

Silimarin İle Tedavi Edilen Tiyoasetamid İndüklü Kronik Hepatik Ensefalopatili
Sıçanlarda miRNA Profilinin Belirlenmesi

Özgün Teksoy

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2019

Determination of miRNA Profile in Rats with Thioacetamide Induced Chronic Hepatic
Encephalopathy

Özgün Teksoy

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

January 2019

Silimarin İle Tedavi Edilen Tiyoasetamid İndüklü Kronik Hepatik Ensefalopatili
Sıçanlarda miRNA Profilinin Belirlenmesi

Özgün Teksoy

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Adnan AYHANCI

Ocak 2019

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Özgün Teksoy'un DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Silimarin ile tedavi edilen tiyoasetamid indüklü kronik hepatik ensefalopatili sıçanlarda miRNA profilinin belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Adnan AYHANCI

İkinci Danışman: Prof. Dr. Yusuf BARAN

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Adnan AYHANCI

Üye: Prof.Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

Üye: Prof. Dr. H.Mehtap KUTLU

Üye: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Üye: Doç. Dr. Emel ERGENE

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Adnan AYHANCI danışmanlığında hazırlamış olduğum “Silimarin ile tedavi edilen tiyoasetamid indüklü kronik hepatik ensefalopatili sıçanlarda miRNA profilinin belirlenmesi” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Tez kapsamında yürütülen tüm deney hayvanı çalışmaları için ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)’nin 513-2/2016 protokol numaralı izni alınmış ‘Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi’ ve ‘Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi’nde yer alan tüm şartlara uyulmuştur. 14/01/2019

ÖZGÜN TEKSOY

İmza

ÖZET

Hepatik ensefalopati (HE), karaciğerdeki fonksiyon bozulması sonucu gelişen beyin hasarını tanımlayan bir terimdir. Deneysel karaciğer hasarı oluşturmada D-galaktozamin, karbontetraklorür ve tiyoasetamid (TAA) gibi birçok hepatotoksin kullanılmaktadır. Silimarin (Sm), deneysel karaciğer hasarlarında anti-oksidan, anti-lipid peroksidatif, anti-inflamatuar, hücre zararını koruma, bağışıklık sistemini güçlendirme ve karaciğer yenileme gibi özellikleri olan polifenolik bileşiktir. Bu deneysel çalışmada sıçanlara intraperitoneal TAA verilerek oluşturulan HE'de gelişen karaciğer ve beyin hasarına karşı oral uygulanan Sm'nin olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 28 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba [Kontrol (ilk 14 gün % 0.2 DMSO ikinci 14 gün % 0.9 SF), TAA (ilk 14 gün % 0.2 DMSO ikinci 14 gün 50 mg/kg TAA), 50+50 ve 100+50 mg/kg Sm+TAA verilen 3. ve 4. gruplar (ilk 14 gün Sm ikinci 14 gün TAA) uygulanmıştır] ayrıldı.

Deney sonunda anestezi altında kalpten alınan kanın bir kısmından kan sayımı (WBC, RBC, PLT, hemoglobin) yapıldı. Kalan kandan ise serum (GPx, TAS, TOS, ürik asit, BUN, ALT, AST, ALP, LDH) ve plazma (MDA) elde edildi. Akabinde karaciğer, beyin ve beyincik dokuları alınarak histolojik ve immünohistokimyasal (ihk) olarak incelendi. Sadece TAA verilen deney grubunda karaciğer ve beyin dokularındaki hasar hem histolojik hem de ihk (Bcl-2 aktivitesi azalırken Bax, kaspaz-3, Tunel ve TNF- α aktiviteleri arttı.) ve biyokimyasal olarak gözlemlendi. Ayrıca periferik kanda lökosit ve trombosit sayıları önemli oranda yükseldi. TAA nedenli hasar karaciğer doku homojenatından ölçülen miRNA-122, miRNA-192 ve miRNA-194 seviyelerinin azalmasıyla da doğrulanmıştır. İhk sonuçlarına göre TAA'nın beyinde hasar yapıp beyincikte yapmamasının kan beyin bariyerinin heterojen yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sm'nin özellikle yüksek dozunun TAA nedenli karaciğer ve beyin hasarlarını önlemede oldukça etkili olduğu hem histolojik hem de biyokimyasal ve ihk olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulunun izni ile yapılmıştır (No: 513-2/2016).

Anahtar Kelimeler: Tiyoasetamid, hepatik ensefalopati, Silimarin, Antioksidan, miRNA, Sıçan

SUMMARY

Hepatic encephalopathy (HE) is a term which describe brain damage caused by liver dysfunction. To create experimental liver damage has been used several hepatotoxin such as D-galaktozamin, carbontetrachloride ve thioacetamide (TAA). Silymarin (Sm) is polyphenolic compound being properties such as anti-oxidant, anti-lipid peroxidative, anti-inflammatory, cell membrane protection, immune system enhancing and liver renewal. In this study, the possible protective effects of Sm that was administered orally were investigated against brain and liver damage which were induced by TAA intraperitoneally. For this purpose, total 28 male Sprague Dawley rat were divided into 4 equal group [Control (the first 14 day % 0.2 DMSO, the second 14 day % 0.9 SF), TAA (the first 14 day % 0.2 DMSO, the second 14 day TAA), 3. and 4. groups given that 50+50 ve 100+50 mg/kg Sm+TAA (the first 14 day Sm, the second 14 day TAA) were administrated].

At the end of the experiment, blood count (WBC, RBC, PLT, hemoglobin) was some part of the blood taken from the heart taken under anesthesia. Serum (GPx, TAS, TOS, ürik asit, BUN, ALT, AST, ALP, LDH) and plasma (MDA) were obtained from remaining blood. Subsequently liver, brain and cerebellum tissues were removed and they were examined histologically and immunohistochemically. In only TAA treatment group was observed liver and brain damage biochemically, histologically and immunohistochemically (Bax, caspase-3, TUNEL, TNF- α activities increase whereas Bcl-2 activity reduced). In addition, the number of leukocytes and platelets increased significantly in peripheral blood. TAA-induced damage was also confirmed by decreased levels of miRNA-122, miRNA-192 and miRNA-194 measured from liver tissue homogenate. According to the immunohistochemical results, it has been thought that it does not damage to the cerebellum while TAA damage to the brain derive from heterogeneous structure of the blood-brain barrier. It has been observed that especially high doses of Sm are highly effective in preventing liver and brain damage caused by TAA, both histologically and immunohistochemically and biochemically. This study was conducted with the permission of the Local Animal Ethics Committee of Eskişehir Osmangazi University (No: 513-2/2016).

Keywords: Thioacetamide, hepatic encephalopathy, Silymarin, Antioxidant, miRNA, Rat

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin planlanmasında ve yürütülmesinde bana danışmanlık eden, beni yönlendiren; bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Adnan AYHANCI' ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez İzleme Sunumlarım sırasında teknik bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Kurulu Üyelerimiz Sayın Prof. Dr. H.Mehtap KUTLU ve Doç.Dr. Figen ÇALIŞKAN 'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım süresince bana fikirleri ve deneyimleriyle destek olan, vakit ayıran Sayın Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK'e saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmamın istatistiksel işlemlerinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üy. Ahmet MUSMUL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında samimi destekleriyle gösterdikleri sabır ve yardımdan dolayı Dr. Öğr. Behçet İnal ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Cengiz'e çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her türlü imkânı bana sağlayan, başarılarımın esas kaynağını oluşturan ve verdikleri emeklerin karşılığını ödeyemeyeceğim annem SERAP IRKÖRÜCÜ ve babam TAHSİN TEKSOY'a ve değerli arkadaşım AYŞENUR HALAÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGÜN TEKSOY/Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
3.GENEL BİLGİLER	7
3.1. Hepatik Ensefalopati	7
3.1.1. Hepatik ensefalopatinin patofizyolojisi	7
3.1.2. Amonyak teorisi	8
3.1.3. Astrosit şişmesi ve küçülmesi	11
3.1.4. İlgili moleküler mekanizmalar	11
3.1.4.1. <u>N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin ilişkisi</u>	12
3.1.4.2. <u>GABA (Gama-Aminobutirik Asit)/Benzodiazepin reseptör kompleksi teorisi</u>	13
3.1.4.3. <u>Dallanmış zincirli amino asitler (DZAA) ve yanlış nörotransmitter teorisi</u>	14
3.1.4.4. <u>Serotonin teorisi</u>	14
3.1.4.5. <u>Cinko teorisi</u>	14
3.1.4.6. <u>Manganez teorisi</u>	14
3.2. Kan Beyin Bariyeri (KBB)	15
3.3. MSS Gelişimi ve Sinaps Formasyonu	17
3.3.1. Sinaptik homeostaz	18
3.3.2. Üçlü sinaps nöronal sinyal.....	18
3.4. Kan Beyin Bariyeri ve Kan Akışının Kontrolü	18
3.5. Astrositlerin Nöronal Enerji Homeostazı ve Nöroprotektif Özellikleri.....	19
3.6. Nöronal Değişirme	19
3.8. Beyincik.....	23
3.8.1. Beyinciğin yapısı.....	24
3.8.2. Anatomi	24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.8.3. Fonksiyon	25
3.9. miRNA	26
3.10. Karaciğer	31
3.10.1. Karaciğerin fonksiyonları	34
3.10.1.1. <u>Metabolik fonksiyonlar</u>	34
3.10.1.2. <u>Sekretuar fonksiyonu</u>	34
3.10.1.3. <u>Detoksifikasyon fonksiyonu</u>	35
3.11. Karaciğerin diğer önemli fonksiyonları.....	36
3.11.1. Toksik hepatit.....	36
3.11.1.1. <u>Mitokondri</u>	37
3.11.1.2. <u>Lizozomlar</u>	38
3.11.1.3. <u>Endoplazmik retikulum</u>	38
3.11.1.4. <u>Lipid peroksidasyonu</u>	39
3.11.1.5. <u>Oksidatif stres</u>	39
3.11.1.6. <u>Sitokinler</u>	40
3.11.1.7. <u>İnterlökinler</u>	40
3.11.1.8. <u>Transforme büyüme faktörü beta</u>	40
3.11.1.9. <u>Tümör nekroz faktör alfa</u>	41
3.11.1.10. <u>Tümör nekroz faktör-iliskili apoptoz indükleyici ligand</u>	41
3.11.1.11. <u>C-jun N-terminal kinase (JNK)</u>	41
3.11.1.12. <u>FAS (APO-1 veya CD95)</u>	42
3.11.2. Hepatosit hasarını gösteren enzimlerin değerlendirilmesi:.....	43
3.11.2.1. <u>Alanin aminotransferaz (ALT)</u>	44
3.11.2.2. <u>Aspartat aminotransferaz (AST)</u>	44
3.11.2.3. <u>Gama glutamil transferaz (GGT)</u>	45
3.11.3. Karaciğer hasarının mekanizması	46
3.12. Silimarin	47
3.12.1. Silimarinin Antioksidan özellikleri	49
3.12.2. Silimarinin lipid peroksidasyonuna karşı aktivitesi	50
3.12.3. Silimarin tarafından karaciğer yenilenmesinin uyarılması	50

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.12.4. Silimarinin anti-inflamatuvar ve anti-kanserojenik özellikleri	50
3.12.5. Silimarin antifibrotik etkileri	51
3.12.6. Vücudun antioksidan sistemleri	51
3.12.7. Silimarinin antioksidan özellikleri	53
3.12.7.1. <u>Direkt serbest radikal süpürme</u>	54
3.12.8. Çeşitli kimyasalların toksisitesinin önlenmesinde silimarinin antioksidan etkileri	55
3.12.8.1. <u>Tiyoasetamid</u>	55
3.12.8.2. <u>Diğer Toksikantlar</u>	56
3.12.9. Oksidatif stres ve transkripsiyon faktörleri	57
3.12.10. Sm'nin pro-oksidan özellikleri	58
3.12.11. In vivo çalışmalar	59
3.12.12. Bağırsakta Sm'nin koruyucu etkisi	60
4.MATERYAL VE YÖNTEM.....	64
4.1. Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları	64
4.2. Deney Hayvanları	64
4.3. Deney Grupları.....	65
4.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar	65
4.5. Histolojik Çalışmalar.....	65
4.6. Malodialdehit (MDA) Testi	66
4.7. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Testi.....	66
4.8. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Testi	67
4.9. Toplam Oksidan Seviye (TOS) Testi	67
4.10. Ürik Asit Testi.....	68
4.11. Kan Üre Azotu (BUN) Testi	68
4.12. Kaspaz-3 İmmünohistokimya	69
4.13. Bcl-2 İmmünohistokimya	70
4.14. Bax İmmünohistokimya	72
4.15. TNF- α İmmünohistokimya	73
4.16. TUNEL İmmünohistokimya	75
4.17. MikroRNA İfade Seviyesini Ölçmek için Dokulardan RNA İzolasyonu.....	76

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.17.1. RNA miktarının hesaplanması	77
4.17.2. q-RT PCR analizi için cDNA sentezi	77
4.17.3. qRT-PCR ile miRNA profilinin analizi	78
4.17.4. Mikro-RNA (miRNA) hedef genlerinin biyoinformatiksel ve fonksiyonel analizleri	79
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	80
5.1. Biyokimya Sonuçları	80
5.2. miRNA Analizleri	90
5.3. Histolojik Analizler	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	112
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	114
EK AÇIKLAMALAR.....	137
Ek Açıklama A	137
ÖZGEÇMİŞ.....	140

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Hepatik Ensefalopati ve beyin ödemi altındaki varsayılan mekanizmalar	9
3.2. Hiperamonyemi sonucu oluşan değişiklikler	10
3.3. Hiperamonyeminin nedenli hepatik ensefalopatiden sorumlu ana faktörler.....	13
3.4. Fizyolojik koşullar altında mikrovasküler endotelial hücreler tarafından kan ve beyin arasında moleküllerin hareketinin düzenlenmesi	16
3.5. Sağlıklı ve patolojik koşullarda mikroglia ablasyonunun etkileri ve dinamikleri.....	21
3.6. Beyin prefrontal bölgesi	23
3.7. MikroRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu.....	28
3.8. Karaciğerin segmentleri.....	32
3.9. Sıçan karaciğerinin anatomisi	33
3.10. Hepatotoksisitenin mekanizmaları	43
3.11. <i>Silybum marianum</i>	48
3.12. Silimarinin bileşenleri	49
5.1. Sıçan kan plazmasından ölçülen AST ve ALT değerleri.....	81
5.2. Sıçan kan plazmasından ölçülen ALP değerleri.....	82
5.3. Sıçan kan plazmasından ölçülen LDH değerleri	82
5.4. Sıçan kan plazmasından ölçülen lökosit (WBC) değerleri	84
5.5. Sıçan kan plazmasından ölçülen eritrosit (RBC) değerleri.....	84
5.6. Sıçan kan plazmasından ölçülen platelet değerleri.....	85
5.7. Sıçan kan plazmasından ölçülen ürik asit değerleri	86
5.8. Sıçan kan plazmasından ölçülen GPx değerleri.....	86
5.9. Sıçan kan plazmasından ölçülen MDA değerleri.....	87
5.10. Sıçan kan plazmasından ölçülen TOS ve TAS değerleri	89
5.11. Sıçan kan plazmasından ölçülen BUN değerleri.....	89
5.12. Sıçan hepatositlerinden elde edilen miR-194, miR-192 ve miR-122 sonuçları.....	90
5.13. Deney guruplarına ait sıçanların karaciğer kesitleri	92
5.14. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde TUNEL immünoreaktivitesi.....	94
5.15. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde kaspaz-3 immünoreaktivitesi.....	95
5.16. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde Bax immünoreaktivitesi.....	96
5.17. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde Bcl-2 immünoreaktivitesi.....	97
5.18. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde TNF- α immünoreaktivitesi.....	99
5.19. Deney hayvanlarının DLDPK kesitleri.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.20. Deney hayvanlarının DLPFK kesitlerinde nöronlarda Bcl-2 immünoaktivitesi.	101
5.21. Deney hayvanlarının DLPFK kesitlerinde nöronlarda Bax immünoaktivitesi.....	102
5.22. Deney hayvanlarının DLPFK kesitlerinde nöronlarda kaspaz-3 immünoaktivitesi.	103
5.23. Deney hayvanlarının DLPFK kesitlerinde nöronlarda TUNEL immünoaktivitesi.	104
5.24. Deney hayvanlarının DLPFK kesitlerinde nöronlarda TNF- α immünoaktivitesi.	105
5.25. Deney hayvanlarının beyincik kesitleri.	106
5.26. Deney hayvanlarının beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında Bcl-2 immünoaktivitesi.	107
5.27. Deney Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında Bax immünoaktivitesi.	108
5.28. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında kaspaz-3 immünoaktivitesi.	109
5.29. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında TUNEL immünoaktivitesi.	110
5.30. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında TNF- α immünoaktivitesi.	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Karaciğer biyobelirteçleri olarak dolaşımdaki miRNA'ların nitelikleri	29
3.2. Farklı karaciğer hastalıklarında dolaşımdaki miRNA'larda seçilmiş raporlar	30
3.3. Toksik hepatite neden olabilen ajanlar	37
3.4. Toksik hepatit mekanizması	47
4.1. Çalışmada kullanılacak miRNA'ların olgun yapıları	78
5.1. Deneş gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde ALT, AST, ALP ve LDH değerleri.....	80
5.2. Deneş gruplarına ait hayvanların kan örneklerinde WBC, RBC ve PLT değerleri	80
5.3. Deneş gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen GSH-Px, MDA, BUN, Ürik Asit, TAS ve TOS değerleri	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

mL	Mililitre (10^{-3} litre)
mg	Miligram (10^{-3} gram)
kg	Kilogram
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
n	Denek sayısı (Adet)
rpm	Devir/dakika
dk	Dakika
g	Gram
$^{\circ}\text{C}$	Celsius degree (santigrat derece)
g/mol	Molekül ağırlığı
CCL_4	Karbon tetraklorür
ONOO^-	Peroksinitrit

Kısaltmalar

Açıklama

AAA	Aromatik Amino Asit
AH	Alzheimer Hastalığı
ALF	Acute Liver Failure (Akut Karaciğer Yetmezliği)
ALP	Alkalin Fosfataz
ALT	Alanin Transaminaz
AO	Antioksidan
AST	Aspartat Transaminaz
ATP	Adenozintrifosfat
BAM	Birleşik Adezyon Molekülleri
BUN	Blood Urea Nitrogen (Kan Üre Azotu)
CLF	Chronic Liver Failure (Kronik Karaciğer Yetmezliği)
DG	Dentat Girus
DLPFK	Dorsolateral Prefrontal Korteks

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DMSO	Dimetisülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DZAA	Dallanmış Zincirli Amino Asit
EAAT-2	Eksitator Aminoasit Taşıyıcı-2
EH	Endotelial Hücre
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ESM	Ekstraselüler Matris
fMRI	Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
GDNF	Gliyal hücre hattı türevli nörotropik faktör
GRK	GABA Reseptör Kompleks
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GZ-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
İF	İmmünflorasan
İHK	İmmünohistokimya
iNOS	İndüklenebilir NO Sentaz
Hb	Hemoglobin
HCl	Hidroklorik Asit
HE	Hepatik Ensefalopati
H-E	Hematoksin-Eosin
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MAPK	Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MDA	Malondialdehid
miRNA	MikroRNA
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	Nükleer Faktör-Kappa B
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
OB	Olfaktör Bulbus
PKC	Protein kinaz C

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

PLT

RBC

RNS

ROS

SB

Sm

TAA

TGF- β TNF- α

WBC

Açıklama

Platelet

Red Blood Cell (Eritrosit)

Reaktif Nitrojen Türleri

Reaktif Oksijen Türleri

Sıkı Bağlantı

Silimarin

Tiyoasetamid

Transforme Edici Büyüme Faktörü- β Tümör Nekroz Faktörü- α

Beyaz Kan Hücresi (Lökosit)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatik ensefalopati (HE), normal karaciğer fonksiyonlarına sahip bireylerde etkin bir biçimde detoksifiye edilen ancak karaciğer yetmezliği olan hastaların detoksifikasyon mekanizmasının bozulmasına bağlı olarak amonyak gibi toksik maddelerin beyin dokusunda birikmesi ve buna bağlı olarak beyin fizyolojisinin ve anatomisinin bozulması ile ortaya çıkan ciddi bir nöropsikiyatrik sendromdur (Butterworth, 2015). HE'li hastalarda hasarın derecesine bağlı olarak motor hareket bozukluğu, kognitif ve duygusal bozukluklar görülmektedir. HE patogenezinde hipoglisemi, hipotansiyon, sepsis, ateş ve hipokseminin de rol aldığı bilirse de hayatını kaybeden hastaların %80'inde ve komadakilerin ise neredeyse tamamında hiperamonyemiye bağlı olarak geliştiği düşünülen ve kafa içi basınçta artışa (astrozit şişmesinden kaynaklı) neden olan serebral ödemin rol oynadığı düşünülmektedir (Monfort vd., 2002). HE'de oluşan nörolojik değişikliklerin patogenezinde ana roller oynayabilen gama-aminobütirik asit (GABA) ve glutamat içeren nöronları ve nörotransmitter sistemlerini etkilemektedir. Glutamat, merkezi sinir sistemindeki pek çok beyin ve nörolojik fonksiyonda rol oynayan ana uyarıcı nörotransmitterdir (Felipe, 2013; Llansola vd., 2013). N-metil D-aspartat (NMDA)'nın (glutamat reseptörü) bloke edilmesinin, sıçanlarda HE tarafından indüklenen değişiklikleri iyileştirdiği ve ölümlerini geciktirdiği gösterilmiştir (Cauli vd., 2014). NMDA reseptörleri uyarıcı sinaptik aktarımda anahtar rol oynar ve ayrıca HE'nin patolojik değişikliklerinin tedavisi için potansiyel hedefler olduğu düşünülmektedir (Felipe, 2013). İnsanlarda astrositler ve farklı HE modelleri, diğer değişikliklerin yanı sıra Alzheimer tip II astrositlerin görünümünü ve perivasküler astrositik ayak işlemlerinin şişmesini göz önüne alarak aşırı formda sitoplazmik genişleme, dejeneratif mitokondriyal değişiklikler ve genişletilmiş çekirdekler sunar (Pilbearn vd., 1984).

Mürinlerde deneysel olarak HE modeli oluşturmak için ise D-galaktozamin, karbontetraklorür ve tiyoasetamid (TAA) gibi birçok hepatotoksin kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan TAA'nın akut uygulamasının hepatite, kronik uygulamasının ise siroza neden olduğu gösterilmiştir (Wallace vd., 2015).

TAA, C_2H_5NS formülüne sahip bir organosülfür bileşimidir. 1983 yılında kanserojenlerle ilgili üçüncü yıllık raporda TAA'nın sınıf 2B (muhtemel karsinojen) olduğu tanımlanmıştır (Low vd. 2004). TAA metabolizmasının ara ürünü TAASO nükleollerin genişlemesinden, nükleer hacmin artmasından, Ca'nın hücre içi konsantrasyonunun artmasından, hücre geçirgenliğindeki değişiklikten ve mitokondriyal aktiviteyi inhibe etmekten sorumludur (Gupta ve Dixit, 2009). Diğer ara metabolit TAASO2 nitrik oksit sentazı (iNOS) ve NF-kB'yi (nükleer faktör-kB) salgılamaktan, santrilobüler nekrozu yönlendirmekten ve protein denatürasyonundan sorumludur (Rahman ve Hodgson, 2003).

TAA ile karaciğer hasarında iltihaplanma makrofajlar, lenfositler, nadir görülen plazma hücreleri ve nadir eozinofiller veya nötrofillerden oluşur ve portal izleriyle sınırlıdır (Pogribny vd., 2008). Nekroz ayrıca kronik karaciğer hasarında çok belirgin bir özelliktir. Su, yağ ve protein birikiminin bir sonucu olarak şişme meydana gelir. Kronik karaciğer hasarı hemen her zaman sinüzoidal yıldız hücrelerinin ve portal kanal fibroblastlarının belirgin aktivasyonuna eşlik eder ve bu da fibrozise yol açar (Zimmermann vd., 2011).

Silymarin (Sm), *Silybum Marianum* bitkisinden elde edilen bir flavinoiddir. Anti-hepatotoksik özelliği nedeniyle yıllardır klinik kullanımı mevcuttur ve içindeki majör biyoaktif komponent silibininidir. Antiproliferatif, pro-apoptotik antianjiyojenik, antioksidan antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkileri mevcuttur. Silymarin'in hepatit, siroz, prostat kanseri, kolorektal kanserler ve küçük hücreli akciğer kanserindeki etkinliği birçok çalışmada gösterilmiştir. Sm farklı ajanlara karşı kemoprotentif etkinliği de gösterilmiş bir ajandır. Sm'nin kemoprotentif etkisi antioksidan özelliğinin getirisi olarak serbest radikalleri düzenlemesi ile oluşmaktadır (Valenzuela ve Garrido, 1994). Lipid peroksidasyonu ve TNF aracılığı ile oluşan serbest oksijen radikallerini suprese ederek etki gösterir. Hücre içi glutatyon peroksidaz aktivitesine etki ederek hücre içi glutatyon miktarını arttırdığı bilinmektedir (Manna vd., 1999). Sm'nin, asetaminofen, karbon tetraklorür, radyasyon, aşırı demir yükü, fenilhidrazin, alkol ve soğuk iskemiden kaynaklanan karaciğer hasarını azalttığı bulundu (Abenavoli vd., 2010). Silimarin, plazma zarının bütünlüğünü koruyarak karaciğer hasarını önler, böylece enzimlerin sızmasını önler (Pradeep vd., 2007) Sm'nin, sitokin üretiminin inhibe edilmesinden kaynaklanan anti-

inflatuar özelliklere sahiptir. Sm, karaciğer rejenerasyonunu ve yeni hepatosit oluşumunu arttırır. Bununla birlikte, silimarinin, rejeneratif hücrelerde DNA replikasyonu ve mitozuna yardımcı olabileceği hala bilinmemektedir (Kiruthiga vd., 2007).

Bu alışmada TAA nedenli karaciğer hasarında beyin, beyincik ve karaciğerde silimarinin n koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Karaciğer hastalığının davranışsal değişikliklerle ilişkili olduğu gözlemi Hipokrat'a dayanmaktadır. Ancak sirozun deliryum ve koma ile ilişkisinin ilk kesin açıklaması 18. yüzyılda Morgagni tarafından yapılmıştır (Morgagni, 1761). Bununla birlikte, duruma ilişkin temel patofizyolojik içgörü, köpeklerde portal-sistemik şantın yaratılmasıyla beyin fonksiyon bozukluğunu indükleyen Hann ve arkadaşları (Hahn vd., 1883) tarafından yapılmıştır. Ayrıca azot metabolizması ile bir bağlantı olduğunu kanıtlayabilmişlerdir. Oral olarak uygulanan amonyak tuzunun sirozlu hastalarda komaya veya sersemliğe neden olduğu van Coumert ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Van Caulert vd., 1932) İlginç şekilde aynı deneklere uygulanan aynı miktarda amonyak tuzunun beyindeki toksik etkisinin doğrudan olmadığı ve beyindeki bazı metabolik süreçlerin de beyin hasarı sürecine aracılık ettiği gösterilmiştir (Nayrac, 1961).

Karaciğer yetmezliğinde, beyin fonksiyonu değişmektedir. Akut-kronik karaciğer yetmezliği başlangıçta anormal davranış ve kötüleşmiş biliş olarak ortaya çıkmakta ve bu hastalıkta akut ve şiddetli karaciğer yetmezliğindeki hastalarda beynin şişmesine neden olabilmekte ve hastalar beyin fonksiyonlarını tamamen kaybedebilmektedir (Wijdicks, 2016).

Hepatik ensefalopati (HE), karaciğer yetmezliği sonucu değişen nöropsikiyatrik sendromdur. Başlangıcı kademeli veya ani olabilmektedir. Beyin fonksiyonunun küçük belirtilerinden derin komaya kadar değişen çok çeşitli nöropsikiyatrik semptomları içeren zihinsel durumdaki değişikliklerle karakterizedir (Ferenci vd., 1998). İleri sirozlu hastalarda yoğun bakım ünitesine başvuru için en yaygın endikasyonlardan biridir. Yalnızca ABD'de HE'nin primer tanısı için hastaneye yatırılan 40.000'den fazla hasta bulunmaktadır ve bu da yaklaşık 932 milyon dolar toplam harcamaya neden olmaktadır. Diğer ülkelerdeki veriler eksik olmasına rağmen hasta ve toplum için finansal olarak büyük bir yüke neden olduğu bilinmektedir (Poordad, 2007).

HE'yi derecelendirmede en sık West Haven kriterleri kullanılmaktadır. Skorları I - IV arasında değişmektedir (IV-koma). Bununla birlikte, minimal hepatik ensefalopati (MHE) veya evre I-HE olan hastaları teşhis etmek güçtür. HE tedavisindeki ilk adım hipovolemi, gastrointestinal kanama, enfeksiyon, aşırı diüretik kullanımı, ishal, kusma, hiponatremi, hipokalemi veya hiperkalemi, kabızlık ve benzodiazepin kullanımı ile tedavisidir (Riordan, 1997).

Şiddetli karaciğer yetmezliği olan hastalar arasında, akut hepatik ensefalopatiden beyin ödeme ile ilişkilidir. Organ nakli yapılan hastalarda ölüm oranı oldukça düşüktür. Sağkalım oranı, nakil sonrası ilk 5 yılda %70'ten fazladır (Bernal, vd., 2013) Ancak şiddetli hepatik yetmezliği olan beş hastadan sadece biri transplant almaktadır (Reuben vd., 2016).

Toksik hepatit nedenleri genel olarak üç başlık altında incelenmektedir. Bunlar; ilaçlar (asetaminofen, methotrexate vb.), doğal toksik ajanlar (CCL₄, TAA, vb.) ve kimyasal maddelerdir (PAH vb.). Klasik tedavi amaçlı ilaçlar, vitaminler, alkol, kokain, ekstazi, mantar, endüstriyel kimyasal ilaçların yanı sıra özellikle son yıllarda şifalı bitkilerin bazılarının da karaciğerde toksik olaylara neden olabileceği belirtilmiştir (Broulac-Sage ve Balabaud, 2004; Narci ve Teoh, 2006).

Tiyoasetamid (TAA), sitomegaliye neden olarak karaciğere zarar veren ve kanserojen aktiviteye sahip organosülfür, beyaz kristalli bir bileşiktir (Ichimura vd., 2010). TAA, sıçanlarda akut bir karaciğer hasarını indüklemek için kullanılmaktadır. TAA, sıçanlara verildikten hemen sonra tiyoasetamid-S-okside ve asetamide metabolize edilir. Tiyoasetamid-S-oksid, hücre geçirgenliği ve Ca⁺⁺ alımındaki değişiklikten sorumlu olan bir hücredeki makromoleküllere bağlanmaktadır. Kalsiyum depolarının bu şekilde kesilmesi nükleer hacmi artırır, nükleoliyi büyütür ve sonunda hepatik nekroza yol açan mitokondriyal aktiviteyi inhibe etmektedir (Bruck vd., 2004; Hajovsky vd., 2012).

Sathyasaikumar vd.'nin (2007) yapmış oldukları çalışmada, 24 saat arayla intraperitoneal (i.p) olarak 300mg/kg TAA verilen sıçanların karaciğer enzimlerinde (ALT ve AST) ve amonyak miktarında kontrol gurubuna göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (Sathyasaikumar vd., 2007).

Singh ve Trigun (2010), tarafından yapılan başka bir çalışmada, 10 gün boyunca i.p olarak 100mg/kg TAA verilen sıçanların beyinciklerinde NADPH dehidrogenaz aktivitesinde önemli bir artış olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Singh vd., 2010).

Karaciğer, çoğu biyokimyasal süreçte yer alan ana homeostatik organ ayrıca zararlı ilaçları ve kimyasalları detoksifiye eder. Sarılık ve karaciğer iltihabı vakalarının artmasıyla birlikte, doğal kaynaklardan hepatoprotektif ilaçların geliştirilmesi gerekli hale gelmiştir (Naji vd., 2017). Bitkisel ürünlerden elde edilen ilaçların kullanımı bilimsel araştırmalarda eski bir uygulamadır. Çok çeşitli hastalıklarda kullanıldığında, önemli faydaları olan birçok molekül bulunmaktadır. Bu moleküller arasında, yüzyıllar boyunca, Sm'nin çok önemli bir rolü olmuştur (Pradhan ve Girish, 2006). Silybum marianum'un potansiyel olarak sağlıklı etkileri olan bir bitki olarak ekilmesi, Eski Mısır çağına dayanmaktadır (Schadewaldt, 1969).

Song vd., Sm (200 mg/kg), toplam üç doz, her 12 saatte bir 5 g/kg vücut ağırlığındaki etanolün gavajı nedeniyle oluşan oksidatif stresi azaltabildiğini ve ayrıca ALT artışını, glutatyonun (GSH) azalmasını, lipid peroksidasyonu ve TNF-a artmasını önlediğini göstermiştir (Song vd., 2006).

Sm'nin karaciğer üzerindeki koruyucu etkisi ile ilgili başka bir çalışmada, Wu vd. (2015) yapılan çalışmada, Sm (25mg/kg) ile 7 hafta boyunca beslenen sıçanların karaciğerlerinin 2/3'ü 7. haftanın sonunda alınmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre hücre döngüsündeki G1, S, G2, ve M fazları proteinlerinin ifadelerinin karaciğerleri alınan sıçanlarda kontrol grubuna göre daha arttığını gösterilmiştir (Wu vd., 2015).

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Hepatik Ensefalopati

Hepatik ensefalopati (HE), karaciğer fonksiyon bozukluğundan kaynaklı olarak serebral fonksiyondaki değişimleri tanımlamada kullanılan terimdir. Karaciğer hastalığının farklı tipleri (akut karaciğer yetmezliği (ALF) ya da kronik karaciğer yetmezliği (CLF)) farklı serebral ve nörolojik değişimlere yol açmakta ve böylece HE'nin her bir formu farklı mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir (Stepanova vd., 2012).

Yaygın serebral fonksiyon bozukluğuyla seyreden bu sendromun geri dönüşümlü olması, metabolik bir mekanizmanın rol oynadığını düşündürmektedir. Fakat HE için tek bir metabolik bozukluğun sorumlu olduğunu söylemek mümkün değildir. Temel mekanizma, hepatosellüler yetmezlik ve/veya şantlar nedeniyle barsak kaynaklı bazı maddelerin hepatik klirensinin yetersizliği ve beraberinde aminoasit metabolizmasındaki bozukluk sonucunda serebral nörotransmisyonunda ortaya çıkan değişikliklerdir (Bacon, 2008). Çeşitli nöroaktif toksinlerin (özellikle amonyak) ve nörotransmitter sistemlerin bu süreçte rol oynadığı ve karşılıklı etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir. HE'de oksijen (O₂) ve glukozun serebral metabolik oranlarının azalmasının da, nöronal aktivitedeki azalmaya bağlı olduğu düşünülmüştür (Mümtaz vd., 2010).

3.1.1. Hepatik ensefalopatinin patofizyolojisi

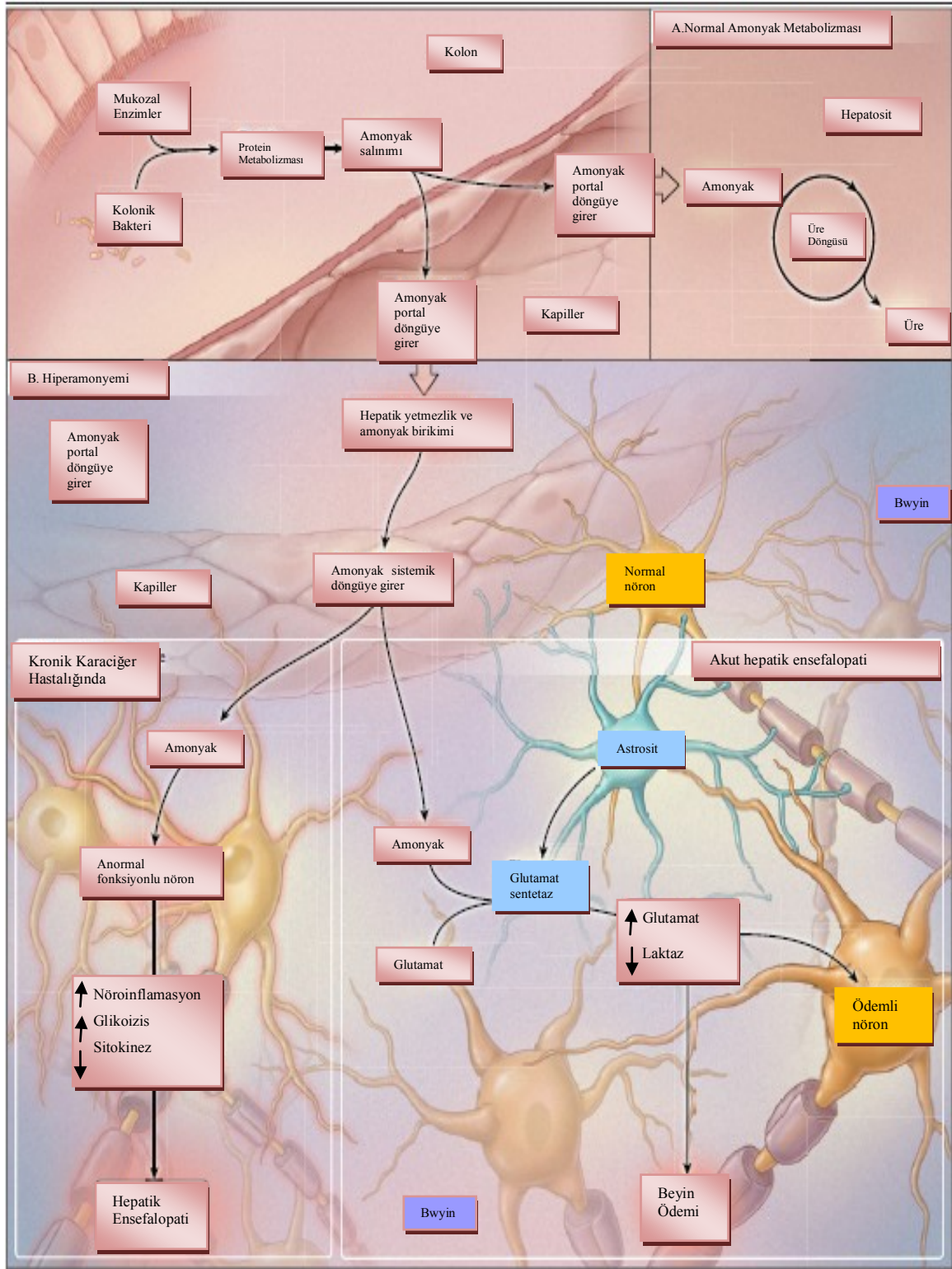
Birçok bilimsel araştırmaya rağmen, HE'ye neden olan patofizyolojik mekanizmalar tam olarak anlaşılammamaktadır. HE'nin patogenezinde en yaygın kabul gören teori, bağırsakta üretilen azotlu maddelerin (başta amonyak) serebral fonksiyonu olumsuz etkilemesidir. Kortikal kütleinin %30'unu oluşturan astrositler, amonyak metabolize edebilen tek serebral hücrelerdir ve HE'deki değişikliklerin çoğunluğunun hücresel temeli olarak düşünülmektedir. Astrositler, HE'de morfolojik olarak değişmekte ve akut karaciğer yetmezliğinde şişmektedir. Bununla birlikte, artmış amonyak konsantrasyonunun HE patogenezindeki önemine şüphe yoktur (Haussinger vd., 2010).

HE'nin altında yatan iki ana faktör inflamasyon ve hiperamonyemidir. Beyinde amonyak detoksifikasyonunun mekanizması, astrositlerde bulunan glutamin sentetaz tarafından glutamatın glutamine dönüşümüdür. Amonyak detoksifikasyonu yüzünden astrositlerde glutamin birikimi sitotoksik ödeme neden olmaktadır (Oria vd., 2010; Cauli vd., 2013).

3.1.2. Amonyak teorisi

Uzun yıllardır amonyağın HE patogenezinde rol oynayan ana nörotoksin olduğu düşünülmektedir. Amonyak, genellikle bağırsak bakterilerinden ve ince bağırsakta glutaminin metabolizmasından bazen de böbrek ve kas dahil olmak üzere çeşitli dokulardan üretilmektedir. Hiperammonemi nedenli HE oluşumunun mekanizması belirsizliğini korumakla birlikte hücre içi amonyak düzeylerinin yükselmesinin, esasen gama amino bütirik asit (GABA)'i agonize ettiği düşünülmektedir (Watanabe vd., 1984).

Amonyak hem aminoasit metabolizması yoluyla hem de bağırsak bakterilerinden üretilmektedir. Yetişkin insanlarda günde yaklaşık 1000 mmol (17 g) amonyak üretilmekte (Cotran vd., 2005) bunun bir kısmı da biyosentez sırasında tekrar kullanılabilir. Geri kalan kısmı ise atıktır ve nörotoksiktir. Amonyagın portal kandaki normal konsantrasyonu 300 ila 600 μ M arasında değişmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bulunan amonyak kandan neredeyse tüm organlara nüfuz etmektedir. Beyin, amonyak gibi toksik maddelerden kısmen kan-beyin bariyeri tarafından korunmasına rağmen aşırı miktarlarda amonyak beyine geçebilmektedir.

