

NKUBAP.23.DS.16.055 no'lu Proje

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

YÜRÜTÜCÜ: ÖĞR. GÖR. DR. İHSAN KARABOĞA

ARAŞTIRMACI: YRD. DOÇ. DR. AYŞE HANDAN DÖKMECİ

ÖNSÖZ

Gastrik veya Peptik ülser olarak adlandırılan klinik tablo Dünya üzerinde çok sayıda insanı hayatının bir evresinde etkileyebilen bir hastalıktır. İnsan yaşantısındaki birçok çevresel faktörün bu hastalığın ortaya çıkmasında etkili olduğu bilinmektedir. Klinikte hali hazırda birçok ilaç bu hastalığın tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Dünya üzerinde çok sayıda insanı etkilemesi daha ucuz ilaçların keşfi ve özellikle tedavide daha etkili ajanların kullanılmak istenmesi gibi nedenler konuyu popüler hale getirmektedir. Özellikle insana benzer klinik tabloların görüldüğü deneysel hayvan modelleri yeni ajanların tedavi etkinliklerinin incelendiği çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır.

Günümüzde Türk geleneksel Halk tıbbında farklı hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan bir bitki olan Kantaron (*H. perforatum* (L.)), İngilizce "St. John Wort" olarak bilinmektedir. Literatürde birçok hastalık modelinde antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Planlanan bu çalışmada *H. perforatum*'un etanol ile oluşturulan akut Gastrik mukoza hasar modelindeki tedavi etkinliklerinin farklı yöntemlerle incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Doktora Sonrası Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir. Proje No: NKUBAP.23.DS.16.055.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ	4
TABLolar LİSTESİ	5
1. GİRİŞ	8
2. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3. BULGULAR.....	14
3.1. Ülser Skoruması Bulguları	14
3.2. Histopatolojik bulgular	15
3.3. Anti-PCNA İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	17
3.4. Anti-İNOS İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	19
3.5. TUNEL Boyama Bulguları	21
3.6. ELISA bulguları	22
3.7. Biyokimyasal Bulgular	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
5. KAYNAKLAR	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Gruplara ait mide mukozalarının makroskopik görünüşleri a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı + Etanol, d; <i>H.perforatum</i> + Etanol.....	14
Şekil 2. Mide dokularına ait histolojik görünüşler. a; Kontrol grubu, b; Etanol grubu, c; Zeytinyağı+Etanol grubu, d; <i>H. perforatum</i> +Etanol grubu, Büyütme; 40X, Hematoksilen&Eozin, ok başı; kanama ve mukozal erozyon alanları, ok; ödem.	15
Şekil 3. Mide dokularına ait histolojik görünüşler. a; Kontrol grubu, b; Etanol grubu, c; Zeytinyağı+Etanol grubu, d; <i>H. perforatum</i> +Etanol grubu, Büyütme; 100X, Hematoksilen&Eozin.	16
Şekil 4. Anti-PCNA boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+Etanol, d; <i>H. perforatum</i> +Etanol, immünperoksidaz, Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Büyütme; 200X.	18
Şekil 5. Anti-İNOS boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+Etanol, d; <i>H. perforatum</i> +Etanol, immünperoksidaz, Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Büyütme; 200X.	20
Şekil 6. TUNEL boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+Etanol, d; <i>H. perforatum</i> +Etanol, immünperoksidaz, Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Ok; TUNEL (+) hücre, Büyütme; 400X.	22
Şekil 7. Gruplara ait IL-6 seviyelerinin dağılımı.....	23
Şekil 8. Gruplara ait IL-10 seviyeleri	24
Şekil 9. Gruplara ait MDA seviyeleri	25
Şekil 10. Gruplara ait mide CAT seviyeleri	26
Şekil 11. Gruplara ait SOD değerleri	26

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Gröplara ait ülser indeksi değerleri (%).....	15
Tablo 2. Gröplara ait Anti-PCNA(+) hücre sayıları.....	17
Tablo 3. Gröplara ait Anti-iNOS aktiviteleri.....	19
Tablo 4. Gröplara ait TUNEL(+) hücre sayıları.....	21

ÖZET

Tıbbi bitkilerin kullanıldığı mide ülseri tedavisi, dünya genelinde geleneksel tıbbı oldukça yaygındır. Bu çalışma sıçanlarda absölü alkol ile oluşturulan gastrik ülserde *H. perforatum*'un antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

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

Sonuçlara incelendiğinde, etanol uyarımlı modelde gastrik hasar; yüksek ülser indeksi skoru, yükselmiş proinflamatuvar IL-6 seviyesi, fazla sayıda TUNEL-pozitif hücre, artmış İNOS ifadesi ve yüksek MDA seviyesi bulguları tespit edildi. *H. perforatum* ve Zeytinyağı ile ön tedavi yapılmış gruplarda gastrik lezyonların önemli derecede azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak *H. perforatum* ve zeytinyağının gastrik mukozal ülserasyon riskini azaltmak için potansiyel bir tedavi seçeneği olabilir. *H. perforatum*'un IL-6 ve IL-10'u ifadesini düzenleyerek inflamatuvar sitokinlerin ayarlanması ve antioksidan özellikleriyle mide koyucu özelliklerine katkıda bulunabilir.

Anahtar kelimeler; Gastrik ülser, etanol, *H. perforatum*, zeytinyağı, İNOS aktivitesi

ABSTRACT

Treatment of gastric ulcers with medicinal plants is quite common in traditional medicine worldwide. This study was conducted to evaluate the antiapoptotic and antiinflammatory effect of *Hypericum perforatum* in the rats induced gastric ulcer by absolute ethanol.

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

The results showed that ethanol induced gastric damage, higher gastric ulcer index score, increased proinflammatory IL-6 level, elevated number of iNOS and TUNEL-positive stained cell number as well as higher MDA level in the group II (ethanol). Pre-treatment of *H. perforatum* and olive oil (group III and IV) significantly attenuated the gastric lesions as compared to the group II (ethanol).

It was concluded that *H. perforatum* and olive oil may represent a potential therapeutic option to reduce the risk of gastric mucosal ulceration and the gastroprotective activity of *H. perforatum* might contribute in adjusting the inflammatory cytokines by regulating the IL-6 and IL-10 and its antioxidant properties.

Keywords; gastric ulcer, ethanol, *H. perforatum*, Olive oil, iNOS activity

1. GİRİŞ

Gastrointestinal ülserler, sindirim kanalının özofagustan kolona kadar herhangi bölgesinde ve çeşitli faktörlerin etkisiyle gelişebilir. Peptik ülser mide veya duodenumda, mukoza ve submukozada sınırlı, genellikle 5 mm' den daha büyük çapa sahip mukoza hasarlarıdır (Malfertheiner ve ark., 2009). Mide asidi salgısına karışan sindirim enzimi olan pepsinin, ülser gelişimi için ana sorumlu faktör olarak düşünülmelerinden dolayı hastalık için "peptik ülser" terminolojik ifadesi kullanılmaya başlanmıştır (Bang ve Baik, 2016).

Peptik ülser insan toplumlarında yaklaşık % 5-10 oranında görülen yaygın bir gastrointestinal sistem hastalığıdır (Aihara ve ark., 2003). Yılda 4 milyon insanı etkilediği düşünülmektedir (Zelickson ve ark., 2011). Peptik ülser insidansının %1.5 - arasında olduğu hesaplanmıştır (Chung ve Shelat, 2017). Peptik ülserin önemli etiyolojik faktörleri arasında *H. pylori* infeksiyonu, non-steroid antiinflatuar ilaçlar (NSAID)'in aşırı kullanımı, alkol tüketimi, sigara kullanımı, fizyolojik ve fizyososyolojik stres bulunmaktadır (Behrman, 2005). Özellikle alkol tüketimi ve NSAID ilaçların kullanımı üst gastrointestinal sistem kanamaları riskini artırmaktadır. Alkol çok sık ve yaygın kullanılan bir ajandır ve bu sebeple alkolün sebep olduğu gastrointestinal sistem rahatsızlıklarına sıkça rastlanmaktadır (El-Maraghy ve ark., 2015).

Gastrik ülserler genellikle gastrik mukozal koruyucu faktörler ile mukozanın maruz kaldığı aşındırıcı, agresif faktörler arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Agresif faktörler içerisinde gastrik hidroklorik asit (HCl) salgısı, Reaktif oksijen radikalleri (ROS), mukozal hipoperfüzyon ve alkol tüketimi sayılabilir (Ham ve Kaunitz, 2007). Bunlar içerisinde alkol tüketimi gastrik ülser oluşumuna katkı sağlayan en önemli faktördür ve aşırı alkol tüketimi gastrik mukozal hasar riskini yükseltmektedir (Franke ve ark., 2006). Bundan dolayı etanol uyarımlı gastrik mukoza hasar modelleri, insan gastrik ülserine sebep olan faktörler ve anti-ülser aktivitesine sahip maddelerin incelenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2012).

Etanol uyarımlı gastrik hasarın mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalar etanol ile indüklenen akut gastrik mukoza hasarında lipit peroksidasyonu ve oksidatif stresin önemli role sahip olduğunu göstermektedir (Pan ve ark., 2008). Çok sayıda çalışmada etanol uyarımlı gastrik mukoza lezyonlarının artmış ROS ile ilişkili olduğu ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açarak membranda lipit peroksidasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2012; Takeuchi ve ark., 1991). Malondialdehit (MDA), hücrelerde çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun nihai ürünlerinden biridir. Serbest radikallerin artması MDA' nın fazla üretilmesine neden olur (Gawel ve ark., 2003). Doku MDA seviyesinin belirlenmesi lipit peroksidasyonu hakkında bilgi verir.

ROS oldukça aktiftir; hücre zarı, karbonhidratlar, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerine saldırırlar (Akıncı ve ark., 2017). Vücut hücreleri tarafından üretilen antioksidan enzimler SOD, CAT ve GSH antioksidan aktivite göstererek ROS' un oksitleyici etkisini bastırmaya çalışmaktadırlar. Bu parametrelerin doku seviyelerinin belirlenmesi ROS ilişkili oksidatif stresin belirlenmesinde de kullanılır.

Ayrıca gastrik mukozaya lökosit infiltrasyonu da ülser oluşumunda önem arz etmektedir ve gastrik ülserin şiddetinde önemli rol oynayan proinflamatuvar ve

antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu etkilemektedir (Liu ve ark, 2012). Akut gastrik ülserin patogeneğinde mide mukozasına nötrofil infiltrasyonu kritik bir süreçtir (Elliott ve Wallace, 1998; Liu ve ark, 2012). Etanol uyarımlı nötrofil infiltrasyonu gastrik mukozada lezyon oluşumu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (La Casa ve ark, 2000). Gastrik dokularda nötrofil infiltrasyonu, nötrofil infiltrasyonunun temel göstergeleri olan Miyeloperoksidaz (MPO) ve Nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitelerinin ölçülmesiyle gösterilebilir (Takeuchi ve ark, 1991). Benzer şekilde İnterlökin-6 (IL-6) ve İnterlökin-10 (IL-10) gibi sitokinler akut faz inflamasyonun yanısıra mide ülserinin devamı ve düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Rogler ve Andus, 1998). Bu sitokinlerin doku seviyelerinin belirlenmesi diğer parametrelerle ilişkilendirilerek gastrik inflamasyonun şiddeti hakkında yorum yapılmasına olanak sağlar.

