



**PRANGOS FERULACEA EKSTRAKTI KAYNAKLI  
HEPATİK ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE  
KARŞI KANNABİNOİD TİP2 RESEPTÖR AGONİSTİ  
JWH-133'ÜN ETKİSİ**

**MESUT ÇELİK**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Halil DÜZOVA**

**Yüksek Lisans Tezi -2020**

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PRANGOS FERULACEA EKSTRAKTI KAYNAKLI HEPATİK  
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE KARŞI KANNABİNOİD TİP2  
RESEPTÖR AGONİSTİ JWH-133'ÜN ETKİSİ**

**Mesut ÇELİK**

**Fizyoloji Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Halil DÜZOVA**

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TYL-2019-1930 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA**

**2020**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Karaciğer Anatomisi .....	3
2.2. Karaciğer Histolojisi .....	3
2.2.1. Karaciğer Lobülleri.....	4
2.2.2. Hepatositler .....	6
2.3. Karaciğer Fizyolojisi.....	7
2.3.1. Metabolizma .....	7
2.3.2. Detoksifikasyon .....	8
2.3.3. İmmün İşlevler .....	8
2.3.4. Karaciğer Enzimleri .....	9
2.4. Hepatotoksisite.....	10
2.4.1 Bitkisel Hepatotoksisite .....	10
2.6. Sitokinler.....	15
2.6.1. İnterlökin-17(IL-17) ve İnterlökin-23(IL-23).....	15
2.7. Apiaceae Familyasının Genel Özellikleri .....	16
2.7.1. Prangos Ferulacea'nın Genel Özellikleri .....	17
3. MATERYAL VE METOT .....	21
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Planının Oluşturulması .....	21
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	21

3.2.1. Hayvanların Ağırlıklarının Ölçümleri .....	22
3.2.2. Deney Süreci ve Protokolü .....	22
3.3. P.Ferulacea Bitkisinin Ekstraktının Elde Edilmesi.....	24
3.4. Deneyin sonlandırılması ve doku örneklerinin toplanması .....	26
3.5. Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	27
3.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ile CHOP, GRP78, ATF4, IL-17, IL-23 Ölçümü .....	27
3.7. Histopatolojik İnceleme .....	28
3.8. İmmünohistokimya .....	29
3.9. İstatistiksel Değerlendirme .....	29
3.9.1. Vücut Ağırlıkları, Biyokimya ve ELISA Sonuçları İçin İstatistiksel Değerlendirme .....	29
3.9.2. Histolojik İnceleme İçin İstatistiksel Değerlendirme .....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Hayvanların Haftalık Kilolarının Ölçüm Sonuçları.....	31
4.2. IL-17 ve IL-23 Düzeylerinin Analizi.....	32
4.3. GRP78, CHOP ve ATF4 Proteinlerinin Analizi .....	32
4.4. ALT ve AST Enzimlerinin Analizi.....	33
4.5. Histolojik Bulgular .....	34
5. TARTIŞMA .....	39
5.1. Sıçanların Vücut Ağırlığı ve Vücut Ağırlık Değişimlerinin Değerlendirilmesi.....	39
5.2. Sıçanlarda Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi.....	40
5.3. Endoplazmik Retikulum Stresi Belirteçleri ve IL-17 ile IL-23 Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	41
5.4. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme .....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR .....	47
EKLER.....	54

EK 1. Özgeçmiş .....	54
EK 2. Etik Kurulu Onayı .....	55



## TEŞEKKÜR

TYL-2019-1930 numaralı yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca tecrübeleriyle bana yol gösteren, tezimin her aşamasına destek veren, sevgi ve saygı duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Halil DÜZOVA başta olmak üzere eğitimim ve iyi bir akademisyen olmam konusunda benim için çok değerli emekleri olan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma,

Çalışmamın histolojik analizlerinin yapımında destek ve katkısını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE'ye, yine tezimin ELISA analizlerinde kıymetli yardımlarını gördüğüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Başak KAYHAN hocalarıma, Zeynal Mete KARACA'ya ve Uzm. Dr. Ali Rıza ÇALIŞKAN'a,

Tezimin bazı aşamalarında değerli katkılarını gördüğüm İnönü Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Turan ARABACI ve Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN hocalarıma, ayrıca Bingöl Üniversitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. İbrahim Halil GEÇİBESLER'e,

Deney aşamasında yine yardımlarını gördüğüm Kübranur KORKMAZ'a, Faruk DİŞLİ'ye, M.Yusuf ÖZER'e, Gül Büşra KAYA'ya, Engin KORKMAZ'a, Mehmet Akif DEMİR'E, Onur ÖZKAYA'ya, ve eğitimimdeki zor zamanlarımda bana destek olan değerli çalışma arkadaşlarıma,

Burada ifade edemeyeceğim kadar benim için fedakarlıkları ve üzerimde emekleri olan değerli aileme ve kıymetli eşime,

Sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

**Mesut ÇELİK**

## ÖZET

### **Prangos Ferulacea Ekstraktı Kaynaklı Hepatik Endoplazmik Retikulum Stresine Karşı Kannabinoid Tip2 Reseptör Agonisti Jwh-133'ün Etkisi**

**Amaç:** Apiaceae familyasına ait *Prangos ferulacea* (PF) bitkisi ülkemiz dahil olmak üzere dünyada birçok yerde yetişmekte ve yaygın olarak tüketilmektedir. Bu kullanımlarından dolayı hepatotoksik vakalar da bildirilmesine karşın bu toksik etkisini tam olarak ortaya koyan çalışmalara fazla rastlanılmamaktadır. Bu çalışmanın amacı; *P. ferulacea* bitkisinin hepatotoksik etkisinin olup olmadığına bakmak, varsa bu etkinin ER stresi ve proinflamatuvar sitokinlerle ilişkisini incelemek, oluşabilecek bu toksisiteye JWH-133'ün etkisi değerlendirmektir.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada 8-10 haftalık olan *Wistar albino* cinsi erkek sıçanlar kullanıldı (n=37). Hayvanlar rastgele atama yöntemine göre 4 gruba ayrıldı: Grup-1 kontrol grubunu oluşturan sıçanlardan, grup-2 PF hidroalkolik ekstraktı (PFE) enjekte edilen sıçanlardan, grup-3 PFE ve kannabinoid tip2 reseptör agonisti olan madde (JWH- 133) enjekte edilen sıçanlardan, grup-4 ise sadece JWH-133 enjekte edilen sıçanlardan oluşturuldu. Çalışma sonunda sıçanlar kurban edildi. Kan serumundan ALT ve AST düzeyleri ölçüldü. Karaciğer dokusunun yarısından elde edilen homojenatlardan ELISA yöntemiyle CHOP, GRP78, ATF4, IL-17 ve IL-23 değerlerine bakıldı. Alınan karaciğer dokusunun diğer yarısında ise dokular hematoxilen-eozin boyasıyla histolojik olarak ve Kaspaz-3 boyama yöntemiyle de immünohistokimyasal olarak incelendi. Sonuçlar uygun istatistiksel yöntemlerle hesaplandı.

**Bulgular:** Yaptığımız çalışma sonunda PFE enjekte edilen hayvanların vücut ağırlığı anlamlı olarak düşük bulundu.(p<0.05) Karaciğer homojenatlarında bulunan ER stresi belirteçlerinde (CHOP, GRP78, ATF4) ile IL-17 ve 23'te gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Karaciğer enzimlerinden ALT ve AST seviyelerinde yine anlamlı fark görüldü(p<0.05). Yapılan immünohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmelerde de PFE gruplarında kaspaz-3 pozitif olduğu ve doku hasarında belirgin olarak artış olduğu görüldü (p<0.05). Buna karşın PFE ile birlikte JWH-133 uyguladığımız hayvanlarda ise doku hasarında belirgin iyileşme gözlemlendi (p<0.05).

**Sonuç:** Çalışmamızda *Prangos ferulacea* bitkisinin histopatolojik olarak karaciğer hasarını belirgin olarak arttırdığı buna karşın ER stresine belirgin bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Bunun yanında oluşan hasara karşı JWH-133'ün iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Endoplazmik Retikulum Stresi, *Prangos Ferulacea*, Kaspaz-3, JWH-133, Hepatotoksisite.

## ABSTRACT

### **Protective Effect of Canaboid Type 2 Receptor Agonist(JWH-133) Against Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Prangos Ferulacea Extract**

**Aim:** The *Prangos ferulacea* (PF) plant, belonging to the Apiaceae family, is grown and widely consumed in many places around the world, including our country. Although hepatotoxic cases have been reported due to these uses, studies that fully reveal this toxic effect are not encountered. The purpose of this study was to examine whether P. ferulacea plant has hepatotoxic effect, and evaluate to the relationship of this effect with ER stress and proinflammatory cytokines, as well as the effect of JWH-133 on this toxicity.

**Material and Method:** *Wistar albino* male rats, 8-10 weeks old, were used in the study (n=37). The animals were divided into 4 groups according to the random assignment method: from the rats forming the group-1 control group, from the rats injected with the PF hydroalcoholic extract (PFE) group-2, from the rats injected with PFE and cannabinoid type2 receptor agonists (JWH-133) group-3. Group-4 included rats injected only with JWH-133. At the end of the study, rats were sacrificed. ALT and AST levels were measured from blood serum. From the homogenates obtained from half of the liver tissue, the values of CHOP, GRP78, ATF4, IL-17 and IL-23 were evaluated by ELISA method. In the other half of the liver tissue removed, the tissues were examined histologically with hematoxylin-eosin stain and immunohistochemically by Caspase-3 staining method. The results were calculated using appropriate statistical methods.

**Results:** At the end of our study, the body weight of animals injected with PFE was found to be significantly lower. (P <0.05) There was no statistically significant difference between the groups in ER stress markers (CHOP, GRP78, ATF4) and IL-17 and 23. There was a significant difference in terms of ALT and AST levels compared to that of controls. (P <0.05) In immunohistochemical and histopathological evaluations, it was observed that caspase-3 was positive in PFE groups and there was a significant increase in tissue damage (p <0.05). On the other hand, in animals applied JWH-133 together with PFE, there was a significant improvement in tissue damage (p <0.05).

**Conclusion:** In our study, it was found that *Prangos ferulacea* plant improved histopathologically liver damage significantly, but it did not have a significant effect on ER stress. In addition, JWH-133 has been shown to have a healing effect against damage.

**Keywords:** Endoplasmic Reticulum Stress, *Prangos Ferulacea*, Caspase-3, JWH-133, Hepatotoxicity



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>%</b>	: yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>ALP</b>	: Alkalen fosfataz
<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>ATF4</b>	: Aktive edici transkripsiyon faktör 4
<b>ATF6</b>	: Aktive edici faktör 6
<b>ATP</b>	: Adenin trifosfat
<b>Bax</b>	: Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma 2
<b>BIP</b>	: İmmunoglobulin bağlayıcı protein
<b>CB1</b>	: Kannabinoid tip1
<b>CB2</b>	: Kannabinoid tip2
<b>CHOP</b>	: Enhancer-binding protein homologous protein
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DTT</b>	: Ditiyotreitöl
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	: Ökaryotik başlangıç faktörü 2 $\alpha$
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>ERS</b>	: Endoplazmik retikulum stresi
<b>GGT</b>	: Gama glutamil transpeptidaz

<b>gr</b>	: gram
<b>GRP78</b>	: Glikozla düzenlenen protein 78
<b>H2O2</b>	: Hidrojen peroksit
<b>I/R</b>	: İskemi reperfüzyon
<b>ICAM-1</b>	: Hücreler arası yapışma molekülü 1
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	: İnterferon $\gamma$
<b>IL-4</b>	: İnterlökin-4
<b>IL-5</b>	: İnterlökin-5
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>IL-9</b>	: İnterlökin-9
<b>IL-10</b>	: İnterlökin-10
<b>IL-12</b>	: İnterlökin-12
<b>IL-13</b>	: İnterlökin-13
<b>IL-17</b>	: İnterlökin-17
<b>IL-21</b>	: İnterlökin-21
<b>IL-23</b>	: İnterlökin-23
<b>IRE1</b>	: İnositol-requiring enzyme 1
<b>İBKH</b>	: İlaça bağı karaciğer hasarı
<b>JNK</b>	: c-Jun N-Terminal Kinase
<b>kg</b>	: kilogram
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz
<b>max</b>	: Maksimum
<b>MDA</b>	: Malondialdehit

<b>med/ort</b>	: Ortalama
<b>mg</b>	: miligram
<b>min</b>	: Minimum
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: milimetre
<b>NK</b>	: Doğal katil
<b>nm</b>	: nanometre
<b>NOS-2</b>	: Nitric oxide synthase 2
<b>PERK</b>	: Pankreatik ER kinaz
<b>PF</b>	: <i>Prangos ferulacea</i>
<b>PFE</b>	: Prangos ferulacea ekstraktı
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SE</b>	: Standart hata
<b>SEM</b>	: Tarayıcı elektron mikroskobu
<b>Th1</b>	: Yardımcı T hücreleri 1
<b>Th17</b>	: Yardımcı T hücreleri 17
<b>Th2</b>	: Yardımcı T hücreleri 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör $\alpha$
<b>UPR</b>	: Katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response)
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b><math>\mu</math>l</b>	: mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Klasik karaciğer lobülünün yapısı.....	4
Şekil 2.2. a. Hekzagonal lobül yapısı, b. Lobül kesiti.....	5
Şekil 2.3. Karaciğer asinüsü.....	6
Şekil 2.4. Endoplazmik retikulum (ER) stres mekanizmaları.....	14
Şekil 2.5. IL-17 ve IL-23'ün inflamatuvar yanıtındaki rolleri.....	16
Şekil 2.6. <i>Prangos Ferulacea</i> Bitkisi.....	17
Şekil 2.7. CB2 Reseptörlerinin Karaciğer ve Böbrek ile İlişkisi.....	19
Şekil 2.8. CB2 Reseptör Agonisti JWH-133'ün Kimyasal Yapısı.....	20
Şekil 3.1. Sıçanlara uygulanan işlemlerin zaman çizelgesi.....	23
Şekil 3.2. Sıçanlara uygulanan enjeksiyon işlemi.....	24
Şekil 3.3. <i>P.Ferulacea</i> 'nin alınan herbarium örneği.....	25
Şekil 3.4. <i>P.Ferulacea</i> bitkisinin hidroalkolik ekstraktının elde edilmesinin aşamaları.....	26
Şekil 3.5. Sıçanlardan doku örneklerinin alınması.....	27
Şekil 4.1. Kontrol (A) ve JWH-133 (B) gruplarının histolojik karaciğer dokusu.....	35
Şekil 4.2. PFE grubu histolojik karaciğer dokusu.....	36
Şekil 4.3. PFE+JWH-133 grubu histolojik karaciğer dokusu.....	37
Şekil 4.4. Kaspaz- 3 immunohistokimyasal boyama prosedürü (tüm gruplar için).....	38

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
<b>Tablo 2.1.</b> ER stresini uyaran etkenler.....	12
<b>Tablo 3.1.</b> Sıçanlara uygulanan işlemler.....	23
<b>Tablo 4.1.</b> Başlangıç ve bitiş haftalarında hayvanların kilo değişimleri.....	31
<b>Tablo 4.2.</b> IL-17 ve IL-23 analizlerinin sonuçları.....	32
<b>Tablo 4.3.</b> GRP78, CHOP ve ATF4 analizlerinin sonuçları.....	33
<b>Tablo 4.4.</b> Serum ALT ve AST seviyelerinin analiz sonuçları.....	33
<b>Tablo 4.5.</b> Gruplar arasındaki histopatolojik hasar tablosu.....	35

# 1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca bitkiler yaygın olarak besin maddesi olarak kullanılmasının yanında çeşitli hastalıkları iyileştirmek amacıyla da kullanılmıştır. Bu durum bitkiler konusundaki merakı da beraberinde getirmiştir. Günümüze kadar bitkilerin kullanımının artışına paralel olarak bu konuda yapılan araştırma ve çalışmalar da büyük artış göstermiştir. Bitkiler konusunda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu bitkilerin içerdiği maddelerin etkinliği, bu maddelerin varsa tedavi edici özelliklerinin varlığı ve mekanizmasının ortaya konulması üzerinedir. Bu bitkilerden biri olan Apiacea familyasına ait *Prangos ferulacea* bitkisi de ülkemiz dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Bu kullanımlar çeşitli şekillerde besin maddesi olarak tüketilmesinin yanında çeşitli sağlık sorunlarında da medikal amaçlı olmaktadır. Ancak son zamanlarda P.Ferulacea bitkisini çeşitli yollarla tüketenlerde karaciğer yetmezliği vakalarında artış görülmektedir (1, 2). Ayrıca Hakkari yöresinden bu bitkiyi çeşitli yollarla tüketerek Turgut Özal Tıp Merkezi'ne başvuran yedi vaka tarafımıza bildirilmiştir. Literatür değerlendirildiğinde bu konuda çalışma olamadığı görülmüş ve bu çalışmanın tarafımızca yapılması düşünülmüştür.