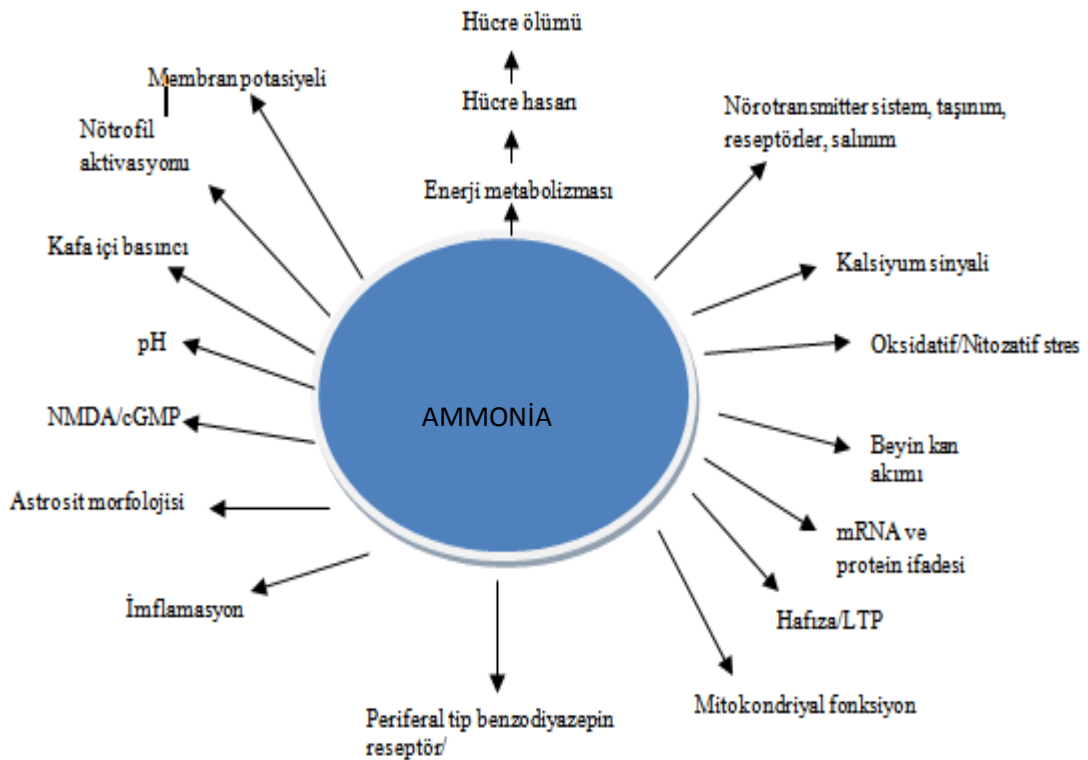


Şekil 3.1. Hepatik Ensefalopati ve beyin ödemi altındaki varsayılan mekanizmalar (Wijdicks, 2016).

Beyin, amonyağın zararlı etkilerine yetişkinliğe kıyasla gelişme döneminde çok daha hassastır. Kandaki amonyak konsantrasyonu yenidoğanlarda erişkinlerden daha

yüksektir (Abdel-Misih ve Bloomston, 2010). Hiperamonyemi, süresine ve derecesine bağlı olarak, beyinde zihinsel yavaşlamaya yol açarak (D'Angelica, 2004) hiperkalemi, kortikal atrofi, ventriküler genişleme ve demiyelinizasyona neden olan, kognitif bozukluk, nöbetler ve serebral felçten sorumlu gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde geri döndürülemez hasar oluşturabilmektedir (Moore, 1992). Vücutta artan amonyak miktarının N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptör (Glutamat reseptörü) fonksiyonlarında uzun süreli bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (Emre, 2002).

Amonyak glutamaterjik sistemin yanı sıra diğer nörotransmitter sistemlerini de etkilemektedir. Beyinde histamin, serotonin, dopamin ve noradrenalin sentezi hiperamonyemiye bağlı olarak değişmektedir (Junqueira vd., 1993). Amonyak, farklı moleküllerin kan-beyin bariyeri geçişini değiştirmektedir. Amonyak ayrıca GABA alımını inhibe eder ve salınmasını arttırmaktadır (Bayramiçli, 2005).



Şekil 3.2. Hiperamonyemi sonucu oluşan değişiklikler (Bosoi ve Rose, 2009)

3.1.3. Astrosit şişmesi ve küçülmesi

Amonyanın astrosit şişmesini tetiklediği bilinmektedir (Brzoska vd., 2003). Astrosit şişmesinin akut karaciğer yetmezliği ile ilişkili sitotoksik beyin ödemi (Junquera vd., 1998) ve intrakranyal basıncın artması sonucu HE'li hastalarda ölüm nedeni olarak önemli bir bileşen olduğu düşünülmektedir (Brzoska vd., 2003; Stryer, 2005; Sendensky ve Dufour, 2011).

Serebral glutamin içeriğinin hepatik ensefalopati derecesi ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (Broulac-Sage ve Balabaud, 2004). Glutaminin mitokondrial permeabilityyi artırdığı gösterilmiştir (Narci ve Teoh, 2006). Amonyanın kendisi, mitokondriyadaki glutamat alımını arttırmasına rağmen mitokondriyal şişmeye neden olmamaktadır (Kogure vd., 1999). Astrosit şişmesi veya beyin ödemi ancak amonyak toksisitesinin son safhalarında görülmektedir (Hussaini ve Farrington, 2007).

3.1.4. İlgili moleküler mekanizmalar

Günümüzde amonyak toksisitesi ile ilişkili olduğu düşünülen birçok faktör ve yol izlenmektedir (Gomez-Lechon vd., 2010). Bu yollar şunlardır:

1. Oksidatif ve nitrosatif stres (Arıcı, 2008),
2. Glutamat-glutamin döngüsündeki olumsuz değişiklikler (Abboud ve Kaplowitz, 2007),
3. Mitokondriyal geçirgenlik geçişindeki değişiklikler (Deepa vd., 2014),
4. Sinir iletimine etki, mitojenle aktive protein kinazların (MAPK) aktivasyonu ve
5. Transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B (NF-κB) üzerindeki etkileri (Fitzhugh ve Nelson, 1948).

Yukarıdaki efektörlere ilave olarak amonyak toksisitesi reaktif oksijen/azot türleri (ROS/RNS) üretmekte (Cervinkova ve Drahota, 1998; Lotkova vd., 2007), çeşitli proteinleri ve kopyalama faktörlerini fosforile etmekte ve mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır.

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumu protein tirozin nitasyonu (Cascales vd., 1979), lipit peroksidasyonu (Bajt vd., 2006), proteinlerde sistein kalıntılarının S-nitrosilasyonunu ve nükleik asit oksidasyonunu indüklemektedir (Ramachandran vd., 2011). Glutasyon, beyinin önde gelen antioksidanıdır ve ROS ve RNS'lerin zararlı etkilerine karşı koyabilmektedir.

Aşırı miktarda amonyak, Na^+/K^+ -ATPaz'ın aktivasyonu nedeniyle ATP tükenmesine ve bu da Protein Kinaz C (PKC)'nin aktivasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Nicotera vd., 1990). Amonyak ayrıca nöronal trikarboksilik asit döngüsünün aktivitesini ve astrositlerdeki glutamin sentezini arttırarak enerji metabolizmasını da etkilemektedir (Ramadori ve Armbrust, 2001). Buna göre, aşırı amonyağın trikarboksilik asit döngüsünü inhibe ederek beyin enerji metabolizmasına müdahale ettiği ve bu inhibisyonun beyin hücrelerinde ATP tükenmesine neden olabileceği belirtilmektedir (Neuman vd., 2001).

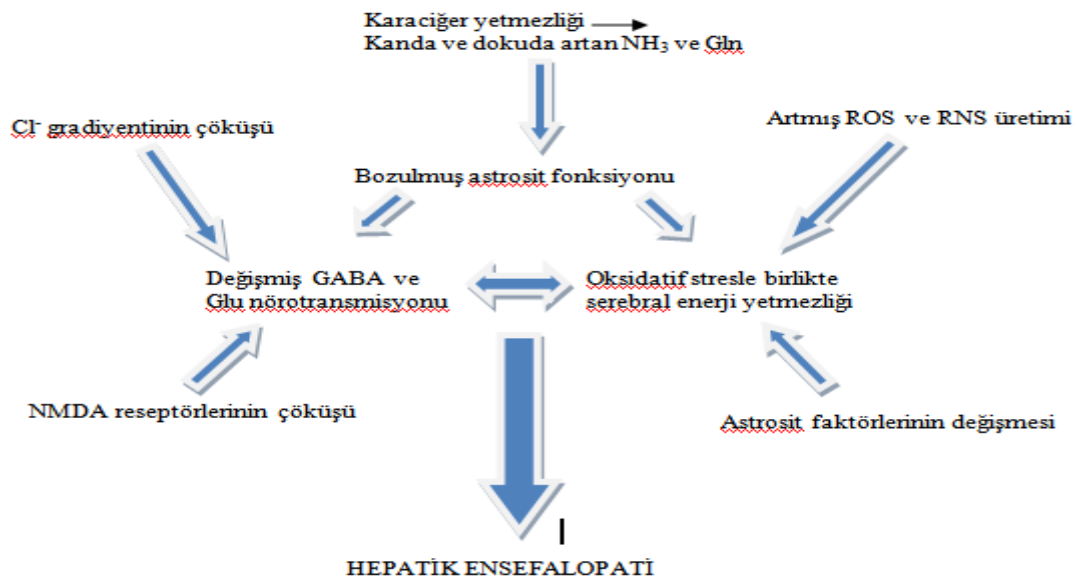
Astrositlerin başlıca rollerinden biri aşırı amonyak üretildiğinde, glutamatı glutamin sentetaz yoluyla glutamine dönüştürmek ve nöronları eksitotoksisteye karşı korumaktır (Neuman vd., 1998; Schwabe ve Brenner, 2006). Bu enzimin ekspresyonundaki değişiklikler astroglial fonksiyonlarda meydana gelen değişiklikleri yansıtmakta ve nöronal fonksiyonları etkilemektedir (Kurose vd., 1997). HE'de, glutamat taşıyıcı maddenin eksitatör aminoasit taşıyıcı-2 (EAAT-2) ekspresyonu azalmakta bu da, astrositler ve nöronlar arasındaki glutamat/glutamin döngüsünü engellemektedir. Sonuç olarak eksitatör nörotransmitter glutamatın hücre dışı seviyesi artmakta, NMDA reseptör aracılı sinyalleme aktif olmakta, RNS ve ROS üretimi aktifleşmekte ve tirozin artıkları da nitratlanmaktadır. Bu olay dizisi, hepatik ensefalopati patogeneğinde bir köşe taşı olarak düşünülmektedir (Schneider vd., 1997).

3.1.4.1. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin ilişkisi

İyonotropik NMDA reseptörleri merkezi sinir sistemi (MSS)'de birçok role sahiptir ve hiperamonyeminin neden olduğu belirtilerin çoğu NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile doğru orantılıdır (Volkman vd., 2007). Bu nedenle, amonyağın akut

nörotoksik etkileri esasen NMDA reseptörlerinin aşırı aktifleşmesinden kaynaklanmaktadır (Czaja, 2003).

Sıçan beyinde amonyak kaynaklı hasar NMDA reseptörü antagonistleri olan NO sentaz inhibitörü ve taurin tarafından anlamlı şekilde azaltılmaktadır (Wang vd., 2006). Amonyak, astrositlerde indüklenebilir NO sentaz (iNOS)'un ifadesini uyarıp aşırı NO oluşumuna yol açabilmekte bu da komşu nöronlarda peroksinitrit (ONOO^-) oluşumunu ve komşu nöronların ölümlerini tetiklemektedir (Berke, 1995). Amonyak aynı zamanda en az üç sinyal molekülünün kompleks etkileşimi sonucu apoptozu da uyarır: NO, PKC ve NF- κ B. NF- κ B muhtemelen iNOS'un indüklenmesine ve C6 glioma hücrelerinde NO'nun zehirli seviyelerinin oluşumuna katkı yapmaktadır (Pan vd., 1998). Şekil 3.3., amonyak nörotoksitesinin ana şeklini özetlemektedir.



Şekil 3.3. Hiperamonyeminin nedenli hepatik ensefalopatiden sorumlu ana faktörler (Oja vd., 2017).

3.1.4.2. GABA (Gama-Aminobutirik Asit)/Benzodiazepin reseptör kompleksi teorisi

Gama-Aminobutirik Asit (GABA) insanlardaki ana inhibitör nörotransmitterdir ve GABA reseptör kompleksine (GRK) bağlanarak aktifleşmektedir. Endojen benzodiazepinlerin ve diğer nörosteroidlerin artan seviyeleri nörotransmisyonun inhibisyonuna yol açmaktadır. HE'de serebral GABA düzeylerindeki değişiklikler de bildirilmiştir (Ahboucha ve Butterworth, 2004).

3.1.4.3. Dallanmış zincirli amino asitler (DZAA) ve yanlış nörotransmitter teorisi

Serebral nöro-iletim, amino asitlerin MSS konsantrasyonu ve öncülleri tarafından düzenlenmektedir. Ciddi karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, aromatik amino asitlerin (AAA) (triptofan, tirozin ve fenilalanin) dolaşımdaki plazma konsantrasyonları yükselmekte, dallanmış zincirli amino asitlerin (DZAA) (lösin, izölösin ve valin) konsantrasyonları azalmaktadır. AAA ve DZAA, MSS'ye ortak bir taşıma mekanizması paylaşmakta ve artan AAA konsantrasyonunun bir sonucu olarak nöronal seviyeler sahte nörotransmitterlerin (octopamide ve feniletanolamid) üretimine yol açmaktadır (Capocaccia vd., 1999).

3.1.4.4. Serotonin teorisi

MSS'de yaygın dağılım gösteren bir nörotransmitter olan serotonin, HE patogenezinde bulunmaktadır. HE'deki nöronal serotonin sentezi, metabolizması, depolanması ve salınımindaki değişiklikler bir serotonerjik sinaptik açığı işaret etmektedir. Ayrıca serebral serotoninin uyku, sirkadiyen ritim ve lokomasyonun düzenlenmesi için önemli olduğu bilinmektedir (Lozeva vd., 2004).

3.1.4.5. Çinko teorisi

Üre döngüsü enzimlerinin bir kofaktörü olan çinko, siroz hastalarında tükenmektedir. Çinko takviyesi, ornitin transkarbamilazın aktivitesini artırarak amonyak atılımını arttırmaktadır. Ancak HE'de çinko takviyesi ile ilgili çelişkili klinik veriler bulunmaktadır (Marchesini vd., 1996; Yoshida vd., 2001).

3.1.4.6. Manganez teorisi

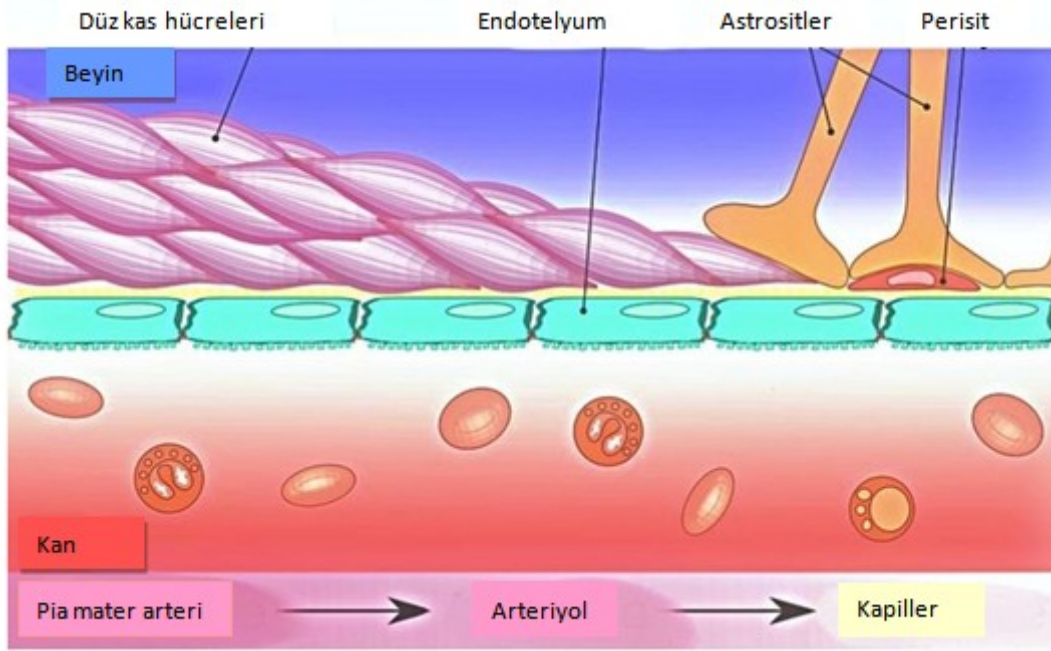
Manganez birikimi sirozlu birçok hastanın bazal gangliyonunda oluşmakta ve karaciğer transplantasyonunu takiben tersine dönmektedir. Serum manganez konsantrasyonu, HE derecesine göre az miktarda korelasyon göstermektedir (Mas, 2006). Buna rağmen, manganez zehirlenmesinin klinik bulgusu ile HE'nin ekstrapiramidal

bulguları arasındaki benzerlik yüksek serebral manganez seviyelerinin HE gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir.

3.2. Kan Beyin Bariyeri (KBB)

Kan beyin bariyeri (KBB) ilk defa 20. yüzyılın başında Lewandosky ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. KBB, endotelial hücrelerden (EH) ve EH'lerle bağlantılı sıkı bağlantılardan (SB), perisitlerden, astrositlerden ve ekstraselüler matriks (ESM)'den oluşmaktadır (Keaney ve Campbell). EH'ler damar duvarlarından oluşurken perisitler vasküler bazal membrana gömülmekte ve astrositik endfeet süreçler neredeyse tamamen beyin kılcal damarlarına çekilmektedir (Abbott vd., 2010). EH'ler ve onların SB'leri nihai geçirgenlik bariyeri olmasına rağmen perisitler ve astrositler ana düzenleyici rol oynamaktadırlar (Obermeier vd., 2013).

Beyin endotelial hücreleri arasında sıkı bağlantılar ve zonular desmosomlar bulunmaktadır. Klaudin, okludin (sıkı bağlantı), kaderinler (zonular desmosomlar) ve birleşik adezyon molekülleri (BAM) gibi ana transmembran proteinleri hücre iskeletine plazma proteinleri cingulin, katenin ve yanaşık desmosom (zonula Occludentes) proteinleri aracılığıyla bağlanmaktadır. Konsantrasyon gradiyenti yoluyla suda çözünebilir maddelerin hücrelerarası serbest difüzyonu büyük ölçüde sıkı bağlantılarla yapılmaktadır. Küçük lipofilik maddeler transselüler yollar aracılığıyla endotelial boyunca difüze olmaktadır. Düşük seviyede transsitoz endotelial hücrelerde ya reseptör aracılı ya da reseptör aracısız meydana gelmektedir. Bir dizi endotelial taşıyıcı protein glukoz ve amino asit gibi besinlerin hareketinden sorumludur. Ek olarak, Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Ca^{2+} ve diğer iyonları taşıyan çeşitli iyon taşıyıcıları beyin iyon homeostazının korunmasıyla ilgilidir (Zlokovic, 2008).



Şekil 3.4. Fizyolojik koşullarda mikrovasküler endotelial hücreler tarafından kan ve beyin arasında moleküllerin hareketinin düzenlenmesi (Anonim, 2018)

Kapiller endotelial bariyer, bağırsak bariyeri, serebral spinal akış bariyeri, KBB ve diğer birçok fizyolojik bariyer yabancı maddelere karşı vücudu savunmakta ve belirli moleküllerin geçişini sınırlamaktadır. Kompleks, dinamik ve uyarlanabilen ara yüzey aracılığıyla MSS ve kan arasında maddelerin geçişini kontrol eden KBB, insan vücudundaki en yoğun bariyer ve MSS'nin temel koruyucusudur (Abbott vd., 2006).

KBB çoğunlukla sıkı birleşimlere neden olan yoğun doldurulmuş beyin endotel hücreleri tarafından oluşmakta ve astrositik end-feet, lümenle ve perisit hücrelerle çevrilmiştir (Şekil 3.4). Spesifik olarak, KBB'deki endotel hücreleri ve sıkı bağlantılar, hücreler arasındaki difüzyonu önleyen kısıtlayıcı bir ağ oluşturmaktadır. Beyin kapillerinin etrafında sarılı olan perisitler KBB'nin düzenlenmesine yardım etmekte ve KBB'yi desteklemektedir (Serlin vd., 2015). Astrositler kimyasal stabiliteyi korumakta ve KBB'yi çevreleyen nöronlarla hücrel etkileşime girmektedirler. Bu hücreler bariyer ile etkileşime girmekte ve sıkı bağlantıları, taşıyıcıları ve enzim sistemlerini düzenlemektedirler. Astrositik end-feet, beyin kılcal damarlarını sarmakta ve erken gelişim sırasında dar geçişler oluşturmak için endotel hücrelerinin indüksiyonunu kolaylaştırmaktadır (Abbott vd., 2010). Bu titiz yapı, yabancı organizmaların ve zararlı kimyasalların KBB'de hareketini kısıtlamakta ve böylece beyin korunarak sadece seçilen iyonlar ve O₂, CO₂,

glikoz ve etanol gibi moleküllerin taşıyıcılar vasıtasıyla geçmesine izin vermektedir. Bununla birlikte, KBB aynı mekanizma ile Alzheimer hastalığı (AH), inme, gliom ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıkların etkili tedavisini de engellemektedir. Bu hastalıkların tedavisinde gerekli olan küçük moleküler ilaçlar ve protein temelli terapötikler de dahil olmak üzere birçok molekül, ciddi seçilmiş yarı geçirgen membran doğası nedeniyle KBB'yi geçememekte bu da ciddi hastalıkların hızlı ve tedavi edilemeden ilerlemesine neden olmaktadır. Maddelerin KBB'den geçtiği toplam dört farklı mekanizma bulunmaktadır: Basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, kanal vasıtasıyla basit difüzyon ve aktif bir bağlanma bölgesi ile bağlantılı bir protein taşıyıcısı yoluyla aktif taşıma (Krol vd., 2012).

3.3. MSS Gelişimi ve Sinaps Formasyonu

Astrositler, MSS'de en çok bulunan hücreler olup akson rehberliğinden sinaptik desteğe, kan beyin bariyeri ve kan akışının kontrolüne kadar çeşitli görevleri yerine getirmektedirler (Blackburn vd., 2009).

Astrositler sadece nöronlar için besleyici, metabolik ve yapısal destek sağlamaz, aynı zamanda kompleks nöronal-glial iletişim, sinaptik sinyal verme, kan akışının düzenlenmesi gibi konularda da aktif rol oynamaktadır. Yetişkin MSS'sindeki sinir öncüllerini/kök hücrelerini kuvvetle etkileyebilmektedir (Seifert vd., 2006). Bu çoklu işlevsellik MSS boyunca bulunan astrosit alt tipli çeşitliliğini açıklayabilmektedir.

Astrositler ile gelişmekte olan nöronlar arasındaki etkileşim dendritik büyümede, etkili sinaptik oluşumda ve istenmeyen sinapsların giderilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Haydon, 2001).

Astrositler, laminin-1, kollajen-IV, nidogen, fibronektin, vitronektin ve tenascin-C gibi hücre dışı matriksi oluşturan proteoglikanlar ve glikoproteinler de dahil olmak üzere akson rehberliği ve glial sınırları için önemli olan büyüme teşvik edici ve büyümeyi önleyici molekülleri salgılamaktadırlar (Garwood vd., 2001). Sinaps gelişiminde önemli olan faktörler arasında kolesterol (Mauch vd., 2001), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) (126) ve trombospondinler bulunmaktadır (Christopherson vd., 2005).

3.3.1. Sinaptik homeostaz

Astrositler, sinapsları, nöronal somataları veya aksonal internodların demetlerini kuşatan parmak benzeri dallara biten birçok işleme sahiptir (Wolff, 1968). Astrositlerin sinaptik kapsama alanı yüksektir ancak hipokampusta %60 oranında olabilmekte (Ventura ve Harris, 1999) bu da, doğum ve emzirme gibi aktivasyona bağlı olarak hipotalamusta değişiklik gösterebilmektedir (Catheline vd., 2006).

3.3.2. Üçlü sinaps nöronal sinyal

Beyin dilimlerinde görüldüğü üzere, astrositlerin sinapsta homeostazı korumaktan çok daha fazlasını yaptığını göstermektedir. Öğrenme, hafıza ve sinaptik plastisitede önemli rol oynayan astrositler, nöronal ve glial sinyallemede de aktif oyunculardır. Astrositler Glu, ATP, Serin, GABA gibi kimyasal transmitterlerin salınımıyla sinaptik iletimi düzenlemekte ve MSS'deki eksitator sinyallemeyle belirlemeye yardımcı olmaktadır (Parpura vd., 1994;Halassa vd., 2007). Astrositler tarafından salınan Glu hem inhibitör hem de eksitator postsinaptik akımların frekansını artırabilmekte (Parri ve Crunelli, 2001) ve aynı zamanda da presinaptik nöronlara ekstrasinaptik metabotropik (mGLuR) reseptörler vasıtasıyla etki etmektedir (Fiacco ve McCarthy, 2004). Astrositler aynı zamanda metabolit adenosin aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak sinaptik aktiviteye cevap olarak ATP'yi serbest bırakmakta, komşu presinaptik nöronlardan Glu salınımını inhibe ederek aktive olan diğer komşu sinapsların eksitator sinaptik iletimini inhibe etmektedir (Zhang vd., 2003). Dolayısıyla "üçlü" sinaps çok karmaşıktır: astrositler, boşluk kavşaklarıyla diğerlerine bağlanırlar ve astrositler, farklı nöronlardan gelen binlerce farklı sinapsı kaplayabilmektedir.

3.4. Kan Beyin Bariyeri ve Kan Akışının Kontrolü

Serebral mikrodamar hattı ve KBB'nin bir parçasını oluşturan endotel hücreleri, astrosit end-feet ile çevrilidir. Astrositlerin, taşıyıcıların lokalizasyonu ve özel antioksidan enzimlerin üretimi de dahil endotel hücrelerinin uzmanlaşmış rollerini düzenleme görevi aldığı düşünülmektedir (Abbott vd., 2006). Astrositler beyin kapiller gelişiminde rol oynadığı düşünülen anjiyopoetin 1, nörotrofinler [Gliyal hücre hattı türevli nörotropik

faktör (GDNF) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)] gibi çeşitli anjiyojenik faktörleri salgılamaktadır (Lee vd., 2003). KBB; inflamatuvar sitokinler, anjiyojenik faktörler, glutamaterjik toksisite, hipoksi ve oksidatif stres ile remodelize edilebilen dinamik bir yapıdadır (Ke vd., 2001).

3.5. Astrositlerin Nöronal Enerji Homeostazı ve Nöroprotektif Özellikleri

Astrositler, astrosit-nöron laktat mekiğini oluşturan glikojen depolarından laktat salınımı sonucu glukoz tüketimi miktarı arttığında nöronları enerji yoksunluğundan korumaktadır (Zwingmann vd., 2000; Bouzier-Sore vd., 2002). E vitamini, askorbat ve glutatyon (GSH) gibi antioksidan molekül konsantrasyonları astrositlerde nöronlara kıyasla daha yüksektir (Dringen vd., 2000; Shih vd., 2003). Astrositler, kendilerini reaktif oksijen türlerinden (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinden (RNS) koruyan GSH salgılamaktadırlar (Bains ve Shaw, 1997). Oksidatif strese yanıt olarak astrositler, glutamat sistein ligazın (GSH üretiminde hız sınırlayan enzim) aktivitesini arttırırken, nöronlar bunu yapamazlar (Gegg vd., 2003). ROS ve RNS, astrositik NF-E2 ile ilişkili faktör 2'yi (Nrf2) arttırır ve Nrf2 nükleusa translokasyon yaparak antioksidan yanıt elementine (AYE) bağlanmaktadır. AYE'nin bağlanması, glutatyon sentezi için kullanılanlar ile astrosit-nöron laktat mekiği ve kolesterol sentezinde yer alanlar da dahil olmak üzere bir antioksidan gen kümesini hızlandırmaktadır. AYE'nin bazal ifadesi ve aktivasyonu astrositlerde nöronlardan daha yüksektir (Kraft vd., 2004).

3.6. Nöronal Değişirme

Astrositler sadece akson rehberliğinde (sinapsların oluşumu ve çıkarılması) önemli bir rol oynamakla kalmaz aynı zamanda nöronal değişime de dahil olmaktadır (Seri vd., 2001; Sanai vd., 2004). Sinir kök hücreleri, mikro çevre, astrositler, endotel hücreleri ve kök hücre nişini oluşturan proteinler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedirler (Fuchs vd., 2004). Kök hücre nişi kök hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlemektedir (Alvarez-Buylla ve Lim, 2004; Mokry vd., 2004).

Yetişkin memeli MSS'sinde nörojenez, yalnızca olfaktör bulbus (OB) ve dentat girus (DG) gibi belirli bölgelerde gerçekleşmektedir. İnhibitör sinyallerinin MSS'den başka

bir yerde nöron değişimini önlediği düşünülmektedir. Ancak hastalık durumlarında sınırlı nörojenez OB ve DG dışındaki bölgelerde de görülmektedir (Lie vd., 2004). Erişkin sinir öncüllerinin doğru tanımlanması, tarifi ile nöronal ve glial kaderi teşvik eden faktörler, süreçte yer alan astrositlerin alt tiplerini tanımlamaya yardımcı olabilecek bir dizi hücre belirteçlerinin tanımlanmasını gerektirmektedir (Steindler ve Laywell, 2003).

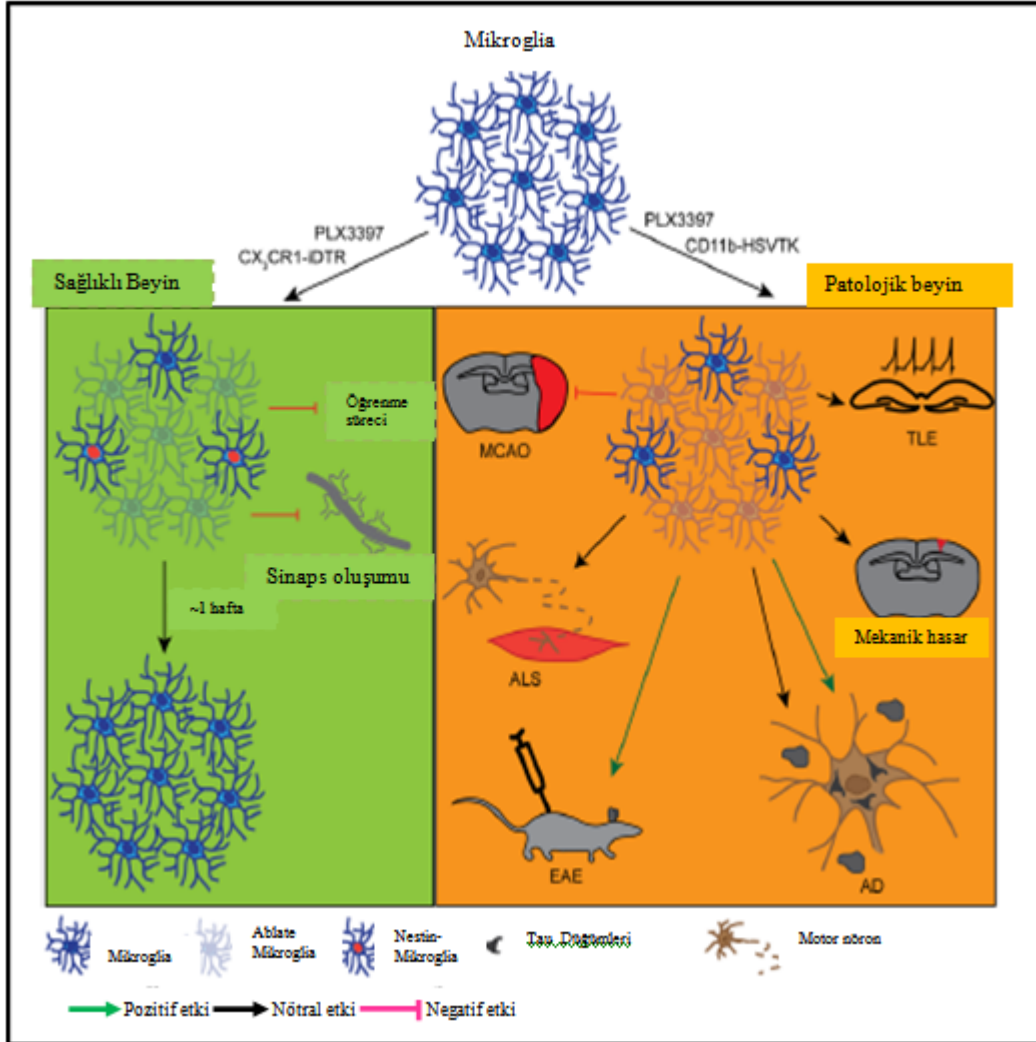
Mikroglia sinir sisteminin hem bağışıklık sistemi hem de fagositik hücreleridir. Bunlar beynin gliyası olsalar da, ektodermal dokudan diğer tüm glial hücreler gibi gelişim sırasında beyni dolduran yolk-kesesi progenitörlerden köken almamaktadırlar (Kim ve de Vellis, 2005; Kettenmann vd., 2011) (Şekil 3.5). Mikroglia'nın yetişkin beyin parankiminin çok büyük bir kısmını kapsadığı görülmektedir (Nimmerjahn vd., 2005; Cronk ve Kipnis, 2013). Ek olarak makrofajlar, beyin ya da kan beyin bariyerinin (KBB) herhangi bir rahatsızlığı üzerine beyni istila edebilir ki bu da mikroglia ve makrofajların rollerinin ayrılmasının zor olduğu anlamına gelmektedir (Pineau vd., 2010).

Ayrıca, mikroglia'nın patolojik işlevinin yanı sıra normal şartlarda da hem gelişim boyunca sinaptik budamada (Wu vd., 2015) hem de sinaptik modülasyonda ana rol oynadığı gösterilmiştir (Bessis vd., 2007; Hong vd., 2016; Vasek vd., 2016).

İyi bilinen bir başka mikroglia özelliği yeniden çoğalma kapasitesidir. Mikrogliaların yaralanma, enfeksiyon veya nörodejeneratif hastalıklara bağlı olarak beyin homeostazında herhangi bir kayıp olması durumunda fenotiplerini "istirahattan" aktif duruma geçirdikleri bilinmektedir. Bu mikroglia aktivasyonu proliferasyon, kemoatraktana doğru göç, hasarlı dokuyu temizlemede fagositozun yanı sıra hücrel karmaşıklığın azalmasından oluşmaktadır (Hanisch ve Kettenmann, 2007). Yaralanma üzerine mikroglia'nın hücrel tepkisi kapsamlı bir şekilde belirlenmesine rağmen hem beyin patojenezi üzerindeki işlevsel etkisi hem de mekanizması belirsizliğini korumaktadır.

Her ne kadar mikrogliaların farklı yaralanmalara ve patolojilere benzer morfolojik değişikliklerle reaksiyona girdiği iyi bilinse de (Kreutzberg, 1996), farklı hakaretlere yanıt olarak fonksiyonel aktivasyonunun değişip değişmediği belirsizliğini korumaktadır. Farklı makrofajların patolojinin tüm seyrinde iki farklı popülasyon haline gelip gelmedikleri veya farklı aşamalarda birbirleri ile etkileşime girip giremeyeceği belirsizliğini korumaktadır

(Varnum ve Ikezu, 2012; Weisser vd., 2013). Eğer ikinci hipotez doğruysa, mikroglia ablasyon çalışmalarının başlangıcının zamanlaması, daha fazla düşünülmesi gereken başka bir faktör olmalıdır.



Şekil 3.5. Sağlıklı ve patolojik koşullarda mikroglia ablasyonunun etkileri ve dinamikleri. Fizyolojik koşullar altında (sol panel), farmakolojik ilaç L-a-aminoadipik asit (L-AAA) veya GFAPCreERT2-DTA ve GFAP-NTR fare hatları kullanılarak başarılı astrosit ablasyonu sağlandı. Astrositler için, repopülasyon kinetiği henüz ayrıntılı olarak analiz edilmemiştir ancak bu hücrelerin tükenmiş alanı yeniden çoğalttığı gösterilmiştir. Fonksiyonel sonuç olarak, ablasyon ya etki göstermemiştir ya da beyincikte ve omurilikte nöronal sağkalımı olumsuz etkilemiştir. Patolojik koşullar altında (turuncu sağ panel), astrosit ablasyonuna sadece GFAP-HSVTK fare hattında erişilmiştir. Bununla birlikte, bu model ile sadece çoğalan astrosit havuzu tükenebilir. Yara oluşturan astrositlerin genel olarak azalması, omurilik yaralanmasında (SCI), mekanik beyin yaralanmasında ve EAE'de yaralanma büyüklüğü ve ciddiyeti açısından olumsuz bir sonuç vermiştir (Jakel ve Dimou, 2017).

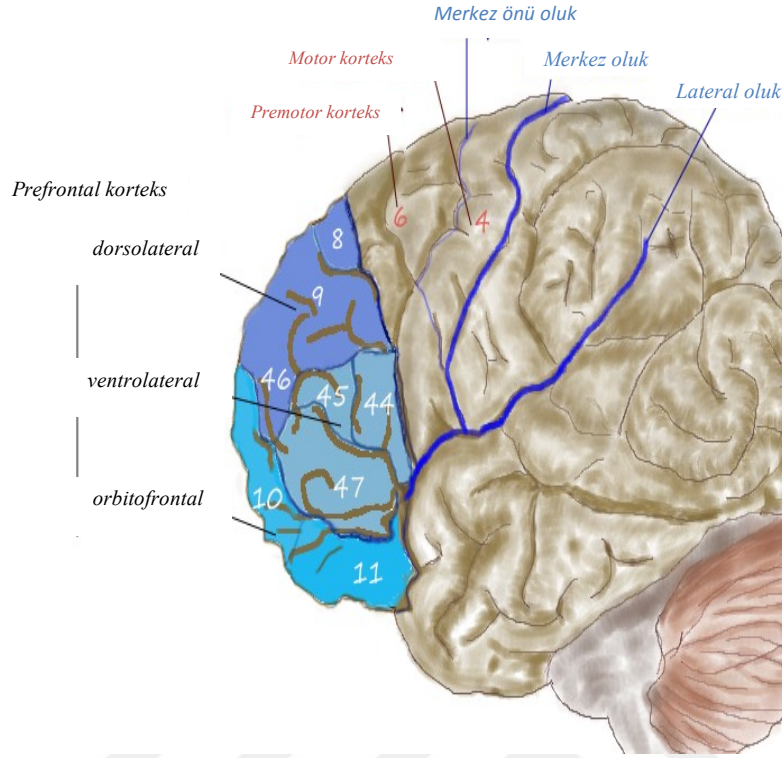
3.7. Dorsolateral Prefrontal Korteks (DLPFK)

Dorsolateral prefrontal korteks (DLPFK) insan ve insan dışı primatlarda beynin prefrontal korteksindeki bir alandır ve insan beyninin en son gelişen kısımlarından birisidir. DLPFK, yetişkinliğe kadar olgunlaşma süresine devam etmektedir. DLPFK anatomik değil, işlevsel bir yapı olup insanda orta frontal girusunda makak maymunlarında ana sulkusun çevresinde yer almaktadır (Şekil 3.6) (Luciana, 2001).

DLPFK talamusun yanısıra orbitofrontal korteks, bazal gangliyonların (özellikle dorsal kaudat çekirdek) parçaları, hipokampus ve neokorteksin primer ve sekonder birleşim alanları ile komşudur (Cieslik, 2013).

DLPFK'nın önemli bir fonksiyonu, çalışma belleği, bilişsel esneklik (Mylius vd., 2013), planlama, inhibisyon ve soyut akıl yürütme gibi yürütücü işlevlerdir (Kaplan vd., 2016). Bununla birlikte DLPFK, sadece yürütme işlevlerinden sorumlu değildir. Tüm karmaşık zihinsel aktivite DLPFK'nin bağlı olduğu ek korteks ve subkortikal devreleri gerektirmektedir. DLPFK aynı zamanda, motor planlama, organizasyon ve düzenlemeye dahil olan en yüksek korteks alanıdır (Miller ve Cummings, 2007).

DLPFK mekansal selektif nöronlardan oluştuğundan sensör girişi, kısa süreli hafızada kalıcılık ve motor sinyal verme gibi entegre bir tepki gerçekleştirmek için gerekli tüm alt fonksiyonları kapsayan bir sinirsel devreye sahiptir (Hoshi, 2006).



