



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**5-FLUOROURASİL İLE OLUŞTURULAN İLEUM VE KOLON  
EPİTEL HASARINA KARŞI SAINT JOHN'S WORT'UN OLASI  
KORUYUCU ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

NURDAN BÜLBÜL  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof.Dr. ŞULE ÇETİNEL

2015-İSTANBUL

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji  
Tez Sahibi : Nurdan Bülbül  
Tez Başlığı : 5-Flourourasil ile Oluşturulan İleum ve Kolon Epitel Hasarına Karşı  
Saint John's Wort'un Olası Koruyucu Rolünün Değerlendirilmesi  
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Abd.  
Sınav Tarihi : 31.08.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Şule Çetinel

Kurumu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Feriha Ercan

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Canan Hürdağ

İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03./08./2015 tarih ve 41. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nurdan BÜLBÜL

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca birikim ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bu çalışmada büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Şule Çetinel'e, öğrenim sürem boyunca bana katkı sağlayan değerli hocalarım, Prof. Dr. Feriha Ercan'a, Prof. Dr. Serap Şirvancı'ya ve Doç. Dr. Dilek Akakın'a teşekkür ederim. Yine bu çalışmada bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Aslı Aykaç'a, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özer Şehirli'ye, Öğr. Gör. Naziye Özkan'a, Araş. Gör. Nagehan Özyılmaz Yay'a, Araş. Gör. Furkan Bölükbaşı'ya, Araş. Gör. Özlem Tuğçe Çilingir'e, Araş. Gör. Elif Kervancıoğlu Demirci'ye, Kutay Köroğlu'ya, Tek. Ünal Devrim'e, Tek. Belgin Terzi'ye, Tek. Yücel Öztürk'e, Cansu Kandemir'e, Buse Özdemir'e, Ozan Tari'ya katkılarından, emeklerinden ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteğini ve iyi niyetini esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Damla Anıl ve Ayça Karagöz'e de teşekkür ederim. Son olarak özellikle hayatımdaki başarılarımın gerçek sahibi olarak gördüğüm ve hayatımda sahip olduğum en değerli şey olan, koşulsuz desteğim aileme çok teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

Sayfa numarası

<b>KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ</b> .....	vi
<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
4.1. İleum Histolojisi .....	5
4.1.1. Mukoza.....	6
4.1.1.1. Epitel.....	8
4.1.1.2. Lamina propriya .....	10
4.1.1.3. Muskülaris mukoza .....	11
4.1.2. Submukoza .....	11
4.1.3. Muskülaris eksterna.....	11
4.1.4. Seroza .....	12
4.2. Kolon Histolojisi.....	12
4.2.1. Mukoza.....	13
4.2.1.1. Epitel .....	13
4.2.1.2. Lamina propriya .....	15
4.2.1.3. Muskülaris mukoza .....	15
4.2.2. Submukoza .....	15
4.2.3. Muskülaris eksterna.....	15
4.2.4. Seroza ve adventisya .....	16
4.3. 5'- Fluorourasil.....	16
4.3.1. 5-FU kullanımı ve yan etkileri .....	17
4.3.2. 5-FU metabolizması ve etki mekanizması .....	17
4.4. Saint John's Wort (Sarı Kantaron) .....	19
4.4.1. SJW'nin temel kimyasal bileşenleri .....	20
4.4.2. SJW'nin çeşitli etkileri .....	21
4.4.2.1. Antidepresan etkisi.....	21
4.4.2.2. Antiinflamatuvar etkisi .....	22
4.4.2.3. Antimikrobiyal-Antiviral-Antibakteriyal etkisi .....	22

4.4.2.4. Yara iyileştirici etkisi .....	23
4.4.2.5. Diğer etkileri .....	23
4.4.3. SJW'nin yan etkileri .....	23
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>24</b>
5.1. Deney Hayvanları .....	24
5.2. Deney Grupları .....	24
5.3. Işık Mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skorlama .....	24
5.4. Apoptoz Tayini .....	25
5.4.1. TUNEL yöntemi ile apoptoz tayini .....	25
5.4.2. Western blot yöntemi ile Bcl-2/Bax oranı, kaspaz-3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin tayinleri .....	26
5.4.2.1. Doku homojenizasyonu ve protein miktarı analizi .....	26
5.4.2.2. SDS-PAGE ve Western Blot .....	27
5.5. PCNA İmmünohistokimyası ile Proliferasyon Tayini .....	27
5.6. Yarı İnce Kesitlerin Hazırlanması .....	28
5.7. İstatistiksel Analiz .....	29
<b>6.BULGULAR</b> .....	<b>30</b>
6.1. Hayvan Ağırlıklarındaki Değişim Bulguları .....	30
6.2. Morfolojik Bulgular .....	30
6.2.1. Hematoksilen ve eozin boyaması .....	30
6.2.1.1. İleum bulguları .....	30
6.2.1.2. Kolon bulguları .....	32
6.2.1.3. Histopatolojik değerlendirme bulguları .....	34
6.2.2. Gomori trikrom boyaması .....	36
6.2.2.1. İleum bulguları .....	36
6.2.2.2. Kolon bulguları .....	38
6.2.3. PAS boyaması .....	40
6.2.3.1. İleum bulguları .....	40
6.2.3.2. Kolon bulguları .....	42
6.2.4. Yarı-ince kesitler .....	44
6.2.4.1. İleum bulguları .....	44
6.2.4.2. Kolon bulguları .....	46

6.3. Apoptoz Bulguları .....	48
6.3.1. TUNEL yöntemi bulguları .....	48
6.3.1.1. İleum bulguları .....	48
6.3.1.2. Kolon bulguları .....	51
6.3.2. Western Blot yöntemi bulguları .....	53
6.3.2.1. İleum bulguları .....	53
6.3.2.2. Kolon bulguları .....	56
6.4. PCNA immünohistokimyası bulguları .....	58
6.4.1. İleum bulguları .....	58
6.4.2. Kolon bulguları .....	61
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>64</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>70</b>
<b>9. ETİK KURUL ONAYI .....</b>	<b>77</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>78</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ANOVA	: Analysis of variance
5-FU	: 5'- Fluorourasil
DPD	: Dihidro pirimidin dehidrojenaz
dTDP	: Deoksitimidin-5'-difosfat
dTMP	: 2'-deoksitimidin-5'-monofosfat
dTTP	: Deoksitimidin-5'-trifosfat
dUMP	: 2'-deoksiüridin-5'-monofosfat
dUTP	: Deoksiüridin-50-trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
FdUMP	: 5-Floro-20-deoksiüridin-50-monofosfat
FdUTP	: 5-Floro-20-deoksiüridin-50-trifosfat
FUH <sub>2</sub>	: 5,6-dihidro-5-fluorourasil
FUPA	: $\alpha$ -floro- $\beta$ -üredopropiyonik asit
FUTP	: 5-Floroüridin-50-trifosfat
GBP-2	: Glukagon benzeri peptid-2
GI	: Gastro intestinal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
i.p.	: İnter peritoneal
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
Sc	: Subkutan
SJW	: Saint John's Wort
TNBS	: Trinitrobenzen sülfonik asit
Tris	: Trishidroksimetilaminometan
TS	: Timidilat sentaz
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling
UTP	: Üridin-5'-Trifosfat

## 1. ÖZET

### **5-Fluorourasil ile Oluşturulan İleum ve Kolon Epitel Hasarına Karşı Saint John's Wort'un Olası Koruyucu Rolünün Değerlendirilmesi**

**Öğrenci Adı ve Soyadı:** Nurdan BÜLBÜL

**Danışman:** Prof. Dr. Şule ÇETİNEL

**Anabilim dalı:** Histoloji ve Embriyoloji

**Amaç:** 5-Fluorourasil (5-FU) kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Ancak ileit ve kolit gibi yan etkileri vardır. Saint John's Wort (SJW) antioksidan, antiinflamatuvar ve antibakteriyal özelliklerinin yanında orta düzeyde depresyonların tedavisinde kullanılan bir tıbbi bitkidir. Bu çalışmanın amacı 5-FU uygulanarak oluşturulmuş ileit ve kolite karşı Saint John's wort'un olası koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada dişi *Sprague Dawley* sıçanlar (220-300 gr) kullanıldı ve üç deney grubuna (n=5) ayrıldı: Grup 1- Serum fizyolojik (SF) grubu, Grup 2- 5-FU uygulama grubu, Grup 3- 5-FU+SJW uygulama grubu. Her gün 150 mg/kg dozda i.p. 5-FU uygulamasının ardından SF ya da 300 mg/kg dozda SJW 4 gün boyunca verildi. Dekapitasyon sonrası ileum ve kolon dokuları histopatoloji için alınıp %10'luk formaldehitte fikse edilerek ışık mikroskopi için rutin olarak takip edildi. Apoptotik hasar TUNEL ve Western Blot yöntemleriyle, proliferasyon PCNA immünohistokimyası ile araştırılıp, sonuçları istatistiki olarak değerlendirildi.

**Bulgular ve Sonuçlar:** Kolon ve ileum dokularında kontrol grupları düzenli epitel ve çok sayıda goblet hücresi içeren glanduler morfoloji sergiledi. Kolon dokusunda 5-FU tedavisi bezlerde dejenerasyon ve lamina propriyada yüksek düzeyde lökosit birikimiyle epitelyal organizasyon bozukluğuna yol açtı. SJW bezlerdeki dejenerasyonu ve lökosit konsantrasyonunu azalttı. İleumda 5-FU tedavisi ile epitelde oldukça fazla dökülmeyle beraber dejenerasyon ve lamina propriyada lökosit birikimi vardı. SJW tedavisi epitelde ve bezlerde orta düzeyde rejenerasyon sağladı. Western Blot metodu, TUNEL metodu ve PCNA immünohistokimyası sonuçları bu bulgularla uyum gösterdi.

**Anahtar Sözcükler:** 5-Fluorourasil, Saint John's wort, İleit, Kolit, Apoptoz

## 2. SUMMARY

### **Evaluation of Possible Protective Effect of Saint John's Wort Against 5-Fluorouracil-Induced Ileum and Colon Epithelium Injury**

**Student Name and Surname:** Nurdan Bülbül, **Advisor:** Prof. Dr. Şule Çetinel

**Department:** Histology and Embryology

**Aim:** 5-Fluorouracil (5-FU) is a commonly used chemotherapeutic agent for cancer treatment. However, it has some side effects including ileitis and colitis. St. John's wort (SJW) is an herbal medicine that is used for therapy of mild depression mainly besides it has antioxidant, anti-inflammatory, and anti-bacterial properties. The aim of this study is to investigate the possible preventive effect of Saint John's wort against ileitis and colitis which are induced by 5-FU.

**Materials and Methods:** Female *Sprague Dawley* rats (220-300g) were used in the study and three experimental groups (n=5) : Group ( 1) –saline group, Group ( 2) 5-fluorouracil (5-FU) treated control, and Group (3) 5-FU + SJW treated group were set. Following 150 mg/kg dose of 5-FU, either saline or SJW (300 mg/kg) were administered in each day during 4 days. After decapitation, ileum and colon tissues of the intestine were removed, fixed in 10% formaldehyde and processed routinely for light microscopy. Apoptotic injury was shown via TUNEL assay and Western Blot method. Proliferation was shown via PCNA immunohistochemistry. Data were analyzed statistically.

**Results:** In the colon and ileum tissues, the control groups demonstrated regular epithelial and glandular morphology with abundance of goblet cells. In the colon tissue, 5-FU treatment degenerated the glands prominently and had led to epithelial disorganization along with a high degree of accumulation of leukocytes in lamina propria. The SJW treatment appeared to have reduced the degeneration of glands and concentration of leukocytes. In the ileum, there was degeneration with severe desquamation in the epithelium, and accumulation of leukocytes in the lamina propria, SJW treatment led to a moderate regeneration in the epithelium and glands. Western Blot method, TUNEL assay and PCNA immunohistochemistry results confirmed histology.

**Key Words:** 5-Fluorouracil, Saint John's Wort, İleitis, Colitis, Apoptosis

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir ya da daha fazla hücrenin çoğalma kontrolünü yitmesiyle tümör olarak nitelendirdiğimiz solid hücre kitleleri ya da kan, kemik iliği ile ilişkili kanserler ortaya çıkmaktadır. Bu kanserlerin tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve/veya radyoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Kemoterapide uygulanan düşük moleküler ağırlıklı ilaçlar tümör hücrelerini tamamen yok eder ya da hücre proliferasyonunu sınırlandırır. Ancak bu ajanların çoğu tümör hücreleriyle beraber sağlıklı hücreleri de etkilediklerinden (Mazzaferro ve ark., 2013) kemik iliği baskılanması, saç kaybı, gastrointestinal lezyonlar, kusma gibi istenmeyen yan etkileri beraberinde getirmektedir (Nussbaumer ve ark., 2011).

Kemoterapide kullanılan en eski kanser ilaçlarından birisi olan 5-fluorourasil (5-FU) kolorektal, meme, karaciğer (Ghoshal ve Jacob, 1997) mide, baş-boyun (Schöffski, 2004), cilt tümörleri (Isanbor ve O'Hagan, 2006) başta olmak üzere pek çok solid tümörün tedavisinde hala kullanılmaktadır. 5-FU, hücreler üzerinde sitotoksik etki gösteren 130,08 g/mol moleküler ağırlığa sahip bir pirimidin analogudur (Straub, 2010; Ghoshal ve Jacob, 1997; Nussbaumer ve ark., 2011). DNA sentezi ve tamirinde görev alan timidilat sentazın inhibitörüdür. Eksozom kompleksinin aktivitesini inhibe eder ve toksik metabolitlerinin DNA ve RNA yapısına katılmasını sağlayarak hücre döngüsünün durmasına ve hücrenin apoptoza gitmesine yol açar (Tung ve ark., 2011). Bu şekilde kanser hücreleri üzerinde hücre çoğalmasını durdurucu etki sağlarken hızlı çoğalan sağlıklı hücreleri de olumsuz etkiler. Bunun sonucu olarak ortaya çıkan kemik iliği baskılanması ve mukozit 5-FU'nun en sık görülen yan etkileri olarak belirir (Nussbaumer ve ark., 2011). Bu yan etkisinden dolayı 5-FU sıçan ve farelerle yapılan çalışmalarda gastrointestinal mukozit oluşturuca ajan olarak kullanılmaktadır (Tung ve ark., 2011; Smith ve ark., 2008; Letari ve ark., 2010).

Kemoterapötiklerin oluşturduğu olumsuz etkiler tedavideki ilaç dozunun azaltılmasına ya da tedavinin yarıda bırakılmasına neden olmakta, bu durum ise tedavinin başarısız olması ile sonuçlanabilmektedir (Smith ve ark., 2008). Yan etkilerden kaynaklanan bu durumu azaltmak için alternatif tedavi yöntemlerinden yararlanım adına pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu yan etkiler arasında bulunan

mukozitin görülme sıklığının ve şiddetinin azaltılması için antiinflamatuvar özellik taşıyan çeşitli bitki özlerinin kullanımına yönelik çalışmalar mevcuttur. Doğal bir antiinflamatuvar olan Saint John's wort (*Hypericum perforatum*, SJW) bitkisi Antik Yunan ve Roma dönemlerinden günümüze kadar çeşitli kullanımlarıyla geleneksel tıpta yer edinmiş bir türdür (Öztürk ve ark., 2007). Son yıllarda antidepresan, antitümöral, analjezik, antimikrobiyal, antioksidan, antiviral özelliklerinin yanında antiinflamatuvar özelliğine dair de etkili sonuçlar ortaya konulan bir bitkidir (Abdel-Salam, 2005). Yüzyıllar öncesinden bu yana yara iyileştirici bir ajan olarak kullanımı da bilinmektedir. Yapılan çalışmalar SJW'nin epitelin yeniden yapılanmasını sağladığını göstermektedir (Lavagna ve ark., 2001). Bu özelliklerinden yola çıkarak SJW'nin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının mukozit gibi komplikasyonları iyileştirici etkisi araştırılmaktadır.

Bu çalışmada deney hayvanlarına 5-FU uygulanmasıyla meydana gelmesi beklenen ileit ve kolitin şiddetinin belirlenmesi ve 5-FU'nun toksik etkisine karşı SJW'nin koruyucu etkilerinin histolojik, histokimyasal ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

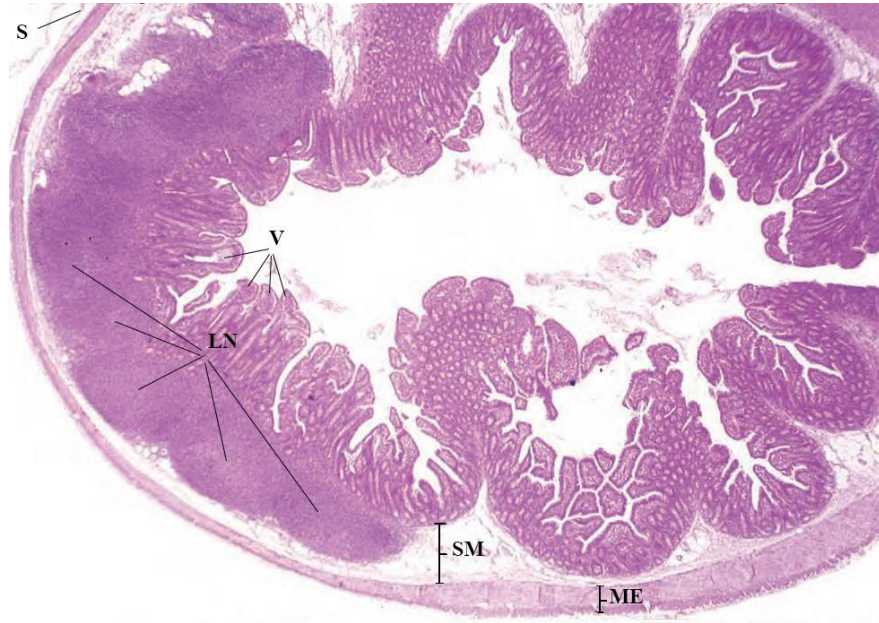
### 4.1. İleum Histolojisi

İnce bağırsak yiyeceklerin sindirimi sürecinin tamamlanarak sindirim ürünlerinin epitel tabakasındaki hücreler tarafından emilime uğradığı bölgedir (Mescher, 2013). Boyu 6 m'yi geçen ve sindirim kanalının en uzun kısmını oluşturan ince bağırsak Duedonum, Jejunum ve İleum olmak üzere 3 anatomik bölgeye ayrılır (Ross ve Pawlina, 2014).

Duedonum, mide pilorunda başlayıp duodojejunal bileşkede sonlanan yaklaşık 25 cm uzunluğunda olan, ince bağırsağın en geniş ve kısa olan ilk bölümüdür.

Jejunum, ince bağırsağın duodojejunal bileşkede başlayan, yaklaşık 2,5 m uzunluğunda beşte ikilik üst kısmını oluşturan kısımdır.

İleum, ince bağırsağın yaklaşık 3,5 m uzunluğundaki alt beşte üçlük kısmını oluşturan, jejunumun devamı olan kısımdır. İleum tüm sindirim kanalında olduğu gibi mukoza, submukoza, muskularis eksterna ve seroza tabakalarından oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014) (Resim1).

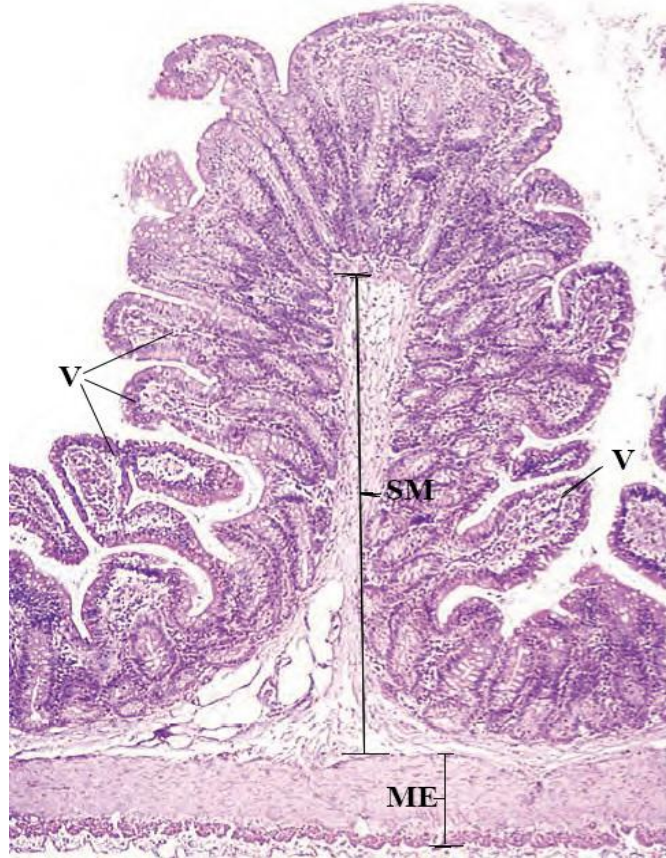


**Resim 1.** İleumun histolojik yapısı. SM: Submukoza, ME: Muskularis eksterna, S:Seroza, V:Villus, LN:Lenf nodu (Ross ve Pawlina, 2014).

#### 4.1.1. Mukoza

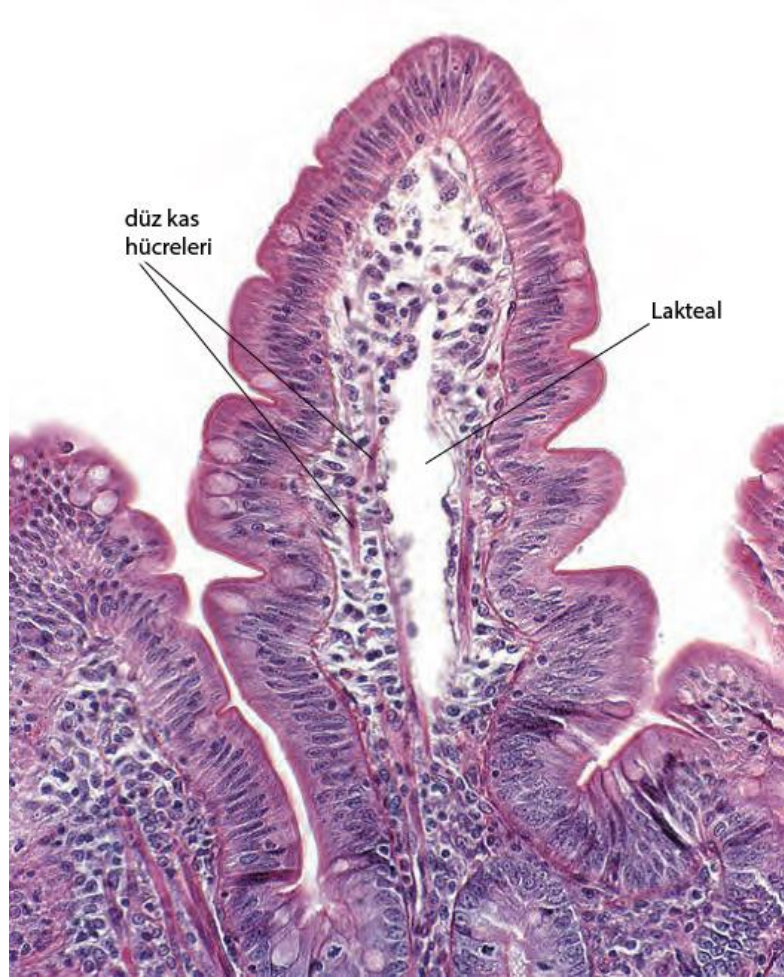
Mukoza, yüzey epiteli, onun altında uzanan bağ dokusu olan lamina propriya ve düz kastan meydana gelen muskularis mukoza tabakalarından oluşur. Koruma, emilim ve salgılama fonksiyonlarını yerine getirir (Ross ve Pawlina, 2011).

Makroskopik olarak incelendiğinde ince bağırsak yüzeyinin mukoza ve submukozanın birleşerek oluşturduğu plika sirkularis (Kerckring valfleri) adını verdiğimiz kalıcı sirküler ya da yarım ay biçiminde görülen katlantılar taşıdığı görülür (Resim 2). Bu katlantılar ince bağırsağın büyük bir kısmında bulunur, sayıları ve büyüklükleri ileumun orta kısmında azalır (Mescher, 2013; Ross ve Pawlina, 2014).



**Resim 2.** İnce bağırsak plika sirkularis yapısı. V: Villus, SM: Submukoza, ME: Muskularis Eksterna. (Ross ve Pawlina, 2011).

Mukoza yüzeyinden lümen içerisine uzanan ve villus adı verilen parmak veya yaprak benzeri mukozal çıkıntılar yoğun bir şekilde tüm yüzeyi örter (Resim 3). Bu çıkıntılar enterosit adı verilen emilim hücreleri ile çok sayıda goblet hücresinden oluşan basit silindirik epitel ile örtülüdür. Sindirim ürünlerinin emiliminde işlev gören temel yapıdır. Lamina propriyadan villus içerisine uzanarak villus merkezini oluşturan gevşek bağ doku fibroblast hücreleri, düz kas hücreleri, lenfositler, plazma hücreleri, fenestralı kan kapillerleri ve lakteal adı verilen sentral lenfatikleri içerir (Mescher, 2013; Ross ve Pawlina, 2014).



**Resim 3.** Villus yapısı ( Ross ve Pawlina, 2011).

#### 4.1.1.1. Epitel

Villus epiteli intestinal bez ya da kript (Lieberkühn kripti) denilen kısa tübüler bezlerle devamlılık gösterir. Bu bezler lamina propriyanın kalınlığı boyunca görülürler ve villuslar arasından bağırsak lümenine açılırlar (Mescher, 2013; Ross ve Pawlina, 2014). Bağırsak bez epiteli farklı hücreler ile ince bağırsağın tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğindeki pluripotent kök hücreleri içerir (Mescher, 2013).

Villus yüzey epiteli ile bağırsak bezi epiteli başlıca beş temel hücre tipini içerir. Bunlar enterositler, goblet hücreleri, Paneth hücreleri, enteroendokrin hücreler ve M (mikrokatlantı) hücreleridir. Bunlara ek olarak bağırsak bezlerinde ara hücreler bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

**Enterositler**, oval çekirdekleri bazal yerleşimli olan uzun silindirik hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2014). Maddelerin bağırsak lümeninden dolaşım sistemine geçişini sağlamak için özelleşmiş bu hücrelerin apikal kısmında bulunan mikrovillus yapıları ışık mikrobik görüntülerde çizgili (firçamsı) kenar oluşturmalarıyla tanınırlar. Bu şekilde apikal yüzey alanını 600 kata kadar arttırabilen mikrovillusların inceyapısal görüntüsüne bakıldığında yüzeylerinin besinlerin hücre içerisine alımını sağlayan glikokaliks ile örtülü olduğu görülür (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2013). Apikal sitoplazmanın çıkıntı yapmasıyla oluşan bu yapılar yaklaşık 1 µm uzunluğa, 0,1 µm çapa sahiptir ve hücre membranı tarafından sarılmıştır (Mescher, 2013). Mikrovillus, villus ve plika sirkularis yapıları mukozal yüzey alanını arttırarak besin emilimini de arttırırlar (Ross ve Pawlina, 2014). Bağırsak yüzeyini plika yapısının 3 kat, villus yapısının 10 kat, mikrovillus yapısının ise 20 kat arttırdığı düşünülmektedir (Mescher, 2013). Enterositlerin emilim fonksiyonlarının yanında salgılama fonksiyonları da önem arz eder. Bu hücreler disakkaridaz ve dipeptidaz salgılayarak dissakkaritlerin monosakkaritlere, dipeptidlerin de amino asitlere parçalanmasını sağlar. Ayrıca gastrik ve pankreatik lipazlarla sindirilen lipid alt ünitelerinin hücre içerisine alınarak bir dizi işlem sonrası şilomikronlara çevrilip lakteale verilmesi işlevini görür (Mescher, 2013).

**Goblet hücreleri**, bağırsak epitelindeki diğer hücreler arasında dağılmış olarak bulunan tek hücreli bezlerdir. Bu hücrelerin sayısının duodenumdan ileuma doğru gittikçe arttığı görülür (Ross ve Pawlina, 2014). Hücreler önce glikoprotein mucus salgılar daha sonra hidrate olarak mukusu oluşturur, bu sayede bağırsağın korunmasını ve kayganlaştırılmasını sağlar (Mescher, 2013). Hücrenin apikalinde büyük mucusojen granül kümelerinin, bazalinde ise dar bir sitoplazmanın bulunması hücreye karakteristik kadeh şeklini verir. Mikrovilluslarının varlığı granüllerin apikal-lateral kısımlarını saran ince sitoplazma halkası ile sınırlıdır (Ross ve Pawlina, 2014).

**Paneth hücreleri**, bağırsak bezlerinin bazal kısmında kök hücrelerin aşağısında konumlanmış, apikal sitoplazmasında bulunan eozinofilik salgı granülleriyle tanımlı geniş ekzokrin hücrelerdir. Salgı granülleri içerisinde lizozim, fosfolipaz A ve defensin bulunur. Bunlar mikroorganizma membranlarına ve bakteri hücre duvarına bağlanır, bu yapıların yıkımını sağlayarak antimikrobiyal etki gösterir (Mescher, 2013). Bu şekilde antimikrobiyal etki göstermelerinin yanında belirli bakterileri ve protozoonları fagosite edebilme yeteneklerinin de bulunmasıyla Paneth hücrelerinin bağırsağın normal florasının düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

**Enteroendokrin hücreler**, kapalı ve açık olmak üzere iki hücre tipi içerir. Çoğunluğu oluşturan açık hücreler her villusun tüm seviyelerinde bulunabilir ve lümenle etkileşerek taşıdığı kemoreseptörler sayesinde belirli nutrientlerin seviyesini tanımlar, gastrointestinal fonksiyonları düzenleyen çeşitli hormonların salınımını sağlar (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2013).

**M (Mikrokatlantı) hücreleri**, ileum mukozasında Peyer plaklarının ve diğer lenf nodüllerinin üzerinde bulunan özelleşmiş epitelyal hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2013). Bu hücrelerin apikal yüzeylerinde mikrovillus yerine mikrokatlantılar bulunur (Ross ve Pawlina, 2014). Epitel içi lenfosit ve antijen sunan hücre taşıyan bazal membran invajinasyonu ya da cebi bulunması ile karakterize hücrelerdir (Mescher, 2013). Taşıdıkları endositotik veziküller ile lümendeki mikroorganizmaları ve makromolekülleri içine alarak bazolateral membrana taşıır ve epitelyal hücreler arası alana boşaltarak alttaki lenfositlerle temas etmesini sağlar.



Lenf hücreleri lenf noduna göçerek bu yolla uygun immün cevabın oluşmasını uyarırlar (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2013).

**Ara hücreler**, bölünme yeteneğine sahip olan hücrelerdir ve bağırsak bezlerinin alt yarısında bulunan kök hücre nişi içerisindeki hücrelerin çoğunluğunu oluştururlar. Mikrovillus taşırlar ancak mikrovillusları kısa ve düzensiz yapıdadır (Ross ve Pawlina, 2014). Bu hücrelerden goblet hücresine farklılaşacak olanların apikal plazma membranı altında küçük, yuvarlak salgı granüllerinin oluşturduğu bir kümelenme görülür. Enterositlere farklılaşacak olan ara hücrelerde ise salgı granüllerinin yerine mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum ve ribozom kümelerinin oluştuğu görülür (Ross ve Pawlina, 2014).

#### **4.1.1.2. Lamina propriya**

Epitel altında yer alan lamina propriya gevşek bağ dokusu yapısındadır. Bol miktarda kan ve lenf damarları, sinir lifleri, düz kas hücreleri, difüz lenfoid doku ve mukozal bezler bu tabakada yer alır (Ross ve Pawlina, 2011; Mescher, 2013). Özellikle villuslarda olmak üzere lenfosit, eozinofil, mast hücresi, plazma hücresi, makrofaj gibi çok sayıda immün sistem hücresi bulunur (Ross ve Pawlina, 2014). Bağırsak villusları içine girerek beraberinde sinir, lenfatik ve mikrodolaşım yapılarını da villuslara taşır (Mescher, 2013). Sindirim ürünleri buradaki kan ve lenf damarlarına difüze olarak vücuda dağılır. Emilen metabolitlerin çoğunluğu kan kapillerlerine geçerken, bazı lipidler ile proteinler lenfatik kapillerlere geçer. (Ross ve Pawlina, 2011). Villus içerisine giren lamina propriyanın merkezinde kör uçlu lenfatik kapiller olan lakteal bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

Lamina propriya içerisindeki lenfatik doku, lümenenden mukozaya girebilecek mikroplara ya da herhangi bir antijene karşı immünolojik bariyer fonksiyonu görerek koruyucu işlev sağlar. İleumda çok sayıda, büyük lenfatik nodül bulunur ve Peyer plakları olarak adlandırılan bu yapılar mukozanın büyük bir kısmı ile submukozayı işgal edebilir (Ross ve Pawlina, 2011).

#### **4.1.1.3. Muskülaris mukoza**

Mukozanın en alt bölümünü oluşturan bu tabaka içte dairesel dışta uzunlamasına dizilimle organize olmuş düz kas hücrelerinden oluşur. Muskülaris mukozadan villus içine uzanarak lakteale eşlik eden bu hücrelerin kasılmasıyla ritmik villus hareketleri oluşur, emilim ve sekresyon kolaylaştırılır (Ross ve Pawlina, 2011; Mescher, 2013). Ayrıca bu kasılma lenfi laktealden muskülaris mukozayı çevreleyen lenfatik damar ağına geçmeye zorlar (Ross ve Pawlina, 2014). Mukozadaki kas hücrelerince oluşturulan bu lokal hareketler sindirim kanalının peristaltik hareketlerinden bağımsız olarak gelişir (Ross ve Pawlina, 2011).

#### **4.1.2. Submukoza**

Mukozanın altında yer alan bu tabaka, içerisinde yoğun geniş kandamarları, lenfatik damarlar ve sinir pleksusu taşıyan sıkı, düzensiz bağ dokudan oluşmuştur. Geniş damarları mukoza, muskülaris eksterna ve serozaya dallar verir. Sindirim kanalının düz kas tabakalarını uyardan sorumlu enterik sinir sistemini oluşturan parasempatik gangliya sinir hücre gövdeleri ve onların postgangliyonik sinir fiberleri submukozada bulunur (Ross ve Pawlina, 2011). Burada bulunan yayılmış, birbirleriyle bağlantılı nöronlar submukozal (Meissner) sinir pleksuslarını oluşturur (Mescher, 2013).

#### **4.1.3. Muskülaris eksterna**

Submukozadan sonra yer alan bu tabaka iç dairesel ve dış uzunlamasına kas tabakası olmak üzere nispeten kalın iki düz kas tabakasından oluşur (Mescher, 2013). Bu iki kas tabakası arasında bulunan ince bağ dokusu tabakasında miyenterik pleksusun (Auerbach pleksusu) sinirleri ile kan ve lenf damarları bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011; Mescher, 2013).

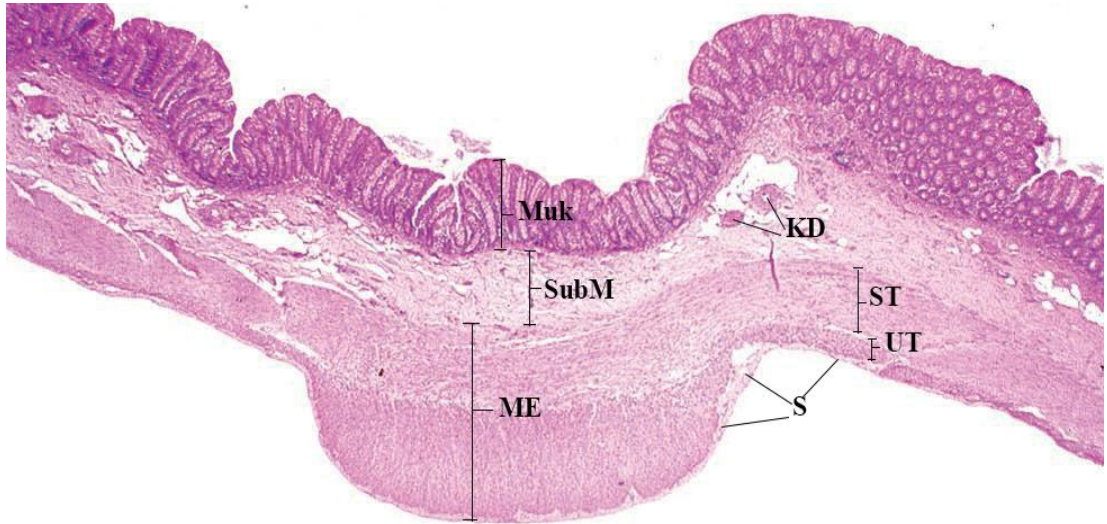
Muskülaris eksterna tabakasının iç dairesel tabakasının kasılmasıyla lümen daralır ve lümandeki içerik karışır. Dış uzunlamasına kas tabakasının kasılması ise bağırsağın kısalmasını, içeriğin ilerlemesini sağlar (Ross ve Pawlina, 2011).

#### 4.1.4. Seroza

Bağırsağı en dıştan saran tabakadır. Mezotelyum adı verilen basit yassı epitel ile altında az miktarda bulunan bağ dokudan meydana gelir. Geniş kan damarları ve lenfatik damarlar ile sinir gövdeleri seroza boyunca seyrederek. Bağ doku kısmında yağ dokusu da gelişebilmektedir (Ross ve Pawlina, 2011).

#### 4.2. Kolon Histolojisi

Kalın bağırsak çekum, çekumun uzantısı olan vermiform appendiks, çıkan, transvers, inen ve sigmoid kolon ile rektum ve anal kanaldan oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2013). Kolon ileumda olduğu gibi sindirim kanalı boyunca görülen karakteristik dört tabakayı da taşımaktadır (Resim 4). Farklı olarak muskularis eksternanın dış longitudinal kas tabakası eşit mesafeli üç kas bandı şeklinde görülür. Bu bantlara Tenia coli adı verilir. Kolonun dış yüzeyinde yer alan tenia koliler arasında küçük kesecikler görülür. Bu keselere ise Haustra coli adı verilir. En dışta serozada küçük yağ uzantıları görülür. Bu uzantılar ise Omental appendiksler olarak adlandırılırlar (Ross ve Pawlina, 2014).

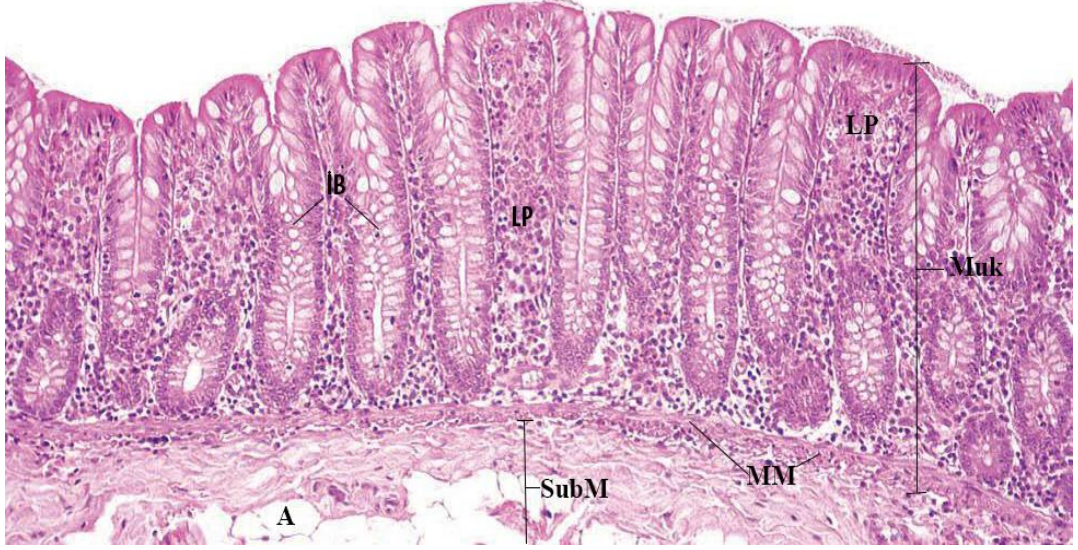


**Resim 4.** Kolonun histolojik yapısı. Muk: Mukoza, SubM: Submukoza, ME: Muskularis eksterna, ST: Sirküler kas tabakası, UT: Uzunlamasına kas tabakası, KD: Kan damarı (Ross ve Pawlina, 2011).



#### 4.2.1. Mukoza

İnce bağırsaktan farklı olarak kolon mukozasında plika sirkularis ve villus yapıları görülmez (Ross ve Pawlina, 2014) (Resim 5).



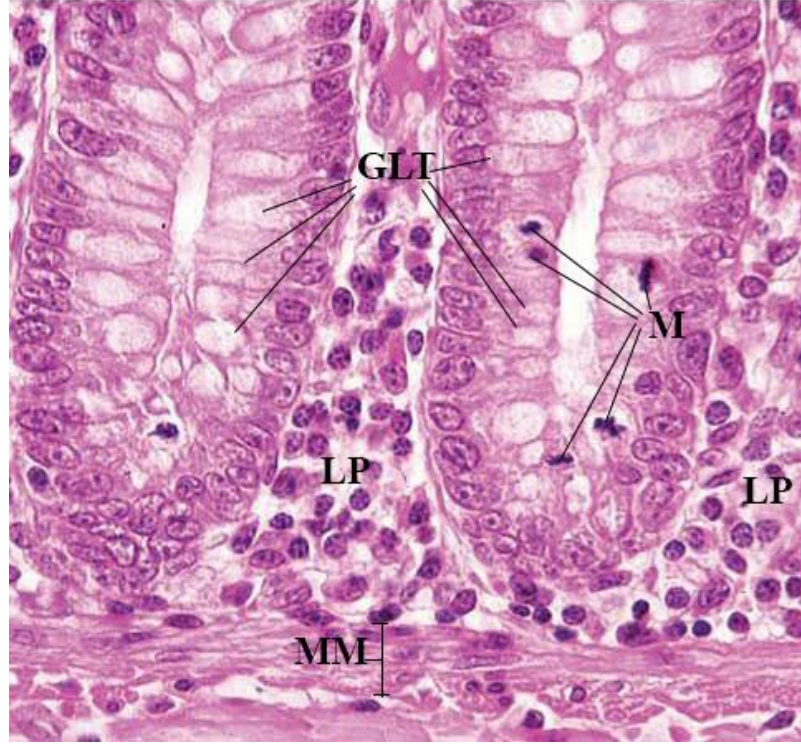
**Resim 5.** Kolon mukozasının histolojik yapısı. Muk: Mukoza, İB: İntestinal bez, LP: Lamina propriya, MM: Muskularis mukoza, SubM: Submukoza, A: Adipoz doku (Ross ve Pawlina, 2011).

##### 4.2.1.1. Epitel

Lieberkühn kriptaları olarak adlandırılan düz-tübüler bağırsak bezleri mukozanın tüm kalınlığı boyunca gözlemlenir. İntestinal yüzeyin invajinasyonu ile oluşan bu bezler yüzey epitelinde olduğu gibi tek katlı silindirik epitel hücrelerinden oluşur. Bezlerin lümenleri taban kısmı haricinde dardır (Ross ve Pawlina, 2014) (Resim 6). Hem bezler hem de intestinal lümen, emilim hücreleri, goblet hücreleri ve az sayıda enteroendokrin hücreler ile sarılmıştır (Mescher, 2013) (Resim 5). İnce bağırsakta bulunan Paneth hücrelerini içermez (Ross ve Pawlina, 2014). Epitelyal kök hücreler ise bezlerin alt üçte birlik kısmında yer alır (Mescher, 2013). Bu kısımda bulunan ara hücreler ince bağırsaktakilerle özdeş hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2014).

Mukozada yer alan silindirik emilim hücreleri (kolonosit) morfolojik olarak ince bağırsaktaki enterositlerle eşdeğerdir ve temel görevi elektrolitlerle suyun geri emilimini sağlamaktır (Ross ve Pawlina, 2014). Hücrelerin yüzeyinde düzensiz mikrovillusların varlığı görülür (Mescher, 2013). Emilim hücreleri kolonun büyük

bir bölümünde goblet hücrelerinden daha baskın olarak görülür. Emilim hücrelerinin kolonda da glikokaliks ürettiği ancak bu tabakanın sindirim enzimleri içermediği bilinmektedir. Hücreler arasındaki boşluğun sıvıların aktif transportundan ötürü sık olarak dilate olduğu görülür (Ross ve Pawlina, 2014).



**Resim 6.** İntestinal bez yapısı. GLT: Goblet hücresi, M: Mitotik figür, LP: Lamina propriya, MM: Muskülaris mukoza (Ross ve Pawlina, 2011).

Kolondaki goblet hücreleri miktarca ince bağırsaktakinden daha fazladır. Bu hücreler sindirim kanalı boyunca ilerlerken daha da katılaştıran içeriğin kolay atılması için sürekli bol miktarda mukus salgılar. Ürettikleri mukus bağırsak yüzeyinin kayganlaştırılmasını sağlar (Ross ve Pawlina, 2014).

Goblet hücreleri bağırsak bezlerinin derinlerine hatta replikatif zona kadar erişebilmektedir. Yüzeye ulaşana kadar sürekli mukus salgılamaya devam eder. Yüzeye ulaştıklarında artık sentez oranı sekresyon oranının altında kaldığı için yüzey epitelinde uzun, ince morfolojide, apikal sitoplazması içinde çok az sayıda musinojen granülü içeren ‘tükenmiş’ goblet hücreleri görülmeye başlar. Bu hücrelerden başka kolon epitelinde “caveolated tuft cell” denilen nadir hücreler de görülür. Ancak bu

hücrelerin tükenmiş goblet hücrelerinin bir formu olabileceği düşünülmektedir (Ross ve Pawlina, 2011).

#### **4.2.1.2. Lamina propriya**

Kolon lamina propriyası ince bağırsakla aynı temel komponentleri içerip ilave bazı özellikler sergiler. Bunlardan biri olan kollajen tabla yapısı fenestralı absorbtif venöz kapillerlerin bazal laminası ile epitelin bazal laminası arasında uzanan, kollajen ve proteoglikanlardan meydana gelmiş kalın bir tabakadır. Epitelin interselüler alanından vasküler alana su ve elektrolitin geçişinin düzenlenmesine katılır (Ross ve Pawlina, 2014).

Bağırsak bezlerinin taban kısmının hemen altında düzenli olarak replike olan hücrelerden oluşan bir fibroblast popülasyonu bulunur. Buna perikriptal fibroblast kılıf adı verilir. Epiteldeki kök hücrelere komşu olan bu hücreler bölünmenin ardından epitel hücreleriyle senkronize bir şekilde farklılık kazanıp epitel hücreleriyle paralel olarak yukarı doğru göç eder. Luminal yüzeye ulaştıktan sonra bu hücrelerin büyük bir çoğunluğu makrofajların özelliklerini kazanır (Ross ve Pawlina, 2014).

Kolondaki immün sistem buradaki geniş bakteriyal popülasyona karşı oldukça gelişmiştir (Mescher, 2013). Burada bulunan büyük lenf nodülleri bağırsak bezlerinin düzenli aralıklarına girip submukozaya kadar uzanır. Bağırsağın luminal yüzeyine uzanan lenfatik damarlar bulunmaz, sadece bağırsak bezlerinin taban kısmında seyrek olarak bulunan küçük lenf damarlarının varlığı bilinmektedir. Bu damarlar da muskularis mukozadaki lenfatik ağa drene olur (Ross ve Pawlina, 2014).

#### **4.2.1.3. Muskularis mukoza**

#### **4.2.2. Submukoza**

İnce bağırsak submukozası ile aynı özelliklere sahiptir.

#### **4.2.3. Muskularis eksterna**

Longitudinal kas tabakası yukarıda belirtildiği gibi tenya koli adını verdiğimiz kas bantları şeklinde kalınlaşmıştır. Tenya kolilerden uzanan kas demetleri kolon boyunca düzensiz mesafelerle iç dairesel kas tabakasına girer. Bu şekilde oluşan

kesintiler kolon segmentlerinin bağımsız olarak kasılmasını sağlar ve kolon duvarında yukarıda bahsedilen haustra coli denen kese şeklindeki çıkıntıların oluşmasına neden olur (Ross ve Pawlina, 2011).

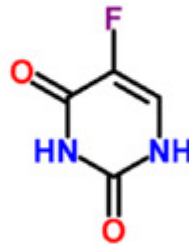
#### 4.2.4. Seroza ve adventisya

Kalın bağırsak en dışta diğer yapılarla direkt temas halinde olduğu yerlerde (posterior kısmın büyük bir bölümünde) adventisya ile diğer yerlerde ise seroza ile sarılıdır (Ross ve Pawlina, 2014).

#### 4.3. 5- Fluorourasil

Kemoterapik ilaçlar, DNA-interaktif ajanlar, antitübilin ajanlar, moleküler hedefli ajanlar, monoklonal antikolar, hormonlar, antimetabolitler gibi etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır (Nussbaumer ve ark., 2011). 5-Fluorourasil (5-FU), 1957’de Heidelberger ve arkadaşları tarafından antimetabolit olarak sentezlenmiş bir florinlenmiş pirimidin ajanıdır (Heidelberger ve ark., 1957). Florin atomu pirimidin halkasının karbon-5 pozisyonundaki hidrojen atomu ile yer değiştirmiştir (Schöffski, 2004) (Şekil 1). Kanser tedavisinde kullanılan bu ajanın *in vivo* olarak üretilen aktif formu bahsedilen üridin 5'- fosfat formudur.

#### 5-fluorouracil



Şekil 1. 5- Fluorourasilin kimyasal yapısı (Nussbaumer ve ark., 2011).

#### **4.3.1. 5-FU kullanımı ve yan etkileri**

5-FU akciğer, kolorektal, over, meme, baş/boyun, genitouriner, (DiFrancia ve ark.), cilt, gastrik (Isanbor ve O'Hagan, 2006 ), pankreatik (Schöffski, 2004) kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır. Genellikle intravenöz bolus olarak ya da devamlı infüzyonlar halinde uygulanmaktadır. Devamlı infüzyonlar halinde verilmesi daha verimli sonuçlar vermekte ve daha az toksik etki göstermektedir (Isanbor ve O'Hagan, 2006; Nussbaumer ve ark., 2011; Schöffski, 2004). Ancak kanser tedavisinde kullanılan 5-FU sadece tümörlere karşı selektif olmadığı ve sağlıklı hücreleri de etkileyebildiği için ciddi yan etkilere yol açabilmektedir (Isanbor ve O'Hagan, 2006; Nussbaumer ve ark., 2011). Nörotoksisite ve kardiyotoksisite sıkça görülen toksik etkileridir (Raschi ve ark., 2010; Nussbaumer ve ark., 2011). Kemik iliği baskılanması, mukozit (Nussbaumer ve ark., 2011) ve diyare, mide bulantısı, kusma gibi gastrointestinal rahatsızlıklar ile saç dökülmesi, dermatit temel yan etkileridir (Schöffski, 2004; Malet-Martino ve Martino, 2002). Kemik iliği baskılanmasının özellikle bolus doz uygulamalarında; el-ayak sendromu, stomatit, nörotoksisite ve kardiyotoksisitenin ise özellikle devamlı infüzyon uygulamalarında daha çok görüldüğü bilinmektedir (Malet-Martino ve Martino, 2002).

#### **4.3.2. 5-FU metabolizması ve etki mekanizması**

5-FU ve türevleri, 5,10-metilen tetrahidrofolatı metil donörü olarak kullanarak 2'-deoksiüridin-5' monofosfatı (dUMP) 2'-deoksitimidin-5'-monofosfata (dTMP) çeviren bir enzim olan timidilat sentazın (TS) inhibitörü olarak iş görür. Timidilat sentaz tarafından bu dönüşümün gerçekleştirilmesi DNA sentezi ve tamiri için temel taş olan dTMP'nin tek de novo yoludur (Isanbor ve O'Hagan, 2006 ; Peter ve ark., 2002). Enzimin aktif bölgesi işgal edilerek malin hücre metabolizmasının durdurulması sağlanır (Malet-Martino ve Martino, 2002).

Urasil hücre içerisinde RNA ve DNA sentezinde gerekli pirimidinlerin öncülü olarak kullanılmaktadır. 5-FU, urasilde olduğu gibi hücre içerisine kolaylaştırılmış transport ile alınır. Hücre içerisine giren 5-FU, urasille aynı şekilde metabolize olmak için ya anabolik yola ya da katabolik yola girer. Anabolik yola giren 5-FU

aktif metabolitlerine dönüşerek terapötik etkilerini gösterecek forma dönüşür. Baskın olan katabolik yola giren 5-FU ise inaktif metabolitlerine dönüşerek elimine edilir. İlaç metabolizmasında etkili olan bu iki yol birbirleriyle yarış halindedir (Schöffski, 2004). Hücre içerisine alınan 5-FU'nun %80'inden fazlası katabolik yola girerken, kalan kısmı anabolik yola girerek terapötik etkisini gösterir (Malet-Martino ve Martino, 2002).

Anabolik yola giren 5-FU'nun dönüştüğü üç ana metabolit ve işlevleri aşağıdaki gibidir:

1. 5-Floro-20-deoksiüridin-50-monofosfat (FdUMP): DNA sentezindeki hız sınırlayıcı basamağı katalizleyen enzim olan timidilat sentazı inhibe eder.

2. 5-Floroüridin-50-trifosfat (FUTP): Üridin-5'-trifosfat (UTP)'ın yerine RNA'nın yapısına katılarak RNA işleyişinin ve fonksiyonun değişmesine yol açar.

3. 5-Floro-20-deoksiüridin-50-trifosfat (FdUTP) ya da Deoksiüridin-50-trifosfat (dUTP): DNA eşlenmesini sağlayan enzim olan DNA polimeraz için substrat görevi gören deoksitimidin trifosfatın (dTTP) yerine DNA'nın yapısına katılır (Schöffski, 2004).

Sitotoksiteden sorumlu en önemli mekanizma FdUMP'nin oluşmasıdır. Normalde timidilat sentazın reseptör kısmına dUMP'nin bağlanması ile konfigürasyonel değişim oluşur ve metil donörü olan N-5,10-metilen-tetrahidrofolat için bitişik bir bağlanma bölgesi açığa çıkar. Bağlanan folatın bir karbon grubunun üridin halkasına katılmasıyla dihidrofolat ve dTMP oluşur; dTMP'nin fosforillenmesiyle deoksitimidin-5'-difosfat (dTDP) ve dTTP meydana gelir. Oluşan bu dTTP DNA sentezi için gerekli nükleotid bazlarından birisidir. 5-FU ve metabolize olmasıyla oluşan FdUMP timidilat sentaza bağlanarak üçlü kovalent bir kompleks oluşturur. FdUMP'nin 5. karbon pozisyonundaki florin atomu dUMP'nin aynı pozisyonundaki hidrojen atomundan daha sıkı bağlı olduğu için dUMP FdUMP-TS kompleksi ile yarışamaz. Böylece FdUMP dUMP'nin TS'ye bağlanmasını engeller ve metil grubu transferi ile dUMP'den dTMP oluşmasının önüne geçer. Sonuçta DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli olan dTTP miktarı ve erişilebilirliği azalır (Schöffski, 2004) . Bu durum programlı hücre ölümü yolaklarını tetikler (Malet-Martino ve Martino, 2002).

Sitotoksiteden sorumlu ikincil ana mekanizma FUTP oluşumudur. 5-FU'da urasilin 5. karbon pozisyonunda hidrojen atomu yerine bulunan florin atomu orijinaline yakın büyüklükte olduğu için UTP'yi taklit ederek RNA polimeraz tarafından tanınabilme özelliğine sahiptir. Bu özellik 5-FU'nun tüm RNA tiplerinin yapısına katılabilmesini sağlar. Sitotoksik etkinin RNA'da oluşan birçok modifikasyonun neticesi olduğu düşünülmektedir. Yukarıda bahsedilen temel iki mekanizma haricinde toksisiteden sorumlu ayrı iki mekanizmanın daha var olduğu anlaşılmıştır. 5-FU'nun DNA yapısına katılması bunlardan biridir. Anabolizma sonucu oluşan FUTP'lerin bazıları RNA yapısına katılmak yerine şekerlerle birleşerek 5-FU-nükleotid şekerlerini oluşturabilir. Bu şekerlerin membran yapısına katılması ile membran fonksiyonunun değişmesi sonucu 5-FU'nun sitotoksik etki gösterebildiği bir diğer mekanizmanın varlığı da kabul edilmektedir (Malet-Martino ve Martino, 2002). Bolus uygulamasında RNA aracılı hücre ölümü tetiklenirken, daha uzun süre düşük doza maruz kalınan uygulamalarda ise timidilat sentaza bağlı mekanizmalarla hücre ölümünün tetiklendiği rapor edilmektedir (Aschele ve ark., 1992; Malet-Martino ve Martino, 2002; Sobrero ve ark., 1993).

Katabolik yolda temel olarak dihidro pirimidin dehidrojenaz (DPD) aktivitesi sonucu 5-FU 5,6-dihidro-5-fluorourasile (5-FUH<sub>2</sub>) indirgenir. Bu dönüşüm basamağı anabolizma için erişilebilir olan 5-FU miktarını etkilediği için önemlidir. Daha sonra bu basamağı sırasıyla 5-FUH<sub>2</sub>'den  $\alpha$ -floro- $\beta$ -üridopropiyonik asit (FUPA) ve sonrasında en büyük kataboliti olan  $\alpha$ -floro- $\beta$ -alanin oluşumu takip eder. Bu temel katabolitlerin yanında farklı metabolitlerin de olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Malet-Martino ve Martino, 2002).

#### **4.4. Saint John's Wort (Sarı Kantaron)**

Saint John's wort (SJW) bitkisinin latince adı *Hypericum perforatum*'dur (Bombardelli ve Morazzoni, 1995). Türkiye'de sarı kantaron, mayasıl otu, binbirdelik otu, kan otu, kılıç otu isimleri ile bilinmektedir (Altun ve ark., 2013). Sarı çiçekleri, oval-doğrusal yaprakları ile belirgin bitki Batı Asya, Kuzey Afrika, Avrupa, Avustralya ve Amerika'da geniş yayılım gösteren çok yıllık bir bitki türüdür (Greenson ve ark., 2001; Wills ve ark., 2000; Saddiqe ve ark., 2010). Bitkinin toprak üstünde kalan kısmı kurutulup besin takviyesi olarak kullanılmaktadır (Greenson ve



ark., 2001). Tıbbi kullanımı M.Ö. 5. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Bu bitkinin yağlı preparatlarının ufak yanıkların, yaraların, deri iltihaplarının tedavisinde sıkça kullanıldığı bilinmektedir (Greeson ve ark., 2001). Yatıştırıcı ve kanamayı durdurucu etkisinin yanında geleneksel olarak aşırı heyecan, fibrozit, siyatik, nöralji, anksiyete, depresyon, menapozal nevrozda kullanıldığı bilinmektedir. En çok bilinen kullanımı hafiften orta düzeye değişen depresif rahatsızlıkların tedavisidir ve bunun için kullanımıyla en çok satılan bitkisel ürünlerden birisi olmuştur (Barnes ve ark., 2001; Wills ve ark., 2000).

#### **4.4.1. SJW'nin temel kimyasal bileşenleri**

SJW çok sayıda aktif biyolojik bileşen içermektedir. Bunlardan (1) naftodiantronlar, (2) floroglusinoller, (3) flavonoidler, (4) proantosiyanidinler, (5) fenilpropanlar, (6) biflavonlar SJW içerisinde bulunan büyük doğal ürün gruplarıdır. Ek olarak taninler, esansiyel yağlar, ksantonlar ve aminoasitler daha az miktarlarla varlık gösterirler (Saddiye ve ark., 2010). Bileşenlerin miktarı varyasyon gösterebilmektedir (Greeson ve ark., 2001).

Naftodiantronlardan hiperisin ve psödohiperisin bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarında bulunmaktadır (Greeson ve ark., 2001; Saddiye ve ark., 2010). Hiperisin ve psödohiperisinin birlikte oluşturduğu total hiperisin miktarı % 0,1 ve 0,15 civarındadır (Vanhaelen ve Vanhaelen-Fastre., 1983). Bu içerikteki psödohiperisin miktarı hiperisin miktarının 2 ile 4 katı arasındadır (Saddiye ve ark., 2010).

Spesifik olarak protein kinaz C'yi inhibe ederek memeli hücrelerinde antiproliferatif etki gösterir (Takahashi ve ark., 1989). Ayrıca hiperisin CD8+T hücre yönetimli sitotoksitelyi baskılayarak T hücre yönetimli hastalıklarda tedavi ajanı olarak kullanım potansiyeli sergiler (Lavie ve ark., 2000). Hiperisinin fototoksik özellik gösterdiği de bilinmektedir (Schey ve ark.,2000; Vandenbogaerde ve ark., 1998). Bu özelliğinden yararlanılarak bazı çalışmalarda fotodinamik kanser tedavisinde ışığa duyarlılaştırıcı ajan olarak kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2015, Kleemann ve ark., 2014).

Floroglusinollerden hiperforin ve adhiperforin çiçek ve tomurcuk kısmında bulunmaktadır (Greeson ve ark., 2001). Hiperforin miktarı %2 ile 4,5 arasında iken



adhiperforin miktarı %2 ile 1,9 arasındadır (Barnes ve ark., 2001). Hiperforin sinaptozomal aralıktaki dopamin, serotonin ve nöradrenalin nörotransmitterlerinin geri alımını inhibe eder ya da değiştirir (Saddiçe ve ark., 2010). Ayrıca antitümöral (Beerhues, 2006) ve antimalaryal (Verotta ve ark., 2007) etkisi bulunmaktadır.

SJW'deki biyolojik olarak aktif maddelerin temel grubunu oluşturan flavonoidlerden hiperosit, kuersetin, kuersitrin, izokuersitrin, kamferol, luteolin, mirisetin, rutin, bitkinin sap, çiçek, filiz ve yaprak kısımlarının hepsinde bulunmaktadır (Greeson ve ark., 2001). Bunlardan rutin %1,6, hiperosit %1,9, izokuersitrin %0,9 miktarında görülmektedir (Barnes ve ark., 2001). Hiperosit, rutin, kuersitrin ve izokuersitrin spazmolitik etkiye sahiptir. Biyolojik aminlerin katabolizmasından sorumlu enzim olan monoamin oksidaz A'yı ve katekol-O-metiltransferazı inhibe eder (Saddiçe ve ark., 2010).

Taninler bileşenlerin %8-9'unu oluşturur (Barnes ve ark., 2001). Tüm bileşenler arasında hiperforin ve hiperisin başlıca biyoaktif bileşenleridir (Nahrstedt ve Butterweck, 1997). Bunların dışında ksantonlar da önemli etkilere sahiptir (Saddiçe ve ark., 2010).

#### **4.4.2. SJW'nin çeşitli etkileri**

##### **4.4.2.1. Antidepresan etkisi**

Temel olarak hiperisinin antidepresan etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Hiperforin de antidepresan etkinin en büyük bileşenlerindedir (Chatterjee ve ark., 1998; Laakman ve ark., 1998; Barnes ve ark., 2001; Cervo ve ark., 2002). Rutin de antidepresan etkiye katılan temel bir bileşendir (Saddiçe ve ark., 2010).

SJW, nörotransmitter metabolizması inhibisyonu, nörotransmitter reseptör yoğunluğu ve duyarlılığının düzenlenmesi, sinaptik geri alım inhibisyonu yolu ile serotonin, nörepinefrin ve dopamin gibi depresyonla ilişkilendirilen nörotransmitterlerin sinaptik yararlanırlığının artmasını sağlayarak antidepresan etki gösterir (Greeson ve ark., 2001).

#### 4.4.2.2. Antiinflamatuvar etkisi

SJW bileşenleri antiinflamatuvar etkisini dış patolojik uyarılara karşı oluşan inflamatuvar cevabı engelleyerek göstermektedir (Fiebich ve ark., 1999).

SJW içerisinde yer alan amentoflavonun antiinflamatuvar etkiden sorumlu bileşenlerden olduğu bilinmektedir (Saddiqa ve ark., 2010). Flavonoidlerden kuersetin siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) tarafından katalizlenen prostaglandin biyosentezini durdurarak antiinflamatuvar etki sağlar (Stojanovic ve ark., 2013).

#### 4.4.2.3. Antimikrobiyal-Antiviral-Antibakteriyal etkisi

SJW bileşenlerinden hiperforinin *Staphylococcus aureus* (Brondz ve ark., 1982), *Streptococcus pyogenes* ve *Corynebacterium diphtheriae*'ye (Schempp ve ark., 1999) karşı antibakteriyal etkisi gösterilmiştir. Ancak bu bakterilere karşı yüksek dozlarda etkili olabilmektedir (Voss ve Verweij, 1999; Fiebich ve ark. 1999; Barnes ve ark., 2001).

Hiperisinin HIV ve Hepatit-C'ye karşı antiviral etkileri bilinmektedir (Barnes ve ark., 2001). Hepatit-B replikasyonunu ve viral antijenlerin sekresyonunu baskıladığı görülmüştür (Pang ve ark., 2010). Hiperisin ve psödohiperisin HIV viryonunun entegrasyon kompleksleriyle etkileşerek konakçı DNA'sının yapısına katılıp çoğalmasını engeller (Stojanovic ve ark., 2013).

SJW preparatlarının (novoimanine ve imanine), yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarına karşı sülfanilamid antibiyotiklerden daha etkili olduğu saptanmıştır. SJW yağı içeren merhemlerin *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Micrococcus luteus* ve *Moraxella catarrhalis*'e karşı etkili olduğu ancak vajinal flora bakterisi olan *Lactobacillus acidophilus*'un üremesini etkilemediği görülmüştür. SJW'nin Gram pozitif bakteriler üzerine olan antimikrobiyal etkisinin Gram negatif bakteriler üzerine olan antimikrobiyal etkisinden çok daha belirgin olduğu bildirilmektedir (Saddiqa ve ark., 2010). *Helicobacter pylori*'ye karşı da antimikrobiyal etki sergilediği görülmektedir (Yeşilada ve ark., 1999).

Taninlerin antiviral (De Bruyne ve ark., 1999) ve antimikrobiyal (Scalbert, 1991) etki sağladıkları bilinmektedir. Hiperisin ve psödohiperisin de antiretroviral etki göstermektedir (Meruelo ve ark., 1988).

#### **4.4.2.4. Yara iyileştirici etkisi**

SJW'nin yara iyileştirici etkisinden dolayı kullanımı yüzyıllar öncesine dayanmaktadır (Saddiçe ve ark., 2010). Bu etki SJW'nin fibroblast hücrelerince kollajen üretimini arttırmasından ve hasarlı alanı tamir için fibroblast hücrelerinin aktive edilerek poligonal şekil almasını sağlamasından kaynaklanır (Öztürk ve ark., 2007).

SJW çiçeklerinden elde edilen ekstraktın yanık yaralarının iyileşmesi süresini geleneksel yöntemlere göre daha fazla kısalttığı bildirilmektedir (Saddiçe ve ark., 2010).

#### **4.4.2.5. Diğer etkileri**

Belirtilen temel etkileri dışında günümüze kadar yapılmış pek çok çalışmada SJW'nin anksiyete (Taylor ve Kobak, 2000), bitkinlik (Stevinson ve ark., 1998), bipolar bozukluk (Potter ve ark., 2009), insomnia (Sarris ve ark., 2011), egzama, yanık (Butterweck, 2003), diyare (Saddiçe ve ark., 2010), ağrı (Galeiotti ve ark., 2014; Bahmani ve ark., 2014; Raak ve ark., 2012) durumlarında tedavi ajanı olarak kullanımı bildirilmektedir.

#### **4.4.3. SJW'nin yan etkileri**

SJW iyi tolere edilebilmektedir ve genellikle orta düzeyde yan etkiler görülür. Bunlar gastrointestinal semptomlar, baş dönmesi, sersemlik, yorgunluk-sedasyondur. Nadiren fotosensitivite görülebilmektedir. Fotosensitivite etkisinden SJW bileşeni hiperisin sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca duyu sinirlerinde hipersensitivite ortaya çıkabildiği ve *in vitro* çalışmalarda yüksek doz kullanımında sperm motilitesini durdurduğu rapor edilmiştir (Barnes ve ark., 2001; Ondrizek ve ark., 1999).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmanın onayı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'ndan alındı (26.11.2014, 75.2014.mar). Deneylerde genç erişkin *Sprague-Dawley* türü dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar uygun kafeslerde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda tutuldu ve standart sıçan yemi ile beslenip içme suyu içirildi.

### 5.2. Deney Grupları

**Kontrol Grubu (n=5):** Gruptaki tüm hayvanlar aynı laboratuvar koşullarında tutuldu ve hayvanlara sadece i.p. olarak serum fizyolojik verildi.

**5-Fluorourasil Grubu (n=5):** Gruptaki tüm hayvanlara 4 gün boyunca 150 mg/kg 5-FU i.p. olarak uygulandı.

**5-Fluorourasil+Saint John's Wort Grubu (n=5):** Gruptaki tüm hayvanlara 4 gün boyunca 150 mg/kg 5-FU'nun i.p. olarak uygulanmasının ardından içme suyu içinde çözdürülmüş 300 mg/kg SJW eter anestezisi altında gastrik gavaj ile verildi.

### 5.3. Işık Mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skori

Servikal dislokasyonla öldürülen tüm gruptaki hayvanlardan 1'er cm'lik ileum ve kolon doku parçaları dekapitasyonun hemen ardından ışık mikroskopik incelemeler için nötral tamponla hazırlanmış %10'luk formalin içine alınıp 72 saat fikse edildi. Fikse edilen doku örnekleri 4-5 mm yüksekliğinde doku parçaları halinde transvers olarak kesilip küçültüldükten sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. 2 defa 5'er dakika ksilende tutulup şeffaflandırmanın ardından bir gece boyunca parafin içerisinde 60°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra doku gömme cihazında kasetlerle bloklandı. Bloklardan alınan ortalama 4 µm kalınlığındaki kesitler morfolojik değerlendirme ve histopatolojik semikantitatif analizlerde kullanılmak üzere Hematoksilen ve eozin (H&E), Gomori trikrom ve Periodic Asit Schiff (PAS) boyası ile boyandı. Boyanan

kesitler Olympus BX51 mikroskopu (Tokyo, Japonya) ile görüntüledi ve Olympus DP72 kamera (Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı. Epiteldeki histolojik hasar skorlaması H&E boyalı kesitlerde rastgele seçilen benzer alan görüntüleri 20X objektifle görüntülenerek yapıldı. Histopatolojik skorlama Ghandour ve ark. (2004)'nın çalışmasındaki kriterler modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapıldı:

**0:** Düzenli epitel yapısı

**1:** Yüzey epitelinde hafif bozulma

**2:** Yüzey ve bez epiteli içerisinde hücre kaybı ve hasarı

**3:** Mukozada vazokonjesyon, hemoraji, fokal nekroz, villus yapısının yarıdan azının kaybolması, intestinal bez kaybı

**4:** Villusun ve bez yapılarının yarıdan fazlasının kaybolması.

## **5.4. Apoptoz Tayini**

### **5.4.1. TUNEL yöntemi ile apoptoz tayini**

Apoptoz tayini için in situ DNA uç işaretleme yöntemi kullanıldı. Yöntemin uygulanmasında TUNEL kiti (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore) içerisindeki kılavuzda yazılı olan işlemler gerçekleştirildi. Işık mikroskopik çalışmalar için kullanılan bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki doku kesitleri, sırasıyla 3 defa 5'er dk ksilen, 2 defa 5'er dk %100 alkol, 3 dk % 95 alkol, 3 dk % 70 alkol'de bekletildi ve 5 dk fosfat tamponlu tuz (PBS) ile çalkalandı. Peptid bağlarının kırılması için kesitler Proteinaz K (20 µg/ml) ile oda ısısında 15 dk inkübe edildi. 2 kere 2'şer dk distile su ile çalkalandı. Ardından endojen peroksidazın maskelenmesi için kesitler PBS ile hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk oda ısısında bekletildi. PBS ile 2 defa 2'şer dk yıkandı. Lamlardaki fazla sıvı kurularak kesitlerin üzerine 15 µl dengeleyici tampon konulup, plastik lameller ile kapatıldı. 30 dk oda ısısında bekletilip üzerlerindeki plastik lameller kaldırılarak dokunun etrafı kurulandı. Lamaların her birinin üzerine 15 µl Tdt enzimi konuldu ve tekrar plastik lameller ile kapatıldı. Nemli ortamda 37 °C sıcaklıktaki etüvde 1 saat inkübe edildi. Plastik lameller kaldırılarak kesitler durdurma/yıkama tamponu ile 10 dk oda ısısında bekletildi. PBS ile 3 defa 5'er dk yıkandı. Her kesit üzerine 13 µl Anti-Digoksigenin-Peroksidaz konuldu ve üzerlerine plastik lameller kapatılarak oda ısısında 30 dk

inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dk yıkandı. Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra her kesit üzerine 15 µl DAB (diaminobenzidin) substrat solusyonu damlatıldı. Boyanma için oda ısısında ortalama 5 dk bekletildi. Renk reaksiyonu oluşması gözlemlendikten sonra kesitler distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen kullanılarak kesitlerin zıt boyaması yapıldı. 2 defa 2'şer dk %96 alkolde bekletildikten sonra kurutulup entellan ile kapatıldı.

Boyalı kesitlerin her birinde farklı gruplara ait her bir sıçan için 20X objektifle görüntülenen 5 farklı kesit alanında bulunan intestinal bezler incelenerek 450-700 arası sayıda bez epiteli hücreleri ve bezlerdeki kahverengi boyalı TUNEL pozitif hücreler sayıldı. Aynı gruba ait farklı hayvanların değer ortalamaları grup skoru olarak kaydedildi. TUNEL pozitif bez epiteli hücre sayısının toplam bez epiteli hücre sayısına oranlanmasıyla ((TUNEL pozitif hücre sayısı) / (Toplam bez epiteli hücre sayısı) X 100) apoptotik indeks hesaplandı.

#### **5.4.2. Western Blot yöntemi ile Bcl-2/Bax oranı, kaspaz-3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin tayinleri**

##### **5.4.2.1. Doku homojenizasyonu ve protein miktarı analizi**

Bcl-2/Bax oranı, kaspaz-3 ve kaspaz 9 aktivitesi tayin edildi. -80°C'de muhafaza edilen dokuların moleküler analizleri için homojenatların hazırlanmasında proteaz inhibitörü (0,2 mM fenil metil sülfonil klorür, 1 µM pepsitatin, 1 µg/ml löpeptin, ve 10 µg/ml soybean tripsin), %10 gliserol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EGTA ve 1 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren pH 7.4'lük 20 mM Tris (Trishidroksimetilaminometan) tamponu kullanıldı. Dokular 50 ml'lik falkonlara alınarak gramajlarına (1:2 w/v) göre eklenen homojenizasyon tamponu içinde 90 saniye ultraturax homojenizatörle buz üstünde homojenize edildi.

Homojenatlar 2000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım 12.000×g'de 60 dk tekrar santrifüj edildi. İkinci santrifüj sonrası oluşan mitodondriyal pellet 500 µl'lik homojenizasyon tamponuyla yıkandıktan sonra 120.000×g'de 1 s santrifüj edildi. Peletler 50 mM Tris-HCL (p.H: 7.4), %5 gliserol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, proteaz inhibitörleri ve %0,05 Triton X-100 tamponuyla

1,5 s vorteks yapılarak inkübasyonu sağlanan fraksiyonlar mitokondriyal ekstrakt olarak kullanıldı. Tüm bu işlemler +4 °C'de yapıldı.

Mitokondriyal ekstraktlardaki protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi (Lowry ve ark., 1951).

#### **5.4.2.2. SDS-PAGE ve Western Blot**

Lowry yöntemi ile protein miktarı analiz edilen doku örnekleri 100 µg protein içerecek şekilde 4X örnek tamponu ile karıştırılıp 6 dk denature edildi.

Örnekler, %12'lik poliakrilamid içeren jel ile elektroforez düzeneğine yüklenerek 120 dakika yürütüldü. Jelden nitroselüloz membrana aktarım 125 mA'de 90 dk süre ile gerçekleştirildi. Membranlar TBS-T (TBS %0.05' lik Tween 20) ve %3'lük BSA (sığır serum albümini) içeren tamponla 14 s boyunca +4°C'de inkübe edildi. Bloklamının ertesi günü membranlar farklı konsantrasyonlarda apoptoz [Bcl 2 (1: 200), Bax (1: 200), caspase 3 (1: 100), veya caspase 9 (1: 100)] proteinlerinin poliklonal antikorları ile gece boyu inkübe edildi.

Bütün membranlar muamele edildikleri antikor dışında normalizasyon analizlerinin yapılabilmesi için bir sonraki gün β aktin antikor (1: 200) ile gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Her inkübasyonun ardından membranlar 3x15 dk TBS-T ( %0,05 Tween- 20 içeren TBS) tamponla yıkandıktan sonra alkalen fosfataz eşlenik tavşan monoklonal anti keçi IgG içeren ikincil antikor ile 1 saat inkübe edildi. İkincil antikor inkübasyonundan sonra membranlar yine 3X15 dk TBS-T ile yıkandı ve NBT/BCIP renk geliştirici solüsyonu kullanılarak membran üzerinde oluşan özgün bantlar gözlemlendi.

#### **5.5. PCNA İmmünohistokimyası ile Proliferasyon Tayini**

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) çalışması için ışık mikroskopik incelemelerde kullanılan ve %10 nötral tamponlu formalin içerisinde fikse edilmiş olan doku bloklarından alınan 4 µm kalınlığındaki parafin kesitler kullanıldı. Pozitif şarjlı lamlara alınan parafin kesitler 1 gece boyunca 37 °C'lik etüvde bekletildikten sonra, parafinin uzaklaştırılması amacıyla 3 defa 5'er dk ksilende tutuldu. %96

alkolde 2 kere 10'ar dk bekletildikten sonra endojen enzim blokajını sağlamak için metanol ile hazırlanmış %3 hidrojen peroksitle 20 dakika bekletildi. Musluk suyunun ardından distile suda yıkanıp antijen geri kazanımı için ısıtılmış sitrat tampon içerisinde 20 dakika 300 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında 20 dakika soğutulduktan sonra kesitler 2 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Bloklama solüsyonunda (invitrogen PCNA staining kit cat. No.93-1143) 10 dakika bekletildi. Fare anti-PCNA biotinlenmiş sekonder antikörle (kullanıma hazır, invitrogen PCNA staining kit cat. no.93-1143) 1 saat oda ısısında, nemli ortamda bekletildi. Kesitler 3 kere 2'şer dakika PBS'te yıkandıktan sonra 10 dakika streptoavidin peroksidazla (kullanıma hazır, invitrogen) bekletildi. Tekrar 3 defa 2'şer dakika PBS ile yıkandıktan sonra, DAB kromojeniyle 5 dakika bekletilip renk reaksiyonu mikroskopta gözlendi. Distile suda yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilen kullanılarak zıt boyama yapıldı. Musluk suyu ve distile su ile yıkamanın ardından 2 defa 2'şer dakika %96 alkolde bekletilen kesitler kurutulup entellan ile kapatıldı. Boyalı kesitlerin her birinde farklı gruplara ait her bir sıçan için 20X objektifle görüntülenen 5 farklı kesit alanında bulunan intestinal bezler incelenerek 450-700 arası sayıda bez epiteli hücreleri ve kahverengi boyalı PCNA pozitif hücreler sayıldı. Aynı gruba ait farklı hayvanların değer ortalamaları grup skoru olarak kaydedildi. PCNA pozitif bez epiteli hücre sayısının toplam bez epiteli hücre sayısına oranlanmasıyla ((PCNA pozitif hücre sayısı) / (Toplam bez epiteli hücre sayısı) X 100) proliferasyon indeksi hesaplandı.

## **5.6. Yarı İnce Kesitlerin Hazırlanması**

Dekapitasyonun hemen sonrasında bekletilmeden alınan ileum ve kolon dokularından 3 mm<sup>3</sup> ebatlarında parçalar alınıp %2,5'lük 0,1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatif i içerisinde 12 saat +4 °C'de fikse edildi. 1 saat PBS'te bekleyen dokulara %1'lik osmiyum tetroksitle 1 saat ikincil fiksasyon uygulandı. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilen dokular önce 2 defa 15'er dk saf propilende daha sonra 1 gece boyunca 1/1 oranındaki propilen epon karışımında bekletildi. Ardından 3 saat saf eponda bekletilen dokular kalıplar içerisinde epona gömülüp polimerizasyon için 60 °C'deki



etüvde 1 gece boyunca bekletildi. Ultramikrotomda (Leica Ultracut R) alınan yaklaşık 1 µm kalınlığındaki yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyandı.

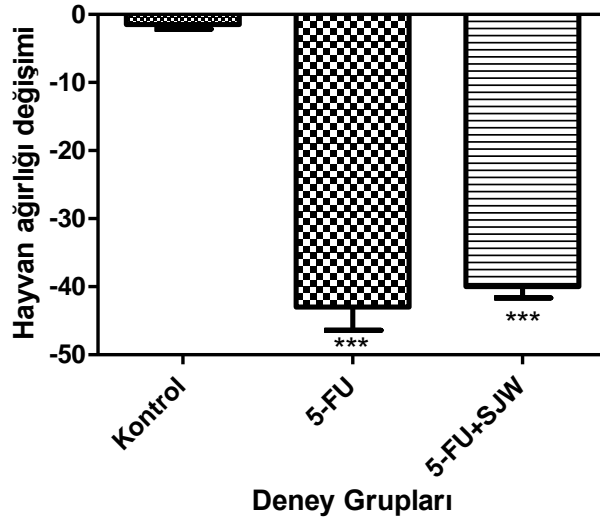
### **5.7. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz yapmak için Graph-Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey testi kullanıldı.  $p < 0,05$  anlamlı (önemli) olarak kabul edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Hayvan Ağırlıklarındaki Değişim Bulguları

Deney gruplarındaki hayvanların ağırlıklarındaki azalma kontrol grubunda  $1,5 \pm 1,2$  gr iken 5-FU grubunda  $43 \pm 6,7$ , 5-FU+SJW grubunda  $40 \pm 3,2$  gr bulundu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hem 5-FU grubunda hem de 5-FU+SJW grubunda hayvan ağırlıklarında anlamlı bir azalma ( $p < 0,001$ ) görüldü (Şekil 2).



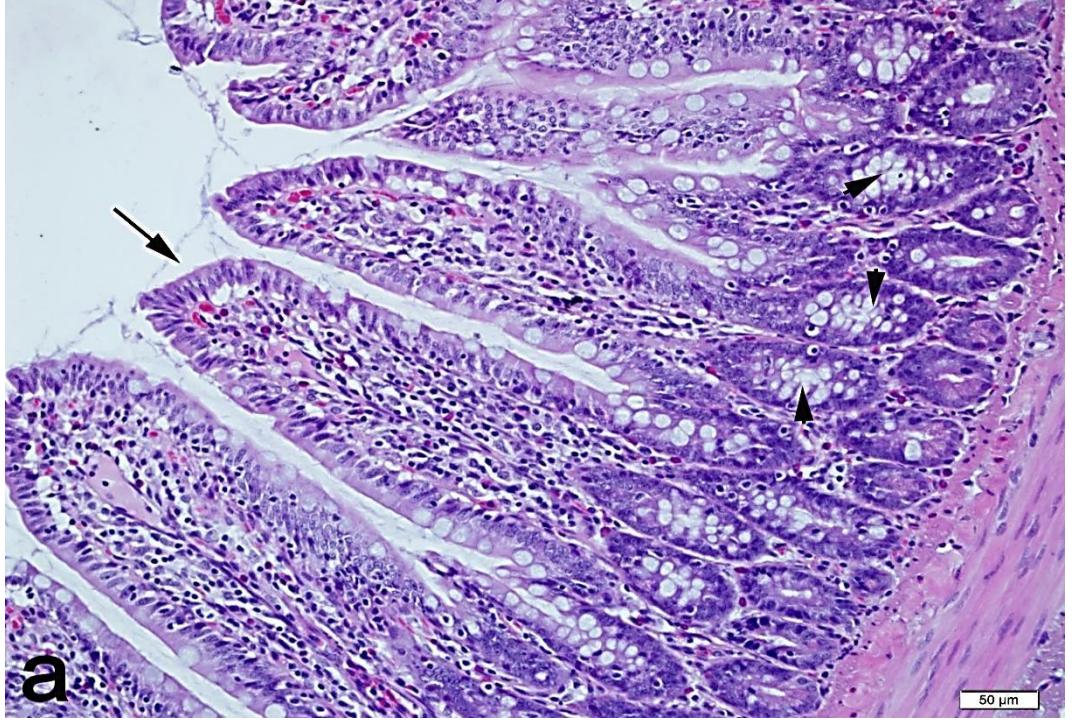
Şekil 2. Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış hayvan ağırlığı değişimi grafiği. \*\*\*:  $p < 0,001$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında.

### 6.2. Morfolojik Bulgular

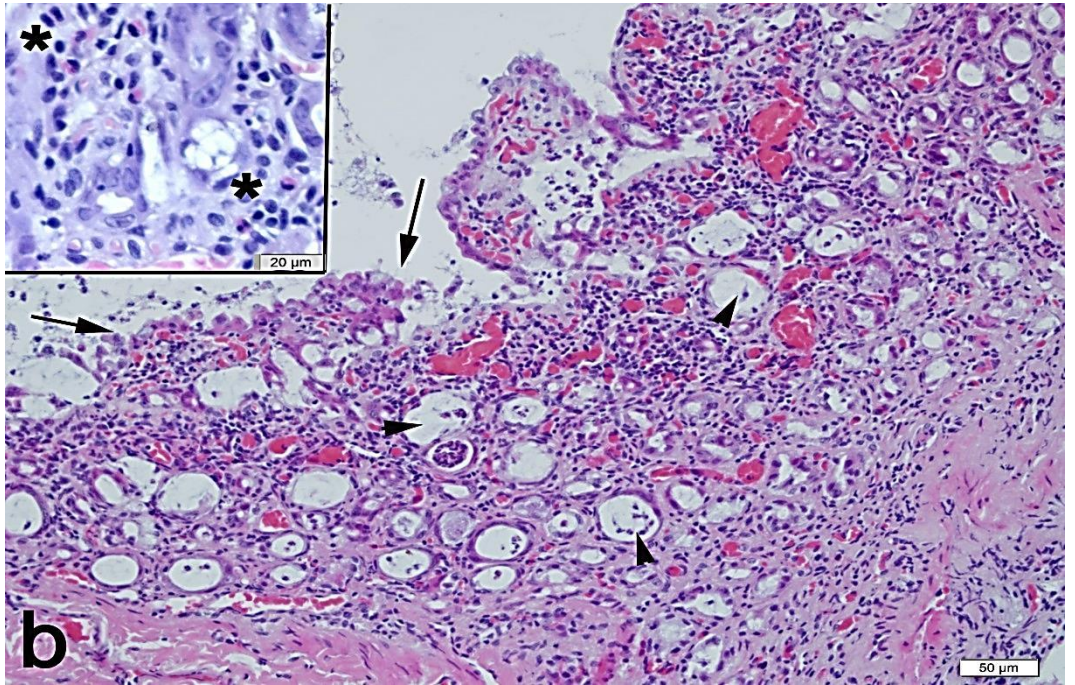
#### 6.2.1. Hematoksilen ve eozin boyaması

##### 6.2.1.1. İleum bulguları

Işık mikroskopik incelemelerde kontrol grubuna ait ileum dokularının normal morfolojik yapı sergilediği görüldü. Düzenli epitel ve intestinal bez yapıları ile mukozanın devamında düzgün görünümde submukoza, muskularis eksterna ve seroza gözlemlendi (Resim 7a). 5-FU grubunda epitel tabakasında ileri düzeyde dökülme, intestinal bezlerde hasar, bağ doku içerisinde artmış lökosit infiltrasyonu izlendi (Resim 7b). 5-FU+SJW grubunda epitelde iyileşme, bezler içerisinde epitelizasyon ve bağ dokuda lökosit varlığı gözlemlendi (Resim 7c).

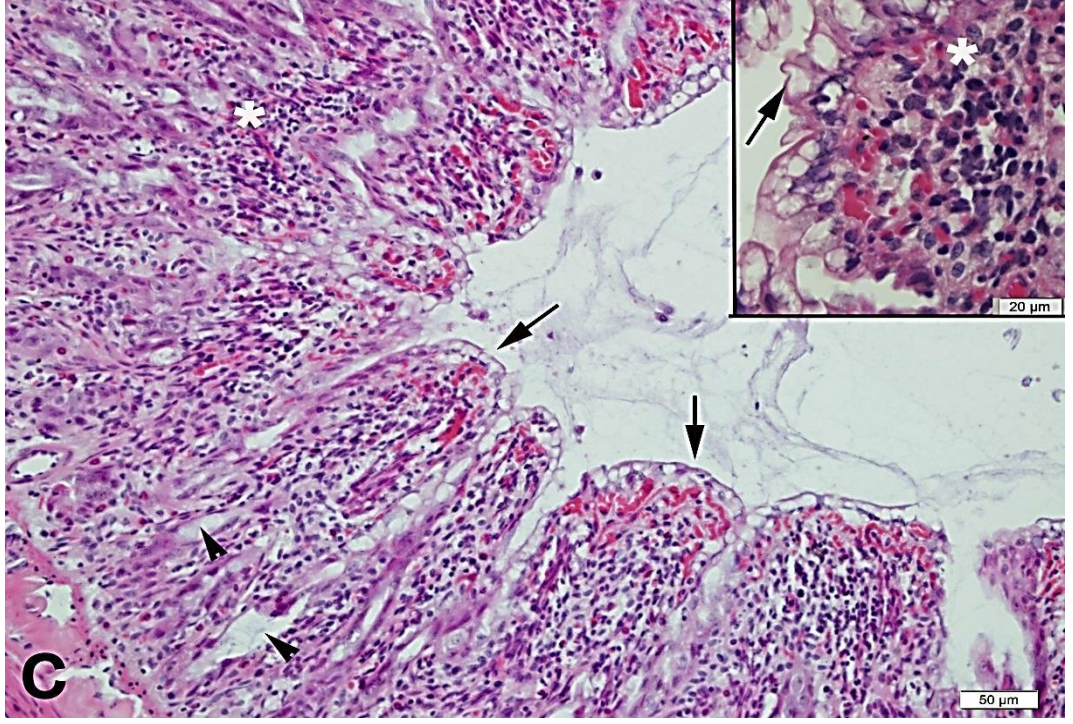


**Resim 7a.** Kontrol grubu, düzgün epitel (ok) ve bezler (ok başları). H&E boyası.



**Resim 7b.** 5-FU grubu, ileri derecede epitel dökülmeleri (oklar) ve bezlerde hasar (ok başları) artmış lökosit kümeleri (küçük resim \*). H&E boyası.



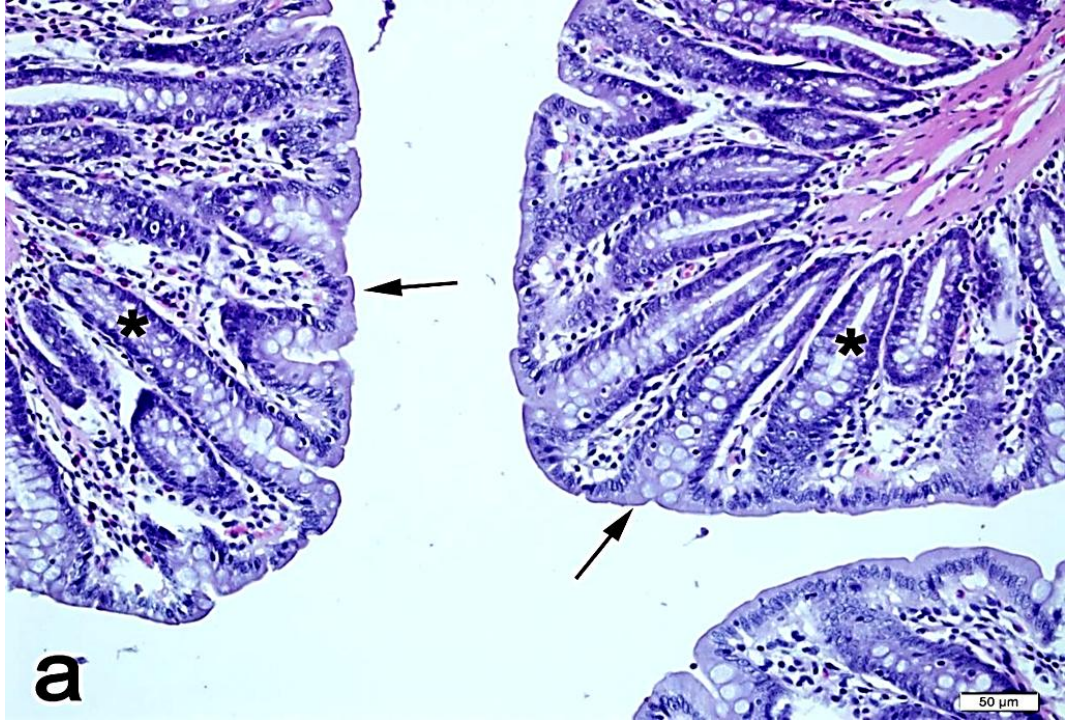


**Resim 7c.** 5-FU+SJW grubu, epitelde düzelme (oklar), bezlerde epitelizasyon (ok başları), lamina propriyada lökositler (küçük resim \*). H&E boyası.

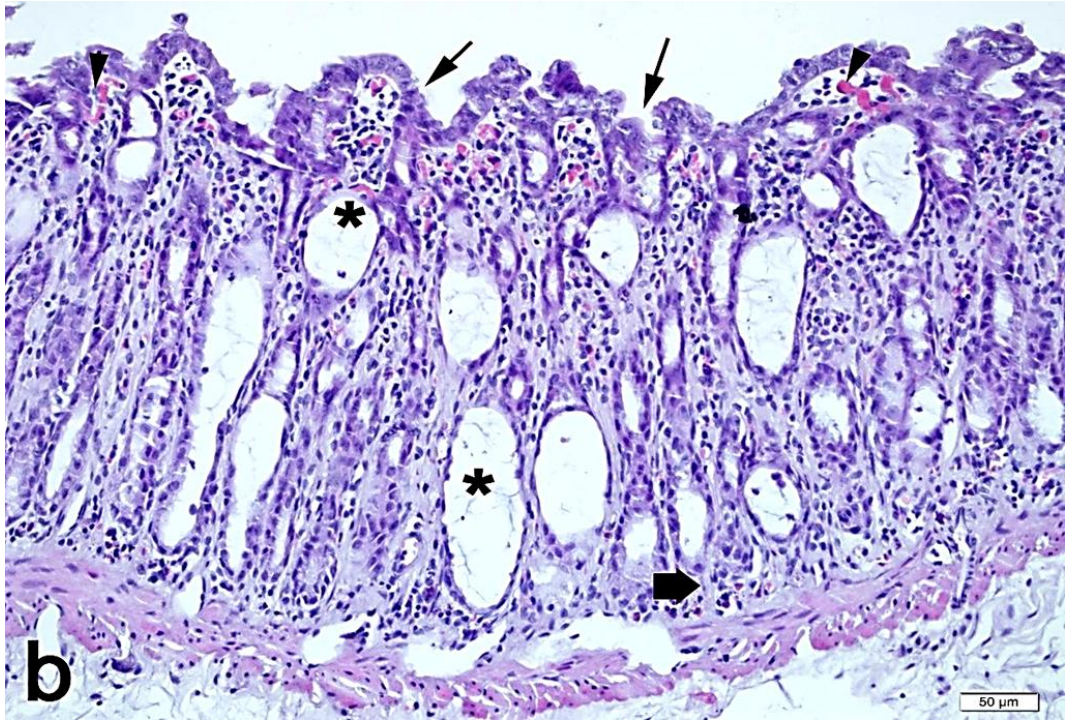
#### 6.2.1.2. Kolon bulguları

Kontrol grubuna ait kolon dokularının düzenli yüzey epiteli ve intestinal bez yapıları ile normal morfolojik yapı sergilediği ışık mikroskopik incelemelerde görüldü (Resim 8a). 5-FU grubunda yüzey epitelinde bozulmayla beraber seyrek olarak görülen hücre dökülmeleri, bez epitelinde yüzey epiteline göre ileri derecede dökülme, konjesyon ve bağ dokuda lökositler görüldü (Resim 8b). 5-FU+SJW grubunda hem yüzey hem de bez epitelinde rejenerasyonla birlikte seyreden hafif konjesyon izlendi (Resim 8c).



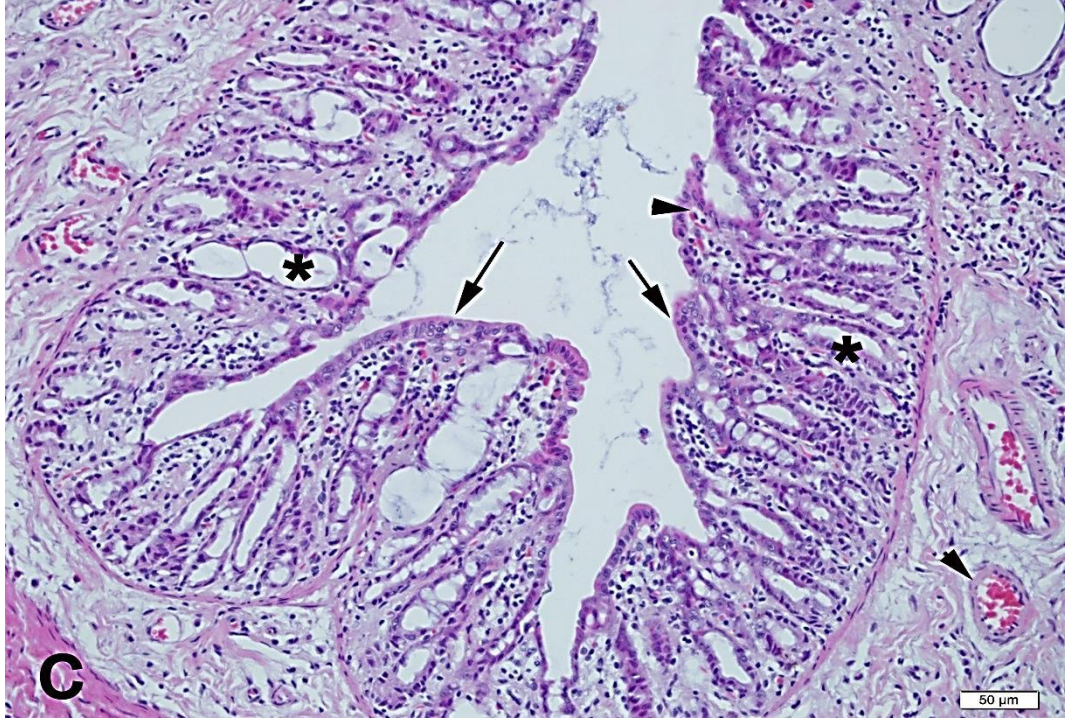


**Resim 8a.** Kontrol grubu, düzgün yüzeyel epitel (oklar) ve bez epiteli (\*). H&E boyası.



**Resim 8b.** 5-FU grubu, epitelde bozulma ve seyrek dökülme (oklar), bez epitelinde ileri derecede dökülme (\*), konjesyon (ok başı) ve lökositler (kalın ok). H&E boyası.



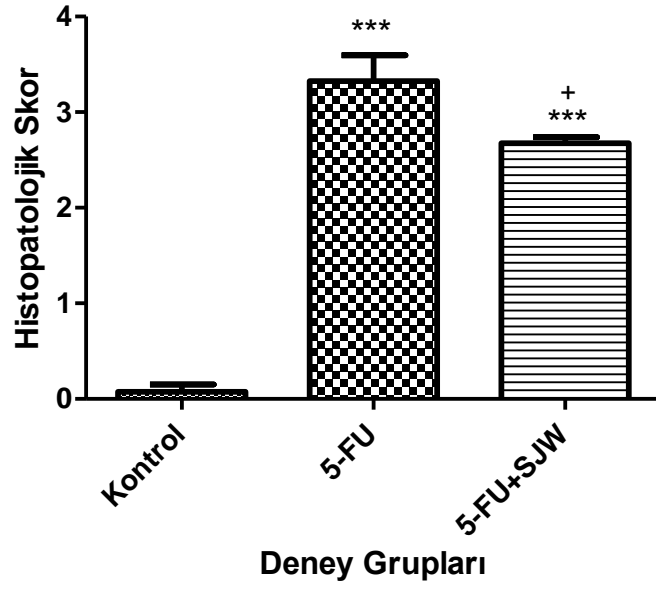


**Resim 8c.** 5-FU+SJW grubu, hem yüzey (oklar) hem de bez (\*) epitelinde rejenerasyon, hafif konjesyon (ok başları). H&E boyası.

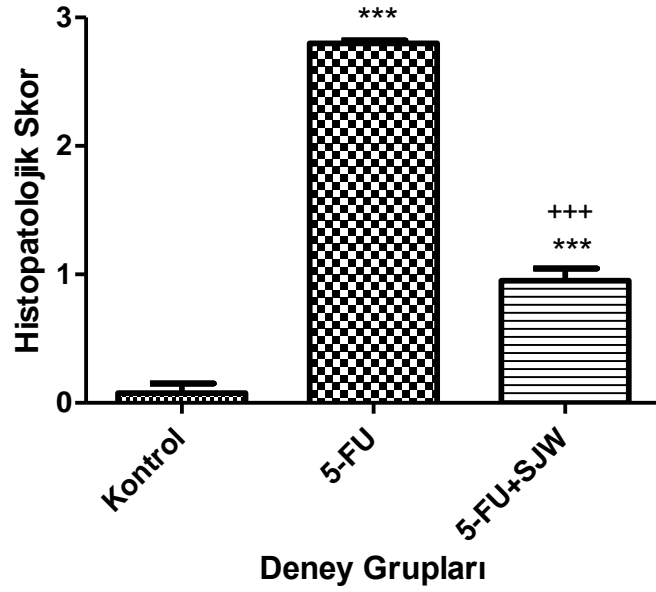
### 6.2.1.3. Histopatolojik değerlendirme bulguları

İleum dokusuna ait histopatolojik değerlendirme sonuçları Şekil 3'te gösterilmiştir. Histopatolojik skor değerleri kontrol grubu için  $0,075 \pm 0,15$ , 5-FU grubu için  $3,32 \pm 0,53$ , 5-FU+SJW grubu için  $2,67 \pm 0,12$  bulundu. 5-FU grubundaki hasar kontrol grubu ile kıyaslandığında sonuçlar anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ). 5-FU+SJW grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında hasarın bu grupta da anlamlı düzeyde yüksek olduğu ( $p < 0,001$ ) ancak 5-FU grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir düşüş görüldüğü tespit edildi ( $p < 0,05$ ).

Kolon dokusuna ait histopatolojik değerlendirme sonuçları Şekil 4'te verilmiştir. Histopatolojik skor değerleri kontrol grubu için  $0,075 \pm 0,15$ , 5-FU grubu için  $2,80 \pm 0,04$ , 5-FU+SJW grubu için  $0,95 \pm 0,19$  bulundu. 5-FU grubundaki hasar kontrol grubu ile kıyaslandığında sonuçlar oldukça anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). 5-FU+SJW grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında hasarın bu grupta da anlamlı düzeyde yüksek olduğu ( $p < 0,001$ ) ancak 5-FU grubuyla kıyaslandığında hasarda anlamlı bir düşüş ( $p < 0,001$ ) var olduğu görüldü.



Şekil 3. Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış ileum dokusu histopatolojik skor grafiği. +:  $p < 0,05$  5-FU grubu ile kıyaslandığında. \*\*\*:  $p < 0,001$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında.

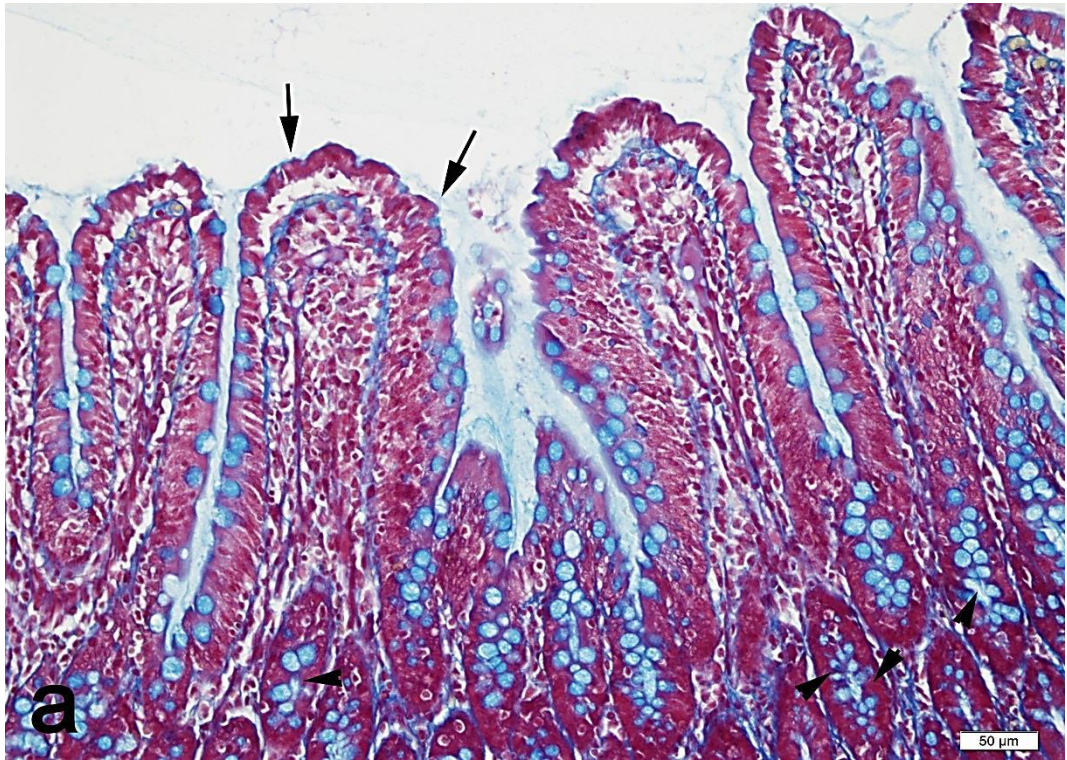


Şekil 4. Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış kolon dokusu histopatolojik skor grafiği. +++:  $p < 0,001$  5-FU grubu ile kıyaslandığında. \*\*\*:  $p < 0,001$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında.

## 6.2.2. Gomori trikrom boyaması

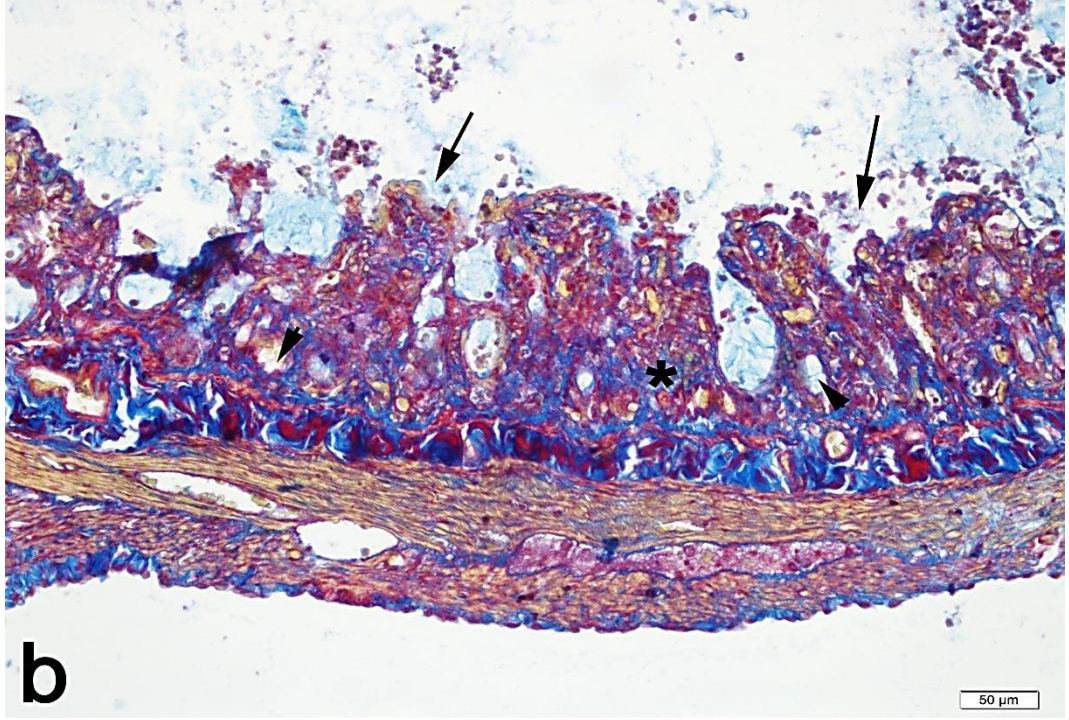
### 6.2.2.1. İleum bulguları

Kontrol grubunda normal morfolojide yüzey epiteli ve bez epiteli gözlemlendi (Resim 9a). 5-FU grubunda hem yüzey hem de bez epitelinde ileri derecede dökülme ile bağ dokuda fibrozis gözlemlendi (Resim 9b). 5-FU+SJW grubunda hem yüzey hem de bez epitelinde rejenerasyon, bağ dokudaki fibroziste gerileme gözlemlendi (Resim 9c).

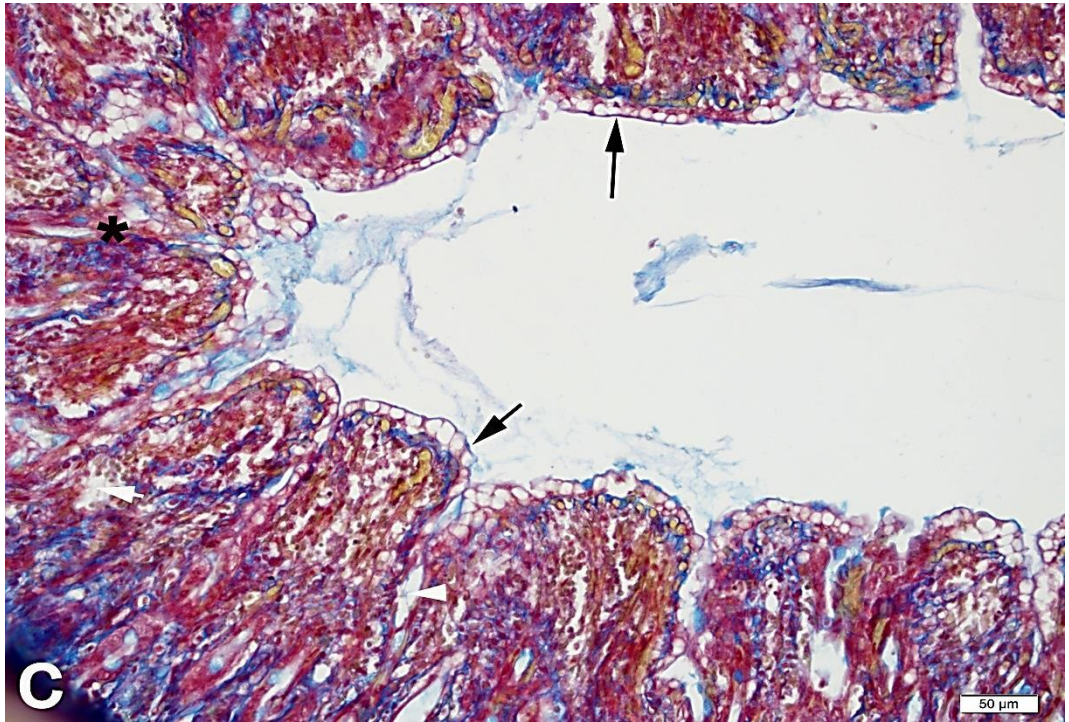


**Resim 9a.** Kontrol grubu, düzgün yüzey epiteli (oklar) ve bez epiteli (ok başları). Gomori trikrom boyası.





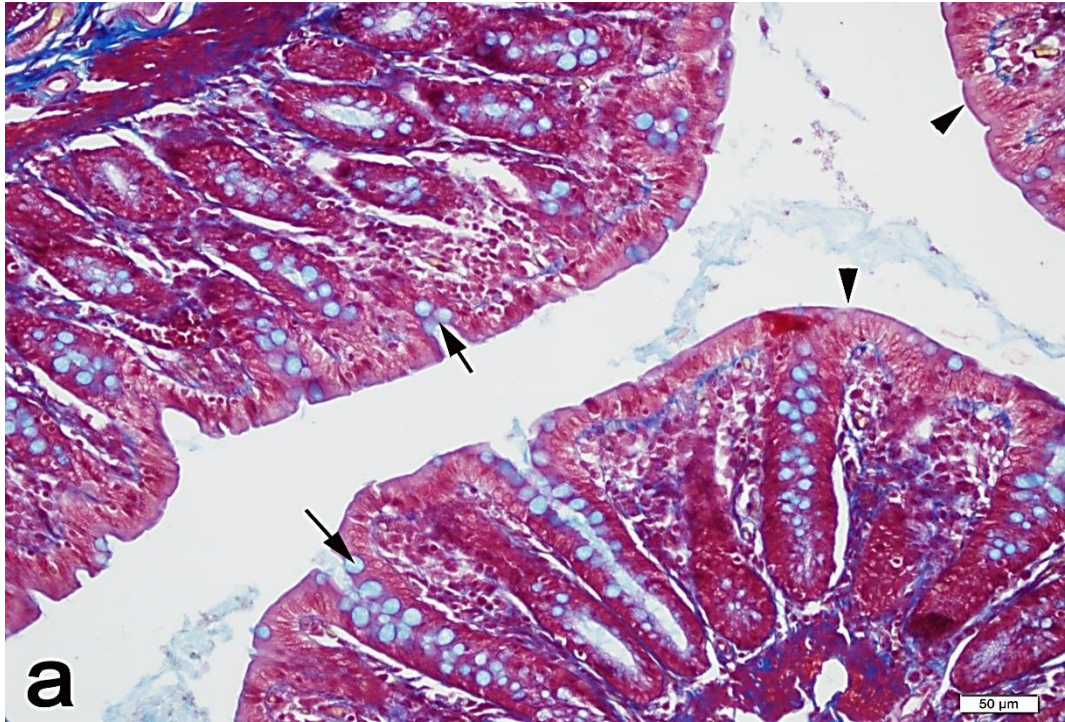
**Resim 9b.** 5-FU grubu, ileri derecede dökülmüş yüzeysel epitel (oklar) ve bez epiteli (ok başları), bağ dokuda fibrozis (\*). Gomori trikrom boyası.



**Resim 9c.** 5-FU+SJW grubu, rejenere olan yüzeysel epitel (oklar) ve bez epiteli (ok başları), gerileyen fibrozis (\*). Gomori trikrom boyası.

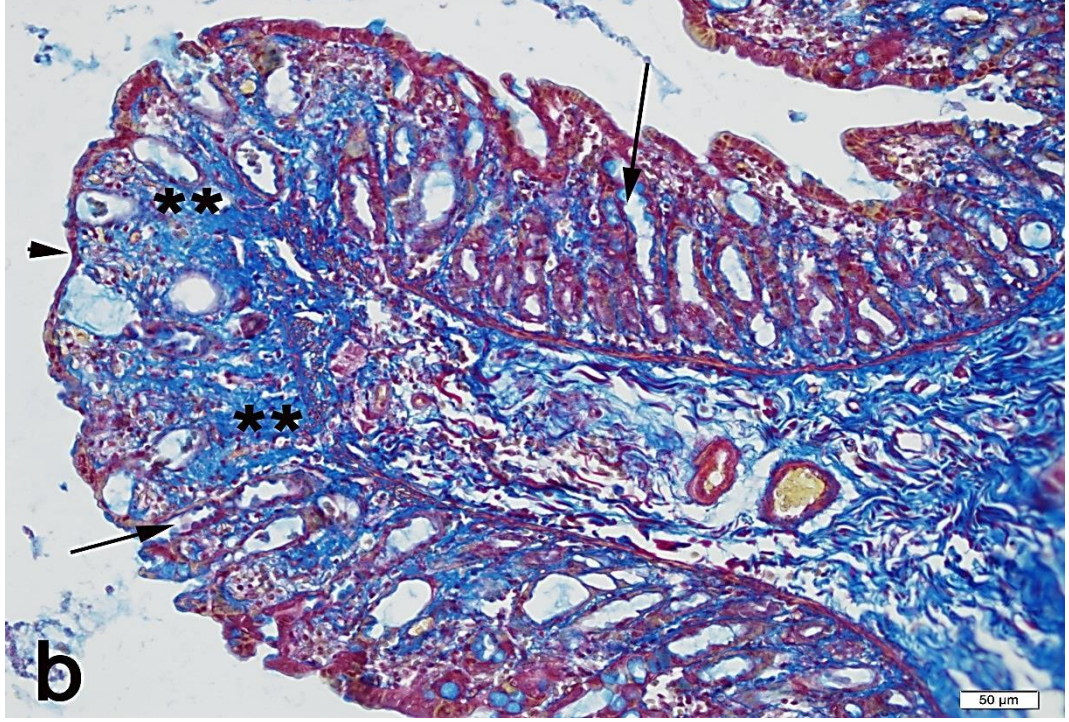
### 6.2.2.2. Kolon bulguları

Kontrol grubunda çok sayıda goblet hücreleriyle belirgin normal morfolojide yüzey ve bez epiteli görüldü (Resim 10a). 5-FU grubunda epitelde ve belirgin olarak goblet hücrelerinde dejenerasyon, bağ dokuda ileri düzeyde fibrozis görüldü (Resim 10b). 5-FU+SJW grubunda yüzey epitelinde rejenerasyon, bağ dokudaki fibroziste gerileme görüldü (Resim 10c).

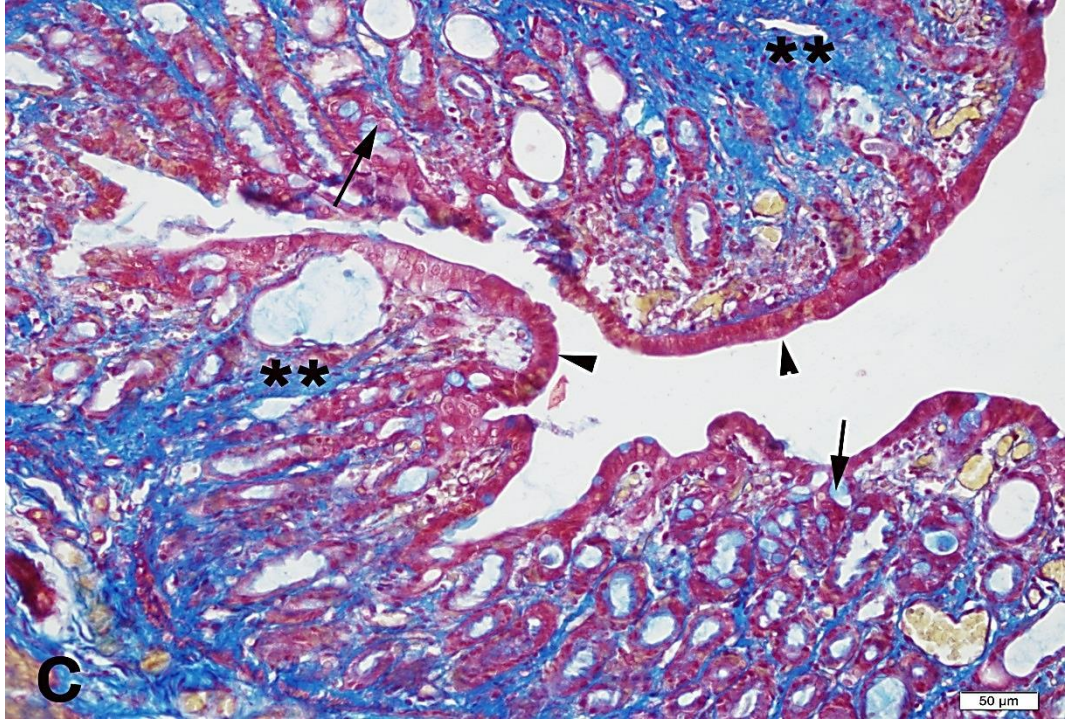


**Resim 10a.** Kontrol grubu, düzgün epitel (ok başları) ve goblet hücreleri (oklar). Gomori trikrom boyası.





**Resim 10b.** 5-FU grubu, bağ dokuda ileri derecede fibrozis (\*\*), bozulmuş goblet hücreleri (oklar) ve epitel (ok başı). Gomori trikrom boyası.



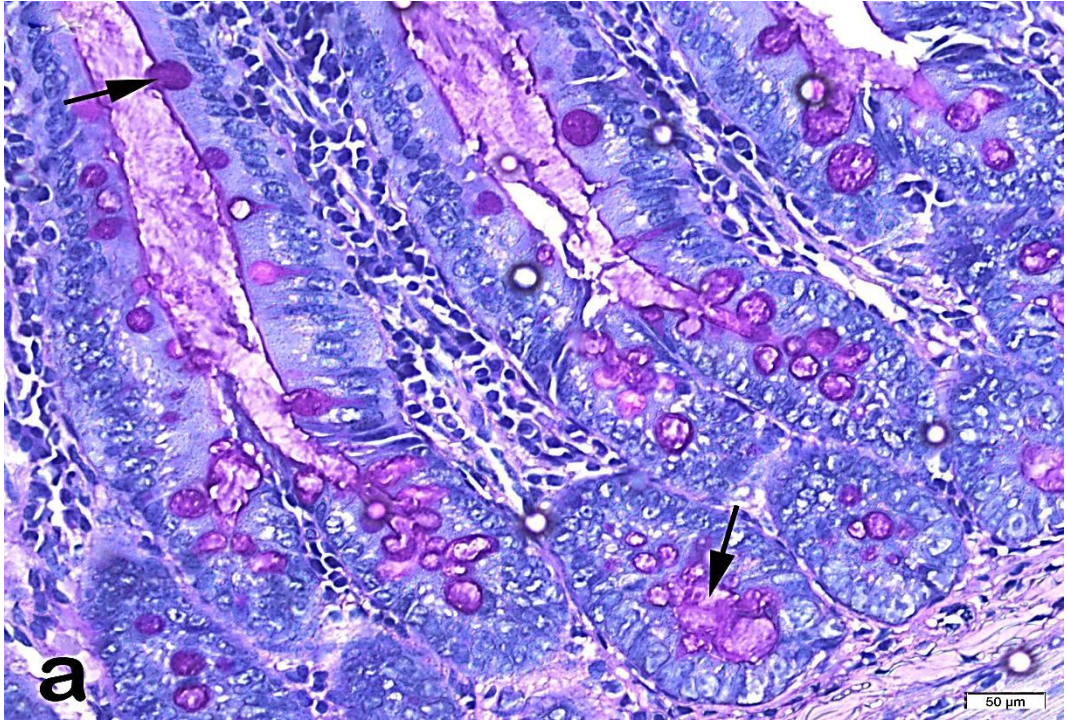
**Resim 10c.** 5-FU+SJW grubu, rejenere olan yüzey epiteli (ok başları) ve goblet hücreleri (oklar), gerileyen fibrozis (\*\*). Gomori trikrom boyası.



### 6.2.3. Pas boyaması

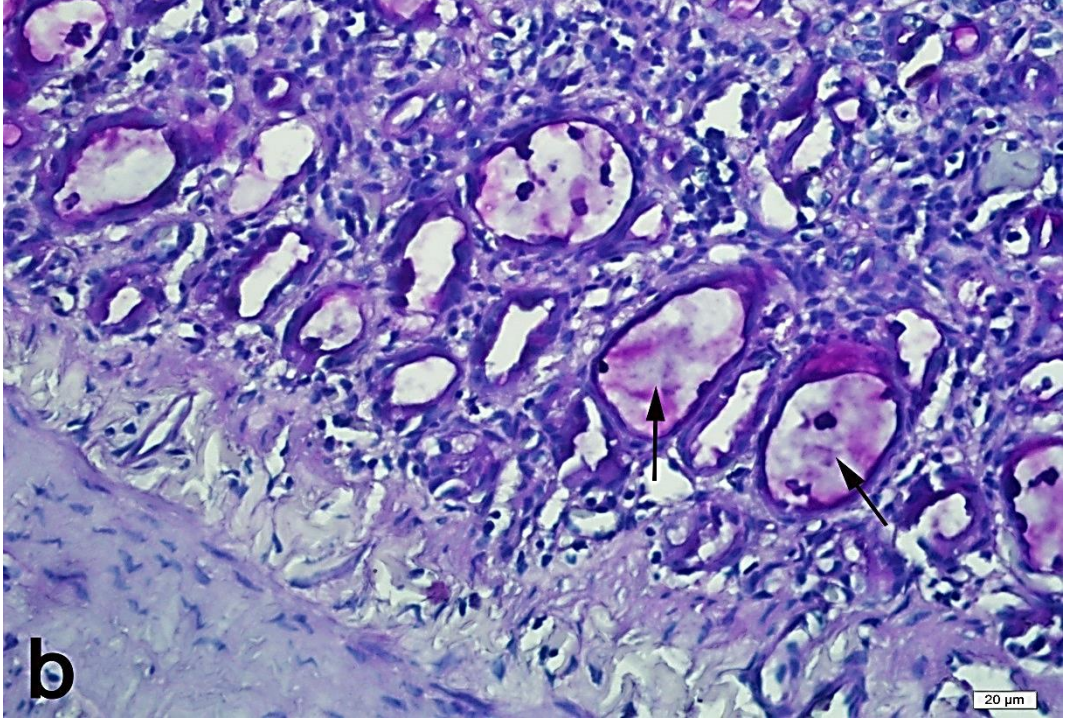
#### 6.2.3.1. İleum bulguları

Kontrol grubunda güçlü PAS boyanma sergileyen normal morfolojide goblet hücreleriyle belirgin epitel gözlendi (Resim 11a). 5-FU grubunda PAS boyanmada azalma ile belirgin bozulmuş goblet hücre morfolojisi sergileyen hasarlı epitel yapısı gözlendi (Resim 11b). 5-FU+SJW grubunda belirgin PAS boyanma sergileyen goblet hücreleri içeren bez epiteli görüldü ( Resim 11c).

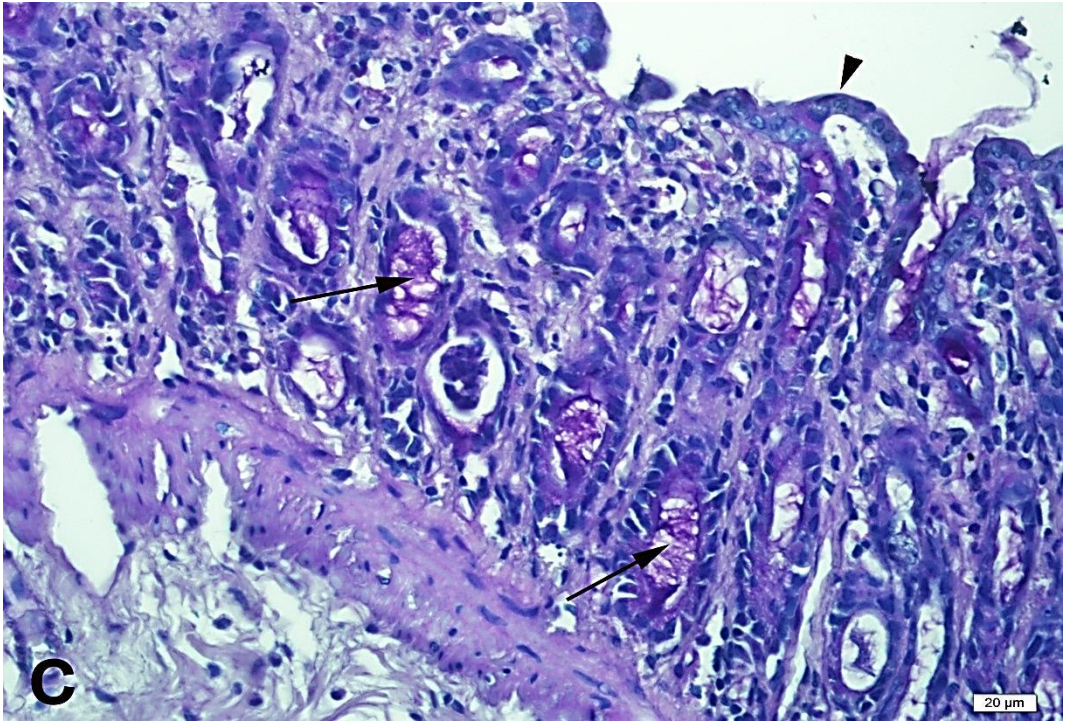


**Resim 11a.** Kontrol grubu, düzgün boyanan intestinal bez ve yüzey epiteli (oklar). PAS boyası.





**Resim 11b.** 5-FU grubu, bozulmuş intestinal bez epiteli hücrelerinde azalmış PAS boyanma (oklar). PAS boyası.

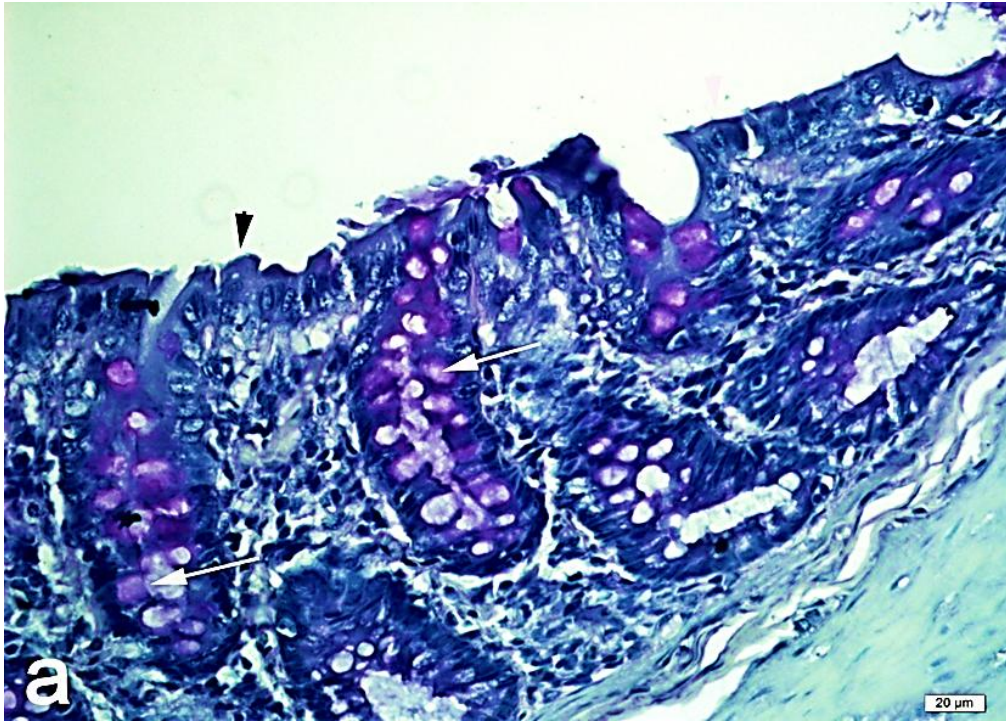


**Resim 11c.** 5-FU+SJW grubu, PAS boyanma gösteren intestinal bez epiteli (oklar), düzelen yüzey epiteli (ok başı). PAS boyası.



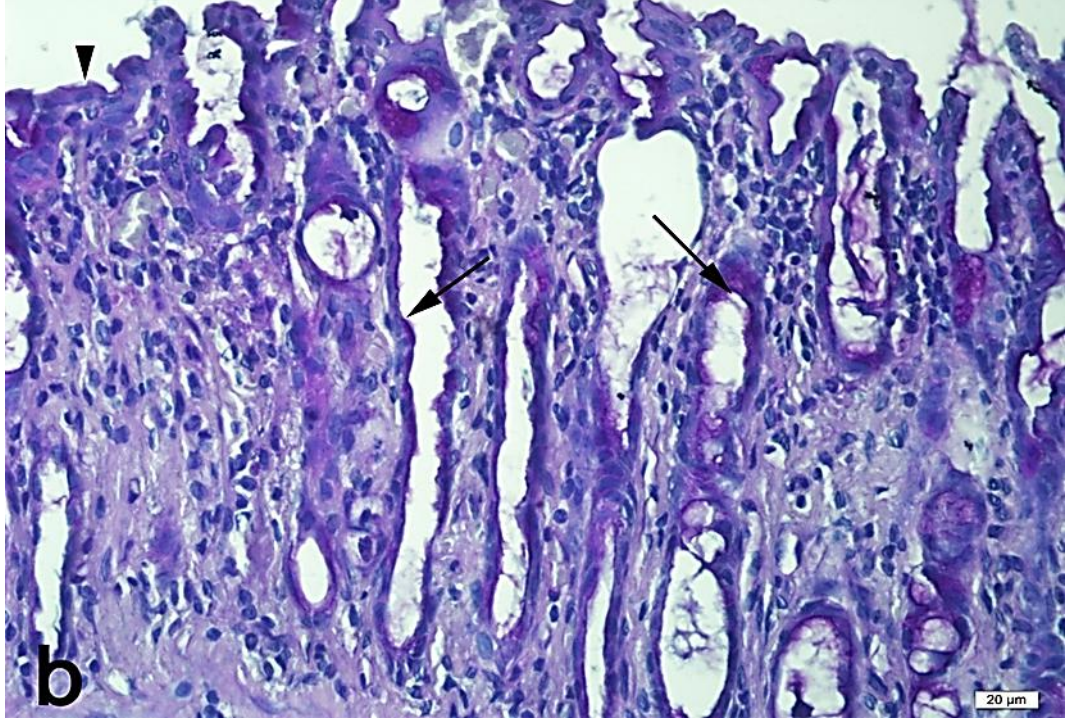
### 6.2.3.2. Kolon bulguları

Kontrol grubunda belirgin PAS boyanma gösteren goblet hücreleri içeren normal morfolojide bez epiteli gözlemlendi (Resim 12a). 5-FU grubunda bezlerde goblet hücrelerinin morfolojilerinin ileri derecede bozulmuş olduğu ve PAS boyanmada azalma olduğu gözlemlendi (Resim 12b). 5-FU+SJW grubunda PAS boyanmada artış ile belirgin goblet hücre morfolojisi gözlemlendi (Resim 12c).

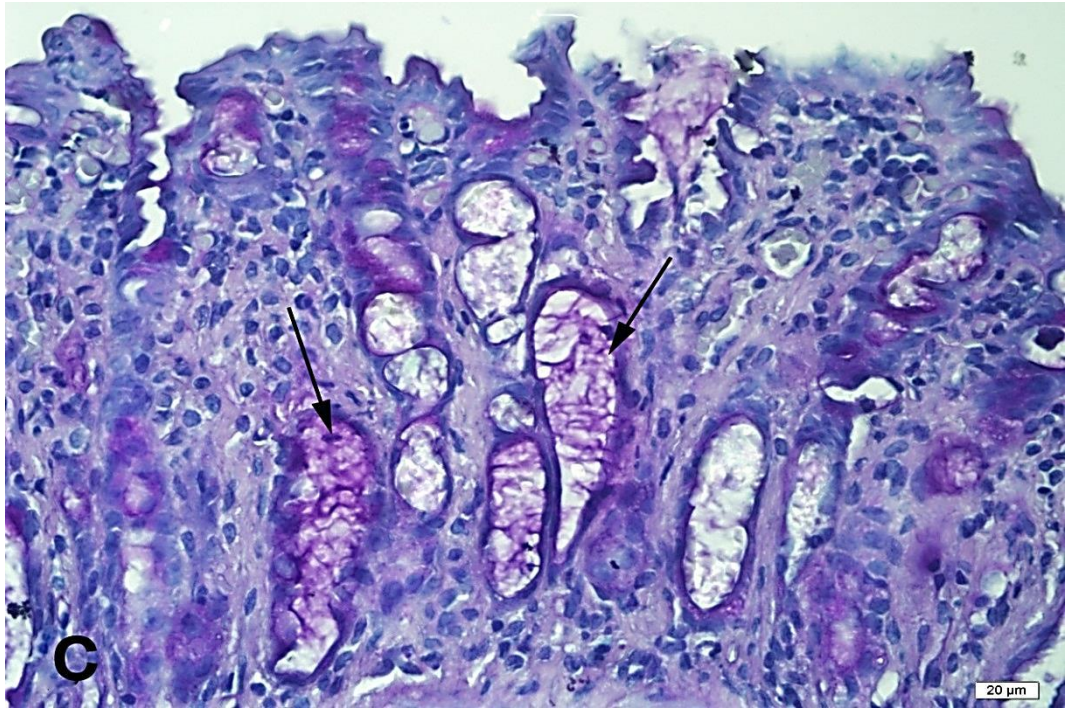


**Resim 12a.** Kontrol grubu, PAS boyanma gösteren intestinal bez goblet hücreleri (oklar) ve düzgün morfolojide yüzey epiteli (ok başı). PAS boyası.





**Resim 12b.** 5-FU grubu, ileri derecede bozulmuş ve PAS boyanması azalmış intestinal bez goblet hücreleri (oklar) ile bozulmuş yüzey epiteli (ok başı). PAS boyası.

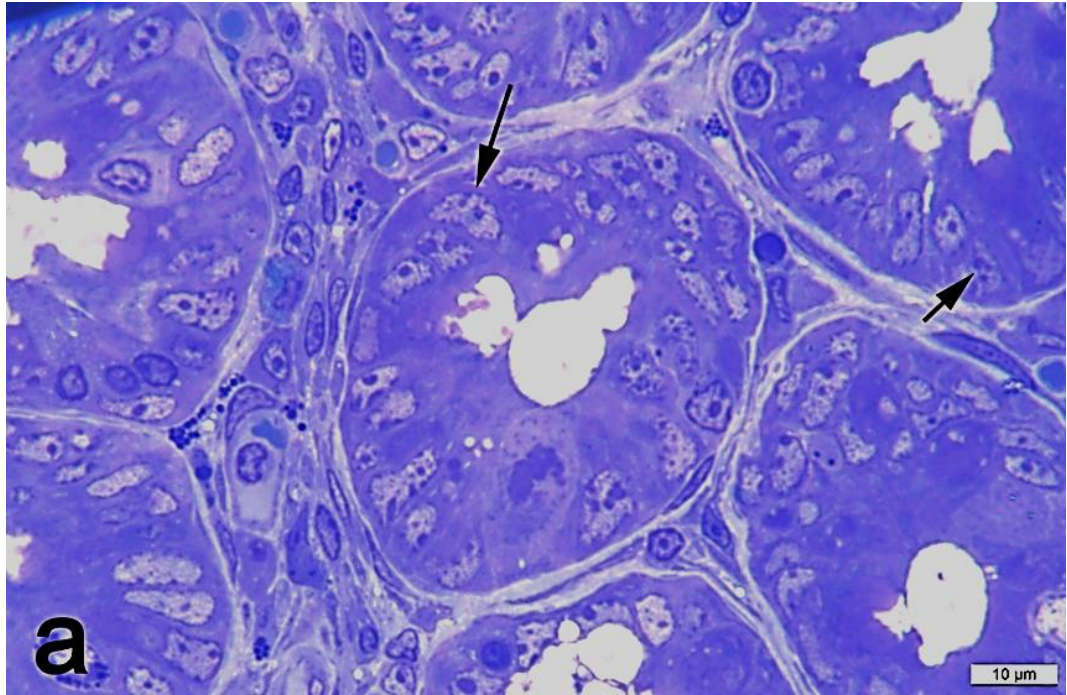


**Resim 12c.** 5-FU+SJW grubu, intestinal bezlerde PAS boyanma gösteren goblet hücreleri (oklar). PAS boyası.

#### 6.2.4. Yarı-ince kesitler

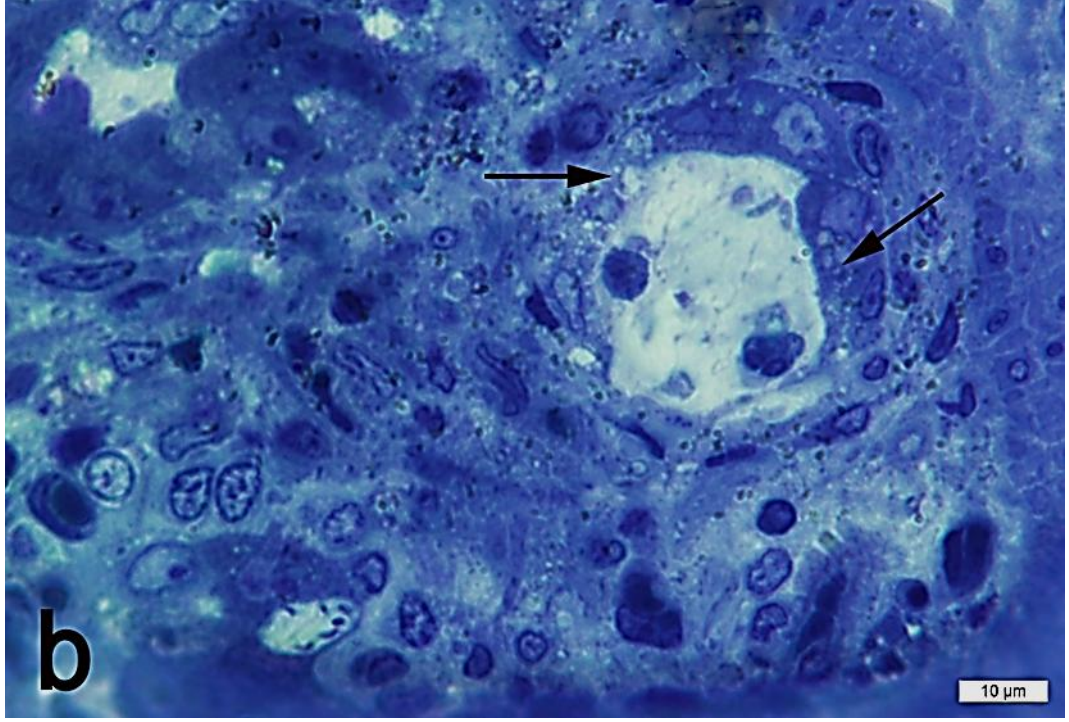
##### 6.2.4.1. İleum bulguları

Kontrol grubunda düzgün morfolojide intestinal bez epiteli hücreleri gözlemlendi (Resim 13a). 5-FU grubunda intestinal bez epiteli hücrelerinde ileri derecede bozulma gözlemlendi (Resim 13b). 5-FU+SJW grubunda intestinal bez epiteli hücrelerinde rejenerasyon gözlemlendi (Resim 13c).

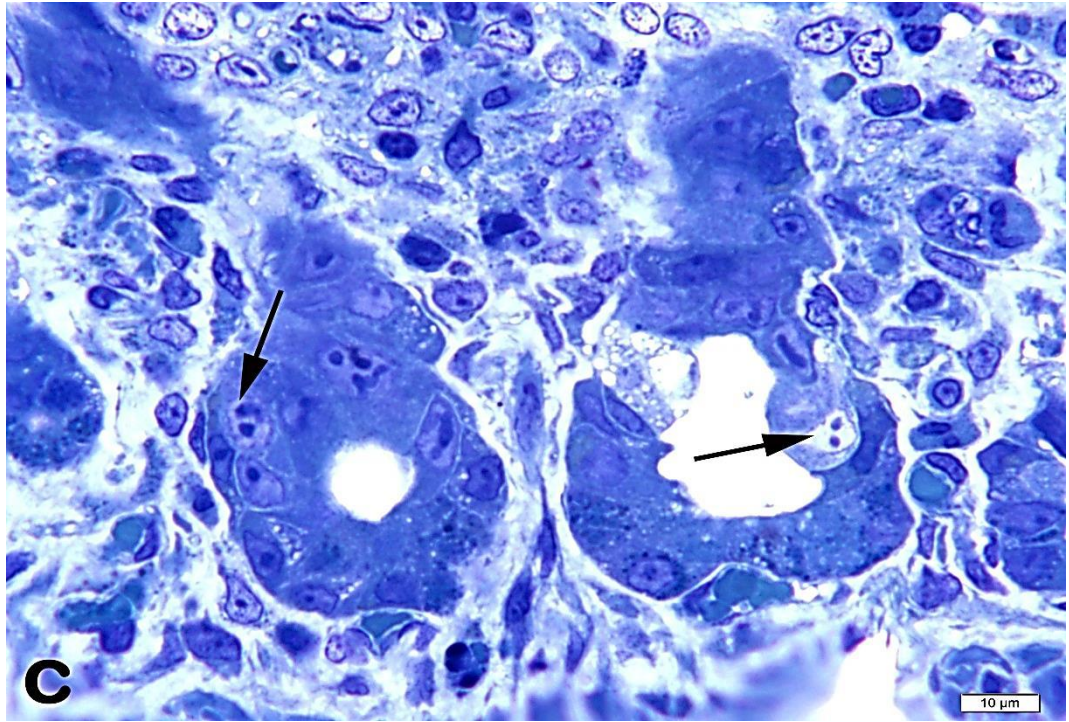


**Resim 13a.** Kontrol grubu, düzgün intestinal bez epiteli hücreleri (oklar). Toluidin mavisi boyası.





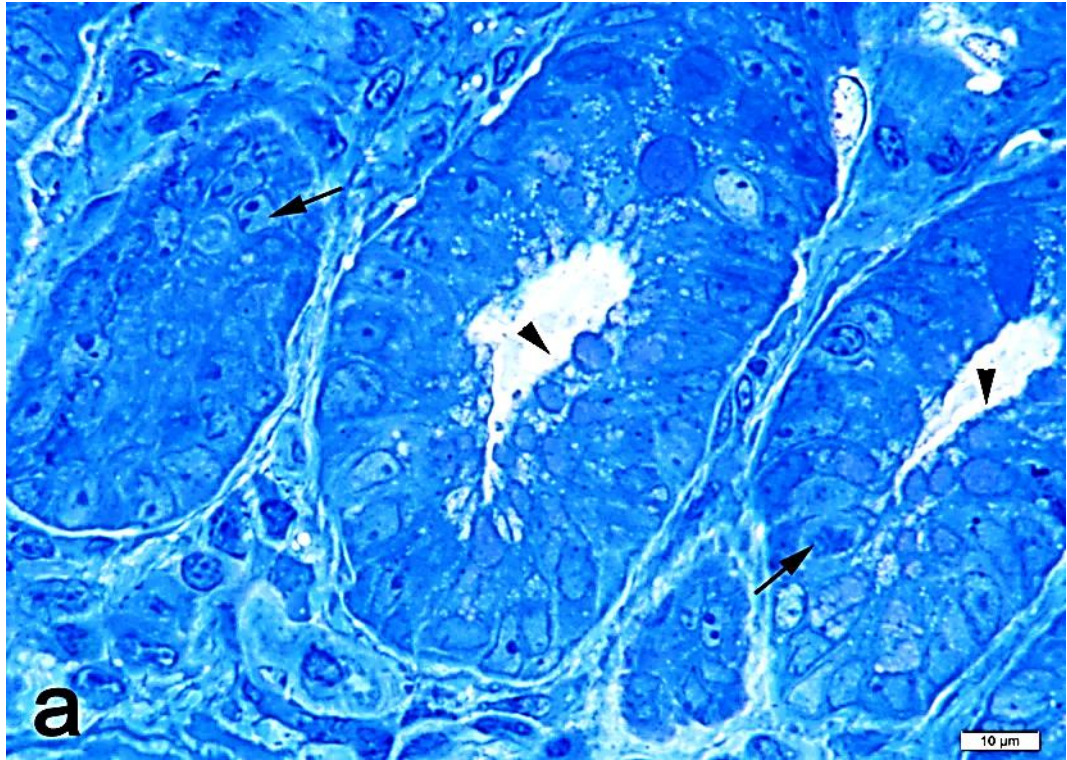
**Resim 13b.** 5-FU grubu, ileri derecede bozulmuş intestinal bez epiteli hücreleri (oklar). Toluidin mavisi boyası.



**Resim 13c.** 5-FU+SJW grubu, rejenere olmaya başlayan bez epiteli hücrelerinde mitotik figürler (oklar). Toluidin mavisi boyası.

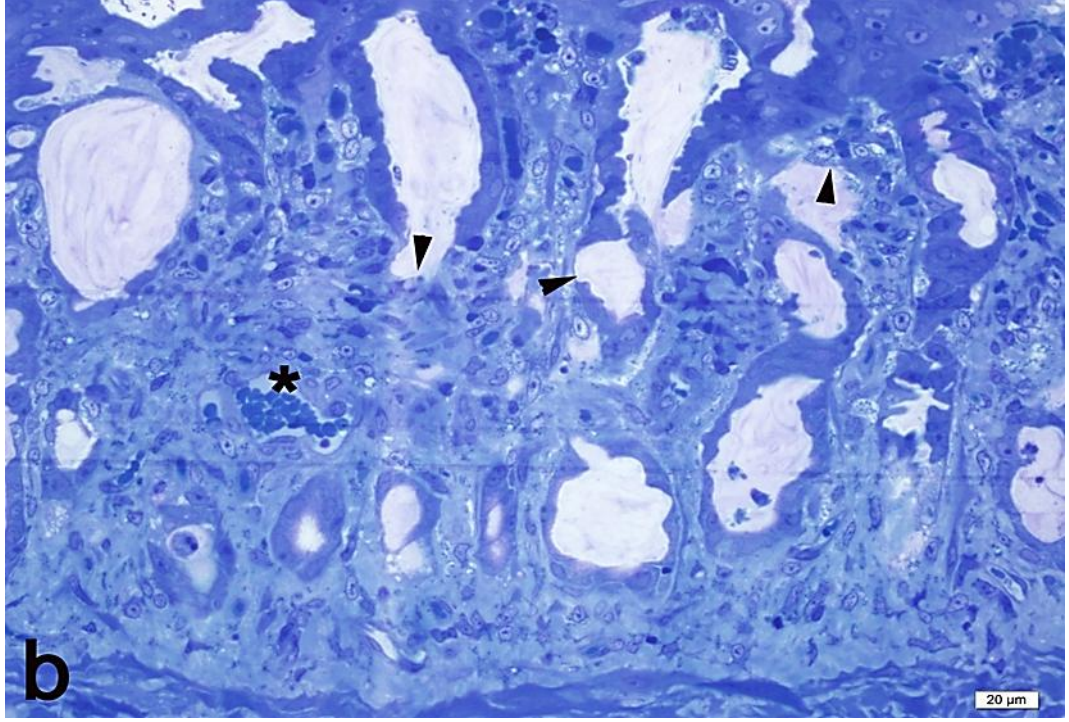
#### 6.2.4.2. Kolon bulguları

Kontrol grubunda çoğalma sergileyen düzgün intestinal bez epiteli hücreleri ve normal morfolojide goblet hücreleri görüldü (Resim 14a). 5-FU grubunda intestinal bez epiteli hücrelerinde dökülme ve konjesyon gözlemlendi (Resim 14b). 5-FU+SJW grubunda intestinal bez epiteli hücrelerinde iyileşme ve çoğalma gözlemlendi (Resim 14c).

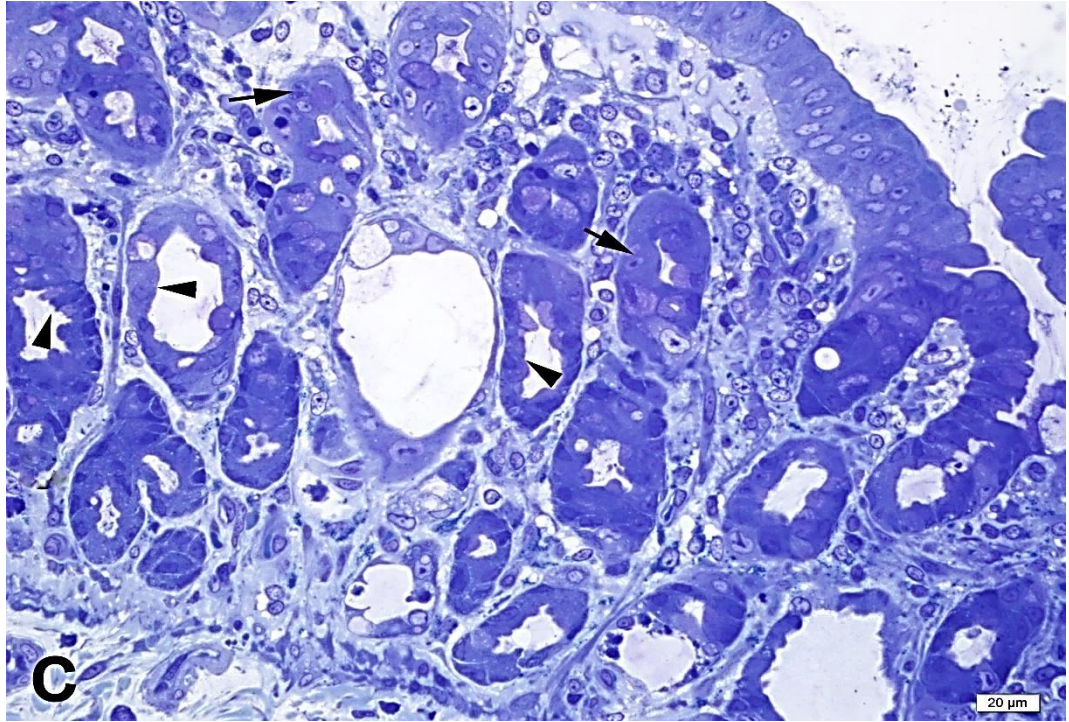


**Resim 14a.** Kontrol grubu, proliferasyon gösteren düzgün intestinal bez epiteli hücreleri (oklar) ve goblet hücreleri (ok başları). Toluidin mavisi boyası.





**Resim 14b.** 5-FU grubu, dökülmüş intestinal bez epiteli hücreleri (ok başları), konjesyon (\*). Toluidin mavisi boyası.



**Resim 14c.** 5-FU+SJW grubu, düzelmeye başlayan (ok başları) ve proliferasyon gösteren (oklar) intestinal bez epiteli hücreleri. Toluidin mavisi boyası.



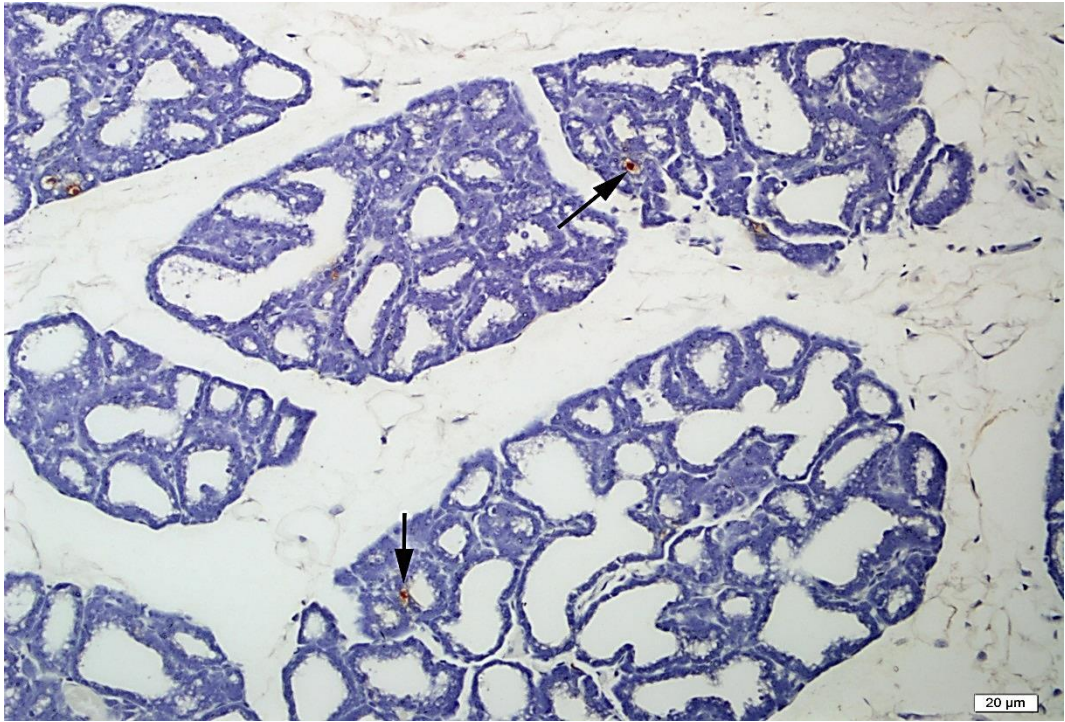
### 6.3. Apoptoz Bulguları

#### 6.3.1. TUNEL yöntemi bulguları

##### 6.3.1.1. İleum bulguları

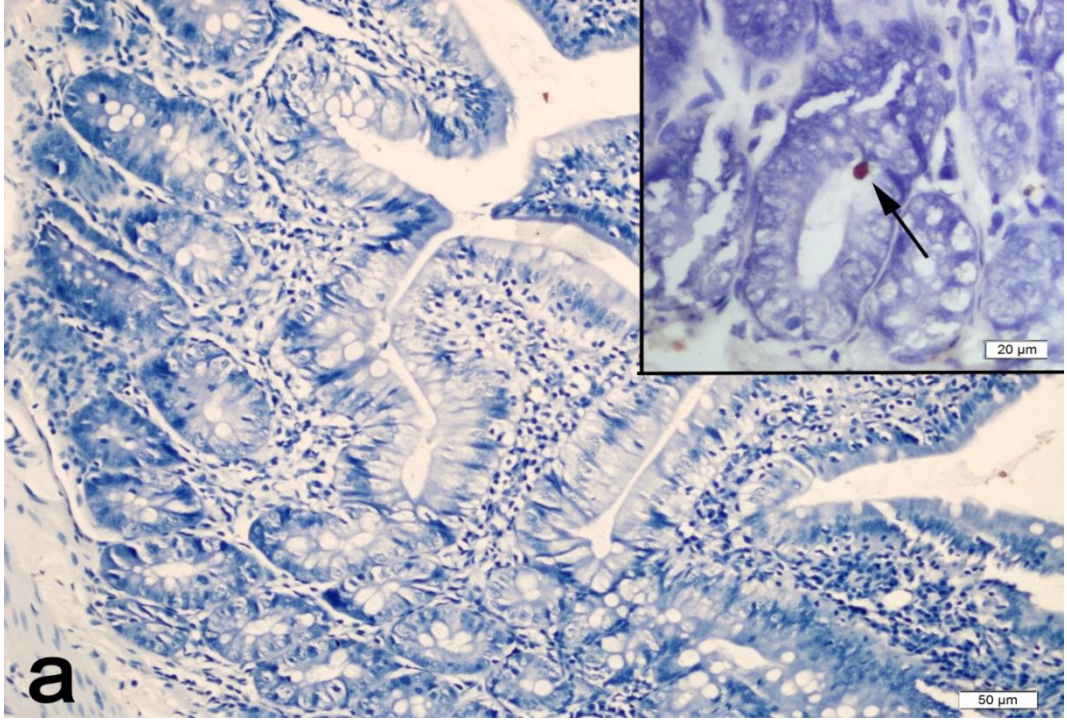
Tiroid dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde TUNEL pozitif hücreler kahverengi boyalı olarak görüldü (Resim 15). Kontrol grubu ve 5-FU+SJW grubuna ait ileum dokularında bulunan yüzey ve bez epitellerinde çok az sayıda TUNEL pozitif işaretli hücreye rastlanırken, 5-FU+SJW grubuna ait bağ dokuda daha fazla sayıda TUNEL pozitif işaretli hücre olduğu görüldü (Resim 15a ve 15c). 5-FU grubunda bulunan TUNEL pozitif işaretli hücre sayısında hem yüzey hem de bez epiteline önemli düzeyde artış gözlemlendi (Resim 15b).

Apoptotik indeks kontrol grubunda  $0,53 \pm 0,04$ , 5-FU grubunda  $12,60 \pm 2$ , 5-FU+SJW grubunda  $0,83 \pm 0,03$  bulundu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5-FU grubu için değerlerin çok yüksek düzeyde olduğu ( $p < 0,001$ ) görüldü. 5-FU+SJW grubu 5-FU grubu ile kıyaslandığında ise değerlerin önemli düzeyde ( $p < 0,001$ ) düşük olduğu görüldü (Şekil 5).

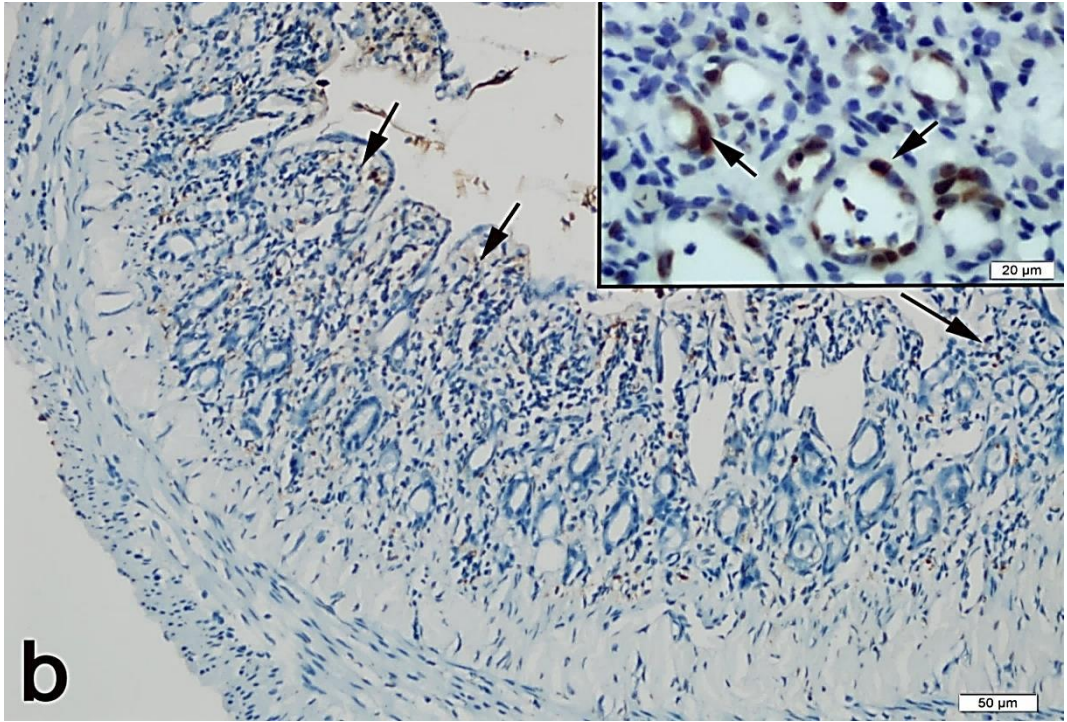


**Resim 15.** Tiroid dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde TUNEL pozitif boyanma (oklar). TUNEL yöntemi.



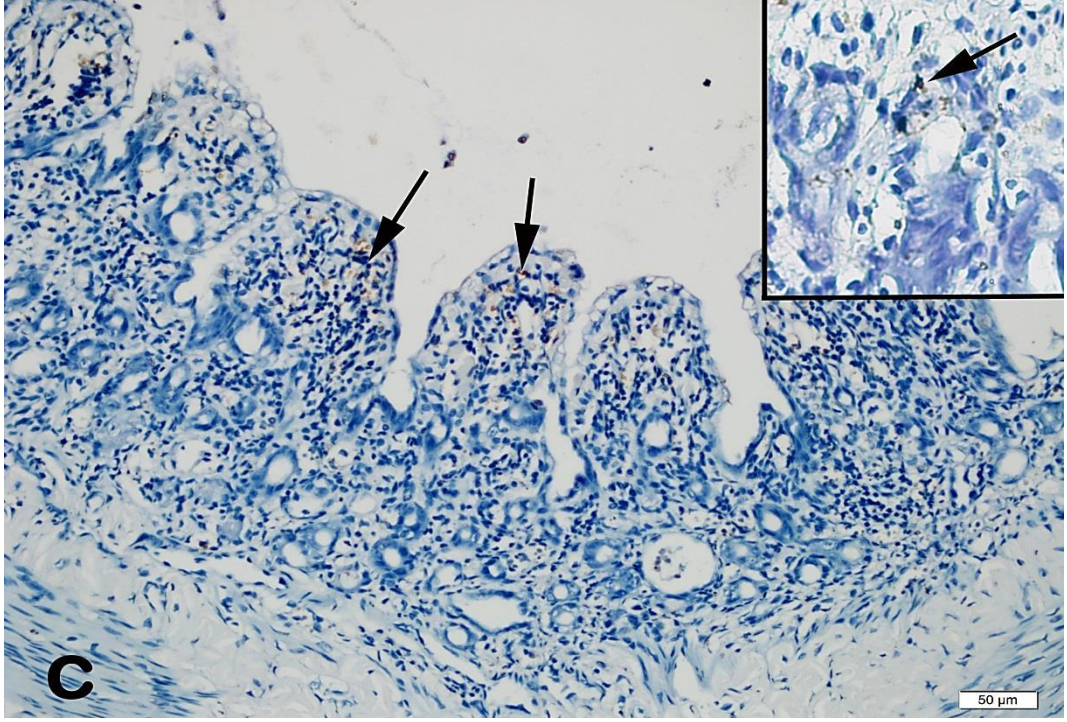


**Resim 15a.** Kontrol grubu, TUNEL pozitif işaretli hücre (küçük resim, ok). TUNEL yöntemi.

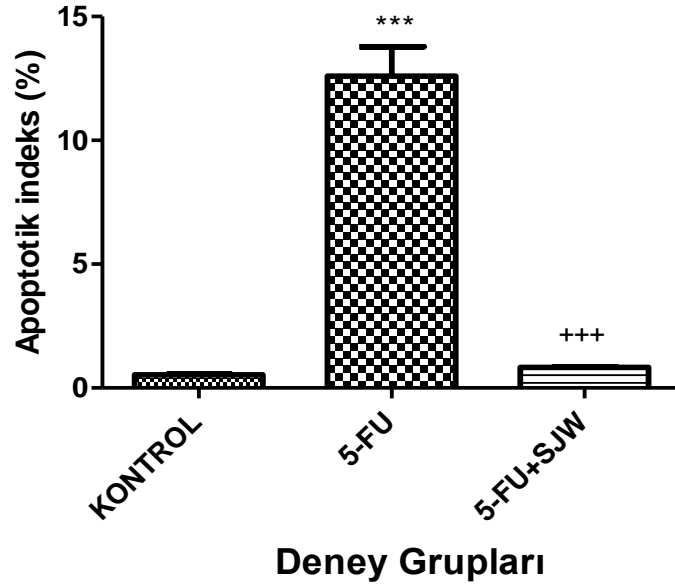


**Resim 15b.** 5-FU grubu, TUNEL pozitif hücreler (oklar). TUNEL yöntemi.





**Resim 15c.** 5-FU+SJW grubu, az sayıda gözlenen TUNEL pozitif hücreler (oklar) (küçük resim, 20 µm). TUNEL yöntemi.

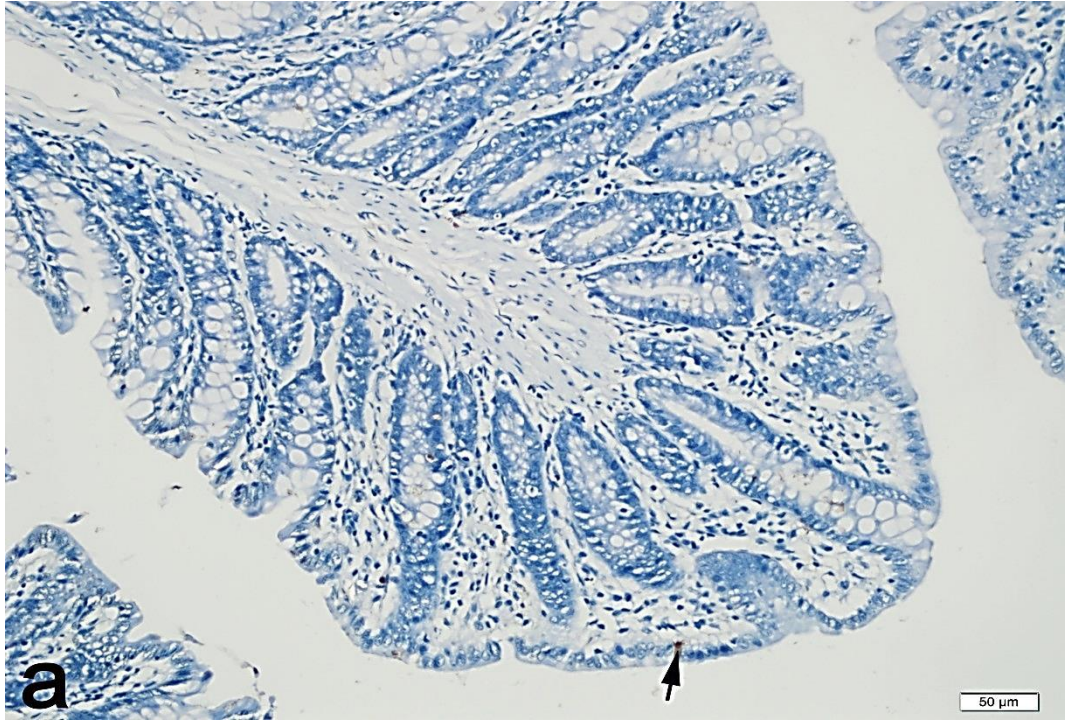


**Şekil 5.** Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış ileum dokusu intestinal bez epiteli apoptotik indeks grafiği. \*\*\*:  $p < 0,001$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında. +++:  $p < 0,001$  5-FU grubu ile kıyaslandığında.

### 6.3.1.2. Kolon bulguları

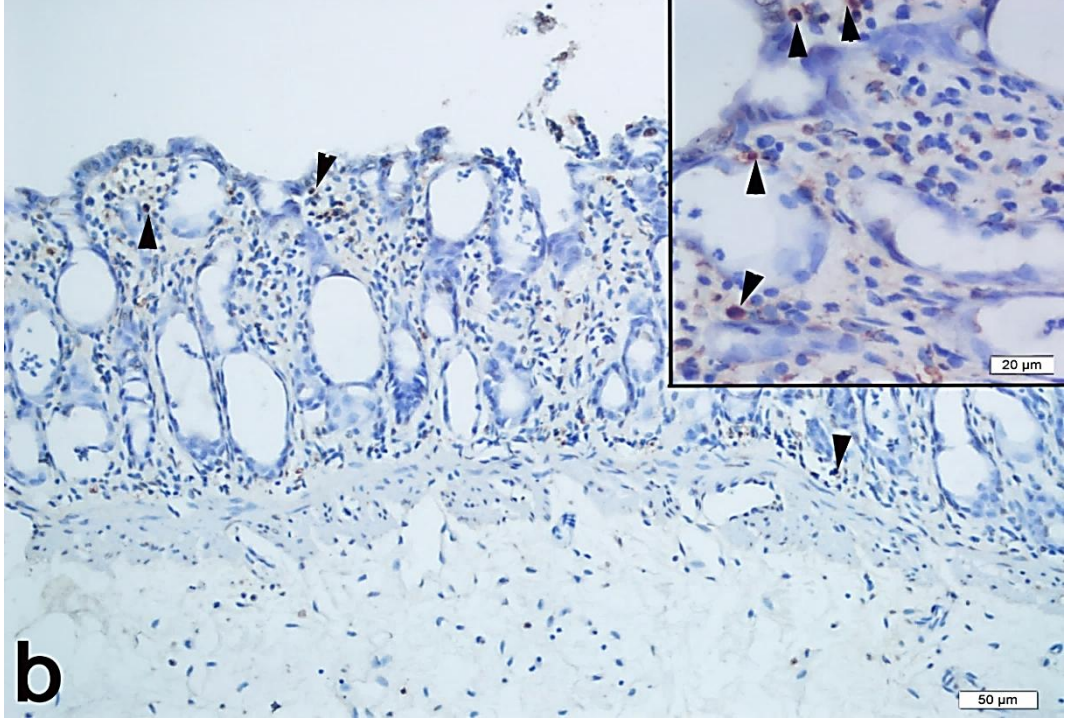
Kontrol grubu ve 5-FU+SJW grubuna ait kolon dokularında bulunan yüzey ve bez epitellerinde çok az sayıda TUNEL pozitif işaretli hücreye rastlanırken (Resim 16a ve 16c), 5-FU grubunda bulunan TUNEL pozitif işaretli hücre sayısında önemli düzeyde artış gözlemlendi (Resim 16b).

Apoptotik indeks kontrol grubu için  $0,53 \pm 0,09$ , 5-FU grubu için  $13,86 \pm 4,5$ , 5-FU+SJW grubu için  $0,89 \pm 0,3$  bulundu. 5-FU grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında değerlerin anlamlı düzeyde yüksek ( $p < 0,01$ ) olduğu, 5-FU+SJW grubu 5-FU grubu ile kıyaslandığında ise değerlerin anlamlı düzeyde ( $p < 0,01$ ) düşük olduğu görüldü (Şekil 6).

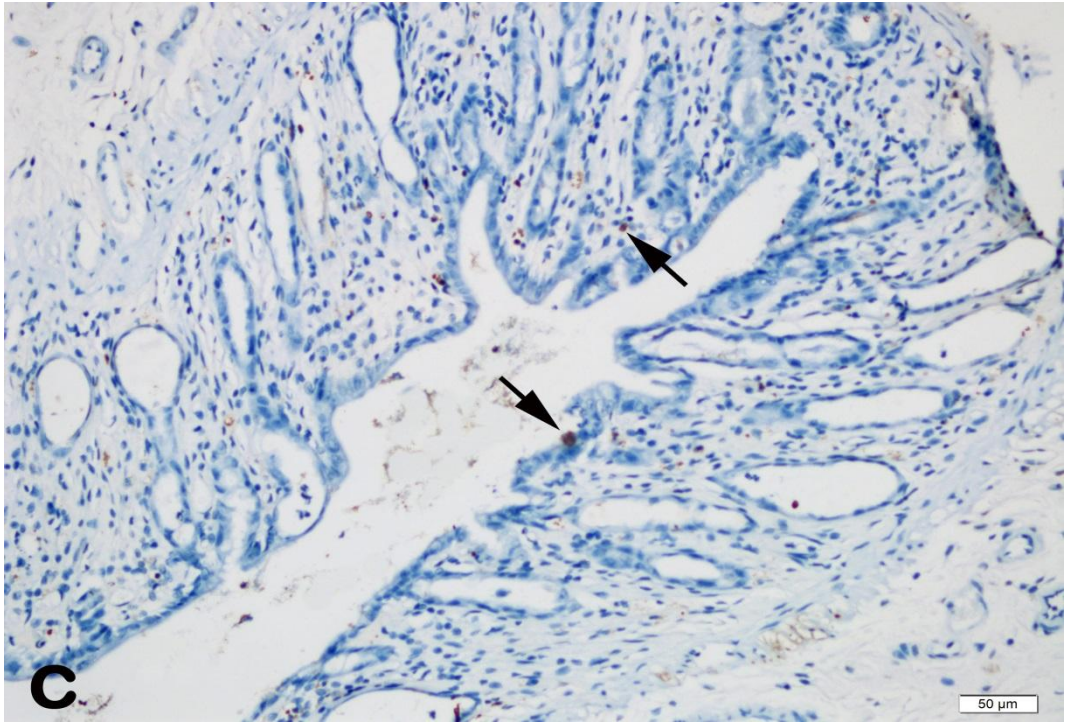


**Resim 16a.** Kontrol grubu, TUNEL pozitif boyalı hücre (ok). TUNEL yöntemi.



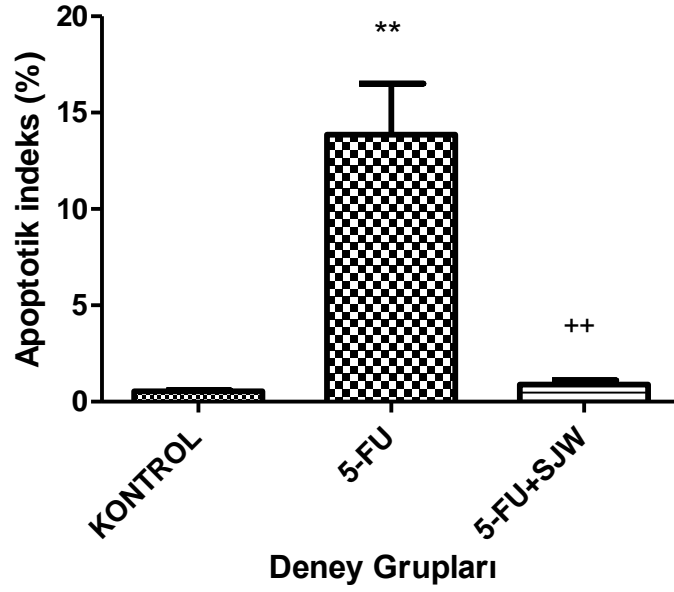


**Resim 16b.** 5-FU grubu, TUNEL pozitif boyalı hücreler (ok başları). TUNEL yöntemi.



**Resim 16c.** 5-FU+SJW grubu, azalmış sayıda TUNEL pozitif boyanan hücreler (oklar). TUNEL yöntemi.



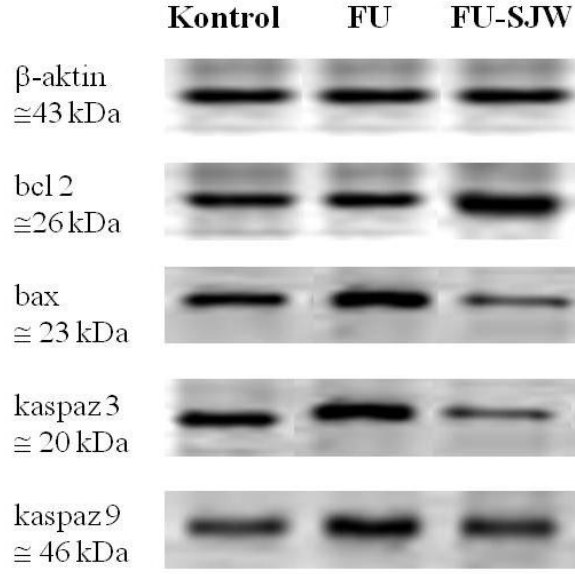


**Şekil 6.** Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış kolon dokusu intestinal bez epiteli apoptotik indeks grafiği. \*\*:  $p<0,01$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında. ++:  $p<0,01$  5-FU grubu ile kıyaslandığında.

### 6.3.2. Western Blot yöntemi bulguları

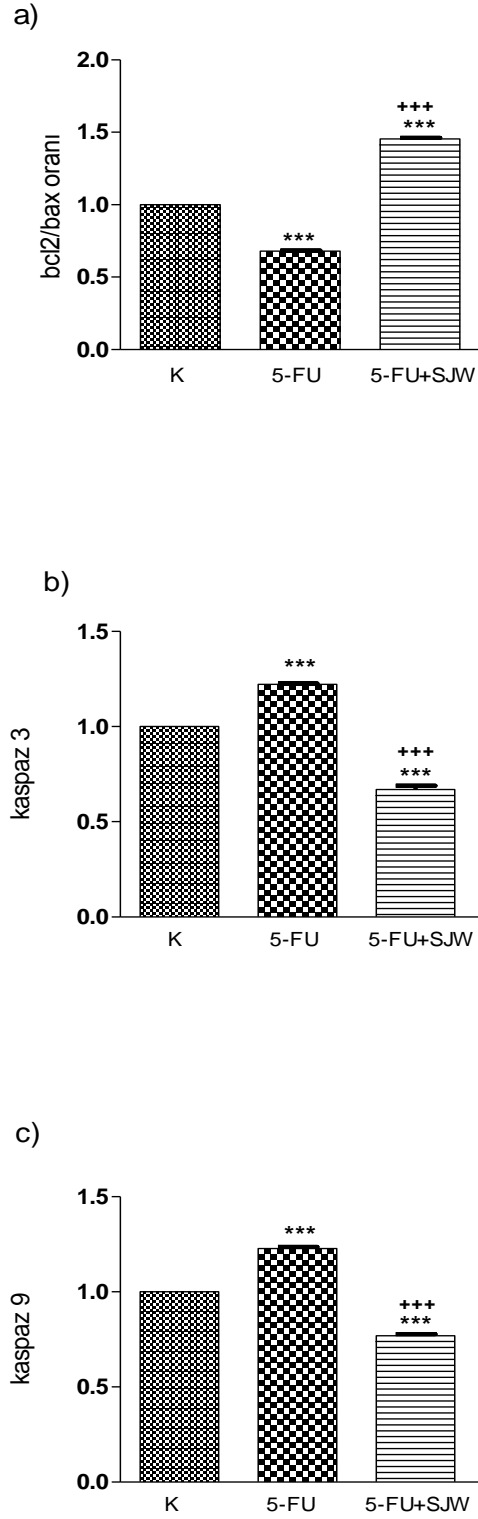
#### 6.3.2.1. İleum bulguları

5-FU grubu kontrol ile kıyaslandığında apoptoz aktivasyonunu gösteren bax, kaspaz 9, kaspaz 3 proteinlerinin membranda daha kalın bant görüntüsü verdiği (Resim 17), istatistiki olarak önemli ( $p<0,001$ ) bulunan bu kaspaz 3 ve kaspaz 9 miktar farkının antiapoptotik belirteç olarak kabul edebileceğimiz bcl-2/bax oranının düşmüş değerlerine eşlik ettiği görüldü (Şekil 7). 5-FU+SJW grubu 5-FU grubu ile kıyaslandığında apoptoz aktivasyonunu gösteren bax, kaspaz 9, kaspaz 3 proteinlerinin membranda belirgin olarak azalmış ekspresyona işaret eden daha ince bant görüntüsü, antiapoptotik bcl-2'nin ise artmış ekspresyona işaret eden daha kalın bant görüntüsü olduğu görüldü (Resim 17). İstatistiki olarak önemli ( $p<0,001$ ) bulunan bu kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyon düşüşünün antiapoptotik belirteç olarak kabul edebileceğimiz önemli düzeyde artmış ( $p<0,001$ ) bcl-2/bax oranına eşlik ettiği görüldü (Şekil 7). Ayrıca 5-FU+SJW grubunun kontrole göre kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyonunun düşmesi ve bcl-2/bax oranının artması önemli bulundu ( $p<0,001$ ) (Şekil 7).



**Resim 17.** İleum dokusuna ait membran görüntüsü. Western Blot yöntemi.

Analiz sonuçlarında ileum dokusu bcl-2/bax aktivitesi değerleri kontrol grubu için 1, 5-FU grubu için  $0,678 \pm 0,01$ , 5-FU+SJW grubu için  $1,453 \pm 0,01$  bulundu. Kaspaz-3 aktivitesi değerleri kontrol grubu için 1, 5-FU grubu için  $1,223 \pm 0,01$ , 5-FU+SJW grubu için  $0,669 \pm 0,02$  bulundu. Kaspaz-9 aktivitesi değerleri kontrol grubu için 1, 5-FU grubu için  $1,227 \pm 0,01$ , 5-FU+SJW grubu için  $0,769 \pm 0,01$  bulundu.

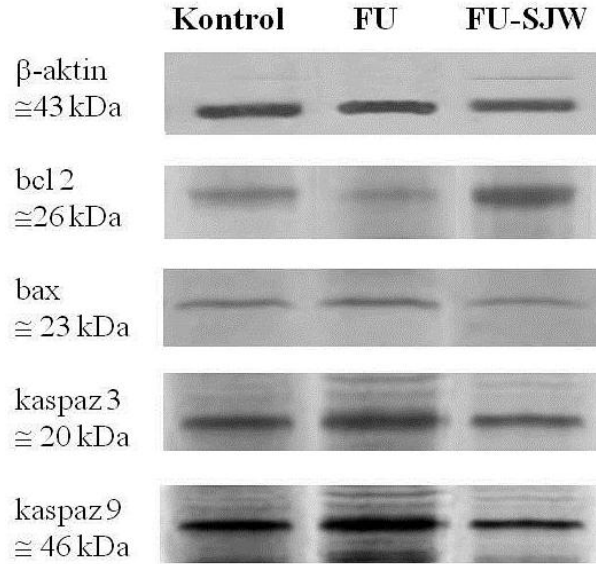


**Şekil 7.** Sıçanlarda yapılan 5-florourasil (5-FU) ile oluşturulan kolit ve ileit modelinde, ileum dokusunda tüm gruplara ait bcl-2/bax oranı ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri. SJW; Saint John's wort, K; Kontrol ve 5-FU; 5-Fluorourasil. \*\*\*  $p < 0,001$  Kontrol grubuna göre, +\*\*  $p < 0,001$  5-FU grubuna göre karşılaştırmalar.

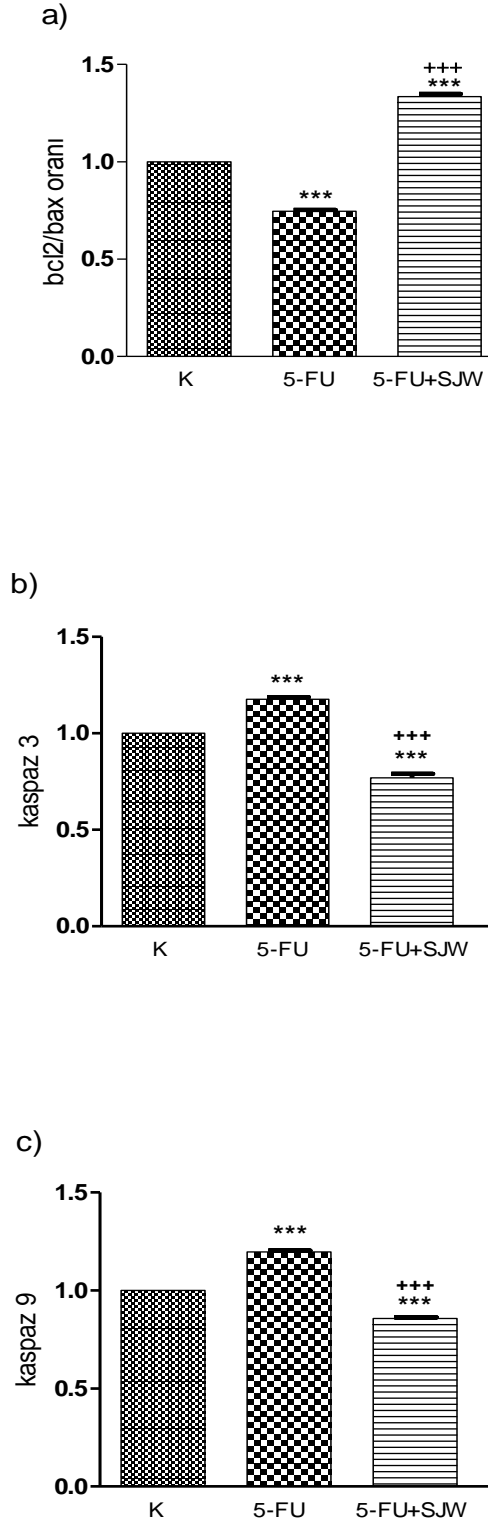
### 6.3.2.2. Kolon bulguları

5-FU grubu kontrol ile kıyaslandığında apoptoz aktivasyonunu gösteren bax, kaspaz 9, kaspaz 3 proteinlerinin membranda daha belirgin bant görüntüsü verdiği (Resim 18), istatistiki olarak önemli ( $p<0,001$ ) bulunan bu kaspaz 3 ve kaspaz 9 miktar farkının antiapoptotik belirteç olarak kabul edebileceğimiz bcl-2/bax oranının düşmüş değerlerine eşlik ettiği görüldü (Şekil 8). 5-FU+SJW grubu 5-FU grubu ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli ( $p<0,001$ ) bulunan kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyon düşüşünün antiapoptotik belirteç olarak kabul edebileceğimiz önemli düzeyde ( $p<0,001$ ) artmış bcl-2/bax oranına eşlik ettiği görüldü (Şekil 8). Ayrıca 5-FU+SJW grubunun kontrole göre kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyonundaki düşüş ve bcl-2/bax oranındaki artış önemli ( $p<0,001$ ) çıktı (Şekil 8).

Analiz sonuçlarında kolon dokusu bcl-2/bax aktivitesi değerleri kontrol grubu için 1, 5-FU grubu için  $0,745\pm 0,01$ , 5-FU+SJW grubu için  $1,335\pm 0,02$  bulundu. Kaspaz-3 aktivitesi değerleri kontrol grubu için 1, 5-FU grubu için  $1,177\pm 0,01$ , 5-FU+SJW grubu için  $0,769\pm 0,03$  bulundu. Kaspaz-9 aktivitesi değerleri kontrol grubu için 1, 5-FU grubu için  $1,196\pm 0,01$ , 5-FU+SJW grubu için  $0,857\pm 0,03$  bulundu.



**Resim 18:** Kolon dokusuna ait membran görüntüsü. Western Blot yöntemi.



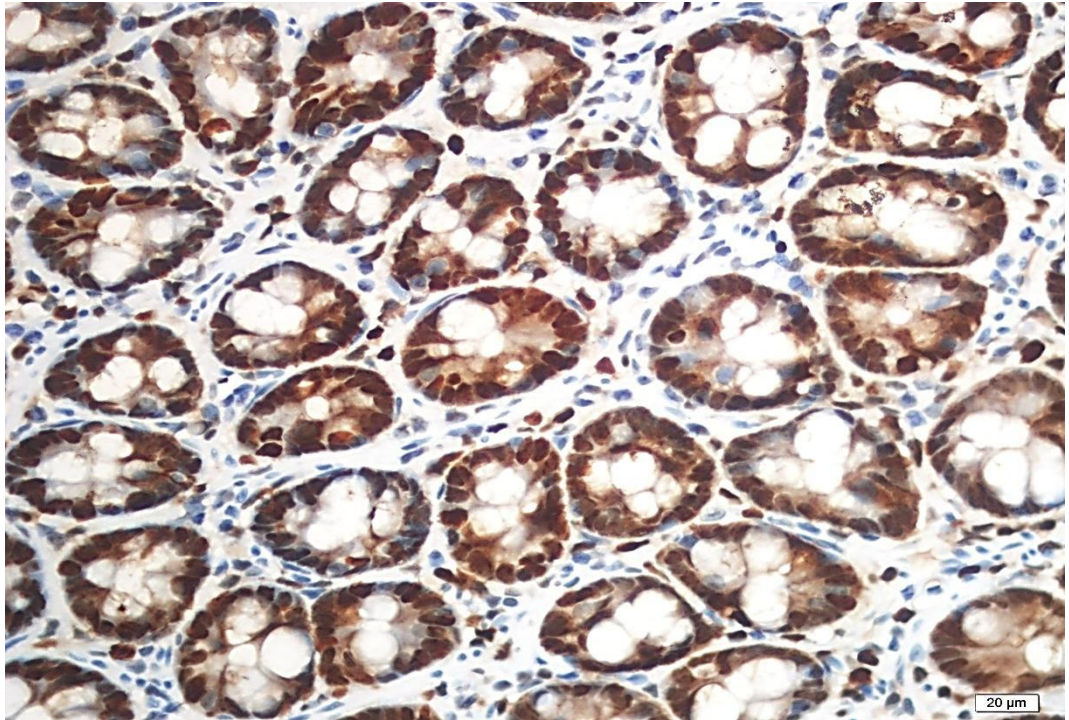
**Şekil 8.** Sıçanlarda yapılan 5-florourasil (5-FU) ile oluşturulan kolit ve ileit modelinde, kolon dokusunda tüm gruplara ait bcl-2/bax oranı ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri. SJW; Saint John's wort, K; Kontrol ve 5-FU; 5-Fluorourasil. \*\*\*:  $p < 0.001$  Kontrol grubuna göre, +++:  $p < 0.001$  5-FU grubuna göre karşılaştırmalar.

## 6.4. PCNA immünohistokimyası

PCNA doku örneklerindeki hücre proliferasyonu için bir belirteç olarak değerlendirildi.

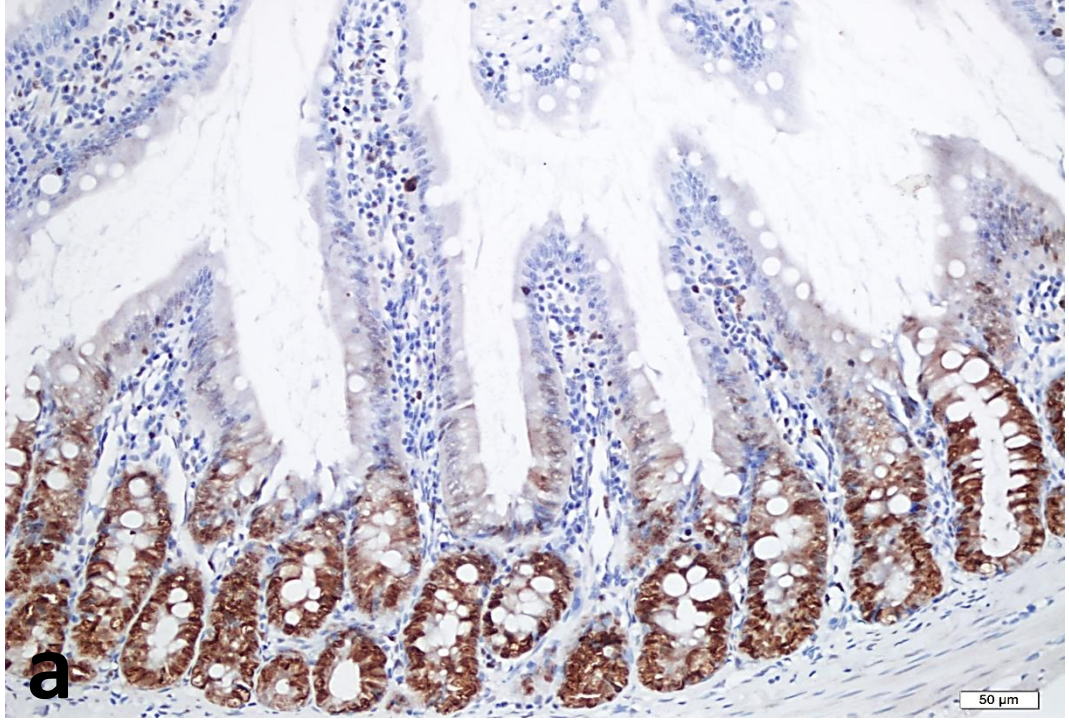
### 6.4.1. İleum bulguları

İnce bağırsak dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde PCNA pozitif hücreler koyu kahverengi boyanmış olarak gözlemlendi (Resim 19). Kontrol grubuna ait ileum dokusunda bez epiteline ait çok sayıda PCNA pozitif hücreler koyu kahverengi boyalı olarak görüldü (Resim 19a). 5-FU grubunda PCNA pozitif hücreler nadir olarak görülürken (Resim 19b), 5-FU+SJW grubunda bez epitelindeki PCNA pozitif hücre sayısında artış görüldü (Resim 19c). 5-FU grubunda hücre proliferasyonunun diğer iki gruba göre çok düşük olduğu, 5-FU+SJW grubunun ise kontrol grubuna göre daha düşük, 5-FU grubuna göre daha yüksek düzeyde hücre proliferasyonu sergilediği görüldü (Şekil 9).

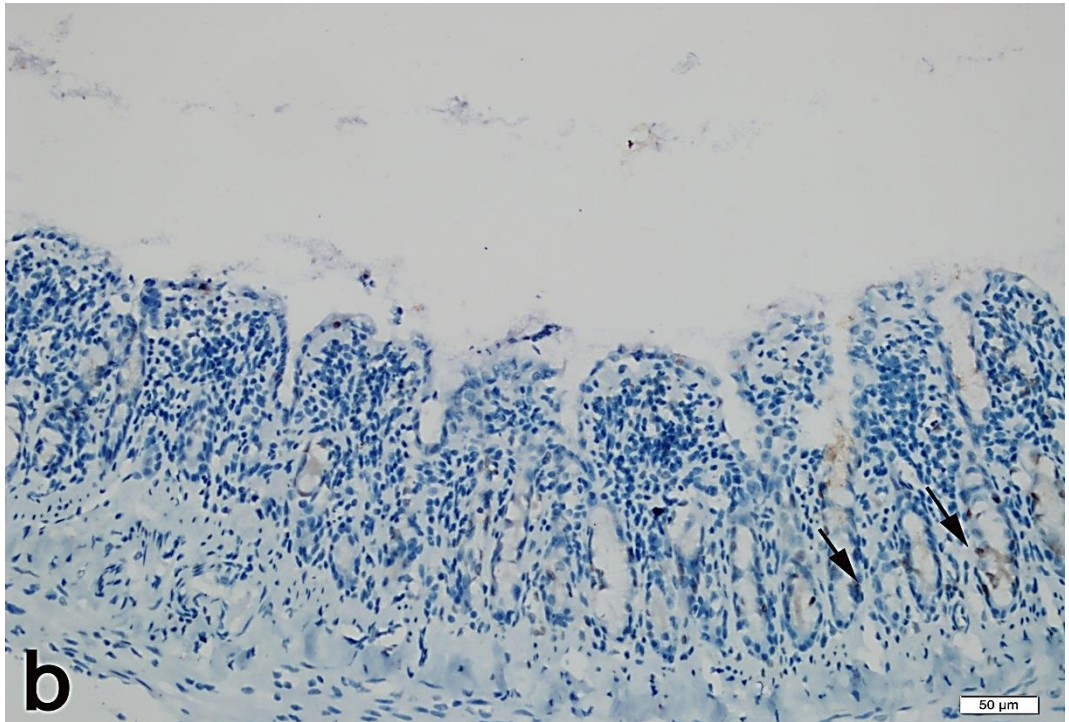


**Resim 19.** İnce bağırsak dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde kahverengi boyalı PCNA pozitif boyanma gösteren hücreler. PCNA immünohistokimyası.

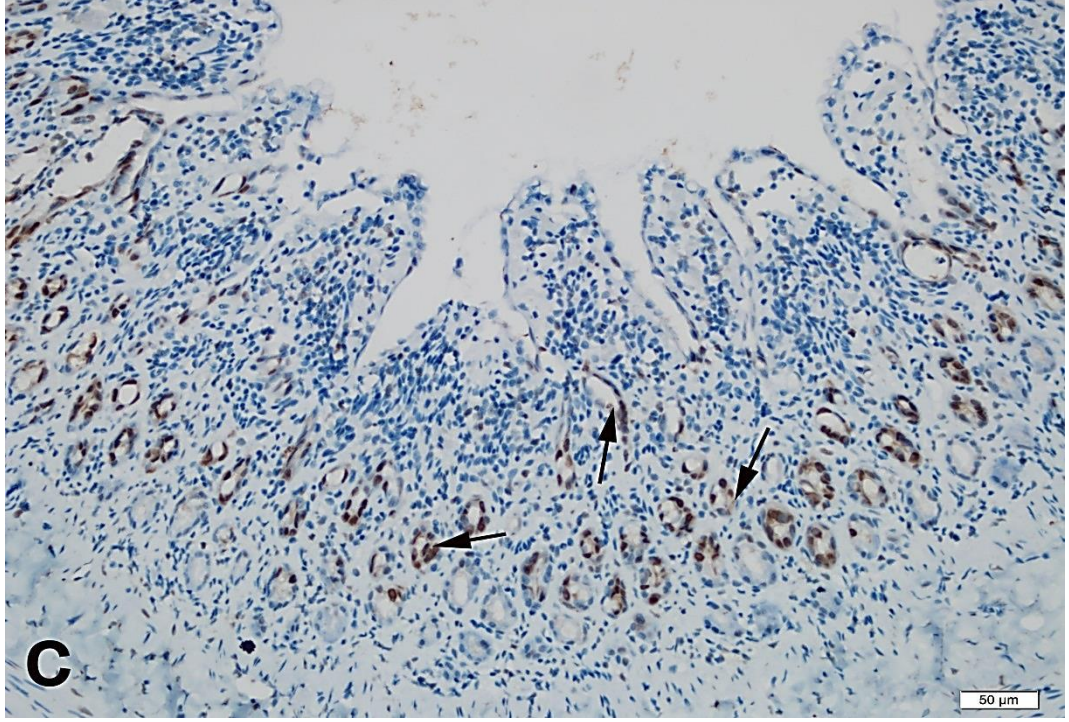




**Resim 19a.** Kontrol grubu, kuvvetli koyu kahverengi PCNA pozitif boyanma. PCNA immünohistokimyası.



**Resim 19b.** 5-FU grubu, azalmış PCNA pozitif boyanma (oklar). PCNA immünohistokimyası.

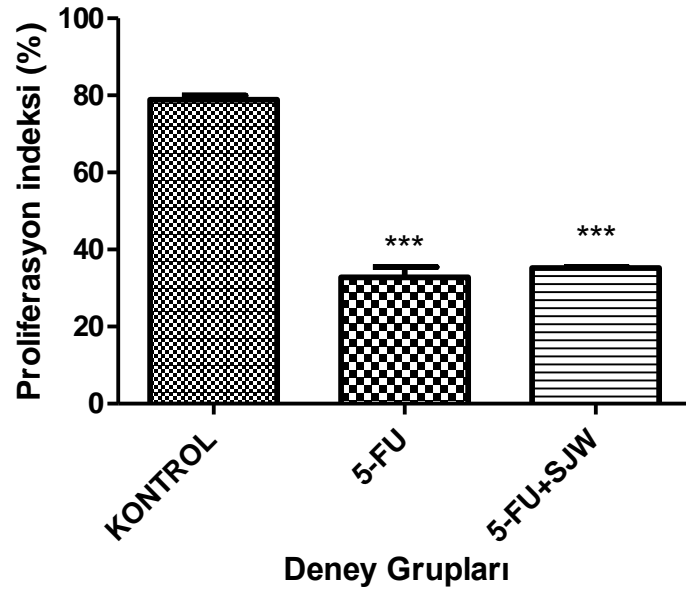


**Resim 19c.** 5-FU+SJW grubu, PCNA pozitif boyanma (oklar). PCNA immünohistokimyası.

Proliferasyon indeksi, kontrol grubunda ortalama  $78,88 \pm 1,8$ , 5-FU grubunda  $32,83 \pm 4,5$ , 5-FU+SJW grubunda  $35,25 \pm 0,3$  bulundu.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5-FU ve 5-FU+SJW gruplarında proliferasyon indeksinin anlamlı düzeyde düştüğü görüldü ( $p < 0,001$ ). 5-FU+SJW grubu, 5-FU grubu ile kıyaslandığında proliferasyon indeksinde istatistiki olarak anlamlı olmayan bir artış olduğu görüldü.





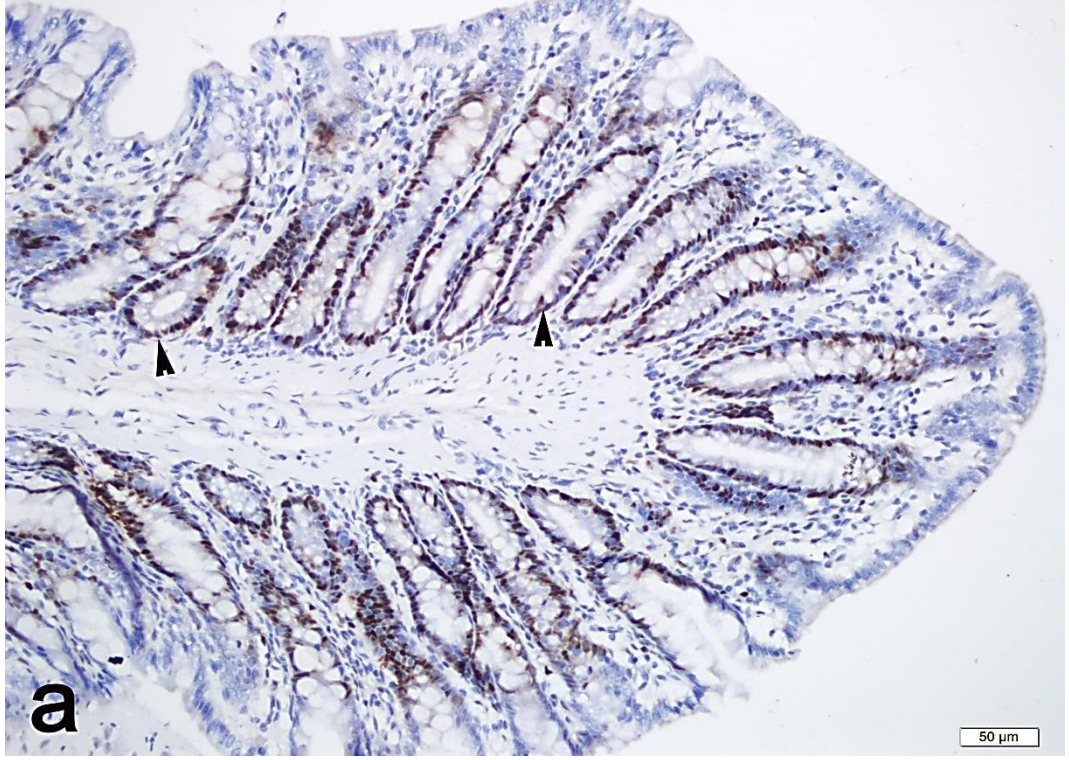
**Şekil 9.** Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış ileum dokusu intestinal bez epiteli proliferasyon indeksi grafiği. \*\*\*:  $p < 0,001$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında.

#### 6.4.2. Kolon bulguları

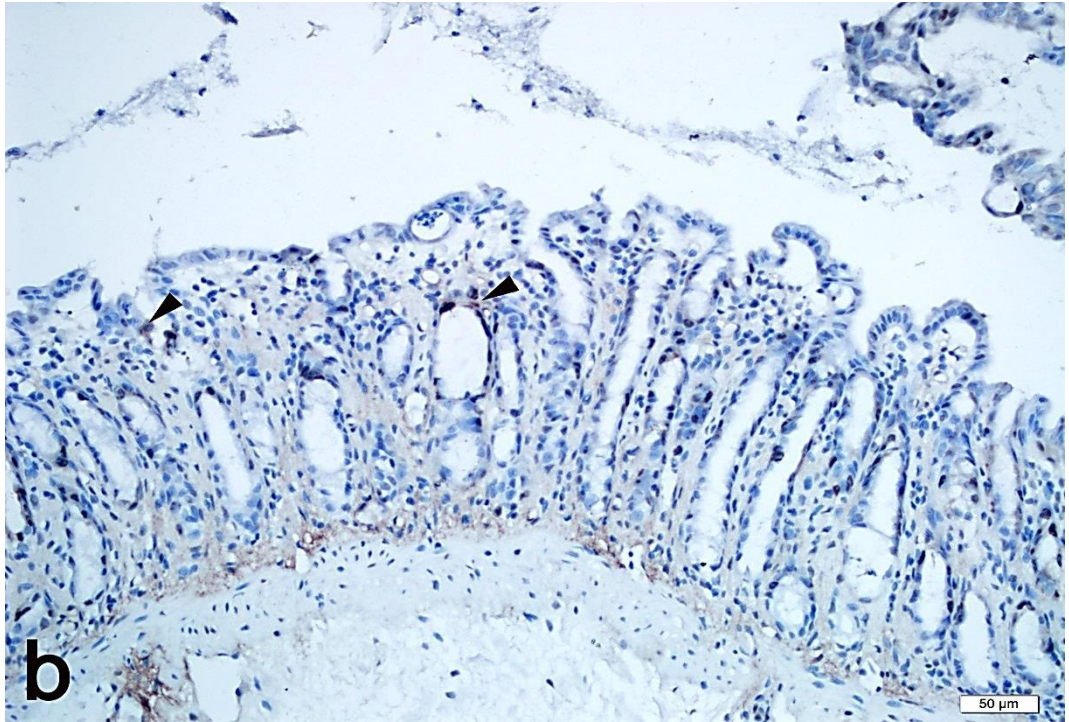
Kontrol grubuna ait kolon dokusunda bez epiteline ait çok sayıda PCNA pozitif hücreler koyu kahverengi boyalı olarak görüldü (Resim 20a). 5-FU grubunda PCNA pozitif hücreler nadir olarak görülürken (Resim 20b), 5-FU+SJW grubunda bez epitelindeki PCNA pozitif hücre sayısında kontrol grubuna benzer şekilde artış görüldü (Resim 20c).

Proliferasyon indeksi, kontrol grubunda ortalama  $71,99 \pm 3,2$ , 5-FU grubunda  $38,20 \pm 8,6$ , 5-FU+SJW grubunda  $70,80 \pm 2,7$  bulundu.

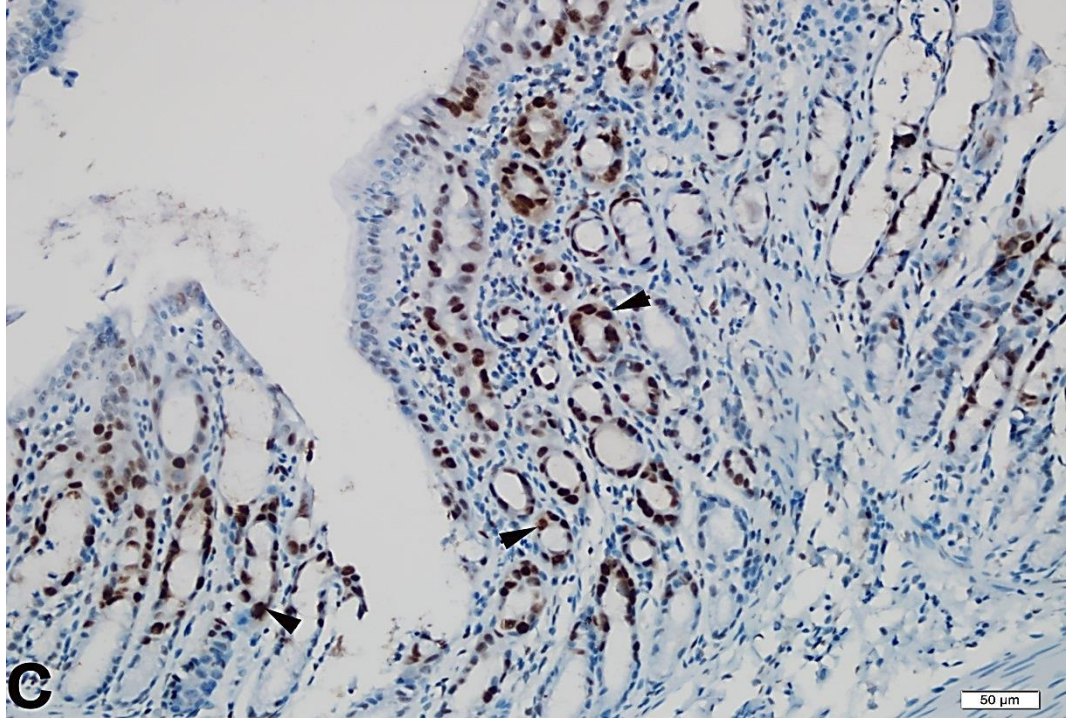
Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5-FU grubunda proliferasyon indeksinin anlamlı olarak düşük olduğu ( $p < 0,01$ ) görüldü. 5-FU+SJW grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında kontrole yakın proliferasyon indeksi değeri sergilediği, 5-FU grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artmış ( $p < 0,01$ ) proliferasyon indeksi değeri sergilediği görüldü (Şekil 10).



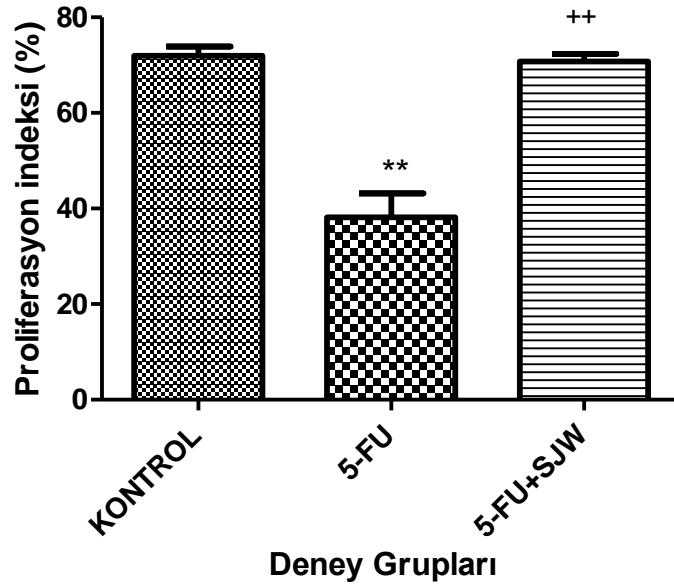
**Resim 20a.** Kontrol grubu, kuvvetli PCNA pozitif boyanma (ok başları). PCNA immünohistokimyası.



**Resim 20b.** 5-FU grubu, zayıf PCNA pozitif boyanma (ok başları). PCNA immünohistokimyası.



**Resim 20c.** 5-FU+SJW grubu, yeniden kuvvetli PCNA pozitif boyanma (ok başları). PCNA immünohistokimyası.



**Şekil 10.** Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış kolon dokusu intestinal bez epiteli proliferasyon indeksi grafiği. \*\*:  $p < 0,01$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında. ++:  $p < 0,01$  5-FU grubu ile kıyaslandığında.



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kemoterapi pek çok kanserin tedavisinde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak kanser hücrelerini öldüren kemoterapötik ilaçlar diğer yandan epitel gibi hızlı bölünen sağlıklı dokuları da olumsuz etkileyerek yan etkilere yol açmaktadır (Bowen ve ark., 2006). Klinikte özellikle solid tümörlerin tedavisinde 50 yılı aşkın süredir kullanılan bir antimetabolit kemoterapötik olan 5-FU da DNA sentezini engellerken sadece malin hücreleri değil hızlı bölünen gastrointestinal yol hücrelerini de etkiler (Fata ve ark., 1999). Bunun bir sonucu olarak ortaya çıkan mukozit özellikle ince bağırsakta ülser ve inflamasyonla birlikte kendini gösteren bir semptom olarak karşımıza çıkar (Duncan ve Grant, 2003). İntestinal bezlerdeki hücre bölünmesi ve villus epitelindeki yenilenme kemoterapötik ajanlar tarafından engellenir. Bu durum ise intestinal yapının bozulmasına yol açar. Mukozit oluşumunun başlangıç aşamasında 5-FU timidilat sentezi inaktive ederek DNA sentezini durdurup epitel hücrelerinin metabolizmasını engeller. Bu durumdan özellikle hızlı bölünen progenitör hücrelerin yer aldığı kript hücre popülasyonu olumsuz etkilenir. 5-FU'nun RNA'nın yapısına katılarak oluşturduğu etki ise daha çok diğer epitelyal ve subepitelyal hücre popülasyonlarının metabolizmasını olumsuz etkiler. Bahsettiğimiz değişimler mitozun durması, hücre-hücre ve hücre-substrat etkileşiminin bozulması, epitel bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanır. Bu durum ise immün ve inflamatuvar hücrelerin hızlı bir şekilde lamina propriyayı doldurmasına neden olur. Hücre bölünmesinin durmasının ardından apoptozda artış başlar, kript ve yüzey epiteli hücrelerinde kayıplar oluşur. Ardından kript derinliği bozulur ve villus yapıları kaybolmaya başlar. Terapinin şiddetli olması halinde epitelin yeniden oluşmasına paralel olarak hücre kayıpları devam edebilir ve absorbtif epitelin neredeyse tamamının kaybıyla da sonuçlanabilir (Duncan ve Grant, 2003).

Bu çalışmada benzer amaçla 5-FU indüksiyonu ileum ve kolon dokusunda oluşturduğu mukozit nedeniyle model olarak seçilmiştir.

Kemoterapi ile oluşmuş intestinal mukozite dair yapılmış pek çok çalışma bulunmasına rağmen mukozitin tedavisi için klinikte kullanılan iyi yöntemler hala mevcut değildir (Wu ve ark., 2010; Cheah ve ark., 2014). 5-FU ile kemoterapi gören hastaların %80 kadarı gastrointestinal (GI) mukozitle ortaya çıkan diyareden

olumsuz etkilenmekte, bu nedenle devamlı GI mukoziti ve diyareyi iyileştirecek yeni terapötik seçenekler araştırılmaktadır (Letari ve ark., 2010).

Eksojen hormonların ve sitokinlerin kullanımı literatürde gördüğümüz yan etkileri iyileştirme stratejilerinden biridir. Boushey ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada farelere 3 gün boyunca 400 mg/kg dozda i.p. 5-FU ya da 280 mg/kg dozda i.p. irinotekan uygulaması öncesinde günde iki kere insan glukagon benzeri peptid-2'yi (GBP-2) subkutan (sc) olarak vermiştir. Çalışmanın sonunda hayvanlarda kilo kaybının azaldığı, canlı kalımın arttığı, hem jejunum hem de kolonda TUNEL sonuçlarında apoptozun bazale yakın hücrelerde daha fazla görüldüğü ve GBP-2 uygulamasıyla azaldığı tespit edilmiştir. GBP-2 uygulaması sonrası Western Blot sonuçlarında prokaspaz-8 ayrılmasının azaldığı, morfolojik değerlendirmelerde kript kaybının azaldığı ve kriptlerdeki hücre sayısının arttığı görülmüştür.

Kendi çalışmamızda, Boushey ve ark. (2001)'nin çalışmasına benzer şekilde 5-FU ve SJW uygulamalarının histolojik sonuçlarını değerlendirmek için H&E, Gomori trikrom boyama teknikleriyle ileum ve kolon dokuları boyanarak morfolojik değerlendirme yapılmıştır. Morfolojik değerlendirmeler sonucunda 5-FU uygulaması sonrasında ileum villuslarında kısalmanın, ileum ve kolondaki kript yoğunluğunda ve her bir kripte bulunan hücre sayısında azalmanın var olduğu, hem ileum hem kolon dokusunda bağ doku içerisinde fibrozis geliştiği tespit edilmiştir. 5-FU ile birlikte SJW uygulamasının yapıldığı grupta ise villus morfolojisinin, ileum ve kolondaki kript yoğunluklarının ve kriptlerdeki hücre morfolojisi ile sayısının normale yakın hal aldığı, fibrozisin azaldığı görülmüştür.

Son dönemde kendi çalışmamızda olduğu gibi doğal bitki ekstraktlarının yan etkileri iyileştirmede kullanımı popülerlik kazanan bir strateji halini almıştır. Cheah ve ark. (2014) dişi sıçanları iki gün metabolik kafeslerde tuttuktan sonra sıçanlara 6 gün boyunca antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği bilinen üzüm çekirdeği ekstraktını tek başına farklı dozlarda (400 mg/kg, 600 mg/kg ve 1000 mg/kg) oral gavaj ile vermiş; 9-12. günlerde üzüm çekirdeği ekstraktının ardından 5-FU (150 mg/kg, i.p.) uygulayarak üzüm çekirdeği ekstraktının deneysel mukozit üzerindeki koruyucu etkisini değerlendirmiştir. Sonuçlarda 5-FU enjeksiyonunun beden ağırlığını düşürdüğünü, ekstraktın bu değerleri önemli düzeyde değiştirmedeğini, 5-FU'nun jejunum ve ileum villuslarında kısaltmaya, kript derinliğinde ve mukoza

kalınlığında azalmaya yol açtığını; doza bağılı olarak ekstrakt verilmesinin bu etkileri iyileştirdiğini göstermiştir. Histolojik skorlama sonuçlarına bakarak mukozit şiddetinin en ağır 5-FU uygulanan grupta görüldüğünü ancak doza bağılı olarak ekstrakt verilen gruplarda azaldığını ifade etmiştir.

Liu ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada farelere 11 gün boyunca günde iki kere gavajla farklı dozlarda *Chimonanthus salicifolius* ekstraktı (5 g/kg, 10 g/kg, 20 g/kg) ile mukozit oluşturmak için 5-7. günlerde 5-FU (50 mg/kg, i.p.) vermiş, sonrasında kan biyokimyasal değerlerini, intestinal histopatolojiyi, apoptoz ile ilişkili gen ekspresyonunu ve proliferasyonu değerlendirmiştir. Mukozit şiddetini değerlendirme adına beden ağırlıklarını kıyasladığında 5-FU'nun hayvan ağırlığını önemli ölçüde azalttığını, *Chimonanthus salicifolius*'un bu etkiyi doza bağılı olarak önemli ölçüde baskıladığını görmüştür.

Çalışmamızda beden ağırlıkları kıyasladığında 5-FU'nun hayvan ağırlığını önemli ölçüde azalttığı ve SJW tedavisinin hayvan ağırlığında artışa neden olduğu gözlenmiştir.

Liu ve ark.(2013) yaptıkları çalışmada 5-FU uygulamasının hem kolon hem de ince bağırsakta kısalmaya yol açtığını, villus deformasyonuna, kaybına ve atrofisine neden olduğunu; 20 g/kg dozda *Chimonanthus salicifolius*'un bu etkiyi önemli ölçüde engellediğini göstermiştir. Apoptotik belirteç için yaptığı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmalarında ince bağırsakta kaspaz-3 RNA seviyesinin 5-FU uygulanmış grupta anlamlı şekilde artarken *Chimonanthus salicifolius*'un bu seviyeyi anlamlı şekilde baskıladığını görmüştür. Aynı yöntemde proliferasyon belirteci olan PCNA RNA seviyesinin 5-FU grubunda yükselmiş, *Chimonanthus salicifolius* ekstraktı uygulanan grupta ise anlamlı ölçüde düşmüş olduğunu göstermiştir.

Dost ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada sıçanlarda intrakolonik trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) uygulamasıyla kolit modeli oluşturmuş, 3 ve 7 gün boyunca farklı dozlarda SJW (50, 150 ve 300 mg/kg, oral gavaj) uygulanmasının bu modelde iyileştirici etkisine bakmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde 3 günlük deney gruplarında kolit grubu için mukozal ödem, kanama, ülserasyon ve erozyon saptanırken, SJW gruplarında orta düzeyde eritem ile ülser ve erozyonda önemli düzeyde iyileşme görülmüştür. 7 günlük deney gruplarında kolit grubu için hafif kanama ve küçük erozyonlar görülürken, SJW grubunda patolojik bulgulara



rastlanmamıştır. Şehirli ve ark. (2015) benzer bir çalışmada aynı deneysel kolit modelini kullanarak SJW (300 mg/kg, oral gavaj) ve spironolakton (80 mg/kg, oral gavaj) uygulamasının kolon, jejunum ve ileumdaki iyileştirici etkisini değerlendirmiştir. Kolit grubunda önemli düzeyde kilo kaybı varken, SJW uygulamasının bu kaybı önemli düzeyde düzelttiği, makroskopik değerlendirmelerde SJW'nin kolondaki hasarı iyileştirdiği ancak hasarın tamamen düzelmeyip hala kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Morfolojik değerlendirmelerde kolon, jejunum ve ileum dokularının hepsinde kontrol, SJW ve spironolakton gruplarında çok sayıda goblet hücresi içeren düzenli epitelyal ve glandüler morfoloji görülmüştür. Kolutin kolonda yüksek düzeyde lökosit birikimiyle bozulmuş epitelyal ve glandüler morfolojiye, jejunumda hipertrofik goblet hücreleriyle beraber epitelde şiddetli dökülmeye, ileumda lamina propria içerisindeki lökosit birikimiyle şiddetli epitel dökülmesine yol açtığı görülmüştür. SJW ve spironolaktonun ileum ve jejunumda epitelde orta düzeyde rejenerasyon sağladığı ifade edilmiştir.

Di Carlo ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada farelere 14 gün boyunca 30 mg/kg ve 100 mg/kg dozda Ekinezya ekstraktı ile SJW uygulamıştır. Çalışmanın sonunda fare dalaklarından elde ettiği lenfosit hücrelerinde apoptoz belirteci olarak kullanmak üzere TUNEL yöntemiyle DNA fragmentasyonuna ve flow sitometri tekniğiyle Bcl-2 ile FAS ekspresyonlarına bakmıştır. Çalışmada her iki bitkinin kullanılan her iki dozda da dozla doğru orantılı olarak Bcl-2 ekspresyonunu anlamlı ölçüde arttırarak, FAS ekspresyonunu anlamlı ölçüde azaltarak apoptoza karşı koruyucu rol oynadığı görülmüştür.

Jang ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada nöroblastoma hücrelerinde hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) uyarılmış apoptoz modeli kullanarak SJW'nin bu apoptoza karşı koruyucu etkisini *in vitro* olarak araştırmıştır. Hücre kültürlerini 24 saat farklı dozlarda ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  mg/ml) SJW ile muamele ettikten sonra 5 saat  $H_2O_2$  ( $10^{-1}$  mM)'ye maruz bırakmıştır. TUNEL sonuçları değerlendirildiğinde sadece  $H_2O_2$  uygulanan grupta TUNEL pozitif hücre sayısında ciddi bir artış gözlemlerken, SJW ile ön muamele yapılan grupta kontrole yakın bir sonuç gözlemlenmiştir. Kaspaz-3 enzim analizlerinde sadece  $H_2O_2$  ile muamele edilen grupta enzim aktivitesinin arttığını, SJW ile ön muamelenin bu artışı kırdığını tespit etmiştir.

Kemoterapötiklerin sitotoksik etkileri hücre döngüsünün durdurulması ya da apoptozun uyarılması ile ilişkilidir. Bu nedenle kendi çalışmamızda SJW'nin bu etkileri geri çevirme mekanizmasını test etmek amacıyla PCNA immünohistokimyası ile kript hücrelerindeki proliferasyon ve TUNEL yöntemi ile kript hücrelerindeki apoptoz değerlendirilmiştir. PCNA bulgularımızda Duncan ve Grant'ın (2003) belirttiği gibi 5-FU'nun bölünmeyi durdurucu etkisi özellikle intestinal bezlerde daha belirgin olarak gözlemlenmiştir. PCNA immünohistokimyası ile elde edilen proliferatif indeks sonuçları SJW'nin epitel üzerindeki trofik etkisini kript hücrelerindeki proliferasyonun uyarılmasına katılarak sağlayabildiğini düşündürmektedir. TUNEL sonuçlarında ise Di Carlo ve ark. (2003)'nin çalışmasıyla paralel şekilde ancak onların çalışmasından farklı dozda (300 mg/kg) SJW uygulamasının apoptozu baskılayıcı etki oluşturduğu gözlenmiştir.

5-FU uygulaması sonrası oluşan apoptoz aracılı intestinal hasara SJW'nin nasıl bir mekanizma ile karşı koyarak antiapoptotik etki sergilediğini anlamak için çalışmamızda Western Blot tekniğinde kaspaz-3, kaspaz-9 miktarları ile Bcl-2/Bax oranı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarla SJW uygulamasının ardından antiapoptotik Bcl-2/Bax oranında oldukça anlamlı bir artış, apoptotik kaspaz-3, kaspaz-9 ekspresyon miktarlarında ise anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar daha önce yapılan Di Carlo ve ark. (2003)'nin çalışmasını doğrular niteliktedir. Ayrıca çalışmamızda protein aktiviteleri için kolon ve ileum dokularının Bcl-2/Bax oranları 5-FU ve 5-FU+SJW gruplarında, iki doku arasında kıyaslandığında SJW uygulamasının antiapoptotik etkiyi iki dokuda da arttırdığı görülmektedir. Ancak 5-FU grubu ile 5-FU+SJW arasındaki değer değişimi farkının ileumda daha büyük olması SJW'nin bu dokudaki antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunu daha iyi arttırdığı, proapoptotik Bax ekspresyonunu daha fazla düşürdüğü ihtimalini düşündürmektedir.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde görülmüştür ki; 5-FU hem kolon hem de ileum dokularındaki yüzey ve intestinal bez epitelinde hasara, bez hücresi proliferasyonunda düşüşe ve apoptoz giden hücre sayısında artışa, intestinal bez hücrelerinin salgı fonksiyonunda düşüşe, ödem oluşumuna, bağ dokuda lökosit artışına, konjesyona ve fibroziste artışa neden olmuştur. SJW'nin ilaçla beraber uygulanmasıyla epitelde rejenerasyon, apoptozda önemli düzeyde düşüş, intestinal

bez hücresi proliferasyonunda artış, salgı fonksiyonunda ve miktarında artış, ödemde ve fibroziste azalma geliştiği görülmüştür. Sonuçlar bize SJW'nin 5-FU ile muamele sonrası oluşan epitel hasarı üzerine iyileştirici etkisi ile hücre proliferasyonunu indükleyici ve apoptozu baskılayıcı özellik sergilemesi arasında direkt bir bağıntı olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızın sonunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda SJW'nin kemoterapi esnasında veya sonrasında bağırsaklarda gelişen mukozite karşı destek tedavi ajanı olarak kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

## 8. KAYNAKLAR

Abdel-Salam OME. Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. *ScientificWorldJournal*. 2005; 5: 585- 596.

Altun ML, Yılmaz BS, Erdoğan Orhan I, Çitoğlu Saltan G. *Ind Crop Prod*. 2013; 43: 87– 92.

Aschele C, Sobrero A, Faderan MA, Bertino JR. Novel mechanism(s) of resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules. *Cancer Res*. 1992; 52: 1855-1864.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000; 148: 187-197.

Bahmani M, Shirzad H, Majlesi M, Shahinfard N, Rafeian-Kopaei M. *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7: S43-S53.

Barnes J, Anderson LA, Philipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum L.*): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *JPP*. 2001; 53: 583-600.

Beerhues L. Hyperforin. *Phytochemistry*. 2006; 67: 2201-2207.

Bombardelli, E., Morazzoni, P. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. 1995; 66: 43-68.

Boushey RP, Yusta B, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 reduces chemotherapy-associated mortality and enhances cell survival in cells expressing a transfected GLP-2 receptor. *Cancer Res*. 2001; 61: 687–93.

Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DMK. Intestinal mucositis: the role of Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*. 2006; 14: 713-731.

Brondz I, Greibrokk T, Groth P A, Aasen A J. The relative stereochemistry of hyperforin: An antibiotic from *Hypericum perforatum L.* *Tetrahedron Lett*. 1982; 23: 1299-1300.

Butterweck V. Mechanism of action of St John's Wort in depression. What is known? *CNS Drugs*. 2003; 17: 539-562.

Camfield DA, Sarris J, Berk M. Nutraceuticals in the treatment of Obsessive Compulsive Disorder (OCD): A review of mechanistic and clinical evidence. *Prog Neuro-Psychoph*. 2011; 35: 887–895.

Cervo L, Rozio M, Ekalle-Sopp CB, Guiso G, Morazonni P, Caccia S. Role of hyperforin in the anti-depressant like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology*. 2002; 164:423–428.

Chatterjee SS, Nöldner M, Koch E, Erdelmeier C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31: 7-15.

Cheah KY, Howarth GS, Putnam Bastian SE. Grape seed extract dose-responsively decreases disease severity in a rat model of mucositis; concomitantly enhancing chemotherapeutic effectiveness in colon cancer cells. *Plos ONE*. 2014; 9: 1-11.

De Avila PHM, De Avila, Dos Santos Filho EX, Bastos CCC, Batista AC, Mendonça EF, Serpa RC, Marreto RN, Da Cruz AF, Lima EM, Valadares MC. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L.(Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Toxicol Rep*. 2015; 2: 563-573.

De Bruyne T, Pieters L, Witvrouw M, De Clercq E, Berghe DV, Vlietinck AJ. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. *J Nat Prod*. 1999; 62: 954-958.

Di Carlo G, Nuzzo I, Capasso R, Sanges MR, Galdiero E, Capasso F, Carratelli CR. Modulation of apoptosis in mice treated with Echinacea and St. John's wort. *Pharmacol Res*. 2003; 48: 273–277.

Di Francia R, Siesto RS, Valente D, Sparta D, Berretta M. Pharmacogenomics panel test for prevention toxicity in patient who receive Fluoropyrimidine/Oxaliplatin-based therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012; 16: 1211-1217.

Duncan M, Grant G. Oral and intestinal mucositis—causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 18: 853–874.

Fata F, Ron IG, Kemeny N, O'Reilly E, Klimstra D, Kelsen DP. 5-Fluorouracil induced small bowel toxicity in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1999; 86: 1129–1134.

Fiebich BL, Heinricin M, Langosch JM, Kammerer N, Lieb K. Antibacterial activity of Hyperforin from St John's wort. *Lancet*. 1999; 354: 777.

Galeotti N, Maidecchi A, Mattoli L, Burico M, Ghelardini C. St. John's wort seed and feverfew flower extracts relieve painful diabetic neuropathy in a rat model of diabetes. *Fitoterapia*. 2014; 92: 23–33.

Ghandour S, Cetinel S, Kurtel H. Endothelin-3 induced mesenteric vasoconstriction and PMN infiltration in the rat small intestine: role of endothelin receptors. *Regul Pept.* 2004; 119: 125-131.

Ghoshal K, Jacob ST. An Alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53: 1569-1575.

Greeson JM, Sanford B, Monti DA. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): A review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology.* 2001; 153: 402-414.

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* 1957; 179: 663-666.

Isanbor C, O'Hagan D. Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *J Flu Chem.* 2006; 127: 303-319.

Jang MH, Lee TH, Shin MC, Bahn GH, Kim JW, Shin DH, Kim EH, Kim CJ. Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn. (St. John's wort) against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human neuroblastoma cells. *Neuroscience Lett.* 2002; 329: 177-180.

Kleemann B, Loos B, Scriba TJ, Lang D, Davids LM. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) Photomedicine: Hypericin-Photodynamic Therapy Induces Metastatic Melanoma Cell Death. *Plos One.* 2014; 9: 1-20.

Laakmann G, Schüle C, Baghai T, Kieser M. St John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry.* 1998; 31: 54-59.

Lavagna SM, Secci D, Chimenti P, Bonsignore L, Ottaviani A, Bizzarri B., Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Il Farmaco.* 2001; 56: 451-453.

Lavie G, Meruelo D, Aroyo K, Mandel M. Inhibition of the CD8+ T cell-mediated cytotoxicity reaction by hypericin: potential for treatment of T cell-mediated diseases. *Int Immunol.* 2000; 12: 479-486.

Letari O, Booth C, Bonazzi A, Garofalo P, Makovec F, Rovati LC, Caselli G. Efficacy of CR3294, a new benzamidine derivative, in the prevention of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis and diarrhea in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 66: 819-827.

Liu Z, Xi J, Schröder S, Wang W, Xie T, Wang Z, Bao S, Fei J. *Chimonanthus nitens* var. *salicifolius* aqueous extract protects against 5-Fluorouracil induced



gastrointestinal mucositis in a mouse model. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 1-12.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265–327.

Malet-Martino M, Martino R. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A Review. Oncologist. 2002; 7: 288-323.

Mazzaferro S, Bouchemal K, Ponchel G. Oral delivery of anticancer drugs I: general considerations. Drug Discov Today. 2013; 18: 25-34.

Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85: 5230-5234.

Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 13 th ed. Bloomington: Mc Graw Hill Education; 2013, p:309-322.

Nahrstedt, A., Butterweck, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum L.* Pharmacopsychiatry . 1997; 30: 129-134.

Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Souverain SF. Analysis of anticancer drugs: A review. Talanta. 2011; 85: 2265-2289.

Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. J Assist Reprod Genet. 1999;16: 87-91.

Öztürk N, Korkmaz S, Öztürk Y. Wound-healing activity of St. John's wort (*Hypericum perforatum L.*) on chicken embryonic fibroblasts. J Ethnopharmacol. 2007; 111: 33–39.

Pang R, Tao J, Zhang S, Zhu J, Yue X, Zhao L, Ye P, Zhu Y. *In vitro* anti-Hepatitis B virus effect of *Hypericum perforatum L.* J Huazhong Univ Sci Technol. 2010; 30: 98-102.

Peter GJ, Backus HHJ, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, Smid K, Lunec J, Calvert AH, Marsh S, McLeod HL, Bloemena E, Meijer S, Jansen G, van Groeningen CJ, Pinedo HM. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. Biochem Biophys Acta. 2002; 1587: 194-205.

Potter M, Moses A, Wozniak J. Alternative Treatments in Pediatric Bipolar Disorder. Child Adol Psych Cl. 2009; 18: 483–514.

Raak C, Büssing A, Gassman G, Boehm K, Osterman. A systematic review and meta-analysis on the use of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) for pain conditions in dental practice. *Homeopathy*. 2012; 101: 204-210.

Raschi E, Vasina V, Ursino MR, Boriani G, Martoni A, De Ponti F. Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacol Therapeut*. 2010; 125:196–218.

Ross MH, Pawlina JL. *Histology: A Text and Atlas Çeviren: Baykal B. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Basım, Palme Yayıncılık, İstanbul; 2014, s: 586-600*

Ross MH, Pawlina JL. *Histology A Text and Atlas. 6 th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/ LippincottWilliams & Wilkins; 2011, p: 569-600.*

Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum L.* *J Ethnopharmacol*. 2010; 131:511–521.

Sarris J, Panossian A, Schweitzer I, Stough C, Scholey A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *Eur Neuropsychopharm*. 2011; 21: 841-860.

Scalbert A, Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991; 30: 3875-3883.

Schempp C, Pelz K, Wittmer A, Schopf E, Simon J C. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet*. 1999; 353: 2129.

Schey KL, Patat S, Chingell CF, Datillo M, Wang RH, Roberts JE. Photooxidation of Lens a-Crystallin by Hypericin (Active Ingredient in St.John's Wort). *Photochem Photobiol*. 2000; 72; 200–203.

Schöffski P. The modulated oral fluoropyrimidine prodrug S-1, and its use in gastrointestinal cancer and other solid tumors. *Anti-Cancer Drugs*. 2004; 15: 85-106.

Smith CL, Geier MS, Yazbeck R, Torres DM, Butler RN. *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr Cancer*. 2008; 60: 757–767.

Sobrero AF, Aschele C, Guglielmi AP, Mori AM, Melioli GG, Rosso R, Bertino JR. Synergism and lack of cross-resistance between short-term and continuous exposure to fluorouracil in human colon adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85: 1937-1944.

Stevinson C, Dixon M, Ernst E. *Hypericum* for fatigue - a pilot study. *Phytomedicine*. 1998; 5: 443-447.

Stojanovic G, Dordevic A, Smelcerovic A. Do other hypericum species have medical potential as St. John's wort (*Hypericum perforatum*)? *Curr Med Chem*. 2013; 20: 2273-2295.

Straub JO. Combined Environmental Risk Assessment for 5-Fluorouracil and Capecitabine in Europe. *Integr Environ Assess Manag*. 2010; 6: 540–566.

Şehirli AO, Çetinel Ş, Özkan N, Selman S, Tetik S, Yüksel M, Dulger FGA. St. John's wort may ameliorate 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid colitis of rats through the induction of pregnane x receptors and/or p-glycoproteins. *J Physiol Pharmacol*. 2015; 2: 203-214.

Takahashi I, Nakashi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki Kohichi, Tamaok T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: Possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Bioph Res Co*. 1989; 165: 1207-1212

Taylor LH, Kobak KA. An open-label trial of St John's wort (*Hypericum ferforatum*) in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2000; 61: 575-578.

Tung D, Cheung PH, Tudor G, Booth C, Saha S. *In vivo* effects of immunomodulators in a murine model of fluorouracil-induced mucositis. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2011; 72: 262-272.

Verotta L, Appendino G, Bombardellic E, Brund R. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure–activity study. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007; 17: 1544-1548.

Vandenbogaerde AL, Kamuhabwa A, Delaey E, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte, PA. Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *J Photoc Photobio*. 1998; 45: 87–94.

Vanhaelen, M, Vanhaelen-Fastre, R. Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography-densitometry. *J Chromatogr*. 1983; 281: 263-271.

Voss A, Verweij P E. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort. *Lancet*. 1999; 354: 777.

Wills RBH, Bone K, Morgan M. Herbal products: active constituents, models of action and quality control. *Nutr Res Rev*. 2000; 13: 47–77.

Wu ZQ, Han XD, Wang Y, Yuan KL, Jin ZM, Di JZ, Yan J, Pan Y, Zhang P, Huang XY, Wang ZG, Zheng Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 68: 87-96.

Yesilada E, Gurbuz I, Shibata H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66: 289–293.

Zhang J, Shao L, Wu C, Lu H, Xu R. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis of myeloma SP2/0 cell depended on caspase activity *in vitro*. *Cancer Cell Int.* 2015; 15: 1-11.

## 9. ETİK KURUL ONAYI



### MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU PROJE ONAY FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	PROTOKOL KODU	75. 2014.mar	Çalışma: Yüksek lisans tezi		
	PROJE ADI	5-Fluorourasil ile oluşturulan ileum ve kolon epitel hasarına karşı Saint Johns Wort'un olası koruyucu rolünün değerlendirilmesi			
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr. Şule ÇETİNEL			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	M.Ü. DEHAMER ve M.Ü. Histoloji ve Embriyoloji Abd Laboratuvarı			
	DESTEKLEYİCİ				
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Tarih	26.11.2014			
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>					
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>					
Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.					
<b>ÜYELER</b>					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. İnci ALİCAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	Var Yok	Evet Hayır	
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞIRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Rezzan AKER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

## 10. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	NURDAN	<b>Soyadı</b>	BÜLBÜL
<b>Doğum Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğum Tarihi</b>	26.08.1985
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Tel</b>	05071341981
<b>E-mail</b>	nrdnblbl@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ	2008
<b>Lise</b>	VATAN ANADOLU LİSESİ(SAMİHA AYVERDİ A.L.)	2003

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)	
Araştırma Görevlisi	Dumlupınar Üniversitesi	2013 - 2014	
Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi	2013 - 2015	
<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İNGİLİZCE	ÇOK İYİ	ÇOK İYİ	ÇOK İYİ

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	86,25							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	84,913	84,981	69,983
(Diğer) Puanı			

#### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	Çok iyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

#### KURSLAR

1. Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşım, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, DEHAMER, 2013.

#### KATILDIĞI SEMPOZYUMLAR

1. XXIV International Symposium on Morphological Sciences (ISMS 2015) İstanbul, Türkiye, 2-6 Eylül 2015.

#### ULUSLARASI KONGRELERDEKİ POSTER SUNUMLARI

1. **Bulbul N.**, Aykac A., Cetnel S., Sehirli A.O. The Ameliorating Effect of Saint John's Wort on 5-Fluorouracil Induced Ileum and Colon. XXIV. International Symposium on Morphological Sciences (ISMS 2015), İstanbul, Türkiye, 2-6 Eylül 2015.