

**BALB/C FARELERDE
D-GALAKTOZAMİN/TÜMÖR NEKROZ
FAKTÖR ALFA İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARINDA SİLMARİN VE NANOFORMLARININ,
DNA, APOPTOSİS, NEKROSİS VE İNCE YAPI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Mustafa CENGİZ
Doktora Tezi

Anadolu Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı
Ekim-2014

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1305F091**

ÖZET

Doktora Tezi

BALB/C FARELERDE D-GALAKTOZAMİN/TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINDA SİLMARİN VE NANOFORMLARININ, DNA, APOPTOSİS, NEKROSİS VE İNCE YAPI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Mustafa CENGİZ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2014, 121 Sayfa

Silmarin karaciğer koruyucu ve antioksidan özelliğinden dolayı çeşitli nedenlerle oluşan karaciğer hasarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak farmakokinetik çalışmalarda silmarinin dokuda uygunsuz dağılıma, düşük çözünürlük ve barsakta çabuk bozulma gibi biyofarmasötik sınırlılıklarının olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, biyofarmasötik sınırlılıklarını azaltmak için D-galaktozamin/tümör nekroz faktör alfa ile oluşturduğumuz deneysel karaciğer hasarı üzerine, sentezlediğimiz silmarin katı lipit nanoformulasyonunun karaciğer koruyucu etkisi araştırılmıştır. Biyokimyasal ve histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde silmarin yüklü katı lipit nanopartikülün deneysel olarak oluşturulan karaciğer hasarında silmarinden daha etkili bir iyileştirici olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, silmarin yüklü katı lipit nanopartikülün, silmarinin farmasötik sınırlılıklarını azaltmak için yararlı bir sistem olabileceği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Silmarin, katı lipit nanopartikül, karaciğer hasarı, hepatoprotektif etki

ABSTRACT

PhD Dissertation

THE EFFECTS OF SILMARIN AND ITS NANO FORMULATION ON DNA, APOPTOSIS, NECROSIS AND FINE STRUCTURE ON EXPERIMENTALLY CAUSED D-GALACTOSAMINE/TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA-INDUCED LIVER INJURY IN BALB/C MICE

Mustafa CENGİZ

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2014, 121 Pages

Silymarin is widely used in treatment of liver diseases of varying origins due to its proven hepatoprotective and antioxidant properties. But, pharmacokinetic studies have shown the biopharmaceutical limitations of this agent as improper diffusion in the tissue, poor solubility in water, and decomposition in the intestine. In this study we aimed to formulate silymarin solid lipid nanoparticles and to investigate the hepatoprotective effects on experimentally damaged liver tissue by D-galactosamine/tumour necrosis factor alpha application. Based upon our investigation results histologic and biochemical findings, it can be concluded that Silymarin solid lipid nanoparticles significantly reduced D-galactosamine/tumour necrosis factor alpha-induced hepatotoxicity, which suggested improved bioactivity compared to silymarin. In conclusion, Silymarin solid lipid nanoparticles could be a useful system for the delivery of poorly water-soluble Sm, apart from providing favourable hepatic protection.

Keywords: Silymarin, solid lipid nanoparticles, liver damage, hepatoprotective effect

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımın her aşamasında büyük payı olan, bilgi ve tecrübelerini yardımseverlikleri ile birleştirerek desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hatice Mehtap Kutlu ve Doç. Dr. Adnan Ayhancı'ya,

Tezimin gerçekleşmesinde gerekli olan imkanları sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Dostluğunu benimle paylaşan ve uzun tez yazım çalışmalarında birlikte çalıştığımız sevgili arkadaşım Djanan Vejselova'ya,

Beni yetiştirip bu günlere getiren, ömrüm boyunca sevgi, ilgi ve desteklerini cömertçe gösteren, benimle birlikte emek sarf eden, sıkıntılarımı paylaşan ve her zaman sabırlı ve hoşgörülü olan, ailemin her bireyine ayrı ayrı,

Yoğun tez çalışmalarım ve iş programım dolayısıyla her zaman hoşgörülü, sabırlı olan eşim Zeynep ve biricik kızlarım Zehra ve Nurvera'ya,

Son olarak da, tüm çalışma aşamalarımnda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli İngilizce hocam M. Sait Kılıçaslan'a ve de hoşgörüsüne sığındığım tüm arkadaşlarım ve sevdiklerime,

En İçten Teşekkürlerimi Sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Hasarında Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)'nın Rolü	3
2.2. Karaciğer Hasarında D-Galaktozamin (D-GaIN)'in Rolü	6
2.3. Silmarinin Genel Özellikleri	7
2.3.1. Silmarin'in Anti-Kanser Etkileri	9
2.3.2. Silmarin'in Anti-İnflamatuvar Etkileri	10
2.3.3. Silmarin'in Hücre Yaşam Döngüsündeki Rolü	11
2.3.4. Apoptozun Tetiklenmesinde Silmarin'in Rolü	12
2.3.5. Silmarin'in Anti-Oksidan Etkileri	13
2.3.6. Silmarin'in <i>İn Vitro</i> Çalışmalarda Kansere Karşı Etkileri.....	14
2.3.7. Silmarin'in <i>İn Vivo</i> da Kansere Karşı Etkileri	14
2.4. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)	17
2.4.1. KLN'lerin Özellikleri	19
2.4.2. KLN'lerin Avantaj ve Dezavantajları.....	20
2.4.3. KLN Hazırlama Yöntemleri	20
2.4.4. KLN'lerin Karakterizasyonu	23
2.4.5. KLN'lerin Stabilitesi.....	24
2.4.6. KLN'lerin Liyofilizasyonu	25
2.4.7. KLN'lerin Sterilizasyonu.....	26
2.4.8. KLN'lerin Uygulama Yolları.....	27
2.5. Apoptoz	28
2.5.1. Apoptoz Düzenlenmesinde Görevli Genler	30
2.5.2. p53 Geninin Apoptoz ile İlişkisi	30

2.5.3. Sitokrom c Geninin Apoptoz ile İlişkisi	31
2.5.4. Kaspazların Apoptozdaki Rollerini	31
2.5.5. Bcl-2 Gen Ailesi	32
2.5.6. Bax Geninin Yapı ve Foksiyonları	33
2.5.7. Çoğalan Hücrelerin Nukleus Antijeni (PCNA)	34
2.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar	34
2.6.1. Serbest Radikallerin Oluşum Yolları	35
2.6.2. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri (Lipit Peroksidasyonu)	37
2.6.3. Lipit Peroksidasyonunda Malondialdehitin (MDA) Önemi	38
2.6.4. Glutasyon (GSH)'un Oksidatif Doku Hasarını Önlemedeki Rolü.....	38
2.7. Karaciğer Fonksiyon Testleri	39
2.7.1. Alanin Transaminaz (ALT) ve Aspartat Transaminaz (AST)'ların Biyokimyası	39
2.7.2. Laktat Dehidrojenaz (LDH)'ın Biyokimyası.....	41
2.7.3. Alkalen Fosfataz (ALP)'ın Biyokimyası	41
3. MATERYAL VE METOD	42
3.1. MATERYAL.....	42
3.1.1. Deney Hayvanlarının Ortama Adaptasyonu ve Beslenmeleri	42
3.2. METOD.....	42
3.2.1. Kimyasal Maddelerin Hazırlanması ve Enjeksiyonları	42
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	42
3.2.3. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar.....	43
3.2.4. Histolojik Çalışmalar	43
3.2.5. Biyokimyasal Analizler	46
3.2.6. İmmünohistokimyasal Boyama.....	49
3.2.7. Silmarin Katı Lipit Nanopartikül (KLN)'lerin Hazırlanması ve Ölçümü	52
3.2.8. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	54
4.1.1. Deney Gruplarının Serum ALT Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	56

4.1.2. Deney Gruplarının Serum AST Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	56
4.1.3. Deney Gruplarının Serum ALP Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	57
4.1.4. Deney Gruplarının Serum LDH Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	57
4.1.5. Deney Gruplarının Redükte Serum GSH Seviyesinin Değerlendirilmesi	58
4.1.6. Deney Gruplarının Plazma MDA Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	59
4.2. Histolojik Çalışmaların Değerlendirilmesi.....	60
4.2.1. Karaciğer Örneklerinin Işık Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi...60	
4.3.1. Karaciğer Örneklerinin Konfokal Mikroskop ile Yapısal Değişikliklerinin Görüntülenmesi	69
4.4.1. İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi	75
4.5.1 Karaciğer Örneklerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin Görüntülenmesi	87
4.3. Silmarin Katı Lipit Nanopartikülleri (KLN)'nin Karakterizasyonun Değerlendirilmesi	91
4.3.1. Partikül Boyutları ve Polidispers İndeksi	91
4.3.2. Zeta Potansiyeli ve Elektriksel İletkenlik	92
4.3.3. Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi	93
5. TARTIŞMA	95
6. KAYNAKLAR	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. TNF- α sinyal yolları.....	4
2.2. D-Galaktozaminin protein sentezini bloke ederek hepatositin TNF- α nedenli hücre ölümüne duyarlı hale getirme mekanizması.....	6
2.3. Silmarinin kimyasal bileşenleri.....	8
2.4. Sm'nin hepatoprotektif özelliklerine uygun ana farmakolojik etkilerinin şematik gösterimi.....	17
2.5. Hücrede Serbest Radikal Oluşum Yolları.....	35
2.6. Malondialdehitin Kimyasal Yapısı.....	38
2.7. Alanin transaminaz enzim aktivitesinin şematik gösterimi.....	39
2.8. Aspartat transaminaz enzim aktivitesinin şematik gösterimi.....	40
4.1. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan kan serumundan ölçülen ALT, AST, LDH ve ALP değerleri.....	58
4.2. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan serumundan ölçülen GSH ve plazmadan ölçülen MDA değerleri.....	60
4.3. Kontrol grubuna ait karaciğer hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer dokusu	62
4.4. D-GaIN/TNF- α uygulanan hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopik İncelenmesi.....	63
4.4. (Devam) D-GaIN/TNF- α uygulanan hayvanların karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelenmesi.....	64
4.5. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hayvanların karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelenmesi.....	64
4.5. (Devam) D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hayvanların karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelenmesi.....	66
4.6. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan hayvanların karaciğer dokularının ışık mikroskopunda incelenmesi.....	67
4.7. D-GaIN/TNF- α /Sm-SLN uygulanan Balb/c faresine ait karaciğer dokusu	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

4.8. Kontrol grubu Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akrinin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü.....	71
4.9. D-GaIN/TNF- α uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akrinin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü	71
4.10. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akrinin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü	72
4.11. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akrinin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü	73
4.12. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akrinin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü	74
4.13. Kontrol grubunu oluşturan karaciğerlerde Bcl-2 pozitif boyanma görüntüleri.....	76
4.14. D-GaIN/TNF- α uygulanan farelere ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüsü	76
4.15. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan farelerin karaciğer doku örnekleri	77
4.16. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanmış Balb/c farelere ait karaciğer dokusu	77
4.17. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan fare karaciğer dokularının ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	78
4.18. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan karaciğer kesitlerinin Bcl-2 immünboyanma yoğunluğu	78
4.19. Kontrol grubunu oluşturan karaciğerlerde Bax negatif boyanma görüntüleri.....	80
4.20. D-GaIN/TNF- α grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüsü	80
4.21. D-GaIN/TNF- α /Sm grubuna ait karaciğer dokusu	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

4.22. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan grubun karaciğer doku görüntüsü	81
4.23. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan fare karaciğerinin Bax boyanma görüntüsü	82
4.24. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan karaciğer kesitlerinde Bax immünboya yoğunluğu	82
4.25. Kontrol grubunu oluşturan karaciğer dokusunda PCNA pozitif boyanmış hepatosit saptanmasının ışık mikroskobundaki görüntüsü	84
4.26. D-GaIN/TNF- α grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskobundaki görüntüsü	84
4.27. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan farelerin karaciğer doku görüntüsü	85
4.28. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan fare karaciğer dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü	85
4.29. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN grubunu karaciğer dokusunun PCNA pozitif boyanmış hepatosit görüntüsü.....	86
4.30. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan karaciğer kesitlerinde PCNA immünboya yoğunluğu	86
4.31. Kontrol grubu Balb/c farelere ait hepatositin elektron mikroskobik görüntüsü.....	88
4.32. D-GaIN/TNF- α uygulanan farelere ait hepatositin elektron mikroskobik görüntüsü.....	88
4.33. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hepatositin elektron mikroskobik görüntüsü.....	89
4.34. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan Balb/c farelere ait hepatositin elektron mikroskobik görüntüsü.....	89
4.35. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan farelere ait hepatositin elektron mikroskobik görüntüsü.....	90
4.36. Silmarin molekülünün partikül boyunun SEM de çekilmiş görüntüsü (A) ve silmarin yükü katı lipid nanopartikül boyutunun SEM de çekilmiş görüntüsü (B).....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan kan serumundan ölçülen ALT, AST, LDH ve ALP değerleri	55
4.2. Silmarin, KLN (Boş) ve Sm-KLN formülasyonlarının partikül boyutu ve polidispers indeks değerleri.....	92
4.3. KLN (Boş) ve Sm-KLN formülasyonlarının zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik değerleri.....	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

mg	: Miligram
kg	: Kilogram
n	: Denek sayısı
ml	: Mililitre
μ g	: Mikrogram
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
$^{\circ}$ C	: Santigrad derece
%	: Yüzde
OSO ₄	: Osmiyum tetraoksit
dk	: Dakika
DDSA	: Dodecenylsuccinic anhydride
BDMA	: Benzyldimethylamine
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu)
NADH	: Redükte Nikotinamid dinükleotit
NAD ⁺	: Okside Nikotinamid dinükleotit
NaCl	: Sodyum klorür
μ S	: Mikro Svedberg
μ L	: Mikro litre
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences

1.GİRİŞ

Karaciğer organizma için hayati olan birçok maddenin sentez ve metabolize edildiği bir organdır. Karaciğer çeşitli toksinler, kimyasal ve mikrobik ajanlarla sürekli karşılaşmakta ve bu ajanları detoksifiye etmektedir. Karaciğerdeki morfolojik değişimler organizmadaki metabolik olayları etkilemektedir. Bu nedenle vücuttaki metabolik fonksiyonların bozulması karaciğer hasarı ile ilişkilendirilir [1]. Hepatitler, ani gelişen karaciğer yetmezliği, çeşitli kanserler, toksinler, sitokinler ve ilaçlar gibi birçok etken karaciğerde hasar oluşturmaktadır [2]. Asetoaminofen [1,2], karbontetra klorür (CCl₄), lipopolisakkarit [3,4], D-galaktozamin (D-GaIN) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi hepatotoksiner deneysel karaciğer hasarı oluşturmada yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir [5]. Sitokinler, organizmada çeşitli uyarılara cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanan düzenleyici proteinlerdir. Sitokinler inflamasyon ve immün yanıt oluşumu, doku onarımı, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynarlar. TNF- α , endotoksiner ve diğer uyarılara cevap olarak, makrofajlarda üretilip salınan bir sitokindir. Bu sitokin daha az miktarda olmak üzere lenfosit hücreleri, mast hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinir hücreleri tarafından da üretilmektedir [5]. TNF- α farklı hücre tipleri üzerinde çeşitli etkiler gösterir ve çeşitli fizyolojik olayların önemli bir aracısı olarak bilinir. Bu olaylar arasında: strese cevap, doku hasarı, tümör nekrozu, diğer sitokinlerin uyarılması, inflamasyon, ateş, immün fonksiyonların düzenlenmesi, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması ve apoptoz ile hücre ölümü sayılabilir [6].

D-GaIN ise diğer doku ve organlara etkisi olmayan, karaciğere spesifik bir hepatotoksindir [7]. D-GaIN karaciğer hasarına özgü morfolojik ve biyokimyasal değişimlere neden olduğundan dolayı karaciğer hasarında model organizma oluşturmak için kullanılan bir maddedir [8,9].

Farelerde D-GaIN/TNF- α 'nın farklı dozlarının enjeksiyonu, karaciğer hastalıklarının oluşumu ve tedavisini incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan deneysel bir metottur [6]. Bu çalışmada da model organizma oluşturmak için bu yöntem kullanılmıştır.

Silmarin (Sm), *Silybum marianum* [L.] Gaertner [10] (Deve diken) bitkisinin meyveleri ve tohumlarından elde edilen anti-oksidan, anti-kanserojen, fibröz giderici, anti-inflamatuvar ve anti-lipit peroksidatif [11] etkilere sahip polifenolik bir bileşiktir [12,13]. Sm, 2000 yılı aşkın bir zamandan beri karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada, aynı zamanda mantar zehirlenmesi, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde de kullanılmaktadır [14,15]. Ancak, Sm'nin kimyasal yapısından kaynaklanan bir takım etki sınırlayıcı durumları bulunmaktadır. Bunlar dokuda uygunsuz dağılım, suda çok az çözünme ve barsak ortamında bozulma gibi biyofarmasötik sınırlılıklarıdır [16,17,18]. Sm'nin bu etki sınırlayıcı özelliklerini ortadan kaldırmak üzere birçok girişim gerçekleştirilmiş olmasına rağmen farmakolojik bir başarı elde edilememiştir [18]. Bu konuda yapılan bir çalışmada çözünürlüğü ve geçirgenliği artırmak amacıyla önerilen silibin-fosfolipit kompleksi başarılı bulunamamıştır [19]. Diğer bir çalışmada Sm tuzları denenmiş fakat membran geçirgenliğinin kısıtlı olması ve lipozomal bir iletim sisteminin yüksek yüzey aktif madde içeriği ve düşük yükleme etkinliğinden dolayı [20] bu sistemin de Sm'nin çözünürlüğünü ve geçirgenliğini artırmada yeterli seviyede olmadığı saptanmıştır.

Bu sınırlayıcı etkileri minimuma indirmek üzere yapılan çalışmalar, çözüm yolunun katı lipit nano-formulasyon (KLN) olabileceği fikrini ortaya koymuştur. Sm-KLN uygulamasıyla ile yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, Balb/c farelerde D-GaIN/TNF- α ile oluşturulan karaciğer hasarında Sm ve nanoformlarının, DNA, apoptoz, nekroz ve ince yapı üzerindeki anti-oksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

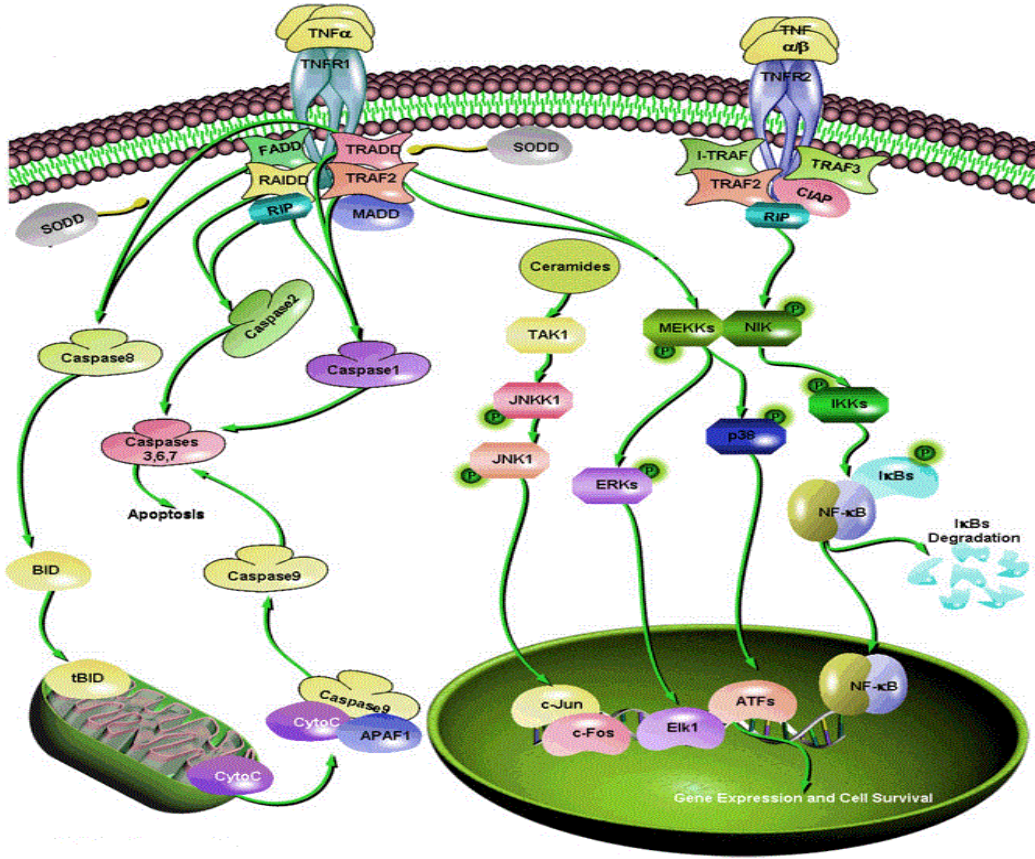
2.1. Karaciğer Hasarında Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)'nın Rölü

TNF- α (Kaşeksin) proliferasyon, inflamatuvar mediyatörler ve hücre ölümü gibi hücrel cevapları tetikleyen, 9 liganddan oluşan TNF reseptörleri ailesini aktifleştirerek fonksiyon gösteren bir sitokindir [21]. TNF- α başlıca makrofajlar tarafından üretilir. Aynı zamanda lenfosit hücreleri, mast hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinir hücreleri olmak üzere birçok hücre tipi tarafından üretilmektedir. Karaciğerde ise TNF- α , birincil olarak safra kanalı hücreleri ve Kupffer hücreleri tarafından üretilir [22].

Farklı hücre tipleri üzerinde çeşitli etkiler gösteren TNF- α strese cevap, doku hasarı, tümör nekrozu, sitokinlerin uyarılması, inflamasyon, immün fonksiyonların düzenlenmesi, ateş, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi çeşitli fizyolojik olayların önemli bir aracısı olarak bilinir [23]. Karaciğerde ise viral hepatit, alkolik karaciğer hastalığı, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve iskemi-reperfüzyon hastalıklarının patofizyolojisinde rol almaktadır [22]. Hepatotoksin varlığında, akut karaciğer yetmezliğinde veya viral hepatitiste, hepatositler yüksek düzeylerde çeşitli sitokinlere maruz kalırlar. Bu sitokinler arasında yer alan TNF- α , hepatositlerde hem hücrenin sağ kalımı ile ilgili yolları hem de apoptotik yolları aktive eder [24].

TNF- α 'nın karaciğerde iki zıt yönlü rolü vardır. Bir yandan hücre ölüm mediyatörü olarak görev yapan TNF- α diğer bir yandan da hepatosit proliferasyonu ve karaciğer yenilenmesini tetiklemektedir [22]. Bu etkilerini, anti-apoptotik etkileri olan transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$)'yi uyararak, hücre bölünmesini uyarma şeklinde göstermektedir. Diğer bir etkisi ise inflamatuvar karaciğer hastalıklarının büyük bir bölümünde, toksik etki yapmaktır. Bu etki yapılan çalışmalarda artan transaminaz seviyeleri ile gösterilmektedir [24]. TNF- α hepatositlerde apoptozu uyararak, karaciğer hasarına katkıda bulunur [25].

TNF- α öncelikle tip 2 transmembran protein olarak üretilir fakat çözünebilir trimerik formda metalloproteaz TNF-dönüştürücü enzim (TACE) tarafından proteolitik parçalama ile serbestleşmektedir [22]. Lipopolisakkarit (LPS) ve diğer bakteri ürünlerine cevaben büyük miktarda TNF- α üretilir. TNF- α biyolojik fonksiyonunu TNF-R1 ve TNF-R2 membran reseptörleri ile etkileşerek gösterir.



Şekil 2.1. TNF- α sinyal yolları (http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=TNF_Signaling) (25.09.2013)

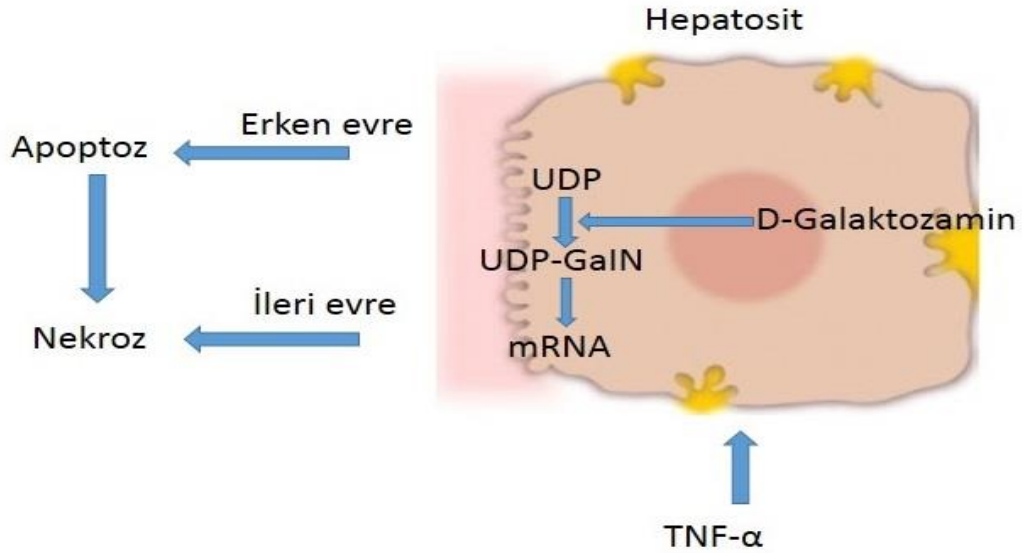
TNF- α proapoptotik yolak ve proinflamatuvar yolağın potansiyel aktivatörü olarak çalışsa da bu sinyal yolları belirli seviyelerde kompleks bir yapıda etkileşmekte ve bir yolağın aktifleşmesi genellikle diğer yolağın inaktif hale gelmesine bağlıdır [22]. Hücreler, TNF- α kaynaklı sinyali uygun cevap ile yönetme yeteneğindedir. TNF- α 'nın iki farklı hücreler arası sinyal iletme eğilimi reseptöre bağlanabilmesi TNF- α kaynaklı hücrel cevabın diğer bir kontrol seviyesini

göstermektedir. TNF-R1, çözünebilir TNF- α ile aktif hale gelirken TNF-R2'nin aktivasyonu membrana bağlı TNF- α 'nın bağlanması ile gerçekleşmektedir [22]. TNF- α 'nın bağlanmasından sonra TNF- α reseptörleri konformasyonel değişikliğe uğrar ve hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu sağlar. TNF-R1'in hücre içi bölgesi korunmuş bir protein içerir. Bu bölge yaklaşık 80 aminoasitlik ölüm noktası denilen bölgedir ve TNF reseptörüne bağlı protein molekülü buraya bağlıdır. TNF-R1 bağlı ölüm bölgesi TNF- α reseptör bağımlı faktörün bağlanma yerini oluşturmaktadır [22]. Reseptör etkileşimli kinaz (RIP) ve bağlayıcı molekül Fas-bağımlı ölüm bölgesi de buraya bağlanmaktadır. Buna zıt olarak TNF-R2 ölüm bölgesi içermez ve doğrudan TNF- α reseptörü bağımlı faktör 2 ile etkileşir. TNF-R1'in aktivasyonu NF- κ B, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) ve p38'in aktivasyonuna yol açabilir. Buradaki aracı enzim RIP1 ve TNF- α reseptörü bağımlı faktör 2 (TRAF2)'dir. Kaspazların ve apoptozun aktivasyonundaki aracı ise Fas-bağımlı ölüm bölgesidir (FADD) [22]. TNF- α reseptörleri ailesinin Fas ve TNF- α aracılı ölüm reseptörleri, apoptoz indükleyici ligandı kaspaz 8'in aktivasyonunun başlatıldığı bir "ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC)" başarılı bir şekilde oluşturur. Bu kompleks TNF- α reseptör sinyalleşmesinde bulunmamaktadır. TNF-R1 bu kompleksin zayıf ve kısa ömürlü oluşumunu tetiklemektedir. Çünkü TRAF2 aracılı apoptoz inhibitör moleküllerinin artmış ve kaspaz 8 aktivasyonu engellenmiştir [22]. Bu yapı TNF- α teşvikli ölüm sinyallerinin genellikle ek mitokondriyal sinyallere ihtiyaç duydukları, buna zıt olarak Fas'ın birçok hücre tipinde mitokondriyal yoldan bağımsız olarak apoptozu indüklediği bilgisiyle daha da pekiştirilmiştir. TRAF2 ve NF- κ B gibi anti-apoptotik sinyaller bloke edildiğinde TNF teşvikli kaspaz 8 aktivasyonu bcl-2 homologu proteinlerin proapoptotik üyelerinin aktivasyonuna, mitokondri depolarizasyonuna, sitokrom c salınımına ve kesici kaspazların aktivasyonuna yol açmaktadır. TNF-R2 özellikle pro-inflamatuvar yolları aktive etse de apoptozu indüklemez. TNF-R1 ve TNF-R2 kaynaklı sinyaller arasındaki çapraz etkileşim, TNF-TNF-R1 kaynaklı hücre ölümünü TRAF2'nin TNF-R2' ye bağlanması özelliğini düşürmesi, TRAF2'nin cIAP1 aracılı indüklenme mekanizmasını bozması, TNF-R2 aracılı JNK aktivasyonunu uzatması ve TNF-R2 kaynaklı TNF- α salınımına yol açması gibi mekanizmalar ile TNF-R1 kaynaklı hücre ölümünü artırabilir [26].

2.2. Karaciğer Hasarında D-Galaktozamin (D-GaIN)'in Rolü

D-GaIN, insan viral hepatit hastalığına benzer karaciğer hasarına neden olduğu bilinen hepatotoksik bir ajandır. D-GaIN'in karaciğer spesifitesi karaciğer hücrelerinde galaktokinaz ve galaktoz-1-P-üridiltransferaz (UDP-glukoz)'un yüksek seviyelerde üretiliyor olması ile ilişkilidir. GaIN metabolizması esnasında, karaciğer hücrelerindeki üridin havuzlarını tükenmesi transkripsiyon ve protein sentezinin durmasına neden olur. Karaciğer hücrelerinde transkripsiyonun durması hücreyi sitokinlere karşı aşırı duyarlı hale getirmektedir. Ayrıca GaIN, karaciğer hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu ve serbest radikal artışı ile mitokondride fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır [27].

Galaktozamin hepatotoksitesinin biyokimyasal temeli galaktozaminin karaciğer hücreleri tarafından metabolize edilmesine dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, D-GaIN'in karaciğer dokusunda oluşturduğu hasar uygulanan galaktozamin dozu ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Karaciğer hasarı oluşturmak üzere uygulanan galaktozaminin etkisi plazma membranında geri dönüşümlü değişikliğe neden olma yönündedir. Bunun sonucunda da hücre ölümünde rolü olan kalsiyumun geçirgenliğinde değişiklik meydana gelmektedir [28].

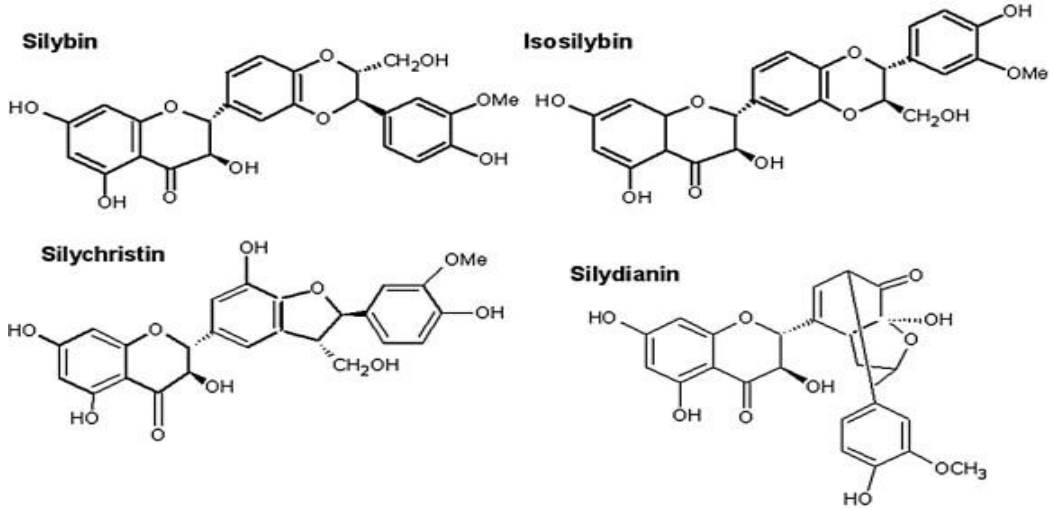


Şekil 2.2. D-Galaktozaminin protein sentezini bloke ederek, hepatositi TNF- α nedenli hücre ölümüne duyarlı hale getirme mekanizması [29]'dan uyarlanmıştır

Deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla özellikle Balb/c farelerde farklı konsantrasyonlarda D-GaIN ve TNF- α enjeksiyonu yaygın olarak kullanılan bir metottur [8,30]. D-GaIN'in tek başına uygulanması ile başka bir hepatotoksik madde ile birlikte uygulanmasından alınan sonuçların farklı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bir çalışmada, tek başına uygulanan D-GaIN'in düşük oranda apoptoz, daha yüksek oranda nekroza neden olduğu, TNF- α ile birlikte uygulanmasından sonra ise apoptotik hücre ölüm oranını belirgin olarak yükselttiği ifade edilmiştir [8,31]. TNF- α 'nın tek başına uygulanması durumunda apoptotik karaciğer hücrelerinde TNF- α 'nın reseptörüne bağlanması ile NF- κ B'nin aktivasyonu görülür ve koruyucu proteinleri kodlayan genlerin üretilmesi uyarılarak protein sentezi bloke edilir [8]. D-GaIN'in TNF- α ile beraber kullanıldığında daha yüksek apoptotik hücre ölümünün görülmesi galaktozaminin karaciğere özel transkripsiyonel blokör olmasından kaynaklanmaktadır [8,32]. Bu iki hepatotoksinin birlikte uygulanması ile oluşturulan apoptotik hücre ölümlerinde mitokondride üretilen serbest radikaller de yer almaktadır. Galaktozaminin tek olarak enjeksiyonu yeterli miktarda serbest radikal üretmekte ve TNF- α 'nın karaciğer hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerine karşı karaciğer hücrelerini daha duyarlı kılmaktadır [30].

2.3. Silmarinin Genel Özellikleri

Silmarin (Sm), *Asteraceae* familyasına ait *Silybum marianum* [L.] Gaertner [10] (Deve diken) bitkisinin meyveleri ve tohumlarından izole edilen, polifenolik bir bileşiktir [33,34]. Deve diken özütleri 2000 yılı aşkın süredir farklı uygarlıklar tarafından gençleştirici olarak kullanılmaya gelmiştir. Kimyasal açıdan Sm, flavonolignan izomerlerinin karışımıdır [35,36]. Sm'nin yaklaşık % 65-80'ini flavonolignanlar ile birlikte yaklaşık %20-35 oranında yağ asitleri ve başka polifenolik bileşenler oluşturmaktadır. Genel kimyasal formülü C₂₅H₂₂O₁₀'dur [37].



Şekil 2.3. Silmarin'in kimyasal bileşenleri (<http://www.medscape.com/viewarticle/422884>), (25.09.2013)

Sm'nin saflaştırılmış özütlerde en önemli kimyasal bileşeni silibin'dir ama izosilibin, silkristin, silidiyanin, ve flavonid taksifolin gibi başka flavonolignan bileşenler de içerir [38]. Çalışmalar göstermiştir ki, silibin ve izosilibinin, silibin A ve silibin B ile izosilibin A ve izosilibin B olmak üzere iki diyasteroizomerin bir karışımıdır ve ayrıca son ikisi Sm karışımından olan (izosilibin A ve izosilibin B) silibin A ve silibin B'nin reyjomerleridir [39]. *Silybum marianum* bitkisinin beyaz çiçek açan türleri silandrin, silimonin, silihhermin ve neozilhermin A and B gibi 3-deoksiflavanolignanlı ek bileşenler içermektedir [40]. Hepatit ve sirozun tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, karaciğeri toksik maddelerden korumak amacıyla da doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır.

Sm, deneysel karaciğer hastalıklarında anti-oksidatif (oksit giderici), anti-lipit peroksidatif, fibröz giderici, iltihap önleyici, hücre zarı koruyucu, bağışıklık sistemini koruyucu, protein sentezi ve hücre yenilenmesinin uyarılması gibi mekanizmalarını ortaya koymuştur. Buna ilave olarak, Sm çeşitli kanser türlerine karşı kanseri önleyici bir potansiyele sahip olduğu için hem hücre kültüründe hem de canlı denekte yaygın bir şekilde çalışılmıştır. Kemopreventif özelliğinin keşfedilmesi, anti-anjiojenik ve anti-kanser özelliklerinin keşfedilmesi gibi farklı amaçlarla Sm'ye olan ilgi yeniden artmıştır [41,42]. Sm flavonolignanları hepatositler üzerinden çok yönlü aktivite göstermektedir. Sm hepatositin RNA

polimeraz I'i harekete geçirme, ATPaz aktivitesini kolaylaştırma ve glutatayon içeriklerini geri yükleme özellikleri vardır [43]. Flavanolignanların karaciğer koruyucu etkisi mitotik aktiviteyi hızlandırarak karaciğer dokularının yenilenmesine yol açmada senkronize bir aktivitedir [44]. Buna ilaveten Sm bileşenleri lökotrienler ve nükleer faktör kapp B (NF-k β) gibi inflamasyon öncesi uyarıcıların güçlü inhibitörleridir [45,46]. İlacın aynı zamanda dokuda uygunsuz dağılıma, suda çok az çözünme ve barsak ortamında bozulma gibi biyofarmasötik sınırlılıkları vardır [47,48,49].

2.3.1. Silmarin'in Anti-Kanser Etkileri

Kanser gelişimi, transkripsiyonel faktörlerin bozuk ifadesi ve hücre çoğalması, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre farklılaşması, programlanmış hücre ölümü (apoptoz), kan damarlarının oluşumu (anjiyogenesis), istila (invazyon) ve metastaz gibi olaylarda rol alan proteinler tarafından tetiklenen çok basamaklı bir süreçtir. Yüksek anjiyogenik potansiyel, istila ve metastazın yanı sıra, bozuk hücre döngüsünün gidişatı ve apoptoz, kanserin belirgin özellikleri olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla, bu süreçlerden bir veya birden fazlasını hedef alan ajanlar, etkili ve ideal kanseri önleyici (kemopreventif) olabilirler. Sm ve/veya silibinin hücre yaşam döngüsü düzenleyicileri ve apoptozda rol alan vitaminlerin ifadelerine müdahale ederek, hücrelerin yaşamda kalması veya apoptoza gitmesi arasındaki dengesizliği ayarlamaktadır. Buna ilave olarak, Sm aynı zamanda belli proteinleri modüle ederek metastazı önleyici ve iltihabı engelleyici özelliğini göstermektedir [50]. Hem Sm hem silibinin, siklin bağımlı kinaz (SBK) ifadesinin baskılanması ve SBK inhibitörlerinin (p21^{CIP1} ve p27^{KIP1}) artışı ve bu inhibitörlerin SBK'lara bağlanmasında görülen eş zamanlı artışından dolayı epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) büyümesini baskılamakta çok etkilidir. Sm hücre büyümesini G₁ ve G₂ kontrol noktalarında durduran mekanizmalarını aktif hale getirir. Sm düşük dozlarda, hücre dışı sinyal-düzenlemeli kinaz (ERK1/2) inhibisyonu ile büyümede durma olayını uyarırken, yüksek dozlarda alınan Sm, mitojen ile aktif hale gelmiş protein kinaz (MAPK)/c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağı ile apoptoza yol açar [50,52]. Yapılan çalışmalarda Sm'nin insanda görülen ilerlemiş prostat kanseri DU145 hücrelerinde, hem temel olarak aktif hem de değişiklik yapan α büyüme etkeni aracılı EGFR'nin tirozin fosforilasyonunu

baskıladığı gösterterilmiştir [53]. Çalışmalar gösteriyor ki, Sm ve silibinin, büyüme faktörlerinin ifade ve sekresyonunu engelleyerek EGFR'nin iletişimini düzenler. Ayrıca, büyüme faktörünün EGFR'ye bağlanmasını veya aktif hale gelmesini engeller ve tümör hücre çizgisinde bir anti-kanser etki sağlar [54].