Şekil 3.6. Beyin prefrontal bölgesi (Anonim, 2019)

Bellekte sadece DLPFK yer almamaktadır. Böylece, dorsolateral prefrontal kortekse zarar verildiğinde tanıma belleği bozulmamaktadır. Hasar görmüş DLPFK’li insanlara iki resim arasından seçim yapma fırsatı verildiğinde, bir süre sonra gördükleri resmi tanımlayamadıkları belirtilmiştir (Chan vd., 2008).

3.8. Beyincik

Beyincik (Latince “küçük beyin”) tüm omurgalıların arka beyinin önemli bir yapısıdır. Genellikle beyinden küçük olmasına rağmen mormirid (mormyrid) balığı gibi bazı hayvanlarda beyinle eşit veya beyinden daha büyük olabilmektedir (Hodos, 2009). İnsanlarda, beyincik motor aktivitelerin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, korku ve zevk yanıtlarının düzenlenmesinin yanı sıra dikkat ve dil gibi bazı bilişsel işlevlerde de yer alabilmektedir (Wolf vd., 2009) ancak en belirgin işlevi hareketle ilgilidir. İnsan beyinciği hareket başlatmaz, ancak eşgüdüm, hassasiyet ve doğru zamanlamaya katkıda bulunmaktadır; omurilik ve beyin diğer bölgelerindeki duyu sistemlerinden girdi alır ve bu girdileri ince ayar motor aktivitesine entegre etmektedir. Beyincik hasarı

insanlarda ince hareket, denge, duruş ve motor öğrenmede bozukluklara neden olmaktadır (Fine vd., 2002).

3.8.1. Beyinciğin yapısı

Anatomik olarak insan beyinciği, beynin altına yapışmış ve serebral hemisferlerin altına sıkışmış ayrı bir yapı görünümündedir. Korteks yüzeyi, serebral korteksin geniş düzensiz konvolüsyonuna çarpıcı şekilde ince aralıklarla yerleştirilmiş paralel oluklarla kaplıdır. Bu paralel oluklar, serebellar korteksin bir akordeon tarzında sıkıca katlanmış ince bir doku tabakasının kesintisiz olduğunu gizlemektedir. Bu ince tabaka içinde çok iyi düzenlenmiş birkaç nöron türü vardır. Bu nöronların en önemlileri Purkinje hücreleri ve granül hücreleridir. Bu karmaşık sinirsel organizasyon, büyük bir sinyal işleme kabiliyetine sahiptir (Purves, 2011).

Makroskopik anatomi düzeyinde beyincik, altta beyaz madde ve tabanında sıvı dolu bir ventrikül bulunan sıkıca katlanan bir korteks tabakasından oluşmaktadır. Beyaz cevherde dört derin serebellar çekirdek bulunmaktadır. Korteksin her bir parçası, oldukça stereotiplendirilmiş bir geometride ortaya konan aynı nöronal elemanlar grubundan oluşmaktadır. Orta düzeyde, beyincik ve yardımcı yapıları, "mikrozonlar" veya "mikro kompartımanlar" olarak adlandırılan yüzlerce veya bin bağımsız işleyen modüle bölünebilmektedir (Van Den Bos vd., 2010).

3.8.2. Anatomi

Beyincik, posteriodaki kranyal fossada bulunmakla birlikte dördüncü ventrikül, pons ve medulla serebellumun önünde yer almaktadır (Susan vd., 2008). Üzerindeki beyin ile tentorium cerebelli denilen bir deriyle ayrılmakta ve beynin diğer kısımlarıyla olan bağlantılarının hepsi pons içinden geçmektedir. Anatomistler beyinciği pons da içeren metensefalonun bir parçası olarak sınıflandırılmaktadır. Beyin korteks gibi, beyincik de iki yarıküreye ayrılmakta; ayrıca dar orta çizgi bölgesi (vermis) de içermektedir. Çok sayıda küçük granül hücresi nedeniyle beyincik beynin geri kalanından daha fazla nöron içermekte, ancak toplam beyin hacminin sadece % 10'unu almaktadır (Llinas vd., 2004).

Beyincikteki nöronların sayısı, neokortekste bulunan nöronların sayısı ile ilişkilidir. Beyincikte neokortekste bulunan nöronlardan yaklaşık 3.6 kat daha fazla nöron bulunmakta, bu oran birçok farklı memeli türü arasında korunmuştur (Herculano-Houzel, 2010). Beyinciğin olağandışı yüzey görünümü, hacminin çoğunun çok sıkı katlanmış gri madde tabakasından oluştuğunu gizlemektedir. Bu katmandaki her sırt ya da girus bir folium olarak adlandırılmaktadır. İnsan serebellar korteksinin tamamen açılması halinde, yaklaşık 1 metre uzunluğunda ve ortalama 5 santimetre genişliğinde, yaklaşık 500 cm²'lik bir toplam yüzey alanına sahip, bir dizi hacimde paketlenmiş bir sinir dokusu tabakası oluşturacağı tahmin edilmektedir. (Llinas vd., 2004). Korteksin gri maddesinin altında beyaz madde yatar ve kortekste büyük ölçüde miyelizine edilmiş sinir liflerinden oluşmaktadır.

Sinir sisteminin farklı bölgelerine beyinciğin bağlanmasında üç çift serebellar sapçık vardır. Bunlar, üst serebellar sapçık, orta serebellar sapçık ve alt serebellar sapçık olup vermişlere göre konumları ile isimlendirilmektedir. Üst serebellar sapçık esasen talamik çekirdekler vasıtasıyla beyin korteksindeki üst motor nöronlara efferent lifler taşımaktadır. Lifler derin serebellar çekirdeklerden kaynaklanmaktadır. Orta serebellar sapçık ponslara bağlanmakta ve ponslardan tüm girdilerini çoğunlukla pontin çekirdeğinden almaktadır. Ponsa girdi serebral korteksten olmakta ve pontin çekirdeğinden transvers pontin fiberler aracılığıyla beyinciğe iletilmektedir. Orta sapçık üçünün en büyüğüdür ve afferent lifleri, girdilerini beyinciğin farklı bölümlerine çeken üç ayrı fasikülün içine ulaştırmaktadır. Alt serebellar sapçık, vestibüler çekirdekler, omurilik ve tegmentumdan gelen afferent liflerden girdi almaktadır. Aşağı alt serebellar sapçıktan gelen çıktı, vestibüler çekirdeğe ve retikülerformasyona efferent lifler vasıtasıyla ulaşmaktadır. Serebellumun tamamı, inferior serebellar pedikül vasıtasıyla inferior olivary çekirdeğinden modüler girdi almaktadır (207).

3.8.3. Fonksiyon

Beyinciğin fonksiyonu ile ilgili en güçlü ipuçları, beyincikte oluşan hasar sonucu beyinciğin incelenmesinden gelmektedir. Serebellar disfonksiyona sahip hayvanlar ve insanlar, beyinciğin hasar gören kısmı ile vücudun aynı tarafında motor kontrol problemi göstermektedirler. Motor aktivitesi üretmeye devam etmektedirler ancak hassaslıklarını

kaybetmektedirler ve düzensiz, koordinasyonsuz veya yanlış zamanlanmış hareketler üretmektedirler (Rapp, 2001).

Motor fonksiyonları dışındaki eksiklikleri tespit etmek daha zordur. Bu nedenle on yıllar önce serebellumun temel işlevi ile ilgili ulaşılan genel sonuç, bir hareketin ayrıntılı biçimini kalibre etmek olduğu ancak hareketleri başlatmak veya hangi hareketlerin yürütüleceğini karar vermek olmadığıdır (Ghez ve Fahn, 1985).

1990'lı yıllardan önce, evrensel olarak beyinciğin işlevinin sadece motorla ilişkili olduğuna inanılmakta idi ancak daha yeni bulgular bu görüşü değiştirmektedir. Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) çalışmaları dil, dikkat ve zihinsel imgeleme ilişkili olarak serebellar aktivasyonu, korelasyon çalışmaları ise serebral korteksin beyincik ve motor dışı alanlar arasındaki etkileşimlerini göstermektedir (Doya, 2000). fMRI kullanarak serebellumun fonksiyonel haritalanmasına dayanan tahminler, serebellar korteksin yarıdan fazlasının serebral korteksin bağlantı bölgeleriyle birbirine bağlandığını göstermektedir (Buckner, 2011). Sonuç olarak beyincik duygu, davranış ve şefkat gibi birçok farklı fonksiyonel özelliklerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Hernández-Goñi vd., 2010).

3.9. miRNA

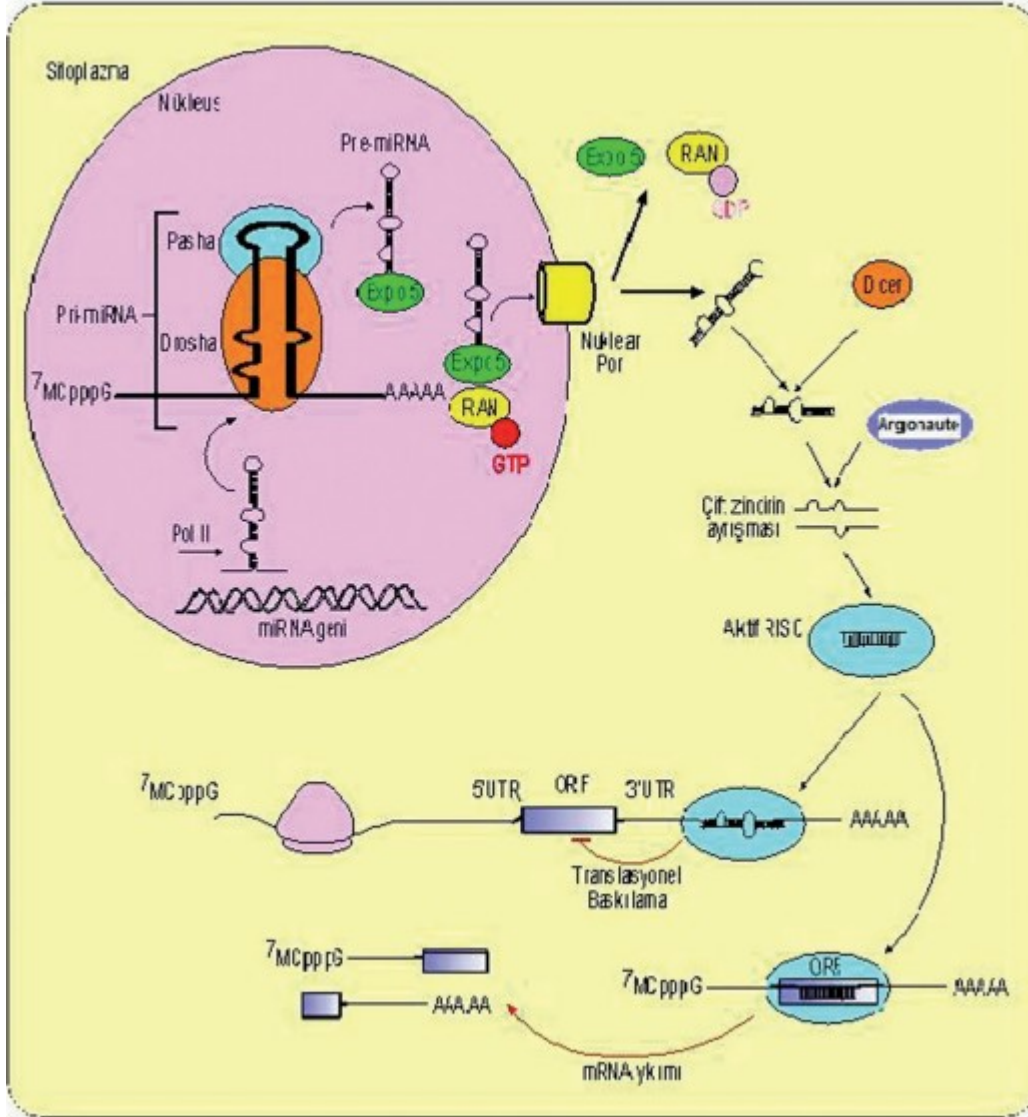
Bitkiler, hayvanlar ve bazı virüsler tarafından kodlanan küçük (~22-nükleotid), kodlama yapmayan, düzenleyici RNA molekülleri olan mikroRNA (miRNA)'lar (Bartel, 2004; Cullen, 2006; Mallory, 2006) ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiş ve tamamlayıcı mRNA'ların ifadesini kısmen düzenlediği gösterilmiştir (Moss vd., 1997). Çoğu miRNA evrimsel olarak birçok türde korunmuştur (Lagos-Quintana vd., 2001; Lau vd., 2001; Lee ve Ambros, 2001). Birçok miRNA'nın gelişimsel ve çeşitli hücrelerdeki spesifik ifade kalıpları iyi tanımlanmakla birlikte (Wienholds ve Plasterk, 2005) çoğu memeli miRNA'sının ekspresyonu ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

miRNA'lar, ilgili hedef mRNA'ların ve kodlanmış proteinlerin ekspresyonunu düzenlemek için posttranskripsiyonel seviyede hareket eden küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır (Ambros, 2004; Zamore ve Haley, 2005). miRNA'lar DNA'dan pri-miRNA'lar

olarak transkribe edilir, akabinde çekirdekten sitozole taşınmakta ve burada genellikle olgun miRNA'lara (22 nükleotid içeren) dönüştürülmektedirler. miRNA'lar RISC (RNA kaynaklı sessizleştirme kompleksi) ile birlikte hareket etmektedirler (Kim vd., 2008). Bireysel miRNA'ların hedef genlerinden genellikle çok sayıda olduğu için miRNA'lar yenilenme, metabolizma, bağışıklık, safra salgılanması, fibroz ve hepatoselüler kanser gibi karaciğerdeki tüm önemli biyolojik işlemlerde görev almaktadırlar (Krek vd., 2005; Bartel, 2009; Chekulaeva vd., 2009).

Intraselüler lokalizasyona ilaveten, miRNA'lar ayrıca serum, plazma, idrar ve tükürük dahil vücut sıvılarında bulunmaktadır (Weber vd., 2010; Shigehara vd., 2011; Bala vd., 2012). Artan kanıtlar, miRNA'ların protein fraksiyonunda olduğu gibi dolaşımdaki eksozomlarda da bulunduğunu düşündürmektedir. Dolaşımdaki miRNA'ların yüksek kararlılığı onların karaciğer hastalıklarında biyolojik belirteç olarak kullanımda cazip kılmaktadır (Szabo ve Bala, 2013).

miRNA'lar esas olarak karaciğerdeki tüm biyolojik süreçleri ve hücre tiplerini hedeflemekte, düzenlemekte ve hemen hemen tüm hücresel süreçlerde gen ekspresyonunun karmaşık programlarını etkilemektedir. Birçok rapor, hücre içi miRNA'lardaki değişikliklerin, viral hepatit, alkolik ve alkolsüz steatohepatit, ilaca bağlı karaciğer hasarı, otoimmün karaciğer hastalığı ve iskemi-reperfüzyon hasarı dahil olmak üzere çeşitli karaciğer hastalıkları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca miRNA ekspresyon profillerinin farklı etiyojilere sahip karaciğer hastalıkları arasında farklı olduğu ortaya çıkmaktadır (Szabo ve Bala, 2013).



Şekil 3.7. MikroRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu. RISC: RNA-indüklü Susturma Kompleksi, UTR: Çevrilmemiş Bölge, ORF: Açık Okunma Çerçevesi, Expo 5: Ekspörtin 5 (Saydam vd., 2010).

Karaciğerde miR 122, hepatik kolesterol ve lipit metabolizmasında yer alan çeşitli genleri etkilemekte ve böylelikle karaciğer homeostazisini sürdürmede merkezi bir rol oynamaktadır. Antisens yaklaşımları kullanılarak miR 122'nin inhibisyonu, fareler (Krutzfeldt vd., 2005) ve şempanzelerde plazma kolesterol seviyelerinin düşürülmesine neden olmuştur (Esau vd., 2009; Lanford vd., 2010). Hem insan NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) hem de bu hastalığın hayvan modellerinde hepatik miR-122 ekspresyonunda bir azalma bildirilmiştir (Cheung vd., 2008; Wang vd., 2009). İki çalışma, farelerde miR-122'yi kodlayan genin silinmesinin, steatohepatit, fibrozis ve [hepatocellular carcinom (hepatoselüler karsinom)'un] (HCC)'nin gelişmesine yol açtığını göstermiştir (Tsai vd., 2012; Hsu vd., 2012).

Çizelge 3.1. Karaciğer biyobelirteçleri olarak dolaşımdaki miRNA'ların nitelikleri (Arrese vd., 2015).

Özellikler	İhtiyaç	Veriler/umut veren ve eksiklikler
Özgül	Doku özgül	miR-122 ve miR-192 ekspresyonu hem yüksek miktarda hem de karaciğere özgüdür.
Hassas	Patolojik durumları ayırt edebilir Düzeyleyler, farklı yaralanma aşamalarında erken ve önemli bir şekilde değişmelidir.	Klinik öncesi çalışmalar, çeşitli miRNA'ların serum ALT seviyelerindeki herhangi bir değişiklikten önce erken aşamalarda artan oranda hassas olabileceğini göstermektedir.28,43
Tahmin edilebilir	Prognozu belirleyebilme (yani hastalığın ilerlemesi, tedaviye cevap)	MiR-122 ve miR-1'in serum seviyeleri sirozlu ve hepatoselüler karsinomlu hastalarda sağkalım ile ilgilidir 88,100 ve hepatit C ile enfekte hastalarda hastalık şiddeti ile doğru orantılıdır. 61
Kuvvetli	Modern teknikler kullanılarak kolayca tanımlanır ve ölçülür. Düzenli depolama koşullarında kararlılık Doku numunelerinde tespit edilebilirlik (formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş numunelerde bile)	Örnek toplama ile ilgili teknik konular, depolanması, RNA izolasyon yöntemleri ve örneklerdeki miRNA'nın kalitesi ve miktarının değerlendirilmesi ele alınmalıdır Ayrıca, seçilen referans RNA'lar kullanılarak miRNA verilerinin normalleştirilmesi, klinik önemi değerlendirmek için kritik bir konudur. 29–31
Çevrilebilir	Veriler, klinik öncesi ve klinik boşlukları doldurmak için kullanılabilir. Tespit klinik ortamda yapılmalı	miRNA testlerinin temel olarak araştırma amacıyla kullanılmasının maliyeti pahalıdır. 37
Non-invazif	Dolaşımda ve/veya diğer biyosıvılarda bulunur.	miRNA'ların çoğu vücut sıvısında bulunur ve oldukça kararlıdır. 3,4

miR-122 ve miR-192 seviyeleri azalırken, asetaminofen verilen farelerin karaciğerlerinde miR-710 ve miR-711 seviyeleri artmıştır (Wang vd., 2009). [Drug-induced liver injury (İlaç indüklü karaciğer hasarı)] DILI'dan sonra miR-122 ve miR-192 seviyelerinde azalmaya neden olan mekanizmalar net değildir, fakat en olası açıklama, hepatosit hasarı sonucu bu miRNA'ların dolaşımda açığa çıkmasıdır.

Farelerde tetraklorodibenzo-p-dioksin (TKDD) ile indüklenen karaciğer hasarı, karaciğerde miR 101a ve miR-122 seviyelerinde zamana bağlı bir azalmayla sonuçlanmaktadır (Yoshioka vd., 2011). miR-101a hedef geni olan [Cyclooxygenase (Siklogenaz)] (Cox2), TKDD'ye maruz kalan farelerde azalmaktadır.

Genel olarak, çeşitli miRNA'lar, ilaç metabolizmasında rol oynayan P450 enzimlerini ve nükleer reseptörleri düzenler. miR-378'in, asetaminofen, alkol ve CCL₄'ün metabolizmasında rol oynayan bir enzim olan Cyp2e1'i düzenlediği gösterilmiştir (Mohri vd., 2009; Sun vd., 2009). Bu sonuçlar miRNA'ların ilaç metabolizmasında ve toksisitesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çizelge 3.2. Farklı karaciğer hastalıklarında dolaşımdaki miRNA'larda seçilmiş raporlar (Arrese vd., 2015).

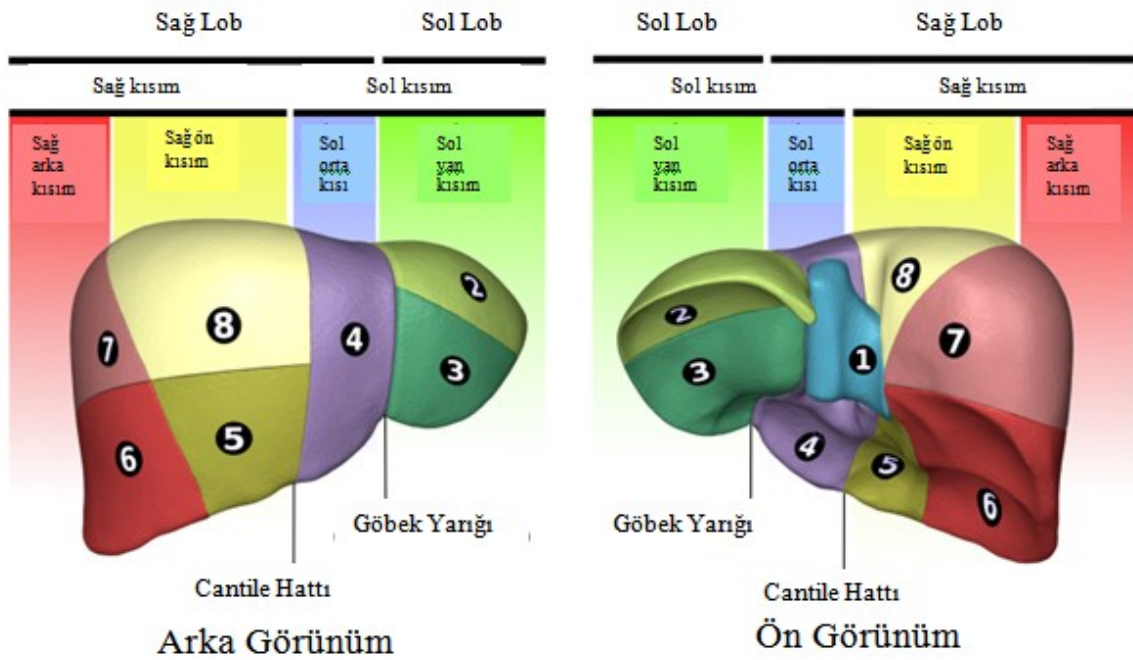
miRNA	Kaynak	Klinik Korelasyon	Deneyisel	İnsan	Referans
DILI					
miR-122 miR-192	Plazma	Artmış	Evet	Hayır	Wang vd., 2009 Su vd., 2012
miR-122	Plazma	Artmış	Evet	Hayır	Bala vd., 2012
miR-122 miR-192	Serum Plazma	Artmış	Hayır	Evet	Starkey-Lewis vd., 2011
miR-122	Plazma	Artmış	Hayır	Evet	Antoine vd., 2013
miR-122	Plazma	Artmış	Hayır	Evet	Dubin vd., 2014
NAFLD/NASH					
miR-122	Serum	Artmış	Evet	Hayır	Clarke vd., 2014
miR-122	Plazma	Artmış	Evet	Hayır	Povero vd., 2013
miR-122 miR-192	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Pirola vd., 2014
miR-122	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Yamada vd., 2013
miR-122 miR-192	Plazma	Artmış	Evet	Hayır	Tryndyak vd., 2014
HCV					
miR-122	Serum	Artmış seviyeler serum ALT aktivitesi ve nekroinflamatuvar aktivite ile ilişkilidir.	Hayır	Evet	Bihrer vd., 2011
miR-122	Serum	Artmış, sağlıklı kontrollerden normal bir ALT ile birlikte kronik HCV ile infekte olmuş hastalarda ayırt etmede ALT'dan daha üstün.	Hayır	Evet	Van der Meer vd., 2013
miR-122	Serum	Artmış	Evet	Evet	Cermelli vd., 2011
HBV					

miR-122 miR-194	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Ji vd., 2011
miR-122	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Zhang vd., 2010
miR-122	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Arataki vd., 2013
miR-122	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Waidmann vd., 2012
miR-122-5p miR-122-3p	Plazma	Artmış	Hayır	Evet	Winther vd., 2013
miR-122 miR-192	Plazma	Artmış		Evet	
HCC					
miR-122	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Qi vd., 2011
miR-122 miR-192	Plazma	Artmış	Hayır	Evet	Zhou vd., 2011
miR-122	Serum	Daha yüksek miR-1 ve miR-122 serum seviyeleri daha uzun genel sağkalım gösterdi.	Hayır	Evet	Köberle vd., 2013
miR-122	Serum	Artmış	Hayır	Evet	Xu vd., 2010
Kolestazis					
miR-122	Serum	Artmış	Evet	Evet	Woolbright vd., 2013

3.10. Karaciğer

Vücudun en ağır organı ve bezi olan karaciğer 1440-1660 gram arasındadır. Karın boşluğunun sağ üst kadranda, karnın sağındaki diyaframın altında ve safra kesesinin üzerinde yer almaktadır. Normal uzunluğu 20-25 cm, yüksekliği 14-17 cm, önden arkaya doğru genişliği 10-14 cm'dir (Koniaris vd., 2003). Karaciğer peritonla kaplı bir organdır ve bu periton güçlü bir bağ dokusu halindedir ve bu şekilde Glisson Kapsülü olarak adlandırılan kapsülü oluşturmaktadır. Karaciğerin iki yüzü vardır: Visseral ve diaframatik. Diaframatik yüz üstte diyafram ile komşudur. Visseral yüz ise hepatik fleksura, transvers kolon, safra kesesi, duodenum, mide ve özefagus ile komşudur (Sutherland ve Harris, 2002). Klasik olarak karaciğerin 4 lobu vardır. Bunlar sağ, sol, kaudat ve quadrat loblardır. Geleneksel bu tanımlama karaciğerin segmental anatomisini açıklamakta yetersiz kalır. 1957 yılında Couinaud tarafından tanımlanan bu anatomik ayırında sol ve sağ loblar arasındaki anatomik bölünme safra kesesi yatağının medial kenarından arkada inferior vena cava (IVC)'ye 3 olan hattı takip etmektedir. Bu

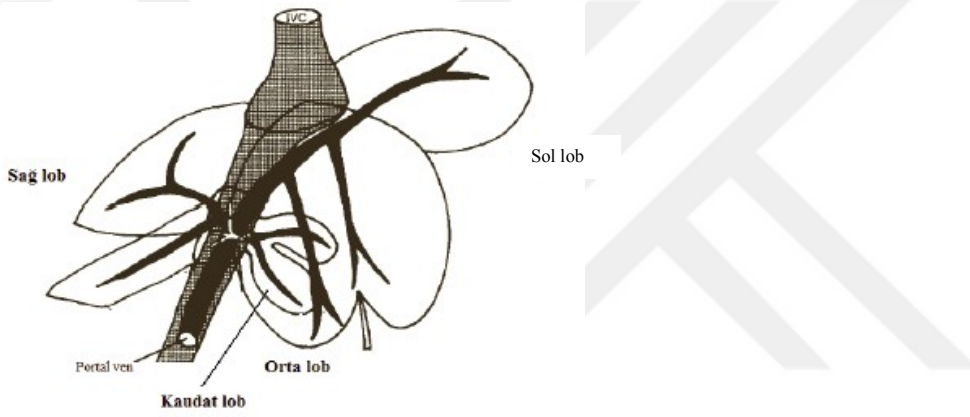
sınıflamaya göre üç segmentli sol lob; sol medial segment (segment IV) ve sol lateral segmentleri (segment II ve III) içermektedir. Sağ lob portal ven ve hepatik arterin dallarına göre dört segmente ayrılmaktadır. Anterior-inferior (segment V), posterior-inferior (segment VI), posterior-superior (segment VII) ve anterior-superior (segment VIII). Kaudat lob (segment I) arkada sağ ve sol hepatik loblar arasında ayrı vasküler yapılar ile yerleşmiştir. Segmentler arasında üç ana hepatik ven karaciğerin üst kısmında vena kavaya açılmaktadır (Taub, 2004).



Şekil 3.8. Karaciğerin segmentleri (Anonim, 2018)

Karaciğere akan kan, kalp debisinin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Ayrıca, vücudun toplam kanının %15'i de karaciğerde bulunmaktadır. Karaciğere akan kan portal ven, hepatik arter ve hepatik ven tarafından düzenlenmektedir. Karaciğer, hem portal venden hem de hepatik arterden kan almaktadır. Portal ven, intestinal ve dalaktan gelen az oksijenlenmiş (%80) venöz kanı taşımaya rağmen hepatositlerin oksijen ihtiyacının yarısını karşılamaktadır (Lafortune vd., 1991). Hepatik arter sistemik arteriyel kan taşımakta ve karaciğer kanlanmasının %25'ini, oksijenizasyonunun ise %30 – 50'sini karşılamaktadır. Sol, sağ ve orta olmak üzere üç ana hepatik ven vardır. Orta hepatik ven, sol ve sağ hepatik ven ile birleşmekte ve IVC'ye dökülmektedir. Karaciğerin temel yapısı olan hepatositler epitelyum kökenlidir ve lobülleri oluşturmaktadır (Scherlock ve Dooley, 2012). Lobül içerisinde hücre kordonları arasında kapillerlerin oluşturduğu sinüzoidler ve

hepatositler ile kapiller endotel hücreleri arasında da Disse aralığı bulunmaktadır. Hepatositlerin mikrovillusları bu aralığa uzanırken, kapiller endotel yüzündeki porlar da Disse aralığı'na açılmaktadır. Bu özel porlu yapı sayesinde hepatositler ile kapiller damarlar arasında makromolekül transferi gerçekleşebilmektedir. Sinüzoidler kapiller endotelin luminal yüzeyinde mononükleer fagositler serisinden Kupffer hücrelerini içermektedir. Bu hücrelerin başlıca fonksiyonları; yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek, bakterileri, virüsleri, tümör hücrelerini ve parazitleri etkisizleştirmektir (Pocok ve Richards, 1999; Burtis ve Ashwood, 1999). Sinüzoidlerin duvarında stellat hücreler de denilen ve A vitamini metabolizmasında rol alan yağ depolayıcı ito hücreleri bulunmaktadır.



Şekil 3.9. Sıçan karaciğerinin anatomisi (Brzoska vd., 2003)

Normal sıçan karaciğerinin histolojisine bakıldığında hegzagonal ve poligonal lobüller görülmektedir. Bu lobüllerin ortasında santral ven ve periferinde hepatik triadlar vardır. Hepatosit sıraları arasında Kupffer hücreleri içeren sinüzoidler bulunmaktadır (Kan vd., 1995). Sıçanlarda da karaciğere kan hepatik arter ve portal ven olmak üzere iki kaynaktan gelmektedir. Dönen kan ise karaciğerin içinden geçen IVC yolu ile boşalmaktadır. Sıçanlarda farelerin aksine safra kesesi yoktur. Hepatik kanal karaciğer hilusundan çıktıktan sonra portal veni çaprazlayıp pankreas kanalları ile birleşip duodonuma bağlanmaktadır.

3.10.1. Karaciğerin fonksiyonları

3.10.1.1. Metabolik fonksiyonlar

Karaciğer hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyona sahiptir. Bazı maddeleri hem sentezlemekte hem de biriktirmektedir. Ayrıca bazılarını detoksifiye etmekte ve bazılarını da taşımaktadır.

Karbonhidrat Metabolizması: Karaciğer karbonhidrat metabolizmasında anahtar rol oynamaktadır. Kanda normal glukoz konsantrasyonunun devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Glikojenin depo edilmesi ve glikojenoliz, glukoneogenez, glukozun pentoz fosfat yolunda yıkımı, galaktoz ve fruktozun glukozla dönüştürülmesi, glukozun diğer monosakkaritlere ve yağla dönüştürülmesi gibi görevleri vardır.

Protein Metabolizması: Karaciğerin, protein metabolizmasıyla ilgili olarak aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması, endojen aminoasitlerin ve albumin, protrombin, fibrinojen, lipoproteinler gibi plazma proteinlerinin sentezi, vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleri gibi fonksiyonları vardır.

Lipid Metabolizması: Karaciğerde gerçekleşen yağ asit metabolizması, enerji üreten katabolik ve biyolojik olarak önemli molekülleri (trigliseridler, fosfolipidler, lipoprotein kolesterol sentezi, ikincil haberciler, bölgesel hormonlar ve keton cisimleri) oluşturan anabolik süreçleri içermektedir.

3.10.1.2. Sekretuar fonksiyonu

Karaciğerin en önemli fonksiyonlarından biri de safranın üretilmesidir. Safranın iki önemli işlevi; yağların sindiriminde, emiliminde ve kandan özellikle hemoglobin parçalama ürünü olan bilirubin ve karaciğer hücrelerinde sentezlenen kolesterol gibi önemli yıkım ürünlerinin atılmasında rol oynamaktadır (McCance ve Huether, 2006).

3.10.1.3. Detoksifikasyon fonksiyonu

İlaçların, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen östrojen, kolesterol, aldosteron, tiroksin gibi hormonların fazlasının veya kalsiyum gibi minerallerin fazlasının detoksifikasyonunu veya safra ile atılımını sağlamaktadır. Karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da birçoğunun vücutta birikmesi, hormonal sistemin aşırı faaliyetine yol açmaktadır. Çoğu ilaçlar karaciğerde sitokrom p-450 (Cyp-450) enzim sistemi (oksidaz, redüktaz ve hidrolaz) tarafından metabolize ve inaktive edilmektedir (Benedetti vd., 2009). Karaciğer, vücutta çeşitli metabolitlerin zararsız hale getirilmesinden de sorumludur. Protein yıkımından ortaya çıkan ve hücreler için toksik bir madde olan amonyağı, üreye dönüştürerek idrarla atılmasını sağlamaktadır. Cyp450'ler oksidasyon, sülfoksidasyon, aromatik hidroksilasyon, alifatik hidroksilasyon, N-dealkilasyon, O-dealkilasyon ve deaminasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir (Ionescu ve Caira, 2005).

İlaç metabolizması tipik olarak, karaciğer, böbrek ve/veya bağırsak tarafından çabucak atılan daha hidrofilik bir bileşiğin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. En yaygın faz I ilaç metabolize edici enzimler, Cyp450 süper ailesi tarafından temsil edilmektedir (Benedetti vd., 2009).. Cyp450'ler, böbrek ve/veya karaciğer tarafından atılmayı kolaylaştırmak için ilaçları suda çözünür ürünlerinde kimyasal olarak değiştiren başlıca enzimler gurubudur (Ionescu ve Caira, 2005).

Faz II ilaç metabolizması sırasında, faz I yollarından gelen ilaçlar veya metabolitler, transferaz enzimlerinin yardımı ile enzimatik olarak hidrofilik bir endojen bileşik ile konjuge edilmektedir. En yaygın faz II ilaç metabolize edici enzimler, UDP-glukuronosiltransferazlar (UGT'ler), sülfotransferazlar (SULT'ler), N asetiltransferazlar (NAT'ler), glutatyon S transferazlar (GST'ler), tiyopurin-S-metiltransferazlar (TPMT) ve katekol O-metiltransferazlar (KOMT'ler) (Almazroo vd., 2016).

Faz III enzimleri, 2 ana süper aileye ayrılmaktadır: ATP bağlayıcı kaset (ABK) ve çözünen taşıyıcı taşıyıcıları (STT). ABC taşıyıcıları aktif olarak hücre zarının bir tarafından diğerin tarafına ilacı almak ya da salmak için enerji tüketimine (ATP) bağımlıdır oysa STT'ler bazı çözünmüş maddelerin membran boyunca geçişini kolaylaştırır ve diğer

çözünen madde veya iyon ile bağlanarak ABC taşıyıcılarının elektrokimyasal gradyanlarına karşı diğer çözünenleri aktif olarak taşır. Faz III enzimleri karaciğer, böbrek, bağırsak ve beyin gibi birçok yerde bulunmaktadır (Giacomini vd., 2010)

3.11. Karaciğerin diğer önemli fonksiyonları

Bağırsak kapillerinden akan kan bağırsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde götürmektedir. Bağırsaklardan portal kana girerek karaciğere gelen mikroorganizmalar hepatik venöz sinüslerde bulunan büyük fagositik makrofajlar aracılığı ile temizlenmiş olmaktadır. Kanda koagülasyon işleminde kullanılan fibrinojen, protrombin, globulin, faktör V-VII-IX-X gibi maddeler karaciğerde yapılmaktadır. Karaciğerde A vitamini, D vitamini, B12 vitamini depo edilmektedir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinuslardaki kan ile birlikte karaciğerin normal kan volümü 450 mL yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin yüzde 10'u kadardır. Sağ atriumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar ve karaciğer genişleyerek 0,5-1L kan hepatik venler ve sinuslarda depo edilmektedir (Junquera vd., 1998).

3.11.1. Toksik hepatit

Toksik hepatit nedenleri genel olarak üç başlık altında incelenmektedir. Bunlar; ilaçlar (asetaminofen, metotreksat vb.), doğal toksik ajanlar (CCL₄, TAA, vb.) ve kimyasal maddelerdir (PAH vb.). Klasik tedavi amaçlı ilaçlar, vitaminler, alkol, kokain, ekstazi, mantar, endüstriyel kimyasal ilaçların yanı sıra özellikle son yıllarda şifalı bitkilerin bazılarının da karaciğerde toksik olaylara neden olabileceği belirtilmiştir (İliçin vd., 1996; Ganong, 2002).

Çizelge 3.3. Toksik hepatite neden olabilen ajanlar (Arıcı, 2008)

Toksik karaciğer hastalığı nedenleri		
İLAÇLAR	DOĞAL TOKSİK AJANLAR	KİMYASAL MADDELER
Analjezikler Anti-inflamatuvar ilaçlar Anestezikler Anti-konvülsan ajanlar Anti-mikrobiyal ajanlar Kardiyovasküler ilaçlar Hormonlar Nöropsikiyatrik ilaçlar İmmunosupresifler	Yiyecekler Alkol Şifalı bitkiler Bakteriyel enfeksiyonlar Mantar, böcek ve akrep toksinleri	İşyerinde kimyasallara maruziyet Endüstriyel kazalar İntihar amaçlı kullanım

Toksik olaylar için risk faktörleri arasında genetik faktörler, ilacın kimyasal içeriği, yaş, cinsiyet yanısıra altta yatan diğer hastalıklar ve kronik alkol kullanımı sayılabilmektedir. İleri yaşlarda risk daha fazladır (Saldinger ve Blumgart, 2002; Lambou-Gianoukos ve Heler, 2008). Çizelge 3.1’de karaciğer hasarına neden olan çeşitli etmenler gösterilmektedir (Guyton ve Hall, 2017).

Hepatotoksisiteye yaş, cinsiyet, beslenme, alkol, genetik ile çeşitli ilaçlar gibi çeşitli faktörlerin neden olduğu bilinmektedir. Deney hayvanlarında oluşturulan hepatotoksisitede ise, birkaç model vardır: Kimyasal indüklü (Alkol, CCL₄, tiyoasetamid, D-Galaktozamin ve lipopolisakkaritler), ilaç indüklü hepatotoksisite (Parasetamol, sisplatin, antitüberküloz ilaç, siklosporin A, doksorubisin), ağır metal indüklü hepatotoksisite (kadmiyum, arsenik) ve diğer modeller (Safranın kanalı ligasyonu, aflatoksin B1, gama radyasyonu, ksenobiotikler).

3.11.1.1. Mitokondri

Mitokondri ökaryotik hücrelerin biyoenerjetik ve metabolik merkezidir. Mitokondrinin dış zarının permeabilizasyonu sitokrom c, kaspazların ikincil mitokondriyal aktivatörü (Smac), endonükleaz G, apoptoz proteininhibitörü (IAP) ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) içeren mitokondriyal iç membran proteinlerinin salınmasına yol açmaktadır (Bajt vd., 2006). Hücre nekrozu sürecinde, mitokondrinin peroksinitrit ve ROS oluşumunun kaynağı gibi davrandığı bilinmektedir. Mitokondri içinde

reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı oluşumu mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesi ve mitokodriyal membran geçirgenliğinin (MMG) tetiklenmesi yoluyla karaciğer hasarında kritik adımdır (Saito vd., 2010). Oksidatif stres C-jun-*N*-terminal kinaz (JNK)'ın aktivasyonundan ve aktif formu olan fosforillenmiş C-jun-*N*-terminal kinaz (JNK)'ın mitokondriye translokasyonundan sorumludur (Ramachandran vd., 2011).