H.perforatum, ülkemizde lokal olarak kantaron; İngilizce "St. John's Worth" adıyla bilinmektedir. Hypericaceae familyası Asya, Kuzey Afrika, Avrupa ve Amerika kıtasında yetişebilmektedir. Ülkemizde bu familyaya ait 80 tür bulunmaktadır (Öztürk ve ark, 1992). *H.perforatum*, ekstraktı bol miktarda flavonoid ve fenolik asit bulunduran önemli bir farmasötik bitkidir (Bayramoglu ve ark, 2014). Literatür incelendiğinde depresyon, yara iyileşmesi, menopozal rahatsızlıklar, yanık tedavisi, baş ağrısı gibi birçok rahatsızlıkta iyileştirici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Kıyan ve ark, 2015; Linde ve ark, 2008). Geleneksel Türk halk tıbbında kantaron, birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Kıyan ve ark, 2015).

Ševčovičová ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, *H.perforatum*'da bol miktarda bulunan Hyperforin'in DNA koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Ocak ve diğ. (2014) deneysel hamster intestinal iskemi reperfüzyon hasar modelinde *H.perforatum*'un koruyucu etkilerini bildirmişlerdir. Castro ve diğ. (2012) yaptıkları deneysel çalışmada *H.perforatum*'un antiinflamatuvar ve serbest radikal temizleyici özelliğini göstermişlerdir. Sindirim sistemi ile ilgili olarak deneysel ülseratif kolitin tedavisinde; kolon doku MDA seviyesini azalttığı, antioksidan enzim SOD, CAT, GSH aktivitelerini artırdığı, histopatolojik bulgularda azalma sağladığı yönünde çalışmalar mevcuttur (Dost ve ark, 2009; Tanideh ve ark, 2014).

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

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje çalışmasının gerçekleştirilebilmesi için gerekli etik kurul izni Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır (HADYEK onay tarihi ve no; 27.06.2016-2016/06-01). Çalışmanın deneysel aşaması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (CÖMÜDAM)' da gerçekleştirildi. Çalışmamızda standart laboratuvar koşullarında (22 ± 1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, erişkin toplamda 40 adet *Wistar albino* erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Deneklerin gruplandırılması aşağıdaki şekilde planlandı;

- I. Grup: Kontrol grubu (n: 10),
- II. Grup: Etanol grubu (n: 10),
- III. Grup: *H. perforatum* + Etanol grubu (n: 10),
- IV. Grup: Zeytin yağı + Etanol grubu (n: 10).

Deney prosedürünün başlatılması ile hayvanlar dışkılarını yememeleri için alt kısımları ızgaralı kafeslere alınıp 24 saat aç bırakıldı (içme suyu tüm gruplarda serbest olacak şekilde). Süre sonunda deney gruplarına aşağıda belirtilen uygulamalar yapılarak protokol gerçekleştirildi.

I. Grup (Kontrol grubu) hayvanları 24 saat açlığın sonunda sakrifiye edilerek mide alındı.

II. Grup (Etanol grubu) hayvanlara 24 saat açlığın ardından 1 ml/sıçan dozunda absolü etanol (>%99,5) oral gavaj kullanılarak verildi ve 90 dakika bekletildikten sonra mide alındı.

III. Grup: *H. perforatum* + Etanol grubu hayvanlarına 24 saat açlığı takiben oral gavaj kullanılarak 1 ml/sıçan dozunda *H. perforatum* ekstraktı uygulandı. 120 dakika beklendikten sonra 1 ml/sıçan dozunda absolü etanol (>%99,5) uygulaması yapıldı ve 90 dakika sonra mide dokusu alındı.

IV. Grup: Zeytin yağı + Etanol grubu hayvanlarına 24 saat açlığı takiben 1 ml/sıçan dozunda zeytinyağı uygulandı. 120 dakika beklendikten sonra 1 ml/sıçan dozunda absolü etanol (>%99,5) uygulaması yapıldı ve 90 dakika sonra mide dokusu alındı.

Geleneksel yöntemlerle üretilen Kantaron yağı, zeytinyağı içerisine atılan *H. perforatum* çiçeklerinin dört hafta boyunca güneş gören bir yerde cam kavanozlar içerisinde bekletilmesiyle elde edilmektedir. Bu karışım belirtilen süre sonunda süzülerek kullanılmaktadır. Kantaron yağının bilinen faydalı etkilerinde içinde bulunduğu zeytinyağının da rolü olması muhtemeldir. Bu sebeple, bu çalışmada oluşturulan IV. grupta sadece zeytinyağı kullanılmış ve zeytinyağının olası mide koruyucu etkisi de yorumlanmıştır.

Deney sonunda ketamin-ksilazin (90-10 mg/kg) anestezisi altındaki hayvanlar, kalpten kan alınarak sakrifiye edildi. Elde edilen mide dokusu serum fizyolojik ile yıkanarak makroskopik incelemesi yapıldı ve ülser skorları hesaplandı. Makroskopik gastrik ülser skorunun hesaplanmasında Özbakiş-Dengiz ve ark. (2012)' nin kullandığı yöntem kullanıldı (Özbakiş-Dengiz ve ark., 2012). Ülser indeksi= ülserli alan(mm²) /toplam mide yüzeyi alanı (mm²) x 100 olarak hesaplandı.

Ülser skoru hesaplanan mide dokuları % 4'lük nötral formaldehit ile fikse edilecek ve rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömülüp bloklar elde edildi. Dokuların parafine gömülmesinde şu aşamalar izlendi;

- 1.Hidratasyon (çeşme suyu altında, 12 saat)
- 2.Dehidratasyon
 - %70 alkol 1 saat
 - %80 alkol 1 saat
 - %90 alkol 1 saat
 - %96 alkol 1 saat
 - Absolü alkol 2×½ saat
3. Şeffaflandırma
 - Toluen 2×1 saat
4. Parafine Gömme
 - Toluen + parafin 1 saat
 - Sıvı parafin 1 saat (etüvde)
 - Katı parafin 1 saat
5. Bloklama

Doku bloklarından elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitlere Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması yapılarak dokuda meydana gelen histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi amaçlandı. H&E boyaması aşağıda belirtilen şekilde uygulandı;

1. Toluol I 5 dk
2. Toluol II 5 dk
3. Absolü alkol 3 dk
4. Absolü alkol 3 dk
5. %96 alkol 3 dk
6. %80 alkol 3 dk
7. %70 alkol 3 dk
8. Çeşme suyu 1-2 dk
9. Mayer's hematoksilen 5 dk
- 10.Çeşme suyu 1-2 dk
11. Eozin 1 dk
12. %96 alkol 30 sn
13. Absolü alkol 30 sn
14. Toluol 30 dk
15. Entellan ile kapatma

Entellan ve lamel yardımıyla elde edilen preparatlar kamera ataçmanlı mikroskopta incelenerek fotoğraflanmıştır.

Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitlere immünperosidaz yöntemi kullanılarak, indüklenebilir nitrik asit sentetaz (iNOS), Prolifere hücre nükleer antijen (PCNA) immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. İmmünohistokimyasal boyama protokolü belirtilen şekilde uygulandı.

Rutin takip işlemlerinin ardından bloklanan dokulardan immünohistokimyasal boyama yapmak üzere poly-L-lysine kaplı lamalar üzerine (Sigma-P0425-72EA) Leica RM-2245 silindirli mikrotomu kullanılarak 5µm kalınlığında kesitler alındı. Toluol ile deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra düşen (%100-90-96-80-70) alkol serisinden geçirilerek suya alındı ardından kesitler fosfat buffer solüsyonunda (PBS) 3x5 dakika yıkandı. Antijen geri kazanımı aşaması sitrat buffer içerisine alınan doku kesitlerinin mikrodalga fırında (Vestel, 1550) kaynatılması ile gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında soğuma işlemi tamamlandıktan sonra PBS ile 3x5 dakika yıkanarak, endojen peroksidaz aktivesini baskılamak için distile su ile hazırlanan %3'lük Hidrojen

Peroksit (H_2O_2) çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Lamlar 3x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra özgül olmayan bağlanmaları engellemek için pappen ile havuz oluşturulan kesitler üzerine blok solüsyonu 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra kurutma kâğıdı yardımıyla blok solüsyonu yıkanmadan uzaklaştırıldı. Üretici firma önerisi ve deneme aşamalarında tecrübe edilen inkübasyon sürelerinde ve uygun dilüsyonda kesitler üzerine primer antikorlar oda ısısında nemli chamber içerisinde uygulandı (iNOS, Abcam, ab15323 ve PCNA (Novus Biologicals, PC10). Primer antikor uygulaması sonrasında kesitler PBS ile yıkanacak ve biotinli sekonder antikorla 10 dakika nemli chamber içerisinde inkübe edilerek PBS ile yıkandı. HRP-streptavidin ile nemli chamber içerisinde 10 dakika muamele edilen kesitler PBS ile yıkandı. Tüm immünohistokimyasal işaretlemelerde kromojen olarak AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) kullanıldı. AEC ile renklendirme aşamasının süresi mikroskop altında belirlenerek tüm kesitler aynı süre kromojenle muamele edildikten sonra kesitler suya indirilerek reaksiyon durdurulur. PBS ile yıkanan kesitler su bazlı kapatma medyumuna ile kapatılıp ışık mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi.

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

Parafin bloklardan lam üzerine alınan $5\ \mu\text{m}$ 'lik kesitler 1 gece $37\ ^\circ\text{C}$ 'lik etüvde tutulduktan sonra toluolde 3x5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırılarak azalan alkol serilerinden (%100, %95, %70) 3'er dk geçirilip distile suya indirildi. 5 dk distile suda tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Chemicon, 21627) uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H_2O_2 'de 5 dk bekletildi. Distile su ve PBS ile çalkalandıktan sonra lam üzerinde kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Zymed, 00-8899) ile çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 5 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler $37\ ^\circ\text{C}$ 'de TdT enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere antidigoksinin konjügatı uygulandı ve oda ısısında 30 dk tutuldu. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk diaminobenzen (DAB) kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 3 dk Mayer's Hematoksin uygulanarak zıt boyama yapıldı. Distile sudan hızla geçirilen kesitler %100 N-Butanolde de hızla geçirildi. Dehidrate edilen kesitler 3x2 dk toluol içerisinde tutulduktan sonra kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirmeye alındı.

Etanol uyarımlı deneysel akut mide mukoza hasarında sitokin ekspresyonlarının değişikliğe uğradığı önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Özellikle antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 ve proinflamatuvar IL-6 sitokinlerindeki değişim belirgindir. Mide dokusunda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi kullanılarak IL-10 ve IL-6 sitokinlerinin ekspresyonu belirlendi.

