

Kantaron Otundan (*Hypericum perforatum*) Elde Edilen Hyperisin Maddesinin İnsan Lenfosit Kültürlerinde Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkisi

H. Ramazan Yılmaz¹, Nezehat Yücel², Efkân Uz³, Pınar Aslan Koşar²

¹Mevlana Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Selçuklu, Konya, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

³Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

Eur J Basic Med Sci 2014;4(2): 22-28

Received: 27-08-2014

Accepted: 27-10-2014

Correspondence (Yazışma Adresi):

Prof. Dr. H. Ramazan YILMAZ
Mevlana Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
42003 Selçuklu, Konya, Türkiye
Tel.: +90.4444243 / 1316
Fax: +90.332.2411111
E-mail: hramazany@yahoo.com

*The Efficacy of Hypericin Derived From *Hypericum perforatum* on Sister Chromatid Exchange in Human Lymphocyte Culture*

ABSTRACT

*Hypericin is thought to be a promising material in cancer treatment. It is natural sensitizer extracted from *Hypericum perforatum* plant and used for the cancer treatment studies with photodynamic therapy. In this study, we aimed to search genotoxic effect of hypericin in the darkness peripheral blood samples were obtained from ten (5 Male and 5 Female) healthy volunteers. Sister Chromatid Exchange (SCE) procedure were performed for two groups and low dose (5 µM/L) and high dose (10 µM/L) of hypericin were added to human lymphocyte cultures and the SCE procedure was performed also there two groups. And the mean SCE values were compared. No difference as found between control group and the 5 µM/L hypericin added group. The mean SCE values between controls and the 10µM/L hypericin added group was found statistically significant (P<0,05). Our results, showe that hypericin may have genotoxic effect in high doses, in contrast no genotoxic effect shown in low doses.*

Key Words: Sister chromatid exchange, *Hypericum perforatum*, hypericin

ÖZET

*Hyperisin (Hy) kanser tedavisinde son zamanlarda umut verici bir madde olarak bilimsel çevrelerce ilgi görmektedir. Bu madde *Hypericum perforatum* bitkisinden elde edilen doğal fotosensitizer olup fotodinamik terapi ile kanser tedavisine yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Hy molekülünün karanlıkta genotoksik etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bunun için sağlıklı ve gönüllü 10 kişiden (5 Erkek ve 5 Kadın) periferik kan örnekleri alındı. Biri kontrol ve ikisi deney olmak üzere üç grup oluşturuldu. İlk gruba kardeş kromatid değişimi (KKD) prosedürü diğer iki gruba düşük doz (5 mM/L) ve yüksek doz (10mM/L) Hy 10 ml'lik insan lenfosit kültürlerine ekleyip KKD prosedürü uygulandı. Elde edilen KKD ortalamalarını karşılaştırdı. Birinci grup (kontrol) ile ikinci grup KKD oranı karşılaştırıldığında anlamlı bir değişikliğe gözlenmedi Birinci grup ile üçüncü grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P< 0,05). Bu çalışmada, düşük dozlarda genotoksik etkisi olmayan Hy'nin yüksek dozlarda genotoksik olabileceği gösterildi.*

Anahtar kelimeler: Kardeş kromatid değişimi, *Hypericum perforatum*, hyperisin

GİRİŞ

Halk arasında sarı kantaron ve binbirdelik otu olarak bilinen *Hypericum perforatum*, Türkiye’de ve Avrupa’da yaygın yetişen yabani bir bitkidir. *H. perforatum* Hypericaceae (Guttiferae) familyasından olup bu familyanın Türkiyede 89 türü yetişmektedir. Bunların 43’ü ise endemiktir (1). *H. perforatum* geleneksel folklorik ilaç olarak dâhilen ağrı giderici, yatıştırıcı, kurt düşürücü, ülser tedavi edici ve haricen yara iyileştirici olarak ülkemizde kullanılmaktadır (2). Yapılan araştırmalarla bu tıbbi bitkinin antitümör (3-5), antiviral (6), antidepresan (7), antibakteriyal (8), antiinflamatuar (9), nöroprotektif (10), hepatoprotektif (11) etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Avrupada St. John’u Wort olarak tanınan bu bitkinin en zengin hyperisin (Hy) ve türevleri (pseudohypericin) kaynağı olduğu bulunmuştur (12). Hy bilinen en güçlü doğal fotosensitizerdir (13). Son yıllarda bu bileşikler tümöral ve viral hastalık tedavisinde ılımlı depresyon yatıştırmasında önem kazanmıştır.

1988’den beri antiviral etkisi araştırılmakta olup etki mekanizması henüz açıklanamamıştır (14). Işığa duyarlılaştırıcı olan ve lipitte çözünen Hy’nin tümör hücreleri ve zarflı viruslar üzerine güçlü fotodinamik etkisi olduğu rapor edilmiş fakat hyperisinin tümör hücresi ölüm mekanizmasını nasıl teşvik ettiği çeşitli teoriler ileri sürülmesine rağmen henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Hy’nin bu antitümör ve antiviral etkisinin fotosensitizer özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hy’nin tümör hücrelerini hem apoptozis hem de nekrozis yoluyla yok ettiği düşünülmektedir (15). Hücre ve organellerin yıkımını ışık aracılığı ile katalizleyen fotosensitizer ajanların kullanılmasına fotodinamik terapi (PDT) denilmektedir. PDT kanser tedavisi için kullanılan yeni ve umut verici yöntemlerden biridir. Antitümoral PDT bir fotosensitizerin sistemik uygulamasını ve tümöral lezyona oksijen varlığında görülebilir ışığın dağıtılmasını hedefler (16). Bu sağlandığı zaman tip I veya tip II reaksiyonu vastasıyla reaktif oksijen radikallerinin lokal üretimi lipid membranlarda zincirleme reaksiyonları gerçekleştirerek tümör harabiyetine (nekrozis) sebep olur (17). PDT virüslara uygulanırsa zarf yapısının bozulmasını sağlayarak virüsün enfekte etme özelliğinin kaybına neden olur (18). Son yapılan araştırmalarda ışıkla aktive edilen Hy’nin intrinsik veya ekstrinsik apoptozis yollarından her ikisini de aktifleyebileceği ileri sürülmüş ve kesin bir açıklama getirilememiştir (19). Tarih boyunca insanlar *H. perforatum*’u ruhsal sıkıntı, hafif depresyon, yorgunluk, bitkinlik tedavisi için kullanmışlardır. Günümüzde ise *H. perforatum* ekstraktları, depresyon yatıştırma

doğal terapatik ajanların en faydalı olanlarından (20). Diğer antidepresanlarla karşılaştırıldığında moleküler etki mekanizmasının onlardan farklı olduğu anlaşılmıştır. Nörokimyasal etkisinin santral sinir sisteminde *H. perforatum*’a, ya bir çok düzenleyicinin cevap vermesi ya da enzimatik aktivitenin reseptör seviyesinde inhibisyonu şeklinde olduğu ileri sürülmüştür. Antidepresan etkinin, bitkinin içerdiği hyperisinler, hyperforinler, pikosyanidinler ve flavanoidlerin farklı etki şekilleriyle olduğu varsayılmaktadır (21).

H. perforatum’un total ekstraktının deri yaralanmalarının iyileşmesinde etkili olduğu bilinmektedir (22). Türkiye’de geleneksel olarak halk arasında zeytinyağı içerisine bu bitkinin çiçeklerinin katılarak güneşte bekletilip elde edilen karışımın yara iyileştirici olarak haricen uygulandığı bilinmektedir (23). Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), genotoksik ajanların deoksiribonükleikaside (DNA) oluşturduğu hasarı kromozom düzeyinde tespit etmemizi sağlayan doğrudan metotlardan birisidir (24). KKD, DNA’daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edilir. DNA hasarının ve indüklenmiş DNA tamirinin gösterilmesinde en basit, duyarlı ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem olarak kullanılmaktadır (25,26). Kardeş kromatid değişimi, DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidler arasında özdeş segmentlerin karşılıklı simetrik yer değiştirmesidir (27,28). Bu olay kromozomun her iki kromatidinin birden kırılması ile ortaya çıkmaktadır (29). KKD’de yeni duplike olmuş kromatid ve eski kendi kardeş kromatidi arasında, kromozom morfolojisi değişmeden simetrik olarak özdeş segmentlerin değişimi söz konusudur (25). KKD, çoğalmakta olan hücrelerde spontan olarak meydana gelir. Özellikle kromozom hasarı, instabilitesi ve DNA tamir bozukluğu sendromlarında duyarlı bir parametre olarak kullanılmaktadır (30).

Bu çalışmada, tümör hücrelerinde apoptozisi indüklediği bilimsel çevrelerce kabul edilmiş fakat genotoksik etkisinden bahsedilmemiş olan Hy’nin insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Deney grupları, 10 (5 Erkek ve 5 Kadın) gönüllü ve sağlıklı (son 6 ay içinde radyasyon almamış, herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç, sigara ve alkol kullanmayan)

Tablo 1. Gruplar arasındaki KKD değerleri

Gruplar	N	KKD Ortalama±SS
Grup I (Kontrol grubu)	10	6.5 ± 1.2
Grup II (5 µM/L Hy)	10	7.2 ± 0.9
Grup III (10 µM/L Hy)	10	8.2 ± 0.4

N: Birey sayısı, SS: Standart Sapma

yaşları 23-30 arasında ortalama 27,3 ± 2,8 olan bireylerde alınan periferik kan örnekleri Hy (Sigma)'den 5 µM/L ve 10 µM/L konularak karanlıkta yapılan deney grupları ve Hy konulmayan karanlıkta yapılan kontrol grubu olarak oluşturuldu. Bu çalışma için etik kurul izni alınmıştır. Moorhead ve ark.nın (31) tekniği modifiye uygulanarak kromozom preparasyonu yapıldı. Kromozomlar Korenberg ve arkadaşlarının (32) önerdikleri modifiye boyama yöntemi kullanılarak boyandı.

Her birey için iyi dağılmış 20 metafazdaki KKD oranları 100X'lik mikroskop (Olympus) altında incelendi. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü değişimlerdeki kırık noktaları gözlemlendi, her bir metafazdaki toplam değişim değeri belirlendi ve her birey için 20 metafaz değerlendirilerek değişimlerin ortalaması alındı.

BULGULAR

Grup I için KKD ortalama 6.5 ± 1.2, grup II ortalaması 7.2 ± 0.9 grup III için 8.2 ± 0.4 bulunmuştur (Tablo 1). Grup I ile grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunurken grup I ile grup III arasındaki fark Paired-t testine göre anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

Ayrıca grup I ve II KKD karşılaştırması grafik 1'de, grup

Tablo 2. Erkek ve kadın KKD değerleri

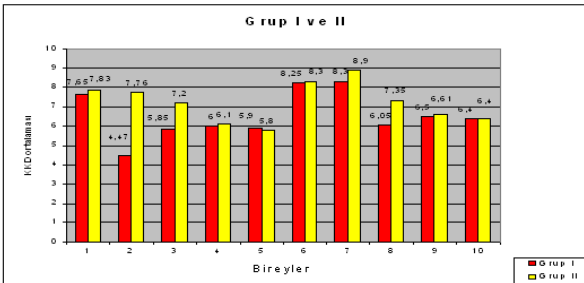
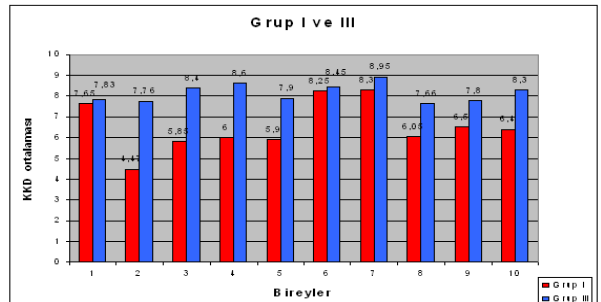
CİNSİYET	Grup I KKD Ortalaması±SS	Grup II KKD Ortalaması±SS	Grup III KKD Ortalaması±SS
Erkek (N=5)	7.1 ± 1.1	7.5 ± 1.1	8.2 ± 0.5
Kadın (N=5)	5.9 ± 1.1	6.9 ± 0.9	8.1 ± 0.4

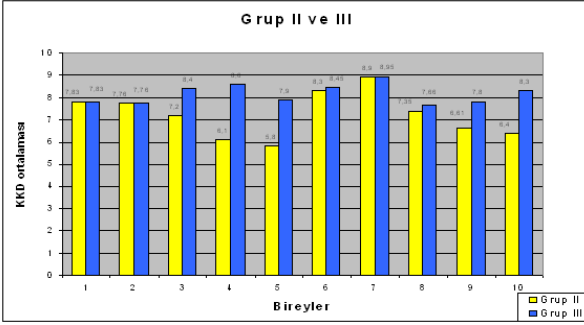
N: Birey sayısı, SS: Standart Sapma

I ve grup III KKD karşılaştırması grafik 2'de, grup II ve III karşılaştırması da grafik 3'te gösterilmiştir. Tüm gruplarda kadın ve erkek KKD ortalamalarını karşılaştırıldığında grup I, grup II, grup III'de erkeklerin KKD oranları kadınlardan yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Grup I ve II'deki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) iken grup III'deki fark anlamsız bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Hypericum perforatum bitkisinin en önemli bileşeni hyperisinin antitümör, antiviral etkileri bilimsel bir gerçektir. Hy'nin bu özellikleri fotosensitizer özelliklerinden kaynaklandığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (5,33). PDT kanser tedavisinde son zamanlarda sık kullanılan bir yöntemdir. PDT'de doğal fotosensitizer olarak Hypericin tercih edilmektedir (34). Hy'nin antitümör etkisi in vivo ve in vitroda melanoma (3), meme (35), kolon (36), glioma (37), prostat (5), hipofiz (38), nazofarenks (18,39), özafagus (18) kanserlerinde çalışılıp etki mekanizması araştırılmıştır. Antiviral etkileri 1988'den sonra çok çalışılmış ve Hy'nin sadece zarflı virüsler ve retrovirüslere etki ettiği ve bu etkinin ışık uygulandığı zaman ortaya çıktığı belirtilmiştir (14). HIV tedavisi için kullanılabilirliği için çeşitli araştırmalar

**Grafik 1. Grup I ve II'nin KKD değerlerinin karşılaştırılması****Grafik 2. Grup I ve III'ün KKD değerlerinin karşılaştırılması**



Grafik 3. Grup II ve III'ün KKD değerlerinin karşılaştırılması.

da yapılmıştır. Etki mekanizmasının tam açıklanamaması, AIDS hastalarına sistemik uygulamasında görülen fototoksiteden (40) ve klinik uygulama azlığından dolayı tedavide kullanım için daha çok erken gözükmektedir.

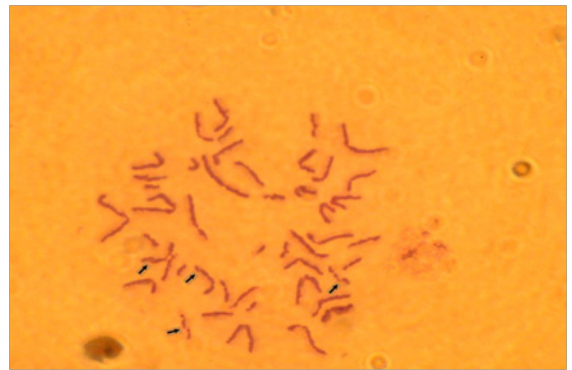
Hypericin ışıkla aktive olduktan sonra tümör hücrelerinde apoptozis ve nekroze yol açmaktadır. Apoptozisin ekstrinsik veya intrinsik sinyal mekanizmasının işlemesi ile gerçekleştiği bilinmektedir. Her iki sinyal yolunda da sistein içeren kaspas proteazlar önemli rol oynamaktadır (19). Ekstrinsik yolda mutlaka hücre zarında bulunan Fas, TNF (tümör nekroz faktör) gibi ölüm reseptörlerinin ligandlarınca uyarılması ile sinyal yolu aktiflenir. Hy aracılı apoptoziste protein kinaz C (PKC) inhibisyonunun tetikleyici olduğu görüşü ekstrinsik sinyal yolunun etkili olabileceği fikrini desteklemektedir. İntrinsik yolda sinyal ya hücrenin genomundan gelir ya da resep-

töre bağlanmaya ihtiyaç göstermeyen ilaç, ışın etkisi ile sağlanır (15,19). Hy hücre kültürlerine eklendiğinde 3,5 saatte nükleus içinde biriktiği, hatta hücre DNA'sının pürinlerinin 7. azotu ile etkileşime girdiği belirlenmiştir (41). Bu da Hy genom üzerinden mitoz bloğu oluşturup apoptotik sinyallerin genomdan gelebileceği fikrini desteklemektedir. Nitekim son yapılan bir çalışmada topoizomerz IIa'nın Hy tarafından inhibe edilerek transkripsiyon ve DNA replikasyon bloğu oluşturduğu ileri sürülmüştür (42). Hyperisinin düşük dozlarda antiproliferatif etki yüksek dozlarda apoptozisi indükleyici etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (43).

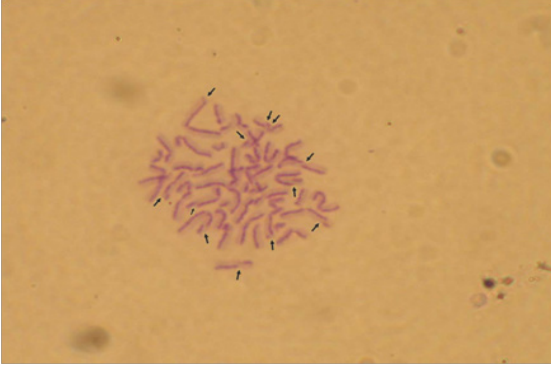
Hypericum perforatum ekstraktlarının Avrupa ve Kuzey Amerikada menopoz sıkıntıları, ılımlı depresyon belirtileri, premenstüral sıkıntılar, anksiyete, uykusuzluk tedavisi için kullanımı her geçen gün artmaktadır (20). Antidepresan etki mekanizması henüz tam açıklığa kavuşturulamamış olan Hp ekstraktlarının serotonin, norepinefrin, dopamin, gama amino bitürik asit (GABA), L-glutamatın sinoptosomal geri salınımını inhibe ederek etki gösterdiği ileri sürülmüş (44). Bu konuda araştırmalar devam etmekte olup, antidepresan etkiyi, önceleri hypericin bileşiğinin gerçekleştirdiği sanılmış daha sonra bu etkiyi hypericin, hyperforin ve flavonoidlerin birlikte yaptığı düşünülmüştür (21). Son yapılan çalışmalarla antidepresan etkiden hypericinden çok hyperforin bileşiğinin sorumlu olduğu fikri ağırlık kazanmıştır (45). Klinik çalışmalar *Hypericum perforatum* ekstraktlarını günde üç kez, her doz 300 mg (%0.3 hypericin) olmak üzere toplam 900 mg'lık dozu ılımlı depresyon tedavisi için kullanımını önermektedir. Bu dozlarda yan etki ve fotosensitizasyon görülmediği belirtilmektedir (46).



Resim 1. Grup I'e ait bir metafaz örneği



Resim 2. Grup II'e ait metafaz örneği



Resim 3. Grup III'e ait bir metafaz örneği

Yapılan literatür araştırmalarında Hy maddesinin genotoksik etkisini belirlemeye yönelik bir çalışmanın yapılmadığı belirlendi. Bu çalışmamızda KKD sıklığı analizi kullanıldı. KKD analizi, DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edildiği, DNA hasarının ve indüklenmiş DNA tamirinin gösterilmesinde en basit, duyarlı ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem (26) olduğu için tercih edildi. Çalışmamızda birbirine bağlı üç grup oluşturuldu. Çocuk, adolesan çağıında, yaşlı, hamile veya emziren, sürekli ilaç kullanan ve 6 ay içinde röntgen ışığına maruz kalmış olan bireylerin KKD ortalamaları değişebileceğinden grup bireyleri sağlıklı yetişkin erkek ve kadınlardan seçildi. KKD sıklığını etkileyecek etmenleri minimize etmek için tüm grupların ekimleri aynı anda yapıp değerlendirme işlemi için aynı mikroskop kullanıldı.

Hyperisin uygulanan gruplar ve hy uygulanmayan grup arasındaki KKD oranı farklılığı hücre kültürüne uygulanan hy miktarına bağlı olduğu sonucuna varıldı. Çünkü düşük dozda (5 µM/L) Hy uygulanan grup ile kontrol grubu KKD oranında anlamlı bir değişiklik yok iken ve yüksek doz (10 µM/L) uygulanan grup ile kontrol grubu KKD oranında bir artış söz konusudur. Bu sonuçlarla, doza bağlı olarak insan lenfosit kültürlerine Hy uygulamasının ışık uyarını kullanmadan da genotoksik etki gösterebileceği gözlenmiştir. Kanser tedavisi için kullanılan Hy dozu çok iyi ayarlanmalı ve yan etkileri yönünden denekler veya normal hücre kültürleri iyi gözlenmelidir. Bu konuda kesin bir sonuca ulaşmak için daha detaylı moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir. *H. perforatum* yur-

dumuz Isparta yöresinde geleneksel olarak birçok hastalık için tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Hazırlanan zeytinyağı ekstraktlarında hy bileşiğinin standardize edilmeme ihtimali yüksek olduğundan fototoksik etkileri açısından tehlikeli olabilir. Hy maddesi ve dolayısı ile Hp ekstraktlarının dozunun iyi ayarlanması gerekmektedir. Gelişi güzel kullanımlar zararlı olabilir.

Teşekkür

Bu çalışma, Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir. 746 nolu proje olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (SDÜBAP)'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands II*. Edinburg University Press. p:355 and p:400 Edinburg. (1978-1988).
2. Baytop T. *Farmakognazi ders kitabı Ist. Üniv. Yay. No:2003. Ecz. Fak. No:19, İstanbul. 1974.*
3. 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(7):1-20.*
4. Jendželovská Z, Jendželovský R, Hilovská L, Koval' J, Mikeš J, Fedoročko P. *Single pre-treatment with hypericin, a St. John's wort secondary metabolite, attenuates cisplatin- and mitoxantrone-induced cell death in A2780, A2780cis and HL-60 cells. Toxicol In Vitro 2014;28(7):1259-73.*
5. Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, et. al. *Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. J Photochem Photobiol B 2000;54(2-3):103-7.*
6. Tang J, Colacino JM, Larsen SH et al. *Virusidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruse. Antiviral Res 1990;13(6):313-25.*
7. Tian J, Zhang F, Cheng J, Guo S, Liu P, Wang H. *Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of Hypericum perforatum L. Sci Rep 2014;4:5632, 1-6.*
8. Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. *A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L. J Ethnopharmacol 2010;131(3):511-21.*
9. Hammer KD, Birt DF. *Evidence for contributions of interactions of constituents to the anti-inflammatory activity of Hypericum perforatum. Crit Rev Food Sci Nutr 2014;54(6):781-9.*

10. Gómez del Rio MA, Sánchez-Reus MI, Iglesias I, et al. Neuroprotective properties of standardized extracts of *Hypericum perforatum* on rotenone model of parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12(5):665-79.
11. Herakman T. *Hypericum perforatum* fraksiyonlarının hepatoprotektif etkilerinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir, 1996.
12. Potacka J. The chemistry, pharmacology and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *J Appl Biomed* 2003;1:61-73.
13. Betty RC, Trikojus VM. Hypericin and non-fluorescent photosensitive pigment from *St. John Wort*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1943;21:175-82.
14. Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *PNAS* 1988;85(14):5230-4.
15. Agostinis P, Vantieghe A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(3):221-41.
16. Seyed MA, Malini O, Gan YY, Bn Soo KC. Induction of apoptosis by Hypericin through activation of caspase-3 in human carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2001;8:521-30.
17. Du HY, Olivo M, Tan BK, Bay BH. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces lipid peroxidation and necrosis in nasopharyngeal cancer. *Int J Oncol* 2003;23(5):1401-5.
18. Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Research* 1991;15:101-12.
19. Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J* 1999;13(13):1647-57.
20. Üstün Ç. Santral sinir sistemi üzerine etkili tıbbi bitkilerin tarihsel süreç içinde ve günümüzde tedavideki yeri. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi, İzmir 1998.
21. Wirz A, Simmen V, Herlmann J, Calis I, Meier B, Sticher D. Bisanthraquinone plicatosides of *Hypericum perforatum* with binding inhibition to CRH-1 receptors. *Phytochemistry* 2000;55:941-7.
22. Prisăcaru AI, Andrițoiu CV, Andriescu C, et al. Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. *Rom J Morphol Embryol* 2013;54(4):1053-9.
23. Mukherjee PK, Verpoorte R, Suresh B. Evaluation of in vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family:Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *J Ethnopharmacol* 2000;70:315-21.
24. Soysal Y. Mitomicin C ile indüklenmiş lenfosit hücre kültürlerinde melatonin ve karotenin in vitro sistemde kardeş kromatid değişimi oranları ve mitotik indeks değerleri üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, 1999.
25. Koşar Aslan P. Mesane kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişim sıklığı. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. Isparta, 1999.
26. Acar A. Ferrokrom fabrikasında çalışan işçilerde sitogenetik çalışmalar. Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Doktora Tezi, 1985.
27. Tanrıverdi N. Kardeş Kromatid Değişimi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Fiz. ABD. Bilim Uzmanlığı Tezi, 1991.
28. Paralı F. Ethidium bromidin (EtBr) in vitro insan lenfositlerine etkisinin SCE yöntemi ile gösterilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, 1994.
29. Ceylaner Başkaya G. Şizofrenili olgularda kardeş kromatid değişimlerinin (Sister Chromatid Exchange-SCE) araştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi, 1997.
30. Erdem N. Kontraplak ve yonga-levha fabrikalarında çalışan işçilerde formaldehit ve odun tozuna maruziyetin solunum fonksiyonları üzerine etkisi ve genotoksik hasarın araştırılması. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi, 1997.
31. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Batips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-16.
32. Korenberg J, Feedlender EF. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosome (Berl)* 1974;48:355-60.
33. Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Hyperforin a constituent of *St John's wort* (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56(1):121-32.
34. Du HY, Olivo M, Tan BK, Bay BH. Photoactivation of hypericin down-regulates glutathione S-transferase activity in nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Lett* 2004;207(2):175-81.
35. Johnson SA, Dalton AE, Pardini RS. Time-course of hypericin phototoxicity and effect on mitochondrial energies in EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25(2):144-52.
36. Mikešová L, Mikeš J, Kovač J, et al. Conjunction of glutathione level, NAD(P)H/FAD redox status and hypericin content as a potential factor affecting colon cancer cell resistance to photodynamic therapy with hypericin. *Photodiagnosis*

- Photodyn Ther 2013;10(4):470-83.
37. Huntosova V, Nadova Z, Dzurova L, Jakusova V, Sureau F, Miskovsky P. Cell death response of U87 glioma cells on hypericin photoactivation is mediated by dynamics of hypericin subcellular distribution and its aggregation in cellular organelles. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11(9):1428-36.
 38. Marekova M, Vavrova J, Vokurkova D, Cerman J. Light-induced photoactivation of hypericin inhibits cellular growth in pituitary adenoma cell line At 20/D16v-f2 (Hypericin inhibits cellular growth of AtT20/d16v-F2). *Acta Medica* 2001; 44(1):7-13.
 39. Du HY, Olivo M, Tan BK, Bay BH. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces lipid peroxidation and necrosis in nasopharyngeal cancer. *Int J Oncol* 2003;23(5):1401-5.
 40. Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, et al. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. *AIDS Clinical Trials Group Protocols 150 and 258. Ann Intern Med* 1999;130(6):510.
 41. Miskovsky P, Sureau F, Chinsky L, Turpin PY. Subcellular distribution of hypericin in human cancer cells. *Photochem Photobiol* 1995;62(3):546-9.
 42. Peebles KA, Baker RK, Kurz EU, Schneider BJ, Kroll DJ. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II alpha by hypericin, a naphthodianthrone from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biochem Pharmacol* 2001;15;62(8):1059-70.
 43. Crnolatac I, Huygens A, van Aerschot A, Busson R, Rozenski J, de Witte PA. Synthesis, in vitro cellular uptake and photo-induced antiproliferative effects of lipophilic hypericin acid derivatives. *Bioorg Med Chem* 2005;13(23):6347-53.
 44. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(5):583-600.
 45. Raffa RB. Screen of receptor and uptake-site activity of hypericin component of St. John's wort reveals sigma receptor binding. *Life Sci* 1998;62(16):PL265-70.
 46. Vorbach EU, Arnoldt KH, Hubner WD. Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD-10. *Pharmacopsychiatry* 1997;Suppl 2:81-5.