3.11.1.2. Lizozomlar

Lizozomlar makromoleküllerin hücre içi döngüsünü kontrol eden hidrolitik ve katalitik enzimler içeren sitoplazmik membran örtülü organellerdir (Luzio vd, 2007). Lizozomlar elliden fazla fosfataz, nükleaz, glikozidaz, proteaz, peptidaz, sülfataz ve lipazları içeren asid hidrolazlar ile doludur (Duve, 1993). Apoptoz yoluyla karaciğer hücre ölümü, protein ekspresyonunda, protein-protein ilişkisinde, proteolitik kırılımda ve fosforillenmede oluşan değişiklikler tarafından kontrol edilmektedir. Mitokondriden çeşitli apoptotik proteinlerin salınımı hücre ölümünde anahtar olaydır ve çoğunlukla B-hücre lemfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir (Duve, 1959). Lizozomal dengesizleşme lizozomal membran permeabilizasyonu (LMP) olarak adlandırılmaktadır. LMP ölüm reseptörü aktivasyonu (Bax), endoplazmik retikulum stresi, proteozom inhibisyonu, oksidatif stres, DNA hasarı, osmotik stres ve büyüme faktörü açlığı gibi çeşitli apoptotik uyarıcılar tarafından tetiklenmektedir (Boya ve Kroemer, 2008). LMP, lizozomal lümeninden sitozole katepsinlerin ve diğer hidrolazların salınımına neden olmaktadır (Ann-Charlotte vd., 2010).

3.11.1.3. Endoplazmik retikulum

Endoplazmik retikulum (ER), membran proteinlerinden, salgılama işleminden ve sentezden sorumlu zarsı organdır ayrıca hücre stres cevabının önemli organelidir (Ron ve Walter, 2007). Çeşitli patolojik stres altında ER homeostazı bozulmaktadır ve ER lümeninde yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikmesine yol açmaktadır. ER stres cevabı, translasyonu inhibe ederek ve şaperon proteinlerine ek olarak nükleer transkripsiyonu indükleyerek ER lümeninde katlanmamış protein yükünü sınırlamaktadır. Eğer yanlış katlanmış proteinler düzeltilemezse, apoptotik hücre ölümü ortaya çıkmaktadır. Bu tarz stresle başa çıkmak için, hücreler yanlış katlanmış protein cevabı (YPC) olarak

adlandırılan çekirdek ve sitoplazma ile birlikte ER lümenine bağlı olan sinyal transdüksiyon sistemini aktive etmektedir (Hampton, 2000). ER stresi ER lümeninde katlanmamış proteinlerin yükünü izleyen transmembran proteinleri tarafından belirlenmektedir ve sinyal sitozole iletilmektedir. Çeşitli hasar tipleri ER kalsiyum depolarının boşalmasına neden olmaktadır ve sitozolik kalsiyum artar ve sitokrom-c salınmaktadır (Jeschke vd., 2009). Kalsiyum depolarının boşalmasına neden olan ER stres/YPC JNK sinyal yolağının aktivasyonuna yol açmaktadır ve nihayetinde hepatosit apoptozu ile bitmektedir (Jeschke vd., 2007).

3.11.1.4. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyon (LPO) süreci hücre içi prooksidan/antioksidan oranının prooksidanlar lehine değişmesiyle oluşan oksidatif stres nedeniyle hücre ölümüne yol açan hepatotoksisite ile yakından ilişkilidir (Sies, 1985). Oksitlenen ve indirgenen döngüde oksidan ya da hücelere katılan oksidize edilmiş kritik protein sülfidril grupları ya da enzimatik düzenleme ya da LPO'nun başlaması yoluyla glutatyonu tüketen reaktif serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açan toksikantların oluşumu nedeniyle demir ve bakır gibi olan metal iyonları redoksta döngüye katılmaktadır (Saukkonen vd., 2006).

3.11.1.5. Oksidatif stres

ROS kanserde, diyabette, kardiyovasküler hastalıklarda, aterosklerozda ve çeşitli akut ve kronik karaciğer hastalıklarında bulunmaktadır (Bruck vd., 2004). Serbest radikal basitçe çiftleşmemiş elektrona sahip herhangi reaktif türler olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller süperoksit (O_2^{\bullet} , oksijen merkezli radikal), tiyoller (sülfür merkezli radikal), triklorometil (CCl_3^{\bullet} , karbon merkezli radikal) ya da nitrikoksit (NO^{\bullet}) olabilmektedir. *In vivo* olarak sürekli olarak üretilen diğer ROS'lar: O_2^{\bullet} , hidroksil radikali ($\bullet OH$) and $H_2O_2^{\bullet}$ 'dir. Bu serbest radikallerin biyolojik sistemlerle sürekli etkileşimi, ya doğal bir şekilde ya da dışsal olarak oluşan solunmuş/sindirilmiş toksikantlar, kimyasal ya da biyolojik reaksiyonlarda proteinde, lipide, DNA'da, karbohidratlarda ya da membranda hasarın birikimine neden olmaktadır. Anti-oksidan savunma sisteminin temel görevi: (i) ROS'un üretiminin baskılanması, (ii) ROS'un süpürülmesi, (iii) nötralizasyon, onarım ve

hasarın yeniden düzenlenmesi yoluyla temizlenmesi ve (iv) antioksidan protein ve enzimlerin indüklenmesidir (Tiwari, 2001; Naik, 2003).

3.11.1.6. Sitokinler

Sitokinler, diğer hücrelerin işlevini etkilemek için hücrelerden salınan bir grup küçük protein içermektedir. Oldukça spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak, hücre içi sinyalleme kaskadlarının geniş bir alanını tetiklemektedir. Sitokinler, interlökinler (IL), büyümeyi teşvik eden faktörler, interferonlar (IFN) ve kemokinler olarak sınıflandırılmaktadır. Sitokinler, çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir ve birçok başka hücre tipinde etkili olmaktadır. Karaciğer, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde sitokinlerin aktivitesine oldukça duyarlı olan hepatositleri barındırması nedeniyle sitokin aktivitesinin merkezi bir organını temsil etmektedir (Ramadori ve Armbrust, 2001).

3.11.1.7. İnterlökinler

İnterlökinler-10 (IL-10), bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde ya diğer bağışıklık hücreleri tarafından tahrip olan belirli bağışıklık hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonunda görev almaktadır. IL-8, belirli bir immün hücre tipini (nötrofiller) enfeksiyon bölgesine çekmektedir. IL-8 ve diğer kemokinler, monosit kemoatraktan protein-1 ve makrofaj enflamatuar protein 1 α ve 1 β olarak adlandırılmaktadır. Bu moleküllerin tümü enfeksiyon/inflamasyon bölgesinde beyaz kan hücrelerini cezbetmektedir. Deneysel rapor, stellat hücrelerinin doku rejenerasyon prosesine, kemokin reseptörlerinin üretilmesine ve IL-8 gibi kemokinlerin hareketlerine tepki verdiğini göstermiştir (Neuman vd., 2001). Diğer IFN- α , IFN- γ , IL-2 ve IL-18 sitokinleri de yükselmekte, dolayısıyla sitokinler önemli bir immünolojik markris karaciğer hasarı olarak düşünülmektedir (Falasca vd., 2006).

3.11.1.8. Transforme büyüme faktörü beta

Transforme büyüme faktörü beta (TGF- β)'nın önemli immüno düzenleyici bir sitokin olduğu bildirilmiştir. TGF- β 'nın çeşitli normal ve tümör hücrelerinde

apoptozuuyardığı bilinmektedir. Ayrıca, TGF- β 'nın, TNF- β ile birlikte, insan hepatoma hücrelerinde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Katz vd., 2001).

3.11.1.9. Tümör nekroz faktör alfa

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), pleiotropik bir sitokindir; çoğalma, inflamatuvar mediatörlerin üretimi ve hücre ölümü gibi hücresele tepkilere neden olmaktadır. TNF- α , viral hepatit, alkolik karaciğer hastalığı, NASH ve iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde yer almaktadır. Karaciğerde, TNF- α , sadece hücre ölümünün aracıcısı olarak davranmaktadır, aynı zamanda hepatosit çoğalmasını ve karaciğer rejenerasyonunu başlatmaktadır (Schwabe ve Brenner, 2006). TNF- α , diğer sitokinlerin üretimini tetikleyen güçlü pro-inflamatuvar sitokinlerden biridir. Karaciğerde, TNF- α diğer sitokinlerle birlikte enflamasyon hücrelerini organa çekmekte, hepatositleri yok etmekte ve yara dokusu oluşumunu içeren iyileşme sürecini başlatmaktadır. Belgelenmiş sonuçlar, TNF- α 'nın hepatoma hücrelerinin (Neuman vd., 1998) yanısıra tümör taşıyan farelerin ve sıçanların hepatositlerinin apoptozunu indükleyebildiğini ortaya koymaktadır (Kurose vd., 1997).

3.11.1.10. Tümör nekroz faktör-ilişkili apoptoz indükleyici ligand

Tümör nekroz faktör-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptör 1 (ölüm reseptörü 4) ve TRAIL reseptörü 2 (ölüm reseptörü 5) büyük ilgi görmektedir ve kronik karaciğer hastalıklarında önemli bir patojen olarak ortaya çıkmaktadır (Schneider vd., 1997). TRAIL reseptörleri 1 ve 2, FAS'a benzer ve kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptozu indükleyebilmektedir. Ölüm reseptörü 3 ve ölüm reseptörleri, yardımcı T hücre aktivasyonunda, iltihaplanma ve immün regülasyonda rol oynayabilmektedir. Araştırmacıların çoğunluğu TRAIL'in antitümör ajan olarak kullanılabileceği konusunda hemfikirdir (Volkman vd., 2007).

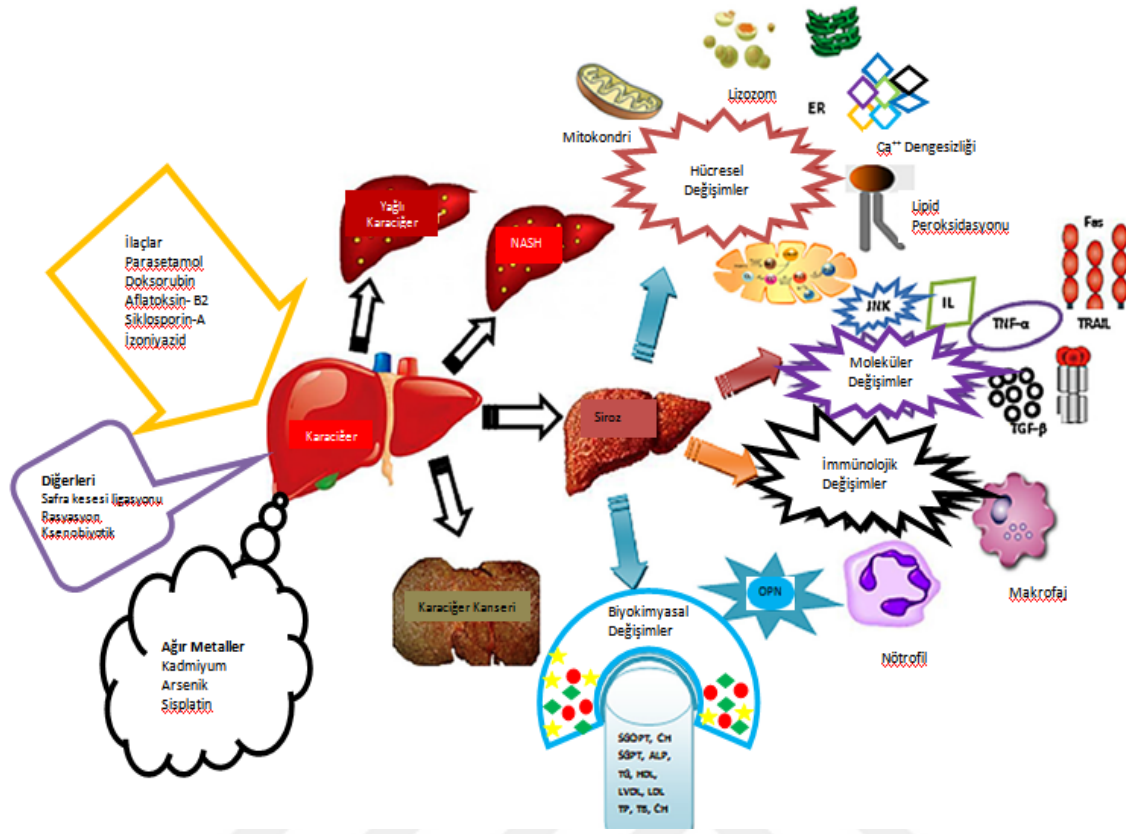
3.11.1.11. C-jun N-terminal kinase (JNK)

Membranlar/organelle başlatılan sitotoksik sinyal yolları sık sık C-jun N-terminal kinaz (JNK) ile ilişkilidir. Bilinen üç memeli JNK geninden iki gen JNK1 ve JNK2 karaciğerde ifade edilmektedir (Czaja, 2003). JNK pre-apoptotik proteinleri (Bim) fosforile

etmekte, onların aktivasyonuna neden olmakta ve mitokondriyal disfonksiyonu tetiklemektedir (Corazza vd., 2006) veya kaspaz 8 aktivasyonuna, Bid bölünmesine ve mitokondriyal sitokrom c salınımına neden olabilmektedir (Wang vd., 2006). JNK1 aktivasyonu, cFLIP'in (ölüm reseptörü sinyallemesinin endojen bir inhibitörü) bozunmasını ve böylece hücre ölümünü FAS veya TRAIL reseptörü 1/TRAIL reseptörü-2 tarafından hızlandırabilmektedir (Chang vd., 2006).

3.11.1.12. FAS (APO-1 veya CD95)

24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler üzerinde bulunmaktadır. 43 kDa molekül ağırlığındaki Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanmaktadır ve reseptör trimerizasyonunu sağlamaktadır. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşmektedir. Bu şekilde; Fas reseptörünün karboksil ucuna (C) yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlatmaktadır. Fas ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilmektedir (Spierings vd., 2004) Fas genellikle hepatositler, kolanjiyositler, sinüzoidal endotel hücreleri, stellat hücreleri ve Kupffer hücrelerinde eksprese edilmektedir (Ueno vd., 2000). Fas, membrana bağlı Fas ligandı (FasL) veya çözümlü FasL ile bağlanma üzerine aktive edilmektedir (Berke, 1995). Fas'ın FasL veya anti-Fas antikorları ile bağlanması, Fas'ın trimerleşmesine ve ardından ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinen bir kompleks oluşturmak üzere proteinlerin birleşmesi ile sonuçlanmaktadır (Song vd., 2004). Fas ile DISC oluşturulduktan sonra, Fas ile ilişkili ölüm etki proteini (FADD) (Chang vd., 1999) ve prokaspaz-8 (Muzio vd., 1995) kaspazların bölünmesi ve aktivasyonu için apoptozom olarak bilinen bir kompleks oluşturmak için birincil bileşenler olarak görev yapmaktadır (Pan vd., 1995). Apoptozomun oluşumu ile inaktif pro-kaspazlar kesilerek ve aktif kaspazlar meydana gelmektedir ve bunlar apoptoz yolağını başlatmaktadır (Nicholson vd., 1995).



Şekil 3.10. Hepatotoksisitenin mekanizmaları (Ingawalea vd., 2014)

3.11.2. Hepatosit hasarını gösteren enzimlerin değerlendirilmesi:

Karaciğer değişik fonksiyonel ve anatomik yapılardan oluşmuş vücudumuzdaki en büyük ve en önemli organdır. Bünyesinde metabolizmada çok önemli olan enzimler içermektedir. Başlıca karaciğer enzimleri (Deepa vd., 2004):

- Alanin aminotransferaz (ALT), eski terminolojide serum glutamik pürivik transaminaz (sGPT)
- Aspartat aminotransferaz (AST), eski terminoloji de serum glutamik oksaloasetik transaminaz (sGOT)
- Gama-glutamil transferaz (GGT)
- Alkalen fosfataz (ALP)

İlk iki enzim hepatositlerde sentezlenirken, son iki enzim safra kanalı epitelyum hücrelerinde sentezlenmektedir. Bu enzimler sadece karaciğer ve safra yollarına özgü değildirler. ALT ve özellikle AST iskelet kası ve kalp kasında, GGT böbreklerde de

sentezlenmektedir (D'Angelica ve Fong, 2004). Klinikte karaciğer testlerini dört başlık halinde incelemek mümkündür;

3.11.2.1. Alanin aminotransferaz (ALT)

Alanin aminotransferaz (ALT) önceleri glutamat pirüvik transaminaz (GPT) olarak anılmakta idi. Esas olarak karaciğerde bulunsa da kalp, iskelet kası ve böbrekte de bulunmaktadır. ALT esas olarak bir karaciğer enzimi olup L-alanin ve glutamat arasında amino gruplarının transferini katalize etmektedir (Karagül vd., 2000). ALT, aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir:



ALT'nin serumdaki normal aktivitesi 5-55 IU/L sınırları arasındadır. NADH'in oksidasyon hızı ALT'nin katalitik aktivitesiyle orantılıdır. Bu hız 340 nm'de absorbans azalmasının ölçümüyle saptanmaktadır. AST ve ALT ölçümleri için serum numunesi laboratuvar ısısında 48 saat, buzdolabında 2 hafta dayanıklılığını korumaktadır. Kaynağının karaciğer olmasından dolayı karaciğer hastalıklarında ALT, kalp hastalıklarında AST daha önemlidir (Ersoy, 2012).

3.11.2.2. Aspartat aminotransferaz (AST)

AST hem sitozolik hem de mitokondriyal izoenzim olup karaciğerin yanı sıra çizgili kaslarda, beyin, pankreas ve kan hücrelerinde bulunmaktadır. AST aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir.



NADH oksidasyon hızı, AST'nin katalitik aktivitesi ile orantılıdır. Bu hız 340 nm'de absorbans azalışı metoduyla belirlenmektedir. Ciddi doku hasarlarında (akut hepatitis, ezilme ve doku hipoksiası gibi) serumda çok yüksek değerlere ulaşmaktadır (Clayton ve Round, 1994).

ALT sitozolik ve göreceli olarak karaciğere spesifik olan bir enzimdir. AST ise hem sitozolik hem de mitokondriyal izoenzimdir. Karaciğerden başka çizgili kaslarda, beyin, pankreas ve kan hücrelerinde de bulunmaktadır. Serum aminotransferaz düzeyinin artması; hepatosellüler nekroz sonucu hücre içindeki enzimin seruma geçmesi veya nekrozla sonlanmayan bir hücre hasarında membran geçirgenliğinin artması şeklinde olabilmektedir. Aminotranferazlar idrarla atılmazlar. Safraya az miktarda geçebilmektedir. Eleminasyonu esas olarak retiküloendotelyal sistemde gerçekleşmektedir. ALT'nin yarı ömrü 47 ± 10 saat ve AST'nin yarı ömrü 17 ± 5 saat olduğundan AST'nin eleminasyonu ALT'den daha hızlıdır (Figlewicz vd., 2009).

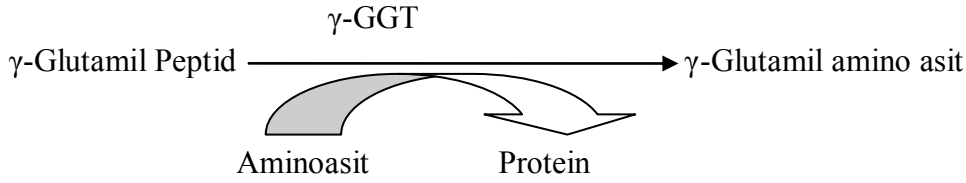
Aminotransferaz artışının önemi klinikte iyi bilinmelidir. Aminotransferaz artışı genellikle,

- Ciddi derecede artış; genellikle normal değerinin 15 katından fazla,
- Orta derecede artış; normal değerinin 5-15 kat arası
- Hafif derecede artış; normal değerinin 5 katından daha az artış olarak üç ayrı seviyede değerlendirilebilir.

İlaçların, bitkilerin veya toksinlerin aminotransferaz artışına neden olduğu bilinmektedir. İlaç, bitki veya toksin kullanımı sonucu gelişen aminotransferaz artışı hafif derecede olabileceği gibi karaciğer yetmezliğine kadar gidebilmektedir. İlaç, bitki veya toksin alımından genellikle 1-2 ay içerisinde aminotransferaz artışı meydana gelebilmektedir (Kunutsor, 2016).

3.11.2.3. Gama glutamil transferaz (GGT)

Gama glutamil transferaz (GGT), C terminal glutamil gruplarına bağlanan bir karboksi peptidazdır. Enzim glutatyon metabolizmasında görev almaktadır. Mikrozoal membranlarda (% 95) ve sitozolde (%5) bulunmaktadır. Serum GGT aktivitesi birincil olarak karaciğer kökenlidir (Zimmerman ve Ishak, 2002). GGT, katalitik aktivitesini transfer ve hidroliz reaksiyonlarında göstermektedir:



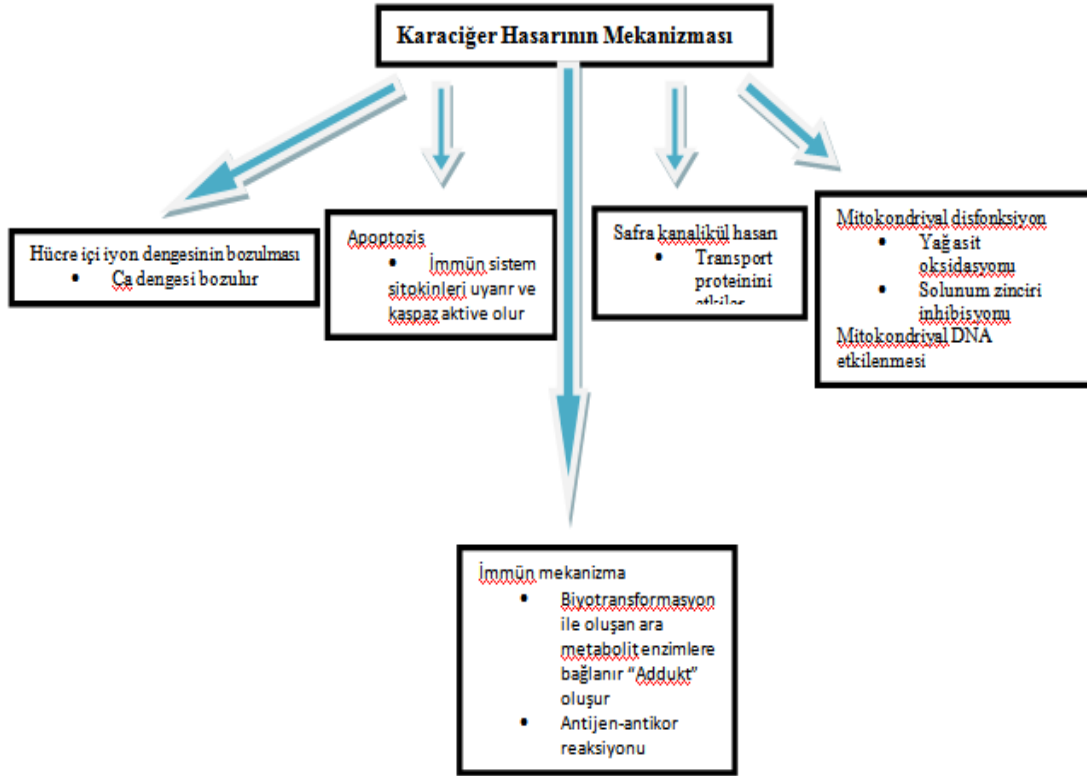
Metastazlı ve primer karaciğer kanserlerinde GGT’de hızlı ve önemli bir artış görülmektedir. GGT’nin serumdaki artışı, genellikle karaciğer metastazının ilk bulgusudur. GGT, aynı zamanda böbrekte ve pankreasta da yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Kunutsor, 2016).

3.11.3. Karaciğer hasarının mekanizması

Toksik olaylarda karaciğer hasarının oluşma mekanizmaları Tablo 5’de özetlenmiştir. Buna göre temel olarak 5 mekanizma söz konusudur. Bunlardan ilki, hücre içi iyon dengesinin bozulması ile açıklanmaktadır. İyon dengesinin bozulması sonucu ilaçlar kovalent bağ ile intraselüler proteinlere bağlanmaktadır. Hücre içi kalsiyum dengesi bozulmaktadır. Hücrede şişme, zarda parçalanma ve hücre yıkımı gerçekleşmektedir. Diğer mekanizma safra kanaliküler hasarıdır. Safra kanalikül membranındaki transport proteini etkilenerek veya safra sekresyonundan sorumlu bölgedeki aktin liflerinin yıkımına neden olarak safra sekresyonuna engel olarak kolestaza neden olmaktadır. Safra asitlerinin hücre içindeki birikimi de apoptozise neden olmaktadır. Bu durumda üçüncü mekanizma olarak apoptozis söz konusudur. Hücre zedelenmesi ile uyarılan immün sistem sitokinleri (TNF gibi) aktifleştirip, hücre içi kaspazları tetikleyerek apoptozisi tetiklemektedir. Karaciğer hasarına neden olan dördüncü mekanizma ise immün mekanizmadır. İlaçlar küçük moleküllerdir ve immün cevap oluşturamamaktadır. Ancak biyotransformasyon sonucu p450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimlere bağlanıp “addukt” denilen antijen gibi algılanan bileşikler oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin hepatosit yüzeyine taşınması ile antikor oluşumu ve humoral immünite uyarılmaktadır. Direkt T hücre cevabı ile sitolize de neden olmaktadır. Son olarak mitokondriyal disfonksiyonda hasara neden olan mekanizma olarak tanımlanmaktadır ve bu yolla oluşan hasar 3 şekilde gerçekleşmektedir. Yağ asitlerinin beta oksidasyonunun inhibisyonu, solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu veya doğrudan mitokondriyal DNA’nın etkilenmesidir. Serbest yağ asitleri metabolize olamayıp, laktat ve reaktif oksijen radikallerinin birikimine yol açmaktadır. Bu radikaller mitokondriyal DNA’yı zedelemektedir. Bu 3 olay sonucunda

hücrede aerobik metabolizmada sıkıntı başlamakta ve anaerobik metabolizma ile laktik asidoz ve trigliserid birikimi olmaktadır. Sonuçta hücre içi yağlanması gerçekleşmektedir (Jaeschke vd., 2002; Kaplowitz, 2004).

Çizelge 3.4. Toksik hepatit mekanizması (Arıcı, 2008)



3.12. Silimarin

Süt devedikeni (Aile: Asteraceae / Compositae) olarak bilinen *Silybum marianum*, karaciğer hastalıklarının tedavisinde araştırılan en eski bitkilerden biridir (Pradhan ve Girish, 2006). 2 metre yüksekliğe kadar uzayabilen yıllık veya iki yıllık bir bitkidir. Karakteristik beyaz lekeleri olan dalgalı, dikenli, kenarlı, geniş ve parlak yaprakları vardır. Kök ve dalların dibinde, çiçek yapraklarına sarılı tübüler mor çiçekler ile oluşan, 4 ile 8 cm çapında bir bitkidir. En dıştakiler güçlü bir omurga ile bitmektedir. Meyve, renksiz, gri lekeli, kahverengi-siyah renkli, parlak ve çizgisizdir. Meyveleri, büyüklüğü ve şekli nedeniyle tohumlarla karıştırılabilmektedir. Yapraklar, bitkinin adını aldığı sütlü damarlarla karakterizedir (Luper, 1998). Süt devedikeni özleri, ilk olarak 4. yüzyılın

başlarında Theophrastus tarafından şifalı bitki olduğu belirtilmiştir (Schuppan vd., 1999). Bitki, Akdeniz'e özgü olup Avrupa ve Kuzey Amerika'da da yetişmektedir (Pepping, 1999).

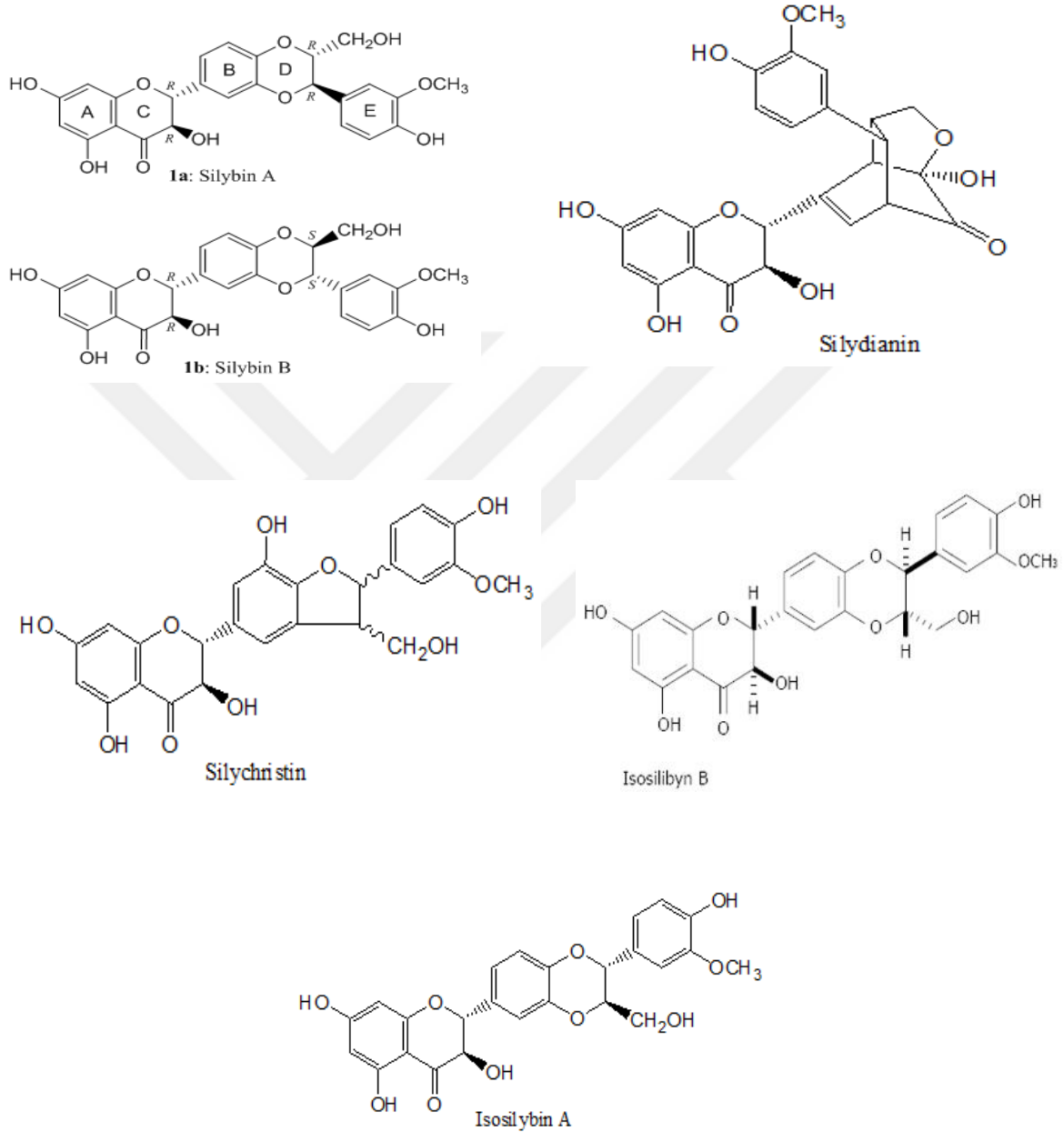


Şekil 3.11. *Silybum marianum* (Anonim, 2018)

Silimarin (Sm), $C_{25}H_{22}O_{10}$ ile şekil l'de gösterildiği gibi, dört flavonolignan izomerlerin, yani silibin, isosilibin, silidiyanin ve silisistin kompleks bir karışımıdır. İzomerler arasında silibin en büyük ve en aktif bileşen olup yüzde 60-70'i temsil etmekte bunu silychristin (%20), silydianin (%10) ve izosilin (%5) izlemektedir. Tohumlar ayrıca betain, trimetilglisin ve esansiyel yağ asitleri içermektedir (Saller vd., 2001).

Silimarin zayıf çözünürlüğü nedeniyle (%2-3) kapsülleme, şeker kaplı tabletler, kendi kendine mikroemülsifiye edici ilaç verme sistemi (SMEDDS) veya beta siklodekstrin inklüzyon kompleksi şeklinde uygulanmaktadır. Sm verilen dozunun yaklaşık %20-40'ı, insanlarda sülfatlar ve glukuronid konjugatlar olarak safraya atılmaktadır. Plazmadaki pik konsantrasyonu 6 ila 8 saat içinde elde edilmektedir (Dixit vd., 2007). Farmakokinetik çalışmalar silimarinin oral yoldan emildiğini ve beslenme yoluna (karaciğer, mide, bağırsak, pankreas) dağıldığını göstermektedir. Esas olarak safrada metabolit olarak salgılanmakta ve enterohepatik dolaşıma maruz kalmaktadır (Fraschini vd., 2002). İntravenöz infüzyon sonrası Sm'nin akut toksisite çalışmaları fareler, sıçanlar,

tavşan ve köpek üzerinde gerçekleştirilmiştir. LD₅₀ değerleri fareler için 400mg/kg, sıçanlar için 385mg/kg, tavşanlar ve köpekler için 140mg/kg olarak hesaplanmıştır. Ancak bu değerler infüzyon hızına bağlı olarak değişebilmektedir (Lecomte, 1975).



Şekil 3.12. Silimaritin bileşenleri (Ghosh vd., 2010)

3.12.1. Silimaritin Antioksidan özellikleri

Silimaritin, antioksidan (AO) ve serbest radikal süpürücüdür. Serbest radikal hasarı mekanizması, hücre membranını iki tabakasında çoklu doymamış yağ asidinin ROS ile

indüklenmiş peroksidasyonunu içermektedir. Bu da lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonuna neden olarak hücrel membrana zarar vermekte ve membran lipidlerinin ve proteinlerinin daha fazla oksidasyonuna neden olmaktadır. Daha sonra DNA, RNA ve diğer hücrel bileşenler de dahil olmak üzere hücre içeriği hasarlanmaktadır (Wiseman, 1995).

3.12.2. Silimarinin lipid peroksidasyonuna karşı aktivitesi

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin, lipitlerdeki doymamış yağ asitleri ile etkileşimi sonucu ortaya çıkmakta ve sonuç olarak hücre zarlarının dejenerasyonu ile sonuçlanmaktadır. Sm, lipid peroksidasyonunu indükleyen serbest radikallerin bir toplayıcısıdır. Glutasyon, süperoksit dismutaz ve ilişkili enzim sistemlerini de etkilediği için antioksidan olarak işlev görmektedir (Lettéron vd., 1990; Mira vd., 1994). Sm'nin güçlü antioksidan ve doku rejeneratif özellikleri nedeniyle hepato-, nöro-, nefro- ve kardiy koruyucu bir bileşen olarak bilinmektedir (Carducci vd., 1996).

3.12.3. Silimarin tarafından karaciğer yenilenmesinin uyarılması

Silimarinin karaciğer dokusu rejenerasyonundaki mekanizmalarından biri de hasar görmüş karaciğerde protein sentezindeki artıştır. İn vivo olarak karaciğerin bir kısmının çıkarıldığı sıçanlarda yapılan deneylerde silibinin ribozomların oluşumunda, DNA sentezinde ve protein sentezinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Magliulo vd., 1973). İlginçtir ki protein sentezindeki artış, sadece hasarlanmış karaciğerlerde değil sağlıklı kontrollerde de silibinin tarafından indüklenmiştir. Silibininin karaciğerde protein sentezini nasıl stimüle ettiği ile ilgili mekanizma tanımlanamamıştır ancak bunun RNA polimeraz I'in fizyolojik regülasyonu sonucu ribozomların oluşumunu stimüle etmesi ile olabileceği düşünülmektedir (Sonnenbichler ve Zetl, 1986).

3.12.4. Silimarinin anti-inflamatuvar ve anti-kanserojenik özellikleri

Silimarinin anti-inflamatuvar ve anti-kanserojenik etkilerinin mekanizmaları henüz net bir şekilde bilinmemekle birlikte inflamatuvar süreçte yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen NF-kB transkripsiyon faktörünün inhibisyonu ile ilişkili

olabilmektedir (Saliou vd., 1998; Mana vd., 1999). Çalışmalar Sm'nin nötrofil göçü ve Kupffer hücrelerinin inhibisyonu, lökotrin sentezinin inhibisyonu ve prostaglandinlerin oluşumu gibi çeşitli etkileri tetiklediğini göstermektedir (Fraschini vd., 2002). Sm tarafından kanserojen ajanlara karşı sağlanan koruma çeşitli deney hayvan modellerinde incelenmiştir. UVB radyasyonu ile üretilen melanom dışı cilt kanserine sahip çıplak farelerde bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. Çalışılan tüm aşamalarda farklı dozlarda cilde uygulanan Sm hayvan başına kanser insidansını, tümör sayısını ve tümör hacmini önemli ölçüde azaltmıştır. Başka bir modelde ise Sm uygulaması apoptozu, cilt ödemi, katalaz aktivitesini ve COX ve ornitin dekarboksilaz aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır.

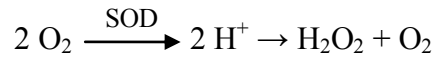
3.12.5. Silimarin antifibrotik etkileri

Karaciğer, etanol veya CCL₄ uzun süre maruz kaldığında stellat hücrelerinde kollajen liflerinin birikmesinden dolayı stellat hücreleri miyofibroblastlara dönüşmektedir. Son zamanlarda silibinin, stellat hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşümü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, 100 µmol/L'lik bir konsantrasyonda silibininin, sıçanların taze karaciğerinden izole edilen stellat hücrelerinin proliferasyonunu yaklaşık %75 oranında azalttığını, bu hücrelerin miyofibroblastlara dönüştürülmesini azalttığını ve azalan hücre dışı matris bileşenlerinin gen ekspresyonunu aşağı regüle ettiğini göstermiştir (Fuchs vd., 1997).

3.12.6. Vücudun antioksidan sistemleri

Evrin sırasında, canlı organizmalar reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) ile başa çıkmak için spesifik antioksidan koruyucu mekanizmalar geliştirmiştir (Nakhat vd., 2007). Genel olarak "antioksidan sistemler" terimi, hücrelerin serbest radikallerin etkilerinden korunmasından sorumlu olan bu mekanizmaları açıklamaktadır. Koruyucu antioksidan bileşikler organellerde, hücre altı bölümlerinde veya genellikle de hücrel korumanın meydana gelmesini sağlayan hücre dışı alanda bulunmaktadır. Böylece canlı hücrenin antioksidan sistemleri üç ana savunma düzeyini içermektedir (Abrol vd., 2005).

Birinci savunma düzeyi, serbest savunma, serbest radikallerin ön maddelerini çıkararak veya katalizörleri inaktive ederek serbest radikal oluşumunun önlenmesinden sorumludur ve üç AO enzimden, yani süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalazdan (CAT), oluşmaktadır. Süperoksit radikali (O_2^-), hücredeki fizyolojik şartlarda üretilen ana serbest radikal olduğu için, SOD hücredeki ilk AOsavunma seviyesinin ana unsuru olarak kabul edilmekte ve bu enzim aşağıdaki reaksiyonla süperoksit radikalini değiştirmektedir (Yan-yu vd., 2006):



Geçiş metali iyonları ayrıca lipid hidroperoksitlerin aldehitler, alkoksil radikalleri ve peroksil radikalleri gibi sitotoksik ürünlere ayrışmasını hızlandırmaktadır. Bu nedenle, metal bağlayıcı proteinler (transferrin, laktoferrin, haptoglobin, hemopeksin, metalotiyonein, seruloplazmin, ferritin, albümin, miyoglobin, vb) de ilk savunma düzeyine ait kabul edilmektedir. Ne yazık ki, hücredeki antioksidan savunmanın birinci seviyesi serbest radikal oluşumunu tamamen önlemek için yeterli olmadığından bazı radikaller bu seviyeden kaçarak lipid peroksidasyonunu başlatmakta ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile DNA ve proteinlere zarar vermektedir. Bu nedenle, ikinci savunma düzeyi zincir kırıcı antioksidanlardan (E vitamini, ubiquinol, karotenoidler, A vitamini, askorbik asit, ürik asit ve diğer bazı antioksidanlar) oluşmaktadır. Glutatyon (GSH) ve tiyoredoksin sistemlerinin de AO savunmanın ikinci seviyesinde önemli bir rolü vardır. Zincir kırıcı AO'lar, çoğalma reaksiyonunun zincir uzunluğunu mümkün olduğunca küçük tutarak peroksidasyonu engellemektedir. Bu nedenle, zincir reaksiyonundaki peroksil radikal ara maddelerini süpürerek lipid peroksidasyonunun yayılma aşamasını önlemektedir (Arcari vd., 1992).

Bununla birlikte hücredeki ikinci AO savunma seviyesi bile lipid ve protein oksidasyonunu önleyememekte, bazı biyolojik moleküller zarar görmektedir. Bu durumda, üçüncü savunma düzeyi hasarlı molekülleri ortadan kaldıran veya onaran sistemlere

dayanmaktadır. Bu AO savunma seviyesi lipolitik (lipazlar), proteolitik (peptidazlar veya proteazlar) ve diğer enzimleri (DNA onarım enzimleri, ligazlar, nükleazlar, polimerazlar, proteinazlar, fosfolipazlar, çeşitli transferazlar, vs.) içermektedir. Tüm bu sistemler vücuda entegre şekilde birbirleriyle bağlantılı çalışmaktadır. Hücredeki AO'lar arasındaki kooperatif etkileşimler, serbest radikallerin ve toksik ürünlerin metabolizmalarının zararlı etkilerinden maksimum koruma için hayati öneme sahiptir (Yan-yu vd., 2006).