P. ferulacea, Güney İran'da yetişen bir bitki olarak gastrointestinal bozukluklar için kullanılan bir türdür. Farsçada Jashir, Türkçede Çakşır gibi isimler taşıyan *Prangos* cinsi, ülkenin pek çok bölgesinde yaygın olarak görülen 15 tür içerir. İran'a ek olarak, bu cinsin diğer türleri Doğu Avrupa, Türkiye, Kafkasya ve Orta Asya'ya dağılmıştır. P. ferulacea, halk tıbbında gastrointestinal bozuklukların yanında sedatif, antienflamatuvar, antiviral, antihelmintik, antifungal ve antibakteriyel amaçlı kullanılmaktadır (3).

Endoplazmik Retikulum(ER), protein sentezi, sekresyon ve zar proteinlerinin üretilmesi ile katlanmasından sorumlu olan organellerden biridir (4). Bir hücrede, ER kapasitesinin üzerinde patolojik veya fizyolojik durumlarda lümende yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimi olması halinde ER protein yükünde bir artış gözlemlenir. Eğer ER protein yükü, ER katlama kapasitesinden fazla ise bu durum yanlış katlanmış proteinlerin birikimine sebep olmaktadır. Bu olay ER stresine yol açmaktadır (5).

Endokannabinoid sistem memelilerde ağrı, iltihap, iştah ve psikoaktivite gibi çeşitli faaliyetlerden sorumludur. Sistem bu etkilerini çeşitli reseptör ve reseptör aracılı

yolaklardan yaratır. Çeşitli doğal veya sentetik maddeler, endokannabinoid sistemde Kannabinoid tip1 (CB1) ve Kannabinoid tip2 (CB2) reseptörlerine bağlanır (6). CB1 esas olarak sinir sisteminde eksprese edilmesiyle birlikte kalp, bağırsak, karaciğer gibi çeşitli periferik dokularda, endotel hücreleri ve adipositler gibi hücrelerde daha az eksprese edilir (6). CB1; beyin hareket, koordinasyon, duyuşsal algı, öğrenme ve hafıza, ödül ve duygular, hormonal fonksiyon ve vücut sıcaklığını kontrol eden bölgelerinde yoğunlaşarak bu işlevleri yerine getirir (7). CB2 reseptörleri büyük ölçüde bağışıklık hücreleri, bademcikler, dalak ve testiste bulunur. Ayrıca, diğer dokularda ve hepatik miyofibroblastlar gibi hücrelerde de daha az oranda eksprese edildiği görülmüştür. Buldukları dokulara uygun olarak immün sistemde ve proinflamasyonda görevleri vardır (7).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda akut karaciğer hasarında fibrojenik hücrelerde eksprese olan CB2 reseptörlerinin aktivasyonu fibrojenik etkiyi azaltarak karaciğer hasarını sınırladığı görülmüştür. CB2 reseptör agonistinin hepatosit apoptozisini azalttığı ve karaciğer rejenerasyonunu artırdığı gözlenmiştir (8).

JWH-133, CB2 agonisti olan selektif bir maddedir. Çakır ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı bir çalışmada beyin dokusunda okadaik asit uygulanarak oluşturulan hasara bağlı olarak artan hücre apoptozunda etkili kaskat yolaklarını aktive eden kaspaz-3 seviyelerinin JWH-133 uygulanmasıyla azaldığı gösterilmiştir. CB2 agonisti olan JWH-133 maddesinin hücre apoptozunu azaltma konusunda yarar sağlayacağı düşünülebilir (9).

Bu çalışmanın amacı, *Prangos ferulacea* bitkisi ekstraktının hepatositler üzerinde ER stresi artırıp artırmadığı, eğer böyle bir etkisi varsa oluşturacağı karaciğer doku hasarı gibi problemleri gidermede CB2 agonisti olan JWH-133'ün etkilerini incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Karaciğer vücutta homeostazisi sağlayan en önemli organlardan biridir. Metabolik işlevlerin sürdürülmesinin yanı sıra ksenobiyotikler, ilaçlar, viral enfeksiyonlar ve alkol gibi endojen ve ekzojen ajanların detoksifikasyonunun sorumludur. İlaçların ve diğer toksik maddelerin karaciğer üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler onun anatomik yerleşimine, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarına bağlıdır (10).

### 2.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, karın boşluğunda bulunan organlardan en büyüğüdür. Ortalama ağırlığı yetişkin bireylerde 1200-1600gr kadardır. Çocuklarda vücut ağırlığının ise %5'ini, yetişkinde %2'sini oluşturmaktadır. Kızıl-kahverengine benzer ve jöle kıvamında bir yapıya sahiptir. Bağ dokusundan yapılmış kuvvetli fibröz bir yapıdan oluşan Glisson kapsülü organı her tarafından sarar ve karaciğer damarları etrafında dokunun içerisine uzantılarını gönderir. Bu fibröz yapı, karaciğerin şeklini korumakla beraber karaciğer dokusunu lob ve lobüllere ayırır (11).

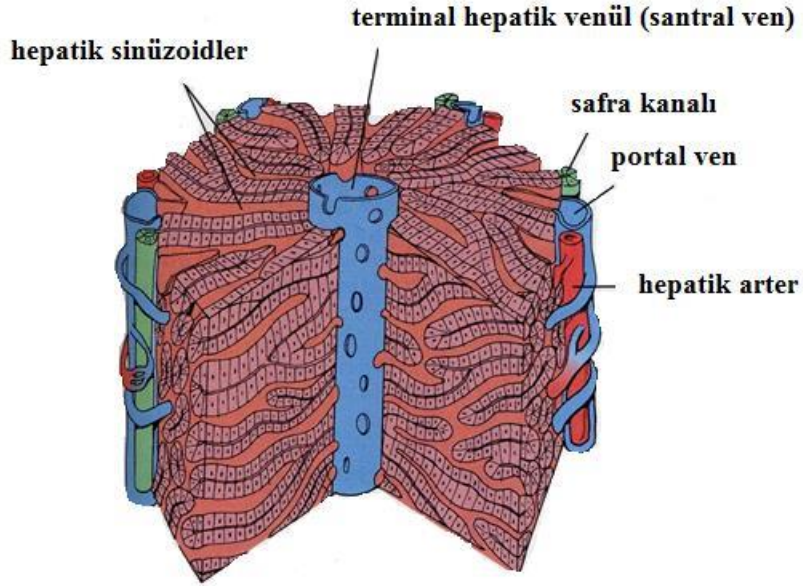
### 2.2. Karaciğer Histolojisi

Parankim, stroma, sinüzoidler ve perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları) karaciğerin yapısal elemanlarıdır. Parankim, hepatosit(karaciğer hücresi) plaklarından oluşmaktadır. Bu plaklar altı yaşına kadar olan bireylerde iki hücre kalınlığındayken yetişkinlerde tek hücre kalınlığındadır. Sinüzoidler ile birbirlerinden ayrılmışlardır. Stroma, bağ dokusu formunda olan ayrıca glisson kapsülüyle devamlılık gösteren yapıdır. Kan damarları, lenf damarları, sinirler ve safra kanalları stroma içerisinde ilerler. Sinüzoidler (sinüzoidal kapiller) hepatosit plakları arasındaki vasküler kanallardır. Perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları) ise karaciğer hücreleri ile sinüzoid endoteli arasında uzanmaktadır. Bu aralıklar kanla hepatositler arasında madde alışverişinin olduğu alanlardır (12).

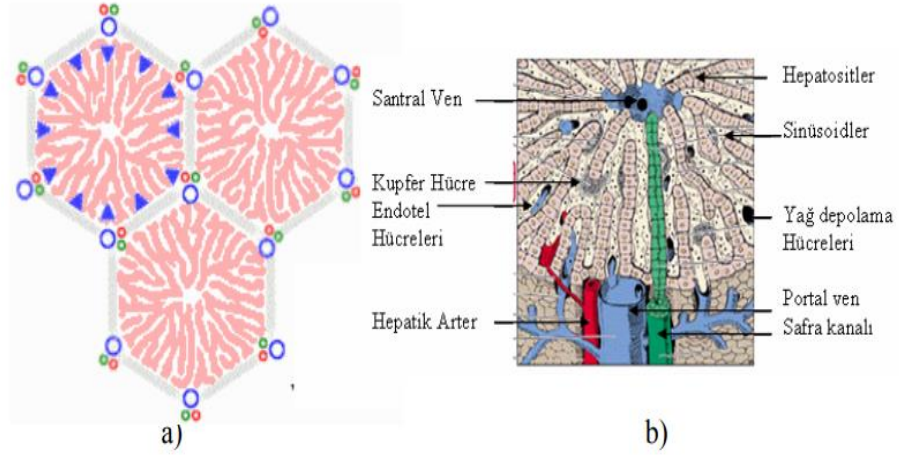


### 2.2.1. Karaciğer Lobülleri

Klasik lobül birbirine bağlanmış hepatosit plak yığınlarından oluşmaktadır. Lobüllerden her biri 2,0 x 0,7 mm boyutlarındadır. Altıgen şeklindeki lobülün merkezinde sinüzoidal kapillerlerin boşaldığı büyük bir venül olan santral ven bulunmaktadır. Hepatosit plakları, sinüzoidler gibi santral venden lobül dışına doğru uzanırlar. Altıgenin köşelerinde portal triadların varlığı ile kendini gösteren gevşek stromal bağ dokusu yapısında portal kanallar bulunmaktadır. Lobülün en dış kısmında yerleşmiş hepatositler tarafından bu kanallar sınırlandırılır. Bu kanalların kenar kısımlarında, bağ dokusu yapısında stroma ile hepatositler arasında periportal bir aralık olan Mall aralığı vardır. Bu kısım karaciğerde lenf sıvısının oluştuğu yerlerdendir (12)(Şekil 2.1.-Şekil2.2.).



Şekil 2.1. Klasik karaciğer lobülünün yapısı (12)



Şekil 2.2. a. Lobülün heksagonal yapısı, b. Lobül kesiti (13)

### Karaciğer Asinüsü

Karaciğer Asinüsü, bu bölgenin patolojilerini açıklamada önemli bir yapıdır. Eşkenar dörtgen şeklinde görünüm göstermekle beraber karaciğer parankiminin en ufak işlevsel yapısını oluşturur. İnsan karaciğerinde toplam 50.000-100.000 adet bulunmaktadır (14, 15). Hepatik lobül, Kiernan tarafından klasik lobül olarak tanımlanan hepatic lobül histolojik olarak üç zona ayrılmıştır:

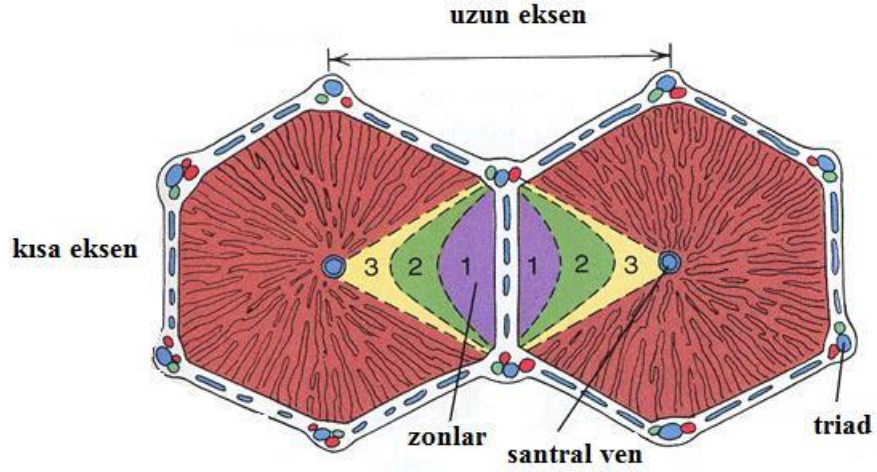
**Zon 1 (periportal zon):** Bu bölüm klasik lobüllerin dışına karşılık gelmektedir. Kısa eksene portal venin ve hepatic arterin dallarından gelen kan desteğine en yakın olan bölümdür.

**Zon 2 (ara zon):** Birinci ve üçüncü zonlar arasında yer almaktadır ancak fazla belirgin sınırları yoktur.

**Zon 3 (perisentral zon):** Bu bölge, klasik lobülün terminal hepatic vene çevreleyen merkezidir. Terminal hepatic vene yakın olan ve kısa eksenden en fazla uzak olan bölgedir (16) (Şekil 2.3.).

Zonlar, hepatositlerin kanlanması ile ilişkili olarak karaciğer dokusunda dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanması ve yorumlanması aşamalarında önem arz etmektedir. İskemik durumlara ve toksik maddelere maruz

kalınması nedeniyle oluşan karaciğer hasarının dağılımı, bu zonlara bakılarak açıklanmaktadır (16).



Şekil 2.3. Karaciğer asinüsü (12)

### 2.2.2. Hepatositler

Karaciğerde bulunan hücrelerin yaklaşık %80'ini oluştururlar. Lobülün anastomozlaşan hücre plaklarını oluştururlar. Çekirdekleri küre şeklinde genişçe olup ve hücrenin merkezindedir. Yetişkin karaciğerindeki çoğu hücrede çift çekirdek bulunduğu görülmüştür (17).

### Kupffer Hücreleri

Monositlerden köken alan makrofaj özellikli hücrelerdir. Transmisyon elektron mikroskobu ve tarama elektron mikroskobu (SEM) bu hücrelerin sinüzoid döşemesinin bir parçası olduklarını göstermektedir. Ferritin formunda demirin ve kırmızı kan hücre bileşenlerinin bu hücrelerin sitoplazmalarında bulunması Kupffer hücrelerinin dalaktan karaciğere doğru gelen hasarlı ya da yaşlanmış kırmızı kan hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görev yapabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca bunun yanında

hemoglobini metabolize etmek, immünolojik olaylarla ilişkili proteinleri salgılamak, kalın bağırsaktan portal kana karışan bakterileri yok etmektir (17).

### **İto Hücreleri (Yağ Depolama Hücreleri)**

Bu hücreler endotelial hücre katmanının alt kısmında, Disse aralığında lokalize olmuştur. Endotelial hücrelere yapışık ya da hepatositlerin mikrovillusları içerisine gömülmüştür. Endotel tabakasının alt kısmında ve sinüzoidlerde uzun sitoplazmik çıkıntıları sahip, hepatositler arasında iletişim kuran hücrelerdir. Bununla birlikte sinir sonlanmaları sayesinde birbirleriyle de bağlantı kurarlar. Bu hücrelerde A vitamininden zengin lipit çökeltileri bulunur (18).

## **2.3. Karaciğer Fizyolojisi**

Karaciğer, metabolizma, depolama, detoksifikasyon ve immün sistemle ilgili birçok fizyolojik işlevde görev alır. Asıl görevi vücuttaki bütün hücreler için enerji substratları sağlamaktır. Bununla birlikte bazı vitamin ve minerallerin yanında karbohidratları glikojen şeklinde depolayabilir (14).

### **2.3.1. Metabolizma**

Karaciğerin karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasındaki asıl görevleri şunlardır:

#### **Karbohidrat Metabolizması**

- Glikojen depolanması ve yıkımı
- Glikoneogenez
- Galaktoz ve fruktozun glikoza dönüştürülmesi
- Karbohidrat metabolizmasının ara ürünlerinden önemli bazı kimyasalların oluşumu

### **Yağ Metabolizması**

- Karbonhidrat ve proteinlerden yağ oluşumu
- Yağ asidi oksidasyonu ile enerji sentezi
- Kolesterol, fosfolipit ve lipoprotein üretimi

### **Protein Metabolizması**

- Plazma proteinlerinin üretimi
- Aminoasitlerin deaminasyonu
- Üre oluşumuyla amonyağın vücuttan uzaklaştırılması (19).

### **2.3.2. Detoksifikasyon**

Karaciğer, birçok uzaklaştırma ve detoksifikasyon reaksiyonlarına katılır. Karaciğerin bu koruyucu yeteneği, ilaç üzerindeki işlevsel grupların ve kimyasal bileşiklerin oksidasyonunu, indirgenmesini ve hidrolizini (Faz I) ve / veya konjugasyonunu (Faz II) katalize etme özelliği olan çok farklı ksenobiyotik biyotransforme enzimlerin ekspresyonundan meydana gelmektedir. Bu enzim sistemlerinin büyük bir çoğunluğunun geniş substrat spesifitesi, izoenzim çokluğu ve indüklenabilirliği ile günlük olarak maruz kaldığımız ortamdaki birçok farklı kimyasal maddeleri işlemek için özellikle iyi adapte olur. Bu konuda amonyak ve etanolün uzaklaştırılması en önemli örneklerdendir (20).

### **2.3.3. İmmün İşlevler**

Kupffer hücreleri, karaciğerde bulunan spesifik fagositik makrofajla intestinal bakterileri içlerine alırlar ve yok ederler (14, 15).

Her ne kadar karaciğer işlevleri metabolik, detoksifikasyon, depolama gibi sınıflara ayrılrsa da hepatositlerin metabolik işlevleri zonlara göre farklılık gösterebilmektedir. Bu yüzden patolojilerin tanımlanmasında zonlar büyük oranda kullanılmaktadır.

Zon 1 (periportal zon) bölgesinde oksidatif enerji metabolizması, aminoasit katabolizması, glikoneogenez, kolesterol sentezi,  $\beta$  oksidasyonu, safra oluşumu öncelikli olarak gerçekleşirken;

Zon 2, zon 1 ve 3'ün işlevsel olarak ara zonu olarak bulunur.

Zon 3 (perisentral zon) bölgesinde glikoliz, glikoneogenez, lipogenez, ketogenez, glutamin oluşumu, ksenobiyotik metabolizması gibi olaylar gerçekleştirilmektedir (19).

### 2.3.4. Karaciğer Enzimleri

Aminotransferazlar karaciğerde hücre nekrozu ve dejenerasyonunun tespitinde sıklıkla kullanılan enzimlerdendir (21, 22). Bu enzimler; Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), Gama glutamil transpeptidaz (GGT), Alkalen fosfataz (ALP) gibi spesifik enzimlerdir.

ALT enzimi, karaciğer hücresi içerisinde yalnızca sitoplazmada bulunan enzimlerdendir. Bu enzim, diğer bazı dokularda düşük düzeylerde bulunduğu için kandaki yüksek seviyeleri karaciğerde oluşmuş bir hasarı düşündürebilmektedir (21, 22).

AST, daha fazla karaciğer, beyin, kalp kası, iskelet kası ve böbrekte bulunan bir enzimdir. Karaciğer, kas ve kalp hücrelerinde oluşan doku hasarı ve travma durumlarında kandaki seviyeleri kısa zamanda artmaktadır (23).

ALP; karaciğer, böbrek, kemik ve plasentada yüksek miktarda bulunmaktadır (24). ALP, karaciğer hücrelerinin sinüzoidal yüzeylerinde ve safra kanalındaki mikrovilluslarda bulunmaktadır (21). ALP artışında ilk olarak bu artışın kaynağının belirlenmesi gerekmektedir. Karaciğer kaynaklı ALP düzeyinin dört kat ve daha fazla artması kolestaz varlığını göstermektedir (25).

GGT, bazı hücrelerin dış kısmında bulunan ve aminoasit reaksiyonları sonucu açığa çıkan gama glutamil artıklarının transfer tepkimelerini katalizleyen bir enzimdir. Serum GGT'nin en büyük kaynağı karaciğer olmakla birlikte beyin kapillerinde, safra epiteline ve böbrek tubüllerinde büyük miktarda sentezlenir (26).

LDH vücuttaki birçok dokuda bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Serumda LDH'nin beş izoenzim formu bulunur ve bunlar çeşitli elektroforetik tekniklerle

ayrılabilir (4). En yavaş göç eden bant karaciğer kökenli izoenzimi ifade eder (7,8). Bu test, karaciğer patolojileri için aminotransferazlar kadar hassas değildir ve izoenzim analizi kullanılsa bile, tanısal özgüllüğü düşüktür. Hemoliz belirteci olarak daha faydalıdır (4). Özellikle iskemik hepatiti viral hepatitten ayırt etmek için kullanılır. İskemik ve toksik hepatitlerde LDH düzeylerinde genellikle belirgin artış gözlenir (27).

ALT ve AST düzeyleri, hepatic hasarın neredeyse tüm çeşitlerinde artabilir. 3 kattan daha az olan yükselişler çoğunlukla karaciğer yağlanması (steatozis) yada kronik viral hepatitlerde gözlemlenirken, 3-20 kat yükselişler akut hepatit yada kronik hepatitin akut alevlenmelerinde görülür. 20 kat ve üstündeki yükselmelerse ağır hepatosellüler nekrozu gösterir ki genel olarak ilaç yada diğer kimyasallardan kaynaklı toksik reaksiyon, şok ve ciddi viral hepatitte görülür. Ciddi hepatosit yıkımının görüldüğü ağır karaciğer hastalığında, enzim salgılayacak kadar hücre kalmadığından ALT ve AST değerleri normal görülebilir. ALT ve AST, karaciğerin yanında iskelet kası, kalp kası, beyin ve böbrekte de bulunur. ALT, karaciğer için daha spesifik bir enzimdir (28).

## **2.4. Hepatotoksisite**

Karaciğerde oluşan dejenerasyon ve fonksiyon bozukluğu hepatotoksisite olarak adlandırılmaktadır. Birçok olumsuz neden karaciğer hasarını oluşturabilir. İlaça bağlı karaciğer hasarı (İBKH) karaciğer işlev bozukluğunun en önemli nedenlerinden biridir. Ayrıca cinsiyet, yaş, beslenme, hepatit B, hepatit C, alkol ve ilaçların birlikte alınımının hepatotoksisitede etkin olduğu bilinmektedir (29).

### **2.4.1 Bitkisel Hepatotoksisite**

Bitkiler birçok açıdan geleneksel ilaçlardan farklıdır. Genel olarak, tek bir farmakolojik ajandan ziyade tipik olarak saf olmayan formlarda ve düşük dozlarda bulunan bileşenlerin karışımlarından oluşurlar. Ayrıca, bitkisel preparatlar genellikle birincil ajan ile yakından ilişkili bileşenler içerir ve bunlar ana ajanın terapötik kullanımı içerisinde kendi etkilerini gösterebilirler. Botanik yanlış tanımlama, ürün kontaminasyonu veya karıştırılması, bitkilerin toplanması ve ekstraksiyon işlemlerinde yanlış uygulamalar gibi nedenler bitkilerden zehirlenmenin nedenleri arasındadır (30).

Karaciğer, bitkisel hepatotoksisite için benzersiz bir risk altındadır, çünkü ilaç biyotransformasyonu için önemli bir bölgedir. Artan sayıda bitkisel ilacın potansiyel olarak hepatotoksik olduğu rapor edilmiştir ve bir dizi farklı mekanizmanın dahil olduğu görülmektedir. Bu nedenle, pirolizidin alkaloidleri, kronik, formlarında fibroz ve siroz ile karakteristik veno-oklüzif hastalık ile sonuçlanan doğrudan doza bağımlı hepatotoksisiteye neden olur. Bitkilerin yapısında bulunan bazı maddeler endoplazmik retikulum stresi, sitokrom P450'nin biyoaktivasyonu, oksidatif stres, mitokondriyal hasar gibi apoptozise neden olan patojenik mekanizmalar bu hepatotoksik etkinin oluşmasına neden olabilir (30).

## **2.5. Endoplazmik Retikulum Stresi**

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, sekresyon ve zar proteinlerinin üretilmesi ile katlanmasından sorumlu olan organellerden biridir (4). Bir hücrede, hücrenin kapasitesini aşan lümende katlanmamış olan ya da bir şekilde yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelmesi halinde ER protein yükünde bir artış gözlemlenir. Eğer ER protein yükü, ER katlama kapasitesinden fazla ise bu durum yanlış katlanmış proteinlerin birikimine sebep olmaktadır. Bu olay ER stresine yol açmaktadır (5).



**Tablo 2.1.** ER stresini uyaran etkenler (31)

---

Hipoksi, iskemi, reperfüzyon

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması, oksidatif stres

Metabolik değişiklikler

Glukoz eksikliği veya hiperglisemi

Besin ve metabolit artışı

Hücre içi kolesterolün artışı

Doymuş yağ asidi artışı

Hücre içi fosfolipitlerin azalması

Kolesterol/fosfolipit oranının artması

Metabolik hız artışı

ATP'nin azalması

Hiperhomosisteinemi

Viral enfeksiyonlar

Hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyon değişiklikleri

ER kalsiyum deposunun boşalması

Protein sentezi ile ilgili değişiklikler

Protein sentezinin artışı

Mutant ve/veya yanlış katlanmış protein yükünün artışı

Posttranslasyonel modifikasyon bozuklukları (Protein glukozilasyonunun veya disülfid bağı oluşumunun bozulması)

Mitokondri hasarı

Hücre içi demir iyonu yükünün artışı

Diğer metal intoksikasyonları (kadmiyum, civa, nikel, kobalt, lantan)

Deneysel (Tunikamisin, tapsigargin, doymuş yağ asitleri, glukoz, DTT,

merkaptotanol, BSA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,) (31)

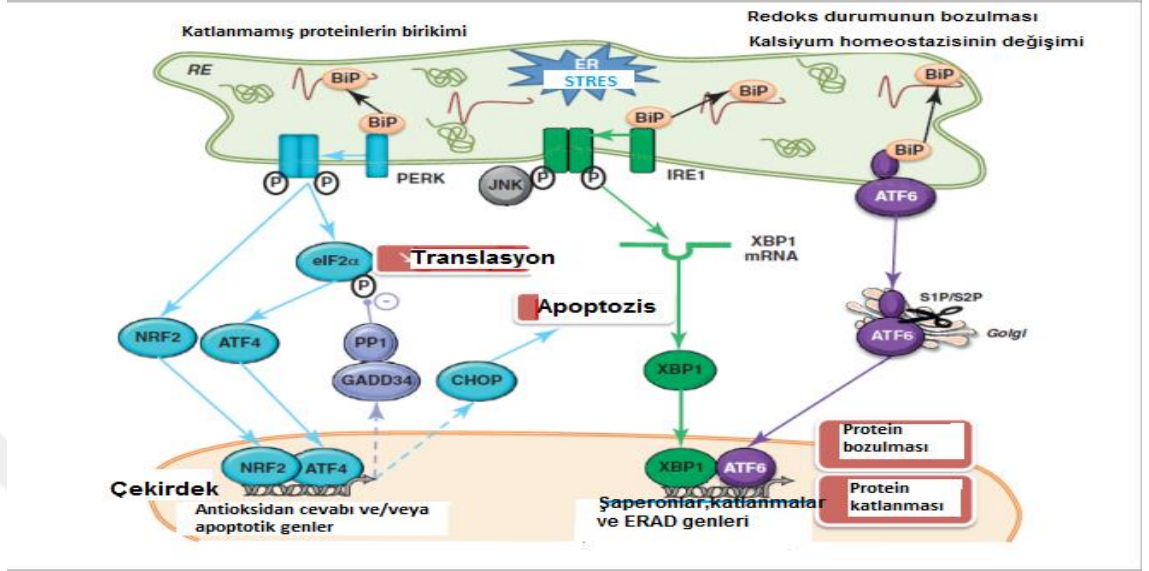
---

ER stresi, bir sinyal iletim yolu olan ve katlanmamış protein yanıtı (UPR-unfolded protein response) olarak isimlendirilen uyarlamalı bir yanıtı tetikler. Bununla birlikte kronik ER stresi altında UPR, apoptoza yol açan sinyalleri ortaya çıkararak hücre ölümüne neden olabilir ya da aşağıda açıklanacak yollar sayesinde ER stresiyle baş edip hücrede gerekli değişiklikleri yaparak hücrenin sağlıklı yaşamına devam etmesini sağlayabilir (32).

UPR, hatalı katlanmış proteinlerin varlığını tespit eden sinyal yollarından oluşmaktadır. UPR'nin aktivasyonu PERK (pankreatik ER kinaz (PKR)-benzeri ER kinaz), ATF 6 (ATF 6 / Aktive edici faktör 6) ve IRE1 (IRE1/ Inositol-requiring enzyme 1) olarak isimlendirilen üç farklı ER stres sensörü tarafından ayarlanmaktadır. PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), ER stres sinyalizasyonunda önemli role sahiptir. PERK yolu ile UPR cevap genlerinin upregulasyonu sağlanır ve hatalı proteinlerin birikimi ile protein translasyonu azaltılır (33). PERK proteinlerin üretimindeki artış nedeniyle eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ /ökaryotik başlangıç faktörü 2 $\alpha$ )'yı ATF4 (aktive edici transkripsiyon faktör 4) yoluyla mitokondriyal apoptozu kontrol eden proapoptotik transkripsiyon faktörü olan CHOP'u (C/EBP homologous protein /CCAAT /enhancer binding protein homologous protein) uyarır (34). CHOP'un güçlü uyarılması hücrenin büyümesinde duraklamaya ve apoptozise sebep olmaktadır. Bu nedenle CHOP, ER stresinde hücrede apoptozisin aktive olmasında önemli rol oynar. ATF4 birçok hücre çeşidinde fazla miktarda eksprese edilir. Ama ER stresi sırasında eIF2 $\alpha$  fosforile olmadan etkin bir biçimde translasyonu gerçekleşemez (35). ATF6 ise ER stresi ile karşılaşıncı posttranskripsiyonel modifikasyona uğrar ve ER katlama kapasitesini yükselterek bu duruma karşı korunma sağlanmaya çalışır (36).

ER stresine karşı koruyucu etkisi olan bir başka protein de glikozla düzenlenen protein 78(GRP78) yada diğer adıyla immunoglobulin bağlayıcı protein (BIP)'dir. Proteinin ER'ye taşınmasının regüle edilmesi, protein katlanmasının yapılması, kalsiyum bağlanması, apoptozisin regüle edilmesi, UPR cevabının oluşturulması, protein kalite kontrolünün test edilmesi, protein katabolizmasının oluşturulması GRP78'in başlıca görevlerindedir (37). GRP78, monomerik veya dimerik formda bulunur. Monomerik formu şekil-1'de görüldüğü üzere şaperon işlevini yerine getirmektedir. GRP78, endoplazmik retikulumun dışında çekirdek ile mitokondride de yer almaktadır. endoplazmik retikuluma kalsiyum düzeyinin düşmesi ve glikozillenmemiş proteinlerin

artması gibi stres durumlarında hücre yaşamının devam ettirilmesinde GRP78 önemli bir pozisyonundadır (4, 38, 39).



Şekil 2.4. Endoplazmik retikulum (ER) stres mekanizmaları (40)

Yaptığımız literatür taramasında yayınların büyük kısmında ortaya konulan olumlu etkilerinin aksine *P. ferulacea*'nın ekstraktından izole edilen bir kumarin olan ostolün insan karaciğer hücre kültürüne uygulanmasıyla hücre canlılığının azaldığı, apoptoz oranının arttığı ve oksidatif stresin hücre içi markerlarının değiştiği görülmüştür. Bununla birlikte ostol; Bcl-2, Bax, Kaspaz-3/-8/-9 gibi apoptozla ilgili protein seviyelerini arttırmıştır. Bunun yanında ostolün endoplazmik retikulum (ER) stres proteinlerinin (GRP78/BIP, CHOP, Kaspaz-4, IRE1 $\alpha$ , PERK, c-Jun N-Terminal Kinase(JNK), Phospho-c-Jun N-Terminal Kinase (P-JNK) ve ATF4) seviyelerini arttırdığı görülmüştür (41, 42). *P.Ferulacea* bitkisi hepatotoksik etkisini içeriğinde bulunan ostol ve buna benzer maddeler aracılığıyla karaciğer hücrelerinde ER stresini arttırarak gösteriyor olabilir.

## 2.6. Sitokinler

Doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin farklı patojenlerle karşılaşınca oluşturdukları özel sitokinlerin varlığında T hücre reseptörleri ile birlikte (TCR) (sinyal 1) kostimulatuar moleküllerin (sinyal 2) etkileşmesiyle, CD4+ T hücrelerinin efektör T hücrelerine dönüşmesi başlar. Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ve IL-12, yüksek miktarda IFN $\gamma$  salgılayan ve hücre içindeki patojenlerin temizlenmesinde aktif rol üstlenen Th1 hücrelerine dönüşmeyi başlatır. Th2 hücrelerinin farklılaşmasında IL-4 görev alır. Th2 hücreleri de IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 salgılayarak hücre dışı patojenlerin yok edilmesinde, alerjik reaksiyonlarla mücadele edilmesinde aktif rol alır ve B hücrelerinin spesifik antikor üretimine katkıda bulunur (43).

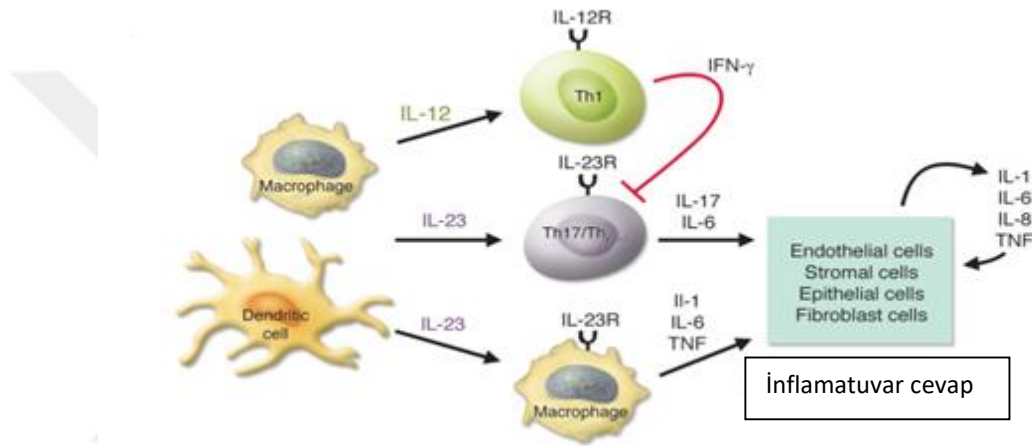
### 2.6.1. İnterlökin-17(IL-17) ve İnterlökin-23(IL-23)

IL-17, T yardımcı hücreleri (CD4 + T hücreleri), sitotoksik T hücreleri (CD8 + T hücreleri), çift negatif (CD4 – CD8 – CD3 +) T hücreleri, gama-delta T hücreleri de dahil olmakla birlikte birçok T hücre alt birimleri tarafından ve buna ek olarak doğal öldürücü (NK) hücreler ve nötrofiller tarafından üretilip salgılanmaktadır. Daha çok IL-17 üreten, ama IL-4 ya da IFN $\gamma$  üretmeyen yeni bir CD4 + T hücresi alt kümesi Th17 hücreleri olarak isimlendirilmiştir. IL-17'nin birçok etkisi mevcuttur ve birden çok hücre tipine etki etmektedir.(60)

IL-17 reseptörlerinin immün hücrelerinin yanında epitel ve endotel hücrelerinde de ekspresyonu yapılmaktadır. Bu reseptörlerden ulaşan IL-17 sinyalleri, inflamasyonlu doku içine monositlerin ve nötrofillerin birikmesine neden olan kemokinlerin (IL-8, monosit kemoatraktan protein-1, büyümeyle ilişkili onkojen protein-alfa) ekspresyonunu arttırmaktadır. Bunun yanında IL-17, hücreler arası yapışma molekülü 1 (ICAM-1) üretilmesini düzenleyerek T-hücresi infiltrasyonunu tetiklemektedir.(60)

Sitokinlerden IL-12 ailesinin bir alt üyesi olan IL-23, ilk kez 2000 yılında; IL-12 ile ortak olarak bir adet de p40 alt birimi ve bir adet p19 alt biriminden oluşan heterodimer bir yapı olarak bulunmuştur. İnterlökin-23 ve Th17 hücreleri arasındaki durumu ortaya koyan kanıtlardan birisi de IL-23'ün aktif T hücrelerinden IL-17 ekspresyonunu yükseltmesidir (44). İnterlökin-23 reseptörü (IL-23R) naif T hücrelerinde yer

almamaktadır. IL-23 reseptörünün, aktive edilmiş veya hafıza T hücre mevcudunun üstünde salgılandığı belirtilmiştir (43). Th17 değişimini gerçekleştiren sitokinlerin (IL-6, TNF $\alpha$  ve IL-21) keşfedilmesi sonrasında IL-23'ün Th17 hücrelerine dönüşme sürecinin ilk aşamalarına girmediği bulunmuştur. IL-23, Th17 hücrelerinin dönüşümünün tamamlanmasında ve hücrelerin aktif olarak kalmasında rol alır. Bunun yanında IL-23 proinflamatuvar düzenleyici sitokinlerin salınımını tetikleyebilir ve Th17 hücrelerinden IL-10 benzeri antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe edebilir (45). Fakat IL-23R'in T hücrelerinde hangi yoğunlukta ve hangi zamanda üretildiği, bunun T hücre işlevlerine etkisi tam olarak bilinmemektedir (45).



Şekil 2.5. IL-17 ve IL-23'ün inflamatuvar yanıtındaki rolleri (46).

## 2.7. Apiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Apiaceae(Umbelliferae) bitki ailesi ilkin on altıncı yüzyılda farklı çiçeklenme formu ile Çin ve Eski Roma'da botanikçilerin dikkatini çekmiştir ve bu familyaya ait çeşitli droglar kullanılmıştır. Büyük kısmı ılıman bölgelerde yayılan kozmopolit bir familya özelliğine sahip ve bugün dünyada bilinen 464 cins ile yaklaşık 3700 türü bulunan Apiaceae familyası, büyük bir familyadır (47). Ayrıca ekonomik değere sahip, ülkemizde de 105 çeşidi ve 485 türü bulunan bu familyanın meyveleri kapalı, kuru ve yarık şizokarp şeklindedir (48). Tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık olabilen bu familyanın bitkileri otsu, odunsu ya da dikenli yapısına ve basit veya bileşik umbella yapısında çiçeklere sahiptir (49).

### 2.7.1. Prangos Ferulacea'nın Genel Özellikleri

Prangos (Umbelliferae) cinsi, dünyada 28 tür bulundurmaktadır. İran-Turan fitocoğrafik bölgesi en önde gelen farklılaşma yeridir. Ülkemizde bulunan takson sayısı 19 olmakla birlikte bunlardan 11 tanesi endemiktir (50).

Apiaceae familyasından *Prangos ferulacea* Güney İran'da yetişir. Bu bitki İran bitkisel ilaçlarında ağırlıklı olarak gastrointestinal bozukluklar için kullanılan bir türdür. Farsçada Jashir, Türkçede Çakşır gibi isimler taşıyan Prangos cinsi, ülkenin pek çok bölgesinde yaygın olarak görülen 15 tür içerir. İran'a ek olarak, bu cinsin diğer türleri Doğu Avrupa, Türkiye, Kafkasya ve Orta Asya'ya dağılmıştır. *P. ferulacea*, halk tıbbında gastrointestinal bozuklukların yanında sedatif, antienflamatuvar, anti-viral, antihelmintik, antifungal ve antibakteriyel amaçlı kullanılmaktadır. Monoterpenler, seskiterpenler, kumarinler, flavonoidler, alkaloidler, tanenler, saponinler ve terpenoidler bu bitkide tanımlanan bazı önemli bileşiklerdir. *P. ferulacea*'nın yağlarının (hem meyve hem de yapraklardaki esansiyel yağları) monoterpen, özellikle  $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen bakımından zengin olduğu gösterilmiştir. Bu bileşenlerin bazıları oksidatif strese karşı antioksidan etkiye sahiptir (3).



**Resim 2.6.** *Prangos Ferulacea* Bitkisi

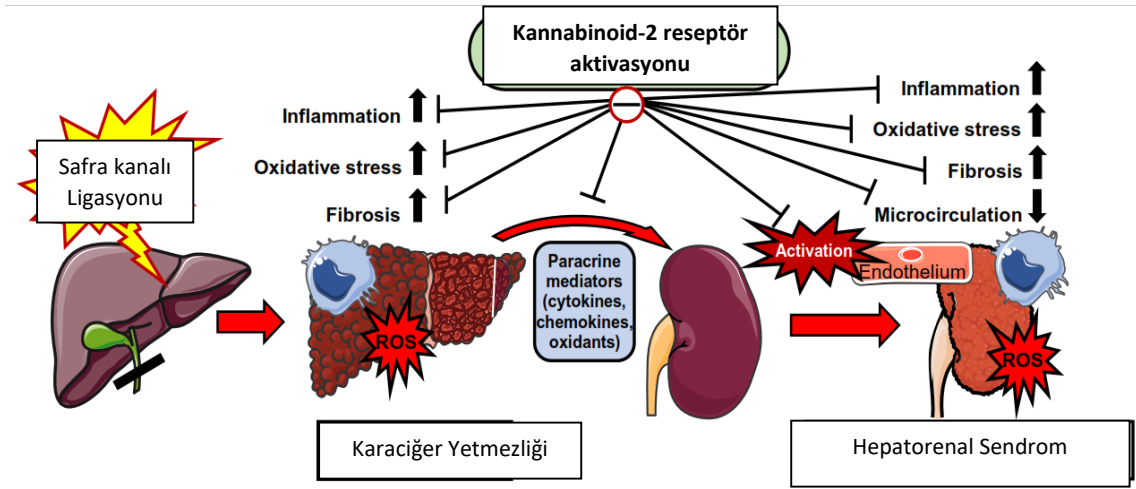
Doğu Anadolu'da özellikle Erzurum yöresinde *P. ferulacea*'nın aromatik yaprak uç kısımları peynirde aroma olarak kullanılır; ayrıca sapı sindirim sistemi düzenleyici,

antidiyabetik ve antihipertansif ajan olarak da tüketilmektedir. Bunun yanında ülkemizde *P. ferulacea*, değerli besin özellikleri nedeniyle hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır (51).

## 2.8. Endokannabinoid Sistem ve Reseptörleri

Endokannabinoid sistem memelilerde ağrı, iltihap, iştah ve psikoaktivite gibi çeşitli fonksiyonlardan sorumlu olan sistemdir ve bu etkilerini çeşitli reseptör ve reseptör aracılı yollardan oluşturur (52). Birçok doğal veya sentetik madde, endokannabinoid sistem reseptörlerine bağlanır. Organik fosfor bileşikleri ile ilgili yapılan son çalışmalar, bu bileşiklerin endokannabinoidlerin parçalanmasından sorumlu olan yağ asidi monoasilgliserol lipaz ve amid hidrolaz üzerinde direkt etki ettiğini göstermiştir. Ana etken maddesi delta-9-tetrahidrokanabinol olan marihuana veya kenevir, kannabinoid tip-1 reseptörü (CB1) ve kannabinoid tip-2 reseptörü CB2 olarak adlandırılan G proteini bağımlı iki tane membran reseptörünü aktive eder (6).

CB1, hareket, koordinasyon, duyuşsal algı, öğrenme, hafıza, duygular, hormonal fonksiyon ve vücut ısısını kontrol eden beyin alanlarında yoğunlaşmıştır ve bulunduğu bölgelere uygun işlevleri yerine getirir. Bununla birlikte cerebellum içinde düşük miktarlarda bulunurken, hipokampus ve beyin korteksinde yüksek yoğunlukta bulunur. Buna karşılık, CB2 büyük ölçüde bağışıklık hücreleri, bademcikler, dalak ve testiste bulunur. Ayrıca, diğer dokularda ve hepatik miyofibroblastlar gibi hücrelerde de daha az oranda eksprese edildiği görülmüştür. Buldukları dokulara uygun olarak proinflamasyon ve immün sistemde görevleri vardır (7).

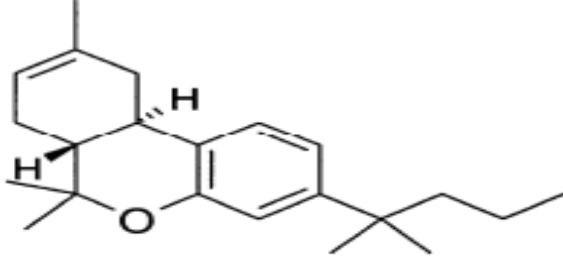


**Şekil 2.7.** CB2 Reseptörlerinin Karaciğer ve Böbrek ile İlişkisi (53)

Karaciğerle ilgili son dönemde yapılan çalışmalarla akut ve kronik hasardan sonra hem Kupffer hücrelerinin hem de karaciğer fibrojenik hücrelerinin uyarıldığı ve bununla birlikte hücrelerde CB2 reseptör miktarının arttığı gösterilmiştir. Söz konusu hücrelerin uyarılması karaciğerde fibrojenik etkiye neden olmaktadır. Teixeira ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada akut karaciğer hasarında fibrojenik hücrelerde CB2 reseptörlerinin aktivasyonu fibrojenik etkiyi düşürerek karaciğer hasarını azaltmıştır. Araştırmada sonuç olarak CB2 reseptör agonistinin karaciğer hücresi apoptozisini azalttığı ve karaciğer rejenerasyonunu artırdığı bulunmuştur (8). Bu bilgiler ışığında P.Ferulacea bitkisinin hepatositler üzerinde ER stresi artırarak oluşturacağı problemleri gidermenin CB2 agonisti olan maddelerin kullanımıyla mümkün olduğu düşünülebilir.

JWH-133, CB2 agonisti olan selektif bir maddedir. Çakır ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı bir çalışmada beyin dokusunda okadaik asit uygulanarak oluşturulan hasara bağlı olarak artan hücre apoptozunda etkili kaskat yolaklarını aktive eden kaspaz-3 seviyelerinin JWH-133 uygulanmasıyla azaldığı gösterilmiştir (9). Bu veriye bakılarak CB2 agonisti olan JWH-133 maddesinin hücre apoptozunu azaltma konusunda yarar sağlayacağı düşünülebilir.





**Şekil 2.8.** CB2 Reseptör Agonisti JWH-133'ün Kimyasal Yapısı (54)

Yukarıdaki bilgiler ışığında P.Ferulacea bitkisinin içeriğinde bulunan bazı maddelerin hepatositler üzerinde ER stresi arttırarak oluşturacağı karaciğer doku hasarı gibi problemleri gidermede CB2 agonisti olan maddelerin (JWH-133 gibi) yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deney Hayvanları ve Deney Planının Oluşturulması

Çalışmaya başlamadan önce İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 2019/A-34 araştırma protokol numaralı onay alındı. Çalışmada 8-10 haftalık olan *Wistar albino* cinsi erkek sıçanlar kullanıldı (n=40). Deney sırasında *P. ferulacea* ekstraktı (PFE) grubundan iki, *P. Ferulacea* ekstraktı + JWH-133(PFE+JWH-133) grubundan bir olmak üzere toplam üç hayvan ölmüştür.

Sıçanlar üzerinde yapılan uygulamalar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Deney süresince sıçanlar kafeslerde  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta, uygun nemde ve 12 saat gece-gündüz döngüsü sağlanmış ortamda barındırılarak ad libitum ile beslendi.

#### 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Hayvanlar rastgele atama yöntemine göre 4 gruba ayrıldı. (n=10). Daha önce yapılmış olan çalışmalar örnek alınarak GRP78 düzeylerindeki değişimin anlamlı çıkabilmesi için %95 güven aralığında ( $\alpha=0,05$ ) ve %80 güç ( $\beta=0,20$ ) ile karşılaştırılması için etki büyüklüğü 0,5989 olarak öngörüldüğünde grup başına alınması gereken minimum hayvan sayısı 10 (on) olarak hesaplanmıştır (55, 56). Hayvanlar bir hafta uyum programına alındı.

1.Grup: Kontrol-sham grubu (n =9)

2.Grup: Sadece JWH-133 maddesi enjekte edilen gruptur. (n=10)

3.Grup: *P.ferulacea* ekstraktı ve JWH-133 maddesi enjekte edilen gruptur. (n=9)

4.Grup: *P.ferulacea* ekstraktı enjekte edilen gruptur. (n=9)

### 3.2.1. Hayvanların Ağırlıklarının Ölçümleri

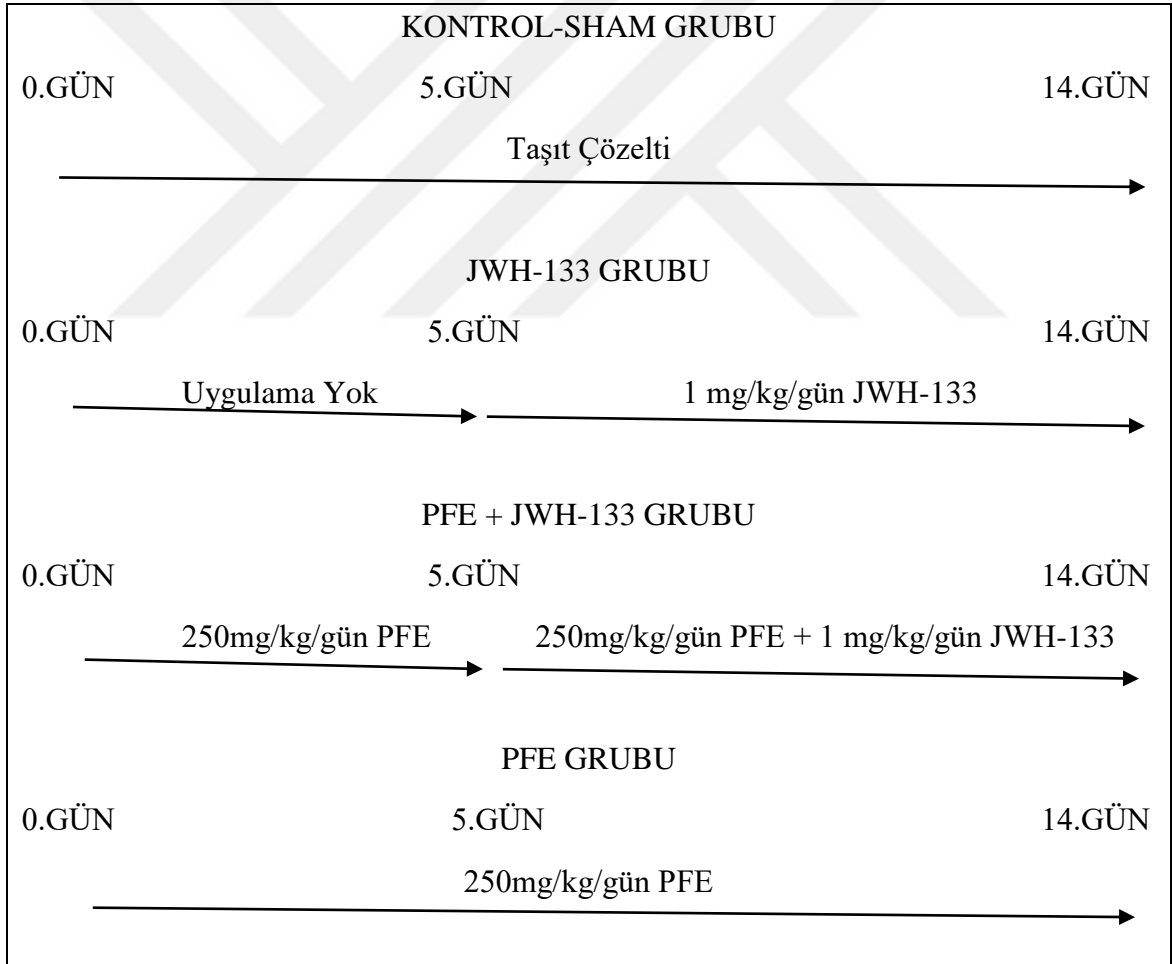
Hayvanlar çalışmaya başlamadan önce, bir hafta sonra ve çalışma sonlandırmadan önce bütün gruplardaki hayvanlar içindeki buldukları kabın darası alınarak tartıldı. Elde edilen veriler not edilerek Excel'e aktarıldı.

### 3.2.2. Deney Süreci ve Protokolü

Kontrol-sham grubundaki (grup-1) sıçanlara normal bakımı devam edilerek çalışma sonuna kadar fosfat tamponu (PBS) ve dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanan taşıyıcı çözelti (PBS(%95)+DMSO(%5)) günlük sıçan başına 1ml intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Tablo 3.1'de gösterildiği üzere grup-2 kapsamındaki sıçanlara çalışmanın 5'inci gününden sonra 1 mg/kg/gün dozunda %5'lik DMSO içinde çözülen ve fosfat tamponunda %99 seyreltilen JWH-133 maddesi intraperitoneal olarak enjekte edildi. Grup-3 deki hayvanlara yine %6 yoğunlukta serum fizyolojik içinde çözülmüş P.ferulacea'nın hidroalkolik ekstraktı 250 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak enjekte edilirken bunun yanında çalışmanın 5'inci gününden sonra DMSO (Sigma Aldrich, USA) içinde çözülen ve fosfat tamponuyla %99 seyreltilen JWH-133 (Axon Medchem, USA) maddesi 1 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak enjekte edildi. Son grubumuz olan grup-4 deki hayvanlara ise %6 yoğunlukta serum fizyolojik içinde çözülmüş P.ferulacea'nın hidroalkolik ekstraktı 250 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak enjekte edildi (6, 57-59). (Şekil 3.1.,Şekil 3.2.)

**Tablo 3.1.** Sıçanlara uygulanan işlemler

Gruplar	Hayvan Sayısı	Uygulanan madde ve Dozu	Uygulama Yapılan Günler
Grup-1(Kontrol-sham)	9	Taşıt çözelti (PBS(%95)+DMSO(%5))	14 gün
Grup-2	10	1 mg/kg/gün JWH-133	Çalışmanın son 9 gününde
Grup-3	9	250 mg/kg/gün PFE	14 gün
		1 mg/kg/gün JWH-133	Çalışmanın son 9 gününde
Grup-4	9	250 mg/kg/gün PFE	14 gün



**Şekil 3.1.** Sıçanlara uygulanan işlemlerin zaman çizelgesi



**Şekil 3.2.** Sıçanlara uygulanan enjeksiyon işlemi.

### **3.3. P.Ferulacea Bitkisinin Ekstraktının Elde Edilmesi**

Hakkari yöresinden toplanan ve İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Turan ARABACI tarafından tanımlanıp herbarium örneği alınarak uygun şartlarda kurutulan *Prangos ferulacea* bitkisinin hidroalkolik ekstraktı Bingöl Üniversitesi İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. İbrahim Halil GEÇİBESLER tarafından uygun kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilmiştir. P. Ferulacea bitkisi uygun boyutlara getirildikten sonra etil alkolden(Sigma Aldrich) geçirildi. Belli bir süre beklendikten sonra içerisinde etkin maddeler bulunan ekstrakt-etil alkol karışımı süzüldü ve evaporatör cihazına (Heidolph Rotary Evaporator, Germany) alındı. Burada karışımdaki alkol uzaklaştırıldı ve ekstrakt elde edildi. Daha sonra ekstrakt oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak kalan son alkolün de uzaklaşması sağlandı (59).(Şekil 3.3, Şekil 3.4)



**Şekil 3.3.** *Prangos Ferulacea*'nın alınan herbarium örneği



**Şekil 3.4.** *Prangos Ferulacea* bitkisinin hidroalkolik ekstraktının elde edilmesinin aşamaları

### 3.4. Deneyin sonlandırılması ve doku örneklerinin toplanması

Yukarıdaki protokole (Tablo 3.1) göre uygulamaya alınmış sıçan grupları, çalışmanın son günü 45 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile anestezi sonrasında kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi. Deney sonunda sıçanların kalbinden kan dokusu örnekleri karaciğer fonksiyon testleri için alındı. Alınan kan örnekleri vakit kaybetmeden 4000 Rpm hız ile 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen serum örnekleri endorf tüplere transfer edilerek -80°C'ye saklandı. Ayrıca karaciğer dokusu örnekleri endoplazmik retikulum stresi indikatörleri ile sitokinleri

değerlendirmesi ve histopatolojik çalışmalar için alındı. Alınan karaciğer doku örneklerinin yarısı histolojik çalışma için % 10 formaldehit içine konuldu. Diğer yarısı ise ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere nitrojen tankına atıldıktan sonra analizler yapılana kadar -80°C derecede saklandı. (Şekil 3.5)



**Şekil 3.5.** Sıçanlardan doku örneklerinin alınması

### **3.5. Karaciğer Fonksiyon Testleri**

Çalışmanın sonunda sakrifiye edilen hayvanların kalplerinden 2 ml civarında kan alındıktan sonra 4000 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Serumlar İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Laboratuvarı'nda alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) değerlerine otoanalizatörde spektrofotometrik-UV ve spektrofotometrik-kalorimetrik yöntemlerle analiz edilerek incelenmiştir (60).

### **3.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ile CHOP, GRP78, ATF4, IL-17, IL-23 Ölçümü**

Çalışma sonunda hayvanlardan alınan dokular fosfat tamponu içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenatlarda İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında Prof. Dr. Başak KAYHAN gözetiminde ELISA yöntemi kullanılarak karaciğer doku homojenatında CHOP, GRP78 ve ATF4 ile IL-17 ve IL-23 düzeyleri ölçülmüştür.



ELISA kiti oda sıcaklığına getirildikten sonra homojenatlar çözününceye kadar bekletildi. Homojenatlar çözüldükten sonra ilk olarak standartlar hazırlandı. Standard çözeltiler seri dilüsyonla seyreltildi. Plate, paketinden çıkarıldı.

Kuyucukların en üst ve en alt bölümü numaralandırıldı. İlk iki sütun standart kuyucuk olarak kabul edildikten sonra diğer numara verilen sütunlar kuyucuklar için hazırlandı. Standard tüplerinden, 50 µl standart çözeltisi alındıktan sonra plate üzerindeki standart kuyucuklarına sırayla eklendi. Her homojenat tüpünden, 40 µl homojenat alındıktan sonra plate üzerindeki numaralandırılan çift tekrarlı kuyucuklara serumlar eklendi. Sadece homojenat kuyucuklarının üzerine ayrı ayrı 10µl anti IL-23 (SunRed,201-11-0126), IL-17 (SunRed,201-11-0116), CHOP (SunRed,201-11-2651), GRP78(SunRed,201-11-0992), ATF4(SunRed,201-11-4967) antibody ilave edildi. Standart çözeltiye biyotin ile antikor içerdiği için standart eklenmedi. Platedeki bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. (Not: std7- BLK hariç) Plate saydam film ile kapatıldı. 60 dk kadar 37°C de etüvde inkübe edildi. Daha sonra yıkama evresine geçildi. İlk olarak Wash Buffer hazırlandı. Daha sonra etüvden çıkarılan plate içindekiler boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 350 µl wash buffer ilave edildi. 30 saniye sonra yavaşça çalkalanarak lavoboya döküldü. Toplamda 5 defa aynı işlem tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra, kuyucuklara ilk olarak 50 µl substrat A çözeltisi sonra 50 µl substrat B çözeltisi ilave edildi. Plate tekrar saydam film ile kapatılıp 10 dk 37°C'de etüvde inkübe edildi. Etüvden çıkan plate içindekiler boşaltılmadan her bir kuyucuğa 50 µl stop çözeltisi eklendi. Bu işlemle mavi renkteki kuyucuklar hızlıca sarı renge döndü. Plate 10 dk içerisinde ELISA cihazına (Bio-Rad,CODA) yerleştirildi ve 450 nm'de okutuldu. Veriler optik yoğunluk ve konsantrasyon grafiği çizilerek en optimum eğri çizildi. Söz konusu hesaplamalar en iyi bilgisayar tabanlı eğri uydurma yazılımı ile yapılabilmektedir. En iyi uyuma çizgisi regresyon analizi ile belirlendi.

### **3.7. Histopatolojik İnceleme**

Çalışmanın sonunda bütün hayvanlar kurban edildi. Her hayvanın karaciğer dokuları alınarak histopatolojik çalışma için %10'luk formaldehit içerisinde 24 saat tespit edildikten sonra saklanan dokulara İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE refakatinde

rutin doku takip işlemleri uygulandı ve alınan doku örnekleri parafin bloklar içinde muhafaza edildi. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen- Eozin boya metoduyla boyandı. Kesitler Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi ile incelendi ve fotoğraflandı (61).

### **3.8. İmmunohistokimya**

Kaspaz-3 yöntemiyle yalnız apoptotik hücrelerde meydana gelen aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yoluyla incelenebilir. Bunun olması için dokunun kaspaz-3 salgıladığının bilinmesi veya incelenen dokuda apoptoza sebep olan ajanın kaspaz-3'e olan etkisinin bilinmesi gerekir. Sadece bu olursa apoptotik hücreler bu yolla belirlenebilir (62). Literatürdeki bu bilgilere dayanarak hücre apoptozunu dolayısıyla hücre hasarını gösteren kaspaz-3 (Thermo Fischer, USA) antikoru uygun boyama ve histokimyasal yöntemlerle İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE gözetiminde değerlendirildi.

### **3.9. İstatistiksel Değerlendirme**

#### **3.9.1. Vücut Ağırlıkları, Biyokimya ve ELISA Sonuçları İçin İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel analizler IBM® SPSS Statistics for Windows Version 22.0 ile yapıldı. Nicel verilerinin tanımlanmasında med(min-max) kullanıldı. Ölçülebilir verilere ilişkin normallik testi Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Tüm grupların ortalama değerleri nonparametrik Kruskal- Wallis testi ile karşılaştırıldı. Grupların karşılaştırılmasında iki bağımsız grup arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Hayvanların çalışma öncesi ve sonrası ağırlıklarındaki değişiklikleri analiz etmek için Wilcoxon W testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi (63).

### 3.9.2. Histolojik İnceleme İçin İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS 13 ve MedCalc programı ile yapıldı. Tüm grupların ortalama değerleri nonparametrik Kruskal- Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Bütün sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SE) şeklinde belirtildi ve  $p < 0.0001$  değerleri istatistiksel bakımdan anlamlı olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hayvanların Haftalık Kilolarının Ölçüm Sonuçları

Çalışmaya başlamadan önceki hayvan ağırlıkları kıyaslandığında, tüm grupların arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

Tablo 4.1.'de gösterildiği üzere tüm gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlere göre çalışma sonrası hayvan ağırlıklarında bazı gruplar kıyaslandığında anlamlı farklar görülmüştür ( $p<0.05$ ). PFE grubunda ve PFE+JWH-133 grubundaki hayvanların kontrol grubundaki hayvanlara göre çalışma sonrası ağırlık değerleri istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Yine PFE+JWH-133 grubundaki hayvanlarla birlikte PFE grubundaki hayvanların ağırlıkları JWH-133 grubundaki hayvanlara kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Sadece PFE verilen gruptaki hayvanların çalışma sonrası ağırlıkları PFE+JWH-133 verilen hayvanlara kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4. 1.** Başlangıç ve Bitiş Haftalarında Hayvanların Kilo Değişimleri (Veriler median, (min-max) şeklinde sunulmuştur.)

	<b>Başlangıç (gr)</b> <b>med (min-max)</b>	<b>Bitiş (gr)</b> <b>med (min-max)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Kontrol-Sham Grubu</b>	452 (423-493)	453 (418-500) <sup>a</sup>	0.965
<b>JWH-133 Grubu</b>	440 (382-504)	428 (372-499) <sup>a</sup>	0.364
<b>PFE+JWH-133 Grubu</b>	453 (385-509)	403 (350-489) <sup>b</sup>	0.015
<b>PFE Grubu</b>	436 (379-478)	356(335-416) <sup>c</sup>	0.001

(Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $p<0.05$ ).)

## 4.2. IL-17 ve IL-23 Düzeylerinin Analizi

Çalışmamızda, tüm gruplardan alınan karaciğer doku homojenatlarında bulunan IL-17 ve IL-23 seviyeleri analiz edilmiştir. ELISA cihazında 450 nm de okunması ile elde edilen sonuçların matematiksel değerleri ve ortalama değerleri ile veri dökümleri tablo 4.2.'de verilmiştir

**Tablo 4. 2.** IL-17 ve IL-23 analizlerinin sonuçları (Veriler median, (minmax) şeklinde sunulmuştur.)

	<b>KONTROL-SHAM</b>	<b>JWH133</b>	<b>PFE+JWH133</b>	<b>PFE</b>	<b>P değeri</b>
	<b>med(min-max)</b>	<b>med(min-max)</b>	<b>med(min-max)</b>	<b>med(min-max)</b>	
	<b>n=9</b>	<b>n=10</b>	<b>n=9</b>	<b>n=9</b>	
<b>IL 17</b>	11.54 (0-26.46)	9.70 (0- 21.72)	12.95 (0- 72.07)	26.11 (0- 62.6)	0.48
<b>IL 23</b>	1.19 (0- 2.78)	1.07 (0.27-4.39)	1.56 (0- 2.34)	1.95 (0-2.87)	0.48

Tabloda görüldüğü üzere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda medyana göre yapılan hesaplamada gruplar arasında bazı farklılıklar olsa da bu farklılıklar anlamlı bulunmamıştır. ( $p>0.05$ )

## 4.3. GRP78, CHOP ve ATF4 Proteinlerinin Analizi

Çalışmamızda karaciğer doku homojenatlarında bulunan GRP78, CHOP ve ATF4 miktarları ELISA yöntemiyle 450 nm de okunarak analiz edilerek gösterilmiştir. (Tablo 4.3)

**Tablo 4.3.** GRP78, CHOP ve ATF4 analizlerinin sonuçları (Veriler median, min-max şeklinde sunulmuştur.)

	<b>KONTROL-SHAM</b>	<b>JWH133</b>	<b>PFE+JWH133</b>	<b>PFE</b>	<b>P</b>
	<b>med(min-max)</b>	<b>med(min-max)</b>	<b>med(min-max)</b>	<b>med(min-max)</b>	<b>değeri</b>
	<b>n=9</b>	<b>n=10</b>	<b>n=9</b>	<b>n=9</b>	
<b>GRP78</b>	1.73 (1.64-2.44)	1.57 (1.31-2.6)	1.77 (1-2.19)	1.88 (1.49-2.11)	0.42
<b>CHOP</b>	1.5 (0-2.7)	1.37 (0-3.31)	1.02 (0.12-2.17)	1.1 (0- 1.68)	0.66
<b>ATF4</b>	0.33 (0.16-0.57)	0.24 (0.15-0.49)	0.29 (0.06-0.56)	0.37 (0.16-0.56)	0.42

Tabloda da görüldüğü üzere yapılan analizlerde gruplar arasında söz konusu maddelerin seviyelerinde istatistiksel anlamlılık görülmemiştir. ( $p>0.05$ )

#### 4.4. ALT ve AST Enzimlerinin Analizi

Yaptığımız çalışma sonucunda tüm grupların kanlarından alınan serumlardaki ALT ve AST seviyeleri kantitatif yöntemlerle belirlenip analiz edilerek Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** ALT ve AST seviyelerinin analiz sonuçları (Veriler median, minmax şeklinde sunulmuştur.)

	<b>KONTROL-SHAM</b>	<b>JWH133</b>	<b>PFE+JWH133</b>	<b>PFE</b>	<b>P Değeri</b>
	<b>med (min-max)</b>	<b>med (min-max)</b>	<b>med (min-max)</b>	<b>med (min-max)</b>	
	<b>n=9 (U/L)</b>	<b>n=10 (U/L)</b>	<b>n=9 (U/L)</b>	<b>n=9 (U/L)</b>	
<b>ALT</b>	63.67(55-72) <sup>a</sup>	57 (46-167) <sup>a</sup>	26 (13-35) <sup>b</sup>	20 (14- 51) <sup>b</sup>	0.00
<b>AST</b>	99 (80-120) <sup>c</sup>	87 (71-202) <sup>c</sup>	49 (36- 64) <sup>d</sup>	48 (39- 73) <sup>d</sup>	0.00

(Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $p<0.05$ ).)

(Not: Sıçanlarda normal referans değerleri ALT: 30-60 U/L, AST: 90-160 U/L (64, 65))

Tabloda da gösterildiği üzere tüm gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlere göre ALT ve AST seviyeleri gruplar arasında anlamlılık göstermiştir. ( $p<0.05$ )

ALT düzeylerinin PFE+JWH-133 verilen grupta kontrol gruba göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu görülmüştür. Yine PFE grubu kontrol grubuna göre, PFE+JWH-

133 verilen grup da JWH-133 verilen gruba göre, PFE verilen grup JWH-133 verilen gruba göre ALT düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur. ( $p<0.05$ )

Aynı şekilde AST seviyeleri karşılaştırıldığında ise PFE+JWH-133 verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Yine PFE grubu kontrol grubuna göre, PFE+JWH-133 verilen grup da JWH-133 verilen gruba göre, PFE verilen grupta JWH-133 verilen gruba göre istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur. ( $p<0.05$ )

#### **4.5. Histolojik Bulgular**

Kontrol ve JWH-133 gruplarında karaciğer dokusunda hepatositler ve portal alan normal histolojik görünümünde izlendi. Karaciğer dokusu, merkezi ven çevresinde belirgin bir şekilde koyu çekirdekleri bulunan ve hücre sınırları düzgün olan, poligonal hepatositlerle bu hücrelerin aralarında uzanarak sinüzoidler bulunduran hepatik lobüllerden oluşmaktadır (Şekil 4.1.).

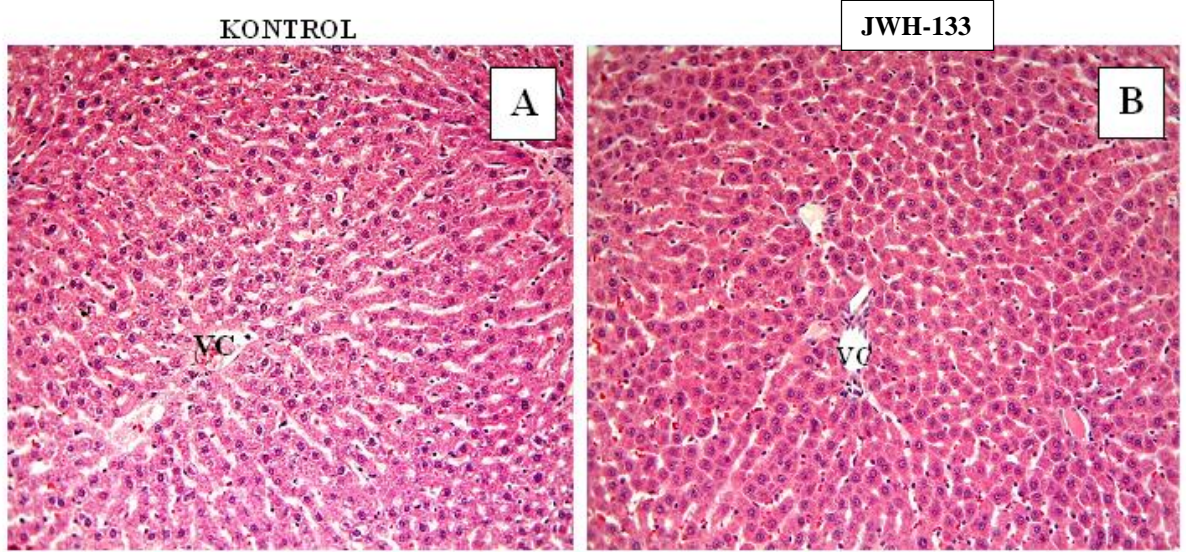
PFE grubunda karaciğer doku örneklerinde glisson kapsülünde kalınlaşma (siyah kalın ok) ve infiltrasyon (beyaz ok) (Şekil 4.2. A), vasküler konjesyon (Şekil 4.2. B, 4.2. 2C), eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hücreler (siyah ince oklar) (Şekil 4.2. B, 4.2. E), hemoraji (siyah kalın oklar) (Şekil 4.2, C, 4.2. E), mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ince oklar) (Şekil 4.2, D), hepatositlerde şişme (Şekil 4.2. E) olduğu gözlemlendi. PFE + JWH-133 gruplarında ise PFE grubunda gözlenen histopatolojik bulgularda azalma olduğu gözlemlendi. PFE + JWH-133 gruplarında az miktarda vasküler konjesyon (siyah kalın oklar) (Şekil 4.3. A), mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ince oklar) ve sinüzoidal dilatasyon (Şekil 4.3. B) olduğu gözlemlendi.

Gruplara göre histopatolojik hasar durumu Tablo 4.5.'da gösterilmiştir. Burada da görüleceği üzere PFE verilen gruplardaki histopatolojik hasar oranı diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ( $p<0.0001$ ). Yine tabloya bakılarak PFE ile birlikte JWH-133 verilen gruptaki oran sadece PFE verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmıştır ( $p<0.0001$ ).

**Tablo 4.5.** Gruplar arasındaki histopatolojik hasar tablosu (Mean ± SE).

<b>GRUPLAR</b>	<b>Histopatolojik hasar (Mean±SE)</b>
<b>Kontrol-Sham</b>	0.56 ± 0.08 <sup>a</sup>
<b>PFE</b>	2.37 ± 0.08 <sup>b</sup>
<b>PFE + JWH-133</b>	1.33 ± 0.11 <sup>c</sup>
<b>JWH-133</b>	0.97 ± 0.10 <sup>a</sup>

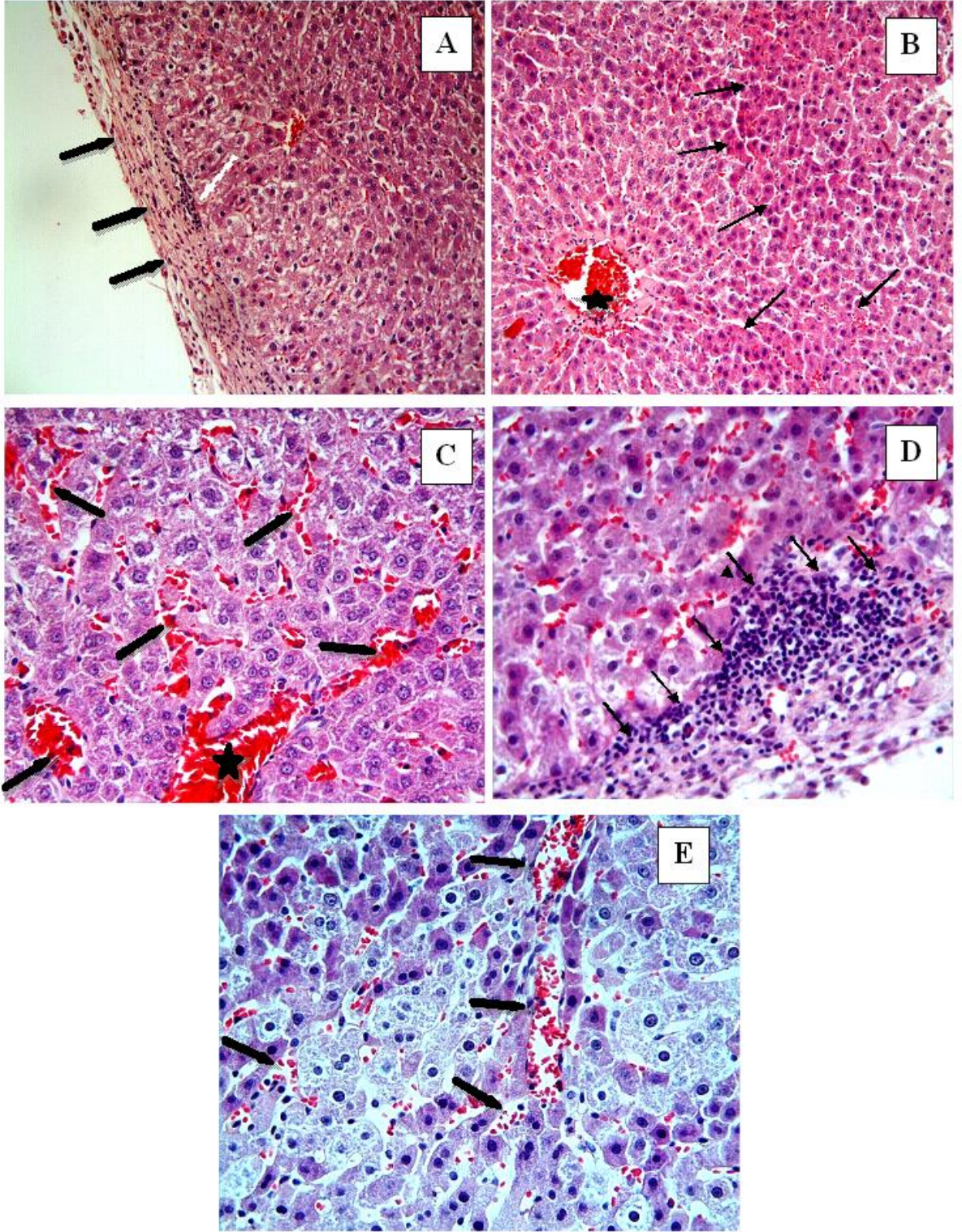
(Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir (p<0.0001).)



**Şekil 4.1.** Kontrol (A) ve JWH-133 (B) gruplarında karaciğer dokusu normal histolojik görünümde gözlemlendi. VC: Vena sentralis, A, B: H-E; X20.

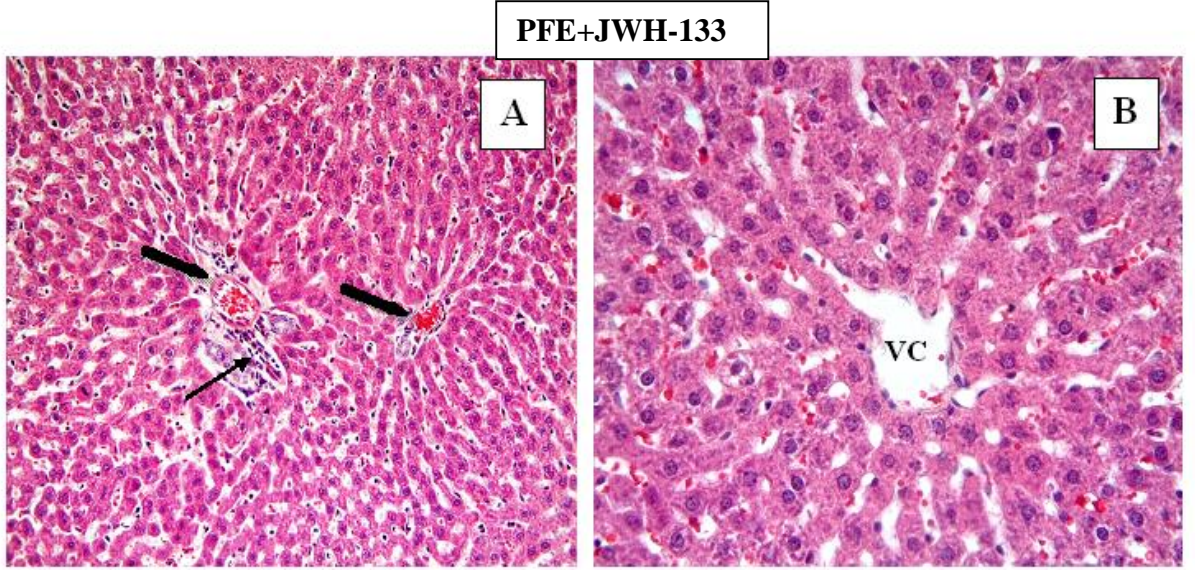


PFE



**Şekil 4.2.** PFE grubunda glisson kapsülünde kalınlaşma (siyah kalın ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) (Şekil 4.2. A), vasküler konjesyon (Şekil 4.2. B, 4.2. C), eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hücreler (siyah ince oklar) (Şekil 4.2. B, 4.2. E), hemoraji (siyah kalın oklar) (C, E), mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah

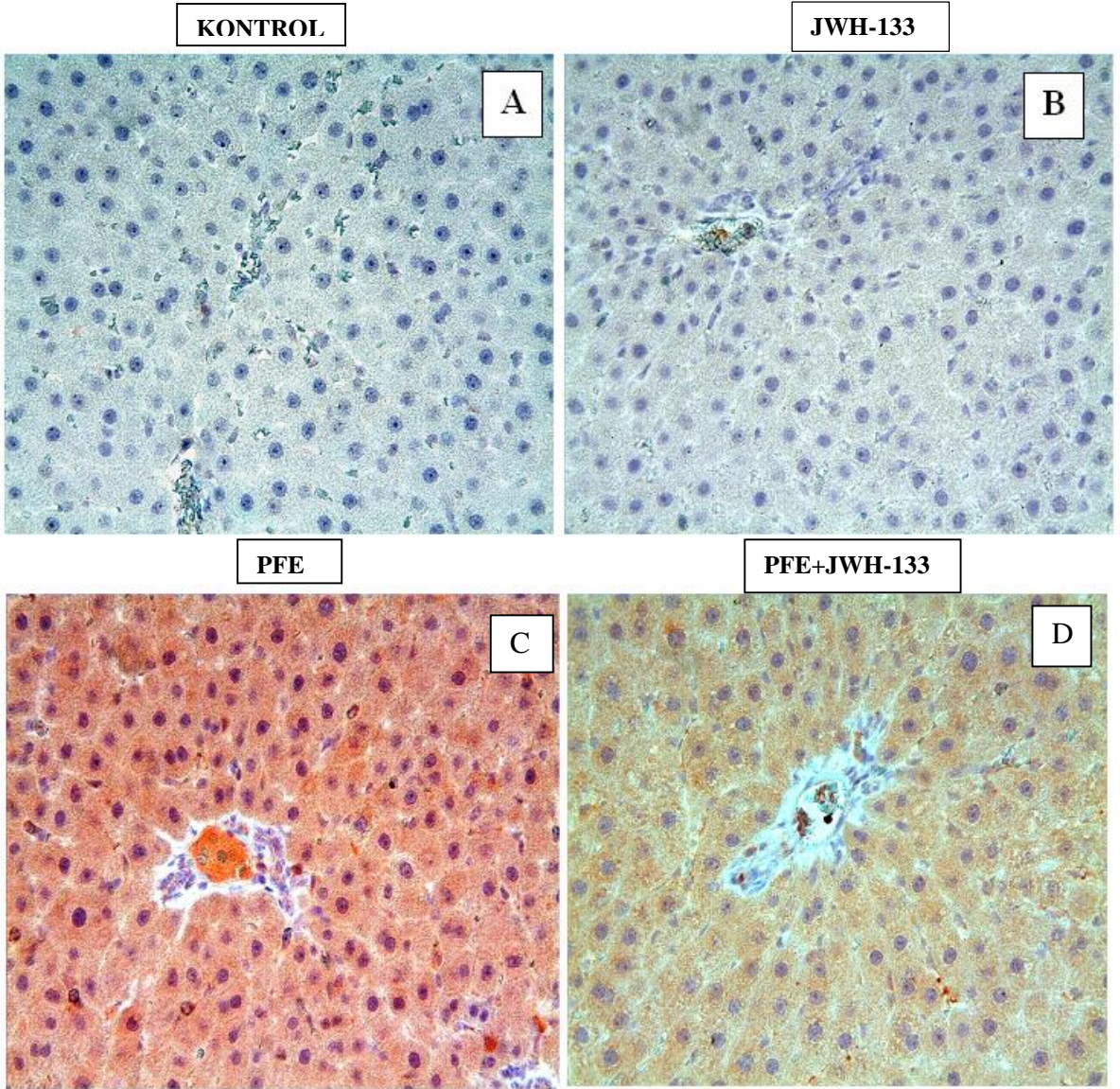
ince oklar) (D), hepatositlerde şişme (E) olduğu tespit edildi. A, B: H-E; X20, C, D, E: H-E; X40.



**Şekil 4.3.** PFE + JWH-133 gruplarında ise PFE grubunda gözlenen histopatolojik bulgularda azalma olduğu gözlemlendi. Az miktarda vasküler konjesyon (siyah kalın oklar) (A), mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ince oklar) ve sinüzoidal dilatasyon (B) olduğu gözlemlendi. A: H-E; X20, B: H-E; X40.

#### 4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol (Şekil 4.4.A) ve JWH-133 (Şekil 4.4.B) gruplarında karaciğer dokusunun immünohistokimyasal incelemelerinde Kaspaz-3 ekspresyonları negatif olarak belirlenmiştir. PFE grubunda karaciğer doku örneklerinde Kaspaz-3'ün yoğun pozitif olduğu (Şekil 4.4.C), PFE + JWH-133 grubunda ise bu pozitiflikte belirgin bir azalma olduğu (Şekil 4.4.D) tespit edildi.



**Şekil 4.4.** Kaspaz- 3 immunohistokimyasal boyama prosedürü. Kontrol (A) ve JWH-133 (B) gruplarında Kaspaz- 3 immün boyama metodu ile herhangi bir pozitiflik gözlenmedi. PFE (C) ve PFE + JWH-133 (D) gruplarında Kaspaz-3 pozitif boyanmış hücreler olduğu gözlemlendi. Pozitif boyanmış hücrelerin PFE + JWH-133 gruplarında PFE grubuna göre belirgin derecede azalma olduğu gözlemlendi.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Sıçanların Vücut Ağırlığı ve Vücut Ağırlık Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda PFE uygulanan hayvanlarda başlangıç kilolarına göre anlamlı bir kilo kaybı olmuştur. Benzer şekilde PFE ile birlikte kannabinoid tip-2 reseptör agonisti olan JWH-133 enjekte edilen hayvanlarda bu kilo kaybının daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum bize kannabinoid tip-2 reseptör agonistinin ve dolayısıyla aktivitesinin kilo kaybını engellediğini göstermiştir. Farokhi ve arkadaşları 4 hafta boyunca uyguladıkları *Prangos ferulacea* bitkisinin ekstrektının diyabetik sıçanlarda yaprak ve gövdede bitkinin köküne göre daha belirgin olmak üzere kilo kaybına neden olduğunu göstermişlerdir (66). Karaciğer, ksenobiyotik metabolizması ve gastrointestinal sistemdeki rolü arasındaki ilişki sebebiyle ksenobiyotik stresin hedef organıdır. Buna benzer stresle bozulmuş karaciğerin homeostazı organizmada vücudun normal fizyolojisini bozabilir. Sıçan ve farelerde sipermetrin benzeri toksik maddelerle yapılmış bazı çalışmalarda maddenin karaciğer, böbrek, mide, bağırsak, dalak ve pankreas gibi çeşitli birçok organda histopatolojik değişiklikler oluşturduğu gösterilmiştir (67, 68). Fareler üzerine yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca farelere sipermetrin uygulanmış, sipermetrin uygulanan grupların başlangıca göre son ağırlıklarında azalma görülmüştür (69). Yine yapılan bazı çalışmalarda da subletal dozda sipermetrin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre hayvanların ağırlık artışları azalmıştır (70, 71). Çalışmamızda da sipermetrinin karaciğer dokusu üzerine olan histopatolojik hasarına benzer bir etki PFE enjekte ettiğimiz hayvanlarda da belirgin olarak görülmüştür. Yaptığımız bu çalışmada *Prangos ferulacea* ekstrektı (PFE) enjekte edilmiş hayvanlarda çalışma sonunda diğer gruplarla kıyaslandığında ciddi ve istatistiksel olarak anlamlı bir ağırlık azalışı olduğu görüldü. Ayrıca yapılan patolojik ve histolojik değerlendirmeler de PFE enjekte edilmiş hayvanlarda ciddi karaciğer hasarı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak PFE'nin yukarıda bahsettiğimiz sipermetrine benzer olarak oluşturduğu karaciğer hasarına bağlı olarak karaciğerin daha önce belirttiğimiz metabolik fonksiyonlarını yerine getiremediği ve bunun sonucu olarak hayvanlarda kilo kaybına neden olduğu düşünülebilir.

## 5.2. Sıçanlarda Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi

Yaptığımız çalışmada sıçanların serum ALT ve AST değerleri kantitatif olarak ölçüldüğünde gruplar arasında anlamlı farklılıklar görüldü. PFE enjekte edilen grup ve PFE+JWH-133 enjekte edilen grupta kontrol grubuna göre ALT ve AST değerleri anlamlı olarak düşük bulundu. Histopatolojik bulgulara bakıldığında ise literatürde karaciğer doku hasarının spesifik göstergesi olarak kabul edilen ALT ve AST miktarlarının artışının (72) olmamasına karşın PFE grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir doku hasar artışı mevcuttu. Bu konuda literatüre baktığımızda çalışmaların büyük kısmının PFE'nin ALT ve AST seviyelerinin azalttığı yönünde olduğuydu. Klinikte ALT ve AST seviyelerinin çok yüksek olduğu *Prangos ferulacea* bitkisi kaynaklı karaciğer yetmezliği vakaları bildirilmiştir (2). Yine *Prangos ferulacea* bitkisiyle benzer içeriklere sahip *Ferula communis* bitkisinin karaciğer hasarına bağlı ALT ve AST seviyelerinin çok yüksek olduğu vakalar bildirilmiştir (73). Buna benzer olarak Mohammadi ve arkadaşlarının *Prangos ferulacea* ekstraktı verdikleri sıçanlarda ALT ve AST seviyelerinin diğer sıçanlara oranla daha fazla yükseldiğini görmüşlerdir (58). Yine *Prangos ferulacea* bitkisinden izole edilmiş bir kumarin olan osthole maddesinin uygulandığı farelerde karaciğer nekrozunun olduğu, serum ALT ve AST seviyelerinin yükseldiği görülmüştür (42). Buna karşın Farokhi ve arkadaşlarının diyabetik sıçanlar üzerine yaptıkları çalışmada *Prangos Ferulacea* hidroalkolik ekstraktının diyabetik sıçanlarda yükselen ALT ve AST değerlerini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (66). Çalışmamızdaki veriler her ne kadar ALT ve AST seviyeleri bakımından literatürdeki birçok çalışmayla benzer olsa da bazı çalışmalardan farklı olduğu görülmüştür. Normalde yapılan birçok çalışmada ALT ve AST seviyelerinin karaciğer hasarıyla direkt ilgili olduğu gösterilse de bizim çalışmamızda bunun aksine histopatolojik olarak anlamlı görülen karaciğer doku hasarına karşın ALT ve AST seviyelerinin artmadığı, tam tersi azaldığı görülmüştür. Yine literatüre bakıldığında ilaç, bitki ya da toksik bir maddeye maruz kalındığında genellikle 1-2 ay içerisinde aminotransferaz yüksekliği gerçekleşebileceği yönünde bilgiler mevcuttur (74). Buna karşın bizim çalışmamızın süresi 14 gün olduğundan dolayı literatürdeki bu bilgiye de dayanarak ALT ve AST değerleri histolojik sonuçlara paralel olarak beklenen değerlerde bulunmamış olabilir. Bununla birlikte karaciğer fonksiyon testlerinin kontrol grubuna göre daha düşük çıkmasının nedeni; i. karaciğer parankim dokusu hasar derecesine bağlı olarak hepatositlerin azalması, ii. uygulanan PFE'nin dozu,

iii. uygulama süresi gibi faktörlere bağlı olabilir (28). Bunlar aminotransferazların değerlerinin yükselmesini engellemiştir şeklinde düşünülebilir.

Endokannabinoid sistem karaciğer hastalıkları gibi birçok yangısal hastalıklarda tedavi için yeni bir hedeftir (75). Avraham ve arkadaşlarının fareler üzerine yaptığı bir çalışmada tiyoasetamidle oluşturdukları akut karaciğer yetmezliğine bağlı artmış serum AST ve ALT seviyelerinin CB2 agonisti HU-308 ile azaldığı gösterilmiştir (76). Benzer sonuçlara hepatik I/R hasarında da ulaşılmıştır. I/R hasarına karşı CB2 agonistleri JWH-133 ve HU-910 kullanılarak plazma AST ve ALT düzeyleri azaltılmıştır (77, 78). Karbontetraklorür (CCI4) ile oluşturulmuş karaciğer hasarında ise CB2 agonisti, yükselmiş serum AST ve ALT miktarını azaltmıştır (8). Çalışmamızda ise her ne kadar histopatolojik olarak PFE'nin oluşturduğu belirgin karaciğer hasarına karşı kannabinoid tip2 resptörü olan JWH-133'ün iyileştirici etkisi anlamlı görülse de PFE grubuyla karşılaştırıldığında sıçanlardan alınan serumlardaki ALT ve AST değerlerinin beklenenin aksine anlamlı olarak düşürmediği görülmüştür. Buna karşın literatürde yapılan taramada çalışmamızdaki gibi CB2 reseptör agonistlerinin ALT ve AST seviyelerini azalmasını gösteren çalışmalara rastlanmadığı için elde sonuçlar başka çalışmalarla kıyaslanamamıştır.

### **5.3. Endoplazmik Retikulum Stresi Belirteçleri ve IL-17 ile IL-23 Seviyelerinin Değerlendirilmesi**

Çalışmamız *Prangos Ferulacea* bitkisinin oluşturacağı karaciğer hasarını endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak incelemeyi ve yine aynı şekilde oluşabilecek bu hasarı yine endoplazmik strese bağlı olarak kannabinoid tip2 reseptör agonisti JWH-133'üne iyileştirici etkisini değerlendirmek için yapılmıştır. Bunun için de ER stresi belirteçleri olan karaciğer dokusundaki CHOP, GRP78 ve ATF4 gibi proteinlerin miktarlarına ELISA yöntemiyle bakılmıştır. Yapılan değerlendirmede çalışmamızda bu proteinlerin seviyesine bakıldığında anlamlı bir fark görülememiştir. Aynı şekilde olası doku hasarının varlığını incelemek için doku hasarında miktarlarının artması beklenen IL-17 ve IL-23 seviyeleri yine değerlendirilmiş ve anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Endoplazmik retikulum (ER), salgı ve transmembran proteinlerinin sentezi, katlanması, olgunlaşması ve translasyon sonrası modifikasyonunda rol oynayan hücre içi

bir membranöz organeldir. Bu nedenle ER, hücre içi homeostazın korunması ve sağlık ve hastalıklar arasındaki dengeyle yakından ilişkilidir. Endoplazmik retikulum stresi (ERS), katlanmamış / yanlış katlanmış proteinler ER ortamının bozulmasından sonra biriktiğinde ortaya çıkar. ERS'ye yanıt olarak hücreler, hücrelerin stresle başa çıkmasına yardımcı olan açılmamış protein yanıtı (UPR) adı verilen uyarlanabilir bir yanıtı tetikler (79). Literatüre bakıldığında Shen ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada Prangos Ferulacea bitkisinin içeriğinde bulunan bir kumarin olan osthole maddesinin ekstraktının uygulanan farelerde karaciğer nekrozuna neden olduğu ve bunun yanında ER stresini arttırdığı gösterilmiştir (42). Çalışmamızda yukarıda belirttiğimiz gibi ER stresi belirteçleri olan CHOP, GRP78 ve ATF4 seviyelerine bakıldığında PFE verilen gruplarla kontrol grupları arasında histopatolojik hasar bulguları belirgin şekilde olmasına rağmen anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu durum *Prangos ferulacea* bitkisinin ve içeriğindeki maddelerin karaciğer üzerine olan nekrotik etkilerini başka yollar ve mekanizmalarla gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir.

Kannabinoidler, iştah, ruh hali, öğrenme / hafıza, ağrı hissi ve inflamasyon gibi fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyen çeşitli bir bileşik sınıftır. Soliman ve arkadaşlarının deri kanseri hücreleri üzerine yaptıkları bir çalışmada CB2 reseptör aktivasyonunun ER stres ve oksidatif stresi azalttığı görülmüş (80). Oksidatif stres ayrıca endoplazmik retikulum (ER) stresinin önemli bir başlatıcısıdır (32). Malondialdehit (MDA), önemli bir oksidatif stres belirteçidir. Yine yapılan bir çalışmada farelerde hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında CB2 agonistinin lipit peroksidasyon üzerine etkisini MDA düzeyine bakarak incelemişlerdir. Çalışmada I/R gruplarında MDA miktarı artmış, I/R ve JWH-133 verilen gruplarda MDA miktarında azalma meydana gelmiştir. Bir diğer çalışmada karaciğer I/R hasarında CB2 agonisti olan HU-308, MDA miktarını azaltarak oksidatif stresi azaltmıştır. Bu çalışmalar CB2 reseptör agonistlerinin hücre sel yangı ile oksidatif stresi sınırlandırdığını ve dolayısıyla ER stresini azaltabileceğini göstermektedir(77, 81). Yaptığımız çalışmada ise her ne kadar JWH-133'ün, PFE'nin histolojik olarak oluşturduğu doku nekrozunu ciddi oranda iyileştirdiği görülse de ER stresine bakıldığında ise anlamlı bir etkisi görülemedi. Yine bu durum JWH-133'ün iyileştirici fibrojenik etkisini, ER stresini azaltma mekanizmasından bağımsız olarak farklı yollar ve mekanizmalarla gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir.

IL-23, saf CD4+ hücrelerinden salınan ve Th17 hücrelerini uyarak IL-17 salgılatan bir proinflamatuvar sitokindir. Yine ağırlıklı olarak aktive edilmiş T hücreleri

tarafından üretilen bir proinflamatuvar sitokin olan IL-17, T hücresi hazırlığını artırır ve IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS- 2, metaloproteazlar ve kemokinler, inflamasyonun indüklenmesi ile sonuçlanır. Doku hasarında inflamatuvar yanıtta seviyeleri artan bu sitokinler doku hasarının göstergesidirler (46). Literatüre bakıldığında *Prangos ferulacea* bitkisinin bu sitokinler üzerine direkt etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda da karaciğer doku homejanatlarında bu sitokinlerin seviyesine bakılmış ve anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

#### 5.4. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Çalışmamızda bulgular kısmında da belirtildiği üzere kontrol ve JWH-133 gruplarında karaciğer dokusunun normal histolojik görünümde olduğu ve immunohistokimyasal incelemelerinde ise Kaspaz-3 ekspresyonları negatif olduğu görülmüştür. PFE grubunda ise glisson kapsülünde kalınlaşma ve infiltrasyon; vasküler konjesyon, eozinofilik boyanmış piknotik çekirdekli hücreler, hepatositlerde şişme, hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik değişikliklerle birlikte fibrotik doku gözlenmiştir. Ayrıca Kaspaz-3' ün yoğun pozitif olduğu görülmüştür. *Prangos ferulacea* ekstraktı uygulanırken çalışmanın 5. gününden itibaren uygulanan kannabinoid tip-2 reseptörü agonisti JWH-133, karaciğer histopatolojisinde belirgin bir iyileşme ve kaspaz-3 pozitifliğinde ise belirgin bir azalışa neden olduğu görüldü. Bu durum JWH-133'ün iyileştirici fibrojenik etkisinden kaynaklı olabilir (8, 82).

Kaspaz-3 yöntemiyle yalnız apoptotik hücrelerde meydana gelen aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yoluyla incelenebilir. Bunun olması için dokunun kaspaz-3 salgıladığının bilinmesi veya incelenen dokuda apoptoza sebep olan ajanın kaspaz-3'e olan etkisinin bilinmesi gerekir. Sadece bu olursa apoptotik hücreler bu yolla belirlenebilir (62). Bu konuda daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında ise *Shokoohinia* ve arkadaşlarının hücre kültürü üzerine yaptıkları bir çalışmada *Prangos ferulacea* bitkisinden izole edilen bir kumarin olan ostolün hücre apoptoz yolaklarını aktive ederek doku hasarını gösteren kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 miktarlarını arttırdığı görülmüştür (83). Yine Shen ve arkadaşlarının hücre kültürü üzerinde yaptıkları bir çalışmada ostolün ER ve oksidatif stresi ile kaspaz 3 ve 9'u arttırıp apoptozis yolaklarını aktive ederek hücre hasarına neden olduğu gösterilmiştir (42). Çalışmamızda ise



histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak literatürdeki bilgileri destekleyici sonuçlara ulaşılmıştır.

Yapılan araştırmalarda, CB2 reseptör agonistlerinin hepatik hasara karşı endotelial hücre aktivasyonunu, adezyon moleküllerini, yangısal sitokinleri, yangısal hücrelerin aktivasyonunu ve adezyonunu azaltarak koruyucu etki oluşturduğu belirtilmektedir (77, 81). Karaciğer için yakın zamanda yapılan çalışmalarla akut ve kronik doku hasarından sonra Kupffer hücreleri ile karaciğer fibrojenik hücrelerinin uyarıldığı ve söz konusu hücrelerde CB2 reseptör miktarının arttığı gösterilmiştir (8, 82, 84). Bu hücrelerin uyarılması karaciğerde fibrojenik etkiyi başlatmaktadır. Akut karaciğer nekrozunda fibrojenik hücrelerde eksprese olan CB2 reseptörlerinin aktive olması ise fibrojenik etkiyi arttırarak karaciğer nekrozunu sınırlandırmıştır. Çalışma sonucu, CB2 reseptör agonistinin hepatosit apoptozisini düşürdüğu ve karaciğer rejenerasyonunu arttırdığı görülmüştür (8). Çalışmamızda PFE verilen hayvanlarda oluşan yaygın karaciğer doku nekrozunu CB2 reseptör agonisti olan JWH-133 maddesinin azalttığı ve belirgin iyileşme sağladığı görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Ülkemizde ve dünyada yaygın olarak çeşitli alanlarda kullanılan ve tüketilen *Prangos ferulacea* bitkisinin yüksek dozlarda karaciğer üzerine toksik olduğu çalışmamızdaki histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerle ortaya çıkarılmıştır. Daha önce bu bitkiyi fazlaca tüketerek sağlık kuruluşlarına başvuran birçok vaka olduğundan, bu bitkinin fazlaca tüketilmesinin engellenmesi bu tarz vakaların önüne geçilmesi konusunda elzemdir.
2. *Prangos ferulacea* bitkisininin kullanılması çalışmamızdaki hayvanlarda ağırlık kaybına neden olmuştur. İleride yapılacak çalışmalar bu durumun mekanizması hakkında bizi aydınlatacaktır.
3. Çalışmamız, *Prangos ferulacea* ekstraktıyla oluşmuş karaciğer hasarına karşı uygulamış olduğumuz Kannabinoid tip2 (CB2) reseptör agonisti olan JWH-133'ün iyileştirici etkisini ortaya koymuştur. Bu yönüyle bu durum, ileride bu ve buna benzer maddelerin karaciğer hasarı oluşturabilecek hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yararlı olabileceğini göstermektedir. Bunun yanında bu konuda CB2 reseptör agonistlerinin tedavide kullanılmasında daha ileri moleküler biyoloji teknikleri ile çalışma yapılmasında fayda vardır.
4. Karaciğer hasarını belirlemede klinikte karaciğer fonksiyon testleri (ALT ve AST değerleri) büyük önem arz etmektedir. Yalnız unutulmamalıdır ki çalışmamızda da gösterildiği gibi bu değerler her karaciğer hasarını tam olarak yansıtmayabilir.
5. Çalışmamızda her ne kadar *Prangos ferulacea* bitkisinin toksik etkisi ve JWH-133 maddesinin bu etkiyi azaltıcı yönü ortaya konulsa da bu durumun mekanizması tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Bu konuda olası yollardan biri olduğunu düşündüğümüz ER stresi belirteçleri anlamlı sonuç vermediğinden gelecekte yukarıda belirttiğimiz toksik ve iyileştirici etkinin mekanizmasının tam anlamıyla ortaya çıkaran çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca ER stresini incelemek için kullandığımız yöntemden (ELISA yöntemi) başka yöntemlerin kullanılması da ileride yapılacak çalışmalarda sonucu anlamlı çıkabilir.

6. Çalışmamızda karaciğer hasarında değişmesi beklenen sitokinlerden olan IL-17 ve IL-23'ün değişmediği gözlenmiştir. Prangos ferulacea bitkisinin karaciğer hasarındaki lokal ve sistemik sitokinlerin rolü ve buna CB2 agonistlerinin etkileri hakkında daha kapsamlı çalışmalarla aydınlatılması gereklidir.
7. Çalışmamızda genel olarak Prangos Ferulacea bitkisi hakkındaki literatürdeki bilgilerin aksine sonuçlara ulaşılmıştır. Bu durum Prangos Ferulacea Ekstrakt'nın uygulanma şekli, dozu, uygulama süresi, bitkinin kullanılan kısmı, bitkinin toplandığı bölge gibi faktörlerin farklılığından kaynaklanmış olabilir.



## KAYNAKLAR

1. Shokoohinia Y, Bazargan S, Miraghaee S, Javadirad E, Farahani F, Hosseinzadeh L. Safety Assessment of Osthole Isolated from Prangos ferulacea: Acute and Subchronic Toxicities and Modulation of Cytochrome P450. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2017, 12(3): 1-9.
2. Dursun H, Albayrak F, Yılmaz Ö, Okçu N. P-006. A case of acute toxic hepatitis associated with Prangos ferulacea. *Turk J Gastroenterol.* 2019, 30(1): S23.
3. Asadi-Samani M, Kafash-Farkhad N, Azimi N, Fasihi A, Alinia-Ahandani E, Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015, 5(2): 146-57.
4. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal.* 2009, 11(9): 2307-16.
5. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 2004, 14(1): 20-8.
6. Tutun H, Baydan E. Cannabinoid receptor type 2 agonist JWH-133 deteriorates the liver toxicity induced by cypermethrin. *Turk J Vet Anim Sci.* 2018, 42(3): 211-21.
7. Cabral G, Raborn E, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.* 2008, 153(2): 240-51.
8. Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, Louvet A, Zimmer A., Tordjmann T, Mallat A, Lotersztajn S. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology.* 2010, 52(3): 1046-59.
9. Çakır M, Tekin S, Doğanyığıt Z, Erden Y, Soytürk M, Çığremiş Y, Sandal S. Cannabinoid type 2 receptor agonist JWH-133, attenuates Okadaic acid induced spatial memory impairment and neurodegeneration in rats. *Life sciences.* 2019, 217: 25-33.
10. Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. *Clinical infectious diseases.* 2004, 38(Supplement\_2): S44-S8.
11. Sancak B. CM. Fonksiyonel Anatomi-Baş Boyun ve İç Organlar: ODTÜ Yayıncılık; 2012.

12. Ross M.H. PW. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas (6 bs.): Palme Yayınevi.
13. Durkut S. Primer sıçan karaciğer hücrelerinin hidrojel yapılı kitosan ve alginat gibi polimerlerde enkapsülasyonu ve in vitro ortamda bazı özelliklerinin incelenmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara, Ankara Üniversitesi 2008.
14. Hall JE. Textbook of Medical Physiology (12 bs.): Nobel Tıp Kitabevleri; 2012.
15. Preston R.R. WTE. Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitapları: Fizyoloji: Nobel Tıp Kitabevleri; 2014.
16. Kiernan F. XXIX. The anatomy and physiology of the liver. *Philos Trans R Soc Lond.* 1833, (123): 711-70.
17. Junqueira LCU, Carneiro J, Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel histoloji: text & atlas: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009.
18. Temel SG, Alpaslan. Karaciğer Yıldızsı Hücreleri (Ito Hücreleri). *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 2002, 22(3): 342-8.
19. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological reviews.* 1989, 69(3): 708-64.
20. Grant D. Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis:* Springer; 1991, 421-30.
21. McIntyre N, Rosalki S. Biochemical investigations in the management of liver disease. *Hepatobiliary diseases:* Springer; 1992. 39-71.
22. Friedman S, Martin P, Munoz J. Laboratory evaluation of the patient with liver disease. *Hepatology, a textbook of liver disease. Philedelphia; Saunders publication.* 2003, 1: 661-709.
23. Ertekin A. Karbontetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan tavşanlarda sialik asit, lipid-bağlı sialik asit, total protein ve bazı spesifik karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 1996.
24. Moss DW. Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clinica chimica acta.* 1997, 257(1): 133-40.
25. Uygun A, Polat Z. Viral hepatit dışı serum transaminaz düzeyinde artışa neden olan hastalıklar. *Güncel gastroenteroloji.* 2009, 13(4): 211-24.

26. Rosalki S, Tarlow D, Rau D. Plasma Gamma-Glutamyl Transpeptidase Elevation In Patients Receiving'enzyme-Inducing Drugs. *The Lancet*. 1971, 298(7720): 376-7.
27. Volkan Bayraktar AMC. Karaciğer Enzim Yüksekliklerine Yaklaşım. *Güncel gastroenteroloji*. 2019, 23/1: 41-7.
28. Parks DA SK, Gelman S, Maze M. Hepatic physiology. Anesthesia Miller RD 5 th ed.2000.
29. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med Overseas Ed*. 2006, 354(7): 731-9.
30. Stedman C. Herbal hepatotoxicity. In Seminars in liver disease Thieme Medical Publishers; 2002, 195-206.
31. Durak MS. Karaciğer Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stresi ile Visfatin Ekspresyonu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2011.
32. Verfaillie T, Rubio N, Garg A, Bultynck G, Rizzuto R, Decuypere J, Piette J, Linehan C, Gupta S, Samali A, Agostinis P. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ*. 2012, 19(11): 1880-91.
33. Colgan SM, Al-Hashimi AA, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert Rev Mol Med*. 2011, 13.
34. Vezzani A. Inflammation and epilepsy. *Epilepsy Currents*. 2005, 5(1): 1-6.
35. Wu Y, Yue Y, Fu S, Li Y, Wu D, Lv J, Yang D. Icariside II prevents hypertensive heart disease by alleviating endoplasmic reticulum stress via the PERK/ATF-4/CHOP signalling pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol*. 2019, 71(3): 400-7.
36. Nishikawa S-i, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *Journal of biochemistry*. 2005, 137(5): 551-5.
37. Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. *Pharmacological research*. 2017, 119: 412-21.
38. Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*. 2012, 29(2): 95-100.

39. Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1994, 4(1): 1-18.
40. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Fougère F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2012, 23(8): 381-90.
41. Sadraei H, Shokoohinia Y, Sajjadi S, Ghadirian B. Antispasmodic effect of osthole and Prangos ferulacea extract on rat uterus smooth muscle motility. *Res Pharm Sci.* 2012, 7(3): 141.
42. Shen Z, Chen J, Lu H. Osthole induced apoptosis in human normal liver cells by regulating cell proliferation and endoplasmic reticulum stress. *Environmental toxicology.* 2019, 34(6): 768-76.
43. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009, 27: 485-517.
44. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry.* 2003, 278(3): 1910-4.
45. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology.* 2007, 8(12): 1390-7.
46. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006, 116(5): 1218-22.
47. Yılmaz G, Kaya A, Koyuncu M. Türkiye’de yetişen Heptaptera marg. & reuter (Apiaceae) türlerinin meyve morfolojisi ve anatomisi. *J. Fac. Pharm. Ankara.* 2016, 40(2): 26-42
48. Hançer ÇKU, Emine Akalın. Apiaceae Familyası Meyve Anatomisindeki “Vitta” Terimi ve Yerleşimleri. *Avrasya Terim Dergisi.* 2017, 5(2): 19-24.
49. Heywood V, Brummitt R, Culham A, Seberg O. Flowering Plant Families of the World. Royal Botanic Gardens, Kew. *Int J Pharmacol.* 2007, 11(7): 874-87.
50. Almurabet EM. Apiaceae Familyasına Ait Bazı Türlerin Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi: Kastamonu Üniversitesi; 2018.
51. Delnavazi M-R, Soleimani M, Hadjiakhoondi A, Yass N. Isolation of phenolic derivatives and essential oil analysis of Prangos ferulacea (L.) Lindl. aerial parts. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2017, 16(Suppl): 207.

52. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* 2008, 7(5): 438-55.
53. Trojnar E, Erdelyi K, Matyas C, Zhao S, Paloczi J, Mukhopadhyay P, Varga ZV, Hasko G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor activation ameliorates hepatorenal syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2020, 152: 540-50.
54. Laine K, Järvinen K, Järvinen T. Topically administered CB2-receptor agonist, JWH-133, does not decrease intraocular pressure (IOP) in normotensive rabbits. *Life sciences.* 2003, 72(7): 837-42.
55. Anapalı M. Fruktöz ve Streptozotocin İle Oluşturulan Diyabet Modelinde Resveratrol ve Vitamin D Tedavisinin Karaciğer ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkileri. Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2018.
56. Thalheimer W, Cook S. How to calculate effect sizes from published research: A simplified methodology. *Work-Learning Research.* 2002, 1: 1-9.
57. Emamghoreishi M, Taghavi A, Javidnia K. The effect of aqueous and methanolic extracts of Prangos ferulacea on formalin-induced pain in mice. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences.* 2011, 9(4): 1-7.
58. Mokhtari M, Mohammadi J. The effect of hydroalcoholic extracts of Prangos ferulacea on blood factors of kidney and liver functions in diabetic male wistar rats. *Galen.* 2012, 2(3): 174-80.
59. Kafash Farkhad N, Farokhi F, Tukmacki A, Soltani Band K. Hydro-alcoholic extract of the root of Prangos ferulacea (L.) Lindl can improve serum glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed.* 2012, 2(4): 179-87.
60. Akarca US. Karaciğer Fonksiyon Testi Yüksekliğine Tamısal Yaklaşım. 9. İç Hastalıkları Kongresi. 2007.
61. Gül Ş, Belge-Kurutaş E, Yıldız E, Şahan A, Doran F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International.* 2004, 30(5): 605-9.
62. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999, 6(2): 99-104.
63. Corp I. IBM SPSS statistics for windows, version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2013.



64. Alshawsh MA, Abdulla MA, Ismail S, Amin ZAJE-bc, medicine a. Hepatoprotective effects of Orthosiphon stamineus extract on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. 2011, 2011.
65. Ayed A-L, Talal ZJJODM. Long-term effects of Nigella sativa L. oil on some physiological parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. 2011, 2011.
66. Farokhi F, Farkhad NK, Togmechi A. Preventive effects of Prangos ferulacea (L.) Lindl on liver damage of diabetic rats induced by alloxan. *Avicenna J Phytomed.* 2012, 2(2): 63.
67. El-Damaty E, Farrag A, Rowayshed G, Fahmy H. Biochemical and histopathological effects of systemic pesticides on some functional organs of male Albino rats. *J Res Appl Sci.* 2012, (November): 5459-69.
68. Maund S, Campbell P, Giddings J, Hamer M, Henry K, Pilling E, Warinton JS, Wheeler JR. Ecotoxicology of synthetic pyrethroids. Pyrethroids: Springer; 2011. p. 137-65.
69. Islam MS, Hoque MM. Clinico-haematological and histopathological features of the Swiss albino mice *Mus musculus* L. in response to chronic cypermethrin exposure.
70. Aldana L, Tsutsumi V, Craigmill A, Silveira MI, De Mejia EG.  $\alpha$ -Tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. *Toxicology letters.* 2001, 125(1-3): 107-16.
71. Nair RR, Abraham MJ, Lalithakunjamma C, Nair ND, Aravindakshan C. A pathomorphological study of the sublethal toxicity of cypermethrin in Sprague Dawley rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis.* 2011, 1(2): 179.
72. Prasanna PL, Renu K, Abilash V. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sciences.* 2020: 117599.
73. Etçioğlu E, Fidan A, Çekiç D, Bilal T, Tozlu M, Eminler AT. Ferula Communis (Çakşır Otu)'in Neden Olduğu Karaciğer Toksisitesi: Vaka Sunumu. *Sakarya Tıp Dergisi.* 2018, 8(3): 674-7.
74. Ersoy O. Karaciğer Enzim Yüksekliğinin Değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal.* 2012, 12(3).
75. Gabbay E, Avraham Y, Ilan Y, Israeli E, Berry EM. Endocannabinoids and liver disease—review. *Liver International.* 2005, 25(5): 921-6.

76. Avraham Y, Zolotarev O, Grigoriadis NC, Pautahidis T, Magen I, Vorobiav L, Zimmer A, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM. Cannabinoids and capsaicin improve liver function following thioacetamide-induced acute injury in mice. *Am J Gastroenterol*. 2008, 103(12): 3047-56.
77. Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey-White J, Jafri A, Hasko G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *The FASEB Journal*. 2007, 21(8): 1788-800.
78. Horváth B, Magid L, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Rajesh M, Park O, Tanchian G, Gao RY, Goodfellow CE, Glass M, Mechoulam R, Pacher P. A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 2012, 165(8): 2462-78.
79. Yang Y, Zhou Q, Gao A, Chen L, Li L. Endoplasmic reticulum stress and focused drug discovery in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. 2020, 504: 125-37.
80. Soliman E, Van Dross R. Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: Receptor-independent endocannabinoid signaling. *Molecular Carcinogenesis*. 2016, 55(11): 1807-21.
81. Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Haskó G, Liaudet L, Gao B, Pacher P. Pivotal Advance: Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2007, 82(6): 1382-9.
82. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Lotersztajn S. Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007, 11(3): 403-9.
83. Shokoohinia Y, Hosseinzadeh L, Alipour M, Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh H-R. Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several coumarins on human cancer cell lines: osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells. *Adv Pharmacol Sci*. 2014, 2014.
84. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*. 2005, 128(3): 742-55.

## **EKLER**

### **EK 1. Özgeçmiş**

**Ad:** Mesut

**Soyad:** ÇELİK

**Doğum Yeri:** BİNGÖL

**Doğum Tarihi:** 01.07.1989

**Adres:** Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

**Cep Telefonu:** (555) 457 77 30

**Yabancı Dil:** İngilizce

**E-Posta Adresi:** mesutcelik@bingol.edu.tr

### **Eğitim Durumu**

**Lisans :** Mustafa Kemal Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü (2010-2014)

**Y. Lisans:** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. (2017-2020)

### **İş Tecrübesi:**

Fizyoterapist - Özel Gökkuşluğu Özel Eğitim ve Reh. Merkezi (2014-2015)

Fizyoterapist - Bingöl Devlet Hastanesi (2015-2019)

Öğretim Görevlisi - Bingöl Üniversitesi (2019- )

## EK 2. Etik Kurulu Onayı



### İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 25.07.2019  
Toplantı Yeri : Tıp. Fak. Toplantı Salonu  
Araştırma Protokol no.su : 2019/A-34  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Sprague Dawley /Wistar Albino  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-10 haftalık

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'n da Prof. Dr. Halil DÜZOVA'nın sorumlu araştırmacı olduğu; "Prangos Ferulacea Ekstraktı Kaynaklı Hepatik Endoplasmik Retikulum Stresine Karşı Canabinoid Tip 2 Reseptör Agonisti JWH133'ün Etkisi" isimli 2019/A-34 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmacının; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmesi şartıyla çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Devret ÖZBAĞ Başkan	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÖR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağrı TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN KATILMADI	 Doç. Dr. Şengül WÜKSEL Üye
 Vet.Hek. Nergin BORKMAZ	 Akın ÖZ Sivil Üye KATILMADI	 Av. M. Umut YALÇIN KATILMADI