Elde edilen mide dokularında Süperoksit dismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) oksidan enzim aktivitelerinin seviyeleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

MDA tayini; Lipit peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley (1990)'in çift kaynatmalı tiyobarbiturik asit reaktivitesi metodu kullanılarak ölçüldü.

SOD tayini; Süperoksit anyon radikallerinin moleküler oksijen ve hidrojen peroksit katalize eden SOD enziminin tayini Durak ve ark. (1993)'in tariflediği modifikasyona

göre tayin metodu: ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına göre ölçüldü.

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

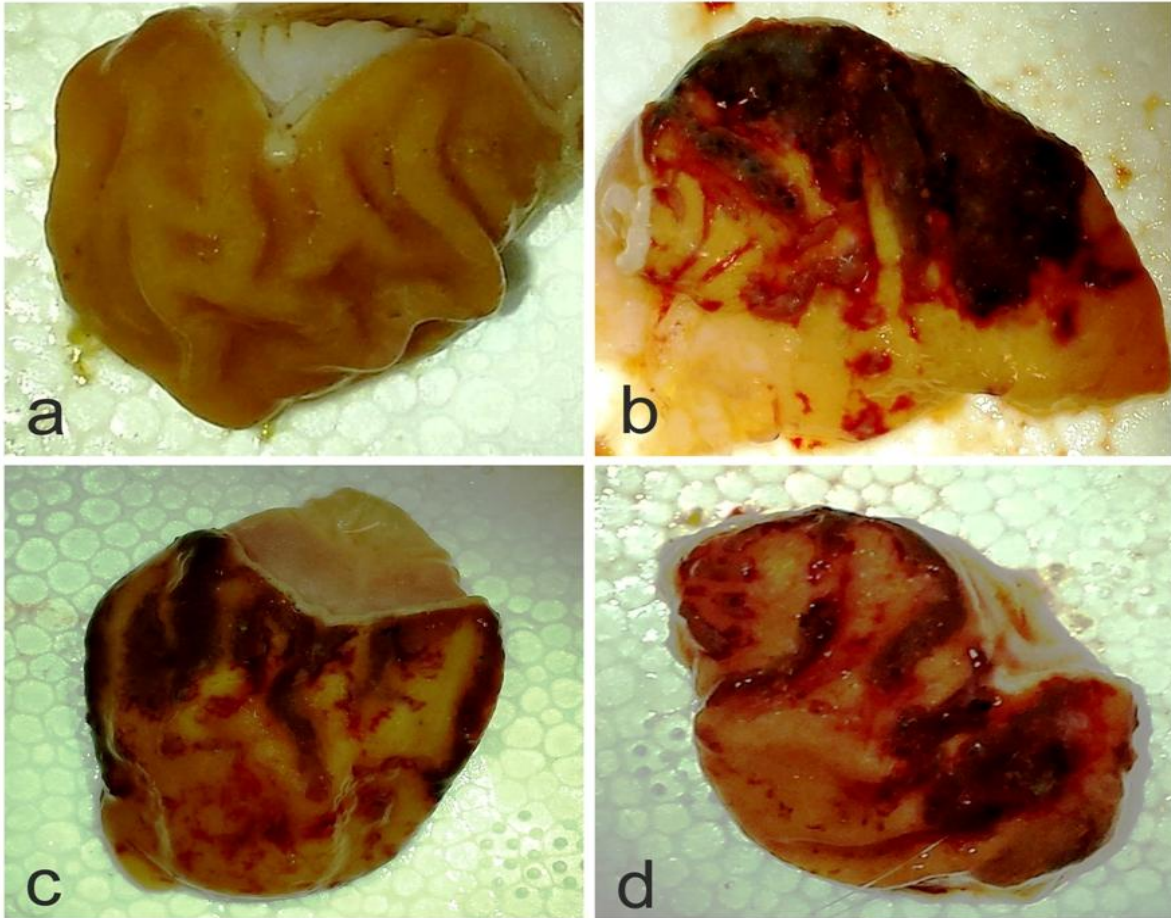
Histopatolojik, immünohistokimyasal ve TUNEL boyama sonuçlarından elde edilen doku mikrofotoğrafları kamera ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus CX40) ve görüntü analiz programı kullanılarak değerlendirildi.

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

3. BULGULAR

3.1. Ülser Skorlaması Bulguları

Deney protokolü sonunda belirtilen sürelerde etanol, zeytinyağı ve kantaron uygulaması yapılan hayvanlar sakrifiye edilip mide dokuları alındı. Mide mukozasındaki değişiklikleri gözlemek ve mide ülser skoru hesaplanması için mideler büyük kurvatur boyunca kesilerek açıldı. Serum fizyolojik ile yüzey temizlendikten sonra fotoğraflandı. Gruplara ait mide mukozalarının genel görünümü Şekil 1'de verilmiştir.



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

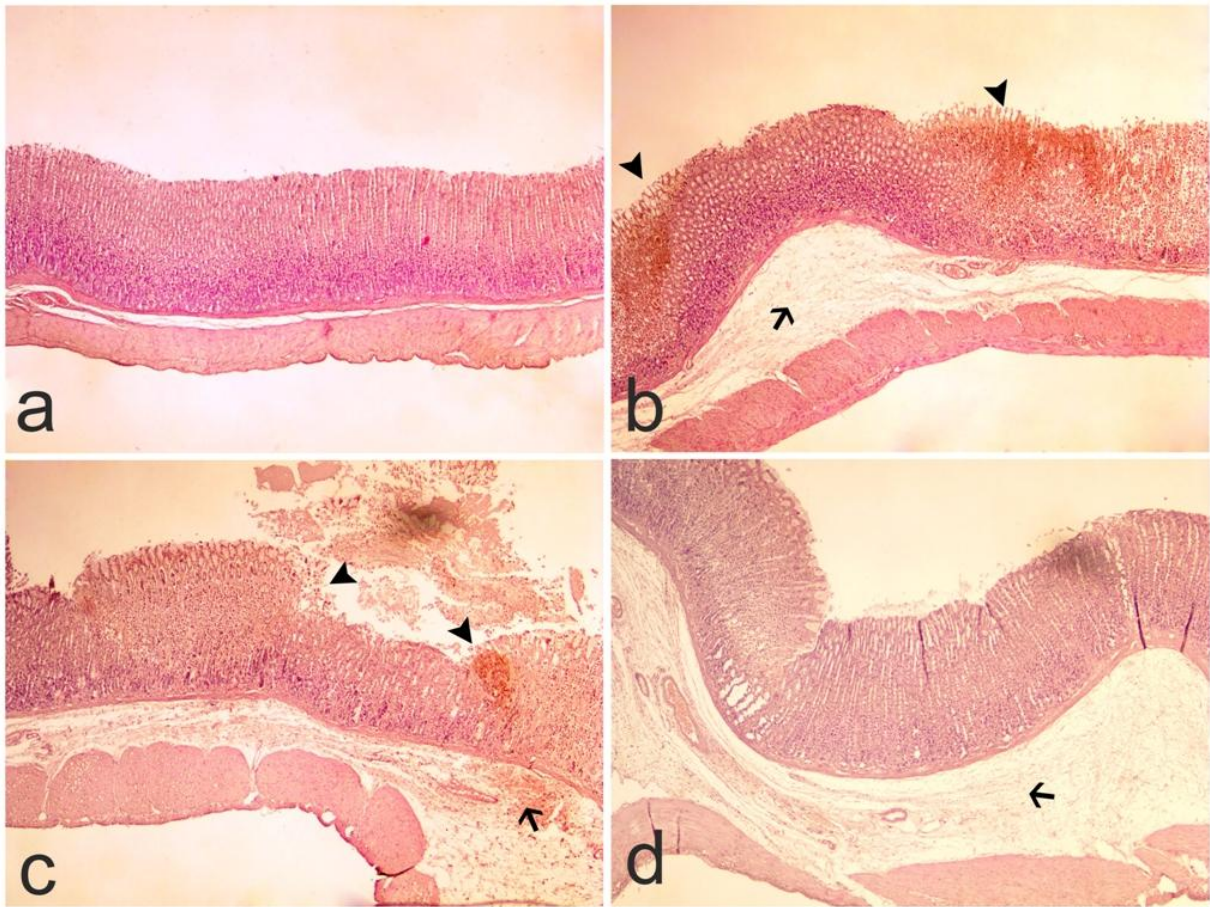
Kontrol grubu hayvanların mide mukozası normal görünümdeydi. Etanol grubuna ait mide dokusunda ödemli, hiperemik ve ülserli alanların artması dikkat çekiciydi. Zeytinyağı+Etanol grubu ve Kantaron+Etanol grubu, sadece etanol grubuna kıyasla daha az hiperemik ve ülserli alan içermekteydi. Ülser indeksleri kıyaslandığında; Zeytinyağı+Etanol (3.5 ± 2.5) ve *H. perforatum*+Etanol (21 ± 2.8) grubu, Etanol grubuna (42 ± 2.9) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük skor puanına sahipti ($p < 0.001$).

Tablo 1. Gruplara ait ülser indeksi değerleri (%)

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

(a; p<0.001, kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; p<0.001, Etanol grubu ile kıyaslandığında, c; p<0.001, Zeytinyağı+Etanol grubu ile kıyaslandığında)

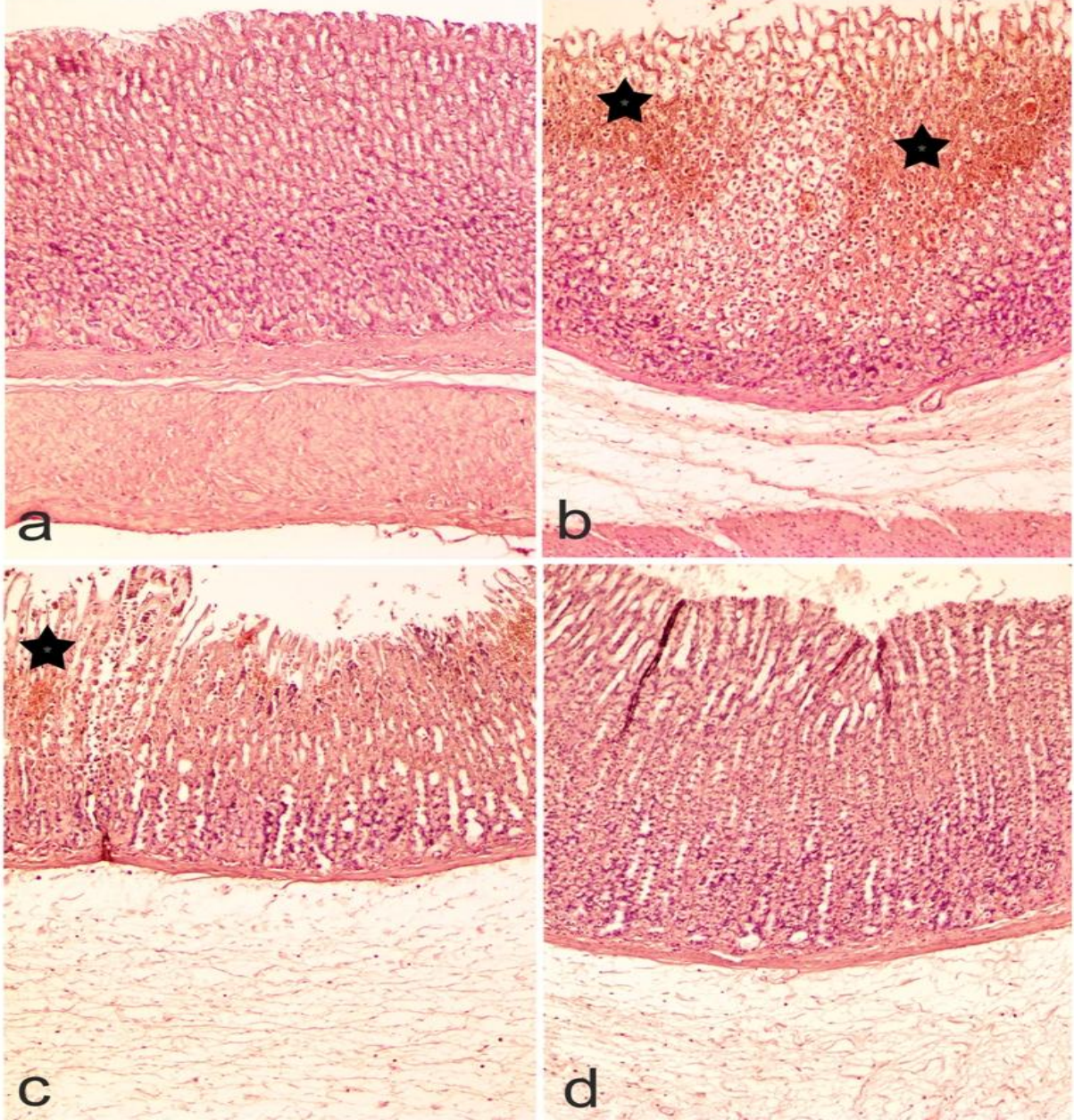
3.2. Histopatolojik bulgular



Şekil 2. Mide dokularına ait histolojik görünümler. a; Kontrol grubu, b; Etanol grubu, c; Zeytinyağı+Etanol grubu, d; *H. perforatum*+Etanol grubu, Büyütme; 40X, Hematoksilen&Eozin, ok başı; kanama ve mukozal erozyon alanları, ok; ödem.

H&E ile boyanmış mide preparatlarında gruplara ait mide mukozalarının histolojik yapıları farklı büyütmelemlerde ayrıntılı olarak incelenmiştir. Kontrol grubu mide dokusu normal histolojik yapı göstermektedir (Şekil 2a). Etanol grubu mide dokusunda kanama ve mukozada erozyon dikkat çekmektedir (Şekil 2b).

Zeytinyağı+Etanol grubunda kanama ve mukozal erozyon etanol grubuna kıyasla azalarak devam etmektedir (Şekil 2c). *H. perforatum*+Etanol grubu mide mukozasında histopatolojik bulguların çok nadir seyrettiği fakat submukozada ödem bulgusunun Etanol ve Zeytinyağı+Etanol grubunda izlendiği gibi devam ettiği görüldü (Şekil 2d).



Şekil 3. Mide dokularına ait histolojik görünüm. a; Kontrol grubu, b; Etanol grubu, c; Zeytinyağı+Etanol grubu, d; *H. perforatum*+Etanol grubu, Büyütme; 100X, Hematoksilen&Eozin.

Daha ayrıntılı büyütme gücünde incelenen H&E ile boyanmış mide kesitleri incelendiğinde, kontrol grubu mide dokularının yapısı normal olarak izlenmiştir. Gastrik çukurcuklar, mide bezleri, lamina propria, submukoza ve muskularis

eksterna normal histolojik yapı göstermektedir (Şekil 3a). Etanol grubu mide dokuları incelendiğinde mukozada gastrik çukurcukları ve yer yer mide bezlerini de içine alacak şekilde hiperemik alanlar izlenmiştir. Bu alanlarda mukozayı örten epitelin dejenere olduğu ve çok sayıda hücrenin nukleuslarının piknotikleştiği izlendi. Mukoza ile beraber submukozada ödemin sebep olduğu kalınlaşma izlenmiştir (Şekil 3b). Zeytinyağı+Etanol grubu midelerin histolojik yapısına bakıldığında kanama alanlarının varlığının devam ettiği fakat etanol grubuna nazaran histopatolojik bulguların azaldığı izlenmiştir (Şekil 3c). *H. perforatum*+Etanol grubu midelerin mukozasında kanama alanlarının çok az olduğu, histopatolojik bulguların etanol ve Zeytinyağı+Etanol grubuna kıyasla daha seyrek izlendiği görüldü. Mukoza histolojik yapısı kontrol grubu mide mukozasına benzerdi (Şekil 3d).

3.3. Anti-PCNA İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

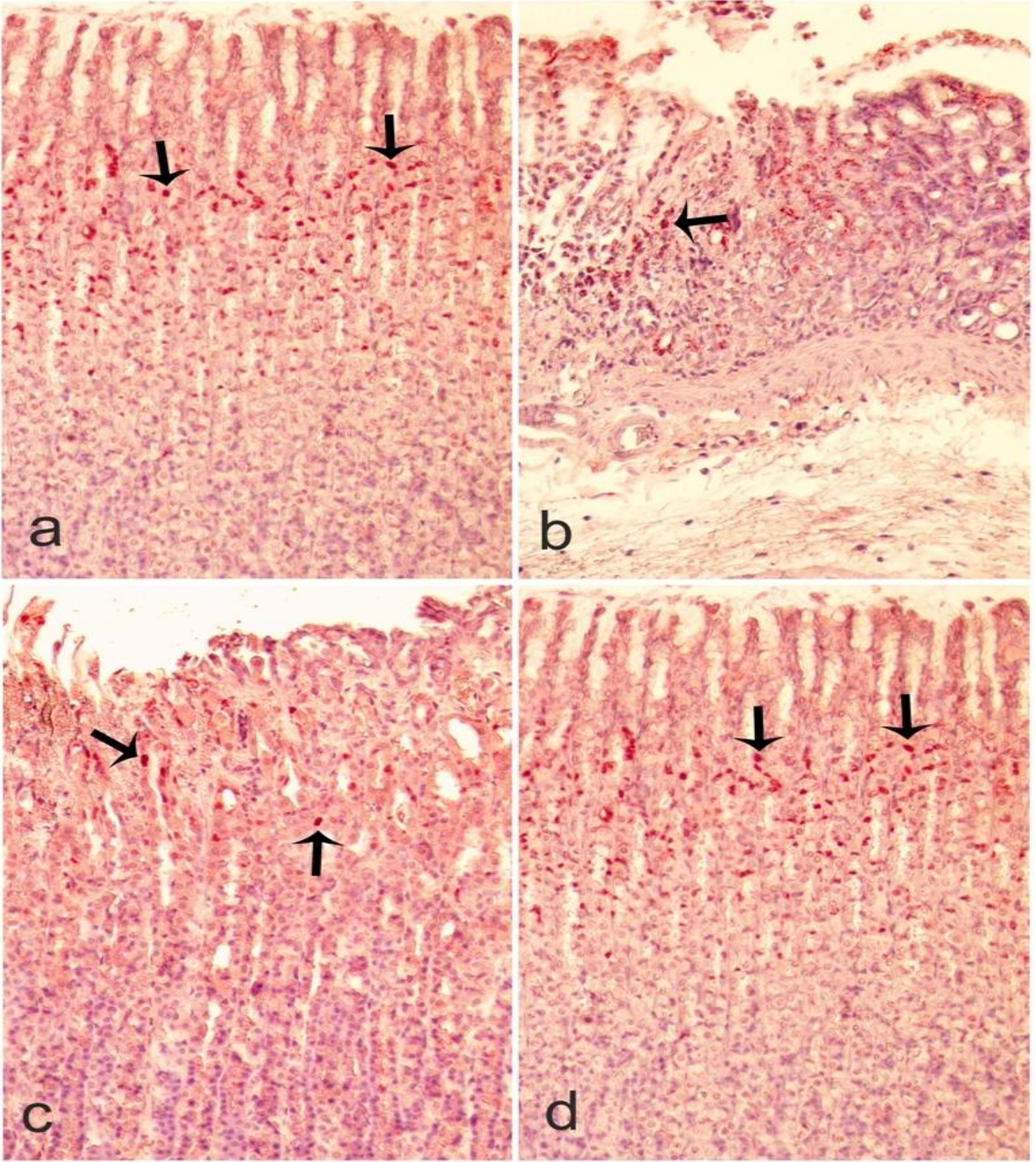
Anti-PCNA ile immünohistokimyasal olarak işaretlenen mide dokuları incelendiğinde özellikle mide bezlerinin boyun kısımlarında, mide bezlerinin kök hücre nişinin bulunduğu isthmus bölgesinde pozitif boyanan hücrelerin daha yoğun yerleştiği görüldü.

Tablo 2. Gruplara ait Anti-PCNA(+) hücre sayıları

Gruplar	Anti-PCNA(+) hücre sayısı/mm ²
Kontrol	138.8±9.2
Etanol	35.6±4.3 ^a
Zeytinyağı+Etanol	58.5±9.2 ^b
<i>H. perforatum</i> +Etanol	94.2±8.5 ^{b,c}

(a; p<0.001, kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; p<0.001, Etanol grubu ile kıyaslandığında, c; p<0.001, Zeytinyağı+Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Kontrol grubu (138.8±9.2) ile kıyaslandığında etanol grubunda (35.6±4.3) Anti-PCNA(+) hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür (p<0.001). Zeytinyağı+Etanol (58.5±9.2) ve *H. perforatum*+Etanol grubunda (94.2±8.5), Etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış gözlenmiştir (p<0.001).



Şekil 4. Anti-PCNA boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+Etanol, d; *H. perforatum* +Etanol, immünperoksidaz, Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Büyütme; 200X.

3.4. Anti-İNOS İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

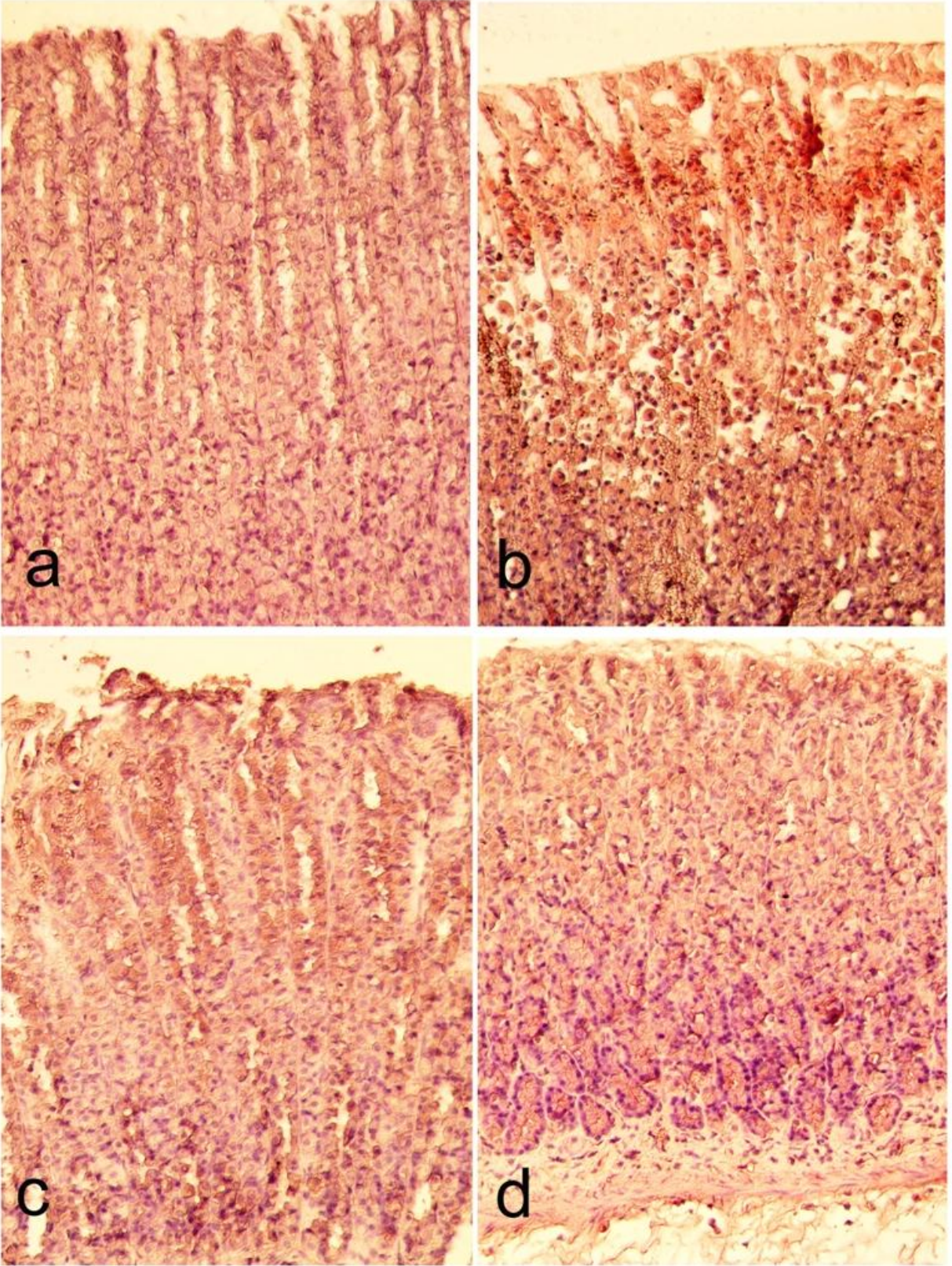
Anti-İNOS antikoruna ile işaretlenen mide dokularında iNOS aktivitesi görüntü analiz programı yardımıyla değerlendirilerek, boyanma yoğunlukları yüzde olarak belirlendi. Kontrol grubu sıçanların mide mukozasında iNOS aktivitesi çok zayıf izlenirken, Etanol grubunda hemen hemen mukozanın tamamına yayılan bir aktivite izlendi (Şekil 5-b). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum* +Etanol gruplarında ise H&E boyama bulgularıyla uyumlu olarak normal histolojik yapının daha hakim olduğu mukozada iNOS aktivitesinde belirgin bir azalma izlendi (Şekil 5c-d). Gruplara ait boyanma yoğunlukları Tablo 3' te verilmiştir.

Tablo 3. Gruplara ait Anti-iNOS aktiviteleri

Gruplar	İNOS aktivitesi (%)
Kontrol	1.5±0.8
Etanol	25.7±3.4 ^a
Zeytinyağı+Etanol	16±2.4 ^b
<i>H. perforatum</i> +Etanol	9.4±1.7 ^{b,c}

(a; p<0.001, kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; p<0.001, Etanol grubu ile kıyaslandığında, c; p<0.001, Zeytinyağı+Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Kontrol grubu (1.5±0.8) ile kıyaslandığında etanol grubunda (25.7±3.4) iNOS aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.001). Zeytinyağı+Etanol (16±2.4) ve *H. perforatum*+Etanol grubunda (9.4±1.7), Etanol grubuna (25.7±3.4) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir (p<0.001).



Şekil 5. Anti-iNOS boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+Etanol, d; *H. perforatum*+Etanol, immünperoksidaz, Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Büyütme; 200X.

3.5. TUNEL Boyama Bulguları

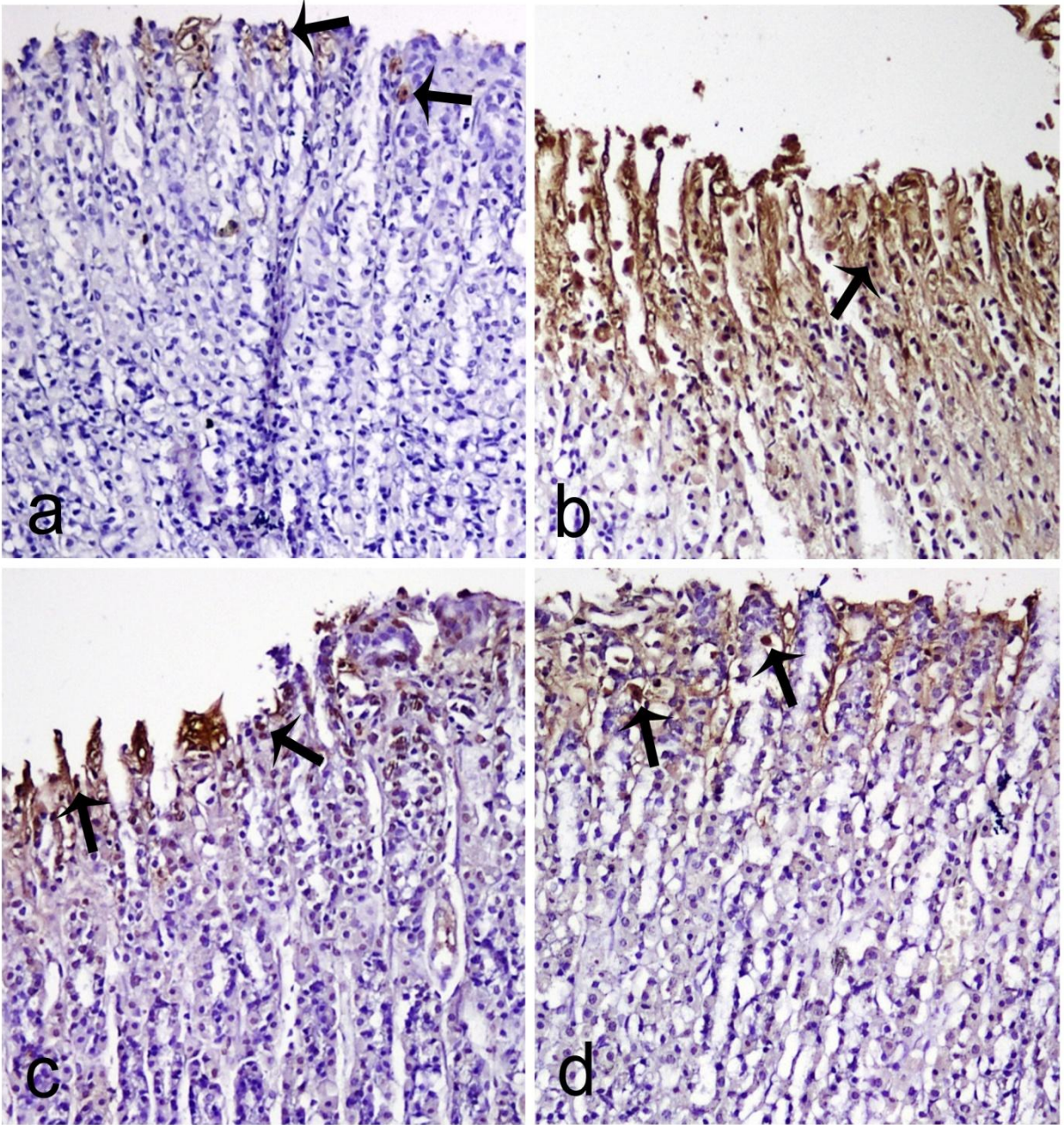
Mide mukozasında apoptozise uğrayan hücreler TUNEL metoduyla işaretlenmiş ve preparatlar Mayer's Hematoksilin ile zıt boyamaya tabi tutulmuştur. DNA'daki kırıkları işaretleyen TUNEL(+) boyamanın sonuçları değerlendirildiğinde apoptotik hücrelerin nükleusları kahverengi renkte izlenmiştir.

Tablo 4. Gruplara ait TUNEL(+) hücre sayıları

Gruplar	TUNEL(+) hücre sayısı/mm ²
Kontrol	1.4±0.6
Etanol	59.1±5.7 ^a
Zeytinyağı+Etanol	37±4.6 ^b
<i>H. perforatum</i> +Etanol	17.7±5.5 ^{b,c}

(a; p<0.001, kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; p<0.001, Etanol grubu ile kıyaslandığında, c; p<0.001, Zeytinyağı+Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Birim alandaki (mm²) TUNEL(+) hücre sayıları değerlendirildiğinde, Etanol grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.001). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum*+Etanol gruplarında ise Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (p<0.001). (Kontrol; 1.4±0.6, Etanol; 59.1±5.7, Zeytinyağı+Etanol; 37±4.6, *H. perforatum*+Etanol; 17.7±5.5)