Bu nedenle, AO savunmaları birkaç seçenek içerir (Qiu vd., 2005):

- Lokalize olmuş oksijen konsantrasyonunu azaltmak,
- Pro-oksidan enzimlerin aktivitesini ve süperoksit üretimine yol açan elektron sızıntısını azaltmak ve mitokondrideki elektron zincirinin etkinliğini arttırmak,
- Çeşitli transkripsiyon faktörlerini (örn., Nrf2 ve NF-κB) ve AO ile ilişkili enzimlerinin sentezini (SOD, GSH-Px, CAT, glutatyon redüktaz (GR), GST) indükleyerek başlangıç radikallerini temizlemek,
- Vita-gen aktivasyonunu, sentezini ve koruyucu moleküllerin ifadesini arttırmak (GSH, Thioredoxins, ısı şoku proteinleri (HSP), sirtuinler, vb.),
- Bağlayıcı metal iyonları (metal bağlayıcı proteinler) ve metal şelatlama,
- Peroksitlerin radikal olmayan, toksik olmayan ürünlere (Se-GSH-Px) dönüştürülerek ayrıştırılması,
- Peroksil ve alkoksil radikalleri (E, C, GSH, ürik asit, ubikuinol, bilirubin vb.) gibi ara radikalleri temizleyerek zincir kırma,
- Hasarlı moleküllerin (metiyonin sülfoksit redüktaz (MSR), DNA-onarım enzimleri, şaperonlar vb.) onarımı ve çıkarılması.

3.12.7. Silimarinin antioksidan özellikleri

Silimarinin AO savunmaya farklı şekillerde katkıda bulunabileceği unutulmamalıdır. Birincisi doğrudan serbest radikal süpürücü olarak, ikincisi serbest radikal üretiminden sorumlu belirli enzimleri inhibe etmekte veya stres koşullarında mitokondrinin elektron taşıma zincirinin bütünlüğünü korumasıyla serbest radikal oluşumunu önleyerek ya da üçüncü olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları aktive ederek hücrenin optimal redoks durumunun sürdürülmesini sağlamakta ve son

olarak da ısı şoku proteinleri (HSP), tiyoredoksin (Trx) ve sirtuin'ler dahil olmak üzere koruyucu moleküllerin sentezinden sorumlu ve stres koşullarında ek koruma sağlayan vitaminleri aktive etmektedir (Suari, 2015)

3.12.7.1. Direkt serbest radikal süpürme

Silibininin insan trombositleri, beyaz kan ve endotel hücreleri tarafından ROS ve eikosanoitlerin oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiştir (Garg ve Gupta, 2009). Silibinin, insan granülositleri tarafından üretilen O_2^- ($IC_{50} > 200 \mu M$) için değil ancak güçlü bir HOCl ($IC_{50} = 7 \mu M$) temizleyici olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde izole sıçan Kupffer hücrelerinde O_2^- ve NO'nun üretimi, doza bağımlı şekilde, $80 \mu M$ (IC_{50}) (Dehmlow vd., 1996) silibinin tarafından inhibe edilmiştir (Varga vd., 2006). Silibinin ($2.5 \mu M$) Ab1-42 stresli nöronlarda H_2O_2 konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmış ve oksidatif ilişkili yaralanmaları önlemiştir (Yin vd., 2011). Dahası, silibinin ($10 \mu M$ ve üzeri), bir model sistemde DNA hasarını iyileştirmede koruyucu aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Fu vd., 2009). Silibinin ile in vitro tedavide, spontan O_2^- ve H_2O_2 salınımını ve pre-eklamptik kadınlardan alınan monositler ile TNF-a üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği rapor edilmiştir. Silibinin ana etkisi $50 \mu M$ konsantrasyonda elde edilmiştir (Cristofalo vd., 2013).

Çeşitli model sistemlerde Sm'nin AO etkisi gösterilmiştir. Örneğin, H_2O_2 için IC_{50} $38 \mu M$ iken, NO için IC_{50} $266 \mu M$ idi (Domitrović vd., 2013). Sm'nin linoleik asit emülsiyonunun %82,7 lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir; bütülenmiş hidroksianisol (BHA), bütülenmiş hidroksitoluyen (BHT), alfa-tokoferol ve trolox, aynı konsantrasyonda linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu üzerine sırasıyla 83,3, 82,1, 68,1 ve 81,3'lük inhibisyon göstermiştir (Köksal vd., 2009). Başka bir in vitro çalışmada, Sm'nin ($> 200 \mu M$) serbest radikal süpürücü aktivitesi ve AO özellikleri dört farklı deneyle gösterilmiştir (Asghar vd., 2008). Sm'nin saf münferit bileşiklerinin serbest radikal süpürücü aktivitesinin önemli ölçüde değiştiği belirtilmelidir.

Sonuç olarak, Sm hem hücre içindeki trafğini değiştirmektedir (Crocenzi vd., 1992; Blaising vd., 2013) hem de hücrenin enerji durumunu etkilemektedir (Colturato vd., 2012). Ayrıca, Sm'nin in vitro olarak tarif edilen etkilerinin çoğu, şu anda insanlar veya hayvanlarda elde edilemeyen konsantrasyonlarda meydana gelmektedir. Bu nedenle,

biyolojik sistemlerde silibinin tarafından doğrudan temizlenen bir ROS'un antioksidan korumaya önemli ölçüde katkıda bulunma olasılığı yoktur.

3.12.8. Çeşitli kimyasalların toksisitesinin önlenmesinde silimarinin antioksidan etkileri

Karaciğer, gıda zehirleyici ve ilaçların biyotransformasyonunda rol oynayan birincil bir organdır. Bağırsak bölgesinden emilen toksinler ilk önce karaciğere giderek çeşitli karaciğer rahatsızlıklarına neden olmaktadır. Hepatik bozukluklar temel olarak toksik kimyasallar (alkol, karbon tetraklorür, klorlu hidrokarbonlar, tiyoasetamid), ksenobiyotikler, antikanser ilaçlar (doksorubisin, sisplatin), immünosupresan ilaçlar (siklosporin), analjezik ve anti-inflamatuar ilaçlar (parasetamol), anti-tüberküloz (izoniazid, rifampisin) ilaçlar, radyasyon (gama radyasyonları), ağır metaller (kadmiyum, arsenik), mikotoksinler (aflatoksin, T-2 toksin, fumonisinler, okratoksinler), galaktozamin ve lipopolisakkarit nedenli olabilmektedir (Ingawale vd., 2014). Oksidatif stresin hepatotoksitenin anahtar mekanizması olduğunu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, yukarıda belirtilen toksik maddeler, Sm'nin antioksidan koruyucu özelliklerini değerlendirmek için çeşitli deney modellerinde kullanılmaktadır.

3.12.8.1. Tiyoasetamid

Tiyoasetamid (TAA) ilk kez Fitzhugh ve Nelson tarafından karışık işlevli oksidazlar tarafından metabolik aktivasyon gerektiren güçlü bir hepatotoksin olarak tanımlanmıştır. TAA uygulaması sıçanlarda karaciğer fibrozunun ve sirozunun tetiklenmesi için rutin olarak kullanılmaktadır. Oksidatif stresin büyük ölçüde mikrozomal flavin-adenin-dinükleotid (FAD) içeren flavin monooksijenaz (FMO) tarafından biyotransformasyonu boyunca oluşan toksik metabolik tiyoasetamid-S-oksit'in oluşumu nedeniyle TAA indüklü karaciğer fibrozunda ana katılımcı faktör olduğu düşünülmektedir (Mustafa vd., 2013). Tiyoasetamid-S-oksit'in çekirdekten sitoplazmaya RNA'nın taşınmasına engel olduğu bilinmekte ve ayrıca tiyoasetamid-S-oksit membran hasarına neden olmaktadır.

TAA ile indüklenen toksisitenin gelişmesinde, serbest radikallerin kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Mustafa vd., 2013). Artan serbest radikal miktarı ile karaciğerde LPO (lipid peroksidasyonu) süreci başlamaktadır. TAA nedenli ROS üretimini lipid peroksidasyonu, glutatyon eksilmesi ve SH-tiyol gruplarında azalma takip edmektedir (Fazal vd., 2014). Ayrıca TAA'nın mitokondriyal enerji metabolizmasını etkilediğine dair in vivo çalışmalar bulunmaktadır (Kadir vd., 2014). Bununla birlikte, hücre enerji metabolizmasında TAA'nın etkisi ve kesin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Singh vd., yaptıkları çalışmada, TAA'nın albümin ve üre sentezini azalttığını göstermiştir (Singh vd., 2012). Bu sonuçlar, TAA uygulamasının protein sentezini azalttığı ve üre döngüsü enzimlerini inhibe ettiği bulgusuyla uyumaktadır (Ali vd., 2014).

Sm'nin sıçanlarda TAA'nın neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Erkek Sprague Dawley sıçanlarda 12 haftalık boyunca içme suyunda TAA uygulaması (ağırlık/hacim olarak % 0.03) sonucu karaciğer hasarı oluşturulmuştur. Sm'nin (50 mg/kg), TAA ile karaciğer hasarı indüklenen sıçanlarda hepatik AO enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Kadir vd., 2014). Gerçekten de, TAA ile indüklenen karaciğer hasarlı sıçanlarda serum ALT, AST, ALP ve MDA'da önemli bir artış gözlemlendiği ve Sm'nin AO sistemini uyararak lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Singh vd., 2012). Ayrıca, Sm uygulamasına yanıt olarak GSH tükenmesi ve ırsı şoku protein-47 gen ifadeleri de azalmıştır.

3.12.8.2. Diğer Toksikantlar

Silimarinin benzer dozlarının vücudun AO sistemleri üzerindeki koruyucu etkileri de pirogallol toksisitesinde (Gupta vd., 2002; Upadhyay vd., 2010), bleomiksin enjekte edilmiş farelerde (Razavi-Azarkhiavi vd., 2014), akrolein toksisitesinde (Taghiabadi vd., 2012), sıçan karaciğerinde dietilnitrozamin kaynaklı oksidatif streste (Pradeep vd., 2007), sodyum florid (Nabavi vd., 2012) ve sodyum nitrit (Sherif vd., 2013) toksisitesinde gösterilmiştir.

Gerçekten de, in vivo ve in vitro çalışmalarda Sm/silibinin CCL₄, çeşitli mikotoksinler, TAA, sisplatin, Mn, benzo[a]piren, doksorubisin, etanol ve bazı diğer toksik maddelerin oksidatif toksisitelerini önemli derecede azaltmıştır. Sm, hücrelerde ROS'u,

sinyal transdüksiyonunu ve gen ekspresyonunu geri kazandırmaktadır. Sm ve silibinin'in serbest radikal süpürücü ve antioksidan özellikleri aşağıdakiler tarafından gösterilmiştir: (a) stresli hayvanların karaciğer ve diğer dokularında endojen AO enzimlerinin (SOD, CAT, GSH-Px, GR ve GST) ve enzimatik olmayan antioksidanların (E ve C vitaminleri) restorasyonu; (b) karaciğer ve diğer dokularda artmış GSH hücre içi konsantrasyonu; (c) azalan lipid ve protein oksidasyonu; (d) DNA fragmantasyonu / hasarı ve apoptoz; (e) ROS'un neden olduğu karaciğer yaralanmaları nedeniyle karaciğerden plazmaya ALT, AST, ALP'nin azalmış sekresyonu; (f) onarılmış Nrf2 ve HO-1 aktiviteleri; (g) tümör nekroz faktörü dâhil olmak üzere NF- κ B ekspresyonunu ve pro-inflamatuar sitokin konsantrasyonunu Toksik travmadan önce veya hemen sonra SM kullanımının kronik karaciğer hastalığından daha koruyucu olduğu düşünülmektedir (Mateen vd., 2013). İn vitro ve in vivo çalışmaların bir kısmı, Sm ve silibininin çeşitli modellerde anti-kanser koruyucu olduğunu göstermektedir (Féher ve Lengyel, 2012; Das vd., 2012; Mateen vd., 2013; Deep vd., 2013).

3.12.9. Oksidatif stres ve transkripsiyon faktörleri

Oksidasyon redüksiyon (redoks) temelli gen ifadesinin düzenlenmesi, hücre biyolojisinde temel bir düzenleyici mekanizma gibi görünmektedir. Gerçekten de, vücuttaki ROS seviyesinin, antioksidan sistemler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edildiği ve aşırı miktarda serbest radikal üretimi ve şiddetli oksidatif stresin, sıklıkla yaygın oksidatif hasara ve hücre ölümüne yol açtığı iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, hücre sağkalımı için bazal bir oksidatif stres seviyesi gereklidir. Aslında, çeşitli stresörlerin yol açtığı orta derecede bir oksidatif stres, adaptif yanıtlar oluşturabilmekte ve stresli zorluklara uyum sağlama yeteneğini geliştirebilmektedir (Yan vd., 2012). Nitekim hayvanlarda redoks-sinyalleşme yolları büyüme, farklılaşma, çoğalma ve apoptoz dâhil çeşitli fonksiyonları düzenlemede farklı kaynaklardan çekirdeğe gelen sinyalleri aktarmada ROS'u kullanmaktadır. Çeşitli transkripsiyon faktörleri antioksidan savunma sisteminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Ma ve He, 2012; Majzunova vd., 2013; Song ve Zou, 2014; Kweider vd., 2014). Bu yollar koordineli bir şekilde çalışırlar ve birçoğu oksidatif stres hasarlarıyla başa çıkabilmeleride kritik öneme sahiptir. Bunlar: Keap1/Nrf2, NF- κ B, Mapk ve AP-1'dir (Lushchak, 2011).

3.12.10. Sm'nin pro-oksidan özellikleri

Keap1 sistein tiyollerinin oksidasyonunun bazı polifenollerin aracılık ettiği gösterilmiştir. Flavonoidler arasında, oksidatif stres ve redoks döngüsünün üretilmesi için içsel potansiyellerinin daha yüksek olması, ARE aracılı gen ekspresyonunun indükleyicileri olarak güçlü olma potansiyellerinin daha fazla olduğu ilginç bir gerçektir (Lee-Hilz vd., 2006). Düşük polifenol konsantrasyonlarının H₂O₂ üretebildiği ve Nrf2 sinyalini aktive ettiği, oksidatif strese hücre adaptasyonunu indüklediği hipotezi öne sürülmüştür (Erlank vd., 2011). Dolayısıyla, polifenoller, terapötik maddeler olarak işlev görmek yerine önleyici bir doğada bulunabilen besinsel "ilaçlar" olarak hareket ederler. Bu nedenle, çeşitli AO moleküllerini indüklemek için antioksidan polifenoller tarafından Nrf2-ARE sinyallemesinin aktivasyonu muhtemelen prooksidant aktivitelerine atfedilebilir (Surh, 2008). Silybin için de aynı şekilde uygulanabilir. Aslında, saf silybin kararsız iken, Sm'deki silybin pH 1,0 ila 7,8 arası tamponlarda stabildir. Silybin metabolizması, plazma, bağırsak sıvısı ve karaciğer homojenatları gibi bir dizi biyolojik sıvıda test edildiği gibi, Sm'deki silybin ile karşılaştırıldığında saf formunda daha şiddetliydi. Sm'deki bileşenlerin ana bileşeni silybin üzerinde bir stabilizasyon etkisine sahip olduğu görülecektir (Tang vd., 2009). Bu nedenle, hücre kültürleri ile yapılan bazı deneylerde silibinin oksitlenebilir ve etkileri, silybin oksidasyonu sırasında üretilen flavonoid veya ROS'un oksitlenmiş formunun bir yansıması olabilir (Zatloukalová vd., 2011). Benzer şekilde, silibinin daha sonraki reaktif oksijen türleri jenerasyonu ile demir-katalize oksidasyon yoluyla pro-oksidan etkilere neden olabilir (Gharagozloo vd., 2008). Silibininin güçlü bir pro-oksidatif ajan olduğu gösterilmiştir, yani, NADH'yi in vitro olarak peroksidaz ve H₂O₂ varlığında oksitleyebilmiştir (Fan vd., 2012). Bu pro-oksidatif etki, serbest radikal türevleri ve müteakip NADH oksidasyonu üretiminden kaynaklanır (Awad vd., 2002). Sm (50, 100 veya 200 uM) ile 24 saat tedavi, hücrel redoks durumunu etkiledi ve HepG2 hücrelerinde ROS üretiminde doza bağlı bir artışa neden oldu. Ayrıca, HepG2 hücrelerinde hücre içi GSH seviyesinde doza bağlı bir azalma ve azalmış toplam AO potansiyeli vardı (Zhang vd., 2013). Silibinin, insan meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231'de hücre ölümüne neden olduğu ve silibinin etkisi ROS üretimine bağlı olduğunu gösteren antioksidanlar tarafından hafifletildi (Kim vd., 2014). Benzer şekilde, HT29 hücrelerinin silibinin ile tedavisi hücre içi ROS düzeyini arttırmıştır (Woo vd., 2014). Stresörsüz 100 mg/kg Sm'nin hayvanlarda pro-oksidan etki gösterebileceği öne sürülmüştür. Aslında,

CCL₄ ve Sm (100 mg/kg) ile tedavi edilen gruplarda NO ve MDA seviyeleri artmış, düşük doz seviyelerinde ise Sm (25 ve 50 mg/kg) NO ve MDA içeriğini değiştirmemiştir. sıçan hipokampusunda. Toplam tiyol moleküllerinin konsantrasyonu SM50 grubunda artmış ve CCL₄ ve Sm100 gruplarında belirgin bir düşüş göstermiştir (Malekinejad vd., 2012). Yukarıda belirtilen sonuçlardan, silybinlerin Nrf2 aktivitesini oksidasyon azaltma potansiyeli ile etkileyebileceğini söyleyebiliriz.

3.12.11. In vivo çalışmalar

Silibinin'in (50 mg/kg), hücrel oksidoredüktaz aktivitelerinin ve NF-κB aktivasyonunun ve ROS üretiminin inhibisyonunun teşvik edilmesine bağlı olarak D-galaktozun neden olduğu yaşlanmaya karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2011) Sıçanların böbreğinde yapılan histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar, aynı zamanda, Silibinin'in (75 mg/kg), arseniğin (As) toksisitesini önemli ölçüde azalttığını ve böbrek dokusunun normal histolojik yapısını koruduğunu, kaspaz-3'ün aracılık ettiği tüp şeklindeki apoptozu inhibe ettiğini ve NADPH oksidaz, iNOS ve NF-κB'nin aşırı ekspresyonu (Prabu vd., 2012). Erkek sıçanlarda deneysel iskemik inme modelinde, silibinin (100 mg/kg), inme sonrası iskemik beyin dokusunda NF-κB'yi önemli derecede düşürmüştür (Wang vd., 2012). NASH modelinde, metionin-kolin eksikliği olan bir diyetle beslenen fareler, sürekli olarak, NF-κB, p65 ve p50 bağlanma aktivitesini artırırken, silibinin uygulaması (20 mg/kg i.p.), her iki alt ünitenin aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Salamone vd., 2012). CCL₄ tedavisinin farelerde NF-κB ekspresyonunu arttırdığı ve karaciğer fibrozunu indüklediği, Sm (200 mg/kg) ise CCL₄ ile indüklenen hepatik NF-κB'yi ve karaciğer fibrozunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Li vd., 2012). Serebral iskeminin sıçan modelinde silibininin (150 mg/kg oral) koruyucu etkisi, beyinde Bax, NF-κB proteini ve Bax, NF-κB mRNA'nın azalmış ifadesi ile ilişkiliydi (Liu vd., 2014). Sm'nin de NF-κB inhibe edici etkileri olduğu gösterilmiştir. Örneğin, NF-κB'nin mRNA ve protein ifadeleri, D-galaktozamin kaynaklı hepatotoksik sıçanlarda önemli ölçüde yukarı doğru düzenlenmiştir ve Sm (25 mg/kg) ile tedavi, bu genlerin ifadelerini önemli ölçüde aşağı regüle etmiştir (Aristatile vd., 2013). Dahası, serum TGF-β1, NF-κB ve IL-6 düzeylerinin sirozlu sıçan örneklerinde anlamlı derecede yükseldiği, Sm'nin (50 g/kg) ise yukarıda belirtilen değişiklikleri önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir (Salama vd., 2013). Sm (250 mg/kg) kobaylarda alkolik karaciğer fibrozunda NF-κB sinyalizasyon kaskadını

baskılamaktadır (Abhilash vd., 2014). Genel olarak Sm/silibinin, proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu inhibe etmek için NF- κ B dâhil olmak üzere çoklu sinyal yollarını hedefler. Birlikte bu bulgular Sm/silibinin'in çeşitli hücrelerde ve aynı zamanda in vivo çalışmalarda NF- κ B sinyalizasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin anti-inflamasyon etkinliğinin önemli bir mekanizması olabileceğini ve bu sinyal yolunu hedef aldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, silibinin klinik ve veterinerlik uygulamalarında potansiyel uygulamaları olabileceğini düşündürmektedir.

3.12.12. Bağırsakta Sm'nin koruyucu etkisi

Bağırsakların polifenollerin antioksidan etkisinin en önemli yeri olduğu düşünülmektedir (Surai vd., 2004). Gerçekten de, oksidatif hasarın azaltılması, kolonik floranın modülasyonu ve gen ekspresyonundaki varyasyon, polifenoller tarafından intestinal fonksiyonun modülasyonunda rol oynar. Örneğin, şarap polifenollerinin gen düzeyinde moleküler etkilerini incelemek için mikrodizi teknolojisi kullanıldı: sıçanlar 14 gün boyunca 50 mg/kg şarap polifenollerini ile muamele edildi. 5707 genin global ekspresyon analizi, metabolizma, transport, sinyal transdüksiyonu ve hücreler arası sinyalizasyon gibi geniş bir yelpazedeki fizyolojik fonksiyonlarda yer alan genlerin aşağı regülasyonunu ortaya koymuştur (Dolara vd., 2005). Polifenollerle tedavi edilen sıçanların kolon mukozasında iki ana düzenleyici yolun aşağı regüle edildiği gösterilmiştir: enflamatuvar yanıt ve steroid metabolizması. Flavonoidler genellikle diğer antioksidan bileşiklerden daha yüksek konsantrasyonlarda tüketildiklerinden, sindirim sırasında koruyucu etkileri büyük önem taşır. Örneğin, flavonoidlerin sadece peroksidize lipit birikimini engellemediği, aynı zamanda heme proteinlerinin proksidant özelliklerini antioksidan olanlara da dönüştürebileceği gösterilmiştir (Kanner vd., 2001). Diyet polifenollerini aynı zamanda, kemirgenlerin gastrointestinal sistemindeki in vivo oksidatif hasarı modüle edebilirler (Giovannelli vd., 2000), diyet polifenollerinin oksidatif hasara bağlı patolojilerde hem koruyucu hem de terapötik bir potansiyele sahip olabileceği hipotezini destekler. Aslında, bağırsağın çeşitli kısımlarındaki antioksidan-prooksidant dengesi (redoks durumu) sonuçta, antioksidanların emilim seviyesinin yanı sıra, diyet tarafından sağlanan ve hücreler tarafından salınan antioksidanlar ve pro-oksidanların seviyesine bağlıdır. ve pro-oksidanlar (Surai vd., 2004). Mide koşullarını taklit eden bir model sistemde, hem lipit peroksidasyonunun hem de vitamin E ve beta-karotenin birlikte

oksidasyonunun pH 3.0'da kırmızı şarap polifenolleri tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Gorelik vd., 2005). Bağırsakta, farklı antioksidanlar arasındaki bir etkileşim, maksimum sinerjik etkilerini ortaya çıkarabilir. Özellikle, yeşil çay polifenol, E vitamini ve C vitamini karışımının lipit peroksidasyonunu korumak için sinerjistik olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Dai vd., 2008). Kısmen oksitlenmiş gıdaların tüketilmesinin, midede lipit peroksidasyonunu ve sitotoksik lipit peroksidasyon ürünlerinin vücuda emilimini arttırabildiği bulunmuştur. Kırmızı şarap polifenollerinin yemeğe eklenmesi bu sonuçları değiştirebilir , bu nedenle kırmızı şarap polifenolleri MDA'nın emilimini inhibe eden yeni fonksiyonla yararlı bir etki gösterir (Gorelik vd., 2008). Bu bulgular gıdalarda / yemelerde bulunan oksitlenmiş yağların potansiyel zararlı etkilerini ve diyet polifenollerinin önemli faydalarını açıklamaktadır. Gerçekten de, polifenollerin gastrointestinal sistemdeki etki sahasının yerini saptamak, silibin de dahil olmak üzere flavonoidlerin in vivo olarak nasıl çalıştığını ve silybin ve diğer polifenollerin sağlığını geliştirici etki mekanizmalarını açıklığa kavuşturmaya yardımcı olabileceğini anlamamızda bir revizyona yol açabilir. (Kanner vd., 2012).

Bağırsak iltihabında redoks sinyali karmaşıktır ve iyi anlaşılmalıdır. Bununla birlikte, intestinal epitelyal redoks ortamın homeostatik kontrolünün besin sindirimi ve emilimi, kök hücre proliferasyonu, apikal enterosit apoptozisi ve bağışıklık yanıtı için merkezi olduğu genellikle kabul edilmektedir (Circu ve Aw, 2012). Gerçekten de, polifenoller bağırsak mukozası bütünlüğünde, inflamasyon ve geçirgenlikte bir rol oynayabilir (Martínez vd., 2013). Örneğin, şarap fenolikleri, hem serbest radikal toplayıcılar hem de hücrel redoks sinyallemede rol oynayan spesifik inflamasyonla ilişkili genlerin modülatörleri olarak işlev gören oksidatif stres ve inflamasyon ile karakterize edilen bağırsak hastalıklarının ilerlemesini önleyebilir veya geciktirebilir. Etkilerini, esas olarak oksidatif ve inflamatuvar uyarılara yanıt olarak aktive edilen hücre sinyal yollarını modüle ederek uygularlar ve Nrf2 ve NF-κB başlıca aşağı akım efektörleridir (Biasi vd., 2011). Örneğin, bir üzüm çekirdeği ve üzüm marc özütü verilen domuzlar, kontrol domuzlarına kıyasla duodenal mukozada (karaciğer ve plazmada değil) NF-κB ve Nrf2'nin daha düşük transaktivasyonuna ve bu transkripsiyon faktörlerinin çeşitli hedef genlerinin daha düşük bir ekspresyonuna sahipti. (Gessner vd., 2013). Ayrıca, villus yüksekliğinin oranı: kript derinliği ve kazanç: yem oranı, bir domuz özü ile beslenen hayvanlarda kontrol domuzlarından daha yüksekti. Farelerde, diyet üzüm çekirdeği ekstresi

proliferasyonu azalttı ve epitel hücrelerinin farklılaşmasını azalttı ve bağırsak epitelindeki değişiklikler NF- κ B sinyalinin bastırılması ile ilişkiliydi (Yang vd., 2014). Polifenolik bileşikler bağırsak bütünlüğünü de etkileyebilir. Örneğin, 21 gün boyunca içme suyuyla sıçanlara verilen üzüm çekirdeği ekstraktı (% 0.1), proksimal kolondaki bağırsak birleşme proteini okludin ekspresyonunu ve kontrol ile karşılaştırıldığında nötrofil protein kalprotektinin fekal seviyelerini azaltmıştır (Goodrich vd., 2014). Yakın zamanda, doğal olarak oluşan flavonoid prosiyanidin B2'nin, oksidatif stres ve ksenobiyotiklere karşı koruyan kolonik hücrelerde hücrel redoks durumunu ve antioksidan enzim savunma sistemini modüle edebildiği bildirilmiştir (Rodríguez-Ramiro vd., 2011).

Bazı antioksidanların tamamen emilmemesi için biyolojik bir neden olduğunu ve böylece bağırsağın alt kısımlarında antioksidan koruma sağladığını söylemek mümkündür (Surai vd., 2004). Çeşitli flavonoidlerin nispeten düşük biyoyararlanımı ve antioksidan potansiyeli, diğer antioksidanların seviyelerinin oldukça düşük olduğu kalın bağırsak dahil olmak üzere, sindirim yolunun çeşitli kısımlarında antioksidan koruma sağlayan insanlar / hayvanlar için yararlı olabilir. Aynısı Sm için de geçerlidir. Örneğin, bağırsaktaki silibinin konsantrasyonu, doğrudan antioksidan aktivitesine olan ihtiyacı aşan bir konsantrasyon olan 800 μ M'ye (Köck vd., 2013) ulaşabilir. Gerçekten de Sm'nin doğrudan antioksidan etkilerinin in vivo olup olmadığı belirsizdir, ancak bu etkilerin gastrointestinal sistemde, SM'nin emilim ve metabolizmaya uğramadan hücrelerle doğrudan temasa geçebileceği gibi, bu etkilere karşı koyabilmesi mümkün olabilir (Surai vd., 2004). Sm'nin gastroprotektif etkilerinin gastrik mukozal NO ve protein olmayan sülfhidril gruplarının korunması ve kapsaisin duyarlı gastrik duyu aferentlerinin modülasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Shin vd., 2011). SM'nin bir murin kolit modelinde yararlı etkileri açıklanmıştır (Esmaily vd., 2009). Sm, kolonik dokudaki toplam antioksidan kapasitesinin yanı sıra kolonik hasarı, lipid peroksidasyonunu, nötrofil infiltrasyonunu ve inflamatuvar sitokinlerin içeriğini etkili bir şekilde azaltmıştır. Trinitrobenzen sülfonik asit ile indüklenen kolit modelinde silibinin tedavisi NF- κ B aktivitesi, IL-1 β , TNFa, TBARS, protein karbonil, miyeloperoksidaz aktivitesi ve kolonun antioksidan kapasitesindeki bir iyileşme gibi inflamatuvar kolitin birkaç bileşenini önemli ölçüde azaltmıştır. doku [280]. Ayrıca, silibinin (50 mg/kg) bağırsak mikrobiyal enzimleri, kolonik oksidatif stresi ve Wnt-a/katenin sinyalini modüle ederek deneysel sıçanlarda 1,2-di-metilhidrazin ile

indüklenen kolon karsinogenezine karşı antiproliferatif etki meydana getirir (Sangeetha vd., 2012).

Polifenollerin, alt bağırsakta antioksidan koruma sağladıkları ve kolonik florayı değiştirebildikleri de iyi bilinmektedir. Silybin dahil polifenoller, bağırsak bakterileri tarafından konakçı fizyolojiyi değiştirebilen simbiyotik ortakların işlevsel ekolojisini etkileyen kompleks bir dizi son ürüne kadar geniş ölçüde metabolize edilirler (Moco vd., 2011). Yüksek diyet polifenol içeriğine sahip bitki besinleri açısından zengin bir diyetin tüketilmesinin, konakçının gastrointestinal sağlığını, mikrobiyota modülasyonu yoluyla arttırabileceği öne sürülmüştür. Gerçekten de, üzüm antioksidan diyet lifi alımı, Lactobacillus'un çoğalmasını uyarır ve sıçanların çekumunda Bifidobacterium türlerinin bileşimini hafifçe etkiler (Pozuelo vd., 2012). Diyet polifenollerinin bağırsak mikrobiyal dengesini modifiye edebilme kabiliyetine sahip olabileceği, ancak bu etkinin dolaylı olduğu, yani orijinal bitki bileşikleri yerine biyotransformasyon ürünleri tarafından aracılık ettiği görülmektedir (Parkar vd., 2013). Polifenol-mikrobiyota etkileşimlerinin karmaşık olduğu ve farklı polifenol-metabolize edici fenotipler veya metabotipler'e neden olan büyük bireysel-birey değişkenliğine tabi olduğu belirtilmelidir (Bolca vd., 2013).

Ne yazık ki, Sm'nin bağırsak mikrobiyota üzerindeki etkisi konusunda herhangi bir veri yoktur, fakat yukarıda açıklanan diğer flavonoidler için de aynı değişikliklerin meydana gelebileceğini söyleyebiliriz. Bu nedenle, oksidatif hasarın azalması, inflamasyonun azaltılması, kolonik floranın modülasyonu ve gen ekspresyonundaki varyasyonun Sm dâhil polifenoller tarafından bağırsak fonksiyonunun modülasyonunda rol oynaması muhtemeldir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

Tiyoasetamid (TAA) ve silimarin (Sm) ticari olarak temin edilmiştir. Bu maddelerden, TAA'nın 50 mg'ı %0,9 NaCl'de çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirilmiştir (Singh ve Trigun, 2014). TAA ve Sm enjeksiyonları çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra steril tek kullanımlık enjektörler ile TAA intraperitoneal (i.p.), Sm ise oral olarak uygulanmıştır. Sm'nin 50 ve 100 mg/kg dozu % 0,2 DMSO'da eritilerek çözelti hazırlanmıştır. Kilo kaybını, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğini en aza indirmek için deney süresince içme suyu yoluyla %0,45 NaCl içeren %5 dekstroz ve 20 meq/L KCl verilmiştir.

Bütün hayvanların ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptanmış ve böylece uygulanacak ilaç dozları belirlenmiştir. Silimarin uygulamasına TAA enjeksiyonundan 14 gün önce başlanmış ve akabinde TAA 14 gün verilmiştir. Son enjeksiyondan bir gün sonra hayvanlar anestezi edilerek kan, karaciğer ve beyinleri alınmıştır (Ayhanci vd., 2009).

4.2. Deney Hayvanları

Deneyisel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 200±20 gram ağırlıkta, yaklaşık 3 aylık, Sprague Dawley cinsi, albino sıçanlar kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi DeneySEL Araştırma Merkezi (TİCAM)'dan temin edilerek 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 (Watanabe vd., 2001). Deney süresince tüm sıçanlar paslanmaz çelik kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir.

4.3. Deney Grupları

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=7' şer sıçan olmak üzere toplam 4 grup oluşturulmuştur. Bunlar;

Grup 1: Kontrol: Her hayvana ilk 14 boyunca gavaj yoluyla Sm'nin çözücüsü olan 0,5 mL %0,2 DMSO verilecektir ve akabinde ikinci 14 gün boyunca da i.p olarak TAA'nın çözücüsü olan 0,5 mL %0,9 SF enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup 2: Her hayvana ikinci 14 gün boyunca 50mg/kg TAA enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup 3: Her hayvana ilk 14 gün boyunca 50mg/kg Sm ve ikinci 14 gün boyunca da 50mg/kg TAA enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup 4: Her hayvana ilk 14 gün boyunca 100mg/kg Sm ve ikinci 14 gün boyunca da 50mg/kg TAA enjeksiyonu yapılmıştır.

4.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ketamin/Ksilazin ile uyutulmuş hayvanlardan intrakardiyak kan alımı yapıldıktan sonra karaciğer, beyin ve beyincik dokuları çıkarılmıştır. Alınan kan örnekleri 10 dakika 3000 rpm'de santrifüjlenerek serumlar elde edilmiştir. Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C derin dondurucuda korunmuştur (Theocharis et al., 2001).

4.5. Histolojik Çalışmalar

Deney sonunda hayvanlara ötenazi uygulanarak elde edilen karaciğer, beyin ve beyincik dokuları uygun büyüklükte parçalara ayrılarak fikse edilmek üzere %10'luk tamponlu nötral formaldehit içine alındı. 24 saatlik fiksasyonun ardından dokular akan çeşme suyu altında yıkandı. Ardından sırasıyla %70, 80, 90 ve 96'lık etanol serisinden geçirilen dokular dansu uzaklaştırıldı. Işık geçirgen hale gelmeleri için dokular ksilol içinde bırakıldı. Arka arkaya 3 ayrı sıvı parafinden geçirilen dokular bloklandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak genel histopatolojik inceleme için hematoksilin-eozin tekniği ile boyandı. Ayrıca, apoptoz durumunu değerlendirmek için bcl-2, bax, kaspaz 3 ve

TUNEL; inflamasyon belirteci olarak da TNF- α immünohistokimyasal uygulamaları yapıldı. Elde edilen boyalı preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirilerek grupları temsil eden görüntüler Olympus marka DP70 model dijital kamera ile alındı.

4.6. Malodialdehit (MDA) Testi

1. Deney sonunda sıçanların sol kulakçıklarından şiringa yardımıyla kanları alındı.
2. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konarak +4°C 10000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası kan serumları ependorf tüplere alınarak -80°C'de deneye kadar saklandı.
4. MDA antikoru ile kaplı ELISA plakasına kuyucuk başına kan (2x25 μ l) transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
5. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı 75 μ l eklenir.
6. Mikroplaka 37°C'de 2 saat bekletilir.
7. Antikor çözeltisi atılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
8. Kuyucuk başına 200 μ l 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.
10. Kuyucuk başına 50 μ l durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.
11. 5-30dk sonra eliza'da 450nm'de okuma yapılır.

4.7. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Testi

1. Deney sonunda sıçanların sol kulakçıklarından şiringa yardımıyla kanları alındı.
2. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konarak +4°C 10000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası kan serumları ependorf tüplere alınarak -80°C'de deneye kadar saklandı.
4. GPx antikoru ile kaplı ELISA plakasına kuyucuk başına kan (2x25 μ l) transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
5. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı 75 μ l eklenir.
6. Mikroplaka 37°C'de 2 saat bekletilir.
7. Antikor çözeltisi atılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
8. Kuyucuk başına 200 μ l 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.

10. Kuyucuk başına 50µl durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.
11. 5-30dk sonra eliza'da 450nm'de okuma yapılır.

4.8. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Testi

1. Deney sonunda sıçanların sol kulakçıklarından şiringa yardımıyla kanları alındı.
2. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konarak +4°C 10000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası kan serumları ependorf tüplere alınarak -80°C'de deneye kadar saklandı.
4. TAS antikoruna ELISA plakasına kuyucuk başına kan (2x25µl) transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
5. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı 75µl eklenir.
6. Mikroplaka 37°C'de 2 saat bekletilir.
7. Antikor çözeltisi atılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
8. Kuyucuk başına 200µl 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.
10. Kuyucuk başına 50µl durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.
11. 5-30dk sonra eliza'da 450nm'de okuma yapılır.

4.9. Toplam Oksidan Seviye (TOS) Testi

1. Deney sonunda sıçanların sol kulakçıklarından şiringa yardımıyla kanları alındı.
2. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konarak +4°C 10000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası kan serumları ependorf tüplere alınarak -80°C'de deneye kadar saklandı.
4. TOS antikoruna ELISA plakasına kuyucuk başına kan (2x25µl) transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
5. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı 75µl eklenir.
6. Mikroplaka 37°C'de 2 saat bekletilir.
7. Antikor çözeltisi atılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
8. Kuyucuk başına 200µl 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.
10. Kuyucuk başına 50µl durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.

11. 5-30dk sonra eliza'da 450nm'de okuma yapılır.

4.10. Ürik Asit Testi

1. Deney sonunda sıçanların sol kulakçıklarından şiringa yardımıyla kanları alındı.
2. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konarak +4°C 10000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası kan serumları ependorf tüplere alınarak -80°C'de deneye kadar saklandı.
4. Ürik asit antikoru ELISA plakasına kuyucuk başına kan (2x25µl) transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
5. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı 75µl eklenir.
6. Mikroplaka 37°C'de 2 saat bekletilir.
7. Antikor çözeltisi atılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
8. Kuyucuk başına 200µl 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.
10. Kuyucuk başına 50µl durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.
11. 5-30dk sonra eliza'da 450nm'de okuma yapılır.

4.11. Kan Üre Azotu (BUN) Testi

1. Deney sonunda sıçanların sol kulakçıklarından şiringa yardımıyla kanları alındı.
2. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konarak +4°C 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası kan serumları ependorf tüplere alınarak -80°C'de deneye kadar saklandı.
4. BUN antikoru ELISA plakasına kuyucuk başına kan (2x25µl) transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
5. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı 75µl eklenir.
6. Mikroplaka 37°C'de 2 saat bekletilir.
7. Antikor çözeltisi atılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
8. Kuyucuk başına 200µl 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.
10. Kuyucuk başına 50µl durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.
11. 5-30dk sonra eliza'da 450nm'de okuma yapılır.

4.12. Kaspaz-3 İmmünohistokimya

Boyanacak kesitlere indirekt boyama yöntemi uygulandı.

4 µm kesit, Pozitif şarjlı lama alınır.

Kesitler 60 °C etüvde 60 dk bekletildi.

- Ksilen I-10 dakika
- Ksilen II-5 dakika
- Ksilen III-5 dakika
- %100 Alkol-1 dakika
- %96 Alkol-1 dakika,
- %70 Alkol-1 dakika
- Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi
- Distile suda 1 dakika bekletildi
- Antijen retrieval uygulaması için düdüklünün içindeki kabta EDTA Buffer (pH:8) + Distile su (1/9 w/w) karıştırılır ve düdüklünün düdüğü ve kapağı kapatıldı. Elektrik ocağı en yüksek kademeye getirildi. Yaklaşık 15 dk sonra düdükten yüksek sesle beraber basınç çıkınca fiş prizden çekildi. Düdüklü ocak üzerinde 5 dk bekletildi. Düdüklü ocak üzerinden alındı ve 5 dk beklendi. Düdük aç kapa yaparak içinde kalan basınç çıkarıldı ve kapak açıldı. Su banyosunda 5 dk da soğutuldu. Lam taşıma sepeti distile suya alındı. Boyama uygulaması kapalı ve nemli ortamda yapıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Solüsyonlar, lam yüzeyindeki doku kesiti üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk bekletildi.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5dk yıkandı.
- Kullanım için hazır olan Ultra V Blok kitindeki süper bloktan damlatılıp 20dk bekletildi.
- Anti-kaspaz 3 primer antikoru damlatılarak dokular 60 dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler Amplifier 20dk
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- HRP damlatılarak 30dk bekletildi.

- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı
- Kesitlerin üzerine kromojen damlatılarak kesitler kahverengi renk alıncaya kadar bekletildi (en fazla 5 dk)
- Kesitler akan çeşme suyunda 30 sn bekletilir.
- HEMATOXYLİN boyasında kesitler 1 dk bekletilerek çekirdek boyaması yapılır.
- Kesitler akan çeşme suyunda 1 dk bekletilir.
- %70 ALKOL-1 dakika
- %90 ALKOL-1 dakika
- %96 ALKOL-1 dakika
- %100 ALKOL-1 dakika
- Ksilen I-1 dakika
- Ksilen II-1 dakika
- Ksilen III-1 dakika
- Lam ortasına 3 damla ENTELLAN damlatılır. 24X60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.
- Boyanan lamalar DP70 kamera ekli BX51 ışık mikroskobu (Olympos Şirketi, Tokyo, Japonya) marka mikroskop ile incelendi ve ile fotoğrafları çekildi.

4.13. Bcl-2 İmmünohistokimya

Boyanan kesitlere indirekt boyama yöntemi uygulandı.

4 µm kesit, Pozitif şarjlı lama alınır.

Kesitler 60 °C etüvde 60 dk bekletildi.

- Ksilen I-10 dakika
- Ksilen II-5 dakika
- Ksilen III-5 dakika
- %100 Alkol-1 dakika
- %96 Alkol-1 dakika,
- %70 Alkol-1 dakika
- Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi
- Distile suda 1 dakika bekletildi

- Antijen retrieval uygulaması için düdüklünün içindeki kabta EDTA Buffer (pH:8) + Distile su (1/9 w/w) kartırılır ve düdüklünün ddg ve kapağı kapatıldı. Elektrik ocağı en yüksek kademeye getirildi. Yaklaşık 15 dk sonra düdükten yüksek sesle beraber basınç çıkınca fi prizden çekildi. Düdüklü ocak üzerinde 5 dk bekletildi. Düdüklü ocak üzerinden alındı ve 5 dk beklendi. Düdük aç kapa yaparak içinde kalan basınç çıkarıldı ve kapak açıldı. Su banyosunda 5 dk da soğutuldu. Lam taşıma sepeti distile suya alındı. Boyama uygulaması kapalı ve nemli ortamda yapıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Solüsyonlar, lam yüzeyindeki doku kesiti üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler %3'lk hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk bekletildi.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5dk yıkandı.
- Kullanım için hazır olan Ultra V Blok kitindeki süper bloktan damlatılıp 20dk bekletildi.
- Anti-Bcl-2 primer antikoru damlatılarak dokular 60 dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler Amplifier 20dk
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- HRP damlatılarak 30dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı
- Kesitlerin zerine kromojen damlatılarak kesitler kahverengi renk alıncaya kadar bekletildi (en fazla 5 dk)
- Kesitler akan eme suyunda 30 sn bekletilir.
- HEMATOXYLİN boyasında kesitler 1 dk bekletilerek çekirdek boyaması yapılır.
- Kesitler akan eme suyunda 1 dk bekletilir.
- %70 ALKOL-1 dakika
- %90 ALKOL-1 dakika
- %96 ALKOL-1 dakika
- %100 ALKOL-1 dakika
- Ksilen I-1 dakika
- Ksilen II-1 dakika
- Ksilen III-1 dakika

- Lam ortasına 3 damla ENTELLAN damlatılır. 24X60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.
- Boyanan lamalar DP70 kamera ekli BX51 ışık mikroskobu (Olympos Şirketi, Tokyo, Japonya) marka mikroskop ile incelendi ve ile fotoğrafları çekildi.

4.14. Bax İmmünohistokimya

Boyanacak kesitlere indirekt boyama yöntemi uygulandı.

4 µm kesit, Pozitif şarjlı lama alınır.

Kesitler 60 °C etüvde 60 dk bekletildi.

- Ksilen I-10 dakika
- Ksilen II-5 dakika
- Ksilen III-5 dakika
- %100 Alkol-1 dakika
- %96 Alkol-1 dakika,
- %70 Alkol-1 dakika
- Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi
- Distile suda 1 dakika bekletildi
- Antijen retrieval uygulaması için düdüklünün içindeki kabta EDTA Buffer (pH:8) + Distile su (1/9 w/w) karıştırılır ve düdüklünün düdüğü ve kapağı kapatıldı. Elektrik ocağı en yüksek kademeye getirildi. Yaklaşık 15 dk sonra düdükten yüksek sesle beraber basınç çıkınca fiş prizden çekildi. Düdüklü ocak üzerinde 5 dk bekletildi. Düdüklü ocak üzerinden alındı ve 5 dk beklendi. Düdük aç kapa yaparak içinde kalan basınç çıkarıldı ve kapak açıldı. Su banyosunda 5 dk da soğutuldu. Lam taşıma sepeti distile suya alındı. Boyama uygulaması kapalı ve nemli ortamda yapıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Solüsyonlar, lam yüzeyindeki doku kesiti üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk bekletildi.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5dk yıkandı.
- Kullanım için hazır olan Ultra V Blok kitindeki süper bloktan damlatılıp 20dk bekletildi.

- Anti-Bax primer antikoru damlatılarak dokular 60 dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler Amplifier 20dk
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- HRP damlatılarak 30dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı
- Kesitlerin üzerine kromojen damlatılarak kesitler kahverengi renk alıncaya kadar bekletildi (en fazla 5 dk)
- Kesitler akan çeşme suyunda 30 sn bekletilir.
- HEMATOXYLİN boyasında kesitler 1 dk bekletilerek çekirdek boyaması yapılır.
- Kesitler akan çeşme suyunda 1 dk bekletilir.
- %70 ALKOL-1 dakika
- %90 ALKOL-1 dakika
- %96 ALKOL-1 dakika
- %100 ALKOL-1 dakika
- Ksilen I-1 dakika
- Ksilen II-1 dakika
- Ksilen III-1 dakika
- Lam ortasına 3 damla ENTELLAN damlatılır. 24X60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.
- Boyanan lamalar DP70 kamera ekli BX51 ışık mikroskobu (Olympos Şirketi, Tokyo, Japonya) marka mikroskop ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

4.15. TNF- α İmmünohistokimya

Boyanacak kesitlere indirekt boyama yöntemi uygulandı.

4 μ m kesit, Pozitif şarjlı lama alınır.

Kesitler 60 °C etüvde 60 dk bekletildi.

- Ksilen I-10 dakika
- Ksilen II-5 dakika
- Ksilen III-5 dakika
- %100 Alkol-1 dakika

- %96 Alkol-1 dakika,
- %70 Alkol-1 dakika
- Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi
- Distile suda 1 dakika bekletildi
- Antijen retrieval uygulaması için düdüklünün içindeki kabta EDTA Buffer (pH:8) + Distile su (1/9 w/w) karıştırılır ve düdüklünün düdüğü ve kapağı kapatıldı. Elektrik ocağı en yüksek kademeye getirildi. Yaklaşık 15 dk sonra düdükten yüksek sesle beraber basınç çıkınca fiş prizden çekildi. Düdüklü ocak üzerinde 5 dk bekletildi. Düdüklü ocak üzerinden alındı ve 5 dk beklendi. Düdük aç kapa yaparak içinde kalan basınç çıkarıldı ve kapak açıldı. Su banyosunda 5 dk da soğutuldu. Lam taşıma sepeti distile suya alındı. Boyama uygulaması kapalı ve nemli ortamda yapıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Solüsyonlar, lam yüzeyindeki doku kesiti üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk bekletildi.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5dk yıkandı.
- Kullanım için hazır olan Ultra V Blok kitindeki süper bloktan damlatılıp 20dk bekletildi.
- Anti-TNF- α primer antikoru damlatılarak dokular 60 dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler Amplifier 20dk
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- HRP damlatılarak 30dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı
- Kesitlerin üzerine kromojen damlatılarak kesitler kahverengi renk almaya kadar bekletildi (en fazla 5 dk)
- Kesitler akan çeşme suyunda 30 sn bekletilir.
- HEMATOXYLİN boyasında kesitler 1 dk bekletilerek çekirdek boyaması yapılır.
- Kesitler akan çeşme suyunda 1 dk bekletilir.
- %70 ALKOL-1 dakika
- %90 ALKOL-1 dakika
- %96 ALKOL-1 dakika

- %100 ALKOL-1 dakika
- Ksilen I-1 dakika
- Ksilen II-1 dakika
- Ksilen III-1 dakika
- Lam ortasına 3 damla ENTELLAN damlatılır. 24X60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.
- Boyanan lamalar DP70 kamera ekli BX51 ışık mikroskobu (Olympos Şirketi, Tokyo, Japonya) marka mikroskop ile incelendi ve ile fotoğrafları çekildi.

4.16. TUNEL İmmünohistokimya

Boyancak kesitlere indirekt boyama yöntemi uygulandı.

4 µm kesit, Pozitif şarjlı lama alınır.

Kesitler 60 °C etüvde 60 dk bekletildi.

- Ksilen I-10 dakika
- Ksilen II-5 dakika
- Ksilen III-5 dakika
- %100 Alkol-1 dakika
- %96 Alkol-1 dakika,
- %70 Alkol-1 dakika
- Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi
- Distile suda 1 dakika bekletildi
- Antijen retrieval uygulaması için düdüklünün içindeki kabta EDTA Buffer (pH:8) + Distile su (1/9 w/w) karıştırılır ve düdüklünün düdüğü ve kapağı kapatıldı. Elektrik ocağı en yüksek kademeye getirildi. Yaklaşık 15 dk sonra düdükten yüksek sesle beraber basınç çıkınca fiş prizden çekildi. Düdüklü ocak üzerinde 5 dk bekletildi. Düdüklü ocak üzerinden alındı ve 5 dk beklendi. Düdük aç kapa yaparak içinde kalan basınç çıkarıldı ve kapak açıldı. Su banyosunda 5 dk da soğutuldu. Lam taşıma sepeti distile suya alındı. Boyama uygulaması kapalı ve nemli ortamda yapıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Solüsyonlar, lam yüzeyindeki doku kesiti üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5 dk yıkandı.

- Kesitler %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk bekletildi.
- Kesitler Tween 20 ile seyreltilen Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 5dk yıkandı.
- Kullanım için hazır olan Ultra V Blok kitindeki süper bloktan damlatılıp 20dk bekletildi.
- Anti-TNF- α primer antikoru damlatılarak dokular 60 dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- Kesitler Amplifier 20dk
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
- HRP damlatılarak 30dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı
- Kesitlerin üzerine kromojen damlatılarak kesitler kahverengi renk alıncaya kadar bekletildi (en fazla 5 dk)
- Kesitler akan çeşme suyunda 30 sn bekletilir.
- HEMATOXYLIN boyasında kesitler 1 dk bekletilerek çekirdek boyaması yapılır.
- Kesitler akan çeşme suyunda 1 dk bekletilir.
- %70 ALKOL-1 dakika
- %90 ALKOL-1 dakika
- %96 ALKOL-1 dakika
- %100 ALKOL-1 dakika
- Ksilen I-1 dakika
- Ksilen II-1 dakika
- Ksilen III-1 dakika
- Lam ortasına 3 damla ENTELLAN damlatılır. 24X60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.
- Boyanan lamalar DP70 kamera ekli BX51 ışık mikroskobu (Olympos Şirketi, Tokyo, Japonya) marka mikroskop ile incelendi ve ile fotoğrafları çekildi.

4.17. MikroRNA İfade Seviyesini Ölçmek için Dokulardan RNA İzolasyonu

Oluşturulan dört adet deney gruplarına ait karaciğerdokuları öncelikle sıvı nitrojen içerisinde havanda dövülerek toz haline getirildikten sonra 1 ml TRIzol solüsyonu ile iyice pipetlenerek homojenize edilmiştir. Homojenize dokular TRIzol içerisinde oda

sıcaklığında 10 dakika bekletilerek dokuların iyice parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin nükleik asitlerden tamamen ayrışması sağlanmıştır. Sonrasında 200 µl kloroform eklenerek örnekler iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dk bekletilerek sonra +4°C'de 12000g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Faz ayrışması gerçekleşen solüsyonların üstteki RNA içeren organik fazları yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Ardından 500 µl izopropanol eklenen örnekler iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra +4°C'de 12000g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Bu adım sonrasında beyaz renkte ya da renksiz çökelti şeklinde görülebilen RNA'lar %75 etil alkolle yıkanarak sonra +4°C'de 7500g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak kurumaya bırakılan RNA'lar iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen moleküler grade su içerisinde çözülmüştür. RNA konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür.

4.17.1. RNA miktarının hesaplanması

Konsantrasyon tayini şu formülasyona göre yapılmıştır; (280 nm RNA – 260 nm ddH₂O) x dilüsyon faktörü x RNA sabiti x ölçümde kullanılan kuvars kristal malzemenin sabiti RNA sabiti : 40 µg/ml , Kuvars kristali malzemenin sabiti: 2

4.17.2. q-RT PCR analizi için cDNA sentezi

cDNA üretmek için aşağıdaki komponentler nükleaz içermeyen steril tüplere aktarılıp; 1 µL 50 pmol/ µL OligodT (20) primeri, 1 µg-5 µg total RNA, 1 µL 1, 10 mM dNTP karışımı, toplam hacim 12 µL oluncaya kadar steril distile su eklenmiştir. Karışım 65 °C de 5 dakika bekletilip hemen buza alınmıştır. Biraz santrifüj edilerek tüpün içeriğinin dipte toplanması sağlanmış ve aşağıdaki komponentler eklenmiştir: 2 µL 0.1 M DTT, 1 µL RNAaz inhibitörü tüpün içeriği hafifçe karıştırılıp ve 42 °C de 2 dakika bekletilmiş ve 1 µL (200 ünite) Superscript III reverse transkriptaz enzimi eklenmiştir. 1.5 saat 50 °C de reaksiyon gerçekleştirilip ve 70 °C de 15 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır

4.17.3. qRT-PCR ile miRNA profilinin analizi

Karaciğer hasarını moleküler düzeyde incelemek için biyo-işaretleyici olarak da kullanılan miR-122, miR-192 ve miR-194 ifade düzeylerini ölçmek için q-RT-PCR (gerçek zamanlı PZR) cihazı kullanılmıştır. Verilerin analizi için ‘threshold’ (Ct) değeri alınır ve Pfaffl’s modeli kullanılmıştır. RocheLightCycler 480 cihazı ve SYBR Green I Master Miks kiti (Roche kat. No: 04707516001) kullanılmıştır. qRT-PCR deneyleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Öncelikle her bir örnekteki RNA, GAPDH ve betatubulin housekeeping genleri kullanılarak normalize edilmiştir. Hazırlanan karışımdan deney planına göre belirlenen kuyucuklara 18’er µl dağıtılmıştır. ‘Plate’ in üzeri özel yapıştırma jelatiniyle kapatılıp, q-RT-PCR cihazına yerleştirilmiştir. Analiz için öncelikle seçilen miRNA'ya özgü cDNA sentezlemek için “sap-ilmik” denilen yapıyı da içinde barındıran ve miRNA'nın 3' ucundaki son 6 nükleotide eşlenik olan diziye sahip primerler dizayn edilmiştir. cDNA elde etmek için Superscript III reverse transkriptaz (Invitrogen) enzimi kullanılmıştır. RNA izolasyonu ve cDNA sentezinin ardından ilgili miRNA'lara ait transkriptlerin ifadeleri gerçek zamanlı kantitatif PZR ile İnvitrogen realtime PZR sistemi kullanılarak karaciğer dokusundaki ifade düzeyleri belirlenmiştir. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Fast SYBR® Green Master Mix, (Roche) kiti kullanılmıştır. Deneysel hataların en aza indirilmesi için her örnek için 3 tekrar kullanılmıştır. q-RT-PCR sonucu çıkan datalar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile analiz edilmiştir.

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılacak miRNA'ların olgun yapıları

miRNA ismi	Olgun yapısının dizisi
>mmu-miR-122-5p MIMAT0000246	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
>mmu-miR-192-5p MIMAT0000517	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
>mmu-miR-194-5p MIMAT0000224	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA

4.17.4. Mikro-RNA (miRNA) hedef genlerinin biyoinformatiksel ve fonksiyonel analizleri

miRNA okumalarına ait hedef genleri belirlemek için miRU (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) veri tabanına girilerek e-value değeri $1e-10$ baz alınarak bu dizilere BLAST yapılmıştır. Ayrıca belirlenen hedef genlerin ontolojileri ve fonksiyon analizleri için Blast2GO (Conesa vd., 2005) programı kullanılarak tesbit edilmiştir. Ayrıca hedef genlerin yolak analizini de gerçekleştirmek için web tabanlı KAAS (KEGG AutomaticAnnotation Server) kullanılarak KEGG analizi yapılmıştır.



5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Biyokimya Sonuçları

Deney sonunda sıçan kanları kalbin sol ventrikülünden alınmıştır ve alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen serumların AST ve ALT (Şekil 5.1), ALP (Şekil 5.2) ve LDH (Şekil 5.3) analizleri İntegra 400 biyokimya otoanalizörü cihazında yapılmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen ALT, AST, ALP ve LDH miktarlarının ortalama \pm standart sapma değerleri (n=7)

	KONTROL	TAA	50 Sm+TAA	100 Sm+TAA
AST (U/L)	108,16 \pm 4,26	175,00 \pm 2,45	114,40 \pm 7,02	108,16 \pm 12,87
ALT (U/L)	53,42 \pm 3,66	147,50 \pm 6,69	62,40 \pm 3,98	64,00 \pm 5,41
ALP (U/L)	118,00 \pm 5,22	194,83 \pm 15,40	173,50 \pm 4,24	158,50 \pm 4,59
LDH (U/L)	485,20 \pm 41,62	1095,00 \pm 36,43	702,60 \pm 74,15	649,80 \pm 66,15

Deney sonucunda sıçan kanları kalbin sol ventrikülünden toplanmıştır, toplanan kanların WBC (Şekil 5.4), RBC (Şekil 5.5) ve PLT (Şekil 5.6) analizleri Mindray 5380 cihazında yapılmıştır (Çizelge 5.2).

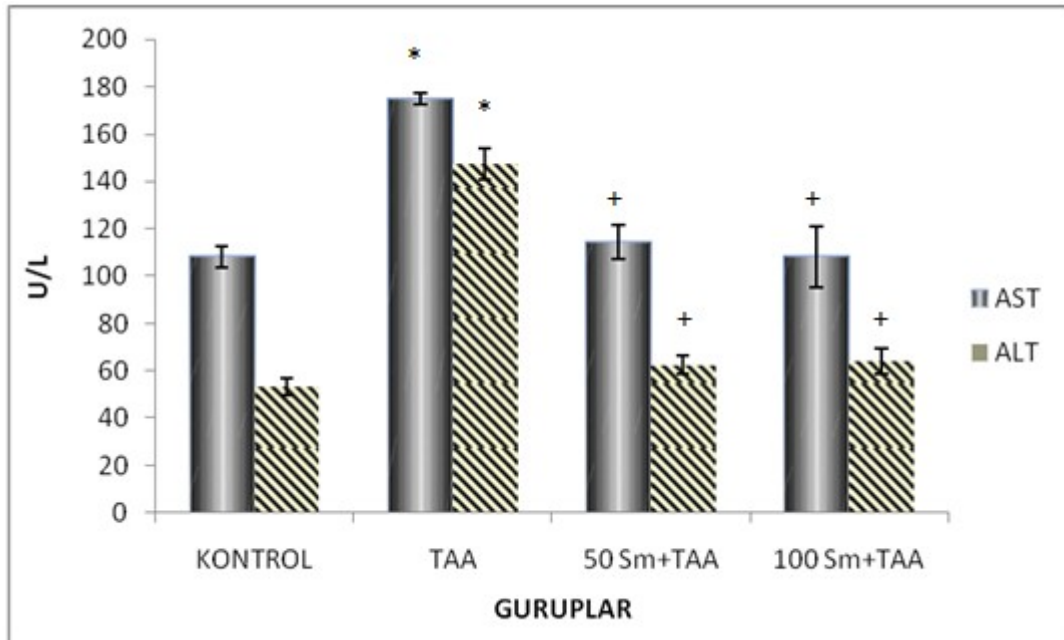
Çizelge 5.2. Deney gruplarına ait hayvanların kan örneklerinde belirlenen WBC, RBC ve PLT miktarlarının ortalama \pm standart sapma değerleri (n=7)

Parametreler/ Gruplar	Kontrol	TAA	50 Sm+TAA	100 Sm+TAA
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5,66 \pm 0,69	6,33 \pm 0,97	5,89 \pm 1,17	5,11 \pm 1,09
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7,01 \pm 0,62	7,52 \pm 0,63	7,21 \pm 0,34	6,76 \pm 0,65
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	919,16 \pm 86,39	1156,85 \pm 75,65	1052,20 \pm 89,91	1048,25 \pm 166,16

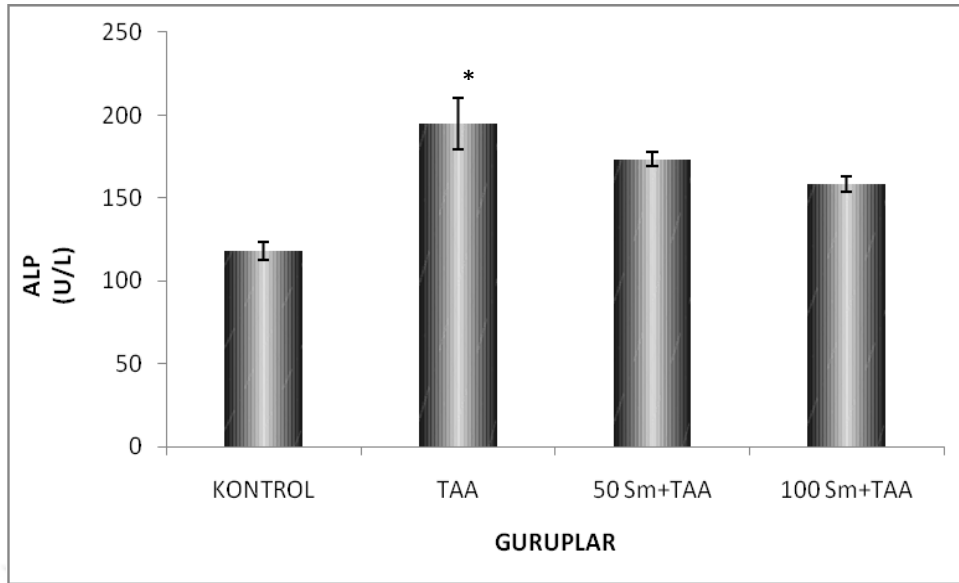
Deney sonunda toplanan kanların serumlarından ürik asit (Şekil 5.6), GPx (Şekil 5.7), MDA (Şekil 5.8), TAS ve TOS (Şekil 5.9), BUN (Şekil 5.10) değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 5.3. Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen GSH-Px, MDA, BUN, Ürik Asit, TAS ve TOS miktarlarının ortalama \pm standart sapma değerleri (n=7)

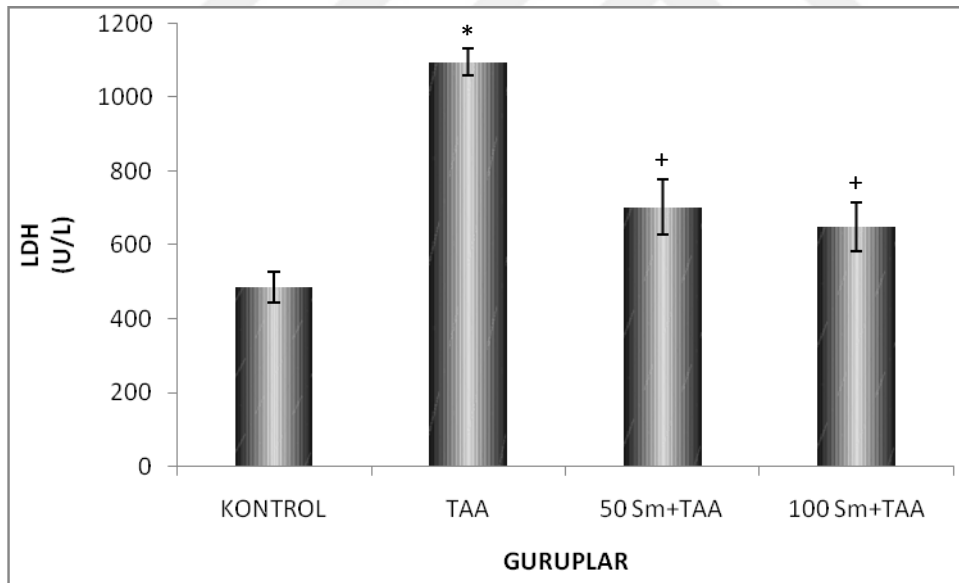
	KONTROL	TAA	50 Sm+TAA	100 Sm+TAA
GSH-Px (μM)	0,892 \pm 0,03	0,809 \pm 0,01	0,849 \pm 0,00	0,872 \pm 0,02
MDA (nmol/mL)	0,131 \pm 0,01	0,224 \pm 0,02	0,176 \pm 0,02	0,117 \pm 0,02
BUN	0,198 \pm 0,02	0,262 \pm 0,01	0,231 \pm 0,02	0,247 \pm 0,02
ÜRİK ASİT	0,464 \pm 0,02	0,569 \pm 0,01	0,537 \pm 0,02	0,449 \pm 0,01
TAS (mikromol) (H₂O₂ equivalent/L)	0,219 \pm 0,011	0,217 \pm 0,01	0,206 \pm 0,01	0,220 \pm 0,01
TOS (mikromol) (H₂O₂ equivalent/L)	0,630 \pm 0,03	0,673 \pm 0,03	0,649 \pm 0,02	0,640 \pm 0,03



Şekil 5.13. Sıçan kan plazmasından ölçülen AST ve ALT değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.001$, + TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.001$).



Şekil 5.14. Sıçan kan plazmasından ölçülen ALP değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).



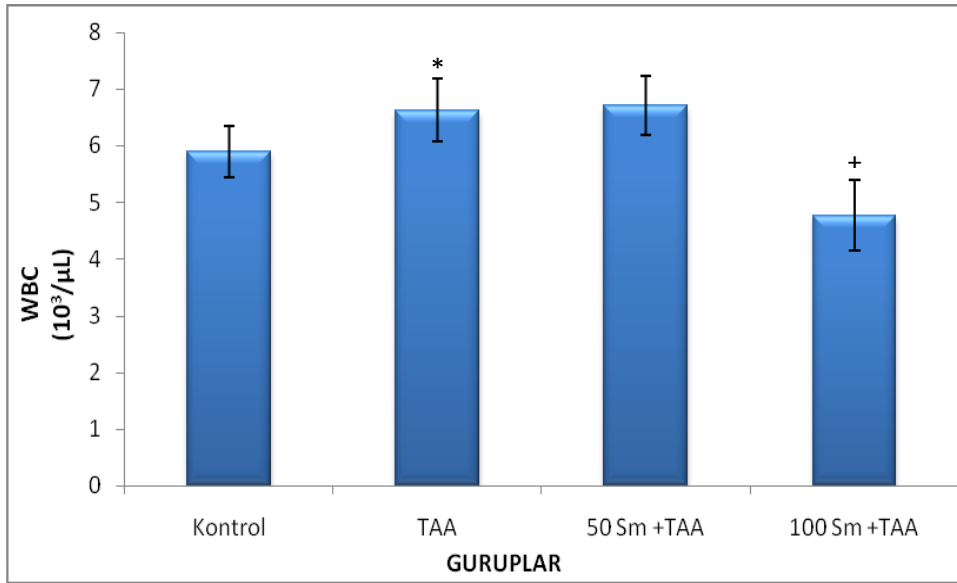
Şekil 5.15. Sıçan kan plazmasından ölçülen LDH değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.001$, + TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.001$).

Yüksek serum karaciğer enzimleri (ALT, AST ve ALP), karaciğerde iltihaplanma veya hücrelerde hasar olduğunu gösterebilmektedir. Hasarlı karaciğer dokusundan, karaciğer enzimleri ve bazı kimyasallar normalden daha yüksek bir miktarda kana sızmakta ve bu da kan testleri ile ortaya konabilmektedir (Anonim, 2018). TAA

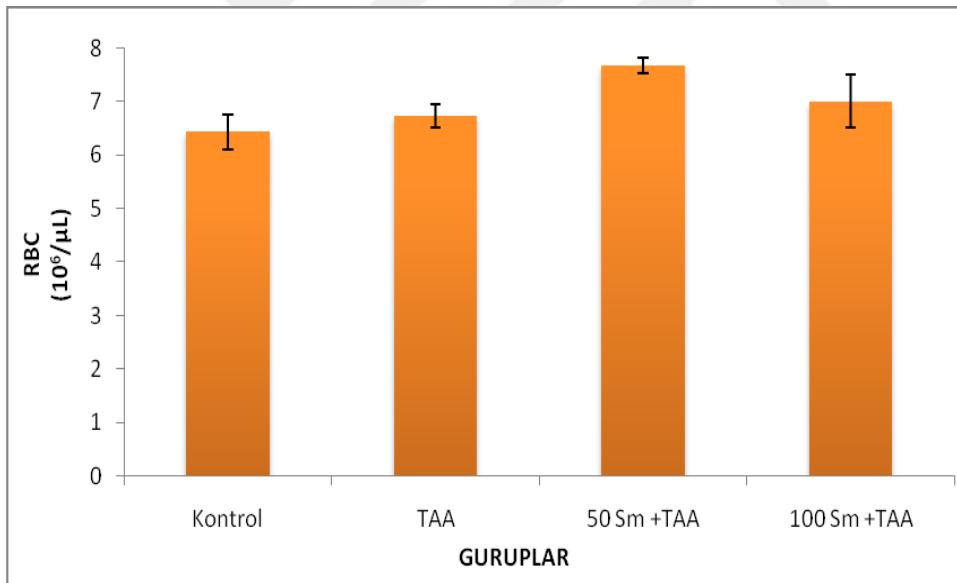
uygulamasının kan serumunda AST, ALT (Singh ve Trigun, 2014) ALP (Abdelaziz vd., 2015) ve LDH (Singh vd., 2014) miktarlarında önemli oranlarda artışa neden olduğu deneysel bulgularımızla örtüşmektedir. Sm gruplarında ise, enzim değerlerinin TAA grubuna kıyasla, düştüğü ve kontrol gurubuna yaklaştığı görülmektedir (Afifi vd., 2018; Bardi vd., 2014).

Deney guruplarının kan serumundan ölçülen karaciğer biyokimyasal analiz sonuçlarına göre, TAA grubunda ALT ($p<0,001$), AST ($p<0,001$), ALP ($p<0,05$) ve LDH ($p<0,001$) değerlerinde anlamlı şekilde artış gözlenirken ön koruma yapılan gruplarda ALT, AST, ve LDH değerleri TAA grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,001$), ALP değerinde TAA grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma görüldü. ALP'deki anlamlı olmayan azalmanın nedeni olarak düşük doz TAA verilmesi sonucu karaciğerin kendini yenilemesi düşünülmektedir. İbrahim vd., (2018) yaptıkları benzer bir çalışmada haftada 2 gün oral olarak 6 hafta boyunca 50 mg/kg TAA verilen Wistar sıçanlarında AST, ALT ve ALP düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde ($p<0,05$) yüksek çıktığı görülmüştür. Birçok çalışmada TAA çeşitli dozlarda ve sürelerde verilmesine karaciğer biyokimyasal parametrelerinde (AST, ALT, ALP ve LDH) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükseldiği görülmektedir (Nascimento vd., 2012; Ramadan vd., 2018; Bashandy vd., 2018). Sonuç olarak TAA'nın hepatotoksin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Karaciğer hasarını önlemedeki etkisi iyi bilinen Sm'nin çalışmamızda da hepatotoksin olduğu bilinen TAA nedenli karaciğer hasarını önlediği kan analizi sonuçlarında da gözükmemektedir. Mourelle vd., (1988) tarafından yapılan Sm'nin karaciğer hasarını önlemedeki rolüyle ilgili bir çalışmada, Wistar sıçanlarında karaciğer hasarı thalium ile indüklenmiş olup karaciğer koruyucusu olarak da tek doz i.p olarak 100 mg/kg Sm verilmiştir. 48 saat sonunda sıçanlar kan ve karaciğer dokusu alınmıştır. Karaciğer enzim aktivite sonuçlarına göre (ALT ve ALP) Sm verilen grup ile kontrol gurubunun sonuçları birbirine çok yakın çıkmıştır. Başka bir çalışmada, tek doz ve oral olarak 4 g/kg CCL₄ verilen Wistar sıçanlarda, koruyucu madde olarak da CCL₄ ile eş zamanlı olarak 150 mg/kg i.p verilen Sm verilmiştir.

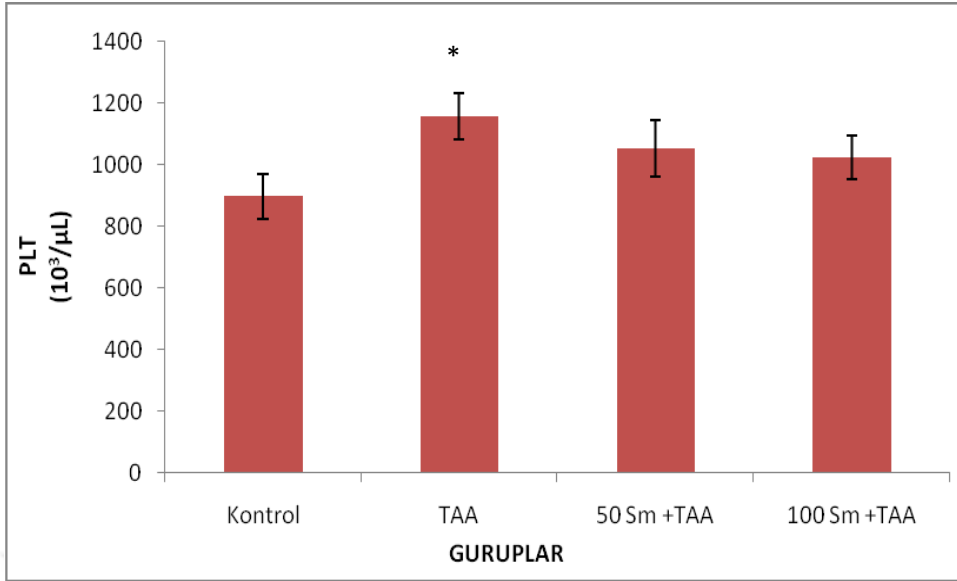


Şekil 5.16. Sıçan kan plazmasından ölçülen lökosit (WBC) değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$, ⁺ TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).



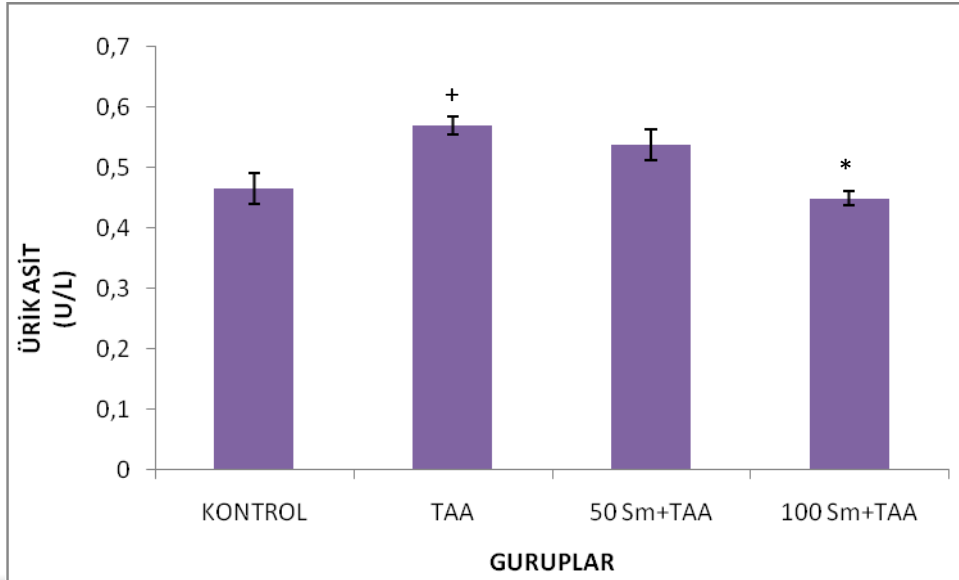
Şekil 5.17. Sıçan kan plazmasından ölçülen eritrosit (RBC) değerleri.

Guruplarımızda RBC değerleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ancak kombin guruplarda kontrol grubuna göre yükselme olduğu görülmüştür (Şekil 5.17).



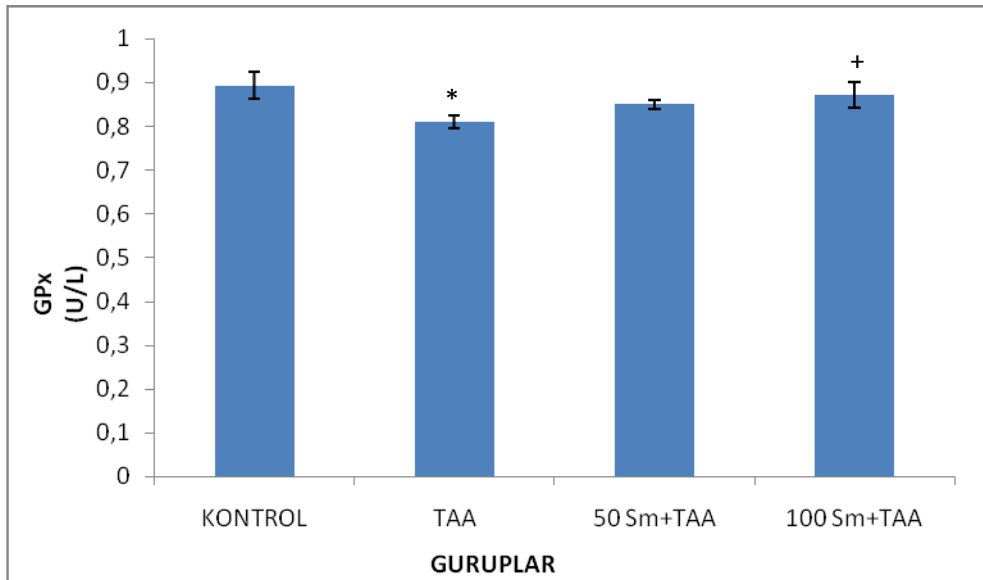
Şekil 5.18. Sıçan kan plazmasından ölçülen platelet değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.001$).

TAA'nın karaciğer hasarını indüklediği kan analizi sonuçlarında da (Şekil 5.18) gözükmemektedir. Karaciğer hasarında arttığı bilinen plateletin (PLT) TAA uygulanan grupta anlamlı şekilde yükseldiği ($p<0.001$) ve Sm ile tedavi edilen kombin gruplarda TAA grubuna göre azalma olsa da herhangi bir anlamlılık gözükmemektedir. Ayrıca, inflamasyon belirteci olarak bilinen lökosit (WBC) değerleri de TAA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ($p<0.05$), 100 Sm+TAA grubunda ise TAA grubuna göre anlamlı bir azalma gözükmemektedir ($p<0.05$). Chen vd., (2008) tarafından yapılan tez doz TAA'nın kan ve enzim değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bir çalışmada, Wistar-Kyoto sıçanlarına iki farklı doz (70 ve 280 mg/kg) TAA uygulanmıştır. Düşük doz TAA uygulanan sıçanlarda hasardan kısa süre sonra (ilk 3 saat) WBC miktarı anlamlı şekilde artarken ($p<0.05$) artan zamana bağlı olarak normal seviyeye döndüğü ancak PLT'nin zamanla doğru orantılı olarak sürekli artış gösterdiği gözükmemektedir. Abo-Ghanema vd., (2016) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, TAA uygulanan albino sıçanlarda, PLT sayısı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalırken WBC sayısında kontrole kıyasla herhangi bir değişim gözlenmemiştir.