2.3.2. Silmarin'in Anti-İnflamatuvar Etkileri

Sm'nin anti-inflamatuvar etkileri iltihap, hücre yaşamı, farklılaşma ve büyümede görev alan çeşitli genlerin ifadesini düzenleyip koordine eden transkripsiyon faktör nükleer faktör-kB'nin (NF-k β) inhibisyonu ile ilişkilidir. Özellikle de NF-k β , interlökin (IL)-1 ve -6, TNF- α , limfotoksin, granulosit makrofaj koloni-uyarıcı faktörü (GM-CSF) ve interferonun (IFN)-y üretilmesine katkıda bulunmaktadır. NF-k β çoğu resting hücrelerde NF-k β 'nin nükleer lokalizasyon sekansları için bir inhibitör görevini gören kB (IkB)-proteinlerine bağlanır ve sitoplazmanın içinde hapsolür. Çalışmalar, Sm'nin TNF- α 'ya bir yanıt olarak NF-k β aktivasyonunu baskılayan kuvvetli bir inhibitör olduğunu ve bu etkinin de IkB'nin fosforilasyon ve aşamalı bozulmanın (degradation) baskılanması ile ortaya çıktığını göstermiştir [54]. Aynı zamanda p65 alt birim nükleer translokasyonunu ve NF-k β -bağımlı raportör gen transkripsiyonunu düşürür. Sm aynı zamanda forbol ester, lipopolisakkarit, okadaik asit ve seramidin neden olduğu NF-k β aktivasyonunu bloke ettiği gözlemlenirken, hidrojen peroksit nedenli NF-k β aktivasyonunun bundan önemli ölçüde etkilenmediği gözlemlenmiştir [55].

Sm'nin, çeşitli anti-inflamatuvar ajanların yol açtığı NF-k β aktivasyonu üzerindeki etkileri çalışılmış [55] Sm'nin aynı zamanda TNF- α 'nın tetiklediği MAPK ve JNK'nin aktivasyonu, TNF nedenli hücre zehirlenmesi (sitotoksosite) ve kaspaz aktivasyonlarını da engellediği gösterilmiştir. Tetrindirle birlikte verilen Sm'nin, dimetilnitrozamin (DMN) verilen sıçanların karaciğerinde metallothionin gen transkripsiyonunu ve NF-k β 'nin aktive ettiği yolakları zayıflattığı gözlenmiştir [56]. Sm, insanların mezenşial hücrelerinde TNF- α , IL-1 beta nedenli NF-k β aktivasyonu, TNF- α nedenli hücre içi kalsiyum ve tek hücreli kemotaktik protein-1 (MCP-1) ifadesini doza bağlı olarak engellediği bildirilmiştir [57]. Sm'nin endotoksin nedenli septisise karşı koruyucu etkisi vardır ve aynı zamanda IL-1 beta ve prostaglandin (PG)-E2'nin üretimi üzerinde engelleyici bir rolü bulunmaktadır [58]. Sm, doza bağlı olarak hem sitokin nedenli nitrik oksit (NO) üretimini ve sıçan

beta hücrelerinin ölümünü ve ayrıca insanın pankreatik adacık hücrelerinde IL-1 beta ve IFN- γ nedenli NO üretimini ve beta hücre bozulmasını önlemektedir [59].

2.3.3. Silmarin'in Hücre Yaşam Döngüsündeki Rolü

Hücre yaşam döngüsünün ilerleme ve bölünmesindeki normal gidişatın bozulması malign dönüşümde görülen önemli bir olaydır. Hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesi bir grup siklin, SBK'lar ve SBK inhibitörleri tarafından kontrol edilmektedir. Aralarında prostat [51-53,60], yumurtalık [61], göğüs [62], akciğer [63], cilt [54], ve mesanenin de [64,65] bulunduğu çeşitli kanser türlerinde, tümörlü hücrelerin çoğalması üzerinde Sm'nin baskılayıcı bir rolü olduğu rapor edilmektedir. Çeşitli bilimsel makaleler, Sm hücre çoğalmasını hücre yaşam döngüsünün ilerleyişini, hücre döngüsünün farklı aşamalarında inhibe etmekte olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmanın sonucuna göre, Sm insanda görülen prostat kanserindeki LNCaP, PC3, ve DU145 hücrelerinde G1 ve/veya G2-M noktalarında durmaya neden olmaktadır. Sm, CDK inhibitörleri olan Cip1/p21 ve Kip1/p27 inhibitörlerini tetiklemekle birlikte, CDK2 ve CDK4 ve G1 noktasında durmaya neden olan ilgili kinaz aktivitelerinde azalmaya sebep olmaktadır [54].

Silibinin tedavisi, hücre büyümesinde doza ve zamana bağlı olarak bir inhibisyon gerçekleştiğini ortaya koymuş ve beraberinde mesane transizyonel hücreli kanser (TCC) hücreleri, T-24 (yüksek-düzye tümör) ve TCC-SUP (yüksek düzey invazif tümör) de G1 noktasında durma gerçekleştiğini göstermiştir. Buna ilave olarak, yüksek konsantrasyondaki silibinin TCC-SUP hücrelerinde G2/M noktasında durmaya sebep olmuş ki, bunun yanı sıra pCdc25c (ser16), Cdc25c, pCdc2 (Tyr15), Cdc2 ve siklin B1 protein düzeylerinde düşüş gözlenmiştir [65]. Sm tedavisinin androjen bağımlı (LNCaP) ve androjenden bağımsız (PC3 ve DU145) prostat kanseri hücrelerinin büyümesine engel olduğu bildirilmiştir [48]. Sm aynı zamanda insanda görülen göğüs kanseri MDA-MB 468 hücrelerinde Cip1/p21 de artışa ve CDK'nın kinaz aktivitesinde ve ilgili siklinlerde düşüşe neden olduğu için hücre yaşam döngüsünü G1 noktasında durdurmaktadır [62].

Sm tedavisi sayesinde Cip1/p21, CDK2 ve CDK6'ya bağlanmış ve buna paralel olarak da siklin D1 ve E de gözlenen bir düşüş ile birlikte, CDK6-siklin ile yapılan çalışmalarda aynı zamanda gösterilmiştir ki, Sm ve silibinin G1 faz siklinlerini-CDKlar-CDK inhibitörlerini G1 noktasında ve Chk2-CDc25C-

Cdc2/siklin B1 yolağını ise G2 noktasında durma için ayarlama/düzenleme yapar ve bunun yanı sıra da hayati öneme sahip olan hücre yaşam döngüsü düzenleyicilerinin değişime uğramış hücre içi (subcellular) lokalizasyonuna yol açmaktadır [54]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar silibinin, SKH1 kılsız sıçanların anti-inflamatuvar ve anjiyojenik yanıtlarında görülen hücre büyümesi, mikrodamar yoğunluğu ve downregülasyonda UVB nedenli artışı engellediğini göstermiştir [66]. Başka çalışmalarda da silibinin p21/CDK4 ve p27/CDK4 komplekslerini önemli ölçüde yukarı doğru regüle etmiş ve Rb-fosforilasyon ve E2F1/DP1 kompleksini de aşağı doğru regüle etmiş ve böylelikle de insanlarda görülen bir karaciğer tümörü olan Huh7 hücre büyümesini engellemiştir [67]. Yapılan birçok çalışmada, Sm den izole edilen ve izosilibin B ve izosilibin A olarak bilinen iki saf bileşenin, insanda görülen prostat kanseri LNCaP ve 22Rv1 hücrelerinde hücre yaşam döngüsünün durması ve apoptoza gitmesi ile ilişkili olduğu tespit edilen bir anti-kanser aktivitesi ortaya çıkartılmıştır [49]. Bu çalışmalar Sm'nin kanseri önleyici ve tedavi edici özelliği sayesinde hücre yaşam döngüsünü düzenlenmesi, Sm'nin çalışma mekanizmaları arasında kabul edildiğini göstermektedir.

2.3.4. Apoptozun Tetiklenmesinde Silmarin'in Rolü

Birçok fizyolojik ve patolojik hastalıkta meydana gelen apoptoz, diğer adıyla programlanmış hücre ölümü, kanserde en çok öne çıkan konulardan biri olarak bilinmektedir. NF- κ B ve AP-1 aktivasyonunu engellediği bilinen birçok bitkisel ilaç, hücre çoğalmasını baskılayabilir ve hücreleri apoptoz indüksiyonuna duyarlı hale getirebilir. Çalışmalarda Sm'nin antikanser etkileri, hücre yaşam döngüsünü durdurduğu ve farklı tip kanserlerde apoptozu tetikleyerek etkisini gösterdiği rapor edilmektedir. Li ve ark. [68] Sm ile tedavi edilen insandaki kötü huylu kara tümör A375-s2 hücrelerini (derinin melanosit hücrelerinden kaynaklanan habis bir tümör) Fas bağımlı protein ölüm bölgesinin ifadesini artırarak apoptoza götürdüğünü gözlemlemişlerdir. İnsanlarda ultraviyole ışın verilen kötü huylu kara tümör A375-s2 hücrelerinde, Sm bir çeşit hücre yaşam proteini olan SIRT1'i aktive etmenin yanı sıra, Bax ve poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ifadesini aşağıya doğru regüle eder ve bu esnada da sitokrom c salınımı

azalmış olup G2-M noktasında da durma gerçekleştiği yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır [69].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Sm'nin izomerleri (diastereomerler), PARP, kaspaz 9 ve kaspaz 3 de kırılmalara neden olarak ve insanda görülen prostat kanseri ve LNCaP ve 22Rv1 hücrelerindeki survivin düzeylerini düşürerek hücreyi apoptoza götürdüğünü belirtmişlerdir [48]. Benzer sonuçlar aktif Stat3'ün inhibisyona uğramasından dolayı DU145 hücrelerinde de gözlemlendiği vurgulanmıştır. Silibinin, prostat kanseri PC-3 hücrelerinde bulunan bir çeşit topoizomeraz II inhibitörü olan mitoksantronun büyümeyi-engelleyici özelliğini, artan apoptozun neden olduğu hücre canlılığını zayıflatarak meydana getirdiğini göstermektedir [70]. Sm insanda görülen K562 lösemi hücrelerinde, PARP yarıklarına yol açmanın yanı sıra kaspaz 9 ve 3'ün aktivasyonu ile ilişkili Akt aktivitesini inhibe ederek hücreyi apoptoza götürmektedir [71]. Çalışmalar aynı zamanda p53-kaspaz 2 aktivasyonu ve mesane tranzisyonel hücre papilloma (RT4) hücrelerinde kaspaz aracılığıyla gerçekleşen Cip1/p21 kırılmasını içeren silibininin tetiklediği apoptoz olayını da göstermişlerdir [72]. Silibin aynı zamanda survivini aşağıya doğru regüle ederek ve aktif hale gelmiş olan kaspaz-3 ve 9'u da yukarıya doğru regüle ederek insanda görülen karaciğer kanserinde apoptozu tetiklemektedir [67]. Yapılan bir diğer deneysel çalışmada Sm takviyeli beslenme biçimi, erkek F344 sıçanlarda 3,2'-dimetil-4-aminobifenil ile oluşturulan prostat kanserini apoptozu artırarak ve hücre büyümesini azaltarak inhibe ettiği sonucuna varılmıştır [73].

2.3.5. Silmarin'in Anti-Oksidan Etkileri

Hem Sm hem de silibinin anti-oksidan etki gösterir ve birçok *in vitro* ve *in vivo* hücre modelinde yükseltgenme-indirgenme (redoks) homeostaz desteğini sağlamaktadır. Kiruthiga ve ark. [77], H₂O₂ ye maruz kalan alyuvarlarda Sm'nin verilmesi ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmanın yanı sıra bir lipid peroksidasyon göstergesi (marker) olan malondialdehit (MDA) düzeylerinde düşüşe neden olduğunu göstermişlerdir [76]. Sm, insan keratinositlerinde ultraviyole radyasyonundan

kaynaklanan hasarın tedavisinde kullanıldığında GSH tüketimini, ROS üretimini ve lipit peroksidasyonu büyük ölçüde düşürmektedir.

Yapılan çalışmalar, ultraviyole kaynaklı DNA tek dizili kırılmalar ve kaspaz-3 aktivitesi Sm tarafından büyük ölçüde azaltıldığı rapor edilmiştir [77]. Ayrıca Sm farelerin üst deri kısmındaki epidermal mikrozomlarda doza bağlı olarak MDA oluşumunu engellediği, TPA ve benzoil peroksit (BPO) kaynaklı lipit peroksidasyonunu baskıladığı ve bu da Sm'nin *in vivo* ortamda güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [50]. Deneysel çalışmalar, Sm'nin ultraviyole kaynaklı H₂O₂ üretimini önemli ölçüde engellediği ve serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliklerinin kemoterapiye bağlı toksisitesinin başlama ve ilerleyişini önleyebileceği veya azaltabileceğini göz önünde bulundurduğunda, akut lenfoblastik lösemi hastalarında ağızdan verilen (5,1 mg/kg/gün dozlarında) Silifoz (Siliphos) ilacının kemoterapiye bağlı karaciğer zehirlenmesi üzerinde koruyucu etki gösterebileceği fikrine varılmıştır [78].

2.3.6. Silmarin'in *In Vitro* Çalışmalarda Kansere Karşı Etkileri

Sm'nin kansere karşı olan, insanda görülen göğüs kanseri, cilt kanseri, androjene bağlı ve androjenden bağımsız prostat kanseri, rahim ağzı kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, karaciğer hücre kanseri, mesane kanseri ve akciğer kanser hücrelerinde görülmüştür [50-52]. İnsanda görülen prostat kanseri LNCaP ve 22Rv1 hücrelerin tedavisi için verilen ve Sm'nin aktif bileşenlerinden (izosilibin B ve izosilibin A) oluşan bir tedavi biçiminin sonuçlarına göre, hücre büyümesinde azalma ve hücre ölümü gerçekleşmiş; ayrıca G1 kontrol noktasında güçlü bir durma ve apoptoza giden hücre ölümüne de rastlanmıştır [49]. Yapılan *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki, silibinin temel olarak aktif olan Stat3'ü inhibe eder ve DU145 hücrelerini apoptoza götürür ki, buna dayanarak denilebilir ki silibinin önemli bir tedavi edici potansiyele sahiptir. Doksorubisin ve sisplatin ile birlikte verilen silibinin maddesinin benzer sinerjik etkileri göğüs ve yumurtalık kanseri hücre dizelerinde de rapor edilmiştir [61].

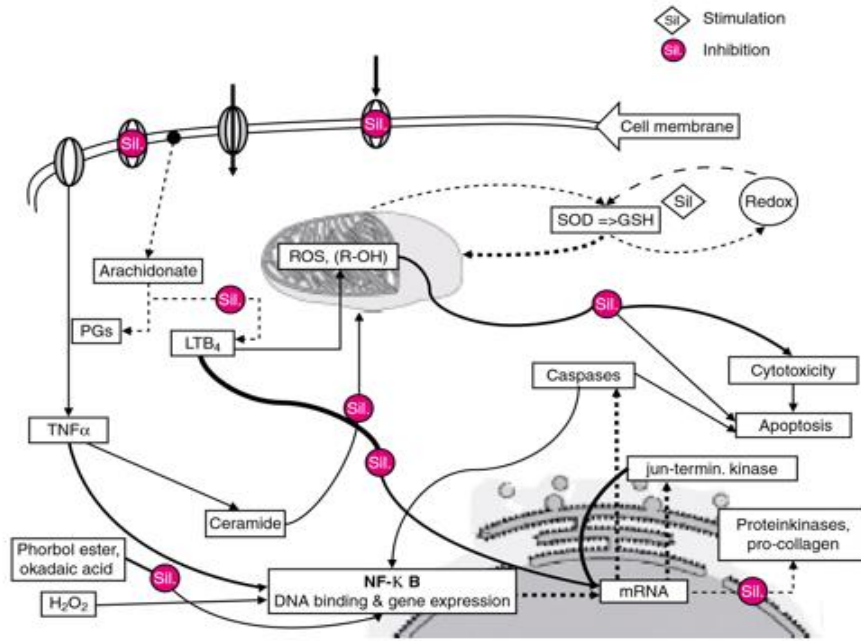
2.3.7. Silmarin'in *In Vivo* da Kansere Karşı Etkileri

Sm'nin, kimyasal maddelere bağlı gelişen kanser, yabancı doku aşısı (ksenogref) ve çeşitli transgenik modellerde etkili olduğu gösterilmiştir. Literatürde Sm'nin 12-*O*-tetradesanol-forbol 13-asetat (TPA) kaynaklı tümör gelişimine karşı

epidermal ornitin dekarboksilazın aktivite ve ifadesini inhibe ederek gösterdiği ilk kez rapor edilmiştir [79]. Başka çalışmalar da şunu göstermiştir ki, Sm kimyasal madde ve ultraviyole ışıklardan kaynaklanan cilt kanserleşmesinde önemli bir baskılayıcı maddedir [54]. Son zamanlarda, Gu ve ark. [66] SKH-1 kılız farelerde topikal veya diyetle ilişkili verilen silibinin, hücre çoğalması, iltihap ve kan damarı oluşumunu engelleyerek, ultraviyole B kaynaklı fotokanserojene karşı güçlü bir koruyucu etkiye yol açtığını rapor etmişlerdir. Zi ve ark. [54] yaptıkları çalışmalarda, diyetle eklenmiş silibinin, ultraviyole B ışıklarından kaynaklanan ve aralarında timidin, dimer-pozitif hücreler, çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ifadesi ve apoptoza yol açan güneş yanığı hücrelerinde bulunduğu cilt hasarlarını önlediğini rapor etmişlerdir. Silibinin aynı zamanda MAPKs familyasından ERK1/2, JNK ve p38 gibi ve akut veya kronik şekilde ultraviyole B ışıklarına maruz kalmanın sonucunda SKH-1 fare cildinde ortaya çıkan Akt aktivasyonunu da engellediğini rapor etmişlerdir [54].

Prostat kanseri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, Sm diyetle eklenerek verildiğinde erkek F344 sıçanlarda 3,2-dimetil-4-aminobifenil (DMBA) kaynaklı prostat kanseri vakasının gelişme oranını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir [73]. Atimik çıplak fare üzerinde yaptığımız laboratuvar çalışmalarında, diyetle eklenen silibinin insanda görülen ileri safha prostat tümör yabancı doku aşısının (ksenograft) büyümesini engellediği ve etkisine de prostat tümöründe hücre çoğalmasına karşı (antiproliferatif), apoptoza götürücü (pro-apoptotic) ve kan damarı oluşumuna karşı baskılayıcı görevini yaparak gösterdiği rapor edilmiştir [50,51]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, diyet içinde alınan silibininin fare prostatındaki transgenik beze tümöründe (adenokarsinom) TRAMP tümörün büyüüp ilerlemesini engellediği ve bu etkiyi de CDK'lar ve CDK inhibitörleri, insüline benzer büyüme faktörü (IGF)-1 ve IGF bağlayıcı protein (IGFBP)-3'ün ifadesini değiştirerek gerçekleştirdiğini göstermiştir [50]. Başka çalışmalar da göstermiştir ki, erkek ICR farelerinde N-butyl-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin verilerek neden olunan mesane kanserinde silibininin verildiğinde, silibinin hücre yaşam döngüsünde durmaya ve hücrenin apoptoza gitmesine yol açtığı belirtilmiştir [64]. Agarwal ve ark. [80] çalışmalarında survivini aşağıya doğru regüle ederek artış gösteren apoptoz ile birlikte p53 ifadesinde bir artış meydana getirerek

silibinin, atimik çıplak farede insan mesane tümör ksenografinin büyümesini engellediğini vurgulamışlardır [80]. Vihn ve ark. [81] ise Sm'nin çeşitli mesane lezyonlarında bromo-üridil (BrdU) için etiketleme indeksini ve siklin D1 pozitif hücre oranını düşürdüğü ve yapılan başka bilimsel çalışmalarda da, A/J farelerinde üreteran nedenli akciğer kanserinde silibinin maddesinin zehirli kimyasal maddelerin birikimine karşı olan etkisi değerlendirilmeye çalışılmıştır [81]. Diyete silibinin takviyesi, hücre çoğalması, iltihap ve kan damarı oluşumunda rol alan proteinlerde değişikliklere yol açarak üreteran kaynaklı akciğer tümörünü önemli ölçüde baskıladığı rapor edilmiştir. Sm'nin kansere karşı etkili olduğu aynı zamanda kolon kanserinin hem in vivo hem de in vitro modellerinde gösterilmiştir. Volate ve ark. [82] yaptıkları bir çalışmada Sm'nin sıçanlarda azoksimetan (AOM) kaynaklı bir kolon kanseri modelinde ACF (aberrant crypt foci) sayısını önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir. Kohno ve ark. [83] ise çalışmalarında, Sm'nin 4 hafta boyunca diyet ile verilmesi (100, 500 ve 1000 ppm oranlarında) AOM (kansere yapıcı madde)'ye maruz kaldığı esnada veya ondan sonraki aşamada, doza bağlı olarak kolonik ACF'nin sıklığında önemli düşüşe neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca uzun bir süre devam eden bir çalışmaya göre içinde Sm bulunan beslenme türü (100 ve 500 ppm oranlarında) AOM kaynaklı kolon kanserininin başlangıç ve başlangıç sonrası aşamalarda kolonik bez kanserinin görülme sıklığı ve çeşitliliğini azalttığı vurgulanmıştır [83,84].



Şekil 2.4. Sm'nin hepatoprotektif özelliklerine uygun ana farmakolojik etkilerinin şematik gösterimi. Hücre membranları (üst sol) ve hücre içi kaskadlar üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Metabolik yollar kesik çizgilerle gösterilmiştir. Sinyal etkileri tam çizgilerle gösterilmiştir. LTB₄ = lökotrien B₄; GSH = glutatyon, NF-KB = nükleer faktör kappa B; PGler = prostaglandinler; Sil = silimarin; SOD = süperoksit dismutaz; ROS= reaktif oksijen türleri; TNF- α = tümör nekroz faktör alfa [13]

2.4. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)

Katı lipit nanopartiküller (KLN), 1991 yılında mevcut koloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak ortaya atılan; yağ/su tipi mikro emülsiyonların dondurarak kurutulması veya katı lipit ve lipit karışımlarının yüksek basınçla homojenizasyonu sonucu oluşan, koloit boyutta, yüzeyinde tek tabaka halinde fosfolipit molekülü bulunan bir katı hidrofobik çekirdekten ibaret, lipozom ve nanopartikül arasında bir yapı olan, ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan katı nanopartiküllerdir [85,86,87]. 1960 yılında ilk güvenilir parenteral yağ emülsiyonu Intralipit Wretlind tarafından parenteral beslenme amacıyla geliştirilmiştir. Bu lipofilik ilaçlar için yeni taşıma sistemlerinin başlangıcıdır. Başarılı market ürünleri diazemuls ve düziprivan bu taşıma sistemlerinin ilk örneklerindedir [88]. Ancak ilaç içeren emülsiyonlar, zeta potansiyele bağlı olarak kümeleşme, ilacı

hapsedememe ve emülsiyonun bozulması gibi kritik fiziksel stabilite sorunlarına sahiptirler [89].

Diğer bir taşıyıcı sistem ise lipozomlardır. Fosfolipit veziküller lipozomlar olarak 1965 yılında Bangham tarafından yeniden adlandırılmıştır ve kendilerine marketlerde ilk yerlerini 1986 yılında bulmuşlardır. Kozmetik bir anti-aging ürünü olan Capture (Dior) ilk lipozom tabanlı farmasötik üründür. Bundan sonra yapılan çalışmalarla taşıyıcı sistem olarak farmasötik alanda araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. İlk farmasötik ürünler marketlere 80'li ve 90'lı yıllarda gelmiştir [85]. Bunlara ilk örnekler;

Sentetik akciğer surfaktantı Alveofact (Dr. Karl Thomae GmbH/Biberach in Germany),

Pulmoner amaçlı Epi-Pevaryl,

Topikal olarak anti mikotik Econazole,

Amphotericin'in intravenöz injeksiyonu için Ambisome,

Sitotoksik içerikli intravenöz Doxil ve

Sitotoksik içerikli intravenöz Daunosome [90]

Bu ürünler yüksek potansiyelli özel ilaçların toksik yan etkilerini azaltmak ve tedavi etkinliğini artırmak için geliştirilmişlerdir. Lipozom formülasyonların geliştirilmesindeki ana engeller ise dispersiyonun sınırlı fiziksel stabilitesi, ilaç sızıntısı, spesifik olmayan hedeflendirmeye bağlı düşük aktivite, mononükleer fagositer sistem tarafından temizlenme ve üretim zorluklarıdır [85] .

Biyodağılır ya da biyodağılım göstermeyen polimerler aracılığıyla yapılan polimerik nanopartiküller ise diğer yenilikçi taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemlerin avantajları alana spesifik hedefleme ve yüklü ilaçların kontrollü salınımını sağlamalarıdır. Ancak 30 yıllık araştırmaların sonunda polimerler taşıyıcı sistem olarak çok fazla yer almamışlardır. İstisnai olarak Nycomed firması tarafından üretilen Abdoscan örnek olarak verilebilir ancak bu da kronik terapötik bir ürün

değil sadece diyagnostik bir ajandır. Ayrıca polimerik nanopartiküllerin büyük çapta üretimi problemlidir.

Bu gelişmeler üzerine 1990'lı yıllarda farklı araştırma grupları alternatif nanopartiküller olan katı lipit nanopartiküllere odaklanmıştır [91,92]. KLN diğer taşıyıcı sistemlerin fiziksel stabilite, hapsedilmiş ilaçların degradasyondan korunması, kontrollü salınım, iyi tolere edilebilme gibi avantajlarını bir araya getirmiştir. Aynı zamanda karşılaşılan problemleri de en aza indirmiştir. KLN formülasyonları farklı uygulama yolları için geliştirilmiş ve bu alanda in-vivo ve in vitro karakterize edilmiştir [93,94]. İlk ürün Polonya'da marketlere sunulan topik uygulanan bir krem olan Nanobase Yamanouchi'dir. 2000'li yıllara gelindiğinde KLN'lerin modifiye edilmesiyle geliştirilen ve nano yapılı lipit taşıyıcılar (NLC) ve lipit ilaç konjugatları (LDC) da literatürlere girmiştir.

KLN'ler katı lipitlerden yapılmış oda ve vücut sıcaklığında katı olan surfaktantlar tarafından stabilize edilmiş partiküllerdir. Tanımsal olarak lipitler yüksek derecede saflaştırılmış trigliseritler, kompleks gliserit karışımları hatta wax'lar bile olabilir. Farklı araştırma gruplarının çalışmaları sayesinde, KLN'ler taşıyıcı sistem olarak geniş bir şekilde karakterize edilmişlerdir. İlk patentler 1993 ve 1996 yıllarında yeni üretim metotları iddiası içererek alınmıştır.

Katı lipit nanopartiküller emülsiyonlara alternatif ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Emülsiyonlar ve lipozomlar gibi KLNler de fizyolojik olarak iyi tolere edilebilir farmasötik olarak insana uygulanabilirliği onaylanmış içeriğe sahiptirler. Polimerlere benzer olarak sahip oldukları katı matriks aktif içerikleri kimyasal degradasyona karşı korur ve ilaç salınım şekilleri oluşumuna olanak verir. KLN'ler toksik çözücüler kullanılmadan üretilirler ve büyük çapta üretime uygundur. Bunların yanı sıra katyonik maddeler kullanılarak hazırlanan KLN'ler gen taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır [95].

2.4.1. KLN'lerin Özellikleri

KLN'ler genel olarak katı lipitler, emülgatörler ve sudan oluşmaktadır. Lipit terimi geniş anlamda kullanılmaktadır ve trigliseridleri (tristearin vb.), kısmi gliseridleri (Imwitor vb.), yağ asitlerini (stearik asit vb.), steroidleri (kolesterol vb.)

ve mumları (setil palmitat vb.) içermektedir. Lipit dispersiyonunu stabilize etmek için, yüklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak bütün emülgatör tipleri kullanılabilir. %1-5 emülgatör veya emülgatör/yardımcı emülgatör kompleksi ile stabilizasyon sağlanmaktadır. Emülgatörün seçimi, uygulama yoluna bağlıdır.

Parenteral uygulamalar için kullanılacak emülgatörler oldukça sınırlıdır. Emülgatör amaçlı kullanılan maddelere örnek olarak lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbattlar verilebilir [95,96].

2.4.2. KLN'lerin Avantaj ve Dezavantajları

KLN'ler; lipozomların, emülsiyonların ve katı partiküllerin sağladığı avantajların kombinasyonunu içeren ekonomik taşıyıcı sistemlerdir. Düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisiteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması gibi yağ emülsiyonlarının ve dokulara etkin madde hedeflenebilmesi gibi lipozomların avantajlarını taşımaktadırlar. Katı lipit matrisleri sayesinde kontrollü etkin madde salımı ve kimyasal bozulmaya karşı etkin maddelerin korunması gibi katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarına da sahiptirler [96,97]. Kolloidal büyüklükte olup, lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler hapsedilebilir, otoklav veya gama ışınları ile sterilizasyon sağlanabilir. Sulu dispersiyonları uzun süre sabit olması alternatif olarak, dondurarak veya püskürterek kurutma uygulanabilir. Yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile belirli dokulara ilaç hedeflemesi yapılabilir [85,95,97,98,99].

Pek çok avantaja sahip olmalarına rağmen; nispeten düşük etken madde yükleme kapasitesine sahip olmaları, saklama sırasında görülebilen polimorfik geçişler nedeniyle etken maddenin taşıyıcıdan dışarı sızabilmesi, ortamda farklı kolloidal yapıların da bulunabilmesi dezavantajlarını oluşturmaktadır [95,86].

2.4.3. KLN Hazırlama Yöntemleri

1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH), KLN üretimi için güvenilir ve etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Yüksek basınçlı homojenizatörler, sıvıyı birkaç mikron genişliğindeki dar bir delikten, yüksek bir basınçla (100-2000 bar)

iterler. Sıvı, çok kısa bir mesafede çok yüksek bir hıza (1000 km/saat'in üzerinde) ulaşır. Çok yüksek kayma stresi (gerilimi) ve kavitasyon kuvvetleri, partikülleri mikron altı büyüklüğe parçalar [95]. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir:

a) Sıcak Homojenizasyon

Sıcak homojenizasyon, lipitin erime noktasının üstündeki sıcaklıklarda gerçekleştirilir ve bu nedenle, emülsiyonun homojenizasyonu olarak değerlendirilebilir [95]. Etkin madde, erime noktasının 5-10 °C üzerinde bir sıcaklıkta eritilmiş olan lipit içerisinde çözülür veya disperse edilir. Etkin madde içeren erimiş lipit, aynı sıcaklıktaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırma ile disperse edilir. Elde edilen sıcak pre-emülsiyon homojenizatörden geçirilir ve sonuçta oluşan sıcak Y/S nanoemülsiyonu oda sıcaklığına soğutulur. Bu şekilde lipit katılaşır (rekristalize olur) ve katı lipit nanopartiküller elde edilir [86,100]. Bununla birlikte, kısa zincirli yağ asitlerinden oluşan veya düşük (oda sıcaklığına çok yakın) erime noktasına sahip olan gliseridler kullanıldığında, rekristalizasyonu başlatabilmek için, nanoemülsiyonları daha düşük sıcaklıklara soğutmak gerekli olabilir. Rekristalizasyon, liyofilizasyon ile de başlatılabilir [100]. Partikül büyüklüğünün küçük olması ve emülgatörlerin varlığı nedeniyle, lipit rekristalizasyonu çok gecikebilir ve ürün, uzun aylar boyunca bir aşırı soğutulmuş karışım (supercooled melt) olarak kalabilir [95]. Sıcak homojenizasyon yöntemi, sıcağa duyarlılığı düşük etkin maddeler için uygundur. Çünkü yüksek sıcaklığa maruz kalınan süre nispeten kısadır. Ancak, yüksek sıcaklığa karşı çok duyarlı olan bileşikler ve hidrofilik özellikteki etkin maddeler için soğuk homojenizasyon yöntemi kullanılmaktadır [100].

b) Soğuk Homojenizasyon

Etkin maddenin içinde çözüldüğü veya disperse edildiği erimiş lipit, kuru buz veya sıvı nitrojen kullanılarak hızla soğutulur. Katı lipit, yaklaşık 50 – 100 µm boyutundaki lipit mikropartiküllere öğütülür. Katı lipit mikropartiküller, soğuk

emülgatör çözeltisinde disperse edilir. Elde edilen pre-süspansiyon, oda sıcaklığında veya oda sıcaklığının altında yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilir. Sonuçta katı lipit nanopartiküller elde edilir [95,86,100].

Soğuk homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon yönteminde ortaya çıkan; sıcaklıkla etkin madde degradasyonunun indüklenmesi, homojenizasyon sırasında etkin maddenin sulu fazda dağılması, nanoemülsiyonun lipit rekristalizasyonunun güçlüğü gibi problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir [95]. Her iki homojenizasyon tekniği de, %40'a kadar olan lipit konsantrasyonlarında işlem yapmak için uygundur ve genel olarak, dar partikül büyüklüğü dağılımları vermektedir [86].

2. Mikroemülsiyon Yöntemi

Gasco ve ark, mikroemülsiyonların dilüsyonuna dayanan bir KLN hazırlama yöntemi geliştirmişlerdir [98]. Bu yöntemde önce, lipit (yağ asitleri veya gliseridler) eritilir. Su, emülgatör ve koemülgatör karışımı, lipitle aynı sıcaklıkta olacak şekilde ısıtılır ve erimiş lipite eklenerek karıştırılır. Bu maddeler, mikroemülsiyon oluşumu için gerekli oranlarda karıştırıldığında, transparan ve termodinamik olarak stabil bir sistem elde edilir. Oluşan sıcak veya ılık mikroemülsiyon, özel olarak geliştirilen termostatlı bir şırınga kullanılarak, aşırı miktardaki soğuk su (2–3 0C) içinde mekanik bir karıştırma ile disperse edilir. Sıcak mikroemülsiyon: soğuk su hacim oranı, 1:25 ile 1:50 arasında değişebilmektedir. Fazla su, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile uzaklaştırılır [95,86,100].

3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi

Çözücü emülsifikasyon- evaporasyon yönteminde; lipit, su ile karışmayan organik bir çözücüde (toluen, kloroform vb) çözülür ve bu çözelti, bir sulu faz içinde emülsifiye edilir. Çözücünün vakum altında buharlaştırılmasıyla, lipit nanopartikülleri oluşarak çöker. Bu yöntemin önemli bir avantajı, hazırlama sırasında ısı uygulanmamasıdır. Bu nedenle, yüksek sıcaklıkta bozulan etkin maddelerin yüklenmesi için uygun bir yöntemdir [95]. Yöntemin dezavantajı ise,

organik çözücü kullanımının gerekmesidir. Buna ek olarak, bu yöntem ile üretimin ölçek büyütme işleminin gerçekleştirilmesinde de problemler ortaya çıkmaktadır [100]. Bu yöntem ile elde edilen ürünün ortalama partikül büyüklüğü, organik fazdaki lipitin konsantrasyonuna bağlıdır [95]. Çözücü difüzyon yönteminde; su ile kısmen karışabilen çözücüler (benzil alkol, etil format vb) kullanılmaktadır. Lipit, su ile doyurulmuş çözücüde çözülür ve yüksek sıcaklıktaki, çözücü ile doyurulmuş sulu emülgatör çözeltisi ile emülsifiye edilir. Aşırı miktarda (1:5 – 1:10 oranlarında) suyun eklenmesinden sonra, organik çözücünün emülsiyon damlacıklarından sürekli faza difüzyonu nedeniyle KLN'ler çöker. Oldukça seyreltik olan dispersiyon, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile konsantre hale getirilmektedir [98]. Trotta ve ark. [101], çözücü difüzyon yöntemi ile ve düşük toksisiteye sahip oldukları kabul edilen çözücülerini ve emülgatörlerini kullanarak, gliserin monostearat nanopartiküllerinin hazırlanabilirliğini araştırmışlardır. Benzil alkol veya bütil laktat kullanılarak, emülsifikasyon difüzyon yöntemi ile katı lipit nanokürelerin üretiminin mümkün olduğunu göstermişlerdir [101].

4. Yüksek Hızda Karıştırma ve / veya Ultrasonikasyon Yöntemi

Her iki yöntemde, yaygın olarak kullanılan ve uygulanması kolay yöntemlerdir. Genellikle bu yöntemler bir arada kullanılmakta ve belli bir süre boyunca yüksek sıcaklıklarda uygulanmaktadır. Yüksek hızda karıştırma yönteminin dezavantajı, mikrometre büyüklüğüne varabilen geniş partikül büyüklüğü dağılımına sahip ürün vermesidir. Bu da, saklama sırasında partikül büyümesi gibi fiziksel stabilite problemlerine sebep olmaktadır. Bunlara ek olarak, ultrasofinikasyon yöntemi kullanılıyorsa, metal kontaminasyonunun dikkate alınması gerektiğidir [95,86]. Hou ve ark. [102], KLN üretimi için, modifiye yüksek hızda homojenizasyon ve ultrason yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin, organik çözücüye ihtiyaç olmadan yüksek kalitede KLN'lerin hazırlanmasında kullanılabilir, basit, uygun ve etkin bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir [102].

2.4.4. KLN'lerin Karakterizasyonu

1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini

Partikül büyüklüğü ve dağılımı, koloidal taşıyıcı sistemlerin en önemli fizikokimyasal özelliğidir. Hazırlama yönteminin parametreleri, partikül

büyükliğini ve dağılımını etkileyen önemli faktörlerdendir. Basıncın ve devir sayısının artırılması ile partiküllerin büyüklüğünde azalma olduğu belirlenmiştir. Üretimde kullanılan emülgatörün tipi ve miktarı da, partikül büyüklüğünü etkilemektedir. Genellikle, emülgatör miktarını belirli bir orana kadar artırmak, ortalama partikül büyüklüğünü azaltmaktadır. Emülgatörler, KLN'lerin hazırlanması sırasında, damlacıkların yüzeylerini kaplayarak damlacık kümeleşmesini ve uzun dönemdeki partikül birleşmesini önleyecek mekanik veya elektriksel engel oluşturmaktadır. Damlacıkların stabilitesi yeterince sağlanabilirse, katılaştırma işleminden sonra elde edilen partiküllerin büyüklüğü nanometrik aralıkta olmaktadır [96]. Partikül büyüklüğünün rutin ölçümleri için en güçlü yöntemler; foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı yöntemi (LD)'dir. Coulter Counter yöntemi ise, koloidal dispersiyonları destabilize edebilecek elektrolitlere ihtiyaç göstermesi ve küçük nanopartiküllerin değerlendirilmesindeki zorluklar nedeniyle, KLN'lerin partikül büyüklüğü ölçümünde nadiren kullanılmaktadır [95].

2. Partikül Şekli Tayini

KLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde, diğer partiküler sistemlerde olduğu gibi, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve elektron mikroskobu kullanılabilir. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküllerin şekilleri, AFM ile vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmektedir [96].

3. Zeta Potansiyel Ölçümü

Zeta potansiyelinin ölçülmesi, koloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Ancak bu kural, sterik stabilizatörler içeren sistemler için tam olarak geçerli olmamaktadır. Çünkü sterik stabilizatörlerin adsorpsiyonu, zeta potansiyelini azaltmaktadır [95].

2.4.5. KLN'lerin Stabilitesi

Kolloidal bir ilaç taşıyıcı olarak KLN'nin kullanılması için çok önemli bir özellik, KLN'lerin uzun süreli fiziksel ve kimyasal stabilitesidir (105). Optimize

edilen sulu KLN dispersiyonlarının partikül büyüklüklerinin, 12-36 ay boyunca stabil kalabildiği gösterilmiştir. Ancak, bu bütün KLN dispersiyonları için genel bir özellik değildir ve pek çok durumda, daha kısa sürede partikül büyüklüğünde artış gözlenebilmektedir [95]. Bir diğer problem ise, hidrolize hassas etkin maddelerin varlığındaki kimyasal stabilite problemi (105). Sıvı dispersiyonun, kuru toz şeklinde bir ürüne dönüştürülmesi faydalı ve sıklıkla da gerekli olmaktadır. Elde edilen katı haldeki ürün, sulu lipit dispersiyonlarından daha iyi bir kimyasal ve fiziksel stabiliteye sahip olmaktadır. Ayrıca, KLN granülatları veya tozları; kapsüller içine doldurulabilmekte, tablet halinde basılabilmekte veya pelletler içine hapsedilebilmektedir [95].

KLN dispersiyonu dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) ve püskürterek kurutma (Spray drying) yöntemleriyle kuru toz şekline dönüştürülebilmektedir.

2.4.6. KLN'lerin Liyofilizasyonu

Liyofilizasyon, KLN'nin uzun süreli fiziksel ve kimyasal stabilitesini artırmak için umut vadeden bir yoldur. Katı şekle dönüşüm, partikül büyümesini ve hidroliz reaksiyonlarını önlemektedir [95]. Liyofilizasyon işlemi sırasında meydana gelebilecek partikül büyüklüğü artışını önlemek için, KLN dispersiyonunun lipit içeriği %5'i aşmamalıdır. Çünkü, seyreltilmiş dispersiyonlarda, lipit partiküllerinin birbirleriyle direkt teması azalmaktadır [95]. KLN'lerin liyofilizasyon sırasındaki agregasyonunu azaltmak, dolayısıyla partikül büyüklüğü artışını önlemek ve kuru ürünün daha iyi bir redispersiyonunu sağlamak için, kriyoprotektanların (dondurma işlemi koruyucuları) eklenmesi gerekmektedir. Farklı lipit nanopartiküller arasındaki teması önleyen yer tutucular olan kriyoprotektanların en tipik örnekleri; sorbitol, mannoz, trehaloz, glukoz ve PVP'dir [95]. Schwarz ve Mehnert de [103], intravenöz (i.v.) uygulama için kabul edilebilir özellikte KLN formülasyonları hazırlamışlar ve dondurarak kurutmuşlardır. Çeşitli konsantrasyonlardaki farklı kriyoprotektanların koruyucu etkilerini araştırmışlar ve %15 konsantrasyondaki trehalozun, dondurarak kurutma işlemi sırasında gerçekleşebilecek partikül büyümesini önlemede en etkin şeker olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, dondurma hızı ve redispersiyon yöntemi gibi parametrelerin optimize edilmesiyle, liyofilizasyon sırasında partikül büyüklüğü

dağılımındaki değişikliklerin minimuma indirilebileceği belirtilmiştir. Etkin madde içermeyen KLN'nin optimize edilmiş koşullar altında dondurarak kurutulması sonucu, yeniden yapılandırılabilme özelliği iyi olan bir liyofilizatın elde edildiği gösterilmiştir. Yeniden yapılandırılan KLN'ler, i.v. uygulama için partikül büyüklüğü dağılımı bakımından uygun olmuşlardır. Partiküllere etkin madde yüklenmesi, yeniden yapılandırılması kalitesini etkilemektedir. Ancak, etkin madde yüklü KLN'lerin liyofilizatlarının, mikropartiküllerin varlığı bakımından daha az kritik olan, örneğin oral yolla uygulanan formülasyonlar için kullanılabilmesi ve i.v. uygulanan bir ürün elde etmek için, liyofilizasyon parametrelerinin daha ileri optimizasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir [103].

2.4.7. KLN'lerin Sterilizasyonu

KLN'lerin sterilizasyonunda, formülasyonlarına bağlı olarak, otoklav, gama ışınları ve filtrasyon kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygun olmadığı durumlarda ise aseptik üretim önerilmektedir [95]. Otoklav sterilizasyonu sırasındaki fiziksel stabilite, KLN formülasyonunun bileşimine çok bağlıdır [100]. Ayrıca ürünün yüksek sıcaklıktaki fiziksel stabilitesi için, emülgatörün doğru seçilmesi büyük bir önem taşımaktadır [95]. Poloksamer serisi gibi, sterik olarak stabilite sağlayan polimerler kullanıldığında, 121⁰C'de otoklavlama gerçekleştirilememektedir. Çünkü, otoklavlama sıcaklığı, polimerin kritik flokülasyon sıcaklığına (CFT) çok yakındır ve polimer adsorbsiyon tabakası kısmen kollapsa uğramaktadır. Bu da, yetersiz stabilizasyon ve partikül agregasyonuna neden olmaktadır. Otoklavlama sıcaklığı azaltılıp (121⁰C'den 110⁰C'e) otoklavlama süresi uzatılarak bu durumdan sakınılabılır [100]. Sıcaklığa duyarlı formülasyonlar için, gama ışını sterilizasyonu, otoklav sterilizasyonuna alternatif bir yöntem olabilmektedir. Gama sterilizasyonu sırasında, gama ışınlarının yüksek enerjisi nedeniyle bütün formülasyonlarda serbest radikaller oluşmaktadır. Bu radikaller yeniden bir araya gelebilirler ve böylece formülasyonda bir hasar meydana getirmezler. Ancak bu yapılar, kimyasal modifikasyonlara neden olabilecek sekonder reaksiyonlara da girebilirler [95].

2.4.8. KLN'lerin Uygulama Yolları

KLN'ler oral, parenteral, topikal, pulmoner ve oküler yollarla uygulanabilir; aşı adjuvanı ve gen taşıyıcı sistem olarak da kullanılabilirler.

KLN'ler oral yolla, doğrudan sulu dispersiyonları halinde veya tablet, pellet, kapsül, kaşe gibi geleneksel dozaj şekillerine dönüştürülerek uygulanabilmektedir [95,100]. Polimerik nanopartiküllerin kullanıldığı bütün parenteral uygulamalarda, KLN'ler kullanılabilir [100]. KLN'lerin subkutan, intraperitonel, intravenöz ve intraartiküler uygulamaları sonucu, kontrollü ve sürekli salım ile birlikte düşük iritasyon etki elde edilmektedir [96]. Parenteral KLN'lerde, yağ asitlerinden oluşan gliseridler ve parenteral uygulamalar için kabul edilen emülgatörler (lesitin, Tween 80, Poloksamer 188, sodyumglikolat vb.) kullanılmaktadır [86,100].

KLN'ler lipozomlara benzer olarak, iyi tolere edilen yardımcı maddelerden oluşmaktadır ve küçük partikül boyutları nedeniyle, deri üzerinde film oluşumuna imkan veren benzer adhezif özelliklere sahiptirler [100]. Deriye uygulanan KLN dispersiyonunun kurutulmasından sonra yoğun bir filmin olduğu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Oluşan film tabakası, deri üzerinde iyi bir örtücü (okluzif) etki sağlamaktadır [95]. Topikal uygulamada KLN'nin sağladığı diğer avantajlar ise; kimyasal olarak dayanıksız bileşiklerin, katı KLN matrisi içine hapsedilerek korunması ve etkin maddenin kontrollü salımının sağlanabilmesidir [100].

Pulmoner yolla etkin madde taşınması için KLN'lerin kullanımı ile ilgili çok az çalışma yayınlanmıştır [100]. KLN'ler, küçük boyutta olmaları ve nefes verme ile hemen dışarı atılmaları nedeniyle, toz halde pulmoner yolla uygulanmazlar. Sulu dispersiyon şeklinde nebulizör ile verilirler. Bronşlarda ve alveollerde depolanır ve kontrollü olarak etkin maddeyi salırlar [97]. Ayrıca KLN'ler, akciğerlerdeki makrofajlara ilaç hedeflemeye de kullanılabilirler [100].

KLN'ler, adhezyon sonucunda gözde daha uzun süre kalarak, görüntüyü bozmadan, yüksek ilaç konsantrasyonunun elde edilmesini sağlamaktadırlar. Bu alanda da sınırlı sayıda çalışma vardır [97].

Adjuvanlar, aşılamada immün cevabı artırmak için kullanılmaktadır. Yıllardır sıklıkla, alüminyum hidroksit partiküllerinden oluşan adjuvanlar kullanılmaktadır; ancak, bunların yan etkileri vardır [100]. Etkin madde yüklenmemiş KLN'ler aşı adjuvanları olarak kullanılabilir. Ayrıca, KLN matrisinde hapsedilen veya yüzeyinde adsorblanan antijenler de, artırılmış bir immünolojik cevabı indüklemektedirler [86]. Geleneksel adjuvanlara kıyasla, KLN'ler, biyodegradasyona uğramaları ve vücut tarafından iyi tolere edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptir [100].

2.5. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamı ile sağlanır. Apoptoz programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olması nedeniyle bu dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Fizyolojik hücre ölümü uzun yıllardır bilinen bir kavram olmasına rağmen apoptoz terimi ilk kez 1972'de Kerr ve ark.[104] "*ölen hücrede gelişen karakteristik yapısal değişiklikleri*" belirlemeleri ve bu süreci apoptoz olarak tanımlamaları ile kullanılmaya başlanmıştır [104]. Hücre çoğalmasının kontrolü hakkında oldukça ayrıntılı bilgiye sahip olmamıza rağmen hücre ölümü ile ilgili bilgilerimiz azdır. Günümüzde hücre çoğalımı kadar karışık bir süreç olan hücre ölümü üzerinde de önemle durulmakta, apoptozu düzenleyen mekanizmalar hızla açıklığa kavuşmakta, bu olayı uyaran veya baskılayan birçok sinyal tanımlanmaktadır [105, 106].

Apoptozis, normal yetişkin dokuların erken gelişim ve büyüme döneminde önemli rol oynayan bir çeşit hücre ölümüdür [107]. Çoğunlukla programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ile aynı anlama gelmektedir [108]. Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere başlıca iki şekilde meydana gelir. Nekroz ve apoptoz arasında biyolojik ve morfolojik belirgin değişiklikler vardır [109]. Nekroz kimyasal ve fiziksel hasarı takiben ortaya çıkan patolojik bir ölüm şeklidir. Başta mitokondri olmak üzere sitoplazmik organeller hasarlanır, hücre membranı seçici geçirgenliğini kaybeder ve şişerek parçalanır. Hücre içeriği çevre dokuya yayılarak, inflamatuvar bir cevaba neden olur. Apoptotik hücrede, nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir. Hücre küçülür, yüzeyinde

sitoplazmik çıkıntılar meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre yoğunluğunda artma ve çekirdek zarına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. Daha sonra tüm çekirdek yoğunlaşır ve DNA'nın fragmentasyonu meydana gelir. Hücre her biri membranla kaplı birçok apoptotik partiküle ayrılır. Komşu hücreler ya da fagositler tarafından bu apoptotik partiküller fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırıldığı için inflamatuvar reaksiyon görülmez. Bu nedenle apoptoz sakın bir ölüm şeklini ifade etmektedir. İnflamasyonun olmaması önemli bir özelliktir ve komşu hücrelere zarar verilmeden hücre ölümü gerçekleşmektedir [110]. Apoptoz dokuların yenilenmesi ve gelişiminde rol oynayan fizyolojik bir süreçtir. Embriyonal gelişme esnasında çok sayıda hücre apoptoz ile yok olmaktadır. Gelişme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin sinyalleri olmadığında hücreler apoptoza giderler. Ancak apoptoz çok çeşitli iç ve dış uyarı ile tetiklenebilmektedir [111].

Toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, çeşitli kimyasallar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen subletal hasarlar hücredeki apoptotik süreci aktive edebilir. Çekirdekte, hücre zarında, mitokondriyonda veya hücre içi herhangi bir bölgeden gelebilecek bir uyarı apoptozu başlatabilir. DNA'da oluşan bir hasar özellikle önemli bir uyarıdır. Duyarlı hücrede p53'ün aktivasyonu veya diğer başka mekanizmalar apoptozu başlatabilir. Bu hasarlanmalar dışında apoptozu tetikleyen bazı fizyolojik sitokinler vardır. Örneğin apoptoz ilişkili bir reseptör olan Fas'ın (Apo1, CD95 isimleri de verilmektedir) kendi ligandı ile etkileşimi sonucu apoptoz gelişebilir [112]. Apoptozu başlatabilen tüm bu uyarılar, sonuç olarak kaspazların (sistein proteazlar) aktivasyonuna neden olmakta, bunların aktivasyonu ile kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması gibi nekroz, apoptoz, inflamasyon makrofajlar veya komşu hücreler tarafından apoptoza ait belirgin yapısal ve biyokimyasal değişiklikler gelişmektedir. Kaspazlar apoptozun efektör kolunu oluşturmaktadır ve apoptoza giden bütün hücrelerde aynı şekilde gelişmektedir [113].

Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı veya bulunmadığı zaman hücrenin yaşamı uzar. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre döngüsünün durmasını teşvik

ederek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/ Bax, Bax / Bcl-2, Bcl-2 / Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir. Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir [114].

2.5.1. Apoptoz Düzenlenmesinde Görevli Genler

Apoptoz çok sayıda ve çeşitte mediyatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (*c-myc*), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediyatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik indüksiyonun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli *kalsiyum* girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir.

2.5.2. p53 Geninin Apoptoz ile İlişkisi

p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı ("single or doublestrand breaks", nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53'ün apoptozisi indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogeneze bu yolla katkıda bulunurlar. p53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu "down" regüle edilerek ya da kendisine bağlanılarak hem aktivitesi inhibe edilir hem de yıkımı hızlandırılır. Fakat DNA'nın hasarlanması halinde p53'ün fosforilasyonu

artar ve buna bağılı olarak da Mdm2'den ayrılır, böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artar.

2.5.3. Sitokrom c Geninin Apoptoz ile İlişkisi

Mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondri den sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör ("AIF, apoptosis-inducing factor") ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1")'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ("ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspaseactivated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Bu mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir (Hunot and Flavell, 2001).

2.5.4. Kaspazların Apoptoztaki Rollerini

Kaspazlar enzimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistenin yer aldığı sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara

naklelerler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1-β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştire.

2.5.5. Bcl-2 Gen Ailesi

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_l) geniş bir ailedir. Bcl-2 gen ailesi apoptozun regülasyonunu Bcl-2 / Bax gen ailesi oranı ile sağlamaktadır [115]. Bcl-2 / Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondriyal ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer almakta ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde bileşik oluşturarak çalışmaktadırlar [116]. Örneğin; Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda ise hücre ölüme gitmektedir [117]. Son yıllardaki, hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerinde yoğunlaştırmıştır [118]. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri proapoptotik, apoptozisi indükleyici, etkiye sahip, diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Proapoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlarlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α-heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik α-heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn. Bax, Bak), diğer ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğer hücrel yollarla "pathway" ilişkisini kurduğu düşünölmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsic" sitokrom c'nin salıverilmesini

baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: bcl-2, bcl-Xl, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir.

Bcl-2 Geninin Yapı ve Fonksiyonları

Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olmakta, böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır Bcl-2 anti-apoptotik bir gen olup Bcl-2 gen ailesinin en önemli üyelerinden birisidir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri (Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Bak, Bad) apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir rol üstlenmektedir. Normalde fötüs ve yetişkin dokularından salınan Bcl-2, apoptoz inhibitörüdür [119-120]. Fazla salınımı radyasyon, ultraviyole, p53, kemoterapötik ilaçlar gibi değişik uyarılar tarafından başlatılan hücre ölümünü önler veya kayde değer bir azalmaya neden olur. Bcl-2, mitokondrial membranlarda ve sitoplazmada bulunur. Hücre, yaşamsal sinyallerden mahrum kaldığında ya da strese maruz kaldığında Bcl-2 mitokondrial membrandan kaybolur ve yerine Bax ve Bim gibi Bcl-2 gen ailesinin pro-apoptotik elemanları geçer. Bcl-2 düzeyindeki azalış mitokondri membran geçirgenliğini artırır ve çeşitli proteinler hücreyi apoptoza götürebilir [121].

2.5.6. Bax Geninin Yapı ve Fonksiyonları

Bax, Bcl-2 genine benzerliği olan proapoptotik bir genidir. Heterodimerizasyon ile sonuçlanan Bax'ın aşırı salınım ve Bcl-2 ile heterodimer formu oluşturarak onu inaktive eder [122]. Böylece Bcl-2 fonksiyonu engellendiğinden apoptoz indüklenmeye başlar [123]. Normal hücrelerde Bax çoğunlukla sitozolde bulunur. Ancak apoptotik sinyalin başlaması ile Bax öncelikle mitokondri membranına geçer. Bax'ın reaksiyona girerek mitokondrial voltaj bağımlı iyon kanallarını açtığı düşünülmektedir. Sitokrom c'nin serbestleşmesiyle ve

diğer apoptotik faktörlerin mitokondriden çıkmasıyla, mitokondrial dış membranın geçirgenliği artıp ve kaspaz aktivasyonu ile hücre apoptoza gitmektedir [122].

2.5.7. Çoğalan Hücrelerin Nukleus Antijeni (PCNA)

Çoğalan hücre nukleus antijen (PCNA) proteini hücrenin geleceği ile ilgili karardan sorumlu önemli moleküllerden birisidir. Hücre poliferasyonu esnasında, DNA replikasyonunda görev alan DNA polimeraz- δ (gama) ile etki gösteren bir proteindir. PCNA, dinlenim halindeki hücrelerde çok az sentezlenirken S fazında ve geç G1 fazında en yüksek sentez seviyesine ulaşır ve G2/M fazında da sentezinde önemli bir azalış görülür [124]. PCNA proteini p53 tarafından indüklenir. Yapılan çalışmalarda PCNA proteininin, p53 proteinin yokluğunda hücrede bol miktarda mevcut olması durumunda DNA replikasyonu meydana geldiği, p53 proteinin varlığında hücrede yüksek seviyelerde mevcut olması durumunda ise DNA tamir mekanizmaları işlevsellik kazandığı belirtilmiştir. PCNA proteini fonksiyonel olmadığı durumlarda veya hücrede az ya da düşük miktarda mevcut olması durumunda ise apoptoz meydana geldiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, nukleusta yüksek PCNA sentezi S fazı ile ilişkilendirilir ve S fazı hücreleri immühistokimyasal yöntemlerde tanımlanabilir. Total DNA seviyeleri ve PCNA sentezinin miktarı hücresel proliferasyonunun aktive olduğunu yansıtan bir durumdur [125].

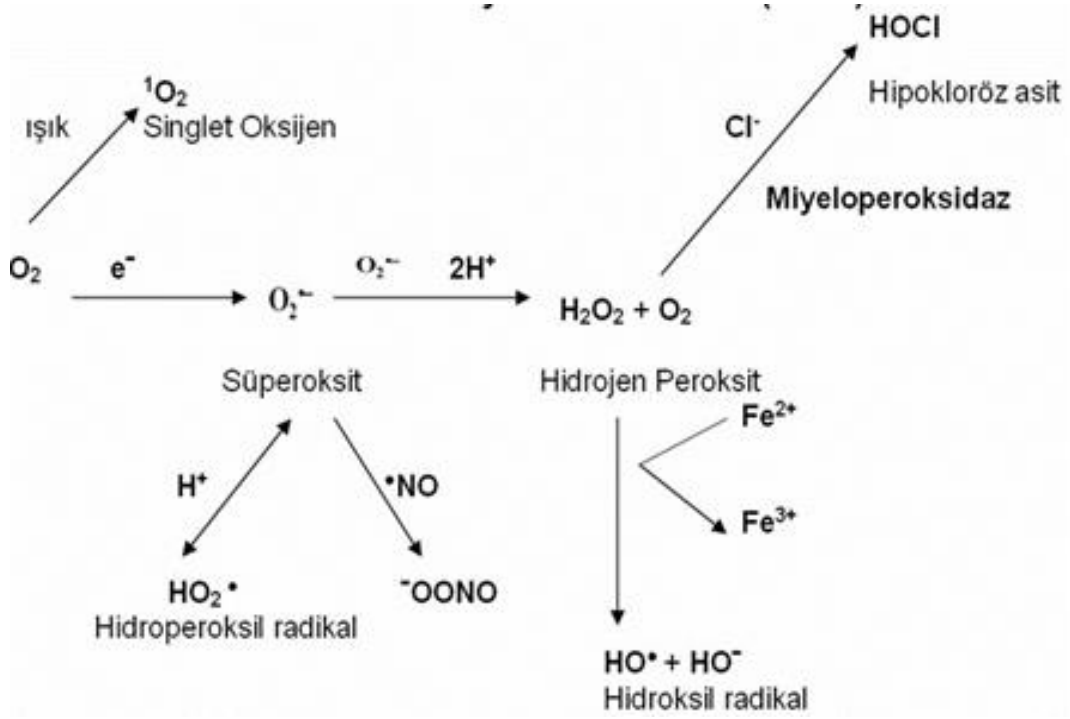
2.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar

Serbest radikaller yapılarında bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya molekülleridir. Bu moleküller içerdikleri ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşur, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksiste ortaya çıkmaz. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkar. Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Canlı içerisinde oluşan serbest oksijen radikalleri sadece hücre içerisinde substrat ile birleşerek hasara neden olmaz, aynı zamanda bağlandıkları moleküllerin hücre içerisinde çeşitli yan ara ürün oluşumuna sebep olarak da hasara neden olabilirler. Organizmada oluşan serbest radikal formlarının temel kaynağı elektron taşıma

zincirinden sızan elektronlardır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin yaklaşık %90-95' i son ürün olarak su ve moleküler oksijene dönüştürülürken, kalan %5-10' u serbest radikalleri meydana getirir. Serbest radikal yakalama yetenekleri sayesinde en az düzeyde tutulur [127]. Serbest radikal üretimi ve bertaraf edilmesi arasındaki dengenin kanser [128], dejeneratif hastalıklar [129], iskemi reperfüzyon hasarı [130], ateroskleroz [131] ve nörodejenerasyon gibi hastalıkların oluşumunda rol oynadığı belirtilmiştir [132].

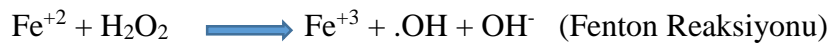
2.6.1. Serbest Radikallerin Oluşum Yolları

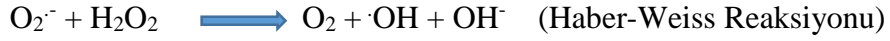
Moleküler oksijenin indirgenmesi ile negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit (O_2^-) radikali oluşur. Süperoksit radikalinden ise kendiliğinden ya da enzimatik dismutasyon ile ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ortaya çıkar. Hidrojen peroksitin bir dizi reaksiyonu sonucunda ise hidroksil radikali ($OH\cdot$) oluşur [132]. Serbest radikaller nükleik asitler, proteinler, karbohidratlar ve lipitleri de kapsayan birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girme özelliğindedir [127]. Hücre içerisindeki diğer serbest radikal kaynakları arasında, endoplazmik retikulumlardaki sitokrom P450, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sayılabilir [128].



Şekil 2.5. Hücrede Serbest Radikal Oluşum Yolları [127]

Başlangıç olarak serbest radikaller, ya diğer bir radikal ile reaksiyona girerek kovalent bir bağ kurar, ya da daha yaygın olarak, radikal olmayan bir başka molekülle reaksiyona girer [130]. Serbest radikaller radikal olmayan bir başka molekül ile reaksiyona girdiklerinde, radikal olmayan molekül bir elektron kaybederek serbest radikale dönüşür. Bu mekanizma hücre zarlarında meydana gelen yüksek miktardaki hasarı tetikleyen zincirleme reaksiyonların başlangıcı ya da temelidir. Bir radikal bir başka radikal ile birleştiğinde oluşan yeni ürün bir önceki radikalden daha fazla yıkıcı etkiye sahip olabilir. Örneğin; nitrik oksit (NO) süperoksit (O₂⁻) ile birleştiğinde meydana gelen peroksinitrit radikali (OONO⁻) hidrojen peroksitten (H₂O₂) 2000 kat daha fazla hasara neden olmaktadır. Bir başka deyişle iki radikalın birleşmesi zincirleme reaksiyonların başlamasına sebep olur. Serbest haldeki Fe⁺², H₂O₂ ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur (Fenton reaksiyonu). Hidroksil radikali bir başka şekilde, H₂O₂'nin, O₂⁻ radikali ile birleşmesi ile meydana gelir ki bu reaksiyon da Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır [131].





2.6.2. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri (Lipit Peroksidasyonu)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açar. Serbest radikaller, hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşikleriyle reaksiyona girerek, oksidatif hasar oluşumuna neden olurlar. Makromoleküllerin hepsinin serbest radikallere karşı hassasiyetleri bulunmaktadır. Ancak serbest radikallere karşı en hassas olan ve en fazla etkilenen makromolekül lipitlerdir. Zardaki kolesterol ve doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle reaksiyona girerek, lipit peroksidasyonu ürünlerini oluştururlar. Lipitler ile serbest radikaller etkileşimi serbest demir atomu varlığında lipit peroksidasyonu ile sonuçlanır. Lipit peroksidasyonunu başlatan iki temel serbest radikal, hidroksil (OH^\cdot) ve peroksinitrit radikalidir (OONO^\cdot). Hidrojen peroksitin metallerle birleşmesi ile OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin NO ile birleşmesi ile de OONO^\cdot oluşur. Peroksi radikal (RO_2^\cdot) formlarının oluşumu ile sonlanan lipit peroksidasyonu, OH^\cdot ve OONO^\cdot 'in PUFA' lardan bir proton (H) çıkarılması ile başlatılır. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle diyen konjugatları ve daha sonra lipit radikalinin moleküler oksijen ile etkileşmesi sonucu lipit peroksidasyonu meydana gelir. Lipit peroksi radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan H atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Bu zincirleme reaksiyonlar, substrat tükeninceye (örneğin; hücre zarındaki lipitler) ya da RO_2^\cdot 'nin bu zincirleme reaksiyonlarını kırabilecek (E vitamini gibi) bir antioksidan molekül ile karşılaşınca kadar devam eder [129].

Plazma membranı ve organel lipit peroksidasyonu, daha önce bahsedilen serbest radikal kaynaklarının hepsiyle sitimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. Bu metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksit ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler. Lipitlerden,

araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine enzimatik lipit peroksidasyonu, diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise non-enzimatik lipit peroksidasyonu denir [132].

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit peroksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri varlığında gerçekleşir. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu bileşikler, ya hücre yüzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

2.6.3. Lipit Peroksidasyonunda Malondialdehitin (MDA) Önemi

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan en sitotoksik ürünler, aldehitlerdir. Üç veya daha fazla çift bağı bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda enzimatik olmayan oksidatif dekompozisyonu sonucu oluşan [133] ve tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit meydana gelir. Bu ürünlerden biri olan MDA, hücre zarlarından kolayca geçebildiği için hücre içindeki yapıları olumsuz yönde etkilemekte ve deformasyonuna neden olmaktadır [134,135]. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir [133].



Şekil 2.6. Malondialdehitin kimyasal yapısı

2.6.4. Glutasyon (GSH)'un Oksidatif Doku Hasarını Önlemedeki Rolü

Memeli hücrelerinde sentezlenen ve hücre içi antioksidan enzim olan glutasyon peroksidazın (GSH-Px), serbest radikal formlarına karşı ilk savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir. GSH-Px, koenzim olarak GSH'ı kullanır

ve H_2O_2 ' yi suya ve oksijen molekülüne dönüştürür. GSH-Px' in hücre içerisinde, kofaktör olarak selenyum kullanarak H_2O_2 ve RO_2 'yi dönüştüren ve kofaktör olarak selenyum kullanmadan H_2O_2 'nin redüklenmesini katalizleyen iki formu bulunmaktadır.

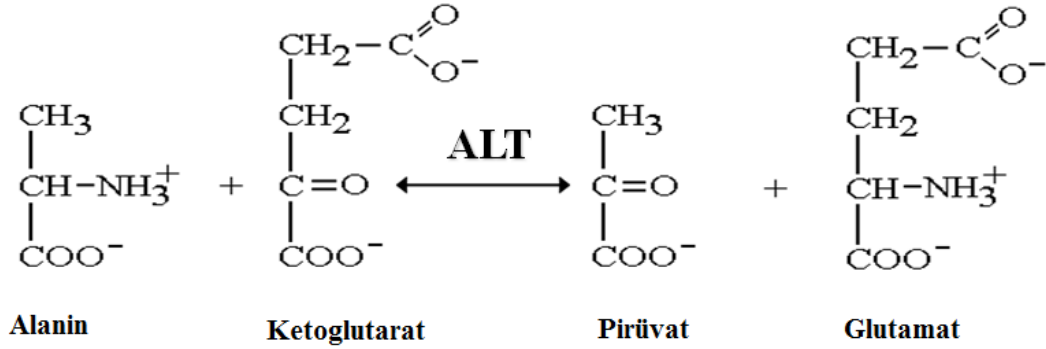
Hücreler, serbest radikal hasarına karşı doğal koruyucular içerir. Özellikle hepatositler glutatyon ve diğer antioksidanlarca zengindirler. Bu moleküller, hepatotoksinlerle oluşan serbest radikalleri hızlı ve etkili biçimde ortadan kaldırarak, hepatositi hasara karşı korurlar. Bu koruyuculardan bir tanesi antioksidan molekül olan glutatyondur [135]. GSH, sülfürlü bir tripeptittir (gama glutamil sisteinil glisin) [136]. Önemli bir indirgeyici ajan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır [136,137]. Proteinlerdeki -SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra aminoasitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar [138]. Glutatyon dokularda birbiriyle dengede bulunan, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. İntrasellüler GSH, selenyum içeren glutatyon peroksidaz enzimi ile GSSG dönüştürülür [139]. Hücreler için oldukça zararlı olan hidrojen peroksit, glutatyon peroksidaz veya katalaz enzimi aracılığıyla, suya dönüştürülerek oksidatif hasar oluşumu engellenmiş olur. Bu dönüşüm sırasında glutatyon okside olarak glutatyon disülfide dönüşür. Glutatyon disülfidin tekrar glutatyona dönüşümü ise glutatyon reduktaz aracılığıyla gerçekleşir [135]. Doku içerisindeki GSH' ın azalması ile oksidatif hasar belirlenebilir. Bu durum oksidatif hasara maruz kalan sıçan hepatositlerinde meydana gelen GSH seviyesindeki azalma ile gösterilmiştir [138].

2.7. Karaciğer Fonksiyon Testleri

2.7.1. Alanin Transaminaz (ALT) ve Aspartat Transaminaz (AST)'ların Biyokimyası

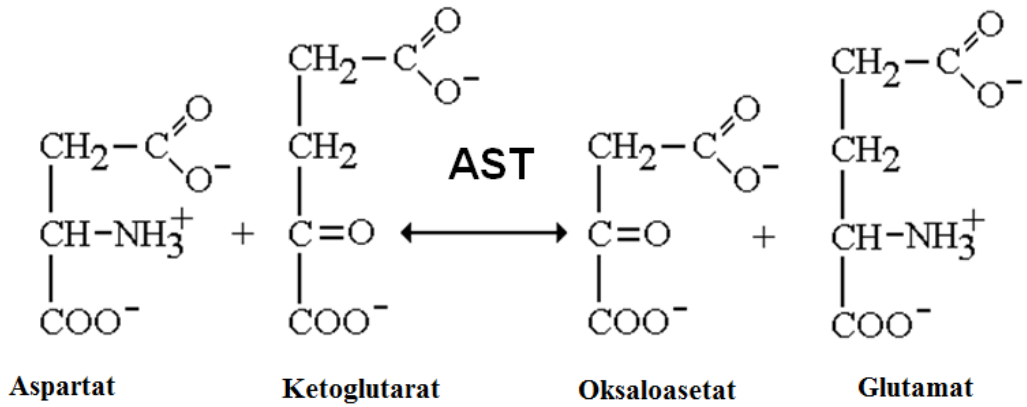
ALT öncelikle karaciğer ve böbreklerde bulunup, kalp ve iskelet kasında daha az miktarda mevcut iken [140], AST karaciğer dışında kalp kası, iskelet kası, böbrek, pankreas, akciğer, beyin ile lökosit ve eritrosit gibi kan hücrelerinde de bulunmaktadır. Dolayısıyla serum aminotransferaz aktivitesinde yükseklik

karaciğer dışı nedenlerden de kaynaklanabilir [141]. ALT hücre sitoplazmasında bulunurken AST hem sitoplazmada hem de mitokondride bulunur [140]. ALT karaciğer hastalıkları için AST den daha spesifik olmakla birlikte bazı karaciğer hastalıklarında AST' nin daha fazla artış göstermesi mümkündür [142].



Şekil 2.7. Alanin transaminaz enzim aktivitesinin şematik gösterimi [140]

AST ve ALT hücre hasarı ve plazma membranının bozulması sonucunda sitoplazmadan kana salınmaktadır. Serum AST ve ALT hepatik hasarın teşhisinde biyomarkırdırlar, çünkü hepatik hasar sonrasında kana salınırlar [143]. Aminotransferazlar karaciğerde hasar meydana geldiğinde teşhiste kullanılan ilk enzimlerdir [144]. Karaciğer dokusunda karsinojenler nedeniyle inflamasyon ve nekrozun oluşması bu enzimlerin karaciğer hücrelerinden plazmaya sızmalarına sebep olur [145].



Şekil 2.8. Aspartat transaminaz enzim aktivitesinin şematik gösterimi [141]

2.7.2. Laktat Dehidrojenaz (LDH)'ın Biyokimyası

Laktat dehidrojenaz enzimi glikolizin anahtar enzimidir ve laktat üretimini katalizler. Bu enzim tüm dokularda yaygın olup beş izoenzimi vardır. Karaciğer dokusu LDH5 yönünden daha zengindir. Kardiyolojik problemler dışında LDH ve izoenzimleri ile ilgili çalışmalar, genellikle karaciğer maligniteleri başta olmak üzere çeşitli malignitelere ve bazı karaciğer hastalıklarına yöneliktir [146]. Karaciğer parankimasının hasarlanmasından sonra bu izoenzimler yükselebilmektedir [147]. Yükselmiş serum LDH' ı genellikle karaciğer hasarı ile ilişkilidir ve hasarlanan hücrelerden kana salınır [148].

2.7.3. Alkalin Fosfat (ALP)'ın Biyokimyası

ALP, alkali ortamda farklı türlerdeki fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen glikozil fosfotidilinozitol ile hücre membranına bağlı glikoprotein yapısında bir metalofosfat enzimidir. ALP' yi magnezyum, kobalt ve mangan gibi iyonlar aktive ederken kalsiyum ve inorganik fosfat inhibe eder, çinko ise yapısal rol oynar. ALP, kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta gibi dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve bu dokulara ait patolojilerde serum düzeyleri artar. ALP artışının hangi dokudan kaynaklandığının anlaşılması için ALP spesifik doku izoenzimlerinin belirlenmesi gerekir. Normal şartlarda insan serumu dört farklı kaynaktan ALP izoenzimi içermektedir. Bunlar; kemik, karaciğer, incebarsak ve gebelikte plasenta dokularıdır [149,1450]. ALP düzeyleri birçok karaciğer hastalığında yükselmekle birlikte en sık safra akımının engellendiği intra ve ekstra hepatic kolestaz da veya primer metastatik karaciğer tümörlerinde yükselmektedir, ayrıca primer karaciğer kanserlerinde, granümatöz hepatitlerde ve infeksiyöz mononükleoz gibi hastalıklarda da yüksek bulunur [151,152].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deney Hayvanlarının Ortama Adaptasyonu ve Beslenmeleri

Bu çalışmada, 20-25 gram 2-2,5 aylık 35 adet Balb/c cinsi erkek fare kullanılmıştır. Deney öncesinde hayvanlar, standart pelet yem ve musluk suyu ile beslenerek, kontrollü laboratuvar şartlarında muhafaza edilmişlerdir. Rastgele seçilen hayvanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen hayvanlar deney süresince 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 C°) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyonu sağlanmıştır. Bu adaptasyon sürecinde tüm fareler polikarbonat şeffaf kafeslerde standart yem ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir.

3.2. METOD

3.2.1. Kimyasal Maddelerin Hazırlanması ve Enjeksiyonları

Tümör nekroz faktör α , farelere, $15\mu\text{g}/\text{kg}$ olacak şekilde fizyolojik tuzlu su içerisinde çözündürülerek intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. D-galaktozamin ise $700\text{ mg}/\text{kg}$ olacak şekilde fizyolojik tuzlu su içerisinde çözündürülerek i.p. olarak uygulanmıştır. Silmarin ve Nano formu ise $100\text{ mg}/\text{kg}$ olacak şekilde distile suda çözündürülerek i.p. olarak uygulanmıştır.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde $n=7$ ' şer Balb/c erkek fare olmak üzere toplam 5 grup oluşturulmuştur. Bunlar;

Grup 1: Kontrol grubu: Her hayvana 0,5 ml serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup 2: $15\mu\text{g}/\text{kg}$ TNF- α / $700\text{ mg}/\text{kg}$ D-GaIN verilen grup

Grup 3: $15\mu\text{g}/\text{kg}$ TNF- α / $700\text{ mg}/\text{kg}$ D-GaIN / $100\text{ mg}/\text{kg}$ Silmarin

Grup 4: $15\mu\text{g}/\text{kg}$ TNF- α / $700\text{ mg}/\text{kg}$ D-GaIN / KLN (Boş)

Grup 5: $15\mu\text{g}/\text{kg}$ TNF- α / $700\text{ mg}/\text{kg}$ D-GaIN / $100\text{ mg}/\text{kg}$ Sm-KLN

3.2.3. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ketamin/rompun (50+10 mg/kg) ile anestezi edilmiş hayvanlardan intrakardiyak kan alımı yapılmıştır. Kan örneklerini Eppendorf Centrifuge 5804 R marka ve model cihaz ile 10 dakika 3000 devir/dk.' da santrifüjlenerek aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), laktat dehidrojenaz (LDH), alkalin fosfataz (ALP), glutasyon (GSH) ölçümleri için serumlar ve malondialdehit (MDA) ölçümü için plazma elde edilmiştir. Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C derin dondurucuda korunmuştur. Karaciğer hücrelerinin olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde ALT, AST, ALP, LDH ve GSH seviyeleri belirlenmiştir. ALT, AST, LDH, ALP, GSH ve MDA ölçümleri HITACHI-917 oto analizörü ile ticari kitler kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4. Histolojik Çalışmalar

Otopsileri yapılan farelerin karaciğerleri dikkatli bir şekilde kesilip alındıktan sonra serum fizyolojik ile temizlenmiştir. Karaciğerler tartıldıktan sonra, %10' luk formalin bulunan renkli şişelere konulmuştur. Karaciğer alındıktan üç saat sonra fiksatifleri yeniden değiştirilerek daha iyi fikse edilmeleri sağlanmıştır. Rutin histolojik doku takibinden sonra parafin blokları hazırlanacak dokulardan alınarak 5-6 mikronluk kesitler hematoksilin-eosin boyası ile boyanarak ve ışık mikroskopunda incelendikten sonra Olympus marka pm10 AD ile fotoğrafları çekilmiştir.

Karaciğer Örneklerinin Hazırlanması

Bütün gruplardaki farelerden dikkatli bir şekilde alınan karaciğerler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra küçük parçalara ayrılmış ve % 10' luk tampon formalin fiksatif ile tespit edilmiştir.

Karaciğer Örneklerinin Parafin Takibi ve Kesit Alma

- Doku Tesbiti
- % 10 formaldehid (nötral-tamponlanmış)
- Doku Takibi

- Doku G6mme (Bloklama)

Amaç: Dokuların mikrotom cihazının blok tutucu yuvasına monte edebilir hale getirmek

Bunun için: Metal g6mme kalıbına az miktarda parafin d6k6l6r, Pens yardımıyla dokular kalıba yerleştirilir. Soğuk bir kısma alınır. Kalıp içindeki dokulara bastırılarak tabana eşit olarak yapışmaları sağlanır. ˘zerine blok kaseti konur, blok kasetini deliklerini geçinceye kadar parafin ilave edilir.

- Doku Kesimi(Mikrotom Cihazı)

Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına blok kaseti takılır. Dokunun 6n y6z6 traşlanarak doku b6t6nl6ė6ne ulaşılır.4 mikrom kalınlığında kesitler alınır. Fırça yardımıyla 47 derece su banyosuna kesitler atılır. Suda açılan kesitler lama alınır.