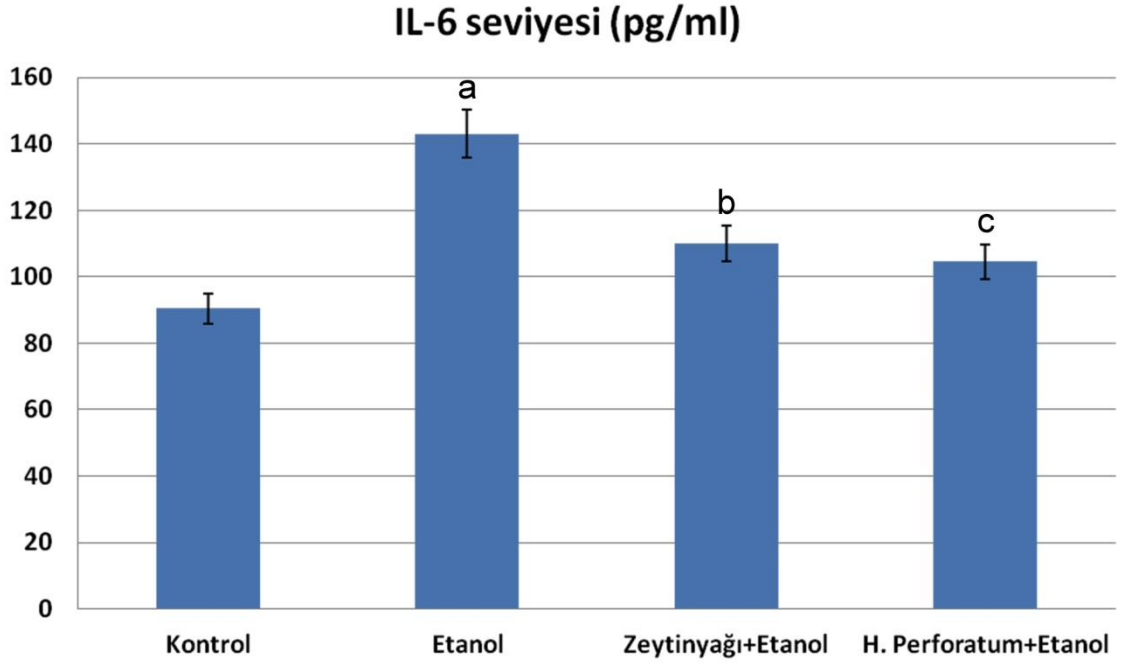


Şekil 6. TUNEL boyama bulguları a; Kontrol, b; Etanol, c; Zeytinyağı+Etanol, d; *H. perforatum*+Etanol, immünperoksidaz, Mayer's Hematoksilen zıt boyama, Ok; TUNEL (+) hücre, Büyütme; 400X.

3.6. ELISA bulguları

Proinflamatuvar sitokin IL-6 ve antiinflamatuvar sitokin IL-10 doku düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş olup değerler $\text{ort} \pm \text{ss}$ pg/ml olarak ifade edilmiştir. Tüm gruplara ait değerler Tablo 7' de gösterilmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Etanol grubunda IL-6 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derece bir artış göstermiştir ($p < 0.001$). Zeytinyağı+Etanol grubunda IL-6 seviyesi, Etanol grubuna göre anlamlı bir

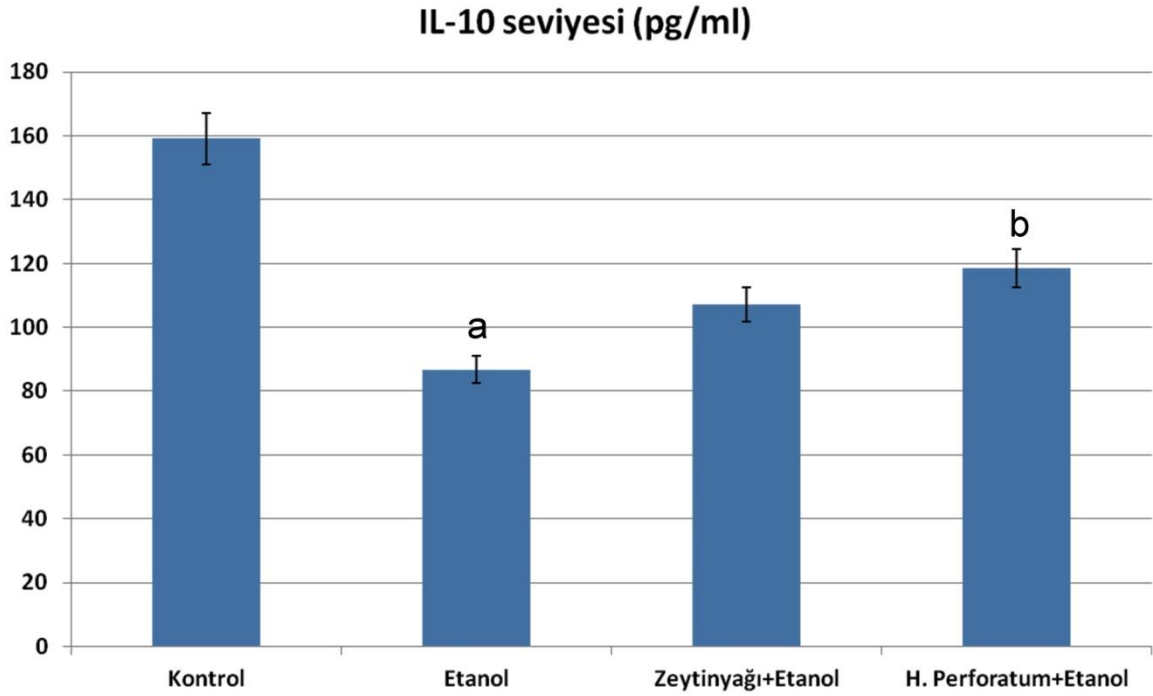
azalma göstermiştir. ($p<0.001$). *H. perforatum* grubu Etanol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterirken ($p<0.001$) Zeytinyağı+Etanol grubuna kıyasla daha düşük IL-6 seviyesine sahip olmasına karşın aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p=0.52$). (Kontrol; 90.36 ± 7.3 , Etanol; 142.98 ± 9.7 , Zeytinyağı+Etanol; 109.98 ± 13.5 , *H.perforatum*+Etanol; 104.51 ± 9.7)



(a; $p<0.001$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; $p<0.001$, Etanol grubu ile kıyaslandığında, c; $p<0.001$, Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Şekil 7. Gruplara ait IL-6 seviyelerinin dağılımı

Antiinflatuvar IL-10 doku düzeyleri incelendiğinde Etanol grubunda, Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). Zeytinyağı+Etanol grubu ile Etanol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.09$). *H. perforatum* ve Etanol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum*+Etanol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.89$). Gruplara ait IL-10 doku seviyeleri Şekil 7' de sunulmuştur. (IL-10 doku seviyeleri pg/ml olarak: Kontrol; 159.1 ± 48.2 , Etanol; 86.76 ± 14.8 , Zeytinyağı+Etanol; 107.2 ± 42.4 *H. perforatum*+Etanol; 118.5 ± 38.2).



(a; $p < 0.001$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; $p < 0.001$, Etanol grubu ile kıyaslandığında)

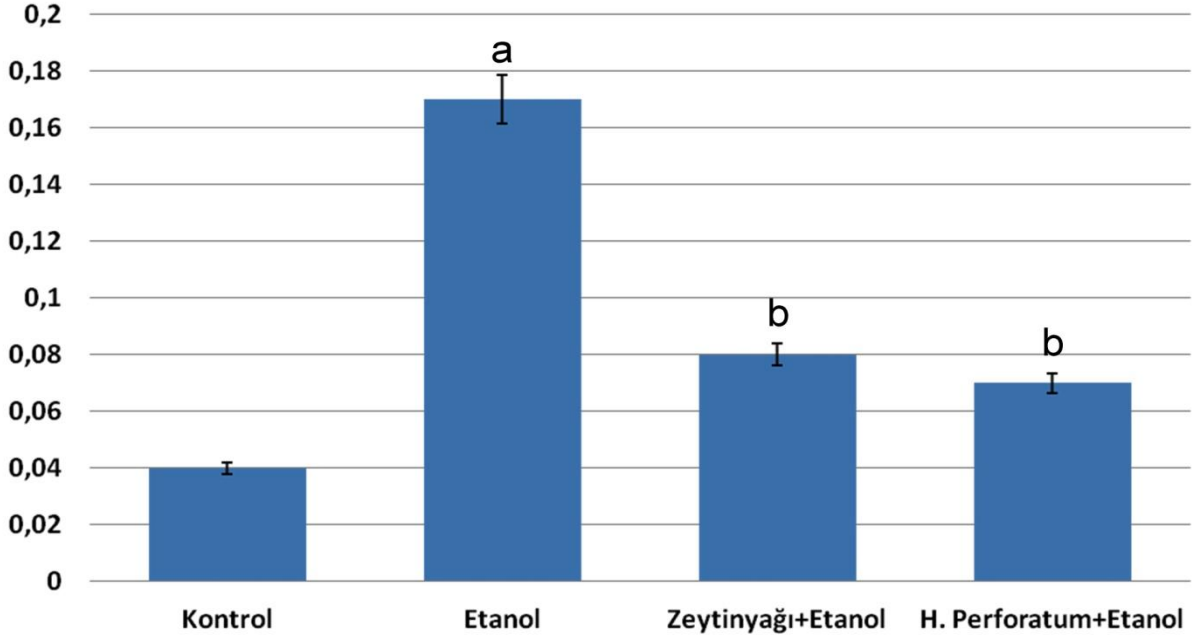
Şekil 8. Gruplara ait IL-10 seviyeleri

3.7. Biyokimyasal Bulgular

Deney sonunda elde edilen mide dokularında lipit peroksidasyonu sonucu artış gösteren MDA ile antioksidan enzimler; SOD ve CAT seviyeleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir.

Mide dokusu MDA seviyeleri incelendiğinde Etanol grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum*+Etanol grubunda, Etanol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.001$). *H. perforatum*+Etanol ve Zeytinyağı+Etanol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p = 0.89$). Gruplara ait mide dokusu MDA değerleri Şekil 9' da verilmiştir. (Mide dokusu MDA seviyeleri: Kontrol; 0.04 ± 0.2 , Etanol; 0.17 ± 0.0 , Zeytinyağı+Etanol; 0.08 ± 0.02 , *H. perforatum*+Etanol; 0.07 ± 0.1)

MDA seviyesi (nmol/mg protein)

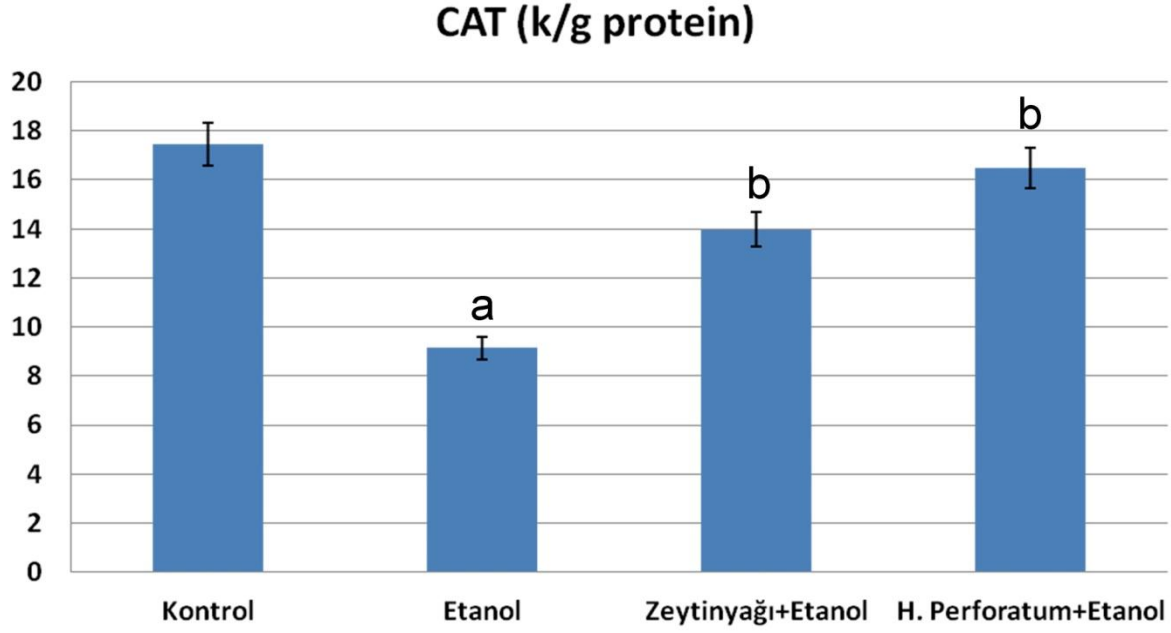


(a; $p < 0.001$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; $p < 0.001$, Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Şekil 9. Gruplara ait MDA seviyeleri

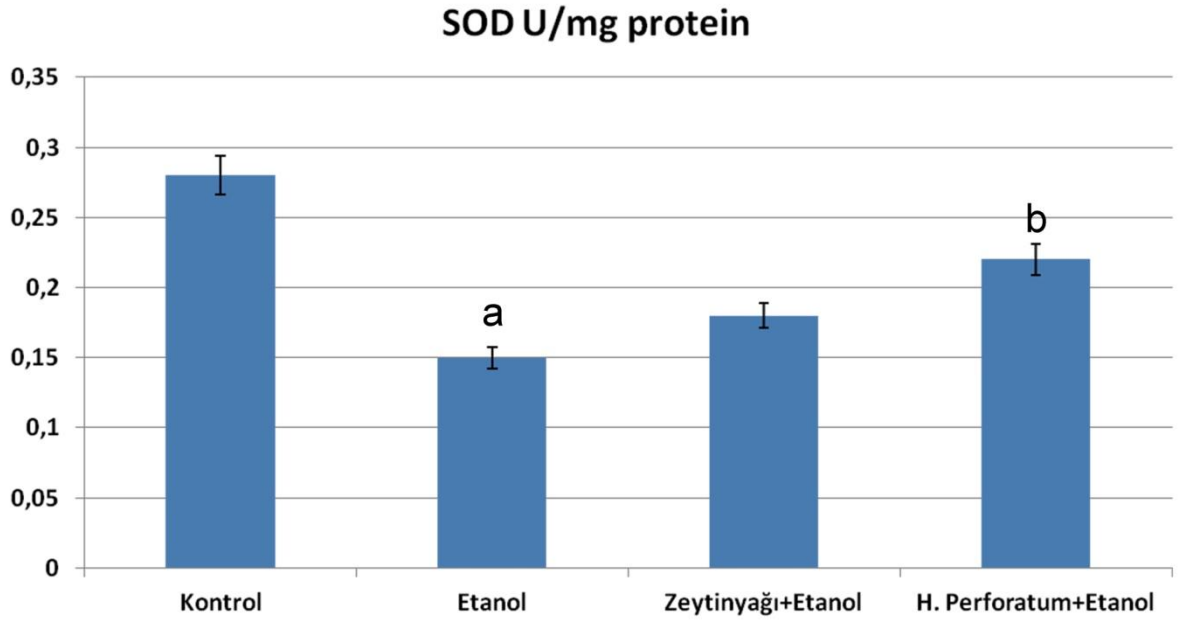
Katalaz aktivitesinin gruptaki dağılımı incelendiğinde; Etanol grubunda, Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.001$). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum*+Etanol grupları arasında anlamlı bir farklılık olmamakla ($p = 0.481$) birlikte her iki grupta da Etanol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.001$). Gruplara ait CAT değerleri Şekil 10' da verilmiştir. (CAT seviyeleri: Kontrol 17.46 ± 5.9 , Etanol; 9.14 ± 1.7 , Zeytinyağı+Etanol; 13.97 ± 2.8 , *H. perforatum*+Etanol; 16.48 ± 3.4)

Süperoksit dismutaz aktivitesi yönünden gruplar incelendiğinde; Etanol grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma izlenmiştir ($p < 0.001$). Zeytinyağı uygulaması SOD enzim aktivitesini artırır da, Etanol grubuna kıyasla bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.481$). *H. perforatum*+Etanol grubunda SOD aktivitesi Etanol grubuna kıyasla anlamlı derece artış göstermiştir ($p < 0.001$). Gruplara ait değerler Şekil 11' de sunulmuştur. (SOD seviyeleri: Kontrol 0.28 ± 0.009 , Etanol; 0.15 ± 0.008 , Zeytinyağı+Etanol; 0.18 ± 0.06 , *H. perforatum*+Etanol; 0.23 ± 0.02)



(a; $p < 0.01$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; $p < 0.001$, Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Şekil 10. Gruplara ait mide CAT seviyeleri



(a; $p < 0.001$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, b; $p < 0.001$, Etanol grubu ile kıyaslandığında)

Şekil 11. Gruplara ait SOD değerleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günlük hayatta insan sağlığı riski ile birlikte gastrointestinal problemler, erken safhada genellikle ihmal edilen ve önem verilmeyen bir küresel bir sorundur (Hui and Fangyu, 2017). Yaygın görüşte gastrik ülser serbest oksijen radikallerinin de bulunduğu çeşitli etiyolojiler tarafından tetiklenen bir hastalıktır ve etanolün peptik ülserlerde hasarın artması veya hastalığın ilerlemesinde etkin rol oynadığı düşünölmektedir (Suzuki et al., 2011). Bu sebeple etanolle oluşturulan gastrik ülser modelleri farklı bileşik veya ekstratların gastrik ülser tedavisindeki etkinliklerini belirlemek amacıyla sıkça oluşturulmaktadır (Hui and Fangyu, 2017; Velázquez-Moyado et al., 2015).

Sunulan bu çalışmada etanol uyarımlı akut gastrik ülser modelinde, zeytinyağı ve Türk geleneksel halk tıbbında yoğun olarak ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan kantaron yağının koruyucu etkileri farklı yöntemlerle belirlendi.

Bu çalışmada mide ülseri oluşumunda absolü etanol (>%99,5) kullanılmıştır. Peptik ülser ve anti-ülser aktivitesi konulu çalışmalar incelendiğinde etanol, aspirin, indomethacin gibi ajanların kullanıldığı görölmektedir (Holzer et al., 1989; Liu et al., 2012; Turan et al., 2013).

Deney protokolü sonunda sakrifiye edilen sıçanların mide dokularının makroskobik inceleme sonuçları değerlendirildiğinde; Etanol grubunda farklı araştırmacıların bulgularıyla benzer olarak gastrik ülser indeksinde belirgin bir artış olduğu gözlendi (El-Maraghy et al., 2015; Velázquez-Moyado et al., 2015). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum*+Etanol gruplarında ülser indeksinin Etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Bu çalışmayla uyumlu olarak, Odabaşıoğlu ve ark. (2008) zeytinyağının indomethacin uyarımlı gastrik ülser modelinde gastrik ülser indeksini düşürdüğu göstermişlerdir. *H. perforatum*' un daha önce gastrik ülser üzerinde tedavi etkinliklerinin incelendiği iki deneysel çalışmada çalışmamızla benzer şekilde ülser indeksinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (Turan et al., 2013; Yesilada and Gurbuz, 1998).

Yapılan histopatolojik incelemelerde etanol grubu sıçanların mide mukozasında mukozal erozyon, kanama, vasküler konjesyonlar ile hem mukoza hem de submukozada ödem oluşumu izlenmiştir. Etanol ile indüklenen farklı çalışmalar incelendiğinde benzer bulgulara ulaşıldığı görölmektedir (La Casa et al., 2000; Liu et al., 2012). Zeytinyağı ve *H. perforatum* uygulamasının, belirlenen bu histopatolojik değişikleri azalttığı çalışmamızda belirtilmiştir. Zeytinyağı ve *H. Perforatum*'ün deneysel ülser modellerinde kullanıldığı diğer çalışmalarda histopatolojik bulguların yer almadığı görölmüştür (Arsić et al., 2010; Turan et al., 2013; Zdunić et al., 2009).

Çalışmamızda mide dokusu PCNA ve İNOS antikorları ile indirek immünohistokimyasal metotla işaretlenmiştir. Etanol grubu mide mukozasında

PCNA(+) hücre sayısı anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). Bu bulgularla uyumlu olarak literatürde gastrik ülser modeli oluşturulan çalışmalarda ülserli mide mukozalarındaki PNCA aktivasyonunda düşüş olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Arsić et al., 2010; Odabasoglu et al., 2006; Yi et al., 2007). Bu deneysel çalışmalarda, bizim çalışmamızda uyumlu olarak, gastrik mukoza hasarını engelleyen ajanlar PCNA aktivitesini yükseltmiştir.

Sunulan bu çalışmada, anti-iNOS immünreaktivite sonuçları incelendiğinde Etanol grubunda yüksek (25.7 ± 3.4) bulunan oran, Zeytinyağı (16.0 ± 2.4) ve *H. perforatum* (9.4 ± 1.7) grubunda istatistiksel olarak azalmıştır. Çalışmamızla benzer olarak Odabaşoğlu ve ark (2006) indomethacin ile oluşturulan gastrik ülser modelinde İNOS aktivitesinin yükseldiğini göstermişlerdir. Gastrik ülser patogenezinde mukozaya nötrofil infiltrasyonu kritik bir prostestir ve İNOS aktivitesi çeşitli gastrik mukozal hasarlarda bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Elliott and Wallace, 1998; Odabasoglu et al., 2006). Bu açıdan zeytinyağı ve *H. perforatum*'un İNOS sentezini baskılayarak mukozaya nötrofil infiltrasyonunu azaltmak yoluyla mukozal yapının korunmasına imkan sağladığı söylenebilir.

İnterlökinler mukozal bariyerin düzenlenmesinde hayati öneme sahip sitokinlerdir (Liu et al., 2012). Gastrik ülserde mukozal pro-inflamatuar IL-6 seviyesi artarken, anti-inflamatuar IL-10 seviyesinde düşüş meydana gelir (Paglia and Valentine, 1967). Çalışmamızda ELISA yöntemiyle mide dokusunda seviyesi belirlenen IL-6 ve IL-10 seviyeleri literatürle uyumlu olarak etanol grubunda artış gösterirken, Zeytinyağı ve *H. perforatum* grubunda istatistiksel olarak anlamlı derece bir azalma göstermiştir ($p<0.01$). Mukozal bariyerin devamlılığı için anti ve pro-inflamatuar sitokinler arasındaki dengenin korunması elzemdir (Papadakis and Targan, 2000). Zeytinyağı ve *H. perforatum*'un proinflamatuar IL-6 seviyesini azaltırken, anti-inflamatuar IL-10 seviyesini artırarak ülser oluşumunu azalttığı söylenebilir.

Etanol uyarımlı gastrik mukozal hasarın artmış ROS seviyesi ile yakın ilişkili olduğu ve artan ROS' un temel kaynağının aktive nötrofiller olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Liu et al., 2012). Artan ROS seviyesini baskılayabilmek amacıyla organizmada SOD, GSH, GSH-Px gibi enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptir (Liu et al., 2012; Rtibi et al., 2015). Etanol uygulaması gastrik mukozada lipit peroksidasyonunu artırırken, CAT, GSH ve mukozadaki diğer koruyucu faktörleri azaltır (Rozza et al., 2011). Literatür ile uyumlu olarak sadece etanol uygulanan grupta SOD ve CAT seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun son ürünüdür ve gastrik mukozada lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak sıkça kullanılmaktadır (Hui and Fangyu, 2017; Ma and Liu, 2014). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak sadece etanol uygulanan grupta MDA seviyesi anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Zeytinyağı+Etanol ve *H. perforatum*+Etanol gruplarında MDA seviyesindeki azalma diğer bulgularla birlikte lipit peroksidasyonunun azaldığını göstermektedir ($p<0.001$).

Gastrik mukozal hasarın etanol ile oluşturulduğu bu çalışmada zeytinyağı ve *H. perforatum*'un koruyucu etkileri farklı yöntemler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıdaki gibidir.

- Etanol uygulaması gastrik mukozal bariyerde hasar meydana getirmektedir.
- Etanol uygulaması mukozada epitel erozyonu ve vasküler konjesyonun yanı sıra submukozada ödem oluşumuna sebep olmaktadır.
- Zeytinyağı ve *H. perforatum* uygulaması mukozal histopatolojik bulguların daha hafif seyretmesini sağlamış; İNOS aktivitesi, TUNEL(+) hücre sayısı, IL-6 seviyesi, MDA seviyesinde azalmayla birlikte PCNA sentezi, IL-10 seviyesi, SOD ve CAT düzeylerinde artış sağlamıştır.
- *H. perforatum* gastrik ülser tedavisinde etkin rol alan bir ajan olarak kullanılabilir.

Elde edilen bu sonuçlar daha ileri çalışmaların planlanmasına ışık tutabilir. Buradan yola çıkarak;

- Zeytinyağı ve *H. perforatum*'un kromatografik/spektrofotometrik yöntemlerle içeriklerinin belirlenerek, bileşenler ayrı ayrı veya kombinasyonlar halinde bu model üzerinde denenebilir,
- Gastrik ülser tedavisinde etkin sonuçlar elde edilen Omperazol gibi ilaçlar çalışma protokolüne dahil edilerek tedavi sonuçları kıyaslanabilir,
- Uygulamaların doku seviyesinde hangi genlerin ifadesine sebep olduğu mRNA seviyelerinin ölçüldüğü moleküler biyolojik yöntemlerle de desteklenerek geliştirilebilir.

5. KAYNAKLAR

Aihara, T., Nakamura, E., Amagase, K., Tomita, K., Fujishita, T., Furutani, K., Okabe, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacology & therapeutics* 98, 109-127, 2003.

Akıncı, A., Eşrefoğlu, M., Taşlıdere, E., Ateş, B., 2017. *Petroselinum Crispum* is Effective in Reducing Stress-Induced Gastric Oxidative Damage. 34(1): 53–59, 2017.

Arsić, I., Žugić, A., Antić, D.R., Zdunić, G., Dekanski, D., Marković, G., Tadić, V. *Hypericum Perforatum* L. *Hypericaceae/Guttiferae* Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress–Induced Gastric Lesions. *Molecules* 15, 6688-6698, 2010.

Bang, C.S., Baik, G.H. *Peptic Ulcer, Helicobacter pylori*. Springer, pp. 219-228, 2016.

Bayramoglu, G., Bayramoglu, A., Engur, S., Senturk, H., Ozturk, N., Colak, S. The hepatoprotective effects of *Hypericum perforatum* L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Cytotechnology* 66, 443-448, 2014.

Behrman, S.W. Management of complicated peptic ulcer disease. *Archives of surgery* 140, 201-208, 2005.

Castro, F.C., Magre, A., Cherpinski, R., Zelante, P.M., Neves, L.M., Esquisatto, M.A., Mendonça, F.A., Santos, G.M. Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum* L. and *Arnica montana* L. on surgically induced wound healing in Wistar rats. *Homeopathy* 101, 147-153, 2012.

Chung, K.T., Shelat, V.G. Perforated peptic ulcer-an update. *World Journal of Gastrointestinal Surgery* 9, 1, 2017.

Dost, T., Ozkayran, H., Gokalp, F., Yenisey, C., Birincioglu, M. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Digestive diseases and sciences* 54, 1214-1221, 2017.

Elliott, S.N., Wallace, J.L. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 12, 559-568, 1998.

EI-Maraghy, S.A., Rizk, S.M., Shahin, N.N. Gastroprotective effect of crocin in ethanol-induced gastric injury in rats. *Chemico-biological interactions* 229, 26-35, 2015.

Franke, A., Teyssen, S., Singer, M.V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. *Digestive Diseases* 23, 204-213, 2006.

Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)* 57, 453-455, 2003.

Ham, M., Kaunitz, J.D. Gastroduodenal defense. *Current opinion in gastroenterology* 23, 607-616, 2007.

Holzer, P., Pabst, M., Lippe, I.T. Intra-gastric capsaicin protects against aspirin-induced lesion formation and bleeding in the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 96, 1425-1433, 1989.

Hui, S., Fangyu, W. Protective effects of bilobalide against ethanol-induced gastric ulcer in vivo/vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 85, 592-600, 2017.

Kıyan, S., Uyanıkgil, Y., Altuncı, Y.A., Çavuşoğlu, T., Uyanıkgil, E.Ö.Ç., Karabey, F. Investigation of acute effects of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort-Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 21, 323-336, 2015.

La Casa, C., Villegas, I., De La Lastra, C.A., Motilva, V., Calero, M.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of ethnopharmacology* 71, 45-53, 2000.

Linde, K., Berner, M.M., Kriston, L. St John's wort for major depression. *The Cochrane Library*, 2008.

Liu, Y., Tian, X., Gou, L., Fu, X., Li, S., Lan, N., Yin, X. Protective effect of l-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *environmental toxicology and pharmacology* 34, 280-287, 2012.

Ma, L., Liu, J. The protective activity of *Conyza blinii* saponin against acute gastric ulcer induced by ethanol. *Journal of ethnopharmacology* 158, 358-363, 2014.

Malfertheiner, P., Chan, F.K., McColl, K.E. Peptic ulcer disease. *The Lancet* 374, 1449-1461, 2009.

Ocak, T., Duran, A., ÖZYALVAÇLI, G., Ocak, Z., Terzi, E.H., Tosun, M., Erdem, K. Protective effects of montelukast and *Hypericum perforatum* against intestinal ischemia-reperfusion injury in hamsters. *Turkish journal of medical sciences* 44, 381-386, 2014.

Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology* 103, 59-65, 2006.

Ozbakis-Dengiz, G., Hekimoglu, A., Kandemir, N., Kurcer, Z. Effects of statins in an indomethacin-induced gastric injury model in rats. *Turk J Gastroenterol* 23, 456-462, 2012.

Öztürk, Y., Aydın, S., Başer, K., Kirimer, N., Kurtar-Öztürk, N. Hepatoprotective activity of *Hypericum perforatum* L. alcoholic extract in rodents. *Phytotherapy Research* 6, 44-46, 1992.

Paglia, D.E., Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Translational Research* 70, 158-169, 1967.

Pan, J.-S., He, S.-Z., Xu, H.-Z., Zhan, X.-J., Yang, X.-N., Xiao, H.-M., Shi, H.-X., Ren, J.-L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. *World J Gastroenterol* 14, 5857-5867, 2008.

Papadakis, K.A., Targan, S.R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual review of medicine* 51, 289-298, 2000.

Rogler, G., Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of surgery* 22, 382-389, 1998.

Rozza, A.L., de Mello Moraes, T., Kushima, H., Tanimoto, A., Marques, M.O.M., Bauab, T.M., Hiruma-Lima, C.A., Pellizzon, C.H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (*Rutaceae*) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E 2. *Chemico-biological interactions* 189, 82-89, 2011.

Rtibi, K., Jabri, M.A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., Amri, M., Marzouki, L. Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. *BMC complementary and alternative medicine* 15, 292, 2015.

Ševčovičová, A., Šemeláková, M., Plšíková, J., Loderer, D., Imreová, P., Gálová, E., Kožurková, M., Miadoková, E., Fedoročko, P. DNA-protective activities of hyperforin and aristoforin. *Toxicology in Vitro* 29, 631-637, 2015.

Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Mogami, S., Hibi, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 50, 35-39, 2011.

Takeuchi, K., Ueshima, K., Hironaka, Y., Fujioka, Y., Matsumoto, J., Okabe, S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. *Digestion* 49, 175-184, 1991.

Tanideh, N., Nematollahi, S.L., Hosseini, S.V., Hosseinzadeh, M., Mehrabani, D., Safarpour, A., Sepehrimanesh, M., Koochi-Hosseiniabadi, O., Najibi, A. The healing effect of *Hypericum perforatum* extract on acetic acid-induced ulcerative colitis in rat. *Annals of Colorectal Research* 2, 2014.

Turan, M.I., Bilen, H., Demiryilmaz, I., Ozgeris, F.B., Baykal, H., Turkoglu, M., Suleyman, H. Effects of *Hypericum perforatum* and *Hippophae rhamnoides* extracts

on indomethacin-induced gastric oxidative stress in rats. *Biomedical Research* 24, 2013.

Velázquez-Moyado, J.A., Martínez-González, A., Linares, E., Bye, R., Mata, R., Navarrete, A., 2015. Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *Journal of ethnopharmacology* 174, 403-409.

Yesilada, E., Gurbuz, I. Evaluation of the antiulcerogenic effect of the flowering herbs of *Hypericum perforatum* L. *ECZACILIK FAKULTESI DERGISI-GAZI UNIVERSITESI* 15, 77-84, 1998.

Yi, S.-X., Peng, Y., Chang, X.-R., Peng, N., Yan, J., Lin, Y.-P. Effect of pre-moxibustion on apoptosis and proliferation of gastric mucosa cells. *World journal of gastroenterology* 13, 2174, 2007.

Zdunić, G., Gođevac, D., Milenković, M., Vučićević, D., Šavikin, K., Menković, N., Petrović, S. Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an antiinflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytotherapy Research* 23, 1559-1564, 2009.

Zelickson, M.S., Bronder, C.M., Johnson, B.L., Camunas, J.A., Smith, D.E., Rawlinson, D., Von, S., Stone, H.H., Taylor, S.M. *Helicobacter pylori* is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation. *The American Surgeon* 77, 1054-1060, 2011.