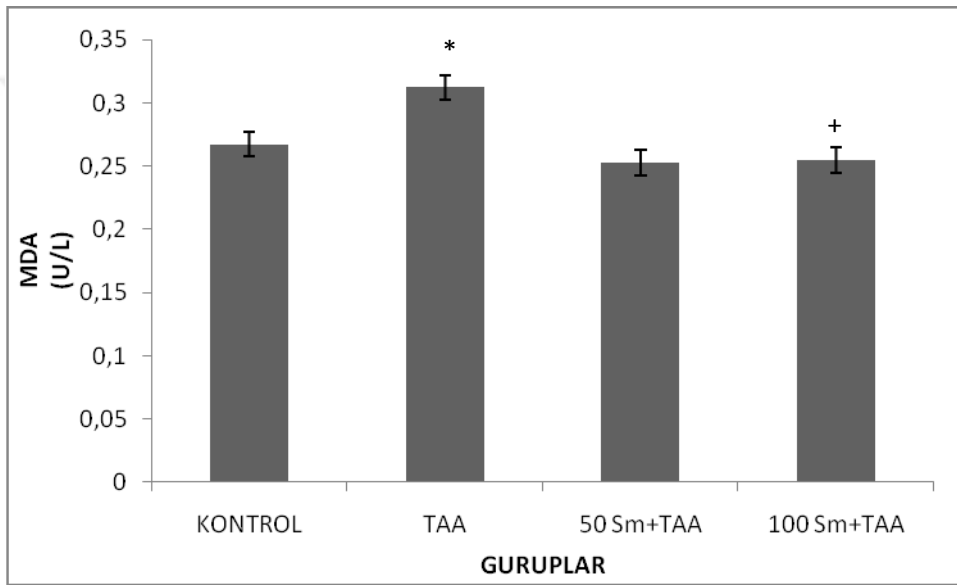
Şekil 5.19. Sıçan kan plazmasından ölçülen ürik asit değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$, ⁺ TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).

Amonyak metabolizması sonucu ortaya çıkan ürik asit, karaciğer hasarına bağlı olarak amonyak metabolizması bozulmakta ve ürik asit miktarı artmaktadır, TAA gurubunda kontrol gurubuna göre yükselmiştir ($p<0.05$). 100Sm+TAA gurubunda da kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($p<0.05$) (Şekil 5.19).



Şekil 5.20. Sıçan kan plazmasından ölçülen GPx değerleri. (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$, ⁺ TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$)

Glutasyon Peroksidaz (GPx), temel biyolojik rolü organizmayı oksidatif hasardan korumak olan peroksidaz aktivitesine sahip bir enzim ailesinin genel adıdır. Glutasyon peroksidazın biyokimyasal işlevi, lipit hidroperoksitleri karşılık gelen alkollere indirgemek ve serbest hidrojen peroksiti suya azaltmaktır. Karaciğer hasarında düşmesi beklenen GPx, Abul vd., (2002) tarafından yapılan, TAA indüklü karaciğer hasarında gösterilmiştir (Abul vd., 2002). Benzer sonuç, çalışmamızda TAA ile karaciğer hasarı oluşturulan grupta da gösterilmiştir ($p<0.05$). Sm kombin gruplarında ise, GPx seviyesinin doza bağlı olarak kontrol grubuna yaklaştığı görülmektedir ($p<0.05$).



Şekil 5.21. Sıçan kan plazmasından ölçülen MDA değerleri (*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$, + TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.001$).

Lipid metabolizması son ürünü olan malondialdehit (MDA), TAA gurubunda kontrol gurubuna göre yükselmiştir TAA+100 Sm gurubunda da kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür.

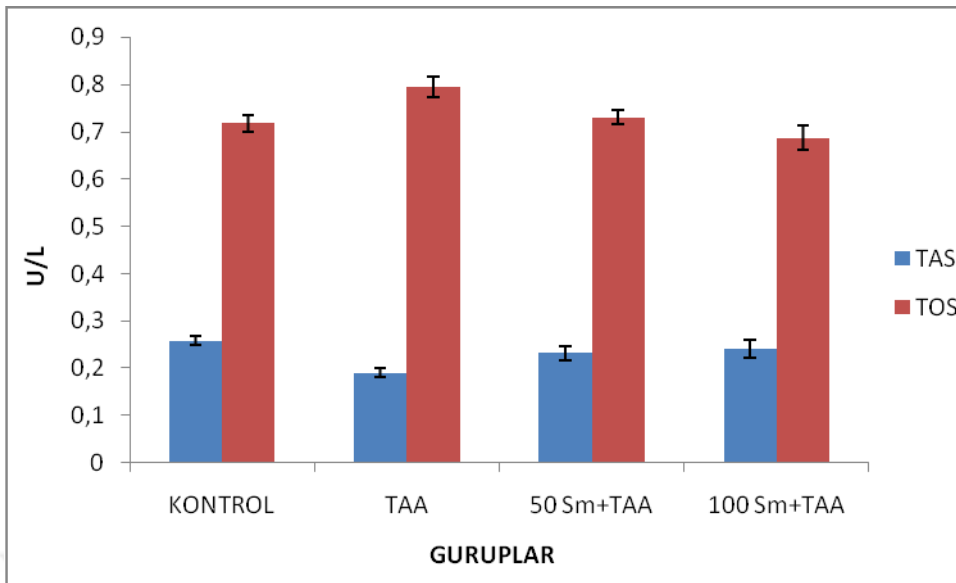
Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, karaciğer hasarında serbest radikal miktarının arttığının göstergesidir. CCL₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında MDA seviyesinin kontrole göre anlamlı şekilde yükseldiği sonucu çalışmamızla da uyusmaktadır. Aynı çalışmada içme suyuyla birlikte verilen Sm'nin karaciğer hasarını engellediği, MDA seviyesinin hasarlı gruba göre azaldığı, gösterilmiştir (Aslan vd., 2016). TAA'nın MDA

seviyesini anlamlı şekilde yükselttiği ($p<0.05$) ve yüksek doz Sm'nin MDA seviyesini düşürerek kontrole yaklaştırdığı ($p<0.05$) çalışmamızda belirlenmiştir.

Zheng vd., (2018) tarafından yapılan TAA-indüklü akut karaciğer hasarı çalışmasında, tek doz olarak 350 mg/kg TAA verilen Sprague-Dawley sıçanlarda, MDA düzeyindeki artış ile GPx seviyesindeki azalış ileri düzeyde anlamlılık göstermektedir ($p<0.01$). Bashandy vd., (2018)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, 8 hafta boyunca haftada 3 kez 100mg/kg TAA verilen Sprague-Dawley sıçanlarda, hem karaciğer hem de böbrekteki MDA seviyeleri ile ürik asit seviyesi kontrol grubuna göre ileri anlamlılık seviyesinde yüksek çıkmıştır ($p<0.01$).

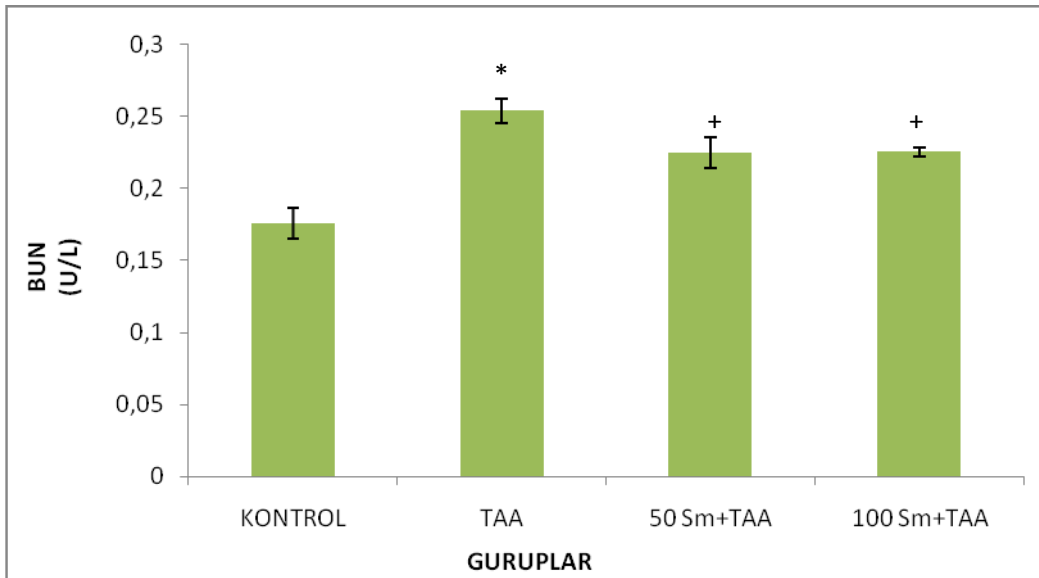
Sm'nin TAA nedenli hepatotoksisite üzerine ön koruma etkisi ile ilgili bir çalışmada, Sprague-Dawley sıçanlara 45 gün boyunca 50 mg/kg Sm oral olarak, deneyin son iki gününde de 300 mg/kg TAA i.p olarak verilmiştir. Deney sonucuna göre antioksidan olan GPx değeri Sm+TAA grubunda TAA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme ($p<0.05$) göstermiştir. TAS değerinde de, Sm+TAA gurubunda, TAA gurubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ise, TAA gurubunda kontrol gurubuna göre anlamlı şekilde ($p<0.05$) artarken, Sm+TAA gurubunda ise TAA gurubuna göre anlamlı şekilde ($p<0.05$) azalma görülmektedir (Afifi vd., 2018).

Çizelge 5.3'de de görüldüğü gibi TAA verilen deney grubu ile 100 Sm+TAA verilen deney grupları MDA değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark görülmektedir ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre de MDA düzeyi bakımından farklı bulunmuştur. 50 mg/kg TAA ile birlikte verilen SM'nin dozu arttıkça MDA seviyesi kontrol düzeyine yaklaştırmıştır.



Şekil 5.22. Sıçan kan plazmasından ölçülen TAS ve TOS değerleri.

TAS ve TOS değerlerinde guruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmamasına rağmen, TAA gurubunda TAS'ın kontrol gurubuna göre düştüğü, TOS'un ise yükseldiği kombin guruplarda ise, TAS'ın doza bağlı azaldığı TOS'un da doza bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.



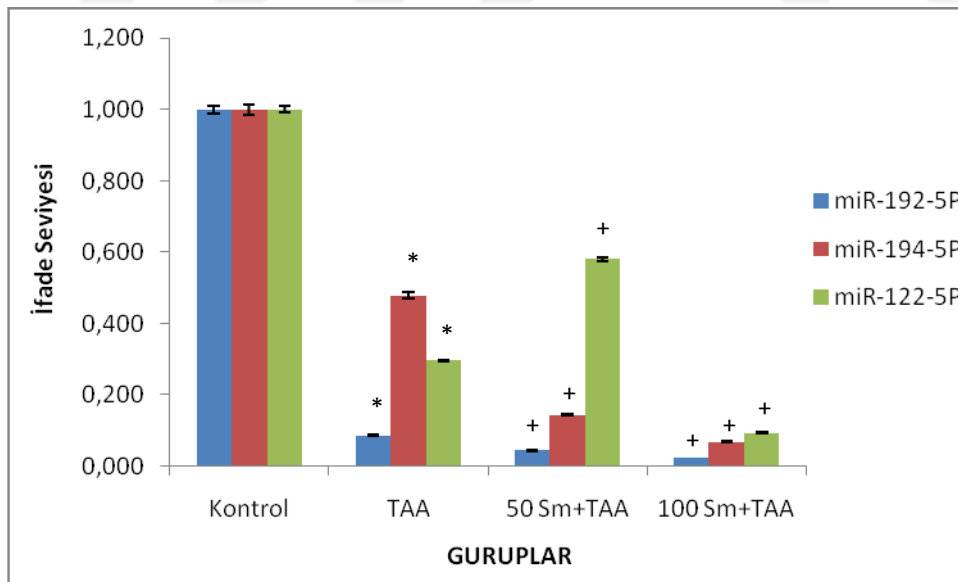
Şekil 5.23. Sıçan kan plazmasından ölçülen BUN değerleri (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$, + TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$).

BUN, bir kan üre nitrojen testidir. Atık üre, kandaki azot miktarını gösterir. Protein vücudunuzda parçalandığında üre oluşur. Üre, karaciğerde üretilir ve idrarla vücudunuzdan çıkar (Hosten, 1990).

Böbreklerin ne kadar iyi çalıştığını görmek için bir BUN testi yapılır. Böbreklerin normalde üre çıkaramazsa, BUN seviyeniz yükselir. Kalp yetmezliği, dehidratasyon veya protein oranı yüksek bir diyet de BUN düzeyinizi daha da yükseltebilir. Karaciğer hastalığı veya hasarı BUN düzeyinizi düşürebilir (Hosten, 1990).

BUN seviyesinin Wistar sıçanlara tek doz (10, 25 ve 50 mg/kg) sisplatin uygulamasının zamana bağlı olarak (24, 48, 72, 96 ve 120 saat) sonucu yükseldiği Palipoch ve Punsawad (2013) tarafından gösterilmiştir. Kan serumundan ölçülen BUN miktarının TAA gurubunda yükseldiği ($p<0,001$) kombin guruplarda ise kontrole yaklaştığı ($p<0,001$) deneysel çalışmamızda görülmüştür.

5.2. miRNA Analizleri

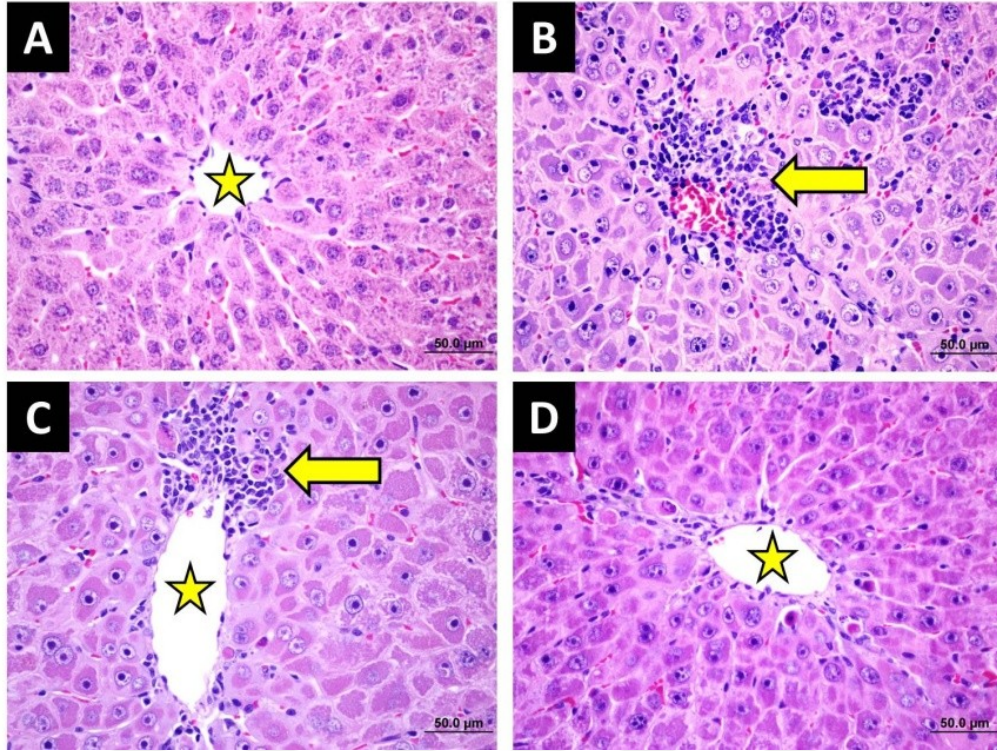


Şekil 5.24. Sıçan hepatositlerinden elde edilen miR-194-5p, miR-192-5p ve miR-122-5p sonuçları. (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$, + TAA grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$)

TAA grubu kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında, kombin guruplarda TAA guruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır.

Karaciğer dokusundan RT-PCR yöntemiyle analiz edilen miRNA-122-5p, miR-192-5p ve miR-194-5p sonuçlarına göre, TAA grubunda miRNA seviyeleri kontrol gurubuna göre azalmakta, kombin gruplarda da miRNA seviyeleri TAA gurubuna göre azalmaktadır. Oda vd., (2018) yaptıkları bir çalışmaya göre TAA ile karaciğer hasarı oluşturulan Sprague Dawley sıçanların kan plazmalarında miR-192-5p seviyesinin kontrol gurubuna göre yükseldiği görülmektedir. Kagawa vd., (2018) yaptığı başka bir çalışmada ise, karaciğer hasarı oral olarak tez doz 100mg/kg TAA ile oluşturulan Sprague-Dawley sıçanlarında serum örneklerinden analiz edilen miR-122-5p sonucuna göre, karaciğer hasarı bulunan grupta miR-122-5p seviyesi kontrol gurubuna göre artmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları bizim sonuçlarımızla çelişiyor gözükse de çalışmamızda miR-192-5p ve miR-122-5p'ye dokudan bakılırken Oda vd., (2018) ile Kagawa vd., (2018) yaptıkları çalışmada kan plazmasından bakılmıştır. Katsura vd., (2015) yaptıkları bir çalışmada, C57BL/6N fareleri 15 hafta boyunca metiyonin-kolin eksik diyetle beslenmişlerdir ve farelerde steatohepatit oluşturulmuştur. Karaciğer dokusunda yapılan miRNA analizi sonucuna göre steatohepatit gurubunda miR-194-5p'nin ifadesi kontrol gurubuna göre azalmaktadır.

5.3. Histolojik Analizler

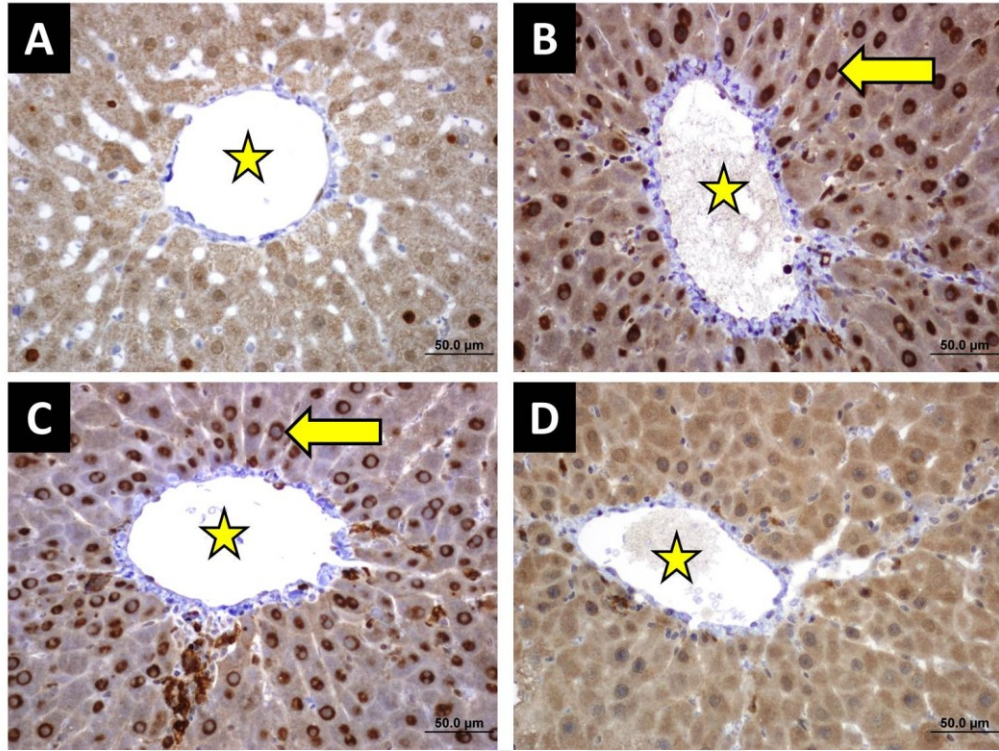


Şekil 5.13. Deney gruplarına ait sıçanların karaciğer kesitleri. Santral venler (*) ve santral venler etrafında biriken iltihabi hücreler (oklar) görülmektedir. Kontrol gurubunda tipik histolojik görünüm sergileyen karaciğer dokusunda hepatositler mavi-mor boyanmış yuvarlak çekirdekleri ve eozinofilik boyanmış sitoplazmaları ile dikkati çekmektedir (Şekil 5.13A). Tek başına tiyoasetamid verilen guruba ait karaciğer kesitlerinde hepatositlerin ödem nedeniyle birbirinden ayrıldıkları, çekirdeklerinin bazılarında vakuollerin oluştuğu, ayrıca santral ven etrafında inflamatuvar hücrelerin biriktiği gözlenmektedir (Şekil 5.13B). Tiyoasetamid +düşük doz silimarin verilen grupta ödem ve inflamatuvar hücre birikiminin devam ettiği (Şekil 5.13C), tiyoasetamid + yüksek doz silimarin verilen grupta ise inflamatuvar hücre birikiminin kaybolduğu, azalmış olsa da ödemin halen mevcut olduğu görülmektedir (Şekil 5.13D). Kesitler hematoksilin-eozin boyası ile boyanmıştır. Barların hepsi 50 µm'dir.

Hematoksilen ve eozin (H&E) boyası en az yüzyıldır kullanılmaktadır ve günümüzde kanser teşhisinin temelini oluşturan çeşitli doku tiplerini ve morfolojik değişiklikleri tanımak için hala gereklidir. Boya, uzun yıllar boyunca değişmeden kalmıştır, çünkü çeşitli fiksatiflerle iyi çalışmakta ve çok çeşitli sitoplazmik, nükleer ve hücre dışı matris özellikleri sergilemektedir. Hematoksilin koyu mavi-mor bir renge sahiptir ve nükleik asitleri karmaşık ve tam anlaşılmış bir reaksiyonla, pembe olan eosin ise proteinleri spesifik olmayan şekilde boyamaktadır. Tipik bir dokuda, çekirdekler mavi olarak boyanır oysa sitoplazma ve hücre dışı matriks değişken derecelerde pembe boyanmaya sahiptir (Fischer vd., 2008).

H&E boyama sonuçlarına göre, haftada 2 kez i.p olarak 200 mg/kg TAA verilen sıçanların karaciğer dokusunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında inflamatuvar ve ödem gözlenmiştir (Reif vd., 2004). Deneysel çalışmamızda TAA grubunda ödem ve inflamasyon gözlemlendiği, kombin guruplarda ise, özellikle yüksek doz Sm kombin gurubnda, kontrol gurubuna benzer şekilde dokuda ödem ve inflamasyon olmadığı gözlemlenmiştir.

Karaciğer dokusunda H&E boyama sonuçları değerlendirildiğinde (Şekil 5.13), TAA grubunda hepatositlerin iltihap ve ödem nedeniyle birbirlerinden ayrıldıkları, düşük doz Sm ile kombin gurupta da TAA grubuna benzer sonuçların görüldüğü yani 50 mg/kg Sm'nin karaciğer hasarını önlemede çok etkili olmadığı görülmektedir. Yüksek doz Sm ile kombin gurubun ise kontrol grubuna benzer şekilde hepatositlerin normal histolojik görünümde olduğu, iltihabi hücre odakları ve ödem olmadığı görülmektedir. Casas-Grajales vd., (2017) yapmış oldukları benzer bir çalışmada, erkek Wistar sıçanlara haftada 3 kez 8 hafta boyunca 200 mg/kg TAA i.p olarak verilmiştir ve sonuçlar hematoksil-eozin boyamasıyla da değerlendirilmiştir. TAA verilen grupta, fibrotik doku ve inflamasyon bölgeleri görülmektedir.



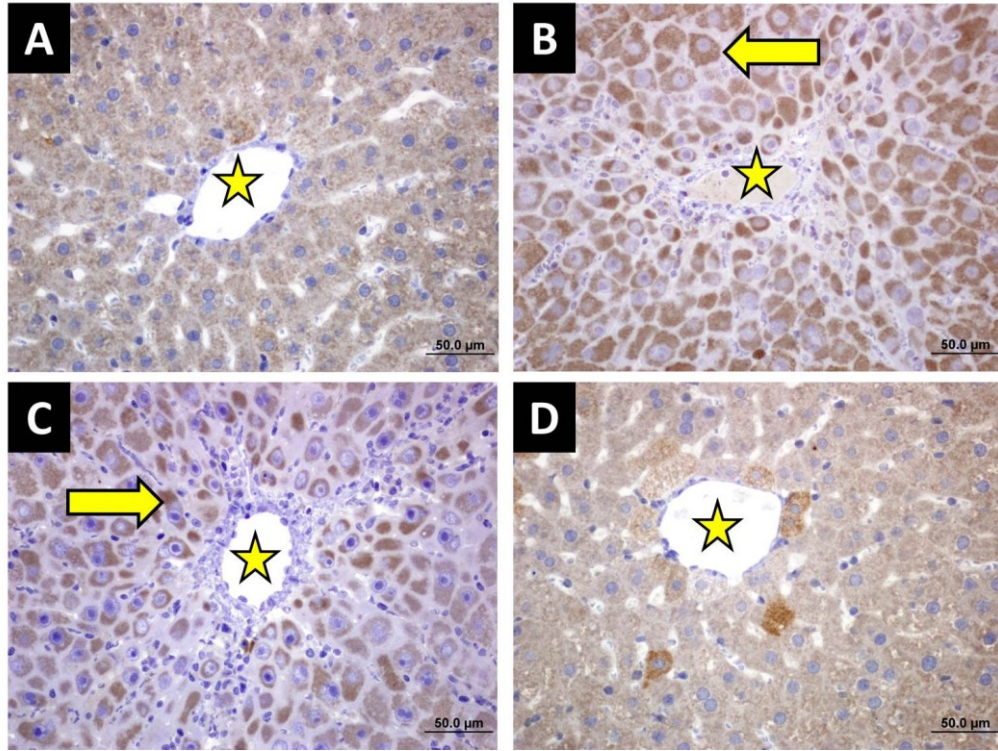
Şekil 5.14. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde TUNEL immünoreaktivitesi. Santral venler (*) ile ve pozitif boyanan hücrelerden bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol gurubunda hepatosit çekirdeklerinde genelde zayıf reaksiyon varken az sayıdaki hücrede pozitif reaksiyon saptandı (Şekil 5.14A). Tek başına TAA verilen gurupta hepatosit çekirdeklerinde kuvvetli pozitif reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.14B). 50 Sm+TAA verilen gurupta hepatosit çekirdeklerinde kuvvetli pozitif reaksiyonun devam ettiği görülürken (Şekil 5.14C) 100 Sm+TAA verilen gurupta reaksiyonun orta dereceye gerilediği saptandı (Şekil 5.14D). Barların hepsi 50 µm'dir.

TUNEL testi apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılan hassas bir yöntemdir. Sonuç olarak, şişmiş hepatositlerde apoptozis olup olmadığını belirlemek için TUNEL testi yapılmaktadır (Grasl-Kraupp vd., 1995).

F344/DuCr1Cr1j sıçanlara 20 hafta boyunca haftada 2 kez 100 mg/kg TAA i.p olarak sıçanlara verilmiş olup deney sonucunda sıçanların karaciğerine TUNEL ihk boyaması yapılmıştır. TAA grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pozitif apoptotik hücrelerin sayısında önemli bir artış olduğu görüşmüştür (Atarashi vd., 2018).

Karaciğer dokusunda TUNEL ihk sonuçlarına göre (Şekil 5.14), TAA gurubunda DNA hasarının yüksek olduğu, düşük doz Sm ile kombin gurupta da TAA grubuna benzer şekilde DNA hasarının yüksek olduğu yani 50 mg/kg Sm'nin karaciğer hasarını önlemede

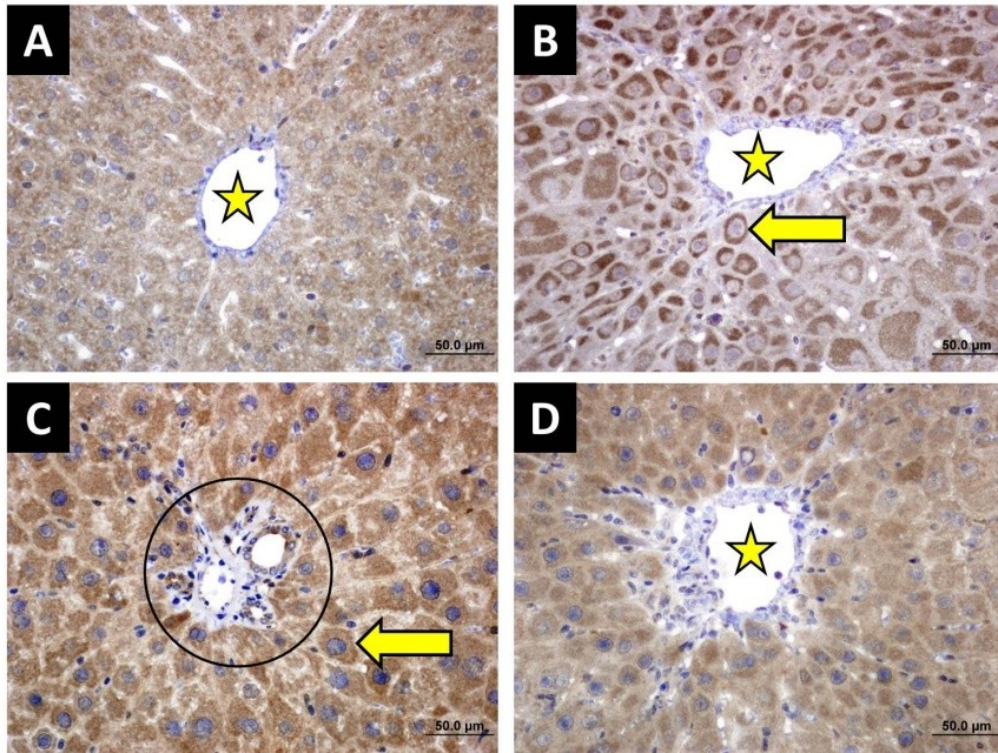
çok etkili olmadığı görülmektedir. Yüksek doz Sm ile kombin gurubun ise kontrol grubuna benzer şekilde düşük miktarda DNA hasarı olduğu görülmektedir.



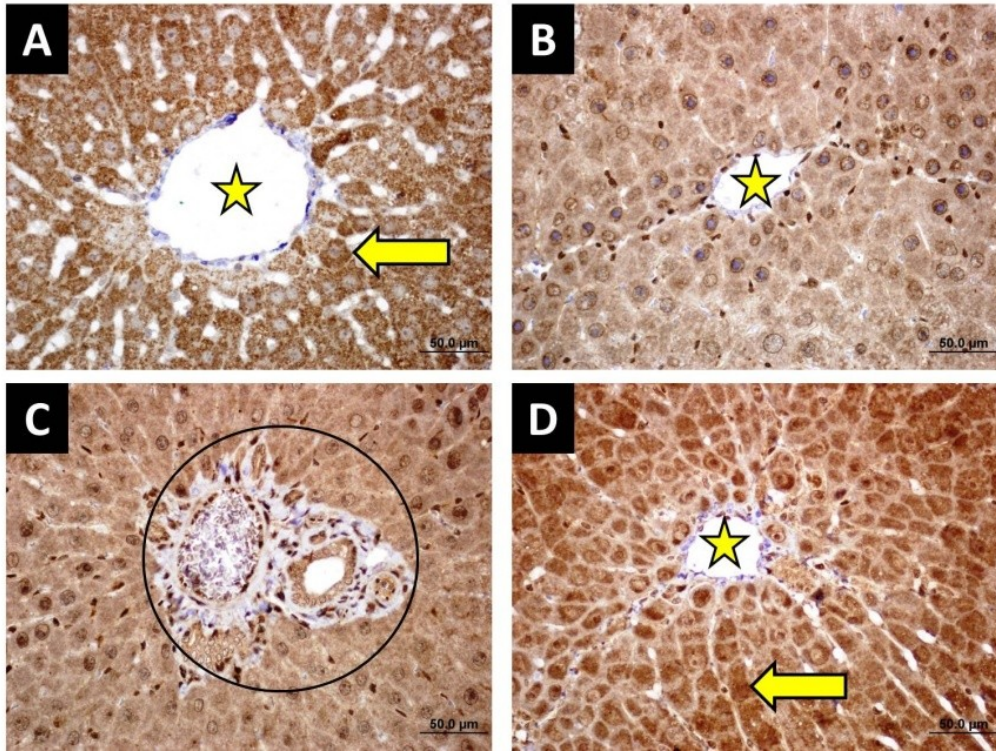
Şekil 5.15. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Santral venler (*) ile ve pozitif boyanan hücrelerden bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol gurubunda hepatosit sitoplazmalarında zayıf reaksiyon vardı (Şekil 5.15A). Tek başına TAA verilen gurupta hepatositlerde kuvvetli bir pozitif reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.15B). Hem 50 Sm+TAA verilen gurupta ve hem de 100 Sm+TAA verilen gurupta hepatositlerde orta derecede pozitif reaksiyonlar görüldü (Şekil 5.15C-D). Barların hepsi 50 µm'dir.

Sprague-Dawley sıçanlara 6 hafta boyunca haftada 2 kez 200 mg/kg TAA verilmesi sonucu hepatik nekroz oluşturulmuştur. Sıçanların karaciğer dokularında kaspaz-3 ihk analizi sonucuna göre TAA verilen gurupta, periportal bölgede pozitif boyanmanın olduğu ve inflamasyon odaklarının olduğu görülmektedir (Eissa vd., 2018).

Karaciğer dokusunda kaspaz-3 ihk sonuçlarına göre (Şekil 5.15), TAA gurubunda ve düşük doz Sm ile kombin gurupta apoptoz miktarının yüksek olduğu yani 50 mg/kg Sm'nin karaciğer hasarını önlemede çok etkili olmadığı görülmektedir. Yüksek doz Sm ile kombin gurubun ise kontrol grubuna benzer şekilde apoptozun az olduğu görülmektedir.



Şekil 5.16. Deney guruplarının karaciğer hepatositlerinde Bax immünoreaktivitesi. Santral venler (*) ile ve pozitif boyanan hücrelerden bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol gurubunda hepatosit sitoplazmalarında zayıf reaksiyon vardı (Şekil 5.16A). Tek başına TAA verilen grupta hepatositlerde kuvvetli bir reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.16B). 50 Sm+TAA verilen grupta ve hem de 100 Sm+TAA verilen grupta hepatositlerde orta derecede pozitif reaksiyonlar görüldü (Şekil 5.16C-D). Barların hepsi 50 µm'dir.

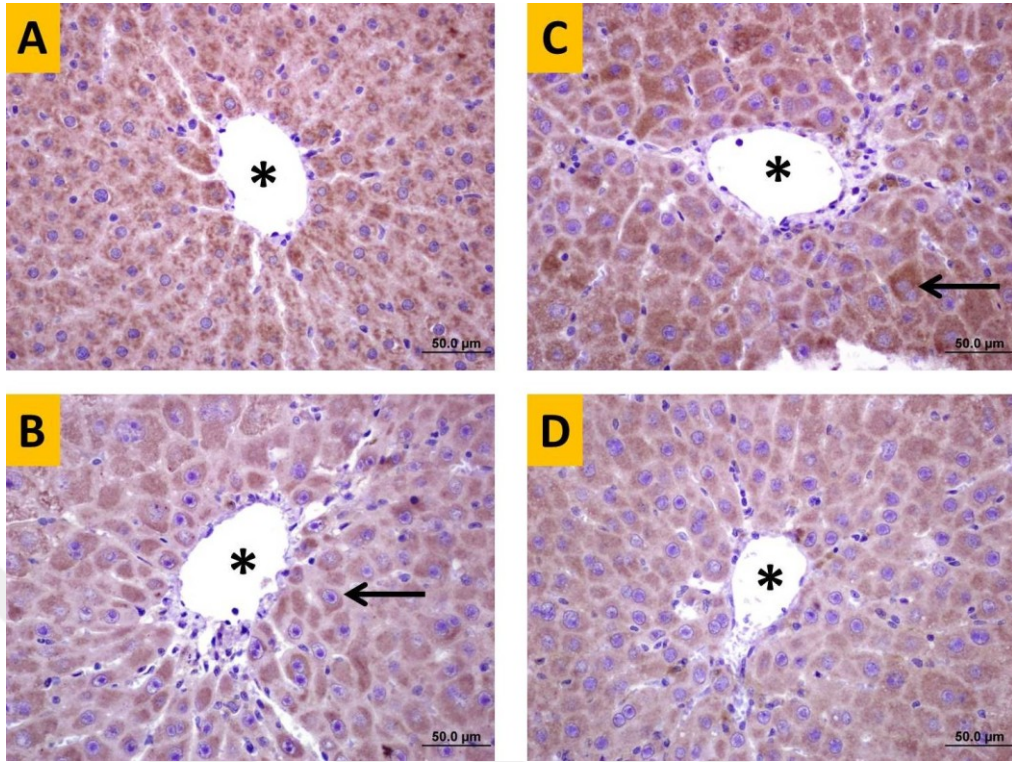


Şekil 5.17. Deney gruplarının karaciğer hepatositlerinde Bcl-2 immünoreaktivitesi. Santral venler (*) ile ve pozitif boyanan hücrelerden bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol gurubunda hepatosit sitoplazmalarında kuvvetli pozitif reaksiyon vardı (Şekil 5.17A). Tek başına TAA verilen gurupta hepatositlerde zayıf bir reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.17B). 50 Sm+TAA verilen gurupta hepatositlerde orta derecede pozitif reaksiyon görülürken (Şekil 5.17C) 100 Sm+TAA verilen gurupta ise kuvvetli pozitif reaksiyon saptandı (Şekil 5.17D). Barların hepsi 50 µm'dir.

Bcl-2 ve Bax proteini "Bcl-2 ailesi" olarak adlandırılan geniş bir protein ailesinin üyeleridir ve her ikisi de apoptozun önemli düzenleyicileridir. Bcl-2 apoptozu baskılayarak hücre sağkalımını uzatabilmekte, Bax ise apoptozu artırabilmektedir. Bcl-2 mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılmasını engelleyebilmekte, böylece kaspaz aktivatörlerinin mitokondriden salınmasını önleyebilmektedir (Kluck vd., 1997). Bax'in aşırı ekspresyonunun apoptozu hızlandığı, Bcl-2'nin ise Bax'ın ölüm fonksiyonunu baskıladığı görülmüştür (Zhao vd., 2004). Karaciğer hasarını indükleyen TAA'nın karaciğer dokusunda Bcl-2 ekspresyonunu inhibe ederken Bax ekspresyonunu indüklediği David vd., (2011) tarafından gösterilmiştir (David vd., 2011). Hepatoprotektan olan Sm'nin karaciğeri koruduğu Bcl-2 ve Bax ihk'ları ile de gösterilmiştir (Wang vd., 2018). Çalışmamızda TAA'nın Bcl-2 ekspresyonunu inhibe ettiği (Şekil 5.16) ve Bax ekspresyonunu indüklediği (Şekil 5.17), Sm gruplarında (özellikle yüksek doz Sm grubunda) Bcl-2 ve Bax ihk sonuçlarının kontrol gurubuyla aynı olduğu görülmektedir.

Mohamed ver ark. (2018)'nin yapmış oldukları bir çalışmada Wistar sıçanlara 12 hafta boyunca haftada 3 kez 200 mg/kg TAA i.p olarak ve son 4 haftada 50mg/kg Sm oral verilmiştir. Karaciğer dokusunun hematoksilen eozin sonuçlarına göre, Sm+TAA gurubunda histolojik görünüm kontrol gurubu ile benzerlik göstermekte olup inflamasyon ya da ödem gözükmemektedir. Salama vd., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada Sprague Dawley sıçanlara haftada 3 kez oral 200 mg/kg TAA sekiz hafta boyunca verilmiştir. Aynı süre boyunca da 50mg/kg Sm oral olarak verilmiştir. Karaciğer dokusunda immünohistokimya boyama sonuçlarına göre, Bax ifade seviyesi artarken Bcl-2 ifade seviyesi de azalmaktadır.

Nafees vd., (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada, 14 gün boyunca 300 mg/kg TAA verilem Wistar sıçanlarda Bax ihk boyamasında TAA verilen grupta hücrelerin birbirlerinden ayrıldıkları ve ödem olduğu kontrol grubunda ise beklendiği gibi boyamanın çok az olduğu görülmektedir. Bcl-2 sonuçları ise, Bax ile ters orantılı olmalıdır. Kontrol gurubunda yoğun boyama olduğu TAA grubunda ise boyama olmadığı görülmektedir.