- Deparaffinize İşlemi (Cihaz_Manuel)
- Boyama Tekniği (Biopsi) (Hematoxilen Eozin)
- Monte Etme(Kapama İşlemi)

Lam ortasına 1 damla entellan damlatılır. 24X60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.

Karaciğer ˘rneklerinin Hemotoksilen-Eozin ile Boyanması

Kesitlerin boyanmasında hematoksilen-eozin ikili boyası kullanılmıştır. Bu amaçla Harris Alum Hematoksilen ve alkoll6 eozin boyları hazır alınmıştır. Deparaffinizasyonu yapılmış olan karaciğer kesitleri 5'er dakika s6relerle saf, %96, %90, %80, %70, %50' lik etanollerde ve distile suda bekletilmıştir. Kesitler, hematoksilen ile 3 dakika muamele edilip distile sudan geçirilerek, 10 dakika eozin ile boyanmıştır. Musluk suyu ile fazla boyası alınan kesitler, alkol serilerinden hızla geçirilerek dehidratasyona uğratılıp, iki ayrı ksilolde 30' ar dakika tutularak Őefflařtırılmıřtır. Karaciğere ait preparatlar, bu aşamadan sonra entellan ile kapatılarak mikroskop altında incelenmeye hazır duruma getirilmıştir.

Karaciğer Örneklerininin Geçirimli Elektron Mikroskopik (TEM) Takibi

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Hücrelerin ince yapılarının (mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum, çekirdek vb organelleri) belirlenmesinde faydalanılmıştır.

Elektron mikroskobu çalışmalarında, nukleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir.

Dokulara Geçirimli Elektron Mikroskopik takip için;

- Fiksatif Hazırlama: İlk fiksatif tamponlanmış glutaraldehittir.
Fosfat Tamponu;
 Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlanmıştır. İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içerisinde 4-24 saat arasında $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de fikse edilmiştir.
- Yıkama: Fikse olmuş hücrelerden fiksatif uzaklaştırmak için hücreler tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. (3x15 dk)
- İkinci Tespit (Osmium Tetraoksit) : Yıkanan hücreler %1'lik OSO_4 içerisinde alınıp, 2 saat süreyle rotatorda döndürülerek, fikse edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3x15 dk yıkanmıştır.
- Dehidratasyon: Etil alkol ile yapılır.
- Şeffaflandırma:
Propilenoksit 30 dk. X2
Resin+ propilenoksit (1/1)
Hücreler bu karışımda 2 saat süreyle rotatorda döndürülmüştür.
- Bloklama: Taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılır. Polimerizasyon işlemi 48 saat boyunca $60\text{ }^\circ\text{C}$ 'de yapılmıştır.
- Resin Solüsyonunun Hazırlanması:
Araldit CY212 20 ml,
DDSA 20ml,
BDMA 0,6 ml,
Dibütilfitalat 1 ml,

- Kesitlerin Boyanması: Uranil asetat boyasının hazırlanması;
- Kurşun Sitrat Boyasının Hazırlanması:

A Karışımı

B Karışımı

B karışımı üzerine 0,5ml A karışımı katılıp, kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır. (ph 12-13 arasında olmalıdır). Temiz bir falkona konup, karanlıkta ve +4 °C' de saklanır. Boyanan kesitler elektron mikroskopunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.

Karaciğer Örneklerinin Konfokal Mikroskopik Analizi

Uygulanan maddelerin verildiği dokular 37 °C'de 24 saat süresince bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda doku PBS ile yıkanır, oda sıcaklığında 15 dakika %2 gluteraldehid ile fikse edildi. Sonrasında doku PBS ile yıkanıp phalloidin ve akridin oranj ile boyanmıştır. Ayrıca parafin takibi yapılmış doku kesitlerine de Anneksin FITC/ PI floresan boyalarla boyanmış doku kesitleri mikroskopik olarak incelenerek çekirdek ve hücre zarlarının yapısına bakılmış, apoptotik ve nekrotik hücreler belirlenmiştir. Doku üzerindeki yapısal değişiklikler Leica TCS- SP5 II konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve software (Leica Confocal Software Version 2.00) kullanılmıştır.

3.2.5. Biyokimyasal Analizler

Serum ALT, AST, ALP, LDH, GSH ve Plazma MDA Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Kontrol ve deney gruplarındaki farelerden tüplere intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri 3000 devir/dakika' da 10 dakika santrifüj edilerek serumlar elde edilmiştir. Alınan serum ve plazma örnekleri tam otomatik biyokimya otoanalizatörü ile ALT, AST, LDH, ALP, GSH ve MDA değerleri saptanmıştır.

1. Serum ALT Ölçüm Prensibi

Serumda ALT düzeyi ticari kit (Biolabo, Maizy, France) kullanılarak *CRONY AIRONE 200 RA* otoanalizatör ile belirlendi (U/L).

Ölçüm Prensibi: Metod *Wroblecki ve LaDue* tarafından geliştirilmiş daha sonra *Henry ve Bergmeyer* tarafından optimize edilmiştir. Reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir:

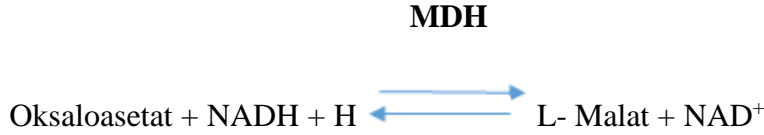


Örnekteki ALT Aktivite oranı ve NADH'ın NAD⁺ a dönüşmesinden dolayı oluşan absorbanstaki azalma 340 nm de ölçülür (U/L).

2. Serum AST Ölçüm Prensibi

Serumda AST düzeyi ticari kit (Biolabo, Maizy, France) kullanılarak *CRONY AIRONE 200 RA* otoanalizator ile belirlendi (U/L).

Ölçüm Prensibi: Metod *Karmen* ve *Al* tarafından geliştirilmiş daha sonra *Henry* ve *Al* tarafından optimize edilmiştir. Reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir:



Örnekteki AST Aktivite oranı ve NADH'ın NAD⁺ a dönüşmesinden dolayı oluşan absorbanstaki azalma 340 nm de ölçülür.

3. Serum LDH Ölçüm Prensibi

Serumda LDH düzeyi ticari kit (Biolabo, Maizy, France) kullanılarak *CRONY AIRONE 200 RA* otoanalizator ile belirlendi (U/L).

Ölçüm Prensibi: Metod *Henry* ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir:



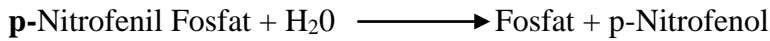
Örnekteki LDH Aktivite oranı ve NADH'ın NAD⁺ a dönüşmesinden dolayı oluşan absorbanstaki azalma 340 nm de ölçülür.

4. Serum ALP Ölçüm Prensibi

Serumda ALP düzeyi ticari kit (Biolabo, Maizy, France) kullanılarak *CRONY AIRONE 200 RA* otoanalizatör ile belirlendi.

Ölçüm Prensibi: Method *Lowry*, *Bessey* ve *Brock* tarafından geliştirilmiş, daha sonra *Hausamen* ve *arkadaşları* tarafından düzeltilmiştir. Magnezyum ve çinko iyonları varlığında; p-nitrofenil fosfat, fosfat ve p-nitrofenol oluşturmak için fosfatazlar tarafından hidrolize edilir. Bu süreçte AMP geçici fosfat alıcısıdır. Renkli p-nitrofenol serbest bırakılması ALP aktivitesi ile orantılıdır. Spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (405 nm).

ALP



5. Serum GSH Ölçüm Prensibi

Örnek GSH miktarı Sedlak ve Lindsay metodu kullanılarak 412 nm'de ölçümü yapıldı. Örnekler %50 TCA (triklorasetik asit) ile çöktürüldü ve 5 dakika 1000xg' de santrifüj edildi. Çöktürülen örneğin üst fazından 0,5 ml alınarak 2 ml Tris-EDTA tamponu (0,2 M, pH=8,9) ve 0,1 ml 0,01 M 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve spektrofotometrede 412 nm'de absorbanları ölçüldü. Deneysel çalışmada UV-1700 Shimadzu marka spektrofotometre kullanıldı. Spesifik aktivite mg protein başına mg cinsinden verildi.

6. Plazma MDA Ölçüm Prensibi

Farelerden alınan kan örnekleri anti-koagulan içeren tüplere aktarılır. Tüpler hafif çalkalandıktan sonra 5000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen plazma örnekleri biyokimyasal analizler yapılana kadar - 80 °C' de saklandı.

Plazma örneklerinde malondialdehit miktarı TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metodu kullanılarak tayin edildi. Lipit peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembe

renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipitleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Deneyin yapılışı:

1. Bir deney tüpüne 150 µL plazma, 1,2 mL H₂SO₄ ve 150 mL fosfotungistik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi.
2. Karışım 1500 g' de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar vortekslendi.
4. Tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100 °C' de inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g' de 10 dk. santrifüjlendi.
6. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

1 mmol 1.1.3.3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3, 2, 1 - 0,5 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nmol MDA/mL olarak belirlendi. Sonuçlar g protein başına nmol cinsinden ifade edildi.

3.2.6. İmmünohistokimyasal Boyama

1. Bcl-2 ve Bax Boyama Yöntemi

Bcl-2 ve Bax immünohistokimyasal incelenmesi için Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam) ve Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam) antikorları kullanıldı.

Ölçüm Prensipleri

İşaretlenmiş antikor yöntemi ile antijeni tanıma ve gösterme temel ilkesine dayanmaktadır. Streptavidin-Biyotin kompleksi teknolojisi kullanıldı. Streptavidinin biyotine afinitesi çok fazladır. Streptavidin peroksidaz etkili olarak nötral, hafif alkali pH' da yalnızca biyotinlenmiş sekonder antikora bağlanır. Oluşan kompleks kromojenik substrat eklenerek görünür hale getirilir. Antijenin bulunduğu bölgede renkli bir çökelti oluşmaktadır.

Ölçüm Yöntemi

İmmünohistokimyasal inceleme için alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit fiksasyonu sonrası 3 saat akan suda yıkandı. Alkol serilerinden geçirilen dokular parafin ile bloklandı. İmmünohistokimyasal inceleme için uygun olan bloklara aşağıda belirtilen işlemler sıra ile uygulandı.

- Poly-l-lysine ile kaplanmış lam üzerinde 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.
- Fiziksel deparafinizasyon için kesitler 60°C'de etüvde 60 dakika parafinin erimesi için bekletildi.
- Kimyasal deparafinizasyon için lamlar ksilol serilerinden geçirildi (3x5 dakika).
- Etil alkol serilerinden geçirildi ve boyama için hazır hale getirildi (3x1dakika %96'lık alkol).
- Dokular yüksek basınç ve nemli ortamda 1/10'luk sitrat tamponu içinde 10 dakika tutuldu.
- Boyama kapalı kutu içinde nemli ortamda yapıldı. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi.
- % 3'lük hidrojen peroksidadza 10 dakika bekletildi. Önce distile su ile 1 dakika sonra fosfat tamponu ile 2 defa yıkandı.
- Ultra V blokta 5 dakika bekletildi.
- Primer antikor (Bcl-2 (Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam)), Bax (Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam) ile 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı. - ENHANCER (sinyal artırıcı): 20 dakika
- Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı.
- HRP, POLYMER (biotinylated goat anti-polyvalent + streptavidin): 30 dakika
- Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı.
- AEC Kromojen uygulandı ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Çeşme suyunda 30 saniye yıkandı ve Hemotoksilen ile zemin boyanması yapıldı.
- Çeşme suyu ile 1 dakika yıkama yapıldı.

- Distile su ile 30 saniye yıkama yapıldı.
- Lamlar havada kurutuldu.
- Aques Mounting Medium damlatılıp lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyama değerlendirilmesi ESOGÜ Histoloji Anabilim Dalında tek bir araştırmacı tarafından, 40X büyütmede 3 ayrı alan taranarak semikantitatif yöntemle boyanan hücrelerin sayısına göre 0 (boyama yok), 1 (az boyama), 2 (orta boyama) ve 3 (çok boyama) olarak yapıldı.

2. Çoğalan Hücrelerin Nükleus Antijeni (PCNA)'nin İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

Bu çalışmada, ışık mikroskobu düzeyinde PCNA immüno lokalizasyonu "Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz" yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir [126]. İmmünohistokimyasal yöntemde, gruplara ait hayvanların karaciğer dokusu kullanıldı. PCNA immünohistokimyası için, % 10 tamponlanmış formalinde fikse edilen karaciğer dokuları kullanıldı. 5 µm kalınlığında alınan kesitler, Poly-L-lysine ile kaplı lamlar üzerine alındıktan sonra, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerine tabi tutuldu. Rehidratasyondan sonra distile suya alınan kesitler, mikrodalga fırında 10mM sitrat tamponunda (pH 6) 10 dakika boyunca 700 W'ta kaynatılarak, antijen iyileştirmesine maruz bırakıldı. Bu aşamadan sonra PBS (pH 7.4) ile yıkanan kesitler membran permeabilizasyonu için %0.3'lük Triton X-100 ile 10 dakika boyunca inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi amacıyla kesitlere, oda ısısında ve nemli ortamda, metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ solüsyonu 10 dakika uygulandı. Bundan sonraki aşamalar Ultravision Detection System Kiti (Lab Vision TM-125-HL) ile kit için öngörülen metoda uygun olarak gerçekleştirildi. Dokuda spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için kesitlere bloke edici solüsyon 5 dakika uygulandıktan sonra, kesitler antikor sulandırma solüsyonu (Lab Vision) ile 1/50 dilüsyonda hazırlanan PCNA için spesifik olan primer antikor (Clone PC10, NeoMarkers MS-106) ile oda ısısında 40 dakika inkübe edildi. Negatif kontrol kesitlere bu aşamada antikor yerine PBS uygulandı. Sırasıyla biyotinlenmiş sekonder antikor ile streptavidin-peroksidaz enzim konjugatı 15'er dakika uygulandı. Renk reaksiyonu gerçekleştirmek amacıyla kesitler AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) kromojen ile muamele edildi ve mikroskopta spesifik immün reaksiyonun oluşumu gözlemlenirken

sonra, kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Kesitler Mayer Hematoksilin ile zıt boyamaya tabi tutuldu. Primer antikor uygulamasından önceki basamak hariç, diğer tüm basamaklar arasında kesitler PBS ile 10'ar dakika yıkandı. Son aşamada kesitler GVA kapatma solüsyonu ile kaplanarak lamelle kapatıldı.

3.2.7. Silmarin Katı Lipit Nanopartikül (KLN)'lerin Hazırlanması ve Ölçümü

Sm yüklü KLN'i hazırlamak için sıcak homojenizasyon tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğe göre; %5 etken madde (Sm), %5 lipit (Compritol 888) ve %3 oranında yüzey etken madde (Tween 80) kullanılmıştır. Önce lipitin 80°C erimesi sağlanmıştır. Lipit eridikten sonra etken madde lipitin üzerine eklenerek Tween 80 yavaş yavaş ilave edilmiş, ultraturaks aracılığı ile yavaş yavaş karıştırılmıştır. Karışım işlemi tam olarak gerçekleştikten sonra 20500 rpm 'de 1 dk karıştırılarak Sm yüklü KLN kompleksleri elde edilmiştir. Son olarak elde edilen sistem 0.2 µm'lik filtreden geçirilmiş ve elde edilen nanopartiküler sistem içeren solüsyon oda sıcaklığında soğumaya bırakılarak 5 mL cam ampüllere konulup saklanmıştır. Aynı zamanda etken maddeler kullanılmadan da kontrol grubu olarak aynı şekilde boş KLN'ler de hazırlanmıştır.

- Silmarin Yüklü KLN'lerin Karakterizasyonu
- Partikül Boyutu, Zeta Potansiyel, Polidispers İndeks ve Elektriksel İletkenlik Ölçümü

Sm yüklü KLN'lerin partikül boyutu, zeta potansiyel ölçümleri, polidispers indeksi (PI) ve elektriksel iletkenlik ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için ard arda üç ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçümler distile su ile seyretmeler yapılarak ölçülmüştür. Distile sudaki iletkenliğin neden olacağı değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için, kullanılan distile su, ölçümlerden önce NaCl ile 50µS iletkenliğe ayarlanmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

- Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Sıcak homojenizasyon tekniği ile elde edilen Sm-KLN'lerin yüzey özellikleri ve şekilleri, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (Biotwin FEI) ile fotoğrafları çekilerek incelenmiştir. TEM yönteminde santrifüjlenerek

süpernatantın ayrıldığı nanopartiküller 100 µL MiliQ su içinde süspanse edildikten sonra karbon kaplı bakır gridler üzerine damlatılarak emdirilmiştir. Uranil asetat (%2'lik) ile 20 saniye muamele edilerek boyanması sağlandıktan sonra suyla boyanın fazlası uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküller 24 saat boyunca kuruduktan sonra TEM ile görüntülenmiştir.

3.2.8. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 12.0 for windows” versiyonu bilgisayar paket programı kullanılmıştır. Kan serumlarında analizi yapılarak ALT, AST, ALP, LDH, GSH ve MDA ölçümlerinden edilen veriler; gruplar arasındaki farklılık durumları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $p < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Fareler üzerinde gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada karaciğere zgu biyomarkırlardan ALT, AST, ALP ve LDH, antioksidan savunma sisteminin unsurlarından biri olan GSH ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan ve oksidatif hasarın ortaya konmasında önemli bir parametre olarak kullanılan MDA düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Kontrol ve deney gruplarına ait serum ALT, AST, ALP, LDH, GSH ve plazma MDA değerleri tabloda gösterilmiştir (izelge 4.1)

Çizelge 4.1. Farklı deney gruplarına ait Balb c farelerden alınan kan serumlarının ALT, AST, LDH, ALP, GSH ve plazma MDA değerleri bakımından birbirleriyle ve kontrol grubuyla karşılaştırılması

GRUPLAR	ALT ^a	AST ^a	LDH ^a	ALP ^a	GSH ^b	MDA ^b
Kontrol	48,28±	53,336±	525±	29,69±	31,4±	0,31±
	5,39	7,7	95,17	4,27	2,15	0,03
TNF-α+D-GalN	6881±	7623,86		415±	5,16±	1,38±
	408,29**	±	6192,86±	62,48**	0,33***	0,11***
	*	**	955,68***	*		
TNF-α+D-GalN+Sm	546,14±	603,29±	584,71±	38,11±	18±	0,74±
	49,8** ###	13,19###	79,03###	1,94###	0,8*** ###	0,06***
TNF-α+D-GalN+KLN	6641,43±	7409,29	6158±	392,14±	5,08±	1,39±
	325,63**	±	1068,67**	76,97**	0,35***ΔΔΔ	0,11***
	* ΔΔΔ	* ΔΔΔ	* ΔΔΔ	* ΔΔΔ		ΔΔΔ
TNF-α+D-GalN+Sm-KLN	276,86±	300,29±	543,86±	33,76±	27,43±	0,39±
	48,34###	12,62###	67,37###	3,51###	3,11** ### ΔΔΔ	0,04### ΔΔΔ
	@@@	@@@	@@@	@@@	@@@	@@@

a, U/L; b, nmol/mg protein

4.1.1. Deney Gruplarının Serum ALT Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu (Şekil 4.1) ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grupları serum ALT değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu serum ALT değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.01$). D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubunda kontrole göre serum ALT düzeyindeki hafif artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları ile serum ALT düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubu arasında da serum ALT düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu arasında serum ALT düzeyleri bakımından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu, D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grupları arasında serum ALT düzeyleri bakımından fark olsa da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

4.1.2. Deney Gruplarının Serum AST Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grupları serum AST değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları kontrolle karşılaştırıldığında serum AST düzeyinde hafif artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları ile serum AST düzeyleri bakımından

karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubu arasında da serum AST düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu arasında serum AST düzeyleri bakımından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).

4.1.3. Deney Gruplarının Serum ALP Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

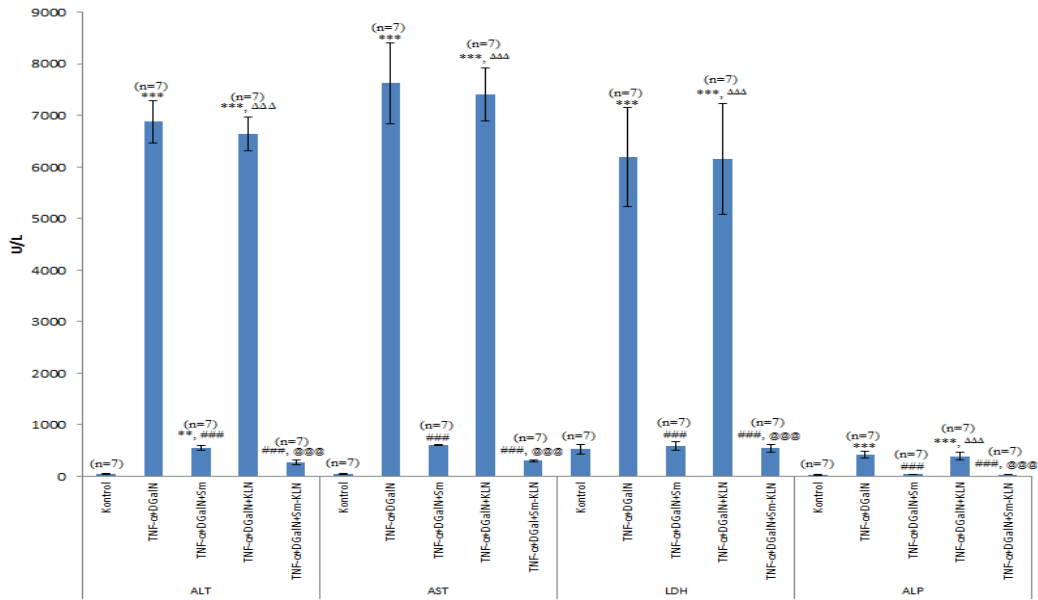
Şekil 4.1' de görüldüğü gibi D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grupları serum ALP değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları Kontrolle karşılaştırıldığında serum ALP düzeyinde hafif artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları ile serum ALP düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubu arasında da serum ALP düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu arasında serum ALP düzeyleri bakımından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).

4.1.4. Deney Gruplarının Serum LDH Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grupları serum LDH değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum LDH düzeyindeki hafif artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları ile serum LDH düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubu arasında da serum LDH düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grubu ile ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu arasında serum LDH düzeyleri bakımından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.1. Farklı deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan serumlardan ölçülen ALT, AST, LDH ve ALP değerleri

** $p<0.05$ (Kontrol grubuna göre elde edilen farklılık), *** $p<0.001$ (Kontrol grubuna göre elde edilen anlamlı farklılık), ### $p<0.001$ (D-GaIN/TNF- α grubuna göre elde edilen anlamlı farklılık), ΔΔΔ $p<0.001$ (D-GaIN/TNF- α /Sm grubuna göre elde edilen anlamlı farklılık), @@@ $p<0.001$ (D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubuna göre anlamlı farklılık)

4.1.5. Deney Gruplarının Redükte Serum GSH Seviyesinin Değerlendirilmesi

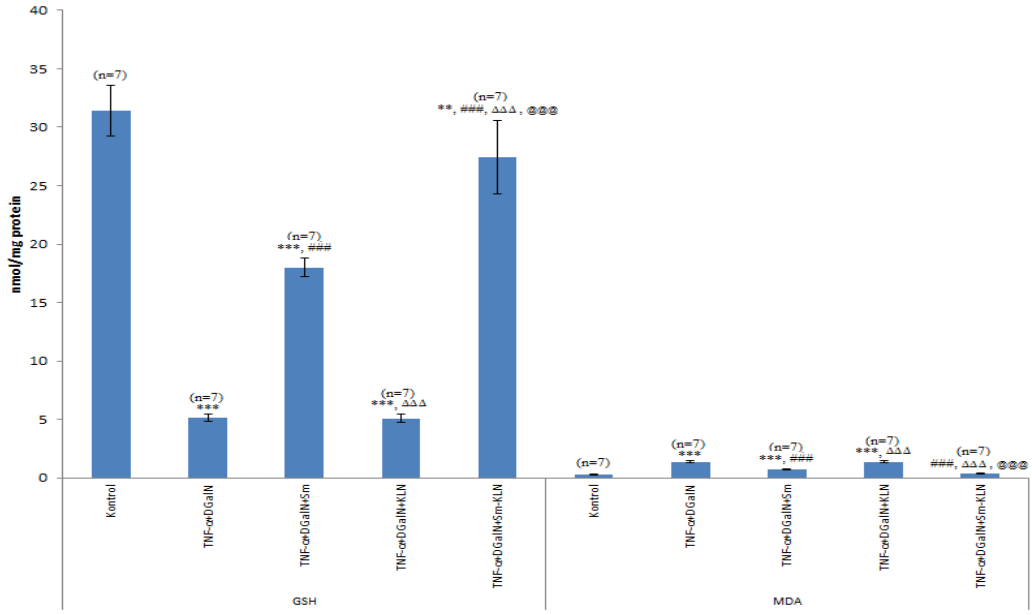
Şekil 4.2' de görüldüğü gibi D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu, D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grupları serum GSH değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-

GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu serum GSH değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.01$). D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları ile serum GSH düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları arasında da serum GSH düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu arasında serum GSH düzeyleri bakımından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).

4.1.6. Deney Gruplarının Plazma MDA Düzeyinin Değerlendirilmesi

şekil 4.2' de görüldüğü gibi D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu, D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grupları plazma MDA değerleri bakımından kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubundaki serum MDA seviyesinde hafif artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu D-GaIN/TNF- α /Sm ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları plazma MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).

Ayrıca D-GaIN/TNF- α /Sm verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) ve D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grupları arasında da plazma MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney grubu ile D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubu arasında plazma MDA düzeyleri bakımından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.2. Farklı deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan serumlardan ölçülen GSH ve plazmadan ölçülen MDA değerleri

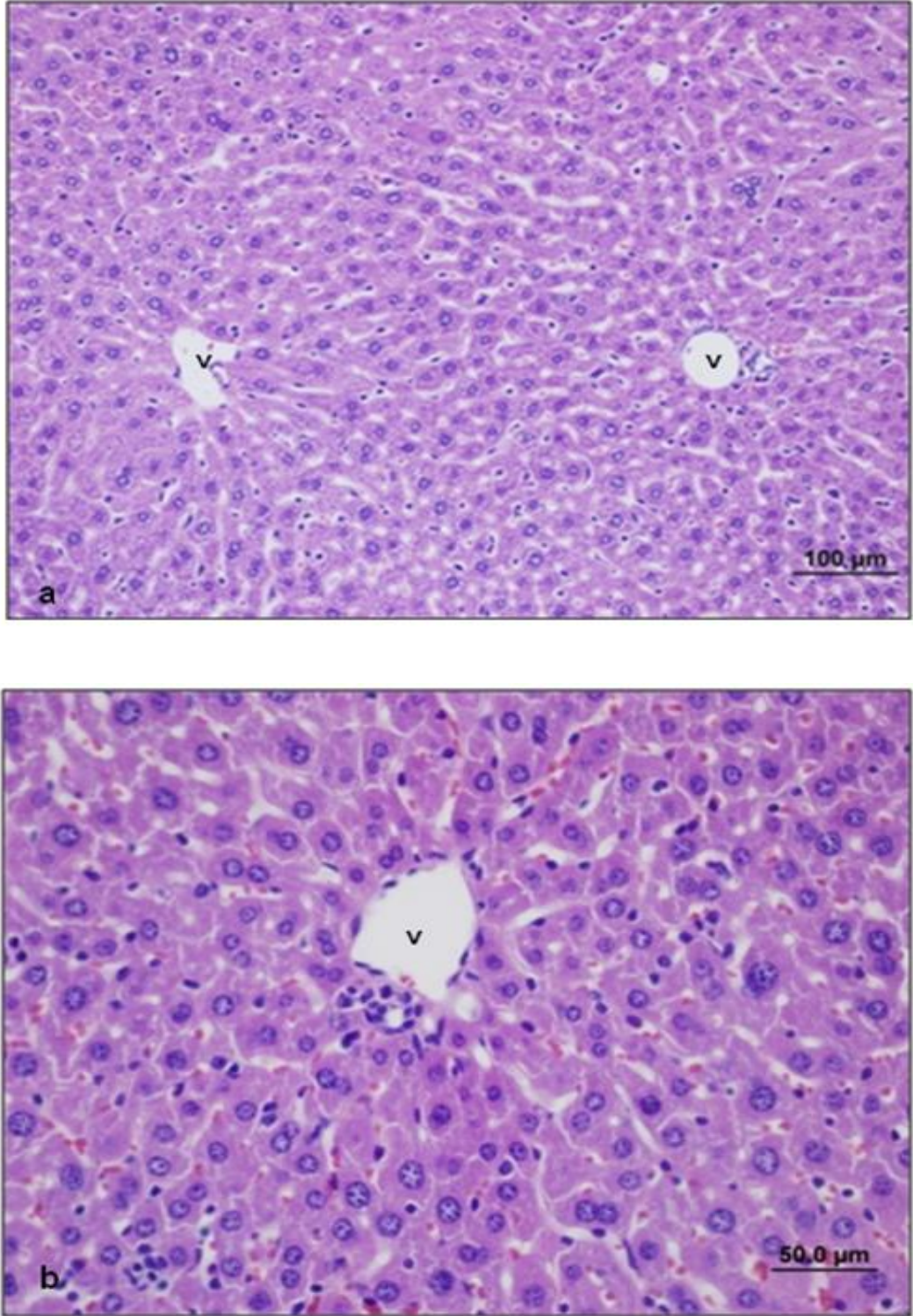
** $p < 0.05$ (Kontrol grubuna göre elde edilen farklılık), *** $p < 0.001$ (Kontrol grubuna göre elde edilen anlamlı farklılık), ### $p < 0.001$ (D-GaIN/TNF- α grubuna göre elde edilen anlamlı farklılık), $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ (D-GaIN/TNF- α /Sm grubuna göre elde edilen anlamlı farklılık), @@@ $p < 0.001$ (D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubuna göre anlamlı farklılık)

4.2. Histolojik Çalışmaların Değerlendirilmesi

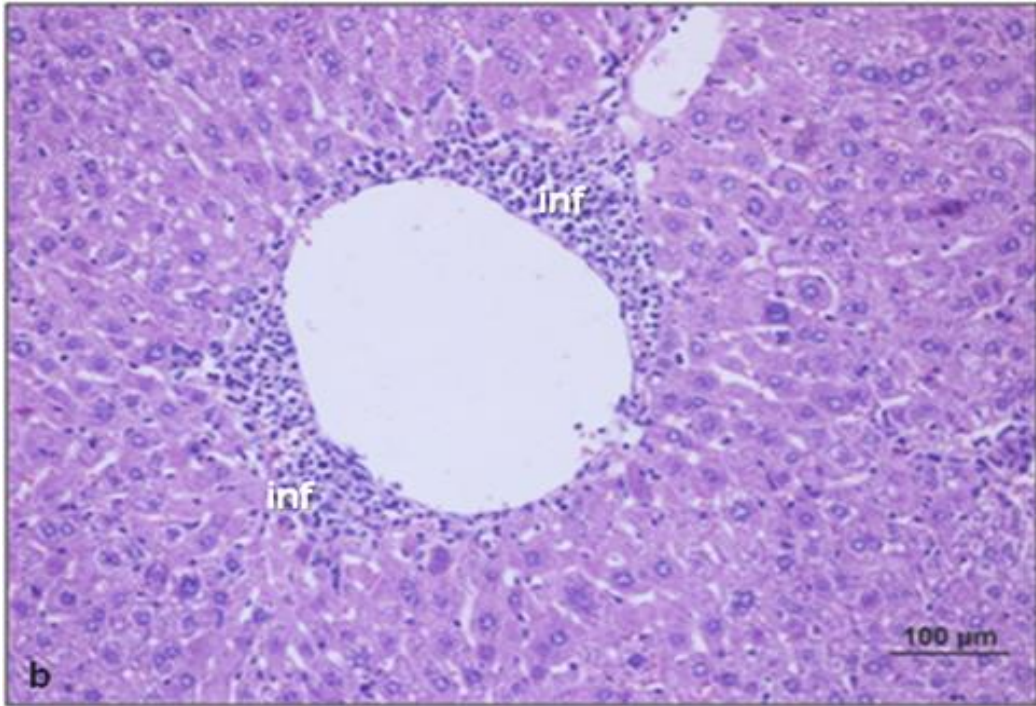
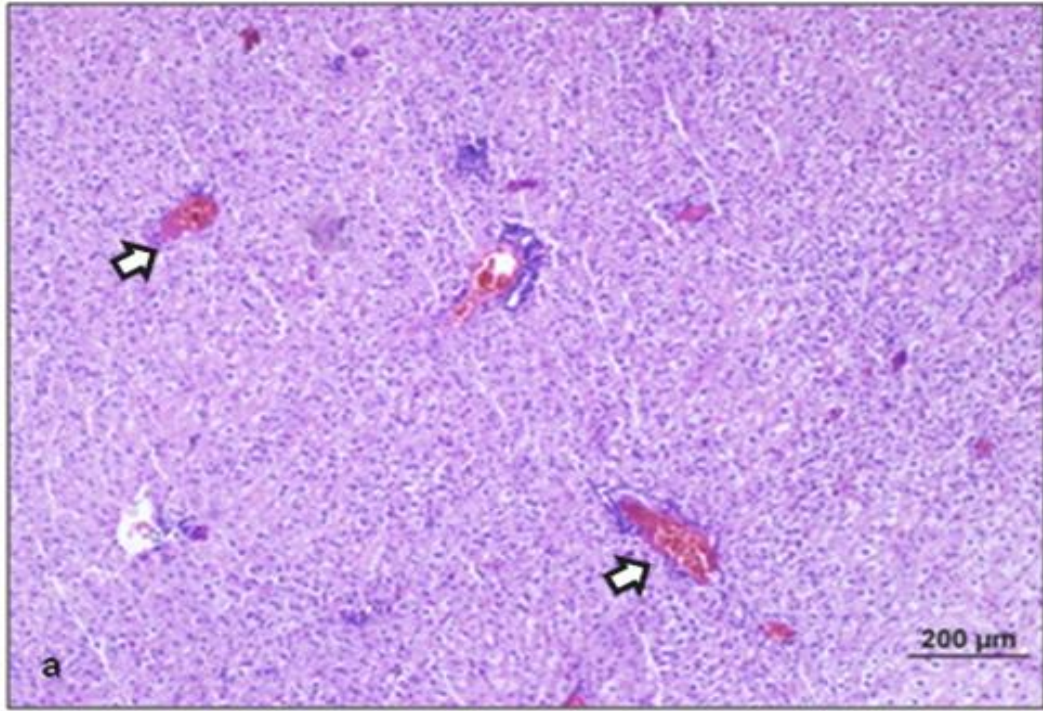
4.2.1. Karaciğer Örneklerinin Işık Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda bulunan deney hayvanlarının karaciğerlerinde sinüzoid, portal alanlarda bulunan hepatik arter, hepatik portal ve safta kanalı dallarından oluşan portal yapıların morfolojilerinin korunduğu saptandı (Şekil 4.3). D-GaIN/TNF- α verilen deney grubuna ait kesitlerde, karaciğer yapısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, oldukça bozulmuş olduğu görüldü. Parankim dokuda hepatosit dejenerasyonu, atipik nükleuslar, kısmi inflamasyon, sinusoidal dilatasyon, piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (inf) ile vasküler kongesyon gözlemlendi (Şekil 4.4). Sm ve D-GaIN/TNF- α verilen deney grubuna ait deney hayvanlarının karaciğer mimarisi, sadece D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi. Ancak bazı deney hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde farklı büyütmelerde bazı hücrelerde karyolizis ve asimetrik nükleer yapı gözlemlendi (Şekil 4.5). KLN (Boş) ve

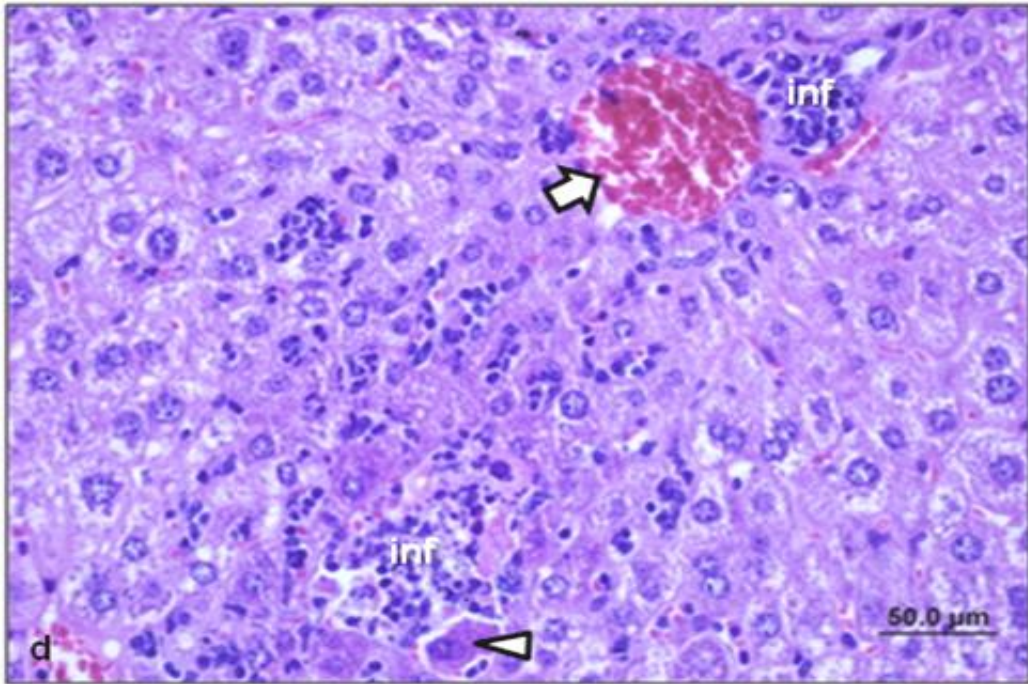
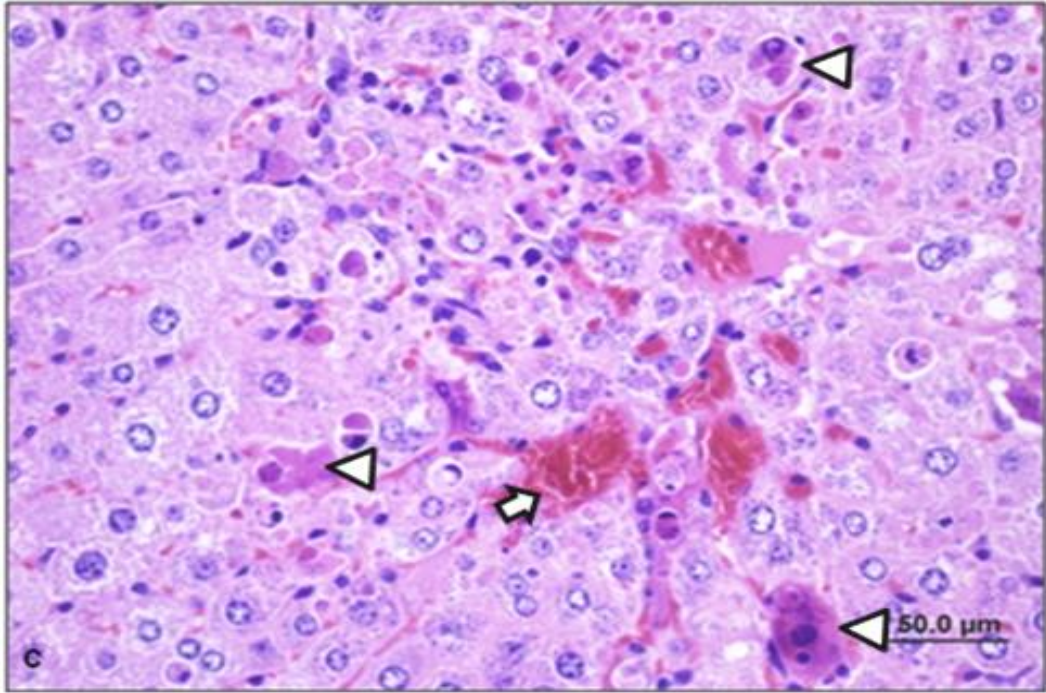
D-GaIN/TNF- α verilen deney grubuna ait kesitlerde, karaciğer yapısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, oldukça bozulmuş olduğu görüldü. Parankim dokuda hepatosit dejenerasyonu, atipik nükleuslar, kısmi inflamasyon, sinusoidal dilatasyon, piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (inf) ile vasküler kongesyon gözlemlendi (Şekil 4.6). Diğer bir deyişle KLN (Boş)'nin deney hayvanları üzerine kayda değer bir koruyucu veya toksik etkisi saptanmamıştır. Sm-KLN ve D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu, sadece D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu, Sm ve D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ve KLN (Boş) ve D-GaIN/TNF- α verilen deney grubu ile karaciğer morfolojisi açısından karşılaştırıldığında kontrol grubuna oldukça benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.7).



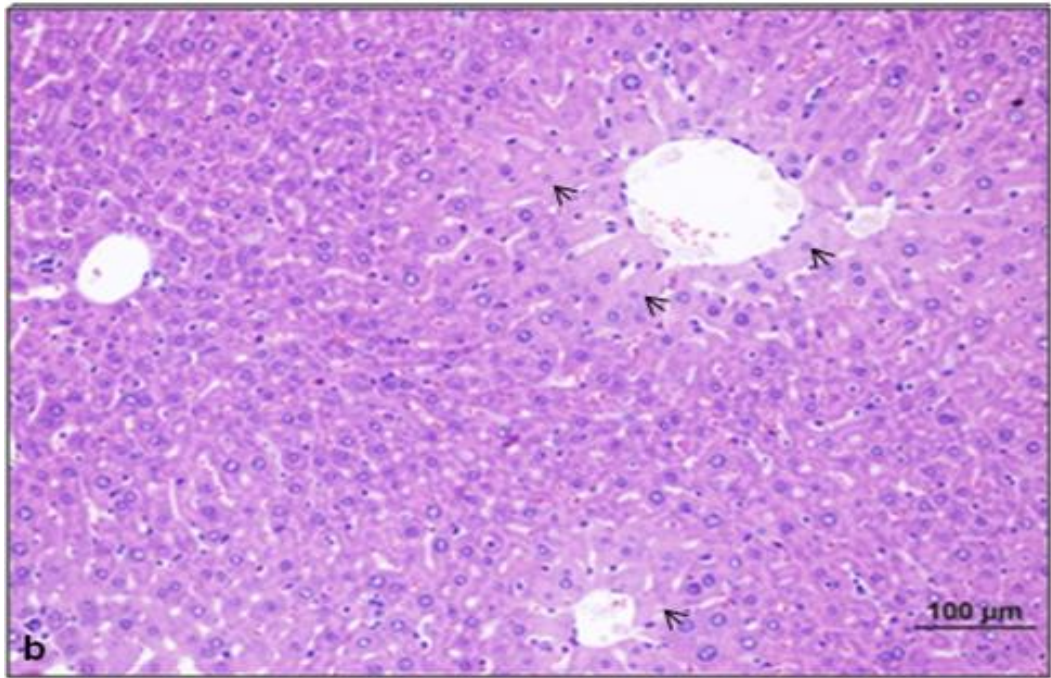
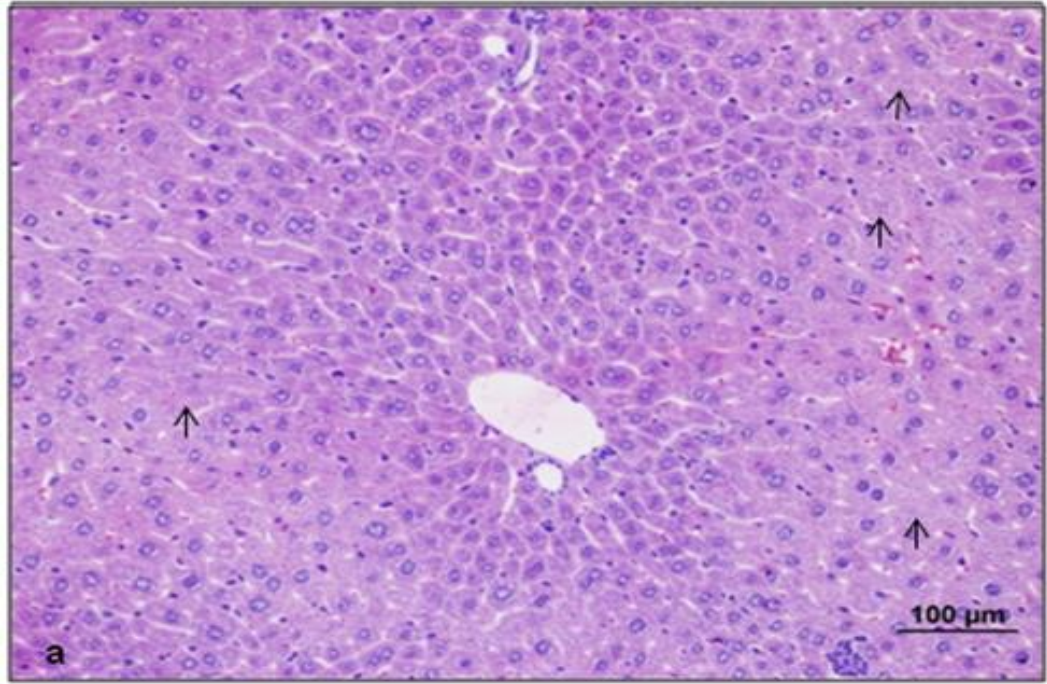
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait karaciğer hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer dokusu (a,b) (v: vena sentralis) (bar:100µm, bar:50.0µm, HE)



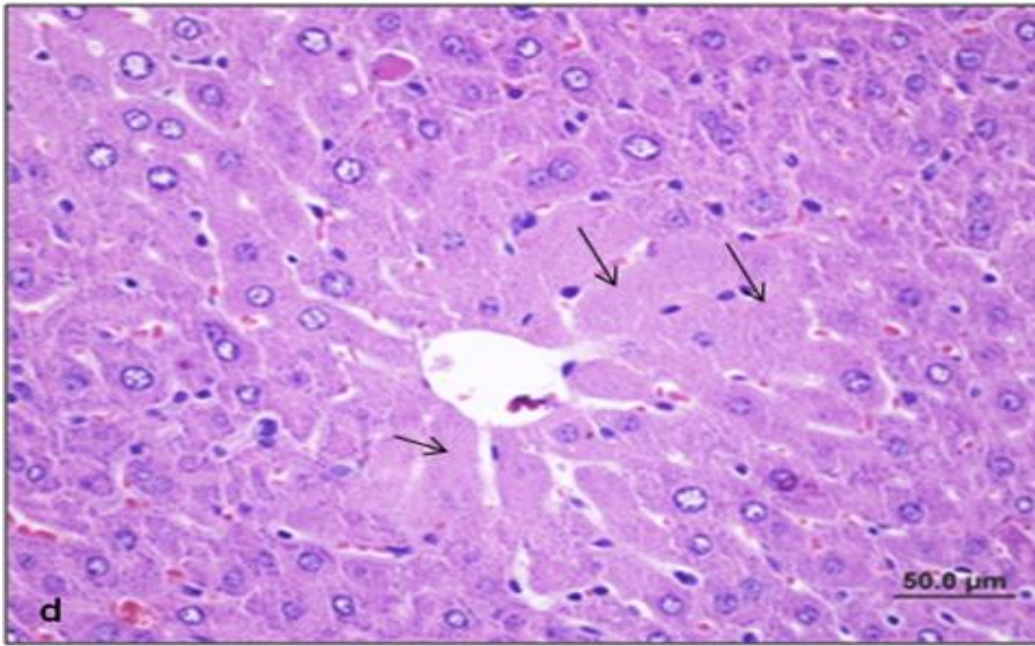
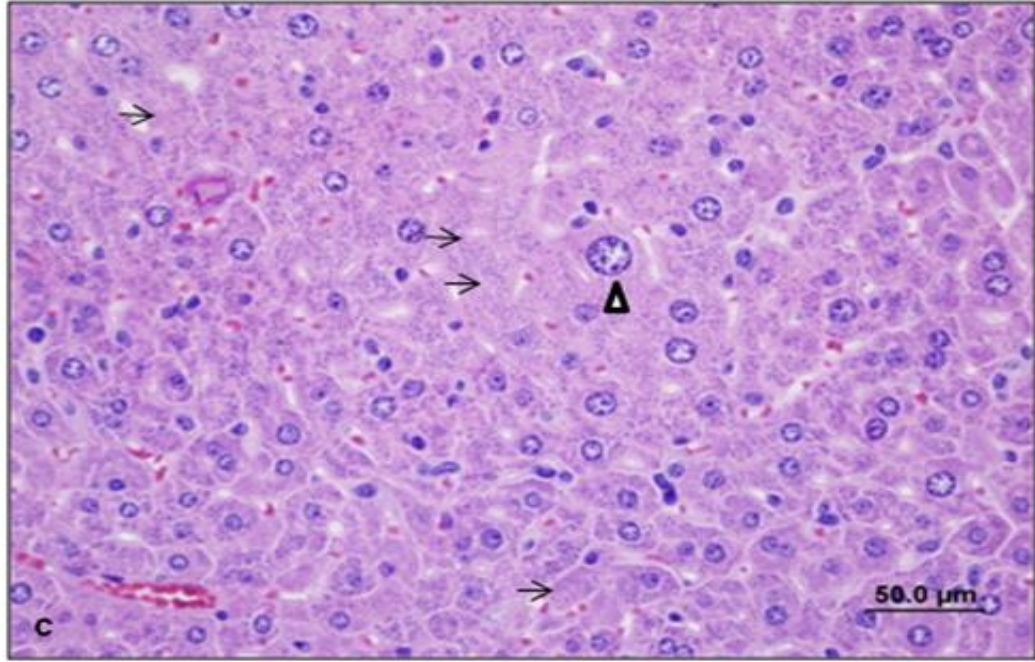
Şekil 4.4. D-GaIN/TNF- α uygulanan hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopik incelenmesi. Parankim dokuda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler (►) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (inf) ile vasküler kongesyon (→) (a-d) (bar:200 μm, bar:100 μm, bar:50.0 μm, HE)



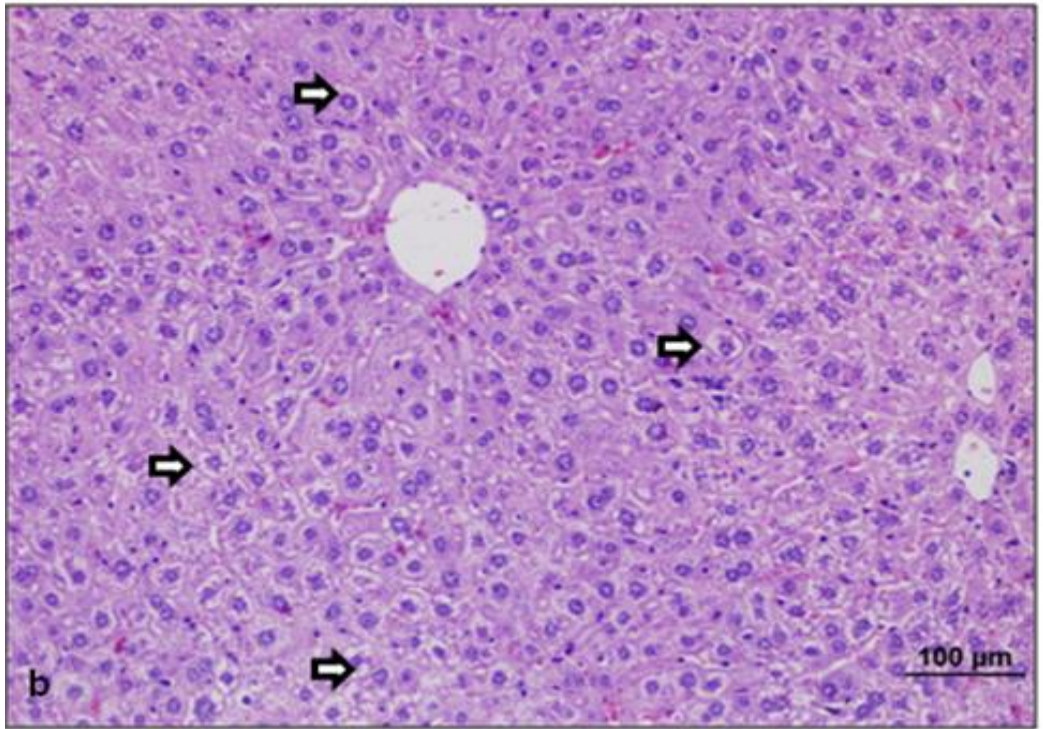
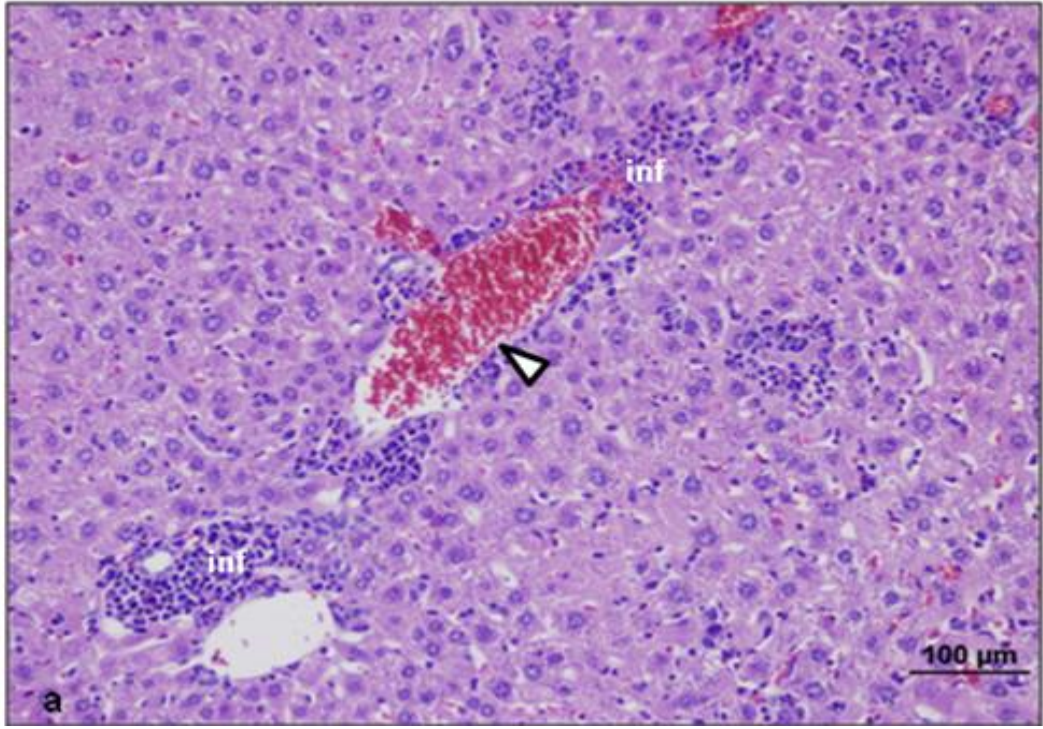
Şekil 4.4. (Devam) D-GaIN/TNF- α uygulanan hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopik incelenmesi. Parankim dokuda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler (►) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (inf) ile vasküler kongesyon (→) (a-d) (bar:200 µm, bar:100 µm, bar:50.0 µm, HE)



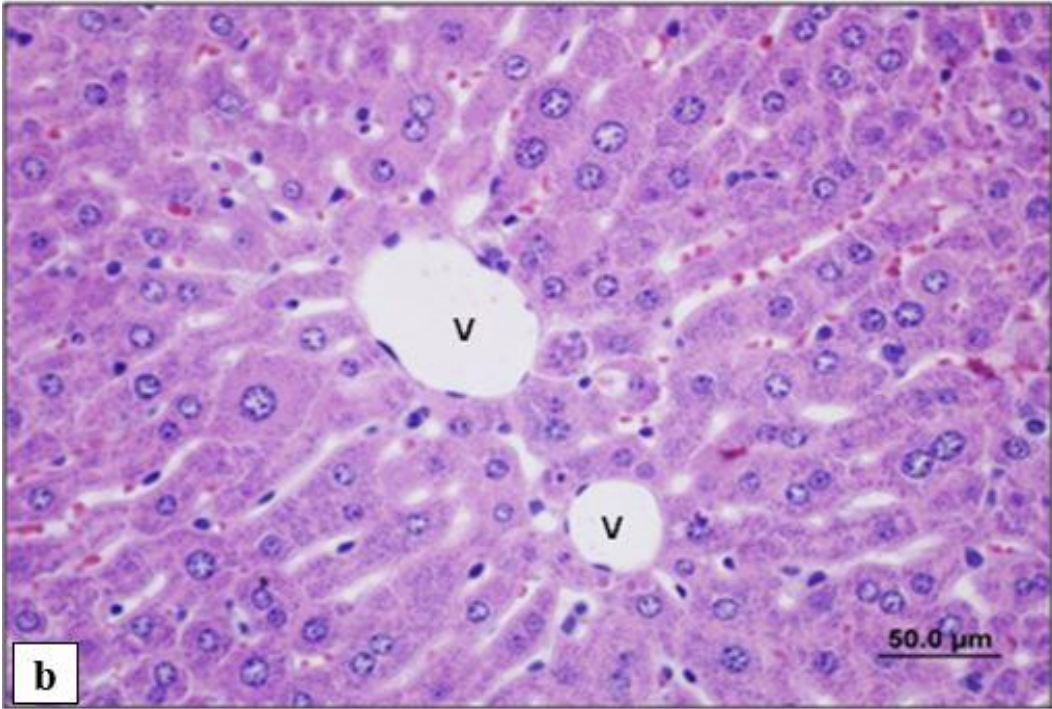
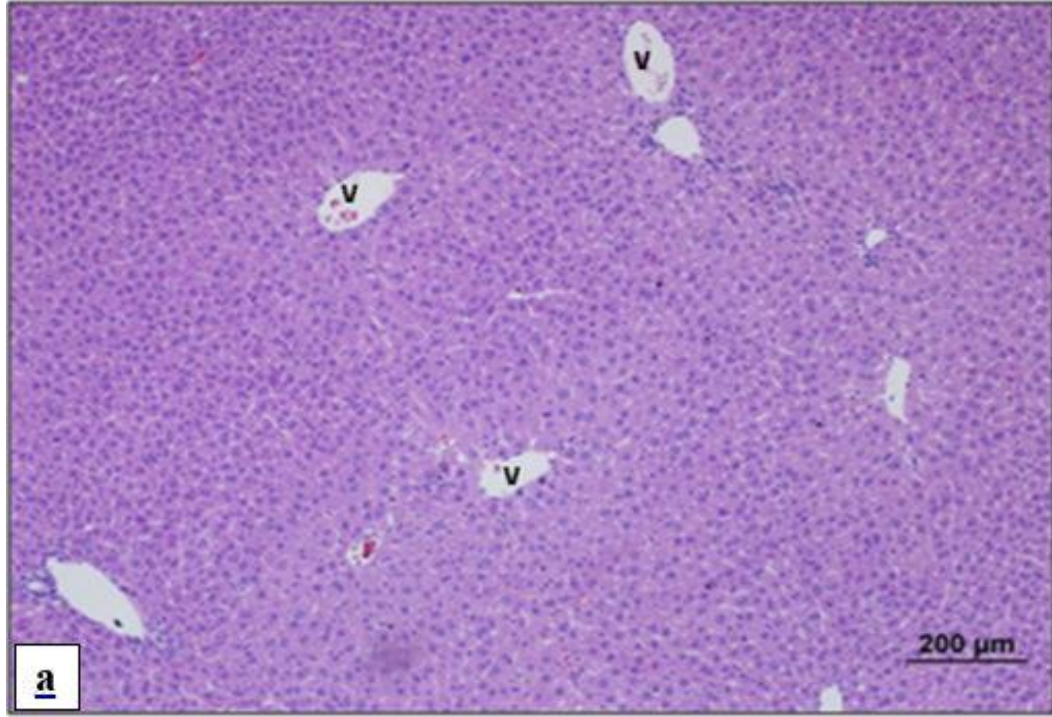
Şekil 4.5. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopik incelenmesi. Bazı hücrelerde karyolizis (\rightarrow), asimetrik nükleer yapı (\blacktriangleright) (a-d) (bar:100µm, bar:50.0µm, HE)



Şekil 4.5. (Devam) D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopik incelenmesi. Bazı hücrelerde karyolizis (\rightarrow), asimetrik nükleer yapı (\blacktriangleright) (a-d) (bar:100µm, bar:50.0µm, HE)



Şekil 4.6. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan hayvanların karaciğerlerinin ışık mikroskopunda incelenmesi. Parankim dokuda hüresel hasar (\rightarrow), vasküler kongesyon (\blacktriangleright), hüresel infiltrasyon (inf) (a,b) (bar: 100 μ m, HE)

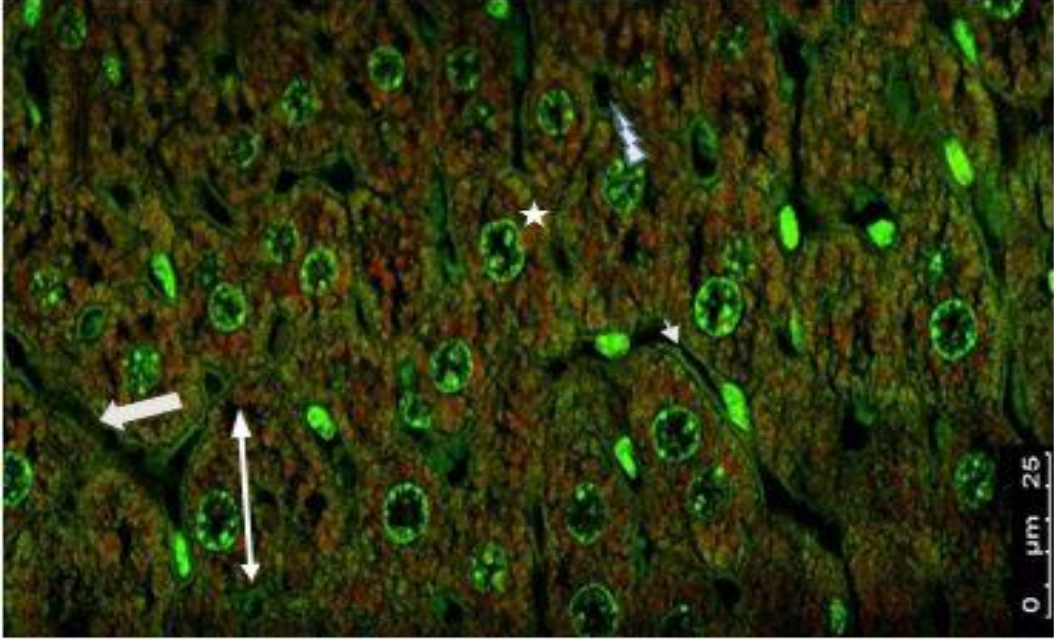


Şekil 4.7. D-GaIN/TNF- α /Sm-SLN uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusu (a,b) (v: vena sentralis) (bar:200µm, bar:50.0µm, HE)

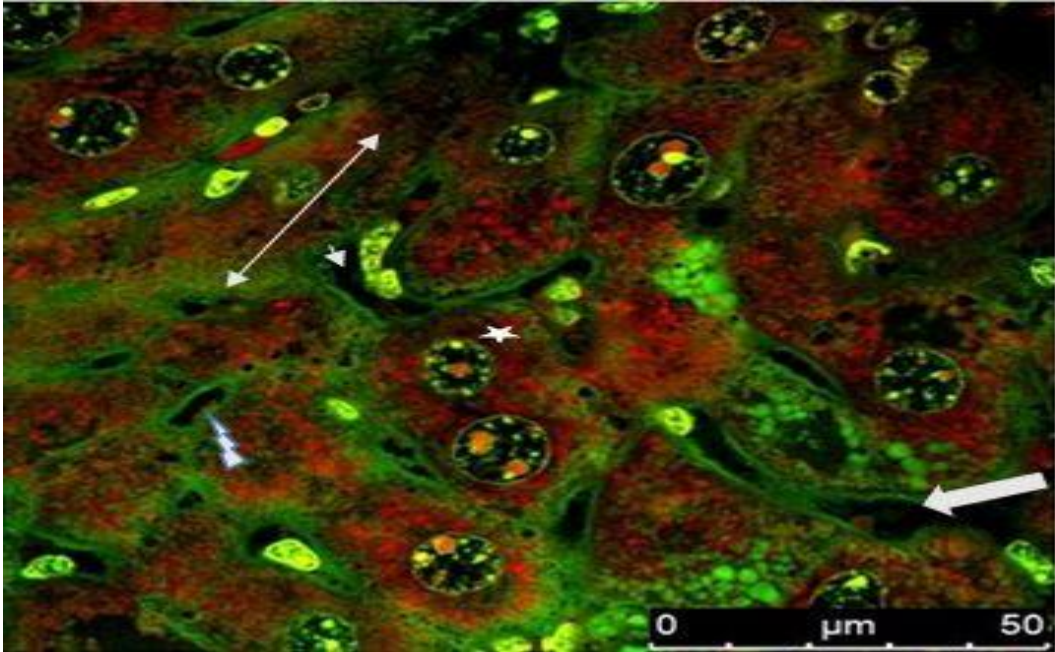
4.3.1. Karaciğer Örneklerinin Konfokal Mikroskop ile Yapısal Değişikliklerinin Görüntülenmesi

0.5 ml serum fizyolojik uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer örneklerinden alınan kesitler akridin oranj ve falloidin ile boyandıktan sonra konfokal mikroskopta ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda dokuda gözlemlenen hepatosit yapısı hasarsız, normal çekirdekli olarak bulunmuştur. Bu örneklerde doku bütünlüğü kompakt ve normal görülmüş ve safra kanalları ve sinusoidal yapılar da normal ve hasarsız olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bu kontrol grubuna zıt olarak karaciğer dokusuna hasar vermek amacıyla D-GaIN/TNF- α uygulanan Balb/c farelerden alınan karaciğer örneklerinde konfokal mikroskop altında çekilen görüntülerde küçülmüş hücre çekirdeği ve çekirdek zarında hafif büzüşme, hepatosit bütünlüğünde bozulma ve parçalanma, sinusoid dilatasyon ve safra kanalı hasar sonucu oluşan değişiklikler saptanmıştır (Şekil 4.9). Şekil 4.10'da gösterildiği gibi D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan üçüncü deney grubu Balb/c farelere ait karaciğer dokularında beklenen iyileşme yönündeki değişiklikler saptanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında saptanan bu değişiklikler normal hücre çekirdeği, sağlam hepatosit yapısı, normal sinüsoid yapısı, sağlıklı safra ve kanalı yapısı olarak bulunmuştur. Sentezlemiş olduğumuz nanopartikül formu olan katı lipit nanoformülasyonun etken madde içermeyen hali (KLN (Boş))'in D-GaIN/TNF- α uygulamasından sonra verildiği dördüncü grup Balb/c farelerde hasarlı grup olan ikinci grup ile benzer sonuçlar bulunmuştur. Beklenildiği gibi karaciğere hasar verilmiş farelere KLN (Boş) uygulaması sonucunda bu formülasyonun karaciğer üzerinde iyileştirici veya hasar yapıcı herhangi bir çarpıcı değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Bu grupta saptanan değişiklikler, küçülmüş hücre çekirdeği, hasarlı ve parçalanmış hepatosit yapısı, dilate sinüsoid yapısı, dilate safra kanalı ve dilate ve de hafif hasarlı ven yapısıdır (Şekil 4.11). Karaciğerine hasar verdiğimiz Balb/c farelerde esas iyileşmeyi görmeyi beklediğimiz grup olan beşinci deney grubuna D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulaması yapılmış ve deney süresi sonunda konfokal mikroskopik inceleme sonucunda beklenen iyileşme saptanmıştır. Bu grupta kontrol grubuna yani sağlıklı karaciğer dokusuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu değişiklikler sağlıklı hepatosit çekirdeği, kompakt ve sağlıklı hepatosit yapısı, sağlıklı ve normal

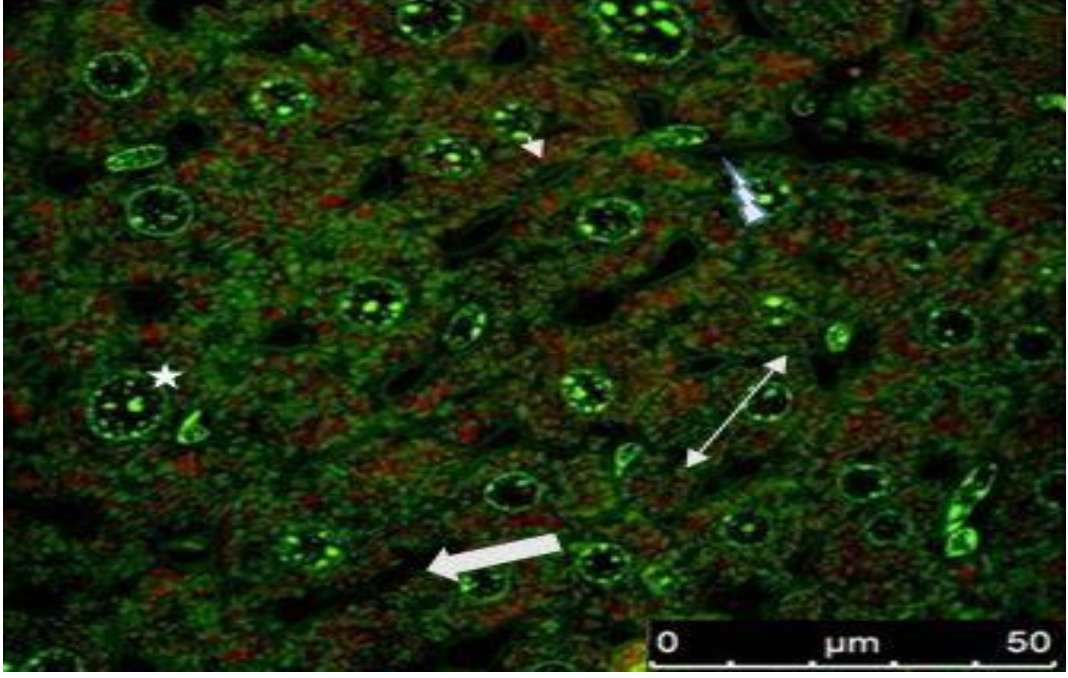
ebatlarda sinüsoid yapısı, normal yapı ve genişlikte safra kanalı, düzgün hücre hatları ve doku bütünlüğüdür (Şekil 4.12). Beşinci gruba ait bu bulgular sadece Sm uygulanan üçüncü gruba ait sonuçlarla karşılaştırıldığında ve bunların kontrol grubuna ait sonuçlarla birlikte değerlendirilmesi sonucunda Sm-KLN'nin karaciğer hasarını belirgin bir şekilde iyileştirdiği ve Sm'ye göre daha olumlu sonuç ve kontrol grubundaki sağlıklı karaciğer yapısına benzer bir yapı sağladığı ifade edilebilir.



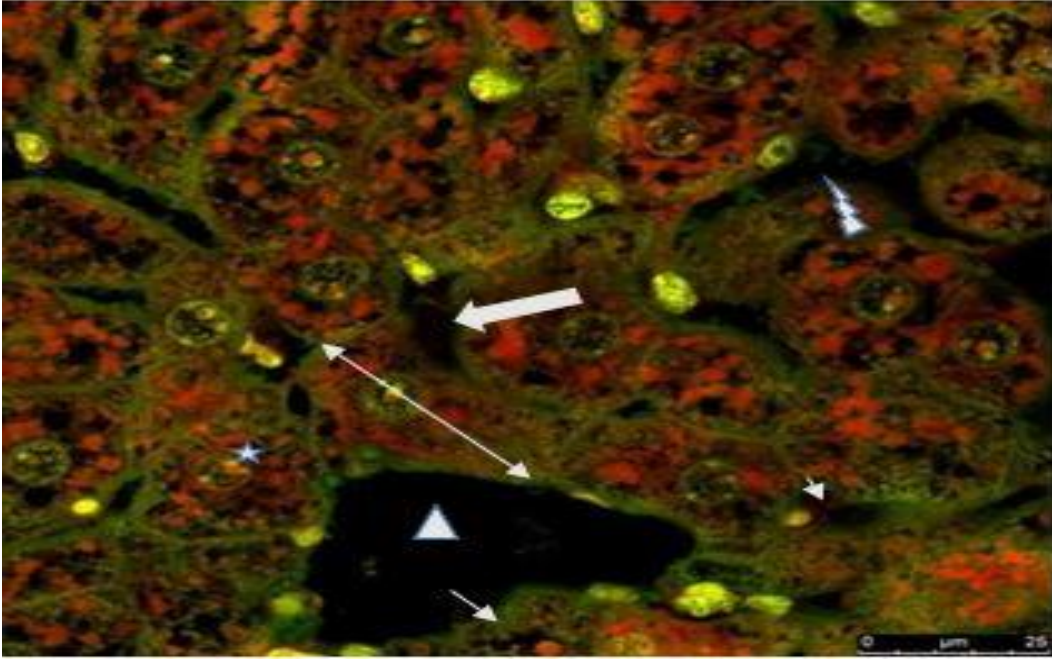
Şekil 4.8. Kontrol grubu Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akridin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü (25x). Hücre çekirdeği (yıldız), normal hepatosit yapısı (Çift yönlü ok), sinüsoid (ok), safra kanalı (şimşek)



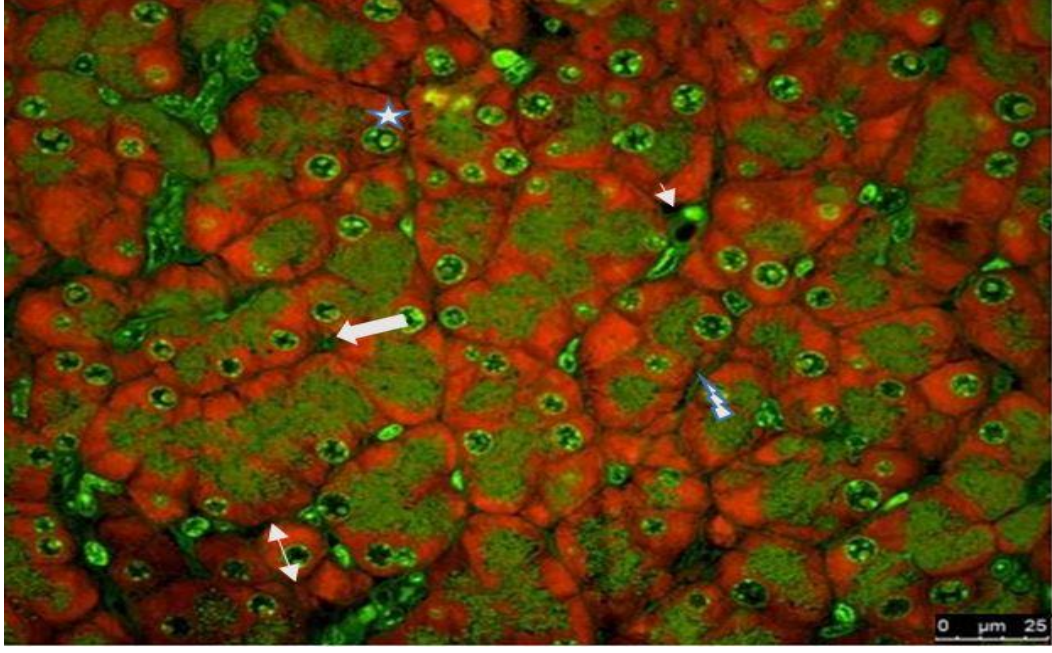
Şekil 4.9. D-GaIN/TNF- α uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akridin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü (63x). Büzüşmüş hücre çekirdeği, hasarlı hepatosit yapısı (Çift yönlü ok), genişlemiş sinüsoidler (ok), genişlemiş safra kanalı (şimşek)



Şekil 4.10. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akridin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü (40x). Normale yakın hücre çekirdeği (yıldız), kısmi toparlanmış hepatosit yapısı (çift yönlü ok), normale yakın sinüsoid yapısı (ok), safra kanalı (şimşek)



Şekil 4.11. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akridin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü (63x). Küçülmüş hücre çekirdeği (yıldız), hasarlı ve hücre bütünlüğü bozulmuş hepatosit yapısı (çift yönlü ok), dilate sinüsoid yapısı (şimşek); dilate safra kanalı (ok), kısmi inflamasyon (tek yönlü ok) ve ven dilatasyonu (üçgen)



Şekil 4.12. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan Balb/c farelere ait karaciğer dokusunun akrinin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanmış konfokal mikroskopik görüntüsü (40x). Normal sağlıklı hepatosit çekirdeği (yıldız), kompakt ve sağlıklı hepatosit yapısı (çift yönlü ok), sağlıklı sinusoid yapısı (şimşek), normal yapıda safra kanalı (ok) ve düzgün hücre hatları

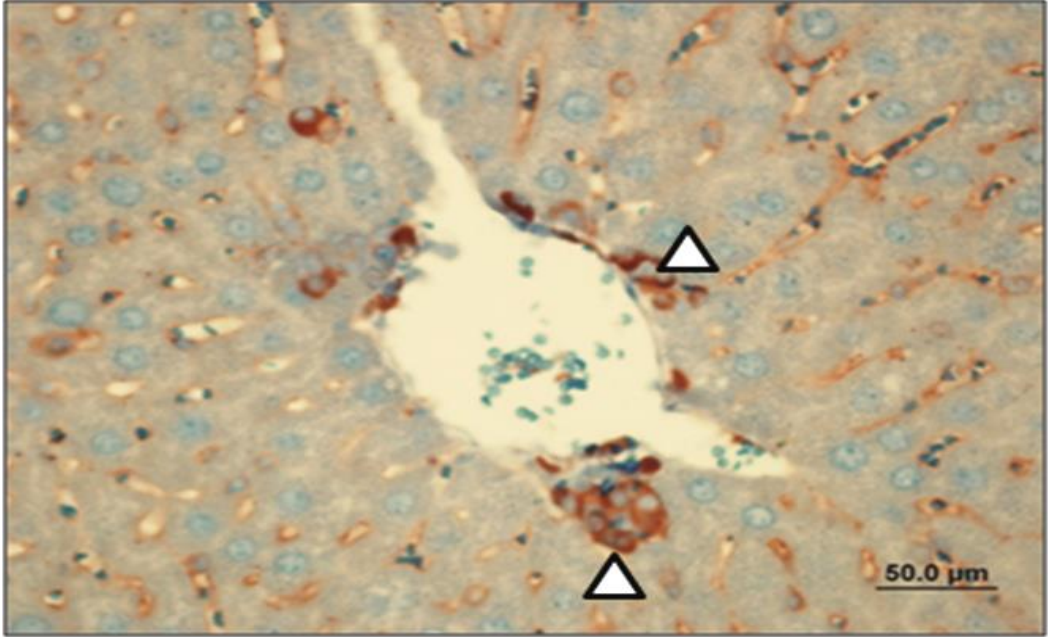
4.4.1. İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, Bcl-2, Bax ve PCNA antijenlerinin ışık mikroskopik düzeyde karaciğer hücrelerindeki yerleşimi ve yoğunluğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir.

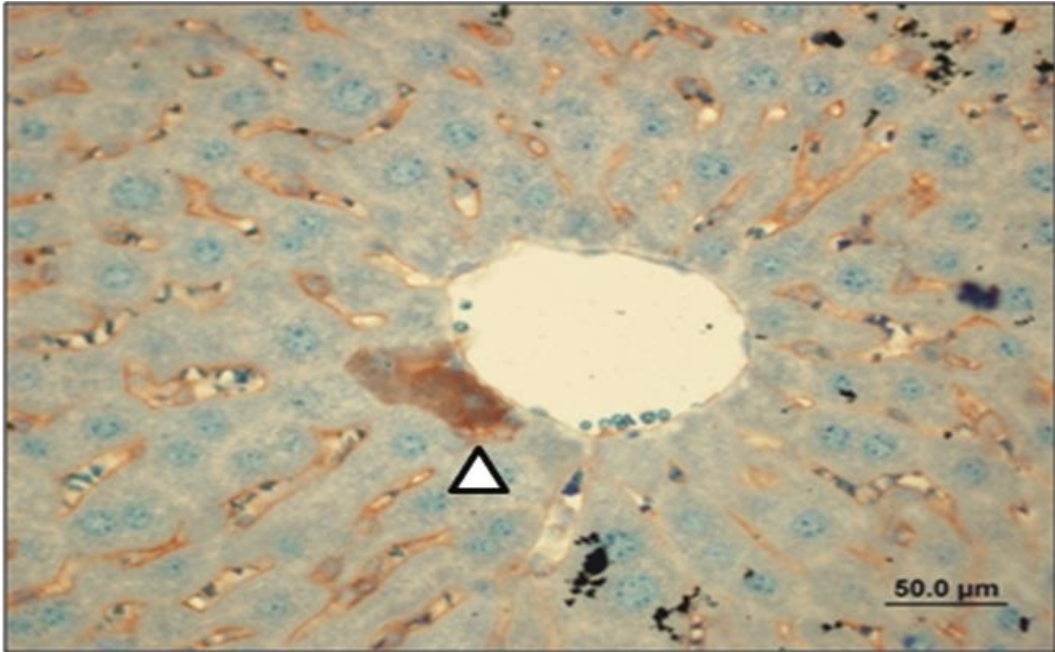
1. Deney Gruplarının Bcl-2 Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Kontrol grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde Bcl-2 pozitif boyanmış hepatositler gözlendi (Şekil 4.13 ve Şekil 4.18). D-GaIN/TNF- α verilen deney grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde az sayıda Bcl-2 pozitif boyanmış hepatositler gözlendi bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.14 ve Şekil 4.18). Sm ve D-GaIN/TNF- α verilen deney grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde sadece D-GaIN/TNF- α deney grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 pozitif boyanmış hücre sayısındaki hafif artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.15 ve Şekil 4.18). KLN (Boş) ve D-GaIN/TNF- α verilen deney grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 pozitif boyanmış hepatosit sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.16 ve Şekil 4.18). Bu deney grubundaki sonuçlar D-GaIN/TNF- α verilen deney grubunun sonuçları ile benzerlik gösterdiği saptandı.

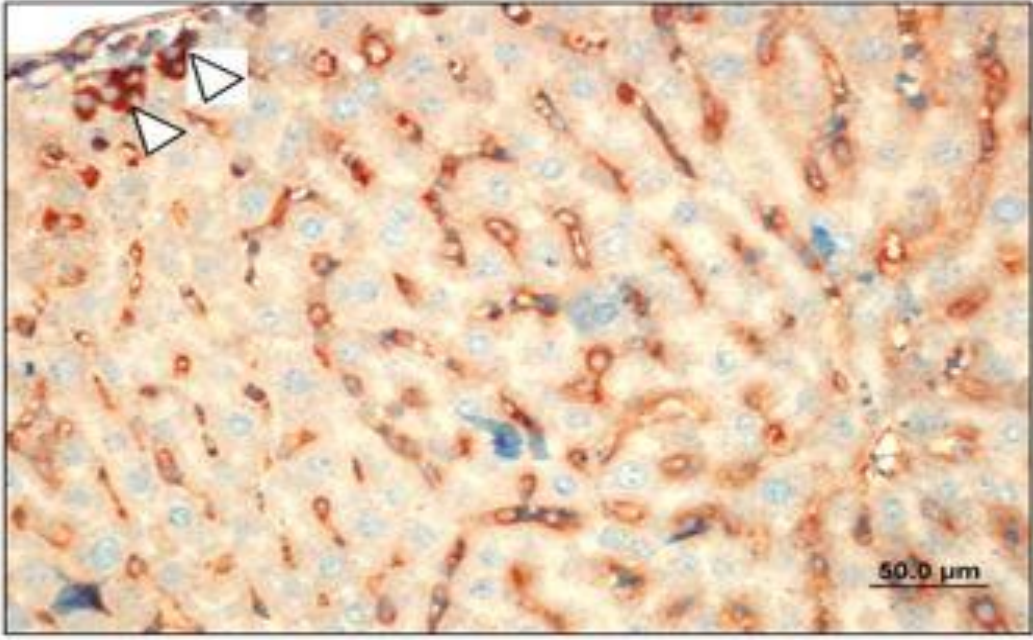
D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN verilen deney grubunu oluşturan karaciğer kesitleri incelendiğinde kontrol grubu hariç diğer tüm deney grupları ile karşılaştırıldığında Bcl-2 pozitif boyanmış hücre sayısında hafif artış olduğu görülmüş ve kontrol grubuna benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



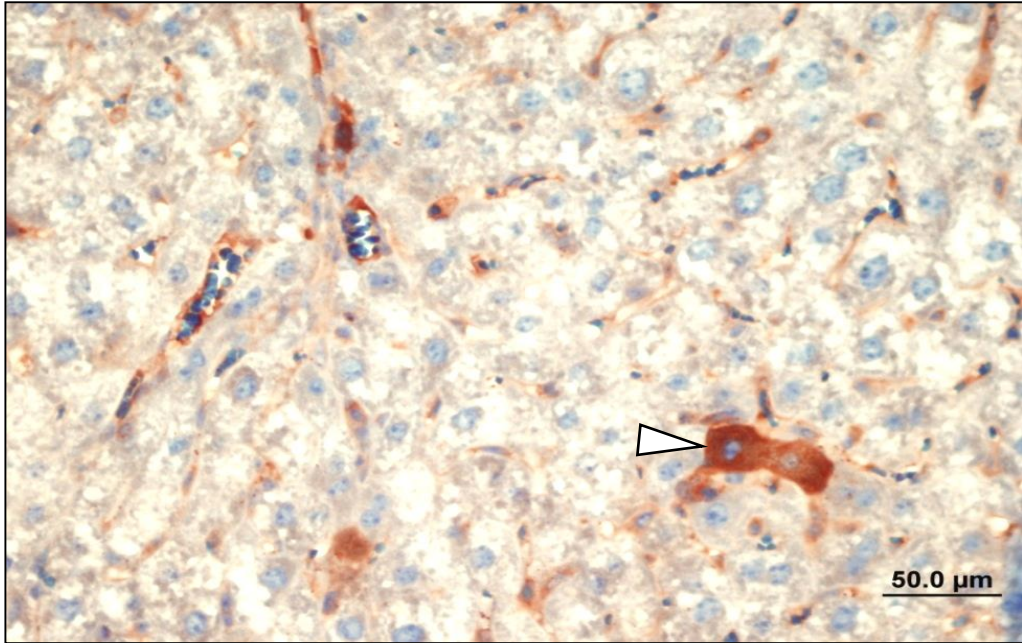
Şekil 4.13. Kontrol grubunu oluşturan karaciğerlerde Bcl-2 pozitif boyanma görüntüleri (bar:50.0µm)



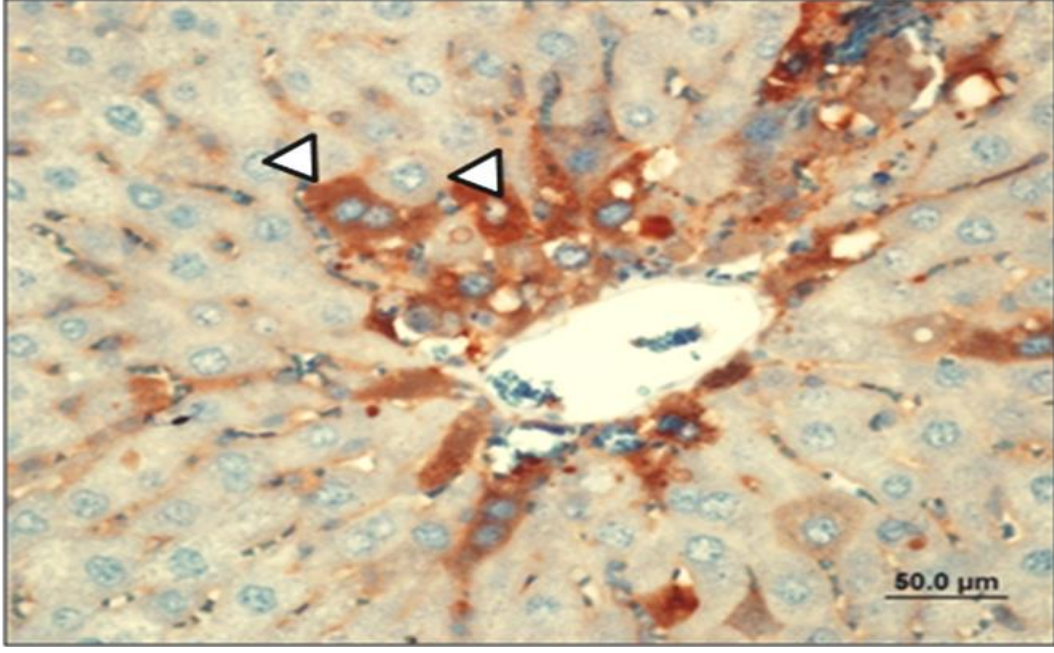
Şekil 4.14. D-GaIN/TNF- α uygulanan farelere ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüsü. Bcl-2 pozitif boyanmış hücreler (►)(bar:20.0µm)



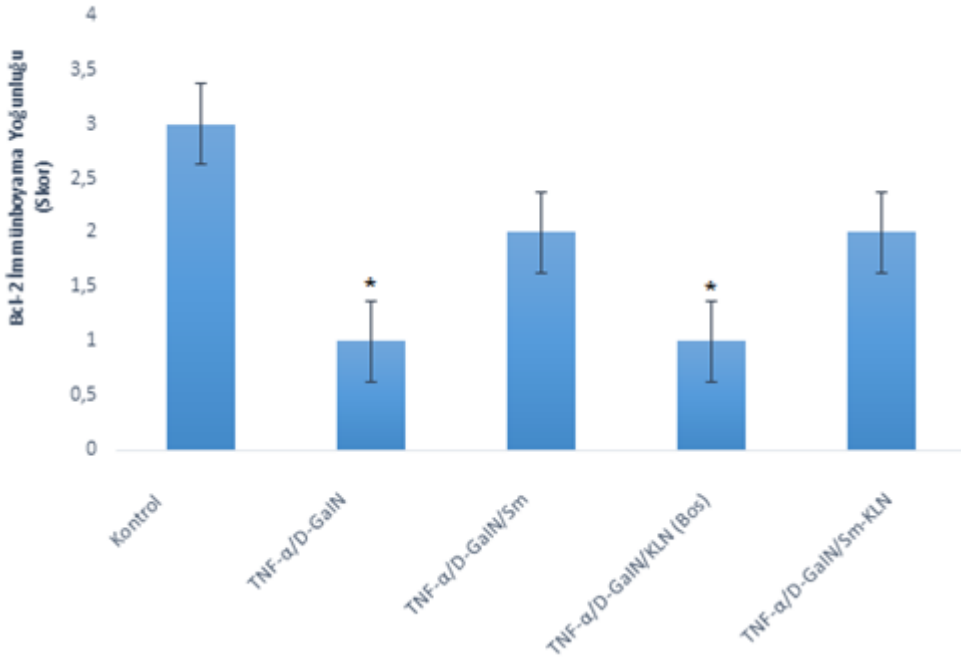
Şekil 4.15. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan farelerin karaciğer doku örnekleri. Bcl-2 pozitif boyanmış hücreler (►) (bar:50.0 μ m)



Şekil 4.16. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanmış Balb/c farelere ait karaciğer dokusu. Bcl-2 pozitif boyanmış hücreler (►)(bar:50.0 μ m)



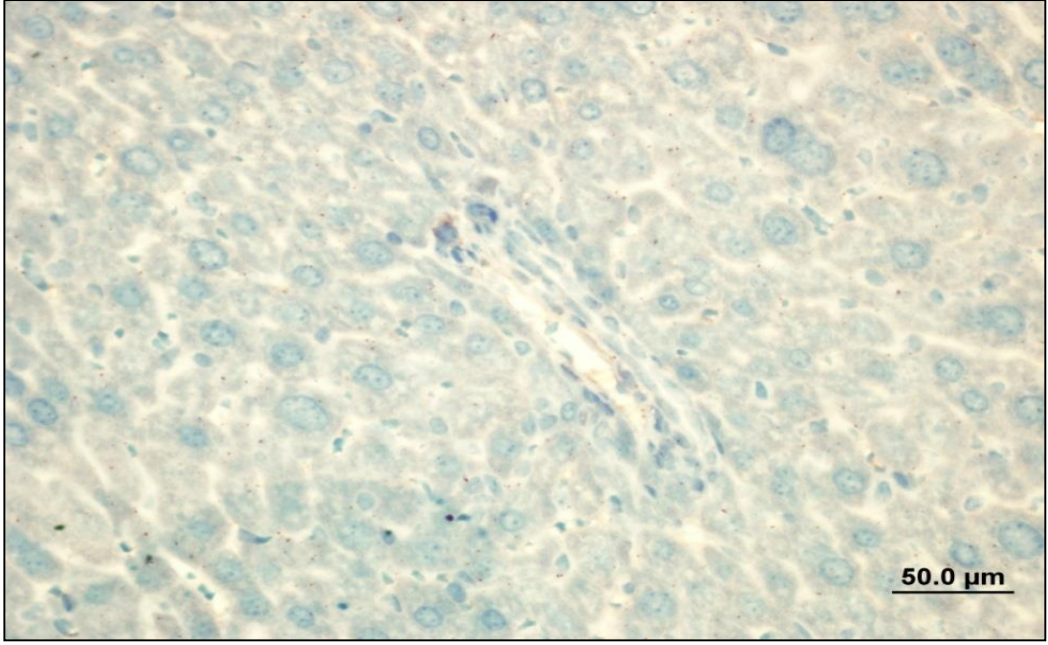
Şekil 4.17. D-GalN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan fare karaciğerlerinin ışık mikroskopundaki görüntüsü. Bcl-2 pozitif boyanmış hücreler (►)(bar:50.0 μ m)



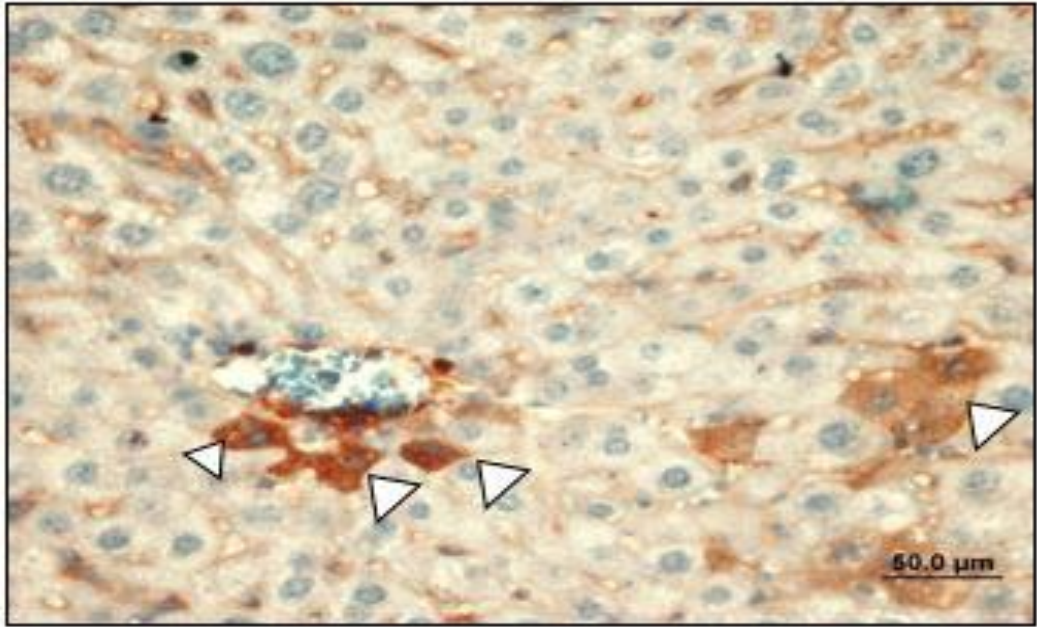
Şekil 4.18. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan karaciğer kesitlerinin Bcl-2 immünboyanma yoğunluğu. * $p < 0.05$ (Kontrol grubuna göre elde edilen farklılık)

2. DeneY Grublarının Bax Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

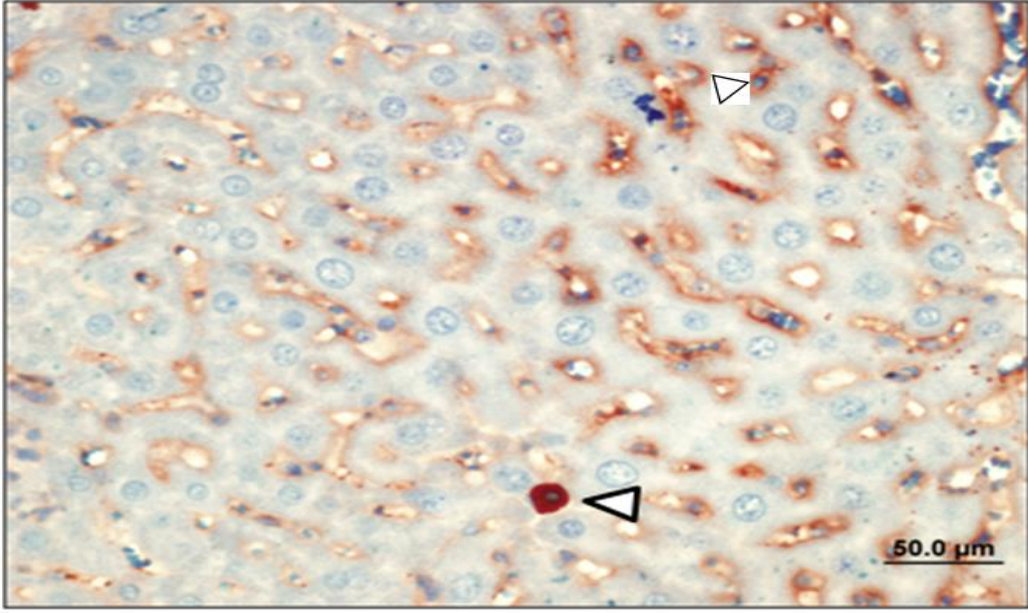
Kontrol grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde Bax negatif boyanmış hepatositler gözlendi (şekil 4.19. ve şekil 4.24). D-GaIN/TNF- α verilen deneY grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde Bax pozitif boyanmış hepatosit sayısı bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (şekil 4.20 ve şekil 4.24). Sm ve D-GaIN/TNF- α verilen deneY grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde Bax pozitif boyanmış hücre sayısındaki azalma sadece D-GaIN/TNF- α verilen deneY grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$)(şekil 4.21 ve şekil 4.24). KLN (Boş) ve D-GaIN/TNF- α verilen deneY grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde Bax pozitif boyanmış hücre sayısındaki artış bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$)(şekil 4.22 ve şekil 4.24). Bu deneY grubundaki sonuçlar sadece D-GaIN/TNF- α verilen deneY grubunun sonuçları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Sm-KLN ve D-GaIN/TNF- α verilen deneY grubunu oluşturan karaciğer kesitlerinde kontrol grubu hariç diğer tüm deneY grupları ile karşılaştırıldığında Bax pozitif boyanmış hepatosit sayısında fazla miktarda azalma olduğu ve kontrol grubuna benzerlik gösterdiği saptandı (şekil 4.23 ve şekil 4.24).



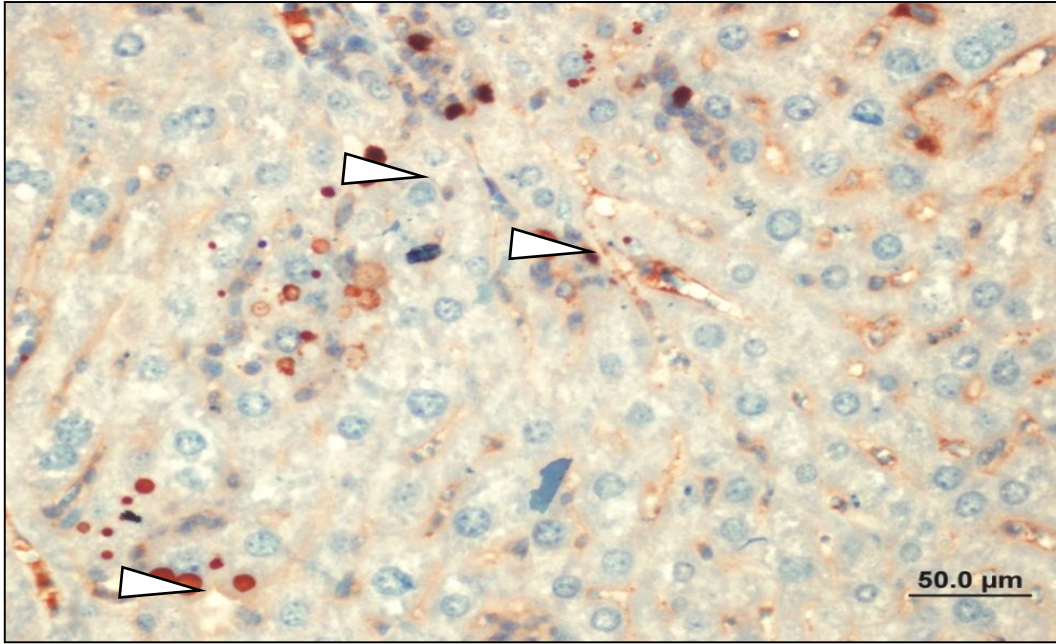
Şekil 4.19. Kontrol grubunu oluşturan karaciğerlerde Bax negatif boyanma görüntüleri (bar:50.0μm)



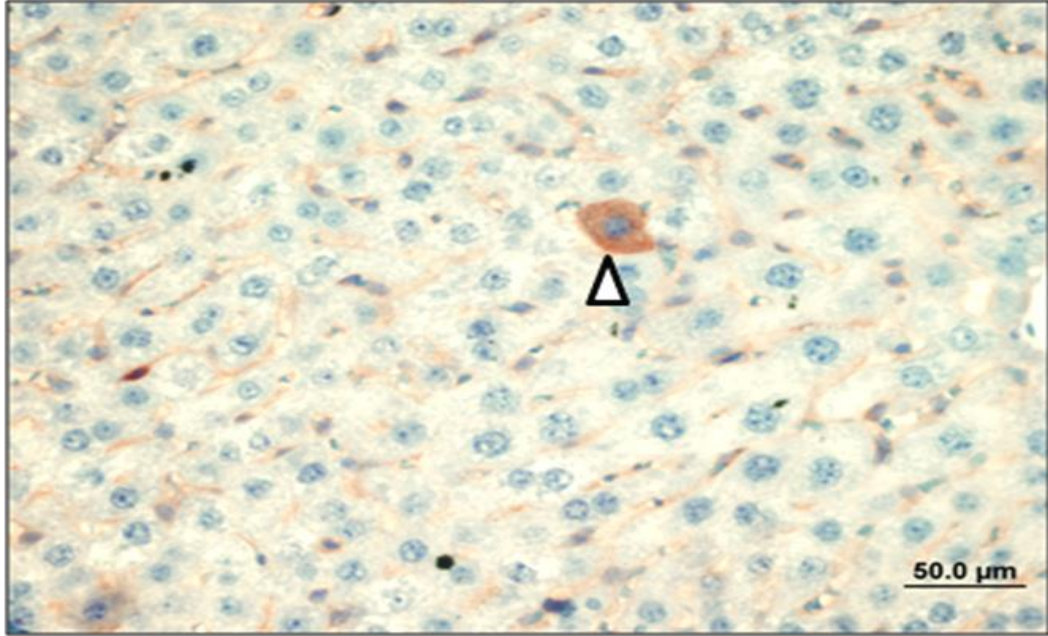
Şekil 4.20. D-GaIN/TNF- α grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüsü. Bax pozitif boyanmış hücreler (►) (bar:50.0μm)



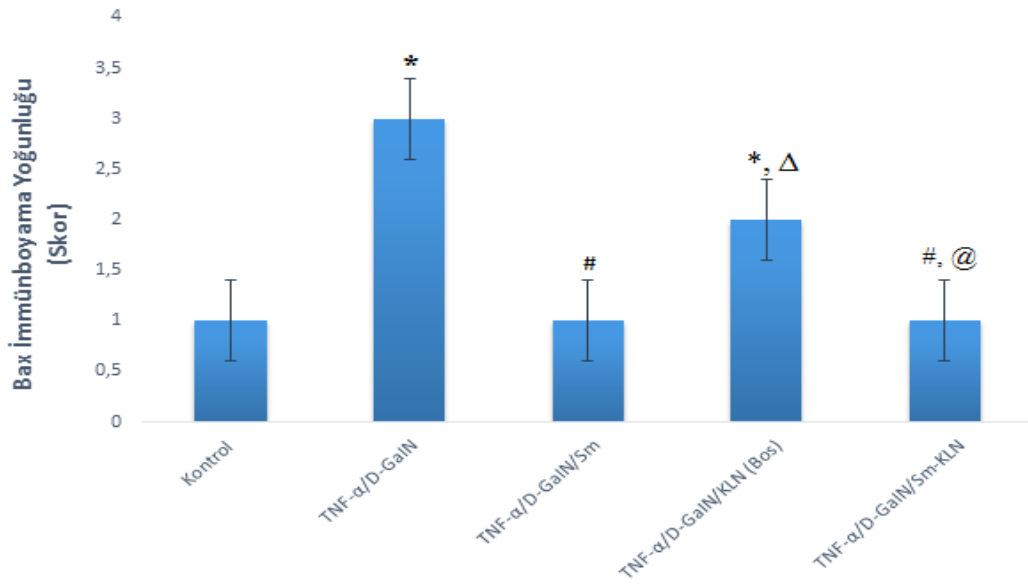
Şekil 4.21. D-GaIN/TNF- α /Sm grubuna ait karaciğer dokusu. Bax pozitif boyanmış hücreler (►)
(bar:50.0 μ m)



Şekil 4.22. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan grubun karaciğer doku görüntüsü. Bax pozitif
boyanmış hücreler (►)(bar:50.0 μ m)



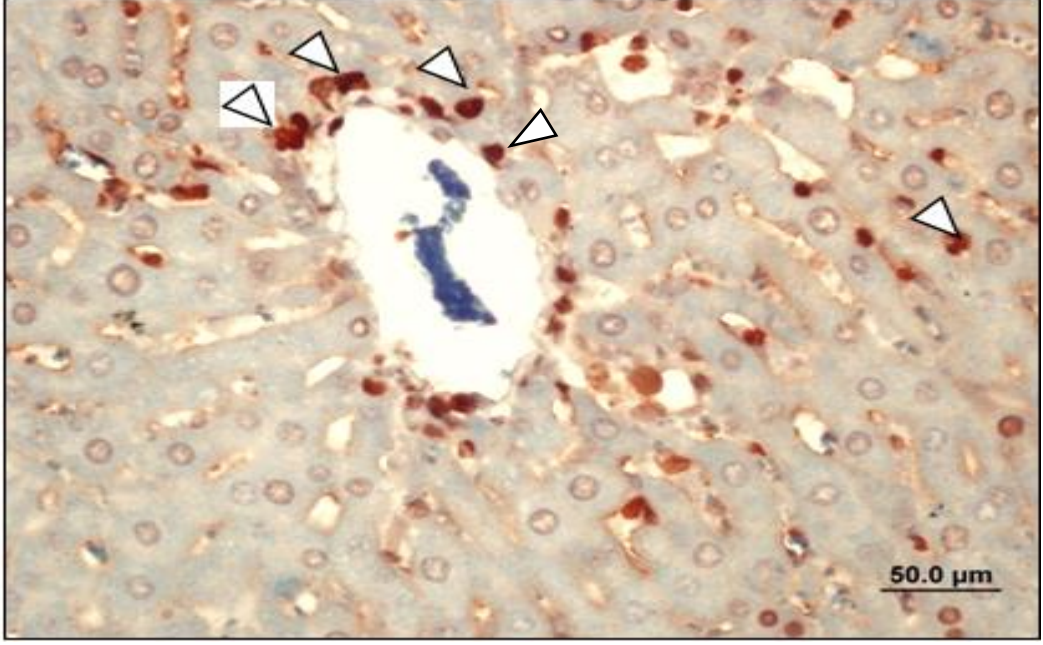
Şekil 4.23. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan fare karaciğerinin Bax boyanma görüntüsü. Bax pozitif boyanmış hücreler (▶)(bar:50.0 μ m)



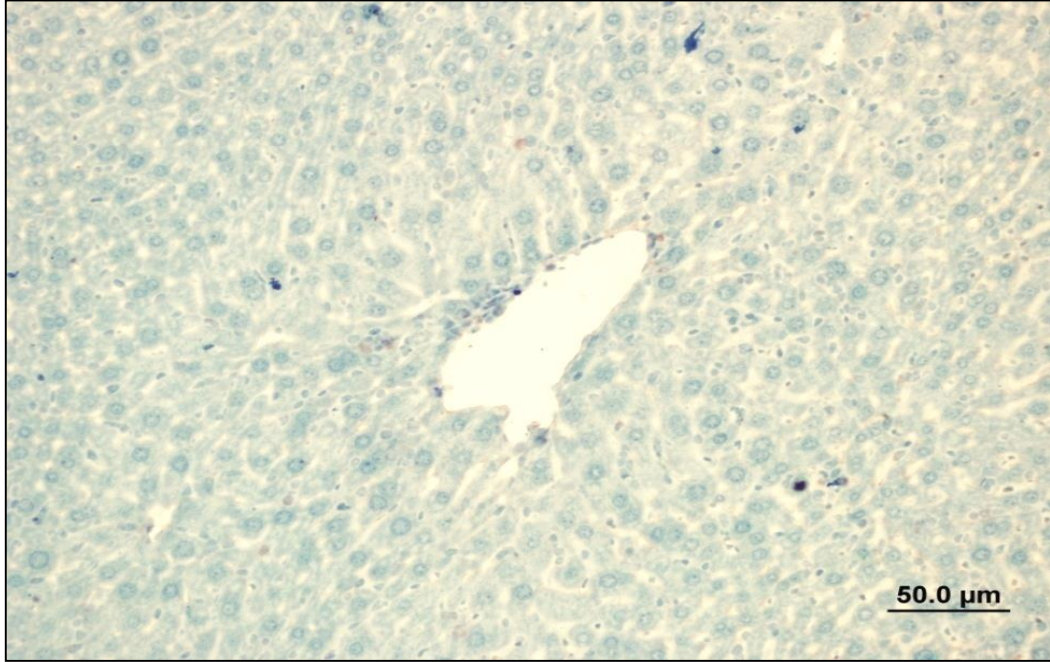
Şekil 4.24. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan karaciğer kesitlerinde Bax immünboya yoğunluğu. * $p < 0.05$ (Kontrol grubuna göre elde edilen farklılık), # $p < 0.05$ (D-GaIN/TNF- α grubuna göre elde edilen farklılık), $\Delta p < 0.05$ (D-GaIN/TNF- α /Sm grubuna göre elde edilen farklılık), @ $p < 0.05$ (D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubuna göre farklılık)

3. Deneş Grublarının oğalan Hücrelerin Nukleus Antijeni (PCNA) Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

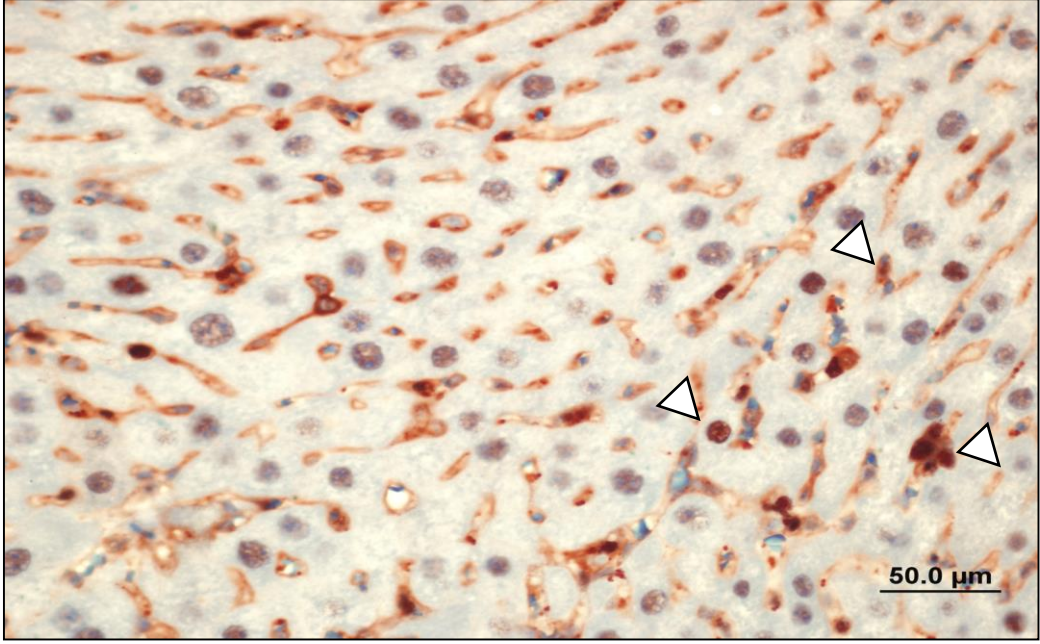
Karaciğerde ışık mikroskobik düzeyde belirgin olarak hepatositlerde PCNA immünoreaktivite gözlenmiştir. Her dört gruba ait ışık mikroskobu düzeyinde yapılan PCNA işaretlemesi sonucu elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir. Kontrol grubuna ait deneş hayvanlarının karaciğer kesitlerinde, yok denecek kadar immünoreaktivite gösteren hepatosit gözlendi (şekil 4.25 ve şekil 4.30). D-GaIN/TNF- α verilen deneş grubuna ait karaciğer kesitlerinde gözlenen immünoreaktivite bulguları, kontrol grubundan farklı olduğu gözlendi ($p<0.05$). Kesitler incelendiğinde immün pozitif hepatositlerin yok denecek kadar az olduğu saptandı (şekil 4.26 ve şekil 4.30). D-GaIN/TNF- α /Sm verilen bu grupta bulunan deneş hayvanlarının karaciğer kesitlerinde gözlenen PCNA immünoreaktivite bulguları, kontrol grubu ve D-GaIN/TNF- α verilen gruba göre farklı olduğu gözlendi ($p<0.05$). Kesitler incelendiğinde sayıca artan immün pozitif reaktivitesinin dokunun genelinde yaygın konumlandıkları saptandı (şekil 4.27 ve şekil 4.30). KLN (Boş) ve D-GaIN/TNF- α verilen deneş grubuna ait karaciğer kesitlerinde gözlenen immünoreaktivite bulguları, kontrol grubundan farklı olduğu gözlendi ($p<0.05$). Kesitler incelendiğinde immün pozitif hepatositlerin yok denecek kadar az olduğu saptandı (şekil 4.28 ve şekil 4.30). Sm-KLN ve D-GaIN/TNF- α verilen deneş grubuna ait karaciğer kesitlerinde gözlenen PCNA immünoreaktivite bulguları, kontrol grubu ve D-GaIN/TNF- α verilen gruba göre farklı olduğu gözlendi ($p<0.05$). Kesitler incelendiğinde sayıca çok artan immün pozitif reaktivitesinin dokunun genelinde yaygın konumlandıkları saptandı (şekil 4.29 ve şekil 4.30).



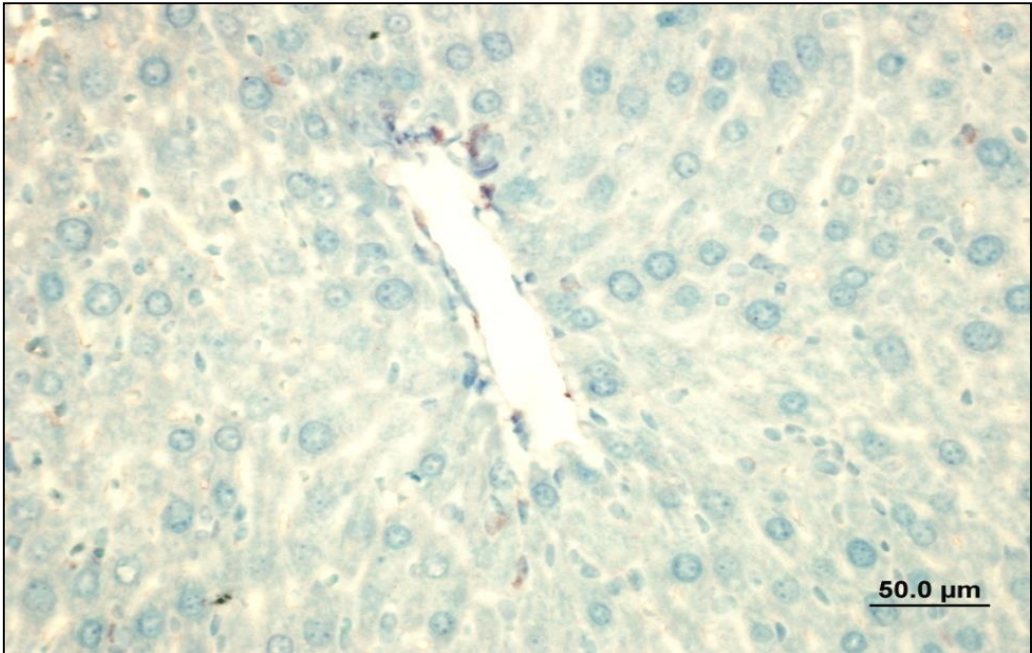
Şekil 4.25. Kontrol grubunu oluşturan karaciğer dokusunda PCNA saptanmasının ışık mikroskopundaki görüntüsü. PCNA pozitif boyanmış hepatositler (►) (bar:50.0μm)



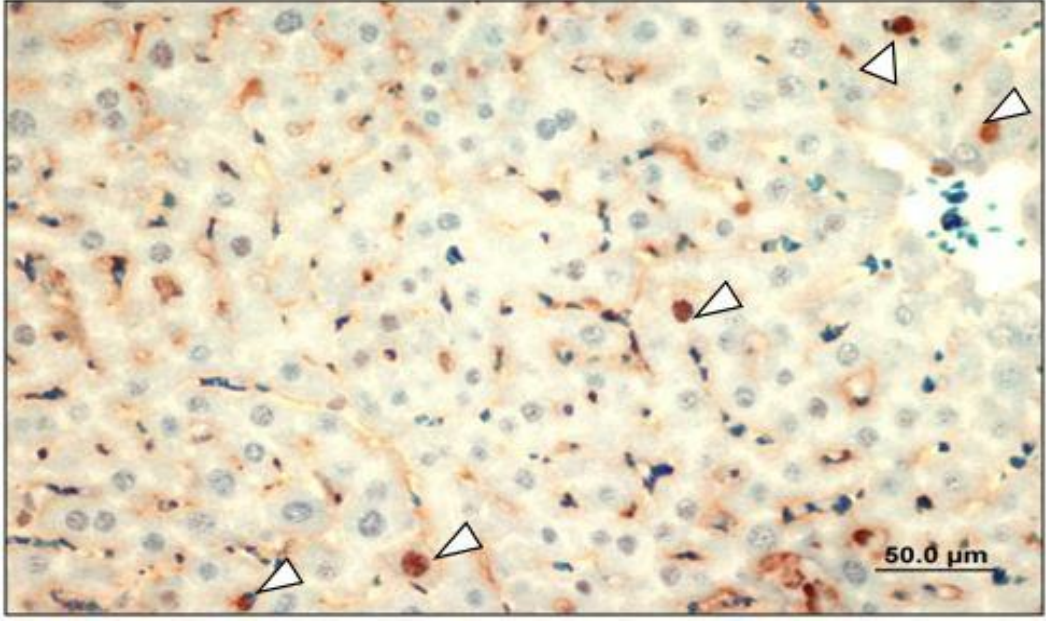
Şekil 4.26. D-GaIN/TNF-α grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüsü. PCNA negatif hepatositler (bar:50.0μm)



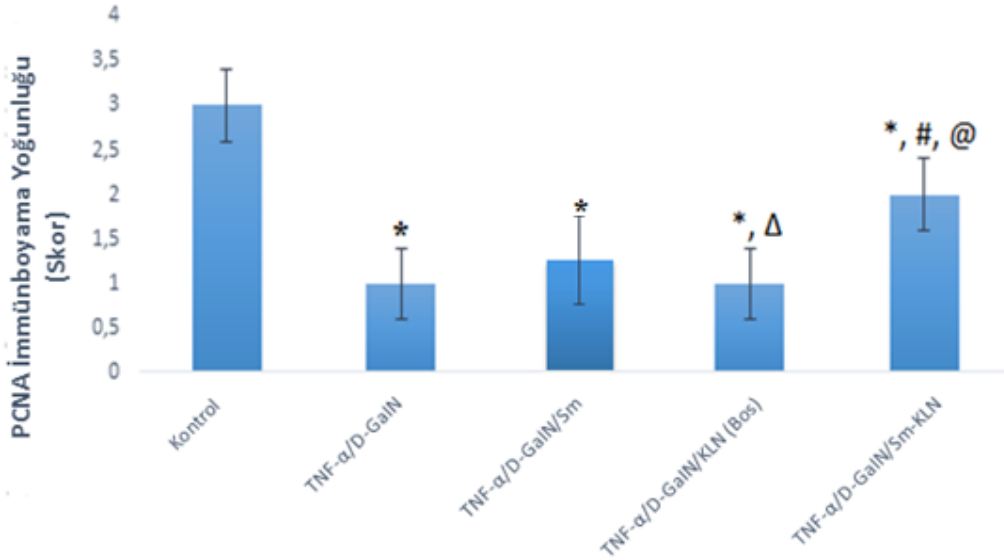
Şekil 4.27. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan farelerin karaciğer doku görüntüsü. PCNA pozitif boyanmış hepatosit (►)(bar:50.0 μ m)



Şekil 4.28 D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan fare karaciğer dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. PCNA negatif boyanmış hepatositler (bar:50.0 μ m)



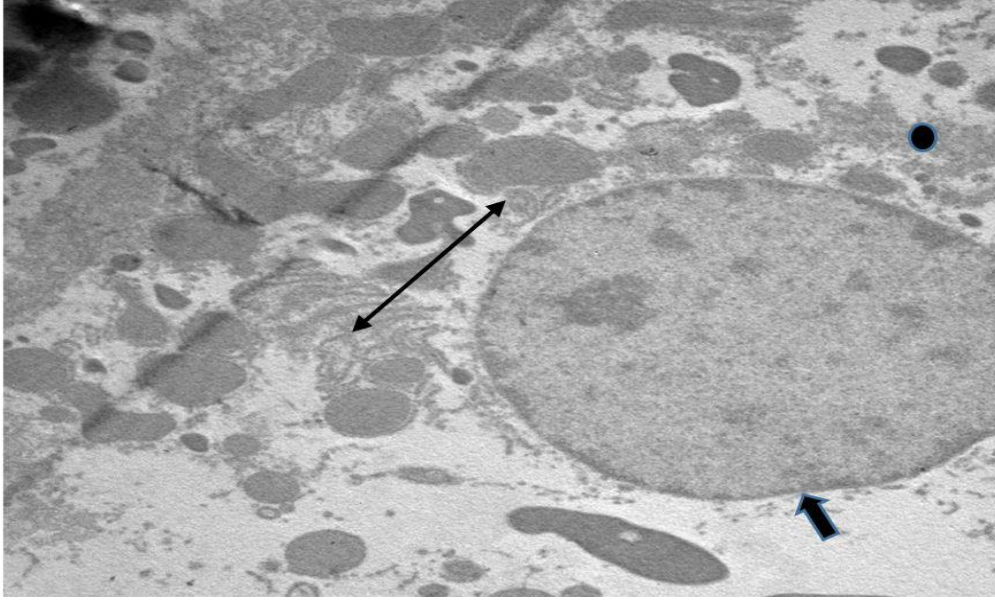
Şekil 4.29. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN grubunu karaciğer dokusunun PCNA boyanma görüntüsü. PCNA pozitif boyanmış hepatosit (►)(bar:50.0 μ m)



Şekil 4.30. Tüm deney gruplarına ait Balb/c farelerden alınan karaciğer kesitlerinde PCNA immünboyama yoğunluğu. * $p < 0.05$ (Kontrol grubuna göre elde edilen farklılık), # $p < 0.05$ (D-GaIN/TNF- α grubuna göre elde edilen farklılık), $\Delta p < 0.05$ (D-GaIN/TNF- α /Sm grubuna göre elde edilen farklılık), @ $p < 0.05$ (D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) grubuna göre farklılık)

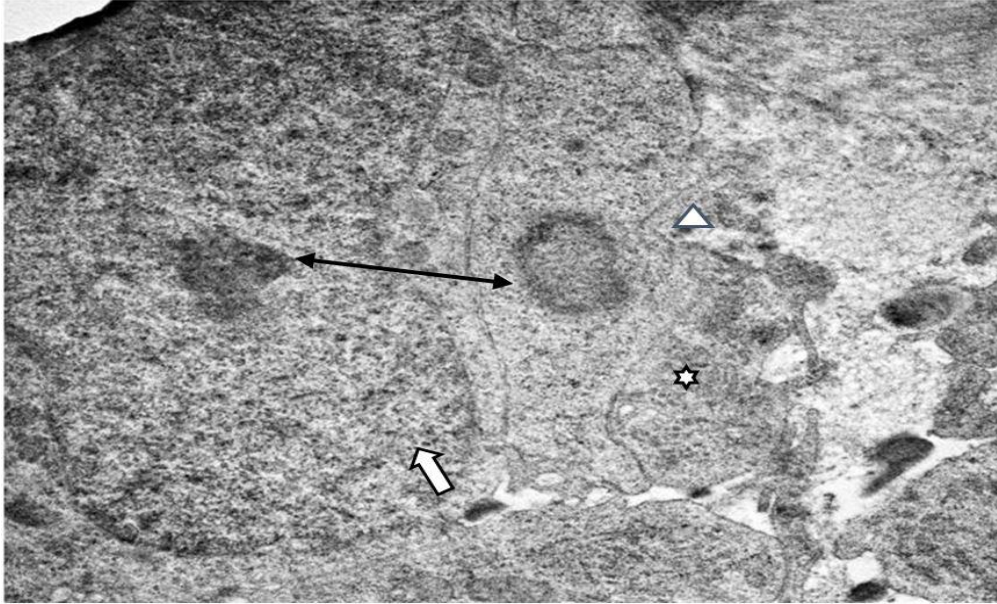
4.5.1 Karaciğer Örneklerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin Görüntülenmesi

D-GaIN/TNF- α ile karaciğeri hasarlanan Balb/c farelere uygulanan Sm ve Sm yüklü KLN maddelerinin etkilerini gözlemlemek amacıyla geçirimli elektron mikroskopik takip yapılmış ve tüm hayvan grupları incelenmiştir. Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu karaciğer dokusuna ait hepatositlerde küçük tek tip çekirdek, granüllü sitoplazma ve normal hücre ve organel yapısı gözlemlenmiştir (Şekil 4.31). D-GaIN/TNF- α uygulanan farelere ait hepatositte çoklu düzensiz ve birbirine yakın çekirdek yapısı ve düzensiz sitoplazmalı hafif büzüşmüş hücreler saptanan değişikliklerdir (Şekil 4.32). D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hepatositlerin elektron mikroskopik görüntüsünde ise çekirdek membranı ve kromatin belirginleşmesi, endoplazmik retikulum ve mitokondri yapı hasarlarında düzelme (kristalarda belirginleşme) ve glikojen birikmesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.33). Hasarlı karaciğere sahip Balb/c farelere KLN (Boş) uygulamasından sonra incelenen karaciğer dokusunda hepatositin yapısında ikinci (karaciğeri hasarlanmış) gruba benzer olarak çoklu düzensiz ve birbirine yakın çekirdek yapısı ayrıca mitokondrielerde krista erimesi ve endoplazmik retikulum yapısında hasar saptanmıştır (Şekil 4.34). Bu grupta lipid damlacıklarının kontrol grubuna göre artışı görülmüştür. Sm-KLN uygulanan Balb/c farelere ait hepatositin elektron mikroskopik incelenmesi sonucunda ise Sm uygulanan gruba göre kontrol daha yakın bulgular saptanmıştır. Bulgular, korunmuş mitokondri kristaları, düzgün yapıllı çekirdek membranı, düzenli ve artmış sitoplazmik glikojen granülleri olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.31. Kontrol grubu Balb/c farelere ait hepatositin elektron mikroskopik görüntüsü (6000X).

Tek tip küçük hepatosit çekirdeği (➡), granüllü sitoplazma(↔), normal hücre ve organel yapısı(●)

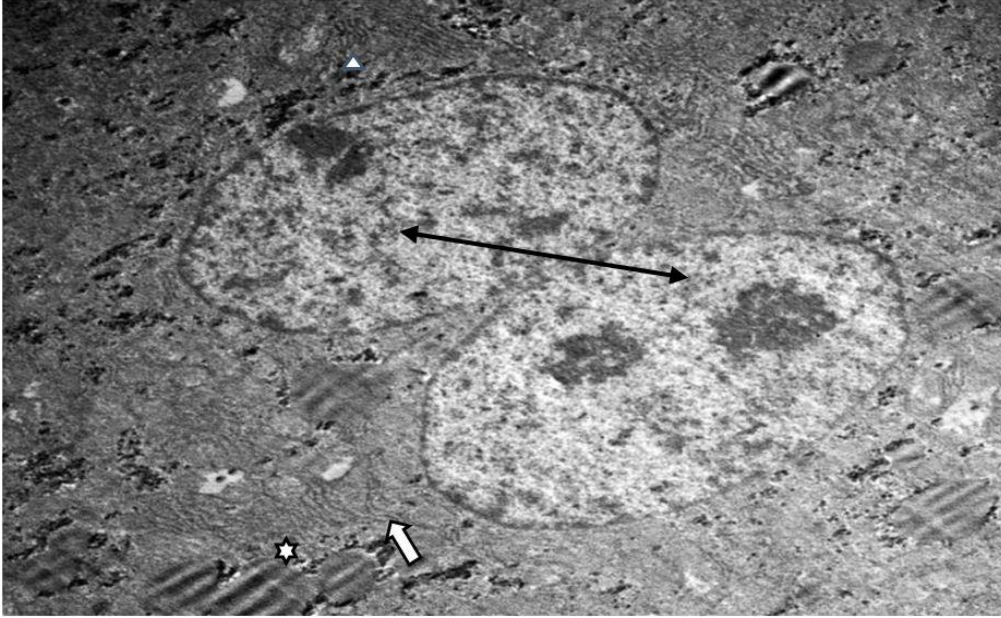


Şekil 4.32. D-GaIN/TNF- α uygulanan farelere ait hepatositin elektron mikroskopik görüntüsü (8200X).

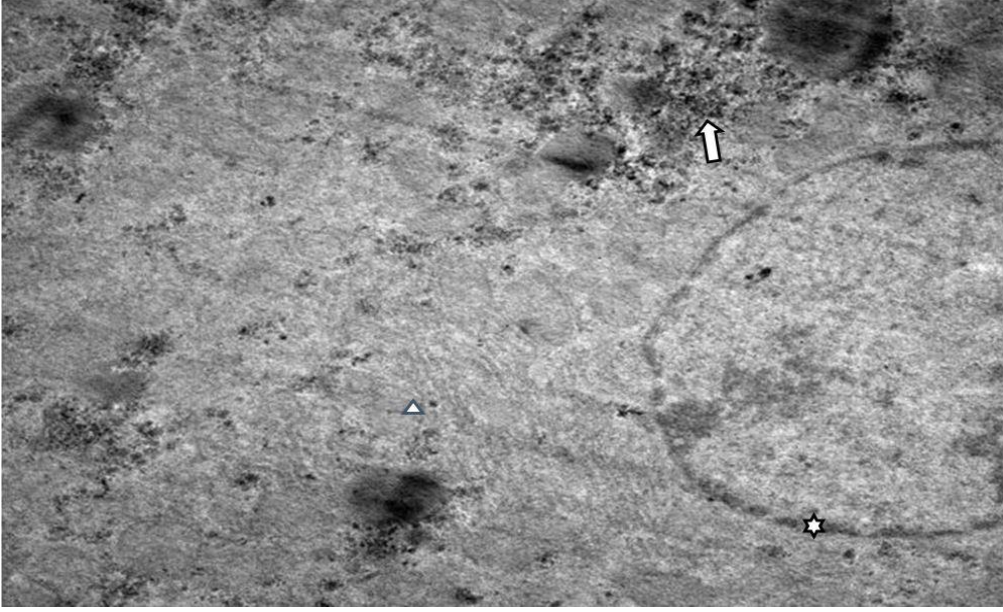
Çoklu düzensiz ve birbirine yakın çekirdek yapısı (↔), düzensiz sitoplazma, (⇒) hafif büzüşmüş hücreler (△), krista kaybı (☆)



Şekil 4.33. D-GaIN/TNF- α /Sm uygulanan hepatositin elektron mikroskopik görüntüsü (8200X). Nükleer membran (\Rightarrow), kromatin belirginleşmesi (\star), endoplazmik retikulum hasarı (\circ), mitokondri yapı hasarlarında düzelme (\triangle), glikojen birikmesinde artış ($\blackleftarrow\rightarrow$)



Şekil 4.34. D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) uygulanan Balb/c farelere ait hepatositin elektron mikroskopik görüntüsü (4200X). İkinci gruba benzer çekirdek yapısı ($\blackleftarrow\rightarrow$), krista kaybı (\triangle), endoplazmik retikulum yapısında hasar (\Rightarrow) artan lipit damlacıklarını (\star)



Şekil 4.35. D-GaIN/TNF- α /Sm-KLN uygulanan farelere ait hepatositin elektron mikroskopik görüntüsü (6000X). Korunmuş mitokondri kristalları (Δ), düzgün yapılı çekirdek membranı (\star), birikmiş glikojen granülleri (\Rightarrow)

4.3. Silmarin Katı Lipit Nanopartikülleri (KLN)'nin Karakterizasyonun Değerlendirilmesi

4.3.1. Partikül Boyutları ve Polidispers İndeksi

Parçacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, koloidal taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan en önemli verilerden birisidir. Özellikle süspansiyon ve emülsiyon gibi taşıyıcı sistemlerin fiziksel kararlılık ve etkinlik açısından başarılı formülasyonu, ürünün partikül büyüklüğüne bağlıdır [153]. Parçacık büyüklüğü geniş olan sistemlerde, küçük parçacıkların yüzeyinde bulunan enerji büyük parçacıklarda olandan daha fazladır. Böyle sistemlerde küçük parçacıklar kristallenerek daha büyük parçacıklar oluşturur. Sm-KLN ve KLN (Boş) formülasyonlarının 0. gün ölçümlerinde 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için sırasıyla 165 nm ve 200 nm partikül boyutu bulunmuştur. Öte yandan Sm'nin partikül boyutu aynı şartlar altında yaklaşık 5µm civarında bulunmuştur.

Ayrıca partikül büyüklüğü dağılımını değerlendirmek için polidisperslik indeks değerleride kullanılmıştır. Sıfıra yakın değerlerin homojen bir dağılım gösterdiği polidisperslik indeksi değerleri değerlendirildiğinde, formülasyonların yaklaşık olarak 0.400 gibi düşük değerler alarak homojen bir dağılıma sahip olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Silmarin, KLN (Boş) ve Sm-KLN formülasyonlarının partikül boyutu ve polidispers indeks değerleri

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm)		Polidispers İndeksi (PI)	
	Ortalama	S.S.	Ortalama	S.S.
	(n=3)		(n=3)	
Silmarin	5000	1.3024	0.562	0.01
KLN (Boş)	200	1.2087	0.451	0.03
Silmarin yüklü KLN	165	0.5247	0.401	0.02

4.3.2. Zeta Potansiyeli ve Elektriksel İletkenlik

Kolloidal parçacıklar dispersiyon ortamında iyon adsorbe ederler. Pozitif ve negatif olarak yüklenirler. Zeta potansiyel, parçacığın yüzeyi üzerindeki net etkili yükü gösterir [154]. KLN formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri partiküllerin saklanmaları hakkında ve oluşacak olan topaklanma gibi dezavantaj hakkında bilgi vermektedir [155]. Elektriksel iletkenlikleri +31 ile -60 mV aralığındaki formülasyonlar orta dereceli, -61 ile -80 mV aralığındaki formülasyonlar iyi ve -81 ile -100 mV aralığındaki formülasyonlar ise mükemmel olarak elektrostatik kararlılığa sahip sistemler olarak tanımlanmaktadır [155].

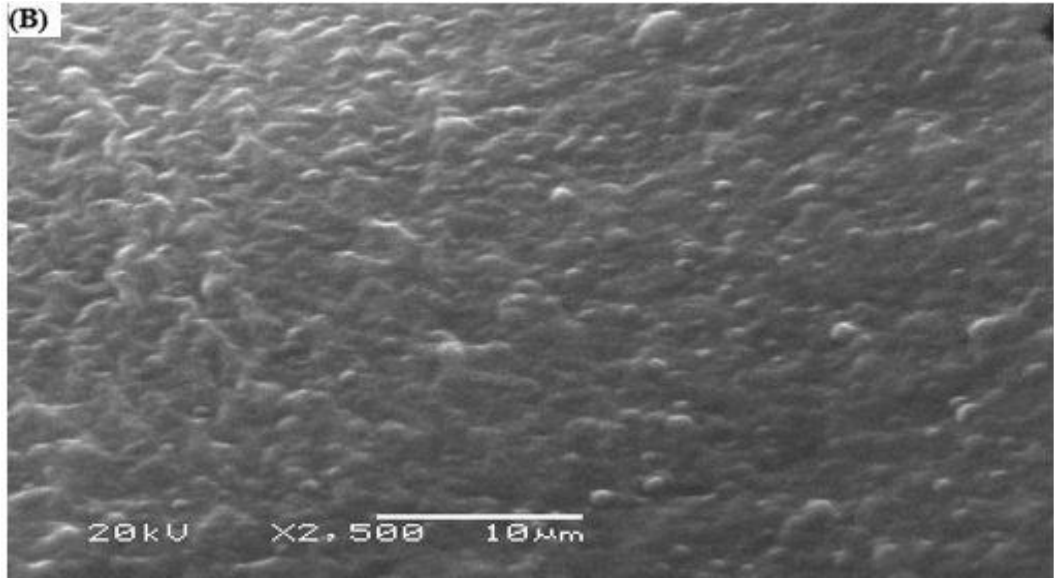
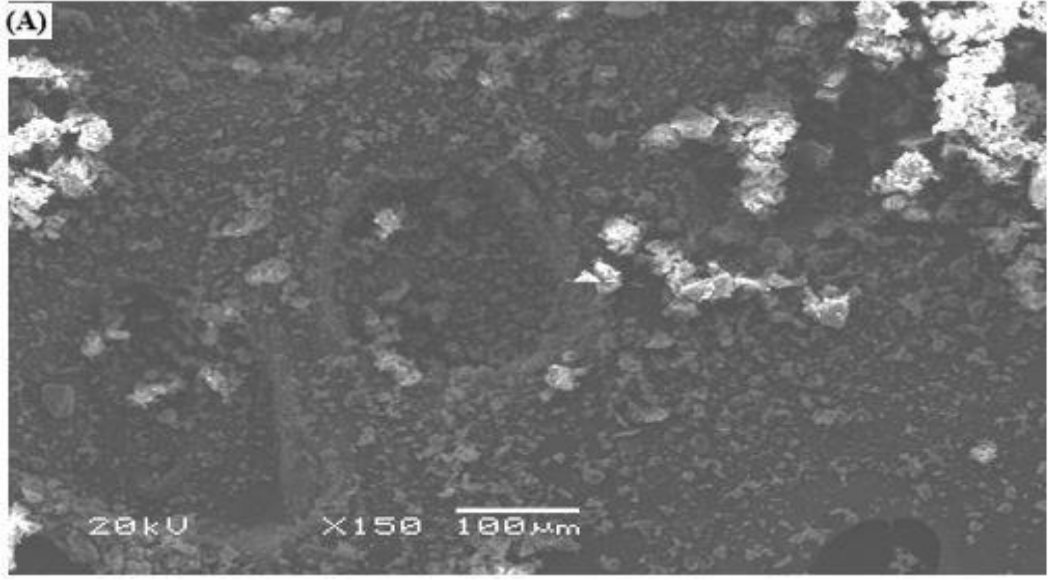
Sm içeren formülasyonların zeta potansiyel değerleri -26,5 mV olarak bulunmuştur. Ayrıca elektriksel iletkenlik değerleri de 0.04 olarak bulunmuştur. Buradan da elde edilen formülasyonların saklama sırasında bozulma ürünü oluşmayacağı veya yapıldıktan sonra her hangi bir bozulma ürünü oluşmadığı gözlemlendi.

Çizelge 4.3. KLN (Boş) ve Sm-KLN formülasyonlarının zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik değerleri

Formülasyonlar	Zeta Potansiyel (mV)		Elektriksel İletkenlik (mS.cm-1)	
	Ortalama (n=3)	S.H.	Ortalama (n=3)	S.S.
KLN (Boş)	-25	1.45	0.05	0.0007
Silmarin yüklü KLN	-26.5	1.71	0.04	0.0005

4.3.3. Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

KLN formülasyonlarının morfolojik incelenmesi için ışık mikroskopu kullanılmış fakat görüntü elde edilemediğinde elektron mikroskopu kullanılmıştır. Hazırlanan KLN formülasyonlarının morfolojik incelenmesi için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmış ve görüntüler Şekil 4.36 (A, B)'de verilmiştir. Elde edilen görüntülere bakıldığında Sm'nin partikül boyutunun mikron boyutunda olduğu ve kristal şekilde olduğu gözlemlenmiş, bunun yanında Sm yüklü KLN formülasyonlarının partikül boyutunun küçüldüğü ve nanometre boyutunda olduğu, şekillerinin ise küresel şekilde olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.36. Silmarin molekülünün partikül boyunun SEM de çekilmiş görüntüsü (A) ve silmarin yüklü katı lipit nanopartikül boyutunun SEM de çekilmiş görüntüsü (B)

5. TARTIŞMA

Karaciğer, birçok önemli metabolik fonksiyonları düzenlediği için hepatik hasar bu metabolik fonksiyonların bozulması ile ilişkilendirilir [1]. Metabolizma ve boşaltımda kilit bir organ olan karaciğer vücuttaki stratejik konumundan dolayı sürekli olarak çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır. Toksinlerin barsaktan emildikten sonra ilk olarak karaciğere ulaşması çeşitli karaciğer hastalıkları ile sonuçlanır [44]. TNF- α [1,2], D-GaIN [3,4], lipopolisakkarit [5,6], CCl₄ [7,8], asetoaminofen [9,10], alkol [11,12] ve kokain [15,16] gibi hepatotoksik maddeler deneysel karaciğer hasarına neden olur. Hepatotoksik maddelerin tek başlarına uygulanması karaciğer hasarına neden olabildiği gibi, diğer hepatotoksik maddelerle birlikte uygulanmaları da karaciğer hasarını artırmaktadır.

TNF- α , proliferasyon, inflamatuvar mediyatörlerin salınımı ve hücre ölümü gibi hücrel cevapları tetikleyen, 9 ligandan oluşan TNF reseptörleri ailesini aktifleştirerek fonksiyon gösteren bir sitokindir [21]. TNF- α 'nın hepatositler üzerine toksik etkilerinin in vivo olarak belirlenmesi için birçok hayvan modelleri geliştirilmiştir [156]. TNF- α 'nın karaciğerde zıt yönlü iki rolü vardır. Bir yandan hücre ölüm mediyatörü olarak görev yapan TNF- α , diğer yandan hepatosit proliferasyonu ve karaciğer yenilenmesini tetiklemektedir [22]. TNF- α , anti-apoptotik etkilerini, nükleer faktör kappa β (NF-k β) üzerinden hücre bölünmesini uyarma şeklinde gösterirken diğer taraftan inflamatuvar karaciğer hastalıklarının büyük bir bölümünde, toksik etkiler yapmaktadır. Bu toksik etkiler yapılan çalışmalarda artan transaminaz seviyeleri ile gösterilmiştir [24].

D-GaIN ise diğer doku ve organlara etkisi olmayan, karaciğere spesifik bir hepatotoksindir [157]. D-GaIN'in karaciğer spesifitesi karaciğer hücrelerinde galaktokinaz ve galaktoz-1-P-üridiltransferaz'ın yüksek seviyelerde üretiliyor olması ile ilişkilidir. GaIN metabolizması esnasında, karaciğer hücrelerindeki üridin havuzlarının tükenmesi transkripsiyon ve protein sentezinin durmasına neden olur. Karaciğer hücrelerinde transkripsiyonun durması hücreyi sitokinlere karşı aşırı duyarlı hale getirmektedir. Ayrıca GaIN, karaciğer hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu ve serbest radikal artışı ile mitokondride fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır [27]. İn vivo [158] ve in vitro [159] çalışmalarda D-GaIN'in

hepatositlerde oluşturduğu hasarın, biyokimyasal ve morfolojik özellikler yönünden benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada *in vitro* hepatosit kültürüne 4 mM D-GaIN eklenmesinden 24 saat sonra hepatositlerde, kontrole göre belirgin farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bu hepatositlerin nükleusları normal hepatositlere göre çok küçülmüştür. Elektron mikroskopik incelemelerde ise, granüllü endoplazmik keselerinin azaldığı ve keselerin üzerinde yalnızca birkaç ribozom bulunduğu saptanmıştır. Bu durum, D-GaIN uygulamasının hepatositlerde protein sentezinin azalmasına neden olduğunu göstermektedir [159]. *In vivo* çalışmalar [160] ise D-GaIN'in hepatic lobülün tümünde nekroza, periportal inflamasyona ve şişkin makrofajların oluşumu ile karakterize edilen yaygın karaciğer hasarına neden olduğunu göstermektedir.

TNF- α ve D-GaIN kombinasyonu hepatositlerin apoptoz ve nekrozunu uyarmak için sıklıkla kullanılmaktadır [156]. Farelerde D-GaIN/TNF- α 'ın farklı dozlarının enjeksiyonu, karaciğer hasarının patogenezi ve tedavisini incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan deneysel bir metottur [6]. Nagaki ve ark. [161]'nin yaptıkları çalışmada D-GaIN ve TNF- α 'nın birlikte verildiği hayvanların karaciğer kesitlerini mikroskopik olarak incelediklerinde yaygın hemoraji, sitoplazmik granüler yoğunlaşmalar ve hiperkromatik nükleus zarı ile karakterize edilen karaciğer ölümünü saptamışlardır. Diğer bir çalışmada D-GaIN/TNF- α enjeksiyonunun, karaciğer doku bütünlüğünü bozduğu, lökosit infiltrasyonu, hemoraji, nekrotik ve apoptotik hücrelerin olduğu belirlenmiştir [162].

D-GaIN ve TNF- α enjeksiyonu ile oluşan karaciğer hasarının uygulama süresine bağlı olarak ilerlediği gösterilmiştir. Enjeksiyondan 3 saat sonra, gerek ışık mikroskobu kesitlerinde ve gerekse geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile yapılan incelemelerde, hepatic nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmazken; enjeksiyondan 6 saat sonra dejeneratif değişiklikler, hemoraji ve nekroz saptanmış, ancak hücre infiltrasyonu gözlenmemiştir [163]. Buna karşılık Van ve ark. [157]'nin yaptıkları çalışmada D-GaIN ve TNF- α 'nın birlikte enjeksiyonu yapılan deney hayvanlarının karaciğerlerinde 8 saat sonra yaygın nekrotik ve apoptotik hücre ölümü nedeniyle, hayvanların öldükleri belirlenmiştir. 800 mg/kg D-GaIN ve 1 μ g/kg TNF- α enjeksiyonundan 9 saat sonra ise ileri

derecede apoptotik karaciğer hücrelerine ilaveten, hepatik nekroz alanları ve lökosit infiltrasyonu belirlenmiştir. Bu veriler hepatik hasar oluşumunda apoptozun erken evrede meydana geldiğini, nekrozun ise ilerleyen evrede geliştiğini göstermektedir [156]. Angermüller ve ark. [164] 700 mg/kg D-GaIN ve 10 µg/kg TNF-α enjeksiyonu ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde, enjeksiyondan 5 saat sonra TUNEL yöntemi ile belirlenen apoptotik hepatositlerin oranını %10 olarak saptamışlardır.

Gezginci ve Bolkent [9] çalışmalarında 700 mg/kg D-GaIN ve 15 µg/kg TNF-α enjeksiyonu ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde, enjeksiyondan 4 saat sonra, TUNEL ve kaspaz-3 immünohistokimya yöntemini kullanarak apoptotik hepatositlerin yoğunluğunun, kontrol grubuna göre çok fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu, bazı merkez venlerin zarlarında çatlak, apoptotik hepatositler, nekrotik alanlar, hiperemi, sinüzoidal dilatasyon, sinüs tıkanıklığı ve nekrotik alanlarda ve bazı merkez venlerin etrafındaki sinüsoidallarda kollojen liflerin birikimi görülmüştür. Dahası bazı santral venlerin çevresinde piknotik çekirdekler, kromatin marginasyonu ve hepatositlerde vakuolizasyon varlığıda saptanmıştır. Ayrıca doku MDA ve LDH düzeyleri ile serum ALT ve AST düzeylerinin belirgin olarak arttığı ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyinin belirgin olarak azaldığı belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda yukarıda belirtilen bulgulara benzer olarak, 700 mg/kg D-GaIN ve 15 µg/kg TNF-α uygulanmasından 4 saat sonra deney hayvanlarının karaciğer kesitlerinde hepatosit dejenerasyonu, atipik nükleuslar, venül içi kongesyon, kısmi inflamasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sinusoidal dilatasyon gibi karaciğer hasarını gösteren bozukluklar (Şekil 4.4) meydana gelmiş ve bu değişimler biyokimyasal parametrelerimiz (ALT, AST, LDH, GSH, ALP ve MDA) ile de desteklenmiştir (Çizelge 4.1.). Nitekim plazma lipid peroksidasyonu düzeyi (MDA) ve serum ALT, AST, LDH ve ALP düzeyleri aşırı bir şekilde artarken serum redükte GSH düzeyi büyük oranda azalmıştır. Ayrıca karaciğer dokusunda apoptoz varlığını yansıtan Bcl-2 ve Bax immünohistokimya boyamaları D-GaIN/TNF-α ve D-GaIN/TNF-α/KLN (Boş) verilen gruplarda Bcl-2 pozitif boyanmış hepatosit sayısında azalış görülürken, Bax pozitif boyanmış hepatosit

sayısında ise önemli artış gözlemlendi, bu sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.18 ve Şekil 4.24). Ayrıca PCNA negatif boyanmış hepatositler bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.30).

Yüksek dozlarda TNF- α , reseptörleri üzerinden kaspaz aktivasyonu ve sitokrom c salınımının uyarılmasıyla apoptotik hücre ölümüne ve devamında nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır [165]. Buna karşılık düşük dozlarda TNF- α , NF-k β aktivasyonunu sağlayarak hücre polirefasyonunu uyarmaktadır [25]. Okano ve ark. [166] farelere 3000 mg/kg D-GaIN uygulamalarından 48 saat sonra immünohistokimyasal olarak PCNA pozitif boyanmış hepatositlerin sayılarının arttığını göstermişlerdir. Tanuguchi ve ark. [167] CCl₄ verilemesinden 6 saat sonra NF-k β aktivitesinde artış gözlemlendiğini ve uygulamadan ancak 36-48 saat sonra PCNA pozitif boyanmış hepatositlerin sayısında belirgin bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar TNF- α 'nın karaciğerde akut hasar ve rejenerasyon süreçlerinin ikisini birden uyardığını göstermektedir. TNF- α uygulamasından sonra erken evrede karaciğer hasarı ve apoptoz görülürken ileri evrede PCNA pozitif boyanmış hepatositlerin artışı ile hücre çoğalması ve bunu takiben doku rejenerasyonunun meydana geldiği belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda sadece D-GaIN+TNF- α verilen deney grubunda enjeksiyondan 4 saat sonra Gezginçi ve Bolkent [9]'den farklı olarak PCNA negatif sonuç vermiştir. Bu durum D-GaIN+TNF- α nedeniyle apoptoz ve nekrozun bu süre zarfında oldukça şiddetli olduğunu göstermektedir.

Serbest radikallerin proapoptotik veya sitotoksik olayların oluşumunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Karaciğer hücreleri, tümör hücreleri ve kalp kası hücrelerinde, TNF- α aracılığıyla oluşan serbest radikallerin başlıca kaynağının mitokondriler olduğu bilinmektedir [168]. Reaktif oksijen türleri (ROT) mitokondriden sitokrom c salınımını uyararak, efektör kaspazların aktive edilmesi yoluyla apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır [169]. TNF- α uyarısıyla hücre içi ROT oluşumunun artışı konfokal mikroskop, akım sitometri ve serbest radikallere özgü faktörlerin kullanılmasıyla gösterilmiştir. Bu çalışmanın

devamında bir serbest radikal süpürücüsü kullanılarak hücredeki serbest radikallerin uzaklaştırılması sağlanmış ve TNF- α uygulanması sonucunda sitotoksosite oluşmadığı kaydedilmiştir [170].

TNF- α 'nın sitotoksik etkisinin moleküler temeli tam olarak anlaşılmış değildir. Ancak, TNF- α 'nın neden olduğu toksisite ile ilgili muhtemel mekanizmalardan birisi reaktif oksijen türlerini ürettiği olmasıdır. Catala ve ark. [171] ve Morales ve ark. [172] çalışmalarında sıçan hepatositlerinin yüksek dozda TNF- α ya maruz kaldıklarında hücrel GSH düzeylerinin azaldığı, LPO ve hidrojen peroksit düzeylerinin yüksek oranda arttığı göstermiştir. Bazı araştırmacılar farelere D-GaIN enjekte ettiklerinde de karaciğerde GSH düzeylerinin azaldığını ve LPO düzeyinin arttığını göstermişlerdir [173,174]. Bu durum lipit peroksidasyonu artışının GSH tükenmesiyle eş zamanlı olduğu anlamına gelmektedir [175].

Diğer taraftan Sakaguchi ve ark. [176] yaptıkları çalışmada farelere TNF- α ve D-GaIN birlikte verildiklerinde gelişen LPO artışı bu iki maddenin ayrı ayrı verilmesi ile gelişen LPO artışından daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Gezginci ve Bolkent 2007 çalışmalarında farelere TNF- α /D-GaIN birlikte enjekte ettiklerinde LPO düzeylerinin önemli oranda arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada D-GaIN/TNF- α verilen fare gruplarında karaciğer GSH düzeylerinin azaldığı ilk kez rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da D-GaIN/TNF- α ve D-GaIN/TNF- α /KLN (Boş) verilen deney gruplarında kontrole grubuna göre LPO artışı ve GSH azalması eş zamanlı olarak görülmüştür (Şekil 4.2).

Sm, *Silybum marianum* [L.] Gaertner [10] (deve diken) bitkisinin meyveleri ve tohumlarından elde edilen 2000 yılı aşkın bir zamandan beri hepatit ve sirozun tedavisinde kullanılan polifenolik bir bileşiktir. Sm, deneysel karaciğer hastalıklarında anti-oksidan (oksit giderici), anti-lipit peroksidatif, fibroz giderici, anti-inflamatuvar, hücre zarı koruyucu, bağışıklık sistemini koruyucu ve karaciğeri yenileyici gibi etkilere sahiptir [12].

Sm ile yapılmış olan deneysel çalışmalarda 16, 25, 100, 150 mg/kg gibi birçok farklı dozlar kullanılmıştır. Ancak en çok tercih edilen doz 100 mg/kg'dır. Bu çalışmamızda Sm'nin uygulama dozu olarak 100 mg/kg tercih edilmiştir. Deney

süresi ise Sm'nin akut etkisi inceleneceğinden 24 saat olarak belirlenmiştir. Yüksek anti-oksidan özelliğe sahip polifenolik bir flavonoid olan Sm, diğer flavonoidler gibi güçlü bir serbest radikal süpürücüsüdür. Detoksifikasyon sistemini uyarmasının yanı sıra D-GaIN/TNF- α nedenli toksisitenin engellenmesinde rolü olan redükte glutasyon seviyesini de artırır. Toksikiteyi önleyen diğer rolü ise sitokrom p450'yi inhibe etmesidir. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında pek çok maddenin neden olduğu karaciğer toksisitesinde görülen apoptotik hücre oluşumunun Sm ile engellendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [23,177,178,19]. Madani ve ark. [179] bu amaçla yaptıkları çalışmada 50 mg/kg Thioasetamid'in karaciğerde oluşturduğu apoptozisin 25 mg/kg Sm ile azaldığını belirtmişlerdir. Yine 2.25 mg/kg Fumonisin B1'in karaciğerde oluşturduğu apoptozisin 750 mg/kg Sm ile engelenildiği gösterilmiştir. Sm, TNF- α , interferon gama (IFN), interlökin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin üretilmesinin yanı sıra kaspaz ve NF- κ B aktivitesini de baskılayıcı bir etki yapmaktadır [180]. Patel ve ark. [181] iyi bilinen bir kardiyotoksin olan Doksorubisin'in 60 mg/kg dozunun karaciğerde toksisiteye neden olduğunu saptamışlardır. Bunu önlemek amacıyla kullandıkları 16 mg/kg Sm'nin Doksorubisin nedenli serbest radikal salınımını ve Bcl-xL gibi apoptotik sinyal proteinlerinin ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Sm'nin apoptoz üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, JB6 C141 kanser hücrelerinde Sm uygulanmasından sonra anti-apoptotic proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xl ekspresyonunda artış gözlenirken, proapoptotik protein olan Bax ekspresyonunda ise azalış olduğu rapor edilmiştir [182].

Sıçanlarda yapılan bir deneysel çalışmada N-nitrözdietilaminin nedenli karaciğer hasarı sonucu artan serum ALT, AST ve ALP düzeyleri 50 mg/kg Sm kullanıldığında önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada N-nitrözdietilamin verilen deney gruplarında GSH seviyelerinde önemli bir düşüş görülürken, Sm verilen gruplarda ise GSH seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir [183]. Yapılan başka bir çalışmada CCl₄ nedenli oluşan karaciğer hasarında karaciğer hasar markırları olan serum AST, ALP ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinde artış gözlenirken, 1000 ppm Sm verilen deney gruplarında bu markırların seviyelerinin önemli oranda azaldığı rapor edilmiştir.

Aynı çalışmada CCl_4 verilen deney gruplarında GSH seviyelerinde düşüş görülürken Sm verilen gruplarda ise GSH seviyelerindeki düşüşleri tersine çevirdiği belirtilmiştir [184]. Raja ve ark. [185] CCl_4 verilen deney gruplarında artan serum ALT, AST ve ALP düzeylerinin 25 mg/kg Sm kullanıldığında ciddi bir şekilde azaldığını vurgulamışlardır.

Tüm bu özellikler dışında Sm'nin kimyasal yapısından kaynaklanan bir takım etki sınırlayıcı durumları da bulunmaktadır. Bunlar dokuda uygunsuz dağılım, suda çok az çözünme ve barsak ortamında bozulma gibi biyofarmasötik sınırlılıklarıdır [16,17,18]. Yapılan çalışmalarda vücuda alınan Sm'nin sadece %27-43 oranında kan dolaşımına geçtiği belirtilmiştir [186,187]. Sm'nin bu etki sınırlayıcı özelliklerini ortadan kaldırmak üzere birçok girişim gerçekleştirilmiş olmasına rağmen farmakolojik bir başarı elde edilememiştir [18]. Bu konuda yapılan birçok çalışmada çözünürlüğü ve geçirgenliği artırmak amacıyla çeşitli yöntem ve tekniklerle Sm ile fosfotidilkolin [188], siklodekstrin klatrat [189] ve katı dispersiyon maddesi [190] gibi çeşitli maddelerin kompleksleri denenmiştir. Tüm bu girişimlere rağmen, günümüzde istenilen etkinlik sağlanamamıştır.

Bu sınırlayıcı etkileri minimuma indirmek üzere yapılan çalışmalar, çözüm yolunun KLN olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Sm-KLN uygulamasıyla yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu deneysel çalışmamızda, Balb/c farelerde D-GaIN/TNF- α ile oluşturulan karaciğer hasarında Sm ve nanoformlarının, DNA, apoptoz, nekroz ve ince yapı üzerindeki antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkilerini karşılaştırdık.

Çalışmamızda, D-GaIN/TNF- α birlikte Sm ve özellikle daha fazla olmak üzere Sm-KLN verilen gruplarda MDA seviyesi azalmış, GSH seviyesi artmış hatta kontrol seviyelerine yaklaşmıştır. Bu durum Sm'nin bir serbest radikal süpürücü ve karaciğeri koruyucu etkiye sahip olduğunu, TNF- α ve D-GaIN'in sitotoksik ve apoptotik etkilerini azalttığı düşüncesini doğrulamaktadır. Sm'nin karaciğeri koruyucu başlıca mekanizması anti-inflamatuvar, anti-oksidant ve anti-fibrotik aktivitesinden kaynaklanmaktadır [191].

Bizim çalışmamızda, yapılan çalışmalardaki bulgulara benzer olarak, D-GaIN/TNF- α ile birlikte Sm verilen grupta Sm uygulamasından 24 saat sonra deney

hayvanlarının karaciğer kesitlerinde sadece D-GaIN/TNF- α verilen gruba göre doku hasarı azalmış olmakla birlikte hepatositlerde karyolizis ve asimetrik nükleer yapılar saptanmıştır (Şekil 4.5. ve Şekil 4.4). D-GaIN/TNF- α ile birlikte KLN (Boş) verilen grupta KLN (Boş) uygulamasından 24 saat sonra deney hayvanlarının karaciğer kesitlerinde sadece D-GaIN/TNF- α verilen gruba benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.4). Diğer bir deyişle KLN (Boş)'nin deney hayvanları üzerine herhangi bir koruyucu etkisi saptanmamıştır. D-GaIN/TNF- α ile birlikte Sm-KLN verilen grupta Sm-KLN uygulamasından 24 saat sonra deney hayvanlarının karaciğer kesitlerinde sadece D-GaIN/TNF- α verilen gruba göre karaciğer histolojik incelemesi sonucunda kontrole benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.4). D-GaIN/TNF- α ile birlikte uygulanan Sm-KLN formunun meydana getirdiği iyileştirme D-GaIN/TNF- α ile birlikte Sm uygulanan gruptan daha etkili bulunmuştur.

Yapılan deneysel bir çalışmada asetaminofen nedenli karaciğer hasarında kullanılan Sm ve nano çöktürme yöntemiyle hazırlanan Sm nanopartikülün koruyucu etkileri karşılaştırıldığında Sm nanopartikülün daha etkili olduğu gösterilmiştir. Nitekim Sm nanopartikül verilen grupta karaciğer doku bütünlüğü daha iyi korunmuş, hepatik GSH değerleri daha çok yükselmiş ve serum transaminaz miktarları daha düşük bulunmuştur [192]. Diğer taraftan Yang ve ark. [193] yaptıkları bir çalışmada CCl₄ nedenli karaciğer hasarında serum transaminaz seviyesinin arttığı karaciğer histolojik kesitlerinde doku mimarisinin bozulduğu belirlenmiştir. CCl₄ ile yapılan aynı çalışmada koruyucu olarak kullanılan Sm tozu, ticari Sm ve Sm yüklü sıvı nanoemülsiyonun CCl₄ nedenli karaciğer hasarında karaciğeri koruyucu etkileri karşılaştırılmış ve Sm tozunun ve ticari Sm'nin yeteri kadar koruma sağlayamadıkları, Sm nanopartikülün ise karaciğer mimarisini önemli ölçüde koruduğu ve azalan transaminaz düzeyleri de gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda Sm, compritol 888, tween 80 5/3/3 oranlarında sıcak homojenizasyon yöntemi ile hazırladığımız Sm-KLN'nin D-GaIN/TNF- α nedenli karaciğer hasarında Sm verilen gruba göre çok daha fazla koruyucu etkiler yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca Sm-KLN grubunda serum transaminaz, LDH, ALP ve GSH seviyeleri normale yakın seviyede korunurken plazma MDA düzeyleri oldukça azalmış olarak saptandı (Çizelge 4.1). Sm-KLN nedenli bu iyileştirme karaciğer

doku kesitlerinde hepatosit dejenerasyonu, atipik nükleuslar, venül içi konjesyon, kısmi inflamasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal genişleme gibi patolojilerin önemli oranda giderilmesi ile doğrulanmıştır. Ayrıca Bcl-2 pozitif hepatosit sayısında artma ve Bax pozitif hepatosit sayısında ise azalma görüldü. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.18 ve Şekil 4.24), öte yandan PCNA pozitif hepatosit sayısının ise dokuda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) artması (Şekil 4.30) karaciğer hasarının azalması, karaciğerde rejenerasyonun başladığını göstermektedir.

Sm nanopartikülün çeşitli çalışmalarda Sm'ye göre daha etkili olmasının nedeni nanopartikülden Sm salınımının yavaş, düzenli ve sürekli olarak sağlanmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Böylece Sm'nin dokuda daha uzun süreli kalması dolayısıyla biyoelverişliliğinin artması ve terapötik etkinliğini daha başarılı gösterebilmesi sağlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Bourdi, M., Masubuchi, Y., Reilly, T.P., Amouzadeh, H.R., Martin, J.L., George, J.W., Shah, A.G., Pohl, L.R., *Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase, Hepatology*, 35 (2):289-98, 2002.
- [2] Pritchard, D.J., Butler, W.H., *Apoptosis-the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity, The Journal of Pathology*, 158(3):253-60, 1989.
- [3] Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y., Wake, K., *Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride, American Journal of Pathology*, 153(2):515-25, 1998.
- [4] Morio, L.A., Chiu, H., Sprowless, K.A., Zhou, P., Heck, D.E., Gordon, M.K., Laskin, D.L., *Distinct roles of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice, Toxicology and Applied Pharmacology*, 172:44-51, 2001.
- [5] Bradham, C.A., Plumpe, J., Manns, M.P., Brenner, D.A., Trautwein, C., *Mechanism of hepatic toxicity. TNF-induced liver injury, American Journal of Physiology*, 275 (3 Pt1):G387-92, 1998.
- [6] Decker, K. and Keppler, D., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 71, 77-106. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 76 (1979) 5943, 1974.
- [7] Van, M. W., Libert, C., *Bilirubin release induced by tumor necrosis factor in combination with galactosamine is toxic to mice, Cytokine*, 23(3):94-100, 2003.
- [8] Tapalaga, D., Tiegs, G., Angermuller, S., *NF-kappaB and caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNF-alpha, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(12):1599-609, 2002.
- [9] Gezginci, S. and Bolkent S., *The effect of Z-FA.FMK on D-galactosamine/ TNF-alpha-induced liver injury in mice cell, Biochemistry and function Cell Biochem Funct*, 25: 277-286, 2007.
- [10] Valenzuela, A., Garrido, A., *Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin, Biol Res* 27: 105-112, 1994.

- [11] Wagner H., Diesel P., Seitz M., *Chemistry and analysis of silymarin from Silybum marianum Gaertn*, *Arzneimittelforschung*. 24(4) 466–471. German, 1994.
- [12] Frascini, F., Demartini, G., Esposti, D., *Pharmacology of silymarin*. *Clin Drug Investig*, 22:51-65. 5, 2002.
- [13] Saller, R, Meier, R, Brignoli, R., *The use of silymarin in the treatment of liver diseases*, *Drugs* ;61:2035-20[84], 2001.
- [14] Hahn, G., Lehmann, HD., Kurten, N., Uebel H., Vogel, G., *On the pharmacology and toxicology of silymarin, an antihepatotoxic active principle from Silybum marianum (L.)Gaertn*, *Arzneimittelforschung*. 18(6):698–704.,German, 1968.
- [15] Madaus, RH., Halbach, G., Trost, W., inventor; Dr. Madaus and Co, Assignee., *Salt of the silymarin group with aminopolyhydroxy alcohols*, United States patent US 3994925, 1976.
- [16] Schulz, HU., Schurer M., Krumbiegel, G. Wachter, W., Weyhenmeyer R., Seidel, G., *The solubility and bioequivalence of silymarin preparations*, *Arzneimittelforschung*.45(1):61–64,German, 1975.
- [17] Woo, JS., Kim, TS., Park, JH., Chi, SC., *Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS*, *Arch Pharm Res*,30(1): 82–89, 2007.
- [18] Zhang HL., Bai TC., Yan GB., Hu YJ., *Solubility of silybin in aqueous poly(vinylpyrrolidone) solution*, *Fluid Phase Equilibr*.238(2): 186–192, 2005.
- [19] Wu, JW., Lin, LC., Tsai, TH., *Drug-drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics*, *J Ethnopharmacol* 121:185-193, 2009.
- [20] Wu, JW., Lin, LC., Hung, SC., et al., *Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application*, *J Pharm Biomed Anal* 45:[63] 5-641, 2007.
- [21] Seino, K.J., Iwabuchi, K., Kayagaki, N., et al., *Cutting edge: Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes*, *The Journal of Immunology*, 161:4463-4488,1998.
- [22] Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P., *Tumor necrosis factor signaling*, *Cell Death Differ* 10: 45–65, 2003.
- [23] .Hu, X., *Proteolytic signaling by TNF alpha: caspase activation and I kappa B Degradation*, *Cytokine*. 21:286-294, 2003.

- [24] Bradham, C.A., Plumbe, J., Manns, M.P. et al., *Mechanisms of hepatic toxicity. TNF-induced liver injury*, American Journal of Physiology, 275 (3 Pt 1):G387-92, 1998.
- [25] Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q. et al., *Cathepsin B knock out mice are resistant to tumor necrosis factor α mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications*, American Journal of Pathology, 159 (6), 2045-2054, 1998.
- [26] Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, CM., Grunwald, U., Huang, DC., Wu, Lee YH., Durkop, H., Engelmann, H., Scheurich, P., Wajant, H. and Strasser, A., *Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF*, EMBO J 18: 3034–3043, 1999.
- [27] Shinozuka, H., Farber, JL., Konishi, Y., Anukarahanota, T., *D-galactosamine and acute liver cell injury*, Fed Proc 32:1516-1526, 1973.
- [28] Farber, JL., Gill, G., Konishi, Y., *Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine*, Am J Pathol 72:5362, 1973.
- [29] Stachlewitz, R.F., Seabra, V., Bradford, B. et al., *Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells*, Hepatology, 29(3):737-45, 1999.
- [30] Osawa, Y., Nagaki, M., Banno, Y. et al., *Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor- α -induced hepatocyte apoptosis*, The Journal of Cellular Physiology, 187 (3):374-85, 2001.
- [31] Gujral, J.S., Farhood, A., Laeschke, H., *Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats*, Toxicology and Applied Pharmacology, 190(1):37-46, 2003.
- [32] Ming-Xiao, Y., *Signal transduction mediated by bcl-2, a pro-death bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways*, Cell Research, 10:161-167, 2000.
- [33] Wagner, H., Diesel, P., Seitz, M., *Chemistry and analysis of Silymarin from Silybum marianum Gaertn*, Arzneimittelforschung.24(4):466-471, 1974.

- [34] Hahn, G., Lehmann, H.D., Kurten, N., Uebel, H., Wogel, G., *On the pharmacology and toxicology of silymarin, an antihepatotoxic active principle from Silybum marianum (L.) Gaertn.*, *Arzneimittelforschung*. 18(6):698-704, 1968.
- [35] Lee, J.I., Nareyan, M., Barrett, J.S., *Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*, *J Chromotogr B Analyt Technol Biomed life Sci.*, 845(1):95-103, 2007.
- [36] Shibano, M., Lin, A.S., Itokawa, H., Lee, K.H., *Separation and characterization of active flavanolignans of Silybum marianum by liquid chromatography connected with hybrid ion-trap and time of flight mass spectrometry*, *J Nat Prod*, 70(9):1424-1428, 2007.
- [37] Kroll, D.J., Shaw, H.S., Oberlies, N.H., *Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies*, *Integr. Cancer Ther.* 6:110–119, 2007.
- [38] Kvasnicka, F., Biba, B., Sevcik, R., Voldrich, M., Kratka, J., *Analysis of the active components of silymarin*, *J Chromatogr A.*, 990(1Pt 2):239-245, 2003.
- [39] Lee, D.Y., Liu, Y., *Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, Isolated from Silybum marianum (milk thistle)*, *J. Nat. Prod.* 66, 1171–1174, 2003.
- [40] Szilagi, I., Tetenyi, P., Antus, S., Seligmann, O., Chari, V.M., Seitz, M., Wagner, H., *Structure of silandrin and silymonin, two new flavanolignans from a white blooming Silybum marianum variety*, *Planta Med.* 43, 121–127, 1981.
- [41] Ramasamy, K., Agarwal, R., *Multitargeted therapy of cancer by silymarin*, *Cancer Lett.*, 269(2):352-362, 2008.
- [42] Kaur, M., Agarwal, R., *Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: How close we are to bedside*, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 224(3):350-359, 2007.
- [43] Sonnenbichler, J., Mattersberger, J., Rosen, H., *Stimulation of RNA synthesis in rat liver and isolated hepatocytes by silybin, an antihepatotoxic agent from Silybum marianum L. Gaertn.*, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 357(8):1171-1180, 1976.
- [44] Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S., *Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage*, *Food and Chemical Toxicol.*, 48(3):803-806, 2010.

- [45] Saliou, C., Cillard, J., Okamoto, T., Packer, L., *Selective inhibition of NF-kappa-B activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2:evidence for different activating pathways*, *FEBS Lett.* 440(1 Pt 2):8-12, 1998.
- [46] Dehmlow, C., Erhard, J., de Groot, H., *Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silybinin*, *Hepatology.*23(4):749-754, 1996.
- [47] Gabetta, B., Bonbardelli, E., Piffeli, Y., *Complexes of Flavonolignanas with phospholipids, preparation thereof and associated pharmaceutical compositions*, United States Patent US 4764508, 1988.
- [48] Madaus, R.H., Halbach, G., Trost, W., *Salt of the silymarin group with aminopolihydroxy alcohols*, United States Patent US 3994925, 1976.
- [49] Schulz, H.U., Schurer, M., Krumbiegel, G., Wachter, W., Weyhenmeyer, R., Seidel, G., *The solubility and bioequivalence of silymarin preparation*, *Arzneimittelforschung*, 45(1):61-64, 1975.
- [50] Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R.P., Aggarwal, B.B., *Anticancer potential of silymarin, from bench to bedside*, *Anticancer Res.* 26, 4457–4498, 2006.
- [51] Singh, R.P., Agarwal, R., *Prostate cancer chemoprevention by silibinin, bench to bedside*, *Mol. Carcinogen.* 45-436–442, 2006.
- [52] Singh, R.P., Agarwal, R., *Cancer chemopreventive agent silibinin, targets mitogenic and survival signaling in prostate cancer*, *Mutat. Res.* 555 21–32, 2004.
- [53] Zi, X., Grasso, A.W., Kung, H.J., Agarwal, R., *A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells*, *Cancer Res.* 58 1920–1929, 1998.
- [54] Deep, G.R., Agarwal, R., *Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer*, *Integr. Cancer Ther.* 6 130–145, 2007.
- [55] Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., Van, N.T., Aggarwal, B.B., *Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis*, *J. Immunol.* 1[84] 6800–6809, 1999.

- [56] Hsu, Y.C., Chiu, Y.T., Cheng, C.C., Wu, C.F., Lin, Y.L., Huang, Y.T., *Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis*, J. Gastroenterol. Hepatol. 22 99–111, 2007.
- [57] Chang, J.W., Kim, C.S., Kim, S.B., Park, S.K., Park, J.S., Lee, S.K., *Proinflammatory cytokine-induced NF-kappaB activation in human mesangial cells is mediated through intracellular calcium but not ROS: effects of silymarin*, Nephron Exp. Nephrol. 103 156–165, 2006.
- [58] Kang, J.S., Jeon, Y.J., Park, S.K., Yang, K.H., Kim, H.M., *Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin*, Biochem. Pharmacol. 67 175–181, 2004.
- [59] Matsuda, T., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V. Kandeel, F., Mullen, Y., *Silymarin protects pancreatic beta-cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways*, Endocrinology 146 175–185, 2005.
- [60] Tyagi, A., Bhatia, N., Condon, M.S., Bosland, M.C., Agarwal, C., Agarwal, R., *Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells*, Prostate 53 211–217, 2002.
- [61] Scambia, G., De Vincenzo, R., Ranelletti, F.O., Panici, P.B. et al., *Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin*, Eur. J. Cancer 32:877–882, 1996.
- [62] Zi, X., Feyes, D.K., Agarwal, R., *Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins*, Clin. Cancer Res. 4 1055–1064, 1998.
- [63] Sharma, G., Singh, R.P., Chan, D.C., Agarwal, R., *Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells*, Anticancer Res. 23, 2649–2655, 2003.
- [64] Tyagi, A., Raina, K., Singh, R.P., Gu, M., Agarwal, C., Harrison, G., Glode, L.M., Agarwal, R., *Chemopreventive effects of silymarin and silibinin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice*, Mol. Cancer Ther. 6 3248–3255, 2007.

- [65] Tyagi, A., Agarwal, C., Harrison, G., Glode, L.M., Agarwal, R., *Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages*, *Carcinogenesis* 25 1711–1720, 2004.
- [66] Gu, M., Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Agarwal, C., Agarwal, R., *Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice*, *Cancer Res.* 67 3483–3491, 2007.
- [67] Lah, J.J., Cui, W., Hu, K.O., *Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines*, *World J. Gastroen- terol.* 13 5299–5305, 2007.
- [68] Li, L.H., Wu, L.J., Jiang, Y.Y., Tashiro, S., Onodera, S., Uchiumi, F., Ikejima, T., *Silymarin enhanced cytotoxic effect of anti-Fas agonistic antibody CH11 on A375-S2 cells*, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 9 593–602, 2007.
- [69] Li, L.H., Wu, L.J., Tashiro, S.I., Onodera, S., Uchiumi, F., Ikejima, T., *Activation of the SIRT1 pathway and modulation of the cell cycle were involved in silymarin's protection against UV-induced A375-S2 cell apoptosis*, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 9 245–252, 2007.
- [70] Flaig, T.W., Su, L.J., Harrison, G., Agarwal, R., Glode, L.M., *Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells*, *Int. J. Cancer* 120 2028–2033, 2007.
- [71] Zhong, X., Zhu, Y., Lu, Q., Zhang, J., Ge, Z., Zheng, S., *Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway*, *Toxi- cology* 227 211–216, 2006.
- [72] Tyagi, A., Singh, R.P., Agarwal, C., Agarwal, R., *Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-medi- ated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regula- tory loop between p53 and caspase 2*, *Carcinogenesis* 27 2269–2280, 2006.
- [73] Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H., Tanaka, T., *Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,20- dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats*, *Clin. Cancer Res.* 11 4962– 4967, 2005.
- [74] Jiang, C., Agarwal, R., Lu, J., *Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of*

vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 371–378, 2000.

- [75] Yang, S.H., Lin, J.K., Chen, W.S., Chiu, J.H., *Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer*, LoVo cell line, J. Surg. Res. 113, 133–138, 2003.
- [76] Kiruthiga, P.V., Shafreen, R.B., Pandian, S.K., Devi, K.P., *Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H₂O₂ exposure in erythrocytes*, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 100 414–419, 2007.
- [77] Svobodova, A., Zdarilova, A., Maliskova, J., Mikulkova, H., Walterova, D., Vostalova, J., *Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin*, J. Dermatol. Sci. 46 21–30, 2003.
- [78] Kidd, P., Head, K., *A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidyl- choline complex (Siliphos)*, Altern. Med. Rev. 10 193– 203, 2005.
- [79] Agarwal, R., Katiyar, S.K., Lundgren, D.W., Mukhtar, H., *Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice*, Carcinogenesis 15 1099–1103, 1994.
- [80] Singh, R.P., Tyagi, A., Sharma, G., Mohan, S., Agarwal, R., *Oral silibinin inhibits in vivo human bladder tumor xeno- graft growth involving down-regulation of survivin*, Clin. Cancer Res. 14 300–308, 2008.
- [81] Singh, R.P., Mallikarjuna, G.U., Sharma, G., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A.K., Chan, D.C., Agarwal, C., Agarwal, R., *Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance*, Clin. Cancer Res. 10 8641–8647, 2004.
- [82] Volate, S.R., Davenport, D.M., Muga, S.J., Wargovich, M.J., *Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin)*, Carcinogenesis 26 1450–1456, 2005.
- [83] Kvasnika, F., Biba, B., Sevcik, R., Voldrich, M., Krátká, J., *Analysis of the active components of silymarin*, J Chromatogr A. 2003;990:239–245, 2005.

- [84] Kaş, H.S., *İlaç taşıyıcı partiküler sistemler* in *Kontrollü Salım Sistemleri*, Gürsoy, Ankara, 2002.
- [85] Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56:1257-1272, 2004.
- [86] Demir, D., Öner, F., Kocagöz, T., *Optimizing bacterial transformation in the pDNA-cationic lipid-surfactant complex systems by adjusting CaCl₂ concentration and incubation temperature*, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27:7-11, 2002.
- [87] Venkateswarlu, V., Manjunath, K., *Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles*, *Journal of Controlled Release*, 95:627-638, 2004.
- [88] Lim, S-J., Kim, C-K., *Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid*, *International Journal of Pharmaceutics*, 243:135-146, 2002.
- [89] Müller, R.H., Mader, K. and Gohla, S., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50:161-177, 2000.
- [90] Freitas, C., Müller, R. H., *Spray drying of solid lipid nanoparticles*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46:145-151, 1998.
- [91] Wissing, S.A., Müller, R.H., *Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration*, *Journal of Controlled Release*, 81:225-233, 2002.
- [92] Lippacher, A., Müller, R.H. and Mäder, K., *Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles*, *International Journal of Pharmaceutics*, 214:9-12, 2001.
- [93] Müller, R.H., Keck, C.M., *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*, *Journal of Biotechnology*, 113:151-170, 2004.
- [94] Mehnert, W., Mäder, K., *Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47:165-196, 2001.
- [95] Demirel, M., Yazan, Y., *Katı lipid nanopartiküller (SLN)*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25:167-179, 2000.

- [96] Bummer, P.M., *Physical chemical considerations of lipit-based oral drug delivery-solid lipit nanoparticles*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 21:1-19, 2004.
- [97] Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M. E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., *Sterilization and freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipit nanoparticles*, International Journal of Pharmaceutics, 148:47-53, 1997.
- [98] Gökçe, E.H., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Güneri, T., Caramella, C., *Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity*, International Journal of Pharmaceutics, 364: 76–86, 2008.
- [99] Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., *Solid lipit nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50:161-177, 2000.
- [100] Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O., *Preparation of solid lipit nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique*, International Journal of Pharmaceutics, 257:153-160, 2003.
- [101] Hou, D-Z., Xie, C-S., Huang, K-J., Zhu, C-H., *The production and characteristics of solid lipit nanoparticles (SLNs)*, Biomaterials, 24:1781-1785, 2003.
- [102] Schwarz, C., Mehnert, W., *Freze drying of drug-free and drug-loaded solid lipit nanoparticles (SLN)*, International Journal of Pharmaceutics, 157:171-179, 1997.
- [103] Kerr, JFR., Wyllie, AH., Currie, AR., *Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics*, Br J Cancer, 26:239-57, 1972.
- [104] Krammer. PH., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., Debatin, MK., *Regulation of apoptosis in the immune system*, Curr Opin Immunol. 6:279-89, 1994.
- [105] Ekert, PG., Vaux, DL., *Apoptosis and the immune system*”, Br Med Bull; 53:591-603, 1997.
- [106] Gerschenson, LE., Rotello, RJ., *Apoptosis: a different type of cell death*, Faseb J; 6:2450-55, 1992.
- [107] Allen, PD., Bustin, SA., Newland, AC., *The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system*, Blood Reviews; 7:63-73, 1993.
- [108] Cohen, JJ., *Overview: Mechanisms of apoptosis*, Immunol Today; 14:126-30, 1993.
- [109] Wyllie, AH., *Apoptosis: an overview*, Br Med Bull; 53:451-65, 1997.

- [110] Lambert, B., Wiele, CV., *Treatment of hepatocellular carcinoma by means of radiopharmaceuticals*, Eur J Nucl Med Mol Imaging; 32:980–989, 2005.
- [111] Szyszko, T., AL-Nahhasa, A., Canelob, R., Habib, N., Jiaob, L., Wasanc, H., Pagoua, M., Taitd, P., *Assessment of response to treatment of unresectable liver tumours with 90Y microspheres: Value of FDG PET versus computed tomography*, Nucl Med Commun. ;28:15–20, 2007.
- [112] Park, BC., Huh, MH., Seo, JH., *Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma*, J Hepatol.; 22:286-94, 1995.
- [113] Wang, J., Chun, HJ., Wong, W., Spencer, DM., Lenardo, MJ., *Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signalling*, Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS); 98:13884-8, 2001.
- [114] Chao, DT., Korsmeyer, SJ., *BCL-2 family: regulators of cell death*, Annual Review of Immunology; 16:395-419, 1998.
- [115] Hetts, SW., (1998), “*To die or not to die*”. The Journal of The American Medical Association (JAMA) ;279:300-7.
- [116] Behnia, M., Robertson, KA., Martin, WJ., *Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease*, Official Publication of The American College of Chest Physi-cians (CHEST); 117:1771-7, 2000.
- [117] Büyükgebiz, O., Caferler, JS., *Apoptoz. Sendrom*, 13:102-7, 2001.
- [118] Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, VM., *Apoptosis signalling*, Annual Review of Biochemistry; 69:217-45, 2000.
- [119] Samojedny, MP., Kokocinska, D., Samojendy, A., Mazurek, U., Partyka, R., Lorenz, Z., et al., *Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of the colon cancer prognosis*, Biochimica et Biophysica Acta, 1741: 25–29, 2005.
- [120] Jansson, A., Sun, XF., *Bax expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer*, Journal of Clinical Oncology, 20: 811–816, 2000.
- [121] O'Reily, LA., Huang, DCS., Strasser, A., *The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry*, The EMBO Journal, 15(24): 6679–6690, 1996.

- [122] Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J.C., Perucho, M., *Mutational Inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution*, PNAS, 97(20):10872–10877, 2000.
- [123] Bukholm, I.K., Nesland, J.M., *Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2 Bax, cyclin D 1 and pRb in human colo carcinomas*, Virchows Arch, 436: 224-28, 2000.
- [124] Zhu, S.C., Li, R., Wang, Y.X., Feng, W., Li, J., Qiu, R., *Impact of simultaneous assay, the PCNA, cyclinD1, and DNA content with specimens before and after preoperative radiotherapy on prognosis of esophageal cancer-possible incorporation into clinical TNM staging system*, World J Gastroenterol, 11: 3823–3829, 2005.
- [125] Wang, T., Shankar, K., Bucci, T.J., Warbritton, A., Mehendale, H.M., *Diallyl sulfide inhibition of CYP2E1 does not rescue diabetic rats from thioacetamide-induced mortality*, Toxicol Appl Pharmacol 173: 27–37, 2001.
- [126] Javois, L.C., *Immunocytochemical Methods and Protocols*, Humana press, New Jersey, ISBN: 0-89603-570-0, 1999.
- [127] Taguchi, M., Takeuchi, T., Nakatsuka, R., Watanabe, T., Sato, K., *Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride*, Life Science, 75(13):1539-49, 2004.
- [128] Cerutti, P.A., *Prooxidant states and tumor promotion*, Science 227, 375–381, 1985.
- [129] Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J., *Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light*, New England Journal of Medicine 337, 1419–1428, 1997.
- [130] McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*, New England Journal of Medicine 312, 159–163, 1985.
- [131] Fruchart, J.C., Duriez, P., In: Rice-Evans, C.A., Burdon, R.H. (Eds.), *Free Radical Damage and its control*, Elsevier Science Publishers Ltd., Oxford, 1994.
- [132] Weber, G.F.T., *The pathophysiology of reactive oxygen intermediates in the central nervous system*, Medical Hypotheses 43, 223–230, 1994.
- [133] Abuja, P.M., Albertini, R., *Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins*, Clinica Chimica Acta 306: 1-17. 6, 2001.

- [134] Ayub, A., Mackness, MI., Arrol, S., *Serum paraoxonase after myocardial infarction*, *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol* 19: 330 – 335. 7, 1999.
- [135] Mackness, MI., Harty, D., Bhatnagar, D., *Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin dependent diabetes mellitus*, *Atherosclerosis* 86: 193– 199,1991.
- [136] Mitchel, JB., and Russol., *The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity*. *BJ Cancer*, 55:96-104, 1987.
- [137] Compoti, M., *Glutathione depleting agents and lipid peroxidation in the aging rat*, *Com Biochem Phys*, 88:177- 180, 1987.
- [138] Ziegler, DM., *Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation*, *Ann Rew Bio- chem*, 54:305-2229, 1985.
- [139] Arrick, BA., Nathan, CF., *Glutathion metabolism as a determinant of the therapeutic efficacy*, *Cancer Res*, 44:4224- 32, 1984.
- [140] Lott, J.A., Wolf, P.L., *Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST)*, *Clinical enzymology: a case-oriented approach*, Chicago, Year Book Medical Publishers,111-38 p, 1986.
- [141] Palanichamy, K., Ontko, A.C., *Synthesis, characterization, and aqueous chemistry of cytotoxic Au(III) polypyridyl complexes*, *Inorg Chim Acta*, 359, 1, 44- 52, 2006.
- [142] Giannini, E., Risso, D., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Motti, F., Romagnoli, P., Testa, E., Ceppa, P., Testa, R., *Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease*, *Arch Intern Med*, 163, 2, 218-24 p, 2003.
- [143] Shaarawy, S.M. Tohamy, A.A., Elgendy, S.M., Elmageed, Z.Y.A., Bahnasy, A., Mohamed, M.S., Kandil, E., Matrougui, K., *Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity*, *Int J Biol Sci*, 5, 6, 549-57 p, 2009.
- [144] Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Gokuladhas, K., Kamaraj, S., Divya, M.G., Devaki, T., *Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats*, *Mol Cell Biochem*, 360, 1-2, 51–60 p, 2012.

- [145] Ajith, T.A., Janardhanan, K.K., *Chemopreventive activity of a macrofungus Phellinus rimosus against N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rat*, J Exp Ther Oncol, 5, 4, 309-21 p, 2006.
- [146] Büyükbaş, S., İnal, A., *İlimli alkol alan erkeklerde laktat dehidrogenaz izoenzim değişiklikleri*, Van Tıp Derg: 13, 3, 85-9 s, 2006.
- [147] Kuntz, E., Kuntz, H.D., *Hepatology Principles and practice*, 2nd edition, springer Medizin verlag heidelberg, 906 p. 2006.
- [148] Chu, I., Bowers, W.J., Caldwell, D., Nakai, J., Pulido, O., Yagminas, A., Wade, M.G., Moir, D., Gill, S., Mueller, R., *Toxicological effects of gestational and lactational exposure to a mixture of persistent organochlorines in rats: systemic effects*, Toxicol Sci, 88, 2, 645-55 p, 2005.
- [149] Harris, H., *The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know*, Clin Chim Acta 186: 133-50, 1990.
- [150] Attila, G., Matyar, S., *Plazma enzimlerinin tanısal değerleri*. Mersin On Tıp Fak Derg 1: 73-82, 2002.
- [151] Dufour, DR., Nolte, FS., Gretch, DR., Koff, RS., Seeff, LB.. *Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests*, Clinical Chemistry 46: 2027-49, 2000.
- [152] Pratt, DS., Kaplan, MM., *Evaluation of Abnormal Liver Enzyme Tests in the Asymptomatic Patient*, NEJM 342: 1266-71, 2000.
- [153] Takka, S., Tursilli, R., Bianchi, A., Scalia, S., *Assay of common sunscreen agents in sun care products by high performance liquid chromatography on a cyanopropyl bonded silica column*. J. Pharm. Biomed. Anal 38: 250,-255, 2005.
- [154] Demirel, M., Yazan, Y., Müller, RH., Kılıç, F. and Bozan, B., *Formulation and In Vitro-In Vivo Evaluation of Piribedil Solid Lipid Micro- and Nanoparticles*, J. Microencaps., 18(3): 359-371, 2001.
- [155] Muller R. H., Mader K., Gohla S. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50, 161-177, 2000.
- [156] Zang, G.Q., Zhou, X.Q., Yu H, et al. *Effect of hepatocyte apoptosis induced by TNF-alpha on acute severe hepatitis in Mouse models*, World J Gastroenterol 6: 688-69, 2000.

- [157] Van, M. W., Libert, C., *Bilirubin release induced by tumor necrosis factor in combination with galactosamine is toxic to mice*, Cytokine, 23(3):94-100, 2000.
- [158] Anukarahanonta, T., Shinozuka, H., Farber, E., *Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galactosamine*, Research Communication Chemical Pathology and Pharmacology, 5(2):481-91, 1973.
- [159] Tran-Thi, T.A., Phillips, J., Falk, H., Decker, K., *Toxicity of D-galactosamine for rat hepatocytes in monolayer culture*, Experimental and Molecular Pathology, 42(1):89-116, 1985.
- [160] Jonker, A.M., Dijkhuis, F.W., Kroese, F.G., Hardonk, M.J., Grond, J., *Immunopathology of acute galactosamine hepatitis in rats*, Hepatology, 11(4):622-7, 1990.
- [161] Nagaki, M., Sugiyama, A., Osawa, Y., Naiki, T., Nakashima, S., Nozawa, Y., Moriwaki, H., *Lethal hepatic apoptosis mediated by tumor necrosis factor receptor, unlike Fas-mediated apoptosis, requires hepatocyte sensitization in mice*, The Journal of Hepatology, 31(6):997-1005, 1999.
- [162] Wielockx, B., Bussolino, F., Shapiro, S.D., Libert, C., *Involvement of a serine protease, but not of neutrophil elastase, in tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis and induction of platelet-activating factor*, Journal of Hepatology, 35(4):490-7, 2001.
- [163] Takenaka, K., Sakaida, L., Yasunaga, M., Okita, K., *Ultrastructural study of development of hepatic necrosis induced by TNF-alpha and D-galactosamine*, Digestive Disease and Sciences, 43(4):887-92, 1998.
- [164] Angermuller, S., Kunstle, G., Tiegs, G., *Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF alpha-treated galactosamine-sensitized mice*, J Histochem Cytochem 46: 1175-1183, 1998.
- [165] Naume, B., Shalaby, R., Lesslauer, W., Espevik, T., *Involvement of the 55-and 75 kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphokine-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells*, The Journal of Immunology, 146(9):3045-8, 1991.
- [166] Okano, J., Shiota, G., Kawasaki, H., *Protective action of hepatocyte growth factor for acute liver injury caused by D-galactosamine in transgenic mice*, Hepatology, 26(5):1241-9, 1997.

- [167] Taniguchi, M., Takeuchi, T., Nakatsuka, R., Watanabe, T., Sato, K., *Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride*, Life Sciences, 75(13):1539-49, 2004.
- [168] Corda, S., Lsplisce, C., Vicaut, E., Duranteau, J., *Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 24(6):762-8, 2001.
- [169] Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., *More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage*, Oncogene, 18(54):7719-30, 1999.
- [170] Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., Fiers, W., *Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediated and their involvement in cytotoxicity*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 92(18):8115-9, 1995.
- [171] Catala, M., Portoles, MT., *Action of E. coli endotoxin, IL-1beta and TNF-alpha on antioxidant status of cultured hepatocytes*. Mol Cell Biochem, 231: 75–82, 2002.
- [172] Morales, A., Garcia-Ruiz, C., Miranda, M., et al. *Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma glutamylcysteine synthetase*, J Biol Chem, 272: 30371–30379, 1997.
- [173] Lim, HK., Kim, HS., Choi, HS., et al. *Effects of acetylbergenin against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats*, Pharmacol Res, 42: 471–474, 2000.
- [174] Korda, MM.. *Protective effect of cresacin in D-galactosamine induced acute experimental hepatitis*, Ukr Biokhim Zh, 70:63–68, 1998.
- [175] Seckin, S., Kocak-Toker, N., Uysal, M., Oz, B., *The role of lipid peroxidation and calcium in galactosamine induced toxicity in the rat liver*, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 80: 117–120, 1993.
- [176] Sakaguchi, S., Furusawa, S., Yokota, K., Takayanagi, M., Takayanagi, Y., *Modification of tumor necrosis factor-induced acute toxicity D-galactosamine challenge by polymyxin B, an anti-endotoxin*. Int J Immunopharmacol, 22: 935–942, 2000.
- [177] Nitatori, T., Sato, N., Waguri, S., Karasawa, Y., Araki, H., Shinabai, K., Kominami, E., Uchiyama, Y., *Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the*

gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis, The Journal of Neuroscience, 15(2):1001-11, 1994.

- [178] Hashimoto, K., Minaga, W., Yanagi, Y., *Caspase-dependent apoptosis in fulminant hepatic failure induced by herpes simplex virus in mice*, The Journal of Hepatology, 39(5):773-8, 2003.
- [179] Madani, H., Talebolhosseini, M., Asgary, S. and Naderi, G.H., *Hepatoprotective activity of Silybum marianum and Cichorium intybus against Thioacetamide in Rat*, Pakistan Journal of Nutrition, 7, 1, 172-176 p,2008.
- [180] Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., Van, N.T., *Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase and apoptosis*, J. Immunol 163, 6800-6809, 1999.
- [181] Patel, N., Joseph, C., Corcoran, G.B., Ray, S.D., *Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver*, Toxicology and Applied Pharmacology, 245, 143–152 p, 2010.
- [182] Santosh, K. Katiyar., Anshu, M. Roy.,and Manjeshwar, S. Baliga., *Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation*, Mol Cancer Ther;4:207-216,2005.
- [183] Sabry, M. Shaarawy., Amany, A. Tohamy., Saad, M. Elgendy., Zakaria, Y. Abd. Elmageed., Abeer, Bahnasy., Maha, S. Mohamed., Emad, Kandil., Khalid, Matrougui., *Protective Effects of Garlic and Silymarin on NDEA-Induced Rats Hepatotoxicity*, International Journal of Biological Sciences, 5(6):549-557, 2009.
- [184] Ramakrishnan, G., Augustine, T.A., Jagan, S., Vinodhkumar, R., Devaki, T., *Effect of Silymarin on N Nitrosodiethylamine Induced Hepatocarcinogenesis In Rats*, Exp Oncol, 29, 1, 39-44, 2007.
- [185] Raja, S., Ahmed, K., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P., *Antioxidant effect of Cytisus scoparius against carbon tetrachloride treated liver injury in rats*, J. Ethnopharm. 109, 41–47, 2007.
- [186] Lorenz, D., Lucker, P., Mennicke, W., Wetzelsberger, N., *Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile*, Methods Find Exp Clin Pharmacol, 6:655–661, 1984.

- [187] Schulz, H., Schurer, M., Krumbiegel, G., Wachter, W., Weyhenmeyer, R., Seidel, G., *The solubility and bioequivalence of silymarin preparations*, *Arzneimittelforschung*, 45:61–64. German, 1995.
- [188] Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G., Pifferi, G., Perucca, E., *Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects*, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 15: 333–338, 1990.
- [189] Arcari, M., Brambilla, A., Brandt, A., et al. *A new inclusion complex of silibinin and beta-cyclodextrins: in vitro dissolution kinetics and in vivo absorption in comparison with traditional formulations*, *Boll Chim Farm.* 131:205–209. Italian 1992.
- [190] Chen, W., Xia, H., Wu, W., *Optimized preparation of silymarin dripping pills by a central composite design response surface method*, *Chin Trad Herbal Drugs*, 36:679–683, 2005
- [191] Luper, S. *A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1*. *Alternative Med Rev* 3:410–421, 1998.
- [192] Suvadra, Das., Partha, Roy., Runa, Ghosh. Auddy., Arup, Mukherjee., *Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity*, *International Journal of Nanomedicine*, 6 1291–1301, 2011.
- [193] Yang, Kwan Yeol., Hwang Du, Hyeong., Yousaf Abid, Mehmood., et al. *Silymarin-loaded solid nanoparticles provide excellent hepatic protection: physicochemical characterization and in vivo evaluation*, *International Journal of Nanomedicine*, 8 3333–3343, 2013.