

T. C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

MERAM TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

***INULA VISCOSA* (YAPIŞKAN ANDIZ OTU) EKSTRAKTININ KARACİĞER
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

DR. ABDULKADİR ÇELİK

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2022

T. C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

***INULA VISCOSA* (YAPIŞKAN ANDIZ OTU) EKSTRAKTININ KARACİĞER
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

DR. ABDULKADİR ÇELİK

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ MUSTAFA ŞENTÜRK

KONYA, 2022

TEŐEKKÜR

Asistanlık eğitimimde katkısı olan tüm hocalarıma, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Şentürk'e, tez çalışmamda emeği geçen Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Sıdıka Fındık'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr. Üyesi İbrahim Kılınç'a ve Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakóltesinden Doç.Dr. Fatma Ayaz'a,

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Dr. Berkan Acar'a, Dr. İhsan Volkan Pençek'e ve bu süreci bizimle paylaşan asistan arkadaşlarıma,

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve tüm aileme,

Genel cerrahi asistanlığının zorlu şartlarına dayanmamda en büyük destek kaynağım olan, fedakarlıkları ve anlayışlılığıyla bu sürecin katlanılabilir olmasını sağlayan değerli eşim Burcu'ya,

En samimi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

***INULA VISCOSA* (YAPIŞKAN ANDIZ OTU) EKSTRAKTININ KARACİĞER REJENERASYONUNA ETKİSİ**

DR. ABDULKADİR ÇELİK

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2022

Amaç: Sıçanlarda %70 parsiyel hepatektomi modeli kullanılarak, *Inula viscosa* bitkisinden elde edilen metanolik ekstrenin karaciğer koruyucu etkisinin ve karaciğerin rejenerasyon kapasitesine etkisinin, biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ile tespit edilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Deneyde 56 adet 10-12 haftalık Wistar albino türü dişi sıçanlar 4 gruba ayrılarak tüm gruplara %70 hepatektomi modeli uygulandı. Sıçanlar kontrol grubu, düşük doz *I. viscosa* ekstresi verilen grup (200 mg/kg/gün), yüksek doz ekstre verilen grup (400 mg/kg/gün) ve ursodeoksikolik asit (UDCA) verilen grup (15 mg/kg/gün) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Ekstre ve UDCA parsiyel hepatektomi sonrası oral gavaj yoluyla günlük olarak verildi. Grupların yarısına postoperatif 1. günde ve kalan yarısına postoperatif 7. günde rezidü karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra kanda ve karaciğer dokularında belirlenen parametreler saptandı. Deneyin başlangıç günü ölçülen karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı ile; deney gruplarından alınan kan örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), gama glutamiltransferaz (GGT), bilirubinler, malondialdehit (MDA), total oksidatif durum (TOS), total antioksidan durum (TAS) düzeyleri; doku örneklerinde ise MDA, TOS, TAS, Ki-67, mitoz sayısı ve histopatolojik bulgular saptandı ve karşılaştırıldı.

Sonuçlar: Çalışmada kullanılan *I. viscosa* ekstresinin belirlenen dozlarda elde edilen sonuçlarına göre muhtemel hepatoprotektif ve antioksidan etkilerinin olduğu düşünülmele birlikte rejenerasyon kapasitesine anlamlı bir etkisinin olmadığı, ancak *I. viscosa* verilen grupların rejenerasyon oranlarının postoperatif 7. günde diğer gruplara göre oransal olarak daha yüksek olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Inula viscosa*, parsiyel hepatektomi, karaciğer rejenerasyonu

ABSTRACT

EFFECTS OF *INULA VISCOSA* EXTRACT ON LIVER REGENERATION

ABDULKADİR ÇELİK, M.D.

MASTER THESIS

KONYA, 2022

Aim: Using the 70% partial hepatectomy model in rats, it was aimed to determine the hepatoprotective effect of methanolic extract obtained from *Inula viscosa* plants and its effect on the regeneration capacity of the liver by biochemical and histopathological findings.

Material and Method: 56 Wistar albino female rats, 10 weeks old, were divided into 4 groups and 70% hepatectomy model was applied to all groups. The rats were divided into 4 groups as control group, low dose *I. viscosa* extract group (200 mg/kg/d), high dose *I. viscosa* extract group (400 mg/kg/d) and ursodeoxycholic acid (UDCA) group (15 mg/kg/d). Extract and UDCA were given daily by oral gavage after partial hepatectomy. Half of the each group was randomly selected and sacrificed on the postoperative 1st day and remainings on the postoperative 7th day. With the liver weight/body weight ratio; at the 24th hour after partial hepatectomy, when the mitosis rate reaches its maximum, and on the 7th day, when the regeneration is almost completed; alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), gamma glutamyltransferase (GGT), bilirubins, malondialdehyde (MDA), total oxidative status (TOS), and total antioxidant status (TAS) levels were determined in blood samples. In the tissue samples, MDA, TOS, TAS, Ki-67, number of mitosis and histopathological findings were determined and compared.

Results: According to the results obtained in the determined doses, the *I. viscosa* extract used in the study was thought to have possible hepatoprotective and antioxidant effects, but it did not have a significant effect on regeneration capacity, however the regeneration rates of the groups given *I. viscosa* extract were higher than the other groups.

Key Words: *Inula viscosa*, partial hepatectomy, liver regeneration

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karaciğer	2
2.1.1. Anatomi ve Fizyoloji.....	2
2.1.2. Rejenerasyon Kapasitesi	3
2.2. Karaciğer Rejenerasyonu	3
2.2.1. Evreler	3
2.2.2. Rejenerasyona Etki Eden Faktörler	4
2.3. Sıçan (Rat) Karaciğeri.....	5
2.4. Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Modeli	5
2.5. <i>Inula viscosa</i>	5
2.6. Ursodeoksikolik Asit (UDCA).....	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7
3.1. Deney Hayvanları.....	7
3.2. Deney Modeli	7
3.2.1. Anestezi	7
3.2.2. Deney Grupları	8
3.2.3. Cerrahi Teknik.....	8
3.2.4. Deneyin Yapılışı.....	10
3.3. Biyokimyasal İncelemeler	12
3.4. Histopatolojik İncelemeler	15
3.5. <i>I. viscosa</i> Ekstresinin Hazırlanması ve Fitokimyasal Analizi	15

3.6. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	17
4. BULGULAR	17
4.1. Postoperatif 1. Gün.....	17
4.1.1 Biyokimyasal bulgular.....	19
4.1.2 Histopatolojik bulgular.....	22
4.2. Postoperatif 7. Gün.....	23
4.2.1 Biyokimyasal bulgular.....	23
4.2.2 Histopatolojik bulgular.....	27
4.3. <i>I. viscosa</i> Ekstesinin Fitokimyasal Analiz Bulguları.....	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR.....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- ALT : Alanin transaminaz
- AST : Aspartat transaminaz
- Ark : Arkadaşları
- cm : Santimetre
- g : Gram
- GGT : Gama glutamil transferaz
- H grubu : %70 parsiyel hepatektomi sonrası yüksek doz *I. viscosa* ekstraktı verilen grup
- HD : Hidropik dejenerasyon
- L grubu : %70 parsiyel hepatektomi sonrası düşük doz *I. viscosa* ekstraktı verilen grup
- LDH : Laktat dehidrogenaz
- MDA : Malondialdehit
- mg : Miligram
- OSI : Oksidatif stres indeksi
- S grubu : Sadece %70 parsiyel hepatektomi uygulanan grup
- TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa
- TAS : Total antioksidan durum
- TOS : Total oksidatif durum
- U grubu : %70 parsiyel hepatektomi sonrası UDCA verilen grup

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 1:** Cerrahi hazırlığı (sol üst ve üst orta), Orta hat kesisi ile yapılan laparotomi (sağ üst), Karaciğer loblarının tespiti (alttaki resimler)8
- Şekil 2:** Karaciğer ligamanlarının kesilerek sol lateral ve median lobların serbestlenmesi9
- Şekil 3:** Sol lateral lob ve median lob pediküllerinin bağlanarak %70 parsiyel hepatektomi yapılması (sol ve orta), Batının kapatılması (sağ).....9
- Şekil 4:** Sıçanların operasyon öncesi tartılması(sol), Parsiyel hepatektomi piyesleri (orta), Parsiyel hepatektomi piyeslerinin hassas terazi ile tartılması(sağ)10
- Şekil 5:** Sıçanlara oral gavajla ilaç verilmesi11
- Şekil 6:** Postoperatif 1. günde ve 7. günde rezidü karaciğer görüntüleri.....11
- Şekil 7:** Standart fenolik bileşiklerin LC-ESI-MS/MS kromatogramı17
- Şekil 8:** Postoperatif 1. günde rejenerasyon oranları18
- Şekil 9:** Postoperatif 1. günde dokuda ve plazmada TOS, MDA ve OSI değerleri.....21
- Şekil 10:** Postoperatif 7. günde AST ve ALT değerleri.....24
- Şekil 11:** Postoperatif 7. günde dokuda ve plazmada TOS, MDA ve OSI değerleri.....26
- Şekil 12:** Histopatolojik bulgular a: x100 H&E İnflamasyon yok b: x100 H&EHafif inflamasyon c: x100 H&E Orta derecede inflamasyon d-e: x400 H&E Mitozlar (sarı oklar ile işaretlenmiş) f: x40 MTK Fibrozis yok g: x200 MTK Fibrozis ok ile işaretlenmiş mavi boyanan alanlar) h-i: x200 Ki-67 ile pozitif ekspresyon (ok ile işaretlenmiş kahverenkli boyanan hücreler)28
- Şekil 13:** *I. viscosa* bitkisinin metanol ekstresinin LC-ESI-MS/MS kromatogramı.....30

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: Postoperatif 1. günde ölçülen ağırlıklar ve rejenerasyon oranları	18
Tablo 2: Postoperatif 1. gündeki biyokimya değerleri	19
Tablo 3: Postoperatif 1. gündeki dokuda ve plazmada TAS, TOS, MDA ve OSI değerleri.....	20
Tablo 4: Postoperatif 1. gündeki histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular	22
Tablo 5: Postoperatif 7. günde ölçülen ağırlıklar ve rejenerasyon oranları.....	23
Tablo 6: Postoperatif 7. gündeki biyokimya değerleri	24
Tablo 7: Postoperatif 7. gündeki dokuda ve plazmada TAS, TOS, MDA ve OSI değerleri.....	25
Tablo 8: Postoperatif 7. gündeki histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular	27
Tablo 9: <i>I. viscosa</i> ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları.....	29

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer rejenerasyonu, günümüzde halen tamamen anlaşılammış kompleks bir süreçtir. Günümüzde yaygınlaşan karaciğer cerrahileriyle birlikte karaciğerin rejenerasyon mekanizmalarının anlaşılması daha fazla önem kazanmıştır. Karaciğerin gelişmiş yenilenme kapasitesi birçok etken ile kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda cerrahi rezeksiyonlardan sonra karaciğerin hem metabolik fonksiyonlarını korumaya çalıştığı hem de rejenerasyon kapasitesini arttırarak hızlı bir şekilde başlangıç ağırlığına ulaşmaya çalıştığı görülmüştür. Rezeksiyon sonrası yeterli doku kalmaması veya rejenerasyonun yetersiz kalması durumunda karaciğer yetmezliği gelişmektedir (1,2). Bu nedenle karaciğer rezeksiyonu sonrası erken dönemde rejenerasyon kapasitesini etkileyen mekanizmaların aydınlatılması bu süreçteki sonuçların iyileştirilmesinde önem arz etmektedir.

Karaciğer dokusunun cerrahi sonrası hepatoprotektif tedavilerle desteklenmesi, karaciğer cerrahisi sonuçlarını olumlu yönde etkilemektedir. Bazı çalışmalarda *I. viscosa* (*Dittrichia viscosa*, Yapışkan andız otu) bitkisinin karaciğer üzerindeki etkilerinden bahsedilmektedir (3). *Inula* cinsinin ülkemizde de yetişen bir türü olan *I. viscosa* türünün ise yapılan çalışmalarda antioksidan, antiparazitik, antiproliferatif, antineoplastik etkilerinin olduğundan bahsedilmiştir (3–5). Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının tedavisinde kullanılan yurtdışında patentli bir *I. viscosa* ekstresi içeren içecek de mevcuttur. Yurtdışında yapılmış olan bu patent çalışmasında alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığında bu içeceğin kolesterol, trigliseritler, protein C ve MDA (malondialdehit) seviyesindeki artışı ortadan kaldırdığı bulunmuştur (6,7). *Inula* cinsinden diğer türlerin de *I. viscosa* ile benzer fitokimyasallar barındırmakta olduğu ve bunların da hepatoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (8,9). *I. viscosa* ekstraktının hazırlanmasında da zengin fitokimyasal içerik elde etmek amacıyla metanolik ekstrakt hazırlandı (10).

Bu bitkinin, karaciğer rezeksiyonu sonrası karaciğer rejenerasyonuna etkisi ile ilgili in vivo çalışma olmaması nedeniyle bu tez çalışması tasarlandı. Deneysel çalışmada, sıçanlarda karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra, postoperatif dönemde sıçanlara *I. viscosa* ekstraktı verilerek kontrol grupları ile karşılaştırmalı verilerinin elde edilmesi amaçlandı. Bu deney için sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu için parsiyel hepatektomi modeli kullanıldı. Sıçanlarda %70 parsiyel hepatektomi modelinin önemi, rezidü karaciğer dokusunda minimum hücresel hasar ile karaciğer rejenerasyonunu güçlü bir şekilde uyarması ve kolay uygulanabilir olmasıdır (11).

Sonuç olarak tez çalışmasında, sıçanlarda %70 parsiyel hepatektomi modeli kullanılarak, *I. viscosa* bitkisinden elde edilen metanolik ekstrenin karaciğer koruyucu etkisinin ve karaciğerin rejenerasyon kapasitesine etkisinin, biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ile tespit edilmesi amaçlandı. Bu çalışmalardaki veriler ile *I. viscosa* bitkisinin, özellikle karaciğer cerrahisi sonrası etkilerinin de bilinmesi ile yeni kullanım alanlarının doğabileceği öngörüldü. Ülkemizde yetişen *I. viscosa* türünün karaciğer rejenerasyonuna etkisinin araştırılması için yapılmış in vivo bir çalışmaya rastlanmamış olup, bu çalışma kapsamında literatüre bu alanda katkı sağlanmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer yalnızca omurgalılarda bulunan; detoksifikasyon, protein sentezi, sindirim ve büyüme için gerekli biyokimyasal maddelerin sentezi gibi birçok temel biyolojik fonksiyonları gerçekleştiren bir organdır. İnsanlarda karın sağ üst kadranda, diyafram altında bulunur. Çoğunluğu hepatositlerden oluşan ileri derecede özelleşmiş karaciğer dokusunun yüzlerce metabolik fonksiyonu olduğu bilinmektedir (12).

2.1.1. Anatomi ve Fizyoloji

İnsan karaciğeri, kişiden kişiye değişmekle birlikte, ortalama 1,5 kg ağırlığında ve 15 cm genişliğinde bir organdır. Hepatik arter oksijenden zengin kanı karaciğere ulaştırırken, portal ven sindirim kanalından emilen ürünlerden zengin kan ile dalak ve pankreastan gelen kanı karaciğere taşır (13). Bu damarların dalları ve hepatositler karaciğerin lobüler yapısını oluşturur. Lobüller karaciğerin fonksiyonel yapılarıdır. Her lobülde milyonlarca hepatosit bulunur. Karaciğer yapıları, fibröz bir doku olan Glisson kapsülüyle ve buradan uzanan yoğun fibroelastik bağ doku ile bir arada tutulur. Karaciğer morfolojik olarak, sağ ve sol olmak üzere falsiform ligament ile ayrılan iki lobdan oluşmaktadır. Ancak morfolojik ayrım cerrahi anatomi ile örtüşmemektedir. Fonksiyonel olarak safra kesesi yatağı ve vena cava üzerinden geçen hayali çizgi (Rex-Cantlie hattı) ile karaciğer sağ ve sol lob olarak ayrılır. Couinaud tarafından tanımlanan karaciğerin fonksiyonel anatomisinde, hepatic ven dallarına göre ayrılan toplam 4 sektör ve bu sektörlerin portal ven dallarına göre ayrılan toplamda 8 segmenti bulunmaktadır. Her segmentin kendine ait besleyen damarı ve safra drenajı vardır (14).

Karaciğer lobları mikroskopik olarak hepatik lobüllerden oluşmaktadır. Bu lobüller altıgen yapıda olup; merkezinde santral veni, köşelerinde portal triadı ile bunlar arasında uzanan hepatositler ve sinüzoidlerden oluşur. Portal triadda; hepatik arter, portal ven ve safra kanalı bulunur. Sinüzoidleri endotel hücreleri ve fagositik Kupffer hücreleri çevreler (15).

2.1.2. Rejenerasyon Kapasitesi

Karaciğer, rejenerasyon kapasitesi olan, ancak rejenerasyonu uyaran bir durum olmadığı dönemde yavaş yenilenen bir organdır. Sağlıklı bir insan karaciğerinde mitoz görülen hepatosit oranı %0,01'den daha azdır (12). Bu oran karaciğer hasarında veya cerrahi rezeksiyonlarda %3'e kadar çıkabilmektedir. Cerrahi rezeksiyon sonrası toksik materyallerin etkisi ile rejenerasyon uyarılır. Hücre çoğalması periportal alanlarda başlar ve lobüllerin merkezine doğru hücre serileri tekrar şekillenir. Rejenerasyon yanıtı rezidü karaciğer dokusundaki asiner yapıların proliferasyonu ile bağlantılıdır. Rezeksiyonlarda bu durumun sonucunda, çıkartılan lobun restorasyonundan ziyade kalan dokunun hipertrofi ve hiperplazisi görülür.

Karaciğer rezeksiyonu malign veya benign patolojiler nedeniyle gerekebilmektedir. Normal karaciğer, major rezeksiyonları %75 parankim kaybına kadar tolere edebilir. Ancak rezeksiyon planlanırken lezyonun tipi ve yeri, hastanın anatomisi, kalan karaciğer dokusunun hacmi ve kalitesi değerlendirilmelidir. Cerrahi sonrası kalan fonksiyonel karaciğer dokusunun tüm metabolik fonksiyonları yerine getirme ve rejenerasyon kapasitesi, karaciğer rezeksiyonlarının sınırlarını belirler. Bu nedenle karaciğer rejenerasyon mekanizmaları, halen aktif birçok araştırmanın yapıldığı bir alandır (1,16).

2.2. Karaciğer rejenerasyonu

2.2.1 Evreler

Rezeksiyon sonrası rezidü dokudaki hepatositlerde kompensatuar hipertrofi ve ardından hiperplazi görülür. Rezeksiyon sonrası rejenerasyon üç evrede gerçekleşir. Bunlar rezeksiyondan sonra 0-5. saatler arasında başlangıç evresi, 5-144. saatler arasında proliferatif evre ve rejenerasyonun sonlanması şeklinde tanımlanır. Hepatektomi sonrası ilk beş saatte rezeksiyona bağlı hasarın başlattığı sinyal yolağı, sitokinler ve büyüme hormonları aracılığıyla bağışıklık hücrelerinin mobilizasyonunu ve nekrotik dokuları ortadan

kaldırmasını, metabolik süreç değişikliklerini ve karaciğer rejenerasyonunun uyarılmasını sağlar.

Başlangıç fazında sinyal yolağını tetikleyen sebepler yeterince tanımlanamamıştır. Rejenerasyonun uyarılmasında major sebepler olarak hemodinamik değişiklikler, doğal bağışıklığın aktivasyonu, Wnt/beta-catenin ve Notch sinyal yolları öne sürülmektedir. Erken dönemde portal venöz akımın miktarının ve içeriğinin değişmesinin tetikleyici sebep olduğu düşünülmektedir. Artan portal akım hacminin oluşturduğu gerilim, hepatik arterde tampon etkisi ile arteryel akımı azaltır. İlk yarım saatte bu duruma ve doğal bağışıklığın aktivasyonuna bağlı olarak, barsak bakterilerinden kaynaklanan lipopolisakkaritlerin portal dolaşımdaki konsantrasyonunda değişiklikler olur. Bu durum, rezeksiyon sonrası kalan hepatositlere ulaşan büyüme hormonu (HGF, EGF) ve sitokinlerin (NF-KB, TNF, IL-6) artmasına neden olur. Artan portal akım ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) artırır, uPA da ekstraselüler matrikse bağlı HGFyi aktive eder ve HGF reseptör aktivitesini artırır. Gerilime bağlı olarak sinüzoidal endotel hücrelerden salınan nitrik oksit de hepatositlerin HGF duyarlılığını artırır. Tüm bunlar, rezeksiyon sonrası ilk beş saatte hepatositlerin hücre döngüsünde G0'dan G1 fazına geçmesini sağlar. Rezeksiyon sonrası 5. Saatte proliferatif faz başlar. Bu fazda ilk 72 saatte hepatositlerin ve kolanjiyositlerin proliferasyonu görülür. Sonrasında 2-3 gün süren anjiyogenez fazı takip eder. Sonlanma fazında hepatosit proliferasyonunun sınırlandırılmasında Kupffer hücrelerinden salınan TGF-beta gibi antiproliferatif faktörler etkili olsa da bu evre henüz yeterince aydınlatılamamıştır (1,17,18).

2.2.1 Rejenerasyona Etki Eden Faktörler

Parsiyel hepatektomiye yanıt olarak salgılanan faktörler şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Başlatıcı faktörler: Bu faktörler hepatositlerin büyüme faktörlerine yanıtını artırır. TNF ve IL-6 bu faktörlerdendir.
- Büyüme faktörleri: Bu gruptaki HGF, TGF-alfa, EGF gibi büyüme faktörleri hepatositlerin hücre siklusunda S fazına geçişini uyarır.
- Komitojenler: Bunlar büyüme faktörleri gibi mitojenlerin aktivitesini artırarak etki eder. Bunlara insülin ve epinefrin örnek verilebilir.
- İnhibitörler: Bu grupta bulunan activin A ve TGF-beta hepatositlerin büyüme yanıtını devamlı baskılayarak karaciğer rejenerasyonunun düzenlenmesini sağlar.

- İnhibitör baskılayıcılar: İnhibitörlerin aktivitesini kısıtlayarak etki ederler. Follistatin ve LAP (Latency associated peptide) bu grupta sayılabilir (12,19).

2.3. Sıçan (Rat) Karaciğeri

Sıçan karaciğeri vücut ağırlıklarının yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır. Farklı boyutlarda 4 lobdan oluşmaktadır. Bunlar median lob, sol lateral lob, sağ lob ve kaudat lobdur. Sol lob mide fundusu üzerinde yerleşmiştir. Median lob falsiform ligaman ile diyaframa asılıdır ve derin bir yarığı (umblikal fissür) bulunmaktadır. Umblikal fissür median lobu iki kısma ayırır. Sağ lob, inferior vena kava sağında yerleşimlidir ve üst üste binmiş iki kısımdan oluşur. Kaudat lob mide tarafından kaplanmış şekilde diğer loblardan ayrı izlenmektedir. Kaudat lobun parakaval parçası da bulunmaktadır. Sıçanlarda insanlardan farklı olarak safra kesesi bulunmamaktadır (20,21).

2.4. Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Modeli

Sıçanlarda karaciğerin lobüler yapıda olması nedeniyle Higgins ve Anderson tarafından tanımlanan parsiyel hepatektomi modeli çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (11). Bu modelin özelliği, rezidü karaciğer dokusunda hızlı bir şekilde karaciğer rejenerasyonunu uyarmasıdır. Bu nedenle karaciğer rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu modelde sıçan karaciğerinin %70'ini oluşturan median lob ve sol lateral lob ligamanları kesilerek serbestlendikten sonra pediküllerinden bağlanarak rezeksiyonu yapılır.

2.5. *Inula viscosa*

Inula viscosa (Yapışkan andız otu), ülkemizde yetişen ve uzun yıllardır geleneksel olarak tıbbi amaçlarla kullanılan bir bitkidir. Ancak bu türün karaciğer üzerindeki etkileri ile ilgili literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bazı araştırmalarda *Inula* cinsinden diğer türlerin *I. viscosa* ile benzer fitokimyasallar barındırmakta olduğu ve bunların da hepatoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada 3 ayrı bitki türünün metanolik ekstraktının hepatoprotektif etkisi araştırılmış, bu üç farklı tür içerisinde *Inula crithmoides* türünün hepatoprotektif etkisinin en fazla olduğu görülmüştür (8). Bir başka çalışmada da *Inula britannica* türünün hepatoprotektif ve antioksidan özelliklerine dair bulgulara ulaşılmıştır (9).

Inula cinsinin ülkemizde de yetişen bir türü olan *I. viscosa* türünün ise yapılan çalışmalarda hepatoprotektif, antioksidan, antiparazitik, antiproliferatif, antineoplastik etkilerinin olduğundan bahsedilmiştir (4,5). Yaygın geleneksel kullanıma sahip olan bu bitki ile yapılan toksisite çalışmasında renal ve hepatik toksisite göstermemiş, hafif derecede hepatoprotektif etkisinin olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada *I. viscosa* bitkisinin aseton ekstresinin farelerde LD50 (Letal doz) değerinin intraperitoneal uygulamada 829,5 mg/kg saptandığı belirtilmektedir. Ayrıca ratlarda intraperitoneal olarak günlük 80 mg/kg dozda aseton ekstresinin uygulamasının karaciğerde toksik etki göstermediği rapor edilmiştir (3). Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının tedavisinde kullanılan yurtdışında patentli bir *I. viscosa* ekstresi içeren içecek de mevcuttur. Bir başka yurtdışında yapılmış olan patent çalışmasında alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığında bu içeceğin kolesterol, trigliseritler, protein C ve MDA (malondialdehit) seviyesindeki artışı ortadan kaldırdığı bulunmuştur (6,7). Ayrıca, Türkiye’de yetişen *I. viscosa* bitkisinden elde edilen ekstralarının analizinde de tespit edilen karvakrol maddesinin, yapılan bir diğer çalışmada hepatoprotektif ve mitozu uyarıcı etkisinin olduğu yorumunda bulunulmuştur (22,23).

2.6. Ursodeoksikolik asit (UDCA)

Ursodeoksikolik asitin karaciğer hastalıklarında kullanımı Çin geleneksel tıbbına dayanmaktadır. Yetişkin ayıların (Latince ‘ursus’) safirasından elde edilen ‘Yutan’ isimli Çin ilacı eski zamanlardan beri karaciğer hastalıklarında kullanılmaktaydı (24). 1936’da Iwasaki tarafından kimyasal yapısının tanımlanması ve yeterli miktarda sentezinin yapılabilmesi, klinik araştırmalarda kullanımının önünü açmıştır (25).

Yapılan çalışmalarda birçok karaciğer hastalığında güvenli kullanım olanağı ve faydalı etkilerinin olduğu görülmüştür (26). Günümüzde kolestatik karaciğer hastalıklarında klinik pratikte kullanılmaktadır. Ancak etki mekanizmaları halen tam anlamıyla ortaya konulamamıştır. Safra asidi havuzundaki değişiklikler, immünmodülasyon, anti-apoptotik etki, anti-inflamatuar etki gibi farklı yollarla karaciğer üzerinde etki göstermektedir (27).

Safra asitlerinin karaciğer rejenerasyonu için önemini araştıran Ueda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, parsiyel hepatektomi sonrası intestinal safraanın karaciğere ulaşması engellendiğinde karaciğer rejenerasyonunun yeterince olmadığı görülmüştür (28). Bu sonucu takiben yapılan bir in vivo çalışmada artmış safra asidi seviyesinin rejenerasyonu hızlandırdığı, düşük seviyelerde safra asidinin rejenerasyonu azalttığı bildirilmiştir (29).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deney hayvanları yerel etik kurulu (HADYEK) tarafından 31.12.2021 tarihinde incelenmiş olup, etik kurul yönergelerine uygun görülüp 2021-061 onay numarası ile etik kurul onayı alındı. HADYEK onayı alındıktan sonra deneysel çalışmalara başlandı. Bu tez çalışmasının deneysel aşamaları Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deneysel çalışma için Wistar-Albino cinsi yetişkin dişi ratlar KONÜDAM'dan temin edildi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma için 56 adet 120-200 gram ağırlığında 2 aylık Wistar-Albino cinsi dişi ratlar tercih edildi. Ratlar her kafeste 4 adet sıçan olacak şekilde, sabit sıcaklık (22 ± 2 °C), nem (%51) ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne sahip bir ortamda barındırıldı. Tüm hayvanların beslenmesi ve su ihtiyaçları ad libitum olarak sağlandı.

3.2. Deney modeli

Deneyde Higgins ve Anderson tarafından tarif edilen sıçanlarda %70 parsiyel hepatektomi modeli kullanıldı (11). Karaciğer rejenerasyon hızı Kwon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tarif ettikleri formülle hesaplandı (30). Bu formüle göre karaciğer rejenerasyon hızı şu şekilde hesaplanmaktadır:

Karaciğer rejenerasyon hızı (%) = (Sakrifikasyon günü karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı) / (parsiyel hepatektomi öncesi hesaplanan karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı) * 100

Parsiyel hepatektomi öncesi hesaplanan toplam karaciğer ağırlığı, %70 parsiyel hepatektomi ile çıkartılan karaciğer dokusunun ağırlığı ölçüldükten sonra hesaplanmaktadır.

3.2.1. Anestezi

Deneyden 12 saat önce tüm sıçanlar aç bırakıldı. İşlem öncesi ratlara anestezik olarak ketamin (Ketalar, Pfizer ilaçları Ltd. şirketi, İstanbul, Türkiye) 90 mg/kg, ksilazin (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) 10 mg/kg intramüsküler uygulandı.

3.2.2. Deney grupları

Sıçanlar 1'den 56'ya kadar rastgele numaralandırıldıktan sonra kontrol grubunda 8, diğer gruplarda 16'şar sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplardaki sıçanlara başlangıç günü genel anestezi altında laparotomi ve %70 parsiyel hepatektomi uygulandı. Gruplar şu şekilde belirlendi:

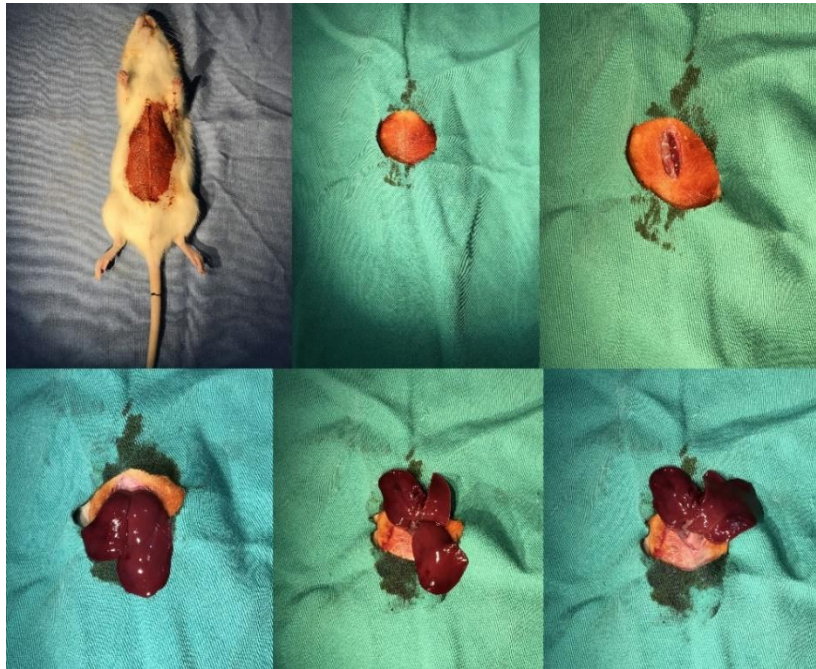
S grubu (n=8); Yalnızca %70 hepatektomi uygulanan kontrol grubu

L grubu (n=16); %70 hepatektomi sonrası günlük oral gavajla düşük doz (200 mg/kg/gün) *I. viscosa* ekstraktı verilen grup

H grubu (n=16); %70 hepatektomi sonrası günlük oral gavajla yüksek doz *I. viscosa* ekstraktı verilen grup (400 mg/kg/gün)

U grubu (n=16); %70 hepatektomi sonrası günlük oral gavajla UDCA verilen grup (15 mg/kg/gün)

3.2.3. Cerrahi Teknik

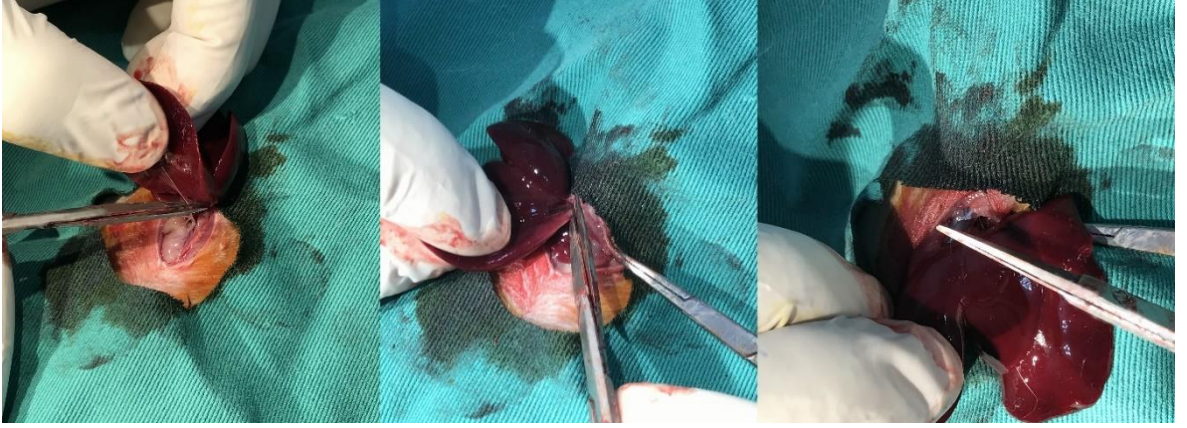


Şekil 1 Cerrahi hazırlığı (sol üst ve üst orta), Orta hat kesisi ile yapılan laparotomi (sağ üst), Karaciğer loblarının tespiti (alttaki resimler)

Sıçanlar anestezi altında, supin pozisyonda operasyon masasına tespit edildi. Operasyon alanı traş edildi ve povidon iyot ile antisepsi uygulandı. Ksifoidden başlanarak yapılan 3 cm'lik batın orta hat kesisi ile batına girildi (Şekil 1).

Karaciğerin falsiform ligamanı ve segmentler arası ligamanları serbestlendikten sonra median lob ve sol lateral lob pedikülleri ortaya kondu (Şekil 2).

Pediküller 3/0 ipekle bağlandıktan sonra rezeksiyon yapıldı (11). Kanama kontrolü sonrası batın içerisi az miktarda serum fizyolojik ile yıkandı. Batın 3/0 prolenle devamlı kapatılarak operasyon sonlandırıldı (Şekil 3).



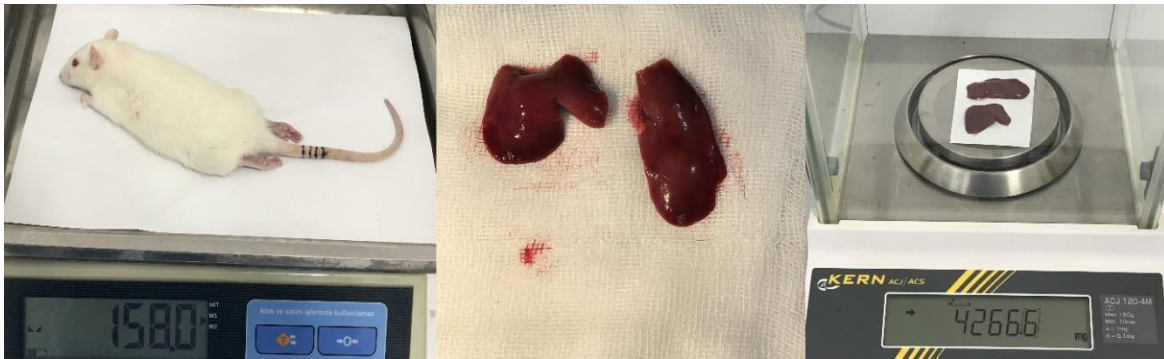
Şekil 2 Karaciğer ligamanlarının kesilerek sol lateral ve median lobların serbestlenmesi



Şekil 3 Sol lateral lob ve median lob pediküllerinin bağlanarak %70 parsiyel hepatektomi yapılması (sol ve orta), Batının kapatılması (sağ)

3.2.4. Deneyin yapılışı

Tüm sıçanlar deney başlangıcından 12 saat öncesinden itibaren aç bırakıldı. Sıçanlar gruplara rastgele ayrılarak deneyin başlangıç günü vücut ağırlıkları tartıldı. Başlangıç günü (0.gün) tüm sıçanlara genel anestezi uygulandıktan sonra operasyon yapıldı. Operasyonda rezeke edilen karaciğer dokusunun ağırlığı hassas terazide tartılarak doku formalin çözeltisi içerisinde korundu (Şekil 4).



Şekil 4 Sıçanların operasyon öncesi tartılması(sol), Parsiyel hepatektomi piyesleri (orta), Parsiyel hepatektomi piyeslerinin hassas terazi ile tartılması(sağ)

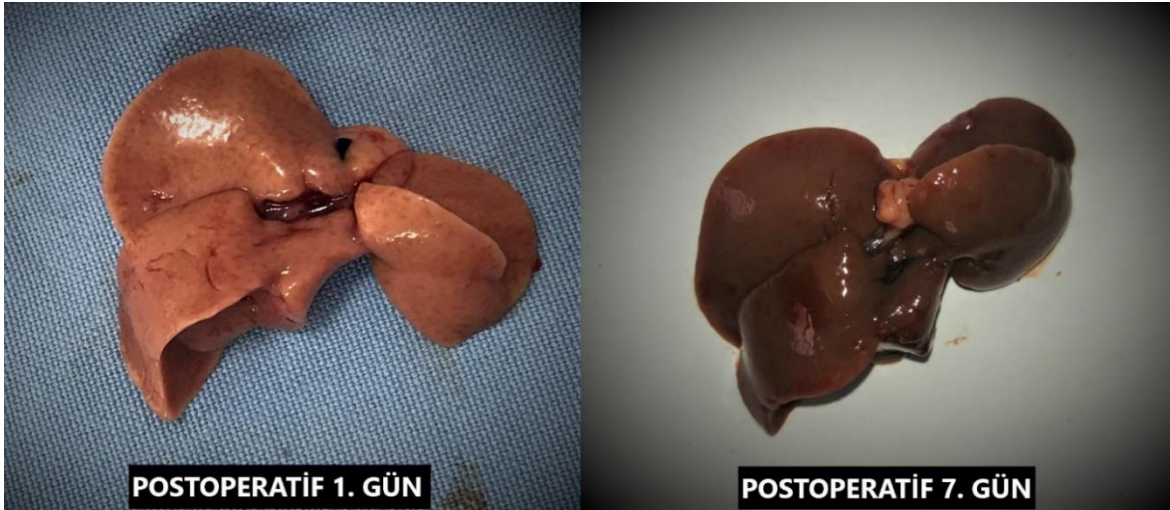
Postoperatif 8. saatte deney gruplarına göre, oral gavaj ile her sıçan için ayrı ayrı belirlenen dozlarda ekstrakt veya UDCA verildi (Şekil 5). Kontrol grubuna ekstrakt veya UDCA verilmedi.

Postoperatif 24. saatte tüm gruplardaki sıçanların yarısı rastgele seçilerek anestezi altında tekrar laparotomi yapıldı. Grupların kalan yarısına postoperatif 1. günden postoperatif 6. güne kadar, grubuna göre oral gavaj ile ekstrakt veya UDCA verildi. Kontrol grubuna bu süreçte ekstrakt veya UDCA verilmedi. Postoperatif 7. günde, tüm sıçanlar 12 saat öncesinden aç bırakıldı ve tüm sıçanlara genel anestezi altında tekrar laparotomi yapıldı. Deney boyunca mortalite olmadı. Üç sıçanda insizyonel herni geliştiği görüldü.

Postoperatif 1. ve 7. günlerde sakrifiye edilecek olan sıçanlardan sakrifikasyon öncesi kardiyak ponksiyonla kan alınarak EDTAlı tüplere aktarıldı ve tüpler derhal buzdolabına yerleştirildi. Sonrasında laparotomi yapılarak rezidü karaciğer dokusunun rezeksiyonu için karaciğer etrafındaki ligamanları serbestlendi. Parakaval karaciğer dokusunun sınırlarından vena kava kesildi ve karaciğer dokusu dışarı alındı (Şekil 6).



Şekil 5 Sıçanlara oral gavajla ilaç verilmesi



Şekil 6 Postoperatif 1. günde ve 7. günde rezidü karaciğer görünümleri

Tekrar kardiyak ponksiyon yapılarak sıçanlar sakrifiye edildi. Çıkarılan rezidü karaciğer dokuları kalibrasyonu yapılmış olan Kern ACJ 120-4M hassas terazide (Kern Elektronik, Ankara, Türkiye) tartıldı. Ağırlıkları not edildikten sonra biyokimyasal testler için yaklaşık 5 mm³ hacminde karaciğer dokusu kesilerek serum fizyolojik içerisinde -80 derece dolabına yerleştirildi. Kalan rezidü karaciğer dokusu %10'luk formalin solüsyonu içerisinde korundu. Sakrifikasyonlar tamamlandıktan sonra kan numuneleri aynı gün buzdolabından alınarak santrifüj edildi ve plazma örnekleri vakit kaybetmeden -80 derece dolabına aktarıldı.

3.3. Biyokimyasal İncelemeler

Çalışmada sıçan venöz kan örnekleri potasyum EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kan örnekleri Hettich Rotina 46R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) marka soğutmalı santrifüj cihazında 4 °C, 1.000 g hızda ve 10 dakika süreyle santrifüj edilerek plazma örnekleri ayrıldı. Total Oksidan Kapasite, Total Antioksidan Kapasite, MDA, ALT, AST, LDH ve Total Bilirubin analizleri çalışılncaya kadar plazma örnekleri -80 °C' de New Brunswick U570 (New Brunswick Scientific, New Jersey, ABD) buzdolabında saklandı. Sıçan karaciğer örnekleri soğuk %0,9 NaCl içerisine alındı. Doku örnekleri Total Oksidan Kapasite, Total Antioksidan Kapasite, MDA ve doku protein analizleri çalışılncaya kadar New Brunswick U570 (New Brunswick Scientific, New Jersey, ABD) buzdolabında -80 °C' de saklandı.

Çalışmada, plazma ve karaciğer doku örneklerindeki testlerin analizleri Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

Çözdürülen karaciğer doku örnekleri tartılarak 10 kat (w/v) soğuk fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.2) içerisinde mekanik homojenizatör (Ika T10 basic ultra-turrax, Almanya) ve ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) kullanılarak buz içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar Hettich Rotina 46R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) marka soğutmalı santrifüj cihazında 4°C ve 10.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Doku analizleri süpernatantlarda yapıldı.

Plazma Total Oksidan Kapasite düzeyinin ölçümü için Rel Assay TOS (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanıldı. Ölçümün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyon dönüşümüne sağlanması ve bunun

da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Total Oksidan Kapasite düzeyleri üretici talimatlarına uygun olarak 530 nm de Bio-rad Mikroplate absorbans okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, Kalifornia, ABD) sistemi kullanılarak absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre Total Oksidan Kapasite sonuçları “ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L” olarak hesaplandı.

Doku Total Oksidan Kapasite düzeyinin ölçümü için Rel Assay TOS (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanıldı. Ölçümün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyon dönüşümüne sağlanması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Total Oksidan Kapasite düzeyleri üretici talimatlarına uygun olarak 530 nm de Bio-rad Mikroplate absorbans okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, Kalifornia, ABD) sistemi kullanılarak absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre Total Oksidan Kapasite sonuçları “ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/mg protein” olarak hesaplandı.

Plazma Total Antioksidan Kapasite düzeyinin ölçümü için Rel Assay TAS (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanıldı. Ölçümün prensibi örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi- yeşil 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbansındaki değişiklik, onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır. Total antioksidan Kapasite düzeyleri üretici talimatlarına uygun olarak 660 nm de Bio-rad Mikroplate absorbans okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, Kalifornia, ABD) sistemi kullanılarak absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre Total Antioksidan Kapasite sonuçları “mmol Trolox Equivalent/L” olarak hesaplandı.

Doku Total Antioksidan Kapasite düzeyinin ölçümü için Rel Assay TAS (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanıldı. Ölçümün prensibi örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi- yeşil 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin absorbansındaki değişiklik, onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır. Total antioksidan Kapasite düzeyleri üretici talimatlarına uygun olarak 660 nm de Bio-rad Mikroplate absorbans okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, Kalifornia, ABD) sistemi kullanılarak

absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre Total Antioksidan Kapasite sonuçları “mmol Trolox Equivalent/ mg protein” olarak hesaplandı.

Oksidatif Stres İndeksi, oksidatif stres düzeyinin bir diğer göstergesi hesapla elde edilen değerdir. Bu indeks TAS ve TOS değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$OSİ = TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv/L}) / TAS (\mu\text{mol Trolox Eqv/L}) \times 100$$

Plazma Malondialdehid (MDA) düzeyleri tıbbi biyokimya laboratuvarında manuel olarak çalışıldı. MDA düzeyinin ölçümü için LPO Assay (Oxford Biomedical Research, Missouri, ABD) kiti kullanıldı. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA, asidik ve alkali ortamda ısıtılarak serbestleştirildi. İki molekül N-metil-2- fenilindol ile bir molekül MDA reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluştu. MDA düzeyleri üretici talimatlarına uygun olarak 586 nm de Bio-rad Mikroplate absorbans okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, Kalifornia, ABD) sistemi kullanılarak absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre MDA sonuçları “nmol/mL” olarak hesaplandı.

Doku MDA düzeyinin ölçümü için LPO Assay (Oxford Biomedical Research, Missouri, ABD) kiti kullanıldı. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA, asidik ve alkali ortamda ısıtılarak serbestleştirildi. İki molekül N-metil-2- fenilindol ile bir molekül MDA reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluştu. MDA düzeyleri üretici talimatlarına uygun olarak 586 nm de Bio-rad Mikroplate absorbans okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, Kalifornia, ABD) sistemi kullanılarak absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre MDA sonuçları “nmol/mg protein” olarak hesaplandı.

Doku protein düzeyleri Pierce bicinchoninic acid-BCA (Thermo Scientific, Illinois, ABD) kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü.

Plazma örneklerinde ALT, AST, LDH ve Total Bilirubin düzeyleri Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya rutin laboratuvarında, Roche Cobas c702 rutin biyokimya otoanalizöründe (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Almanya) Roche Diagnostics firmasının orijinal kit, kalibratör ve kontrolleri kullanılarak ölçüldü. Plazma örneklerinde ALT, AST ve LDH aktiviteleri IU/L olarak hesaplandı. Plazma örneklerinde total bilirubin düzeyleri mg/dL olarak hesaplandı.

3.4. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik incelemeler Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarında yapıldı. Alınan doku örnekleri %10'luk formaldehitte tespit edildi. Makroskopik olarak karaciğerden diseke edilen doku örnekleri rutin doku takibine alındı. Parafin bloklara gömülen örneklerden Hematoksilen&Eozin, KI-67 ve MassonTrikrom (MTK) boyamalar için 4-5 mikronluk kesitler alındı. Kesilen lamlara Dako Omnis (Agilent Technologies, Kalifornia, ABD) cihazında EDTA inkübasyonu sonrasında, Ki-67 (DAKO-Clone-MIB-1) boyama protokolü uygulandı. Artisan Link Pro model DAKO otomatik Histokimya cihazında MassonTrikrom boyama protokolü uygulandı. H&E, immünohistokimyasal ve histokimyasal boyalı lamlar; Olympus BX46 (Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda uzman patolog tarafından değerlendirildi.

Işık mikroskopisinde; H&E boyalı lamlarda 10 BBA da mitoz sayısı, steatoz, İltihabi hücre yoğunluğu, hidropik dejenerasyon (HD) ve MTK boyalı lamlarda periportal ve perisentral fibrozis değerlendirildi. Ki-67 boyamada; nükleer olarak pozitif boyanan hücrelerin hot spot olarak yüzdesi verildi.

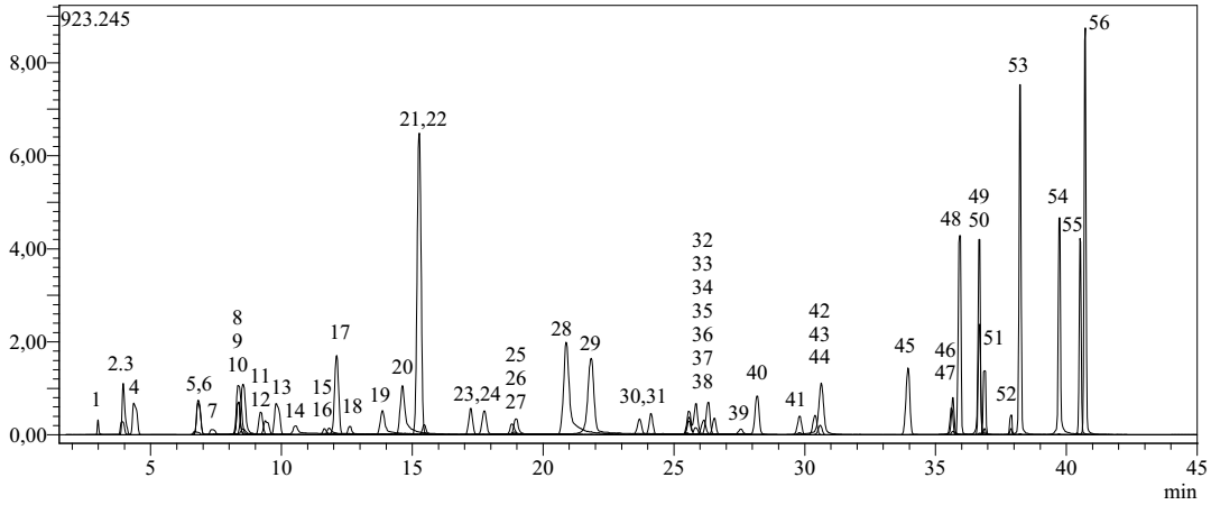
3.5. *I. viscosa* Ekstresinin Hazırlanması ve Fitokimyasal Analizi

I. viscosa bitkisinin toprak üstü kısmı, doğal olarak yetiştiği Manisa-Akhisar bölgesinden 01.06.2013'te, köklerine zarar vermeden deneysel çalışmalar için toplandı. Keskin kokuya sahip olan bitki kurutulduktan sonra aynı tazeliğini koruması için kuru ve soğuk depoda saklandı. Bitki türünün teşhisi Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde öğretim üyesi olan Prof. Dr. Hayri DUMAN tarafından yapıldı. Toplanan bitki materyalinden bir herbaryum örneği hazırlanarak saklanması için, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Herbaryumu'na (GAZI) bırakıldı (F. Ayaz 01). Literatürde benzer türlerde yapılan çalışmalara göre etanol, metanol veya sulu ekstrelerin hazırlandığı görüldü (8,31,32). Zengin fitokimyasal içeriğin elde edilmesi ve yapılacak deneylerde etkinliğin görülebilmesi için suya göre daha polar olan metanol çözücüsü tercih edildi (10). *I. viscosa* bitkisinin toprak üstü kısmı, gölge ve havadar bir ortamda kurutuldu ve ardından öğütücü yardımı ile toz edildi. Zengin fitokimyasal içeriğin elde edilmesi ve yapılacak deneylerde etkinliğin görülebilmesi için metanol ile ekstre hazırlandı. Toz edilmiş bitki materyali tartılarak (210 g) cam bir kap içerisine alındı ve üzerine metanol çözücüsü ilave edildi. Karışım çalkalayıcı kullanılarak maserasyona bırakıldı. Süzme işleminin ardından kalan posaya birkaç defa daha

metanol çözücüsünden ilave edilerek aynı işlemler tekrarlandı. Toplamda 9 L metanol kullanıldı. Tüm süzüntüler birleştirilerek evaporatör yardımıyla alçak basınçta 40°C'yi geçmeyecek sıcaklıkta yoğunlaştırma işlemi yapılarak kuruluğa kadar uçuruldu. Kalan kuru bakiye çözdürülerek uygun bir cam kaba aktararak su banyosunda yoğunlaştırılmış ve kuru ekstre (46,9784 g, %22,37 verim) elde edildi. Kuru ekstre deneysel çalışmalar yapılana kadar buzdolabının dondurucu kısmında saklandı. Deney hayvanları ile çalışma yapılacağına kuru ekstrenin sulu çözeltisi sodyum karboksi metil selüloz (%0,5) ile süspande edilerek hazırlandı.

I. viscosa bitkisinden elde edilen metanollü ekstrenin kantitatif olarak fitokimyasal analizini gerçekleştirmek için bir kütle spektrometresi ile birleştirilmiş (Shimadzu-Nexera) Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC) kullanıldı. Ters faz-UHPLC sistemi, bir otomatik numune alıcı (SIL-30AC), bir kolon fırını (CTO-10ASvp), ikili pompalar (LC-30AD) ve bir degazer (DGU-20A3R modeli) hattından oluşmaktadır. Analizde 53 adet fitokimyasal için optimum ayırım elde etmek için kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Optimum koşullar belirlenerek kromatografik ayırmda analitik kolon ters faz-Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mmx2,1 mm, 2,7 µm) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. Gradient elüsyon ile yapılan ayırmda, solvent A (su+5 mM amonyum format+%0,1 formik asit) ve solvent B (metanol+5 mM amonyum format+%0,1 formik asit) için uygulanan profil %20-100 B (0-25 dakika), % 100 B (25-35 dakika) ve %20 B (35-45 dakika) şeklindedir. Ayrıca solvent akış hızı 0,5 mL/dk uygulanmış, enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir.

LC-ESI-MS/MS analizi için UHPLC'ye bağlı kütle spektrometresi hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modlarında çalışan bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile donatılmış bir tandem kütle spektrometresi (Shimadzu LCMS-8040) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler LabSolutions yazılımı (Shimadzu) kullanılarak sunuldu. Fitokimyasalların miktar tayininde MRM (çoklu reaksiyon izleme) modu kullanıldı ve belirtilen öncü fitokimyasal fragmentlerden iyon geçişlerinin taranmasına dayalı olarak bileşiklerin seçici olarak saptanması ve ölçülmesi için yöntem optimize edildi (Şekil 7) (33).



Şekil 7 Standart fenolik bileşiklerin LC-ESI-MS/MS kromatogramı

3.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

Sürekli değişkenler median (minimum-maksimum) olarak verildi. Normalite ve homojenite varsayım testleri için sırasıyla Shapiro-Wilk ve Barlett testleri kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren homojen dağılan sürekli verilerin karşılaştırılmasında Fisher one-way ANOVA, homojen dağılmayan verilerin karşılaştırılmasında Welch one-way ANOVA, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Kategorik değişken içeren grupların karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi. İstatistiksel testler SPSS 28.0 sürüm istatistik paket programı kullanılarak yapıldı (34).

4. BULGULAR

Deney gruplarının postoperatif 1. gündeki ve postoperatif 7. gündeki bulguları ayrı ayrı karşılaştırıldı. Bu bulgular karaciğer ağırlıkları ve rejenerasyon oranları, biyokimyasal bulgular ve histopatolojik bulgular olarak incelendi.

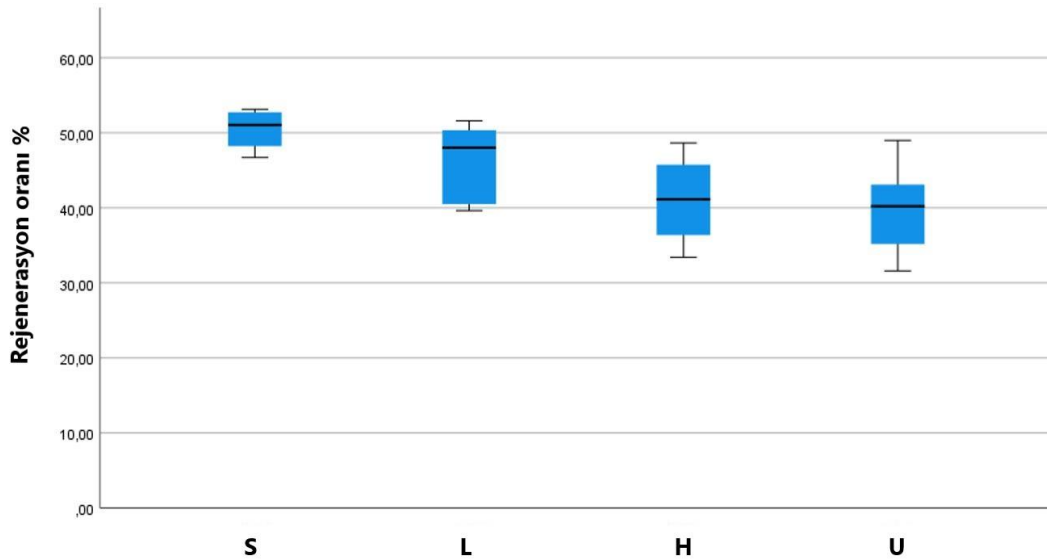
4.1. Postoperatif 1. Gün

Vücut ağırlığı ve hesaplanan pre-op karaciğer ağırlığı açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 1).

Tablo 1 Postoperatif 1. günde ölçülen ağırlıklar ve rejenerasyon oranları

	S	L	H	U	p
Vücut Ağırlığı	156 (141-170)	146,2 (131-165)	151,8 (120-172)	151,6 (133-190)	0.81*
Hesaplanan Preoperatif Karaciğer Ağırlığı	8728,5 (7358-9652)	8056,1 (6450-9444)	8451,6 (7320-9537)	7961,6 (5974-9925)	0.608*
Rezidü Karaciğer Ağırlığı	4400,8 (3851-4851)	3689,9 (2977-4523)	3453,9 (2704-4119)	3135 (2180-3767)	0,002*
Rejenerasyon Oranı	50,5 (46,72-53,13)	46,1 (39,63-51,62)	41,1 (33,42-48,64)	39,7 (31,59-48,98)	0,007*

*Fisher's ANOVA



Şekil 8 Postoperatif 1. günde rejenerasyon oranları

Rezidüel karaciğer ağırlığının gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p=0,002$). S grubu, H grubundan ($p=0,018$) ve U grubundan ($p=0,001$) yüksek saptandı. Diğer ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark saptanmadı.

Rejenerasyon oranının gruplar arasında anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p=0,007$). İkili karşılaştırmalarda S grubu istatistiksel olarak anlamlı şekilde H grubundan ($p=0,031$) ve U grubundan ($p=0,011$) yüksek saptandı. Diğer ikili karşılaştırmalarda fark görülmedi (Şekil 8).

4.1.1. Biyokimyasal bulgular

ALT, TAS ve dokuda TAS açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 2 ve 3).

AST düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,004$). İkili karşılaştırmalarda L grubu H grubundan daha düşük ($p=0,012$) saptandı. S grubunda H grubundan anlamlı düşüktü ($p=0,011$), ancak L ($p=0,98$) ve U ($p=0,366$) grupları ile arasındaki fark anlamlı değildi.

Tablo 2 Postoperatif 1. gündeki biyokimya değerleri

	S	L	H	U	p
ALT	141,3 (104-166)	144,3 (63-415)	215 (161-401)	140 (51-244)	0,087***
AST	202 (173-259)	212,9 (99-293)	325,3 (261-420)	254,9 (151-390)	0,004*
Total Bilirubin	0,31 (0,21-0,40)	0,245 (0,15-0,30)	0,35 (0,29-0,45)	0,29 (0,20-0,32)	0,009*
GGT	57,2 (50-64)	67,1 (60-72)	95,9 (89-104)	86,5 (85-89)	<0.001**
LDH	314,5 (244-395)	356,3 (235-420)	489,3 (424-575)	463,9 (345-510)	<0.001*

*Fisher's ANOVA, **Welch's ANOVA, ***Kruskal-Wallis test

Total bilirubin düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu görüldü ($p=0,009$). İkili karşılaştırmalarda sadece L grubu istatistiksel olarak H grubundan anlamlı düşüktü ($p=0,005$).

GGT düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p<0,001$). İkili karşılaştırmalarda L grubu H ve U grubundan istatistiksel olarak anlamlı düşüktü ($p<0,001$). U grubu da H grubundan anlamlı düşük saptandı ($p=0,011$).

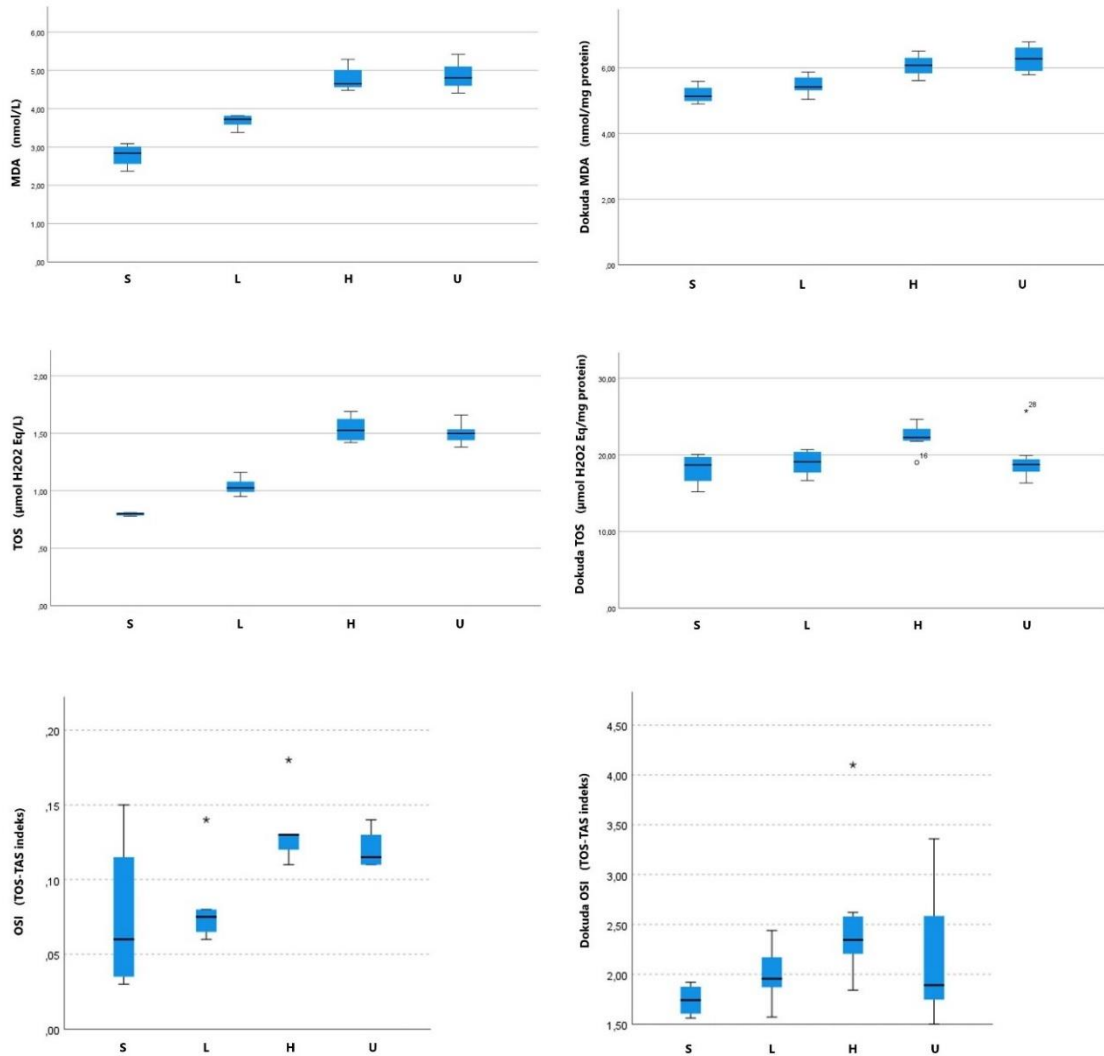
Tablo 3 Postoperatif 1. gündeki dokuda ve plazmada TAS, TOS, MDA ve OSI değerleri

	S	L	H	U	p
TAS	1,57 (0,51-2,56)	1,41 (0,72-1,89)	1,20 (0,84-1,37)	1,26 (0,98-1,41)	0,201***
TOS	0,798 (0,78-0,81)	1,038 (0,95-1,16)	1,536 (1,42-1,69)	1,499 (1,38-1,66)	<0,001**
OSI	0,075 (0,03-0,15)	0,080 (0,06-0,14)	0,131 (0,11-0,18)	0,120 (0,11-0,14)	0,016***
MDA	2,79 (2,37-3,09)	3,68 (3,38-3,82)	4,78 (4,48-5,29)	4,86 (4,41-5,42)	<0,001*
Dokuda TAS	1,05 (0,83-1,17)	0,96 (0,73-1,11)	0,92 (0,55-1,03)	0,93 (0,70-1,09)	0,413***
Dokuda TOS	18,17 (15,21-20,07)	18,97 (16,66-20,70)	22,35 (19,02-24,65)	19,26 (16,33-25,74)	0,006*
Dokuda OSI	1,74 (1,56-1,92)	2 (1,57-2,44)	2,53 (1,84-4,10)	2,16 (1,50-3,36)	0,046***
Dokuda MDA	5,19 (4,9 - 5,59)	5,47 (5,04-5,87)	6,07 (5,61-6,51)	6,27 (5,79-6,79)	<0,001*

*Fisher's ANOVA, **Welch's ANOVA, ***Kruskal-Wallis test

Grupların LDH düzeylerinin anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p=0,009$). İkili karşılaştırmalarda S grubu H grubundan ortalama 175 ($p<0,001$) ve U grubundan ortalama 149,4 ($p=0,002$) düşük saptandı. L grubu istatistiksel olarak anlamlı şekilde H grubundan ortalama 133 ($p<0,001$) ve U grubundan 107,6 ($p=0,008$) düşük saptandı.

TOS düzeylerinde gruplar arasında fark saptandı ($p<0,001$). İkili karşılaştırmalarda L grubu istatistiksel olarak H ve U grubundan anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$). S grubu da U, H ve L gruplarından sırasıyla ortalama 0,7 ($p<0,001$), 0,74 ($p<0,001$) ve 0,24 ($p<0,001$) kadar daha düşük bulundu (Tablo 3).



Şekil 9 Postoperatif 1. günde dokuda ve plazmada TOS, MDA ve OSI değerleri

MDA düzeylerinde gruplar arasında fark olduğu görüldü ($p<0,001$). L grubu, H ve U grubundan anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$). S grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi (Tablo 3) (Şekil 9).

OSI (Oksidatif stres indeksi) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi ($p=0,016$). İkili karşılaştırmalarda L ile H grupları ($p=0,005$) ve L ile U grupları ($p=0,032$) ve S ve H grupları ($p=0,037$) arasında anlamlı fark saptandı.

Dokuda TOS düzeylerinin gruplar arasında anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p=0,006$). S grubu H grubundan ($p=0,016$), L grubu H grubundan ($p=0,018$) ve U grubu da H grubundan ($p=0,033$) istatistiksel olarak anlamlı düşüktü.

Dokuda MDA düzeylerinde gruplar arasında fark olduğu görüldü ($p<0,001$). S grubu anlamlı şekilde H ve U grubundan ($p=0,001$) düşük saptandı. L grubu istatistiksel olarak anlamlı şekilde H grubundan ($p=0,007$) ve U grubundan ($p<0,001$) düşüktü.

Dokuda OSI açısından gruplar arasında farklı olduğu görüldü ($p=0,046$). İkili karşılaştırmalarda S ile H grupları arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0,006$).

4.1.2. Histopatolojik bulgular

Tablo 4 Postoperatif 1. gündeki histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular

	S	L	H	U	p
Mitoz	10,25 (5-14)	7,125 (0-21)	1,125 (0-7)	1,625 (0-10)	0,015****
Ki-67	%0	%0	%25 (n=2)	%25 (n=2)	0,321****
İnflamasyon	%75 (n=3)	%37,5 (n=3)	%62,5 (n=5)	%50 (n=4)	0,601****
Hidropik dejenerasyon	%100 (n=4)	%75 (n=6)	%62,5 (n=5)	%87,5 (n=7)	0,431****
Fibrozis	%0	%50 (n=4)	%50 (n=4)	%12,5 (n=1)	0,13****

Kruskal-Wallis test, *Ki-kare test

Kİ-67, inflamasyon, hidropik dejenerasyon ve fibrozis açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4). Mitoz açısından gruplar arasında farklılık saptandı (p=0,015). İkili karşılaştırmalarda S ile H grupları (p=0,011), S ve U grupları (p=0,008), L ve U grupları (p=0,047) arasında anlamlı fark saptandı.

4.2. Postoperatif 7. Gün

Vücut ağırlığı, hesaplanan preoperatif karaciğer ağırlığı, rezidü karaciğer ağırlığı ve rejenerasyon oranı açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 5).

Tablo 5 Postoperatif 7. günde ölçülen ağırlıklar ve rejenerasyon oranları

	S	L	H	U	p
Vücut Ağırlığı	157,75 (138-169)	144,88 (134-156)	150,75 (129-195)	149,5 (137- 165)	0,361*
Hesaplanan Preoperatif Karaciğer Ağırlığı	9096 (8098- 9481)	8205,3 (6552- 9424)	7816,6 (7195- 9194)	8490,1 (7400- 9418)	0,083**
Rezidü Karaciğer Ağırlığı	7092,3 (6500- 7402)	6765,1 (5704- 7765)	6764,6 (5280- 8007)	6850,8 (6325- 7965)	0,878**
Rejenerasyon Oranı	78 (77,5- 78,6)	84,5 (82,5- 85,5)	91,1(83,8- 94,5)	81,8 (73,3- 85,2)	0,136*

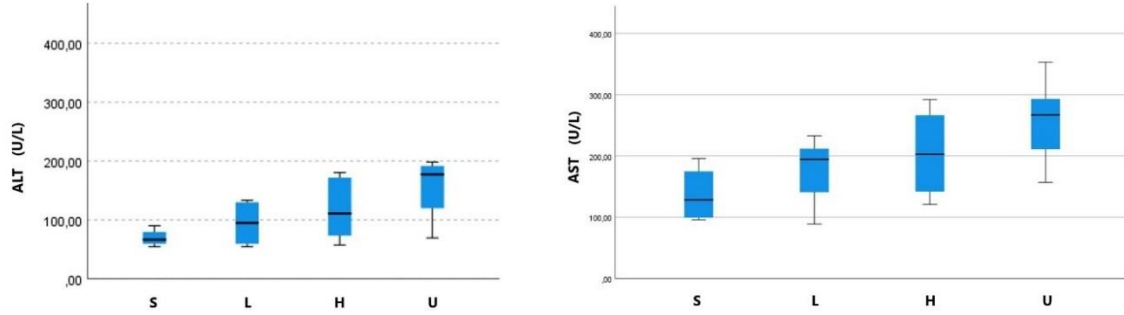
*Kruskal-Wallis test, **Fisher's ANOVA

4.2.1. Biyokimyasal bulgular

LDH, TAS ve dokuda TAS açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 6 ve 7).

ALT açısından gruplar arasında fark olduğu görüldü ($p=0,021$). L ve U grupları ($p=0,012$) ile S ve U grupları arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0,007$) (Şekil 10).

AST düzeylerinin anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p=0,001$). L grubu U grubundan anlamlı düşüktü ($p=0,06$). S grubunun U ($p=0,011$) ve H ($p=0,009$) grupları ile ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ($p=0,747$).



Şekil 10 Postoperatif 7. günde AST ve ALT değerleri

Tablo 6 Postoperatif 7. gündeki biyokimya değerleri

	S	L	H	U	p
ALT	69 (54-90)	94,1 (54-133)	118,4 (57-180)	200,1 (69-556)	0,021*
AST	137,3 (96-196)	177,1 (89-233)	204,5 (121-292)	256,5 (157-353)	0,015**
Total Bilirubin	0,20 (0,15-0,29)	0,25 (0,20-0,35)	0,25 (0,20-0,32)	0,30 (0,25-0,35)	0,033*
GGT	55 (50-60)	66 (60-73)	91,9 (82-103)	86 (76-95)	<0,001**
LDH	333,8 (201-476)	396,9 (240-585)	401,8 (295-520)	458,4 (330-535)	0,185**

*Kruskal-Wallis test, **Fisher's ANOVA

Total bilirubin açısından gruplar arasında fark saptandı (p=0,033). İkili karşılaştırmalarda S grubu U grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (p=0,005).

GGT düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu görüldü (p<0,001). L grubu, H ve U grubundan anlamlı düşük bulundu (p<0,001). S grubu ile U ve H grupları arasında istatistiksel olarak fark saptandı (p<0,001), L grubundan da istatistiksel olarak anlamlı olmayan ancak kaydedeğer bir düşüklük saptandı (p=0,051).

TOS düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu görüldü (p<0,001). L grubu, H ve U gruplarından anlamlı düşük bulundu (p<0,001). S grubu ile U, H ve L grupları arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (p<0,001).

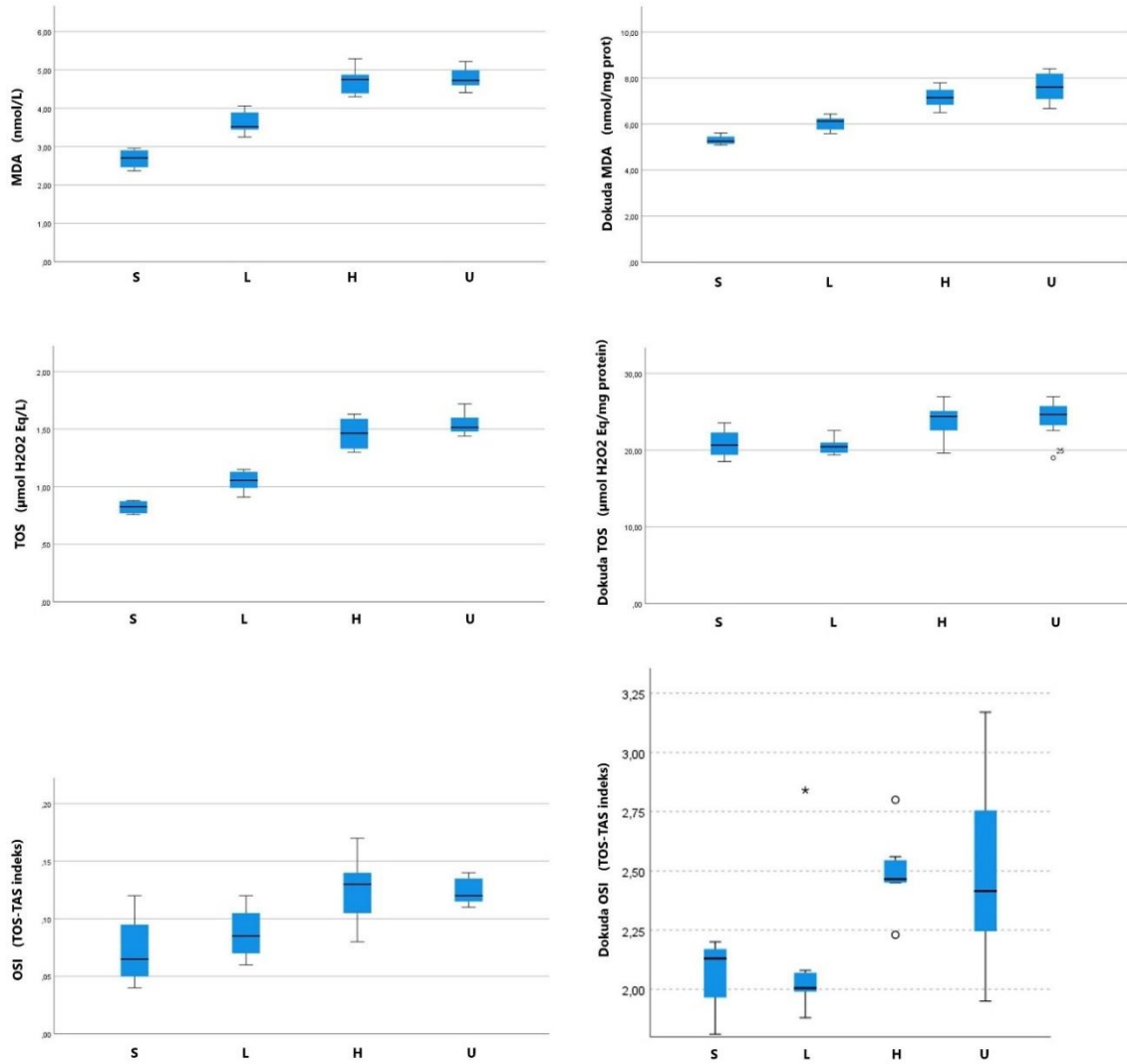
Tablo 7 Postoperatif 7. gündeki dokuda ve plazmada TAS, TOS, MDA ve OSI değerleri

	S	L	H	U	p
TAS	1,30 (0,63-1,90)	1,27 (0,81-1,78)	1,24 (0,81-1,67)	1,25 (1,09-1,35)	0,995***
TOS	0,82 (0,76-0,88)	1,05 (0,91-1,15)	1,46 (1,30-1,63)	1,54 (1,44-1,72)	<0,001**
OSI	0,073 (0,04-0,12)	0,088 (0,06-0,12)	0,13 (0,08-0,17)	0,12 (0,11-0,14)	0,001**
MDA	2,69 (2,37-2,96)	3,63 (3,25-4,06)	4,70 (4,30-5,29)	4,78 (4,41-5,22)	<0,001**
Dokuda TAS	1,01 (0,86-1,12)	0,99 (0,73-1,10)	0,96 (0,78-1,10)	0,98 (0,80-1,09)	0,785*
Dokuda TOS	20,84 (18,52-23,55)	20,53 (19,39-22,56)	23,85 (19,62-26,97)	24,16 (18,99-26,97)	0,003**
Dokuda OSI	2,07 (1,81-2,20)	2,10 (1,88-2,84)	2,49 (2,23-2,80)	2,49 (1,95-3,17)	0,01*
Dokuda MDA	5,30 (5,09-5,61)	6,04 (5,59-6,44)	7,16 (6,50-7,79)	7,61 (6,68-8,40)	<0,001**

*Kruskal-Wallis test, **Fisher's ANOVA, ***Welch's ANOVA

Gruplar arasında OSI düzeylerinde anlamlı fark izlendi ($p=0,001$). L grubu, H ($p=0,031$) ve U ($p=0,025$) grubundan anlamlı düşük bulundu. S grubu da U ($p=0,011$), H ($p=0,009$) gruplarına göre anlamlı düşük bulundu, L grubu ile aralarında fark saptanmadı ($p=0,747$).

MDA düzeylerinin arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). L grubu, H ($p<0,001$) ve U ($p<0,001$) gruplarından anlamlı düşük tespit edildi. S grubu da U, H ve L gruplarından anlamlı düşük saptandı ($p<0,001$) (Şekil 11).



Şekil 11 Postoperatif 7. günde dokuda ve plazmada TOS, MDA ve OSI değerleri

Dokuda TOS düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p=0,003$). İkili karşılaştırmalarda U ve H grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,99$). L grubu istatistiksel olarak H ve U grubundan sırasıyla ortalama 3,32 ($p=0,016$) ve 3,63 ($p=0,008$) kadar daha düşük bulundu. S grubu ile L, H ve U grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. S ile U grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da dikkat çekiciydi ($p=0,062$).

Dokuda OSI açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde fark olduğu görüldü ($p=0,01$). İkili karşılaştırmalarda L ve H grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p=0,006$).

Dokuda MDA düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu görüldü ($p<0,001$). İkili karşılaştırmalarda U ve H grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,219$). L grubu istatistiksel olarak H ($p<0,001$) ve U ($p<0,001$) grubundan anlamlı düşük bulundu. S grubu da istatistiksel olarak U, H ve L gruplarından sırasıyla ortalama 2,31 ($p<0,001$), 1,85 ($p<0,001$) daha düşük saptandı, L grubundan da 0,73 kadar istatistiksel olarak anlamlı olmayan ancak kaydedeğer bir düşüklük saptandı ($p=0,064$).

4.2.2. Histopatolojik bulgular

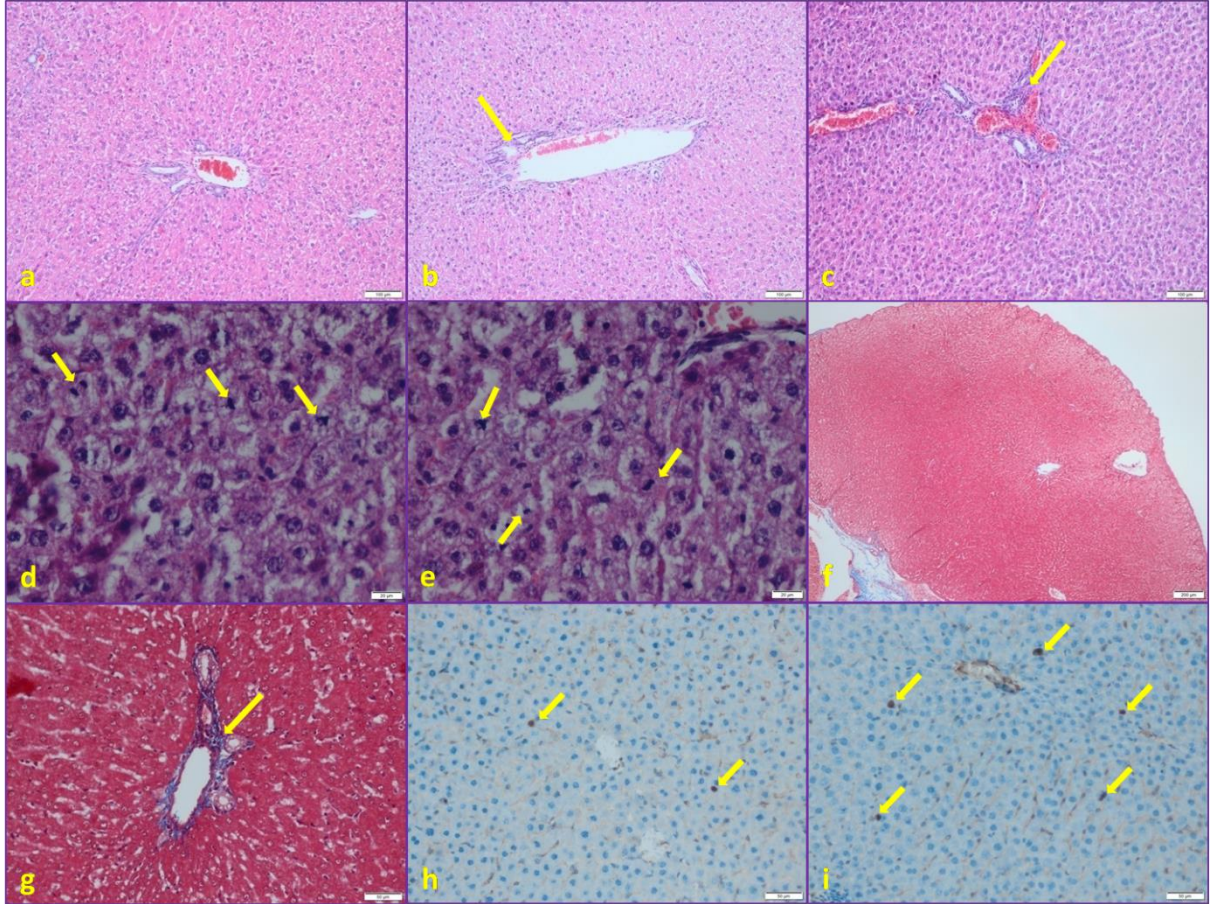
Tablo 8 Postoperatif 7. gündeki histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular

	S	L	H	U	p
Mitoz	1,50 (0-3)	0,38 (0-2)	1,38 (0-3)	1,13 (0-3)	0,138*
Ki-67	%25 (n=1)	%62,5 (n=5)	%50 (n=4)	%50 (n=4)	0,721*****
İnflamasyon	%75 (n=3)	%75 (n=6)	%62,5 (n=5)	%87,5 (n=7)	0,063*****
Hidropik Dejenerasyon	%0 (n=0)	%62,5 (n=5)	%12,5 (n=1)	%50 (n=4)	0,579*****
Fibrozis	%25 (n=1)	%62,5 (n=5)	%37,5 (n=3)	%37,5 (n=3)	0,138*****

*Kruskal-Wallis test, *****Ki-Kare test

Mitoz, Ki-67, inflamasyon, hidropik dejenerasyon ve fibrozis açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 8).

Yoğun iltihap bulunan grup saptanmadı. Periportal ya da perisentral fibrozis pozitif olan vakaların tümünde minimal derecede idi. Steatoz grupların hiçbirinde saptanmadı. Tüm gruplarda konjesyon bulgusu görüldü (Şekil 12).



Şekil 12 Histopatolojik bulgular **a:** x100 H&E İnflamasyon yok **b:** x100 H&E Hafif inflamasyon **c:** x100 H&E Orta derecede inflamasyon **d-e:** x400 H&E Mitozlar (sarı oklar ile işaretlenmiş) **f:** x40 MTK Fibrozis yok **g:** x200 MTK Fibrozis ok ile işaretlenmiş mavi boyanan alanlar) **h-i:** x200 Ki-67 ile pozitif ekspresyon (ok ile işaretlenmiş kahverenkli boyanan hücreler)

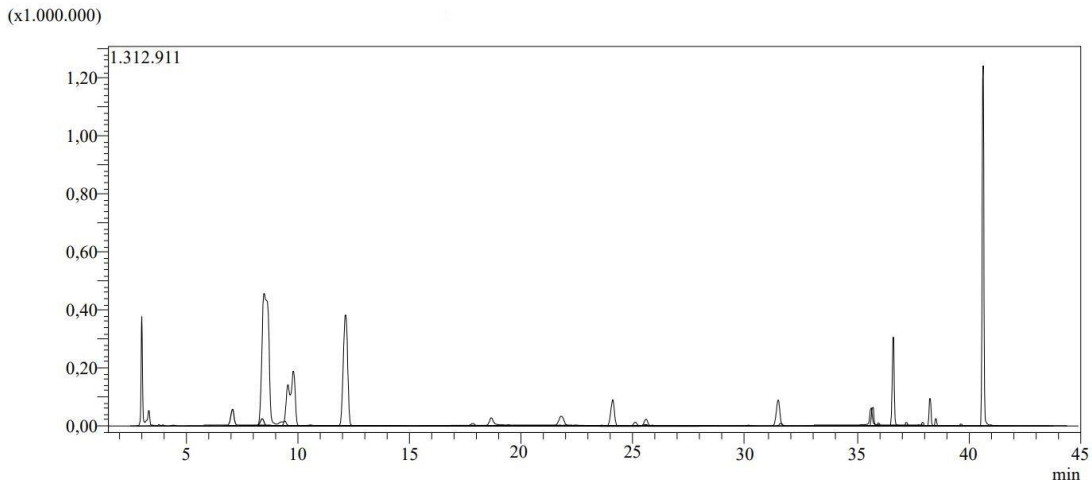
4.3. *I. viscosa* Ekstesinin Fitokimyasal Analiz Bulguları

Tablo 9 *I. viscosa* ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları

	Analit	(mg analit/g ekstre)		Analit	(mg analit/g ekstre)
1	Kinik Asit	25,084	29	Salisilik Asit	0,189
2	Fumarik Asit	0,556	30	Sinarosid	0,078
3	Akonitik Asit	t.e.	31	Miquelianin	4,157
4	Gallik Asit	0,099	32	Rutin-D3-IS	u.
5	Epigallokateşin	t.e.	33	Rutin	0,202
6	Protokateşik Asit	1,733	34	İzokersitrin	1,031
7	Kateşin	t.e.	35	Hesperidin	0,137
8	Gentisik Asit	1,608	36	<i>o</i> -Kumarik Asit	t.e.
9	Klorojenik Asit	15,904	37	Genistin	t.e.
10	Protokateşik Aldehit	0,014	38	Rosmarinik Asit	t.e.
11	Tannik Asit	0,05	39	Ellajik Asit	t.e.
12	Epigallokateşin Gallat	t.e.	40	Kozmosiin	0,022
13	1,5-Dikafeoilkinik Asit	7,821	41	Kersitrin	0,05
14	4-OH Benzoik Asit	0,311	42	Astragalin	3,987
15	Epikateşin	t.e.	43	Nikotiflorin	0,436
16	Vanilik Asit	t.e.	44	Fisetin	t.e.
17	Kafeik Asit	3,079	45	Daidzein	t.e.
18	Şiringik Asit	t.e.	46	Kersetin-D3-IS	u.
19	Vanilin	t.e.	47	Kersetin	1,96
20	Şiringik Aldehit	t.e.	48	Naringenin	0,041
21	Daidzin	t.e.	49	Hesperetin	t.e.
22	Epikateşin Gallat	t.e.	50	Luteolin	0,768
23	Piseid (resveratrol 3- β -mono-D-glukozid)	t.e.	51	Genistein	t.e.
24	<i>p</i> -Kumarik Asit	0,315	52	Kamferol	0,259
25	Ferulik Asit-D3-IS	u.	53	Apigenin	0,18
26	Ferulik asit	t.e.	54	Amentoflavon	0,015
27	Sinapik Asit	t.e.	55	Krisin	0,004
28	Kumarin	t.e.	56	Akasetin	6,053

t.e.: Tespit edilemedi; u.: Uygulanamadı

Yapılan LC-ESI-MS/MS analizine göre *I. viscosa* metanollü ekstresinde 53 adet standart fenolik bileşiğin kantitatif tayini yapıldı. Ancak bunlardan 23 tanesi tespit edilemedi. Majör olarak bulunan fenolik bileşikler sırasıyla kinik asit (25,084 mg/g ekstre), klorojenik asit (15,904 mg/g ekstre), 1,5-dikafeoilkinik asit (7,821 mg/g ekstre), akasetin (6,053 mg/g ekstre), miquelianin (4,157 mg/g ekstre), astragalin (3,987 mg/g ekstre), kafeik asit (3,079 mg/g ekstre), kersetin (1,96 mg/g ekstre) ve izokersitrin (1,031 mg/g ekstre) olarak belirlendi (Tablo 9) (Şekil 13).



Şekil 13 *I. viscosa* bitkisinin metanol ekstresinin LC-ESI-MS/MS kromatogramı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğerin parsiyel rezeksiyonu sonrası birçok mekanizmanın etkisi ile karaciğer rejenerasyonu başlar ve rezeksiyonun derecesine göre değişen bir hızda devam eder. Rezidü karaciğer dokusu, rezeksiyon öncesi karaciğer ağırlığına yaklaştıkça rejenerasyon yavaşlar ve sonlanır. Bu süreçlerin anlaşılması ve etki eden mekanizmaların aydınlatılması karaciğer cerrahilerinde önem arz etmektedir (17,18,35).

Çalışmamızda %70 hepatektomi sonrası 4 gruba ayrılan sıçanlarda, oral gavaj yoluyla verilen *I. viscosa* ekstresinin belirli dozlarda postoperatif 1. ve 7. günlerde karaciğer rejenerasyonuna etkisi kontrol cerrahi ve UDCA verilen gruplarla karşılaştırılarak incelendi.

Inula cinsine ait bitki türlerinin karaciğer üzerine etkileri araştırılmış, *I. britannica* L., *I. heterolepis* Boiss., *I. crithmoides* L., *I. cappa* DC. ve *I. racemosa* Hook.f. türleri üzerinde yapılan hepatoprotektif aktivite çalışmalarından literatürde bahsedilmiştir (8,31,32,36–39). Bu aktivitenin bitki içeriğindeki dikafeoilkinik asit türevleri ve onların türevlerinden klorojenik asit gibi bileşiklere atfedilebileceği de rapor edilmiştir (8). *I. viscosa* ise, ülkemizde yaygın olarak yetişen bir *Inula* türüdür ve sedef gibi cilt hastalıklarında, yaranın tedavisinde, romatizmal ağrılar, astım ve bronşit gibi akciğer rahatsızlıklarında, diyabet, gastroduodenal hastalıklar, hipertansiyon, kanser, bronşit, tüberküloz ve kısırlık gibi durumlarda geleneksel kullanımı olan bir bitkidir (4,40,41). Literatüre göre, *I. viscosa* bitkisinin antiinflamatuvar, antiseptik, antiskabiez, ekspektoran, diüretik, antipiretik, antihelmintik, antifungal, antioksidan, antiülserojenik, antiproliferatif, antimikrobiyal ve kanamayı durdurucu etkilere sahip olduğu bilinmektedir (4,40–42). Yapılan çalışmalar ile, *I. viscosa* bitkisinin biyoaktif seskiterpenler ve seskiterpen asitler (inuviscolide, tomentosin ve türevleri, karabron, ilisik asit, kostik asit ve türevleri), azulenler, flavonoidler (sakuratenin, 7-O metylaromadendrin ve 3-O-acetylpadmatin), fenolik asit türevleri (kafeoilkinik asit, dikafeoilkinik asit ve türevleri), glikolipidler (inugalactolipid A), triterpenoidler ve uçucu yağlar içerdiği bulunmuştur (5,40,43). Ayrıca, *I. viscosa* türlerinden hazırlanan etanol, metanol ve sulu ekstrelerde antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteler gibi çeşitli biyolojik etkilerden sorumlu olduğu düşünülen flavonoidler ve fenolik asitler sınıfından birçok bileşen tespit edilmiştir (5,40,41,44–46).

Antioksidan, sitotoksik, antiasetilkinolinesteraz, antimikrobiyal ve antifungal aktiviteler ile fitokimyasal analiz üzerine yapılan *I. viscosa* çalışmalarının büyük bir kısmı bitkiden elde edilen etanol, metanol ve etil asetatlı ekstrelerde bulunan fenolik ve flavonoid türevi bileşiklerin kalitatif olarak tayin edildiği çalışmalardır (5,44,45,47,48). Kantitatif olarak yapılan çalışmalar ile *I. viscosa* bitkisinin antioksidan, antiproliferatif ve antimikrobiyal bakımdan da incelendiği literatürler oldukça kısıtlıdır (40,41). Bir başka çalışmada ise, *I. viscosa* bitkisinden hazırlanan metanollü ekstreten izole edilen 1,3-dikafeoilkinik asit bileşiğinin, kafeoilkinik asit ve dikafeoilkinik asit türevi bileşikler arasında en güçlü antioksidan aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur (46). Buna ilave olarak, başka *Inula* türlerinin hepatoprotektif etkisi üzerine çalışmalar olmasına karşın, *I. viscosa* türünün karaciğer rejenerasyonuna etkisi ile ilgili çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle tez kapsamında *I. viscosa* bitkisinin potansiyel antioksidan etkisinden sorumlu

olabilecek fenolik bileşiklerce zengin olması nedeniyle karaciğer rejenerasyonu üzerine etkisi ilk defa araştırılmıştır.

I. viscosa bitkisinin kantitatif olarak fitokimyasal analizinin yapıldığı çalışmalardan birinde çiçek yaprak ve kök kısımlarından ayrı ayrı olacak şekilde metanol ile ekstreler hazırlanmıştır. Klorojenik asit, kafeik asit, rutin, mirsetin, kersetin, luteolin ve kamferol bakımından incelenen ekstrelerde klorojenik asit bileşiğinin majör olarak bulunduğu görülmüştür. Mirsetin hiçbir ekstrede tespit edilemezken, kamferol sadece çiçek ekstresinde; kersetin ve luteolin de çiçek ve yaprak ekstrelerinde tespit edilmiştir (41). Bir diğer çalışmada *I. viscosa* bitkisinin toprak üstü kısmından sulu ve metanollü ekstreler hazırlanmıştır. Gallik asit, kafeik asit, rutin, luteolin, kamferol, rosmarinik asit, mirsetin, kersetin, kumarin ve apigenin bileşiklerinin miktarlarının incelendiği bu çalışmada, kamferol (34,36 mg/g sulu ekstre; 40,87 mg/g metanollü ekstre) her iki ekstrede de majör olarak tespit edilmiştir. Diğer yüksek miktarda tespit edilen fitokimyasallar arasında kersetin ve kumarin sırasıyla 8,68 ve 4,42 mg/g metanol ekstresi olarak bulunmuştur (40). Bizim çalışmamızda ise, ilk defa bu kadar çok sayıda fitokimyasal standart madde kullanılarak bir fenolik profil incelemesi yapılmıştır. Gökbulut ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile paralel olarak bizim çalışmamızda da klorojenik asit miktarı oldukça yüksek bulundu. Diğer taraftan Özkan ve arkadaşlarının çalışmasında majör madde olarak tespit edilen kamferol maddesinin bizim çalışmamızda oldukça düşük miktarda bulunması sonuçlarda farklılıkların olduğunu gösterdi (40). Ayrıca kumarin ve kafeik asit bileşiklerinde de önemli uyumsuzluklar gözlenmiştir. Buna ilişkin, ekstraksiyon koşulları, bitki materyalinin toplanma yeri ve zamanı, toprak yapısı ve mevsimsel faktörler nedeniyle fitokimyasal analiz sonuçlarında farklılıkların olabileceği sonucuna varılmıştır.

Hepatoprotektif etkinliğin in vitro ve in vivo yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada *I. crithmoides* bitkisinin metanollü ekstresi ve fraksiyonlarından etil asetat fraksiyonu en aktif bulunmuştur. Bu aktif fraksiyondan izolasyon çalışmaları yapıldığında kersetin, 3,5-dikafeoilkinik asit, klorojenik asit, α -amirin, β -sitosterol ve β -sitosterol-3-O- β -D glukopiranozit elde edilmiştir (8). Özellikle dikafeoilkinik asit türevleri ve klorojenik asit gibi fenolik bileşiklerin antioksidan ve hepatoprotektif etkiler ile ilişkilendirilen çalışmalar rapor edildiğinden bitkinin aktiviteden sorumlu bileşiklerinin klorojenik asit ve 3,5-dikafeoilkinik asit olabileceği öne sürülmüştür (49–51). Ayrıca bir çalışmada dikafeoilkinik asit türevi bileşiklerin kafeoilkinik asit türevlerinden daha güçlü antioksidan

potansiyellerinin olduğu bildirilmiştir (52). 1,5-dikafeoilkinik asit bileşiğinin majör olarak tespit edildiği bir izolasyon çalışmasında *Vernonia condensata* Baker bitkisinin etil asetat fraksiyonunun hepatoprotektif etki gösterdiğini ve bu etkinin antioksidani hipokolesterolemik ve antienflamatuvar etkinlikler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca bitkinin klorojenik asit, apigenin ve luteolin taşıması nedeniyle de antioksidan ve antienflamatuvar etkinlikler gösterebileceği öne sürülmüştür (53). Bizim *I. viscosa* ile çalışma sonuçlarımıza bakıldığında bu literatürleri destekler nitelikte bulgular elde edilmiştir.

Karaciğer fonksiyon testleri açısından çalışma sonuçları incelendiğinde AST düzeyini postoperatif 1. günde S ve L grubunda, H grubuna göre düşük olduğu görüldü. Postoperatif 7. günde ise AST düzeylerinin S ve L gruplarında diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. ALT düzeyleri karşılaştırıldığında ise postoperatif 1. günde gruplar arasında fark yokken, postoperatif 7. günde S ve L gruplarında U grubuna göre daha düşük seviyelerde olduğu görüldü. Çetinkunar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçanlara %70 parsiyel hepatektomi uygulanmış ve sıçanlara 10 gün boyunca silimarin verildikten sonra postoperatif 10.günde karaciğer rejenerasyonuna etkileri araştırılmış. Çalışmada AST ve ALT seviyeleri çalışmadaki tüm gruplarda benzer seviyelerde ve normal aralıktan yüksek saptanmış (54). Çalışmadaki hepatektomi grubunun AST ve ALT değerleri ile bizim çalışmamızdaki kontrol grubunun değerlerinin benzer şekilde yüksek olduğu görüldü. Uyanoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlarda intraperitoneal olarak karvakrol uygulanmış, postoperatif 72. saatte sakrifikasyon yapılarak karaciğere etkileri araştırılmış (22). Postoperatif ilk saatlerde sham grubunda AST ve ALT seviyeleri normal aralıkta seyretmişken diğer gruplarda yüksek saptanmış, postoperatif 72.saatte ise normal aralığa gerilemiş. Benzer şekilde Meier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da parsiyel hepatektomi sonrası postoperatif 1. gün, 3. gün ve 5. günde parsiyel hepatektominin karaciğere etkileri değerlendirilmiş. %70 parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlarda postoperatif 1. günde ALT seviyesinin artmış olduğu, postoperatif 3. günde normal aralığa gerilemiş olduğu rapor edilmiş (55). Siddique ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2/3 parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlarda operasyon saatinden başlayarak belirli aralıklarla postoperatif 7.güne kadar venöz kanda biyokimyasal parametreler incelenmiş (56). ALT ve AST değerlerinin postoperatif 24. saate kadar yükseldiği, sonrasında düşüş eğiliminde olduğu, postoperatif 7. günde ALT değerinin normal aralığa gerilediği, AST değerinin ise normal aralığa yaklaştığı saptanmış. Bu çalışmaya kıyasla,

çalışmamızdaki kontrol cerrahi grubunun AST ve ALT değerleri postoperatif 1.günde çok daha düşük seviyelerde saptanmasına rağmen, postoperatif 7.günde benzer seviyelerde olduğu görüldü. Çalışmamızda tüm gruplara %70 hepatektomi uygulandığından, postoperatif 1. günde tüm gruplarda AST ve ALT seviyeleri diğer çalışmalarla benzer şekilde yüksek saptandı. Postoperatif 7. günde tüm gruplarda değerlerin gerilemiş olduğu, *I. viscosa* verilen gruplarda AST ve ALT değerlerinin UDCA grubuna göre daha düşük seviyelerde olduğu görüldü.

Çalışmamızda LDH düzeyleri tüm gruplarda postoperatif 1. ve 7. günde benzer diğer çalışmalara göre düşük düzeylerde saptandı (54,56). Postoperatif 1.günde S ve L gruplarında diğer gruplardan daha düşük seviyelerde görülmesine karşın postoperatif 7. günde gruplar arasında fark saptanmadı. GGT seviyelerinin çalışmamızda yüksek saptandığı ve literatürdeki düzeylerle uyumsuz olduğu görüldü (54,56). Bilirubin düzeyleri çalışmamızdaki tüm gruplarda diğer çalışmalardaki seviyelerle aynı aralıktaydı (54–56). UDCA'nın primer biliyer sirozlu hastalarda bilirubin seviyelerini düşürmesine benzer bir etki çalışmamızda saptanmadı.(24,57)

Histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde, Çetinkunar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yalnızca parsiyel hepatektomi yapılan ve hepatektomi sonrası silimarin verilen grup arasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz, hücresel dejenerasyon bulgularının benzer olduğu görülmüş (54). Bizim çalışmamızda da postoperatif 7. günde değerlendirilen histopatolojik bulgularda gruplar arasında farklılık saptanmadı. Bu bulgular *I. viscosa* ekstresinin belirlenen dozlarda hepatotoksik etkisinin olmayabileceği şeklinde yorumlandı.

Parsiyel hepatektomi sonrası lipid peroksidasyonunun rejenerasyonda erken dönemde etkisinin olduğu gösterilmiştir.(58) Bu nedenle oksidatif ve antioksidatif durumlardaki değişim karaciğer rejenerasyonunu etkileyebilmektedir. (59,60) Biz de çalışmamızda bu nedenle total oksidatif durum (TOS), total antioksidan durum (TAS), oksidatif durum indeksi (TOS-TAS oranı), MDA düzeylerini hem dokuda hem plazmada tespit ettik. Çalışmamızda düşük doz *I. viscosa* ekstresi verilen L grubunun postoperatif 7. günde tüm gruplar arasında en düşük OSI değerine sahip olduğu, H ve U gruplarından anlamlı derecede düşük olduğu, ancak yalnızca cerrahi uygulanan S grubuyla arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. Çetinkunar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada parsiyel hepatektomi yapılan grupta sham grubuna göre dokuda MDA seviyeleri belirgin yüksek bulunmuş (54). Sokolovic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda safra yolu ligasyonu

sonrası UDCA etkileri araştırılmış. Bu çalışmada UDCA intragastrik olarak verilmiş ve sonuçlar kontrol gruplarıyla karşılaştırılmış. Çalışmadaki safra yolu ligasyonu sonrası UDCA verilen grubun postoperatif 9. günde MDA seviyesinde azalmayı sağladığı ifade edilmektedir (61). Bizim çalışmamızda ise postoperatif 1. ve 7. günlerde S grubunun MDA ve dokuda MDA seviyeleri diğer tüm gruplardan daha düşüktü, L grubunun ise H ve U gruplarından daha düşük değerlerde olduğu görüldü. Sokolovic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kontrol grubu değerleri bizim çalışmamızdaki S grubu ile benzer seviyelerdeydi. Bizim çalışmamızda UDCA'nın MDA seviyelerinde diğer gruplara kıyasla olumlu etkisinin olmadığı izlendi. Toydemir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kurkumin maddesinin parsiyel hepatektomi sonrası etkileri araştırılmış. Parsiyel hepatektomi sonrası MDA düzeylerinin yükseldiği ve antioksidan aktivitenin azaldığı görülmüş (62). Kanter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçanlarda parsiyel hepatektomi sonrası kersetin maddesinin karaciğer rejenerasyonuna etkisi araştırılmış. Çalışma sonuçları, kersetinin muhtemel antioksidan ve proliferatif etkileri ile karaciğer rejenerasyon kapasitesine olumlu etkisinin olduğu şeklinde yorumlanmış (63). Çalışmamızda kullandığımız *I. viscosa* ekstresinin analiz sonuçlarında majör bileşenler olan kinik asit, klorojenik asit, 1,5-dikafeoilkinik asit, akasetin gibi bileşiklere nazaran daha az miktarda kersetin (1,96 mg/g eskre) içerdiği görüldü. Ancak muhtemel antioksidan etkiden sorumlu olabilecek kinik asit ve klorojenik asit bileşiklerini majör olarak bulundurması literatürdeki yorumu desteklemektedir. Kontrol cerrahi (S) grubunun MDA düzeylerinin bu çalışmalarda sonuçlarla uyumlu şekilde artmıştı. Düşük doz uygulanan *I. viscosa* ekstresi (L) grubunda MDA seviyelerinin H ve U gruplarından anlamlı derecede düşük saptanması ise, Grozovski ve arkadaşlarının yaptığı patent çalışmasında *I. viscosa* ekstresinin MDA seviyesinde azalma sağladığıyla ilgili bulguları destekler niteliktedir (6,7). Bu sonuçlar bizim çalışmamız ile kıyaslanışında *I. viscosa* ekstresinin belirli dozlarda antioksidan etkinliğinin olabileceğini düşündürmektedir.

Sumer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ki-67 seviyeleri postoperatif 5. Günde tüm gruplarda benzer düzeylerde saptanmış (64). Bizim çalışmamızda da Ki-67 seviyeleri postoperatif 1. günde ve 7. günde gruplar arasında benzerdi, ancak postoperatif 7. günde L grubunda kontrol cerrahi grubuna göre oransal olarak daha yüksek olduğu görüldü.

Yardımcı ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası intraperitoneal sildenafil uygulanmış ve rejenerasyon oranları karşılaştırılmış. Sildenafilin

kontrol grubuna göre postoperatif 1. günde rejenerasyon oranında fark oluşturmadığı, postoperatif 5. günde rejenerasyon oranının daha fazla olduğu gösterilmiş. Bizim çalışmamızda ise yalnızca cerrahi uygulanan grupta postoperatif 1.günde rejenerasyon oranı diğer gruplara göre yüksek saptandı, ancak postoperatif 7. günde dört grup arasında fark saptanmadı. Buna rağmen Yardımcı S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki kontrol grubunun postoperatif 5. günde rejenerasyon oranı ile çalışmamızdaki kontrol cerrahi grubunun postoperatif 7. gündeki rejenerasyon oranının benzer olduğu; bizim çalışmamızda yüksek doz uygulanan *I. viscosa* ekstresi grubunun (H grubu) rejenerasyon oranının diğer gruplardan dikkate değer oranda yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. (65) Sumer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise postoperatif 1. günde rejenerasyon oranlarının bizim çalışmamızdaki postoperatif 1. gündeki oranlarla benzer olduğu görüldü. Aynı çalışmadaki postoperatif 5. gündeki kontrol grubunun rejenerasyon oranıyla bizim çalışmamızdaki kontrol grubunun postoperatif 7. gündeki rejenerasyon oranlarının benzer olduğu görüldü. Bizim çalışmamızda *I. viscosa* verilen grupların rejenerasyon oranı Sumer ve arkadaşlarının nebivolol verilen gruplarda belirttikleri rejenerasyon oranından daha yüksek saptandı (64).

Sonuç olarak, deneysel çalışmamızda kullandığımız *I. viscosa* ekstresinin postoperatif 7. günde karaciğer rejenerasyon oranının diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Benzer şekilde oksidatif stres indeksi düşük doz uygulanan *I. viscosa* ekstresi grubunda en düşük saptanmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Karaciğer fonksiyon testlerinin postoperatif 1. ve 7. günde *I. viscosa* ekstresi uygulanan gruplarda UDCA grubundan istatistiksel olarak farklı olmaması da *I. viscosa*'nın karaciğerde kullanımının uygun dozlarda güvenli olabileceğini desteklemektedir. Tüm bu bulgular ile, ülkemizde yetişen *I. viscosa* bitkisinin muhtemel hepatoprotektif ve antioksidan özellikleri ile rejenerasyon kapasitesine etkisinin yapılacak ilave çalışmalarla aydınlatılabileceğini düşünüyoruz.

6. KAYNAKLAR

1. Michalopoulos GK. Liver regeneration. Vol. 213, Journal of Cellular Physiology. 2007. p. 286–300.
2. Yamamoto KN, Ishii M, Inoue Y, Hirokawa F, MacArthur BD, Nakamura A, et al. Prediction of postoperative liver regeneration from clinical information using a data-led mathematical model. Sci Rep. 2016 Oct 3;6.
3. Abbas MA, Hameed NA, Al-Khateeb EH, al Haj RMN. Evaluation of Toxicity and Fertility Effects of *Inula viscosa* Aerial Parts Extract in Male Rats. Vol. 11, Jordan Journal of Biological Sciences. 2018.
4. Seca AML, Grigore A, Pinto DCGA, Silva AMS. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. Vol. 154, Journal of Ethnopharmacology. Elsevier Ireland Ltd; 2014. p. 286–310.
5. Brahmi-Chendouh N, Piccolella S, Crescente G, Pacifico F, Boulekbache L, Hamri-Zeghichi S, et al. A nutraceutical extract from *Inula viscosa* leaves: UHPLC-HR-MS/MS based polyphenol profile, and antioxidant and cytotoxic activities. J Food Drug Anal. 2019 Jul 1;27(3):692–702.
6. Grozovski M., Maoz M., Assy N. Therapy Of Non Alcoholic Fatty Liver Disease Utilizing *Inula Viscosa* Extract [Internet]. WO: Ofek Eshkolot Res And Dev Ltd; 2011. Available from: <https://lens.org/087-611-364-988-128>
7. Grozovski M., Maoz M., Assy N. A Cola Beverage Containing *Inula Viscosa* Extract For Consumers Suffering Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) [Internet]. WO: Ofek Eshkolot Res And Dev Ltd; 2012. Available from: <https://lens.org/006-802-500-741-933>
8. Kabbash A. In vitro and In vivo Hepatoprotective Study of *Inula crithmoides* L., *Pluchea dioscoridis* (L.) Desf. and *Phyllanthus reticulatus* Poir. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2015 Jan 1;7:978–93.

9. Khan AL, Hussain J, Hamayun M, Gilani SA, Ahmad S, Rehman G, et al. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. *Molecules*. 2010 Mar;15(3):1562–77.
10. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. *Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts*. Vol. 6, *Plants*. MDPI AG; 2017.
11. Higgins G, Anderson RM. Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931;12:186–202.
12. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003;197(4):634–59.
13. Kennedy PA, Madding GF. Surgical anatomy of the liver. *Surgical Clinics of North America*. 1977;57(2):233–44.
14. Bismuth H. of Sairgery *Surgical Anatomy and Anatomical Surgery of the Liver*. Vol. 6, *World J. Surg*. 1982.
15. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. Vol. 27, *Current Biology*. Cell Press; 2017. p. R1147–51.
16. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004 Jul;19(SUPPL. 4).
17. Forbes SJ, Newsome PN. Liver regeneration-mechanisms and models to clinical application. Vol. 13, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 473–85.
18. Gilgenkrantz H, Collin de l’Hortet A. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. Vol. 188, *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc.; 2018. p. 1316–27.
19. Fausto N. Liver regeneration. *Journal of Hepatology*. 2000;32:19–31.

20. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: From anatomy to surgery. *Ann Surg.* 2006 Jul;244(1):89–98.
21. Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1999 Jul 9;6(2):171–5.
22. Uyanoglu M, Canbek M, Aral E, Husnu Can Baser K. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine.* 2008 Mar 10;15(3):226–9.
23. Grauso L, Cesarano G, Zotti M, Ranesi M, Sun W, Bonanomi G, et al. Exploring *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter phytochemical diversity to explain its antimicrobial, nematicidal and insecticidal activity. *Phytochemistry Reviews.* 2020 Jun 1;19(3):659–89.
24. Bachrach WH, Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid in the treatment of cholesterol cholelithiasis. *Dig Dis Sci.* 1982 Aug;27(8):737–61.
25. Iwasaki T. Über die Konstitution der Urso-desoxycholsäure. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1936 Jan;244(3–4):181–93.
26. Ishizaki K, Imada T, Tsurufuji M. Hepatoprotective bile acid “ursodeoxycholic acid (UDCA)”: Property and difference as bile acids. *Hepatology Research.* 2005;33(2):174–7.
27. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid ‘mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders.’ *J Hepatol.* 2001 Jul;35(1):134–46.
28. Ueda J, Chijiwa K, Nakano K, Zhao G, Tanaka M. Lack of intestinal bile results in delayed liver regeneration of normal rat liver after hepatectomy accompanied by impaired cyclin e-associated kinase activity. *Surgery.* 2002;131(5):564–73.
29. Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, et al. Nuclear Receptor-Dependent Bile Acid Signaling Is Required for Normal Liver Regeneration. Vol. 312, New Series. 2006.
30. Kwon AH, Uetsuji S, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. *Ann Surg.* 1990 Mar;211(3):295–300.

31. Kaur AK, Kumar S, Sharma PK. Hepatoprotective activity of *Inula cappa* DC. aqueous extract against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in Wistar rats. *International Research Journal of Pharmacy*. 2017 Feb 7;8(1):14–9.
32. Zangeneh MM, Zangeneh A, Almasi M, Tahvilian R, Hosseini F, Moradi R. A comparative study of hepatoprotective effect of *Inula britannica* L aqueous extract and glibenclamide in streptozotocin-induced diabetic mice. *Comp Clin Path*. 2018 Nov 1;27(6):1649–57.
33. Yilmaz MA. Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Ind Crops Prod*. 2020 Jul 1;149.
34. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR J*. 2002 Jan 1;43(4):244–58.
35. Shi JH, Line PD. Hallmarks of postoperative liver regeneration: An updated insight on the regulatory mechanisms. Vol. 35, *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. Blackwell Publishing; 2020. p. 960–6.
36. Song QH, Kobayashi T, Iijima K, Hong T, Cyong JC. Hepatoprotective effects of *Inula britannica* on hepatic injury in mice. *Phytother Res*. 2000 May;14(3):180–6.
37. Saygi Ş, Konuklugil B, Kutsal O, Uzbay IT, Deniz G, Gören Z. Assessment of therapeutic effect of *Inula heterolepsis* Boiss in alcoholic rats. *Phytotherapy Research*. 2003 Jun;17(6):683–7.
38. Tie H, Dong M, Yan G, Jing Z, Yi WU. Hepato-protective Effect of Polysaccharides Extracted from *Inula Britannica* Flower for Mice. Vol. 2012, *Chem. Res. Chinese Universities*.
39. Dong M, Hong T, Liu S, Zhao J, Meng Y, Mu J. Hepatoprotective effect of the flavonoid fraction isolated from the flower of *Inula britannica* against D-Galactosamine-induced hepatic injury. *Mol Med Rep*. 2013 Jun;7(6):1919–23.

40. Ozkan E, Karakas FP, Yildirim AB, Tas I, Eker I, Yavuz MZ, et al. Promising medicinal plant *Inula viscosa* L.: Antiproliferative, antioxidant, antibacterial and phenolic profiles. *Progress in Nutrition*. 2019;21(3):652–61.
41. Gökbulut A, Özhan O, Satılmış B, Batçioğlu K, Günal S, Şarer E. Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Phenolic Compounds of Selected *Inula* species from Turkey. *Nat Prod Commun*. 2013;8(4):475-478.
42. Talib WH, Abu Zarga MH, Mahasneh AM. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*. 2012 Mar;17(3):3291–303.
43. Amin S, Kaloo ZA, Singh S, Altaf T. Micropropagation of medicinally important plant species of family asteraceae-a review. *International Journal of Recent Scientific Research Research*. 2013 Aug; Vol. 4, Issue, 8, pp.1296- 1303,
44. Kheyar-Kraouche N, da Silva AB, Serra AT, Bedjou F, Bronze MR. Characterization by liquid chromatography–mass spectrometry and antioxidant activity of an ethanolic extract of *Inula viscosa* leaves. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Jul 15;156:297–306.
45. Mohti H, Taviano MF, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, Marino A, et al. *Inula viscosa* (L.) Aiton leaves and flower buds: Effect of extraction solvent/technique on their antioxidant ability, antimicrobial properties and phenolic profile. *Nat Prod Res*. 2020 Jan 2;34(1):46–52.
46. Danino O, Gottlieb HE, Grossman S, Bergman M. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*. 2009 Nov;42(9):1273–80.
47. Mahmoudi H, Hosni K, Zaouali W, Amri I, Zargouni H, Hamida N ben, et al. Comprehensive Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antifungal Activities of *Inula viscosa* Aiton Leaves. *J Food Saf*. 2016 Feb 1;36(1):77–88.
48. Trimech I, Weiss EK, Chedea VS, Marin D, Detsi A, Ioannou E, et al. Evaluation of anti-oxidant and acetylcholinesterase activity and identification of polyphenolics of the invasive weed *dittrichia viscosa*. *Phytochemical Analysis*. 2014;25(5):421–8.

49. Wu YH, Zhang XM, Hu MH, Wu XM, Zhao Y. Effect of *Laggetera alata* on hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 2009 Oct 29;126(1):50–6.
50. Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.* 2009 Apr 15;113(4):1370–6.
51. Gebhardt R, Fausel M. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Artichoke Extracts and Constituents in Cultured Rat Hepatocytes. Vol. 11, *Toxicology in Vitro.* 1997.
52. Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida K, Fujita T. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J Agric Food Chem.* 2004 Jul 28;52(15):4893–8.
53. Silva JB da, Mendes R de F, Tomasco V, Pinto N de CC, de Oliveira LG, Rodrigues MN, et al. New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker. *J Ethnopharmacol.* 2017 Feb 23;198:399–406.
54. Cetinkunar S, Tokgoz S, Bilgin BC, Erdem H, Aktimur R, Can S, et al. The effect of silymarin on hepatic regeneration after partial hepatectomy: is silymarin effective in hepatic regeneration? Vol. 8, *Int J Clin Exp Med.* 2015.
55. Meier M, Andersen KJ, Knudsen AR, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit S, Mortensen FV. Liver regeneration is dependent on the extent of hepatectomy. *Journal of Surgical Research.* 2016 Sep 1;205(1):76–84.
56. Siddique M., S.A. Malik, A.S. Khan, G. Nazir, J.A. Chawla. Comparison of Liver Function Tests After 2/3 Hepatectomy and Liver Biopsy in Experimental Rats. *Journal of Medical Sciences.* 2004 Sep 15;4(4):318–22.
57. Mas N, Tasci I, Comert B, Ocal R, Mas MR. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2008 Feb 21;14(7):1108–11.

58. Francés D, Ronco MT, Ochoa E, Alvarez ML, Quiroga A, Parody JP, et al. Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Oct;85(10):1047–51.
59. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. Vol. 16, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2015. p. 26087–124.
60. Oguz S, Kanter M, Erboga M, Toydemir T, Sayhan MB, Onur H. Effects of *Urtica dioica* on oxidative stress, proliferation and apoptosis after partial hepatectomy in rats. *Toxicol Ind Health.* 2015;31(5):475–84.
61. Sokolovic D, Nikolic J, Kocic G, Jevtovic-Stoimenov T, Veljkovic A, Stojanovic M, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on oxidative stress level and DNase activity in rat liver after bile duct ligation. *Drug Chem Toxicol.* 2013 Apr;36(2):141–8.
62. Toydemir T, Kanter M, Erboga M, Oguz S, Erenoglu C. Antioxidative, antiapoptotic, and proliferative effect of curcumin on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Toxicol Ind Health.* 2015;31(2):162–72.
63. Kanter M, Tuncer I, Erboga M, Atanassova P, Takir M, Kostek O. The effects of quercetin on liver regeneration after liver resection in rats. *Folia Morphol (Warsz).* 2015. 75(2):179–87.
64. Sumer F, Colakoglu MK, Ozdemir Y, Ozsay O, İlter O, Bostanci EB, et al. Effect of nebivolol on liver regeneration in an experimental 70% partial hepatectomy model. *Asian J Surg.* 2017 Sep 1;40(5):375–9.
65. Yardimci S, Bostanci EB, Ozer I, Dalgic T, Surmelioglu A, Aydog G, et al. Sildenafil accelerates liver regeneration after partial hepatectomy in rats. In: *Transplantation Proceedings.* 2012. p. 1747–50.