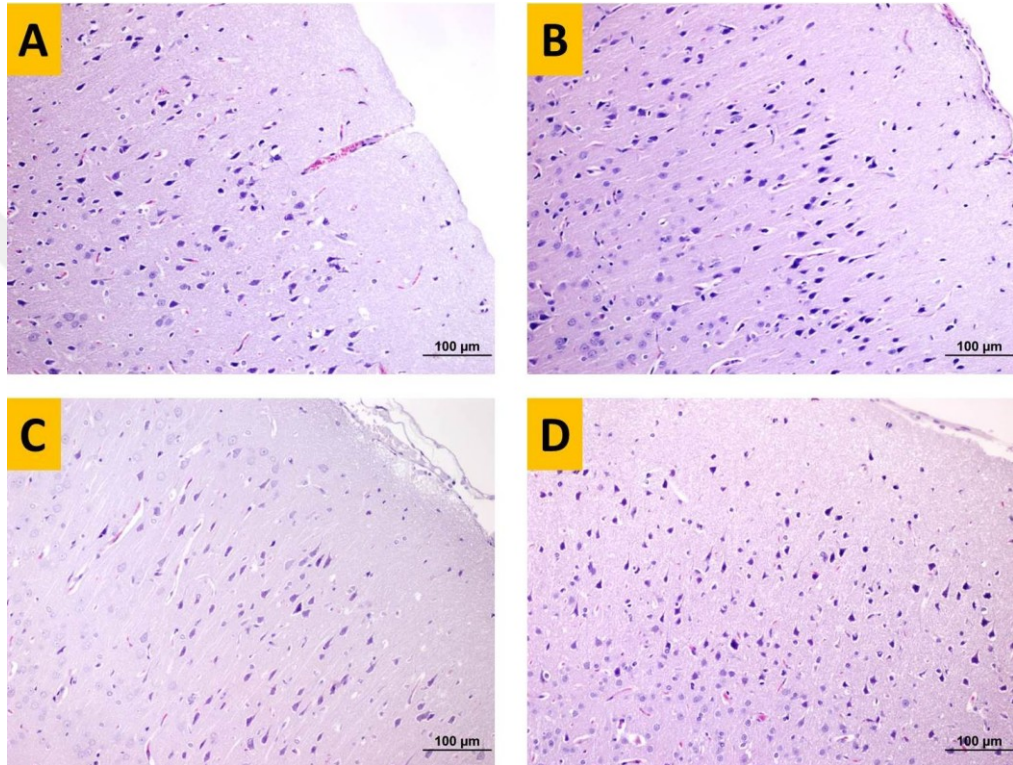


Şekil 5.18. Deney gruplarının karaciğer hepatositlerinde TNF- α immünoreaktivitesi. Santral venler (*) ile ve pozitif boyanan hücrelerden bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol grubunda hepatosit sitoplazmalarında genelde zayıf reaksiyon varken az sayıdaki hücrede pozitif reaksiyon saptandı (Şekil 5.18A). Tek başına TAA verilen grupta hepatosit sitoplazmalarında kuvvetli pozitif reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.18B). 50 Sm+TAA verilen grupta hepatositlerdeki reaksiyonun orta dereceli pozitif düzeyinde olduğu (Şekil 5.18C) ve 100 Sm+TAA verilen grupta reaksiyonun gerilemeye daha da devam ederek zayıf dereceye indiği saptandı (Şekil 5.18D). Barların hepsi 50 μm 'dir.

Akut karaciğer yaralanmalarında erken evrelerde hepatic makrofajlar hızla proinflamatuvar sitokinler ve apoptotik sinyallerle sonuçlanan kemokinler salgılamaktadır (Luedde ve Schwabe, 2011). Bu kemokinler ve sitokinler (özellikle TNF-a), hücresel hasarla ilişkili olup farklı karaciğer hastalıklarında kritik faktörler olarak kabul edilmektedir (Auguet ve., 2008). Deney sonuçlarımıza göre, TNF- α boyanmasının TAA verilen grupta kuvvetli olduğu ve yüksek doz Sm verilen grupta ise kontrol grubuna benzer şekilde zayıf olduğu görülmektedir (Şekil 5.18). Ahmed vd., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, erkek Wistar Albino sıçanların bir grubuna 3 gün başka bir gruba ise 30 gün boyunca günde 100 mg/kg TAA i.p olarak enjekte edilmiştir. Deney sonunda sıçanların karaciğerleri, beyinleri çıkarılmış ve kanları da toplanmıştır. Kan serumlarından ELİSA yöntemiyle TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. 3 gün TAA enjekte edilen grubun TNF- α seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükseldiği görülürken ($p < 0,05$),

30 gün boyunca enjekte edilen grubun TNF- α seviyesinin çok daha fazla yükseldiği görülmektedir ($p < 0,001$).

Deneysel başka bir çalışmada ise tek doz TAA (300 mg/kg) ile indüklenen karaciğer hasarında, TNF-a ve kaspaz-3 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir (El Awdan vd., 2018).

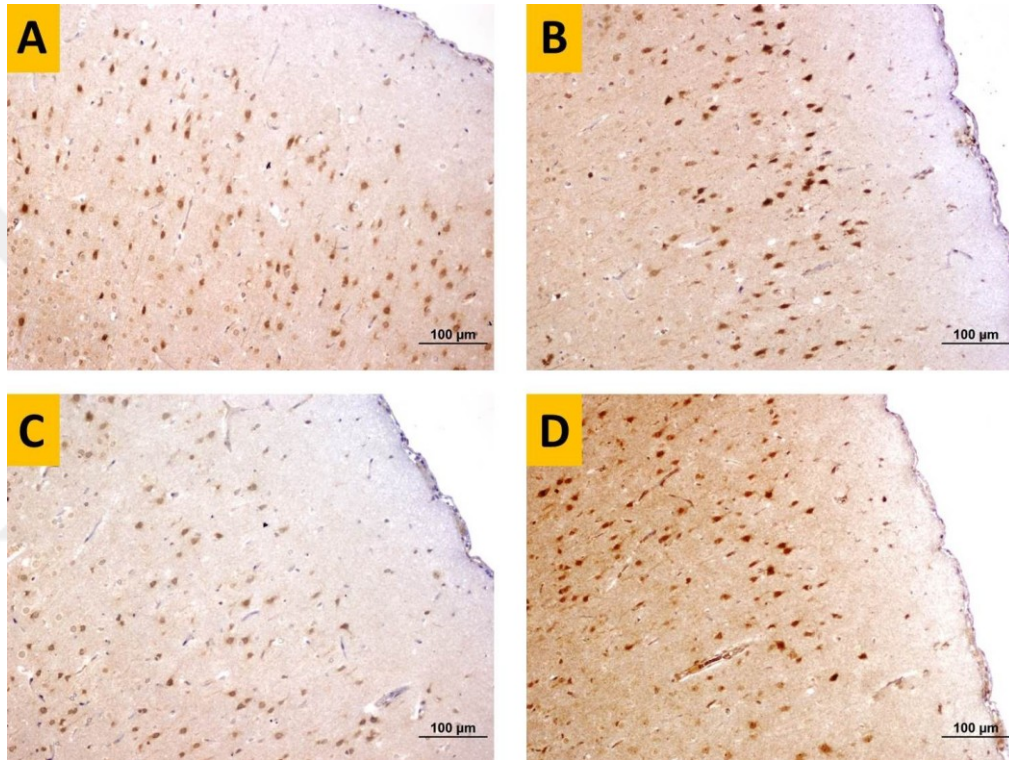


Şekil 5.19. Deney gruplarına ait sıçanların DLDPFK kesitleri. Tüm gruplara ait beyin kesitlerinde tipik beyin korteksi histolojik görüntüleri izlendi. Gruplar arasında belirgin bir histolojik fark görülmemektedir (Şekil 5.19A-D). Kesitler hematoksilin-eozin tekniği ile boyanmıştır. Barların hepsi 50 μm 'dir.

Afifi ve Embaby (2016) yılında yapılan bir çalışmada, oral olarak günde 5 mg/kg kadmiyum (Cd) verilen erkek albino sıçanları 60 günün sonunda sakrifiye edilmişlerdir. Deney sonunda sıçanların beyin korteksi çıkarılmış ve H&E boyasıyla boyanmıştır. Sonuçlara göre, kadmiyum alınan gruptan elde edilen H&E ile boyanan kesitlerin incelenmesi, kontrol grubuna göre korteksin tüm katmanlarında ciddi multifokal histolojik değişiklikler olduğunu göstermektedir. Farklı boyutlarda birçok vakuol, tüm tabakalardaki çoğu hücrenin içinde veya arasında tekli veya çoklu görünür. Bazı bölgeler, özellikle dış granüler ve dış piramidal katmanlar daha hücresel hale gelmektedir. Sinir hücrelerinin

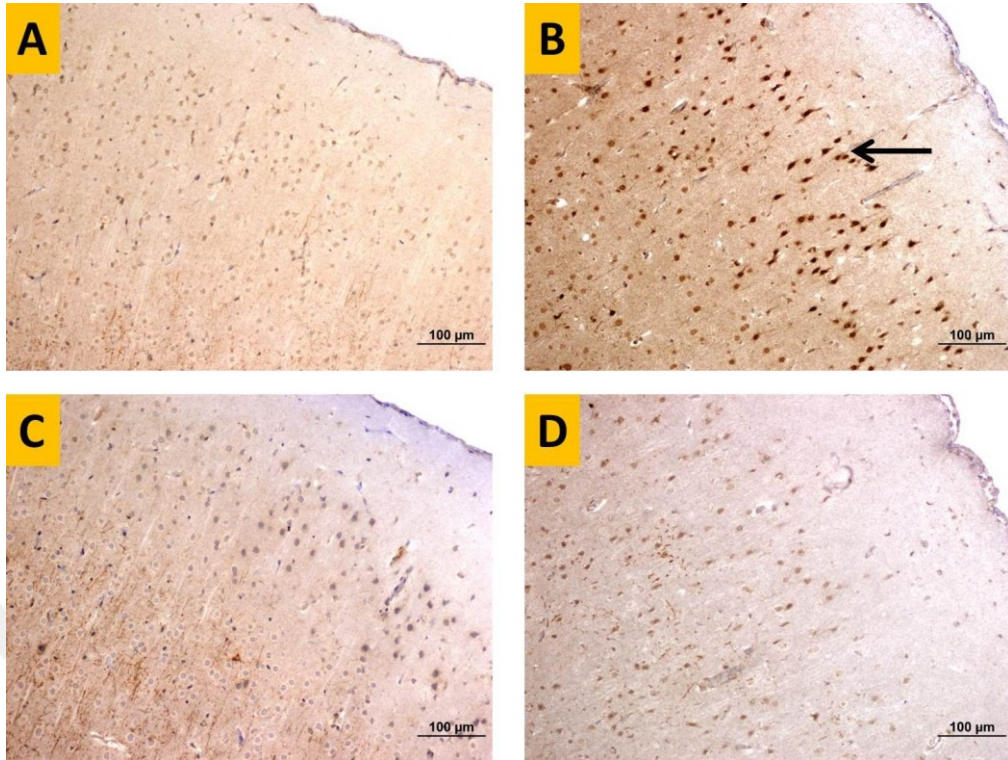
çoğu küçülür ve sinir hücrelerinde periselüler haleler oluşur. Piramidal hücreler şekilsiz hale gelir. Sinir hücreleri ve nöroglia arasındaki nöropil, vakualizasyon gösterir (Afifi ve Embaby, 2016).

DLPFK kesitlerinde H&E sonuçlarına göre (Şekil 5.19), hiçbir grupta belirgin hasar olmadığı görülmektedir.



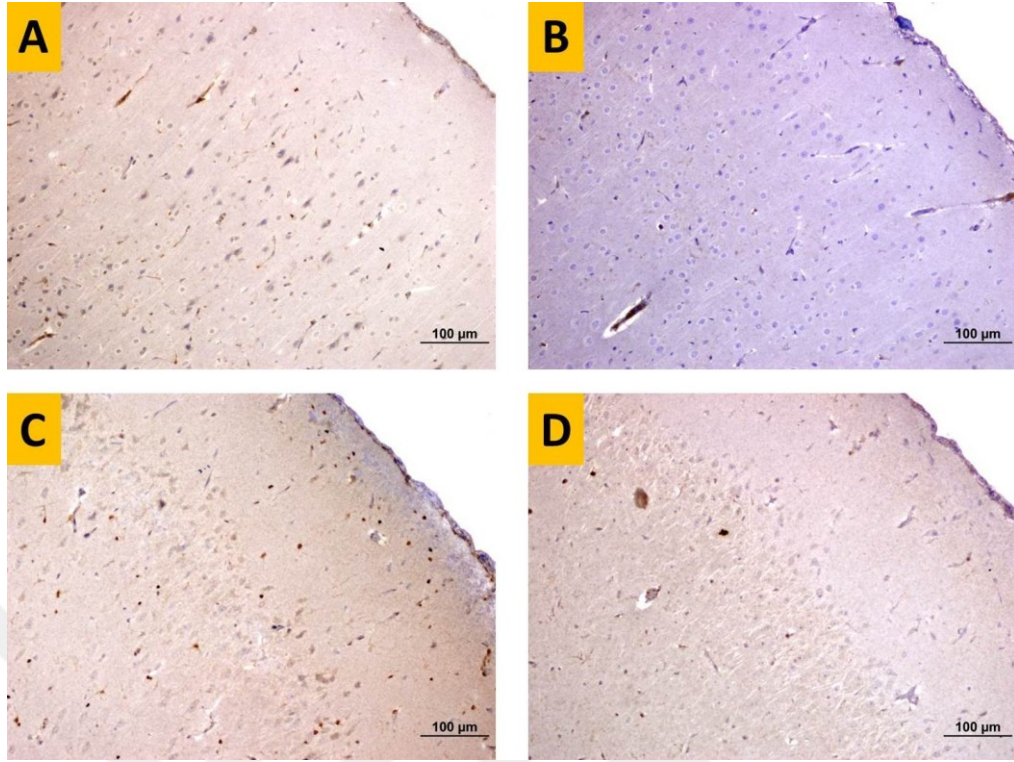
Şekil 5.20. Deney gruplarına ait sıçanların DLPFK kesitlerinde nöronlarda Bcl-2 immünoreaktivitesi. Tüm gruplara ait beyin kesitlerinde nöronlarda kuvvetli pozitif reaksiyonun olduğu ve gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığı görüldü (Şekil 5.20A-D). Barların hepsi 50 µm'dir.

DLPFK kesitlerinde Bcl-2 ihk sonuçlarına göre (Şekil 5.20), tüm gruplarda Bcl-2 boyanmasının olduğu yani hiçbir gruplar arası önemli fark bulunmadığı görülmektedir.



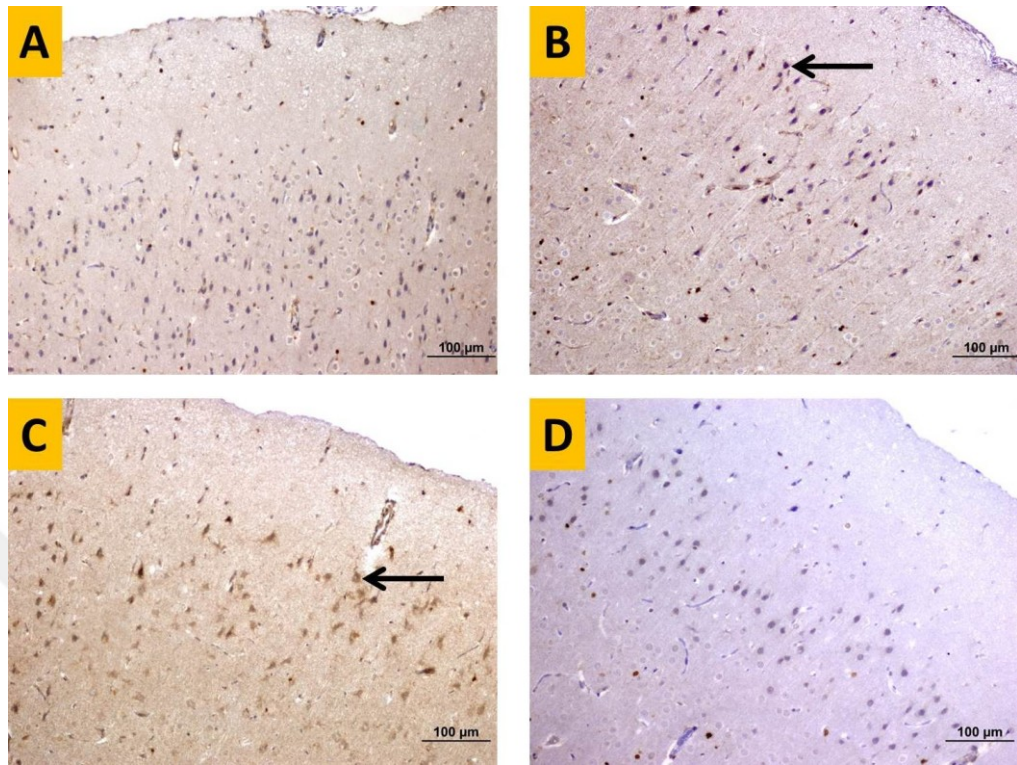
Şekil 5.21. Deney guruplarına ait sıçanların DLPFK kesitlerinde nöronlarda Bax immünoreaktivitesi. Pozitif reaksiyon veren bir nöron (ok) ile gösterilmiştir. Kontrol grubunda nöronlarda zayıf reaksiyon vardır (Şekil 5.21A). Tek başına TAA verilen grupta nöronlarda kuvvetli bir pozitif reaksiyon olduğu gözlenmektedir (Şekil 5.21B). Hem 50 Sm+TAA verilen grupta ve hem de 100 Sm+TAA verilen grupta nöronlarda zayıf reaksiyonlar görülmektedir (Şekil 5.21C-D). Barların hepsi 100 µm'dir.

Pro-apoptotik olan Bax'ın ekspresyonunun ise arttığı Mahvadi vd., (2018) tarafından i.p olarak kadmiyum verilen Wistar ratların frontal kortekslerinde gözlenmiştir (Mahvadi vd., 2018). Benzer şekilde TAA verilen grubun prefrontal korteksinde Bax ekspresyonunun arttığı ve Sm verilen guruplarda ise kontrole benzer şekilde Bax ihk'sının zayıf reaksiyon verdiği çalışmamızda gösterilmiştir (Şekil 5.21).



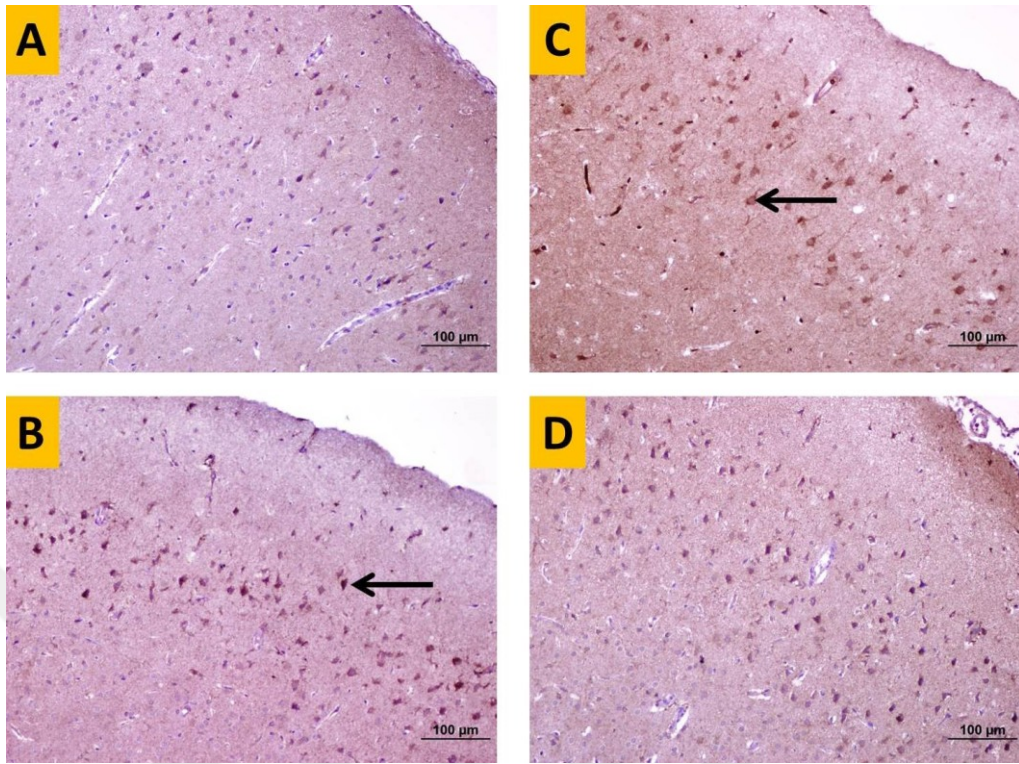
Şekil 5.22. Deney guruplarına ait sıçanların DLPFK kesitlerinde nöronlarda kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Tüm guruplara ait beyin kesitlerinde nöronlarda zayıf reaksiyonların olduğu ve guruplar arasında önemli bir fark bulunmadığı görüldü (Şekil 5.22A-D). Barların hepsi 100 µm'dir.

DLPFK kesitlerinde kaspaz-3 ihk sonuçlarına göre (Şekil 5.22), guruplar arası önemli fark bulunmadığı görülmektedir.



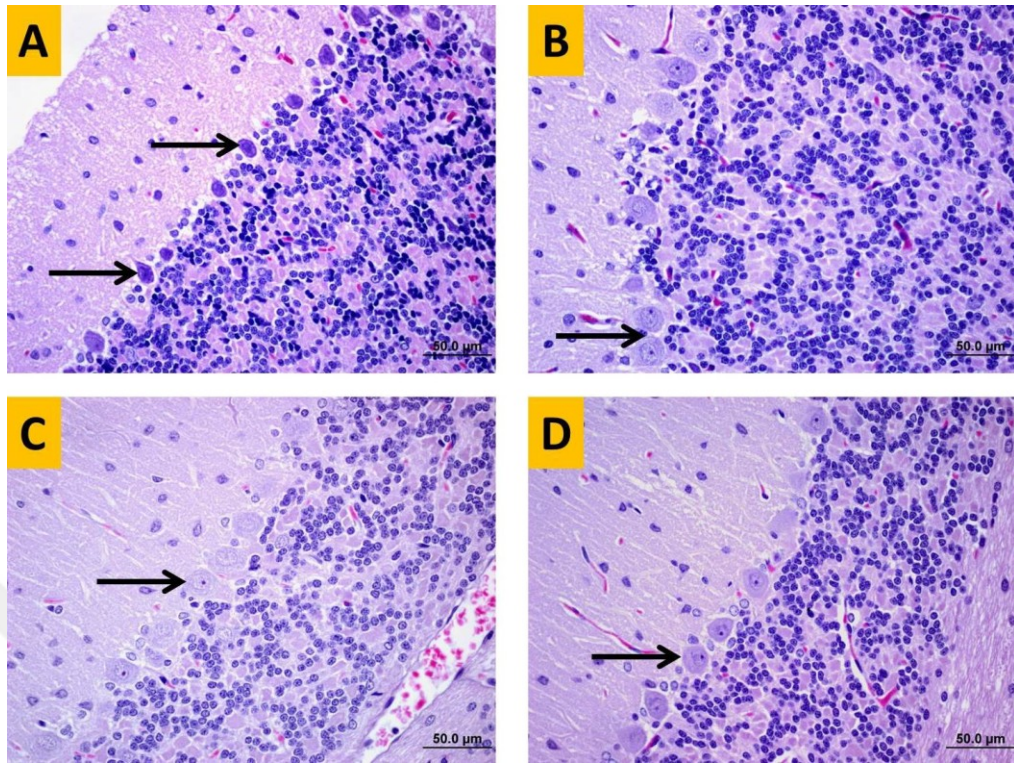
Şekil 5.23. Deney guruplarına ait sıçanların DLPFK kesitlerinde nöronlarda TUNEL immünoaktivitesi. Pozitif reaksiyon veren nöronlardan bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol grubunda nöronlarda zayıf reaksiyon varken (Şekil 5.23A) tek başına TAA verilen grupta kuvvetli pozitif reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.23B). 50 Sm+TAA verilen grupta nöronlarda orta dereceli pozitif reaksiyon görülürken (Şekil 5.23C) 100 Sm+TAA verilen grupta reaksiyonun zayıf dereceye gerilediği saptandı (Şekil 5.23D). Barların hepsi 100 µm'dir.

DLPFK kesitlerinde TUNEL ihk sonuçlarına göre (Şekil 5.23), TAA grubunda DNA hasarının yüksek olduğu, düşük doz Sm ile kombin grupta da TAA grubuna benzer şekilde DNA hasarının yüksek olduğu yani 50 mg/kg Sm'nin beyin hasarını önlemede çok etkili olmadığı görülmektedir. Yüksek doz Sm ile kombin grubun ise kontrol grubuna benzer şekilde DNA hasarının az olduğu görülmektedir.



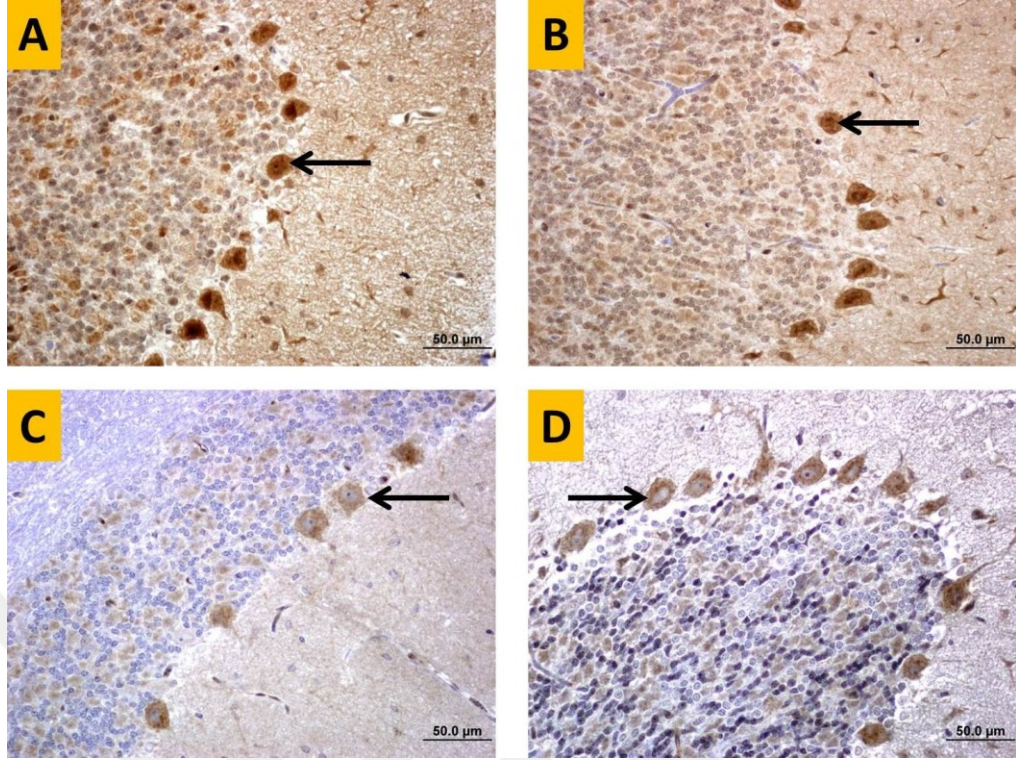
Şekil 5.24. Deney gruplarına ait sıçanların DLPGK kesitlerinde nöronlarda TNF- α immünoreaktivitesi. Pozitif reaksiyon veren nöronlardan bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Kontrol grubunda nöronlarda zayıf reaksiyon varken (Şekil 5.24A) tek başına TAA verilen grupta kuvvetli pozitif reaksiyon olduğu gözlemlendi (Şekil 5.24B). 50 Sm+TAA verilen grupta nöronlarda orta dereceli pozitif reaksiyon görülürken (Şekil 5.24C) 100 Sm+TAA verilen grupta reaksiyonun zayıf dereceye gerilediği saptandı (Şekil 5.24D). Barların hepsi 100 μ m'dir.

DLPGK kesitlerinde TNF- α ihk sonuçlarına göre (Şekil 5.24), TAA ve düşük doz Sm ile kombin grupta hücrelerde inflamasyon olduğu yani 50 mg/kg Sm'nin beyin hasarını önlemede çok etkili olmadığı görülmektedir. Yüksek doz Sm ile kombin grubun ise kontrol grubuna benzer şekilde düşük miktarda inflamasyon olduğu görülmektedir.

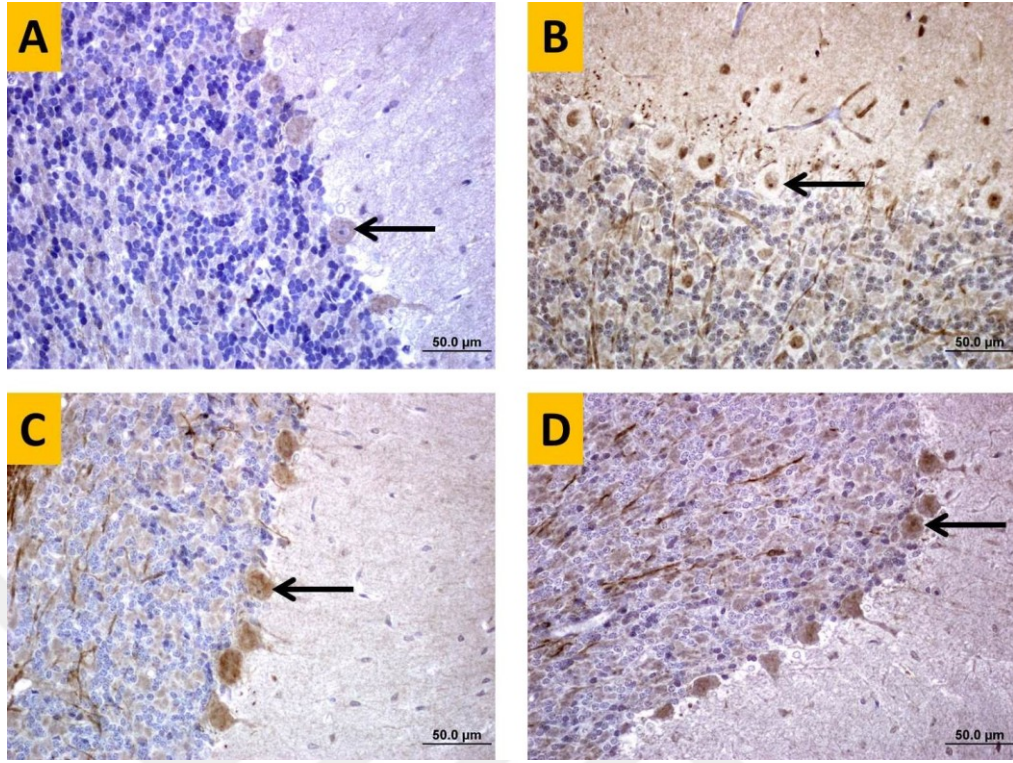


Şekil 5.25. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik kesitleri. Purkinje nöronlarından bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. Tüm gruplara ait beyincik kesitlerinde tipik beyincik korteksi histolojik görüntüleri izlendi. Gruplar arasında belirgin bir histolojik fark görülmemektedir (Şekil 5.25A-D). Kesitler hematoxilin-eozin tekniği ile boyanmıştır. Barların hepsi 50 µm'dir.

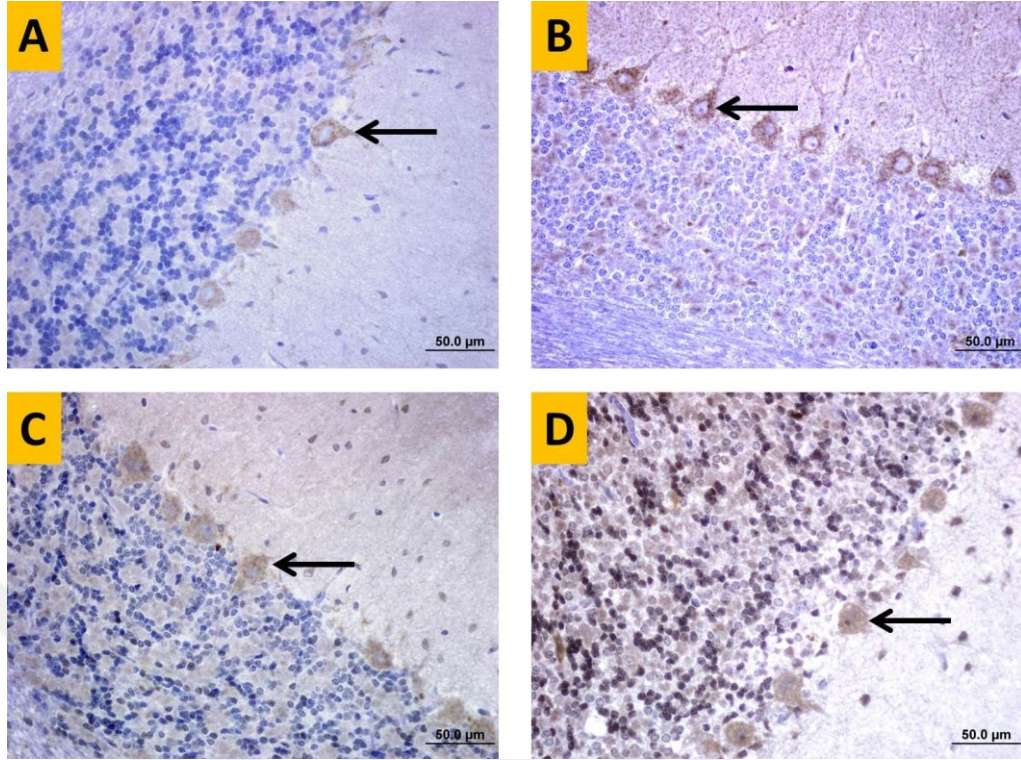
Mostafa ve vd., (2017) yaptıkları çalışmada, erkek Wistar Albino sıçanlarına tek doz 300 mg/kg TAA i.p olarak enjekte etmişlerdir. Tedavi edici madde olarak da vitamin ve biopropolis kullanmışlardır. 30. günde sakrifiye edilen sıçanlardan beyincikleri çıkarılarak hematoxilin eozin boyası ile boyanmıştır. TAA verilen grupta Purkinje hücrelerinde nekroz olduğu tedavi gruplarının ise kontrol grubuna benzer olduğu gösterilmiştir (Mostafa vd., 2017).



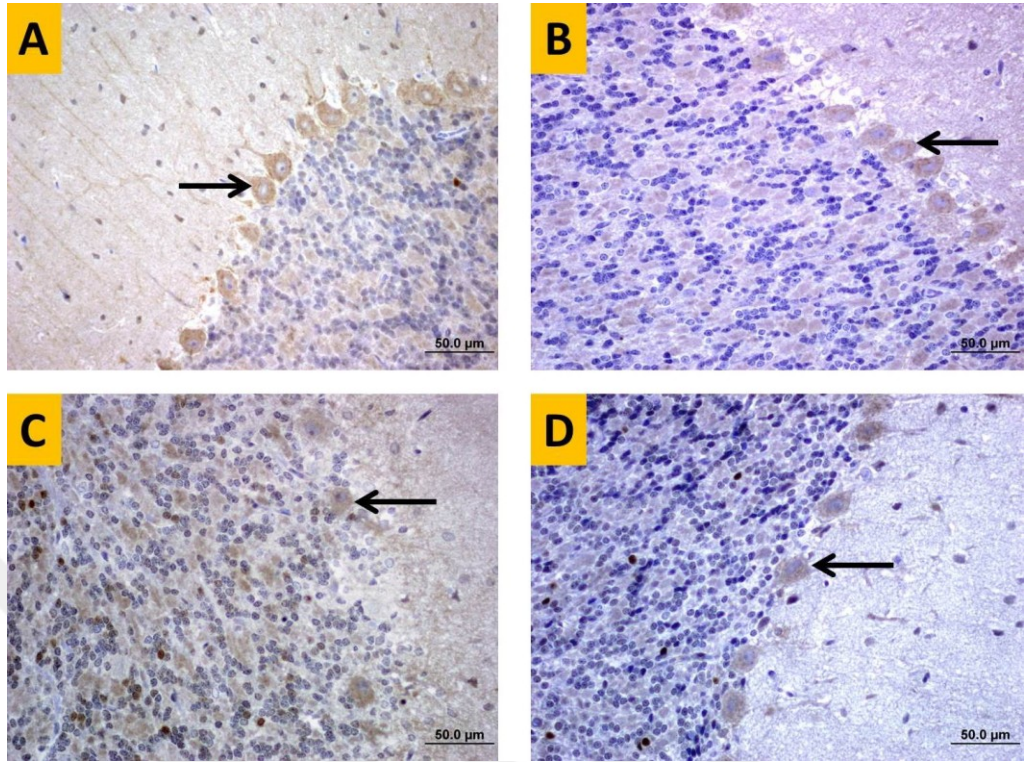
Şekil 5.26. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında Bcl-2 immünoreaktivitesi. Purkinje nöronlarından bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. **A:** Kontrol grubunda, **B:** TAA verilen grupta, **C:** 50 Sm+TAA verilen grupta ve **D:** 100 Sm+TAA verilen grupta kuvvetli pozitif reaksiyonların olduğuna ve gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığına dikkat ediniz. Barların hepsi 50 μm 'dir.



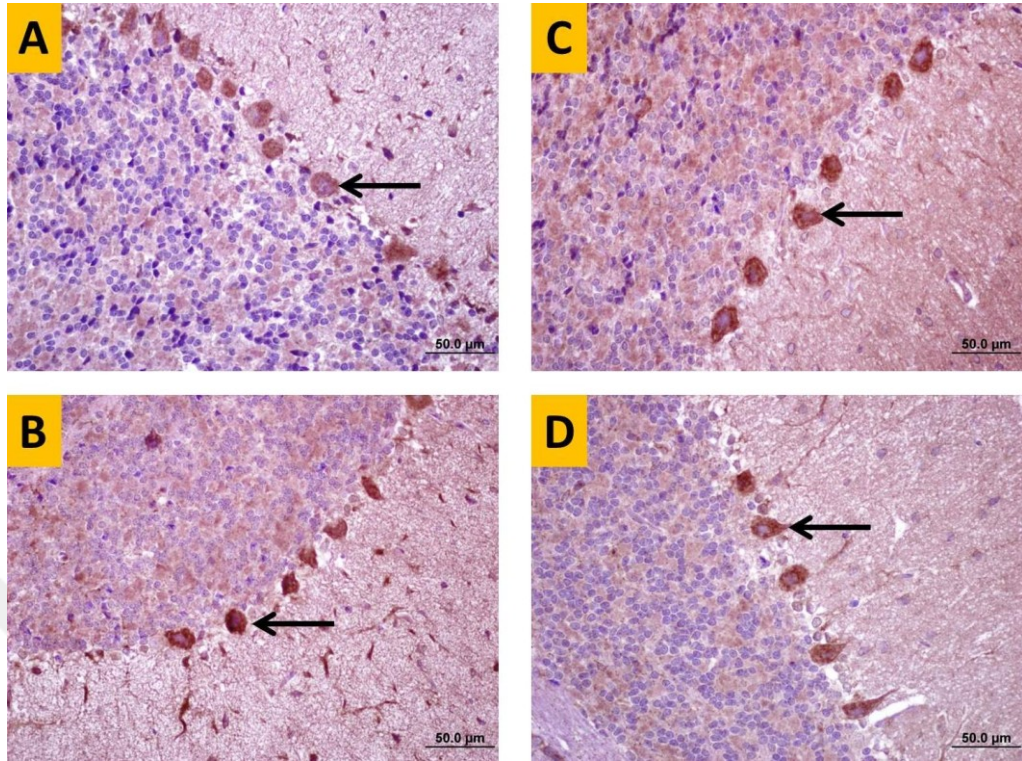
Şekil 5.27. Deney Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında Bax immünoreaktivitesi. Purkinje nöronlarından bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. **A:** Kontrol grubunda, **B:** TAA verilen grupta, **C:** 50 Sm+TAA verilen grupta ve **D:** 100 Sm+TAA verilen grupta zayıf pozitif reaksiyonların olduğuna ve gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığına dikkat ediniz. Barların hepsi 50 µm'dir.



Şekil 5.28. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Purkinje nöronlarından bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. **A:** Kontrol grubunda, **B:** TAA verilen grupta, **C:** 50 Sm+TAA verilen grupta ve **D:** 100 Sm+TAA verilen grupta zayıf reaksiyonların olduğuna ve gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığına dikkat ediniz. Barların hepsi 50 μm 'dir.



Şekil 5.29. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında TUNEL immünoreaktivitesi. Purkinje nöronlarından bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. **A:** Kontrol grubunda, **B:** TAA verilen grupta, **C:** 50 Sm+TAA verilen grupta ve **D:** 100 Sm+TAA verilen grupta zayıf reaksiyonların olduğuna ve gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığına dikkat ediniz. Barların hepsi 50 μm 'dir.



Şekil 5.30. Deney gruplarına ait sıçanların beyincik korteksi kesitlerinde Purkinje nöronlarında TNF- α immünoaktivitesi. Purkinje nöronlarından bazıları (oklar) ile gösterilmiştir. **A:** Kontrol grubunda, **B:** TAA verilen grupta, **C:** 50 Sm+TAA verilen grupta ve **D:** 100 Sm+TAA verilen grupta Purkinje nöronlarının sitoplazmalarında kuvvetli pozitif reaksiyonların olduğuna ve gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığına dikkat ediniz. Barların hepsi 50 μ m'dir.

TAA nedenli HE'nin beyincik Purkinje nöronlarını etkilemediği H&E (Şekil 5.25), Bcl-2 (Şekil 5.26), Bax (Şekil 5.27), kaspaz-3 (Şekil 5.28), TUNEL (Şekil 5.29) ve TNF- α (Şekil 5.30) ihk boyamalarında gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak da kan-beyin bariyerinin heterojen yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wilhem vd., 2016).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hepatik ensefalopati (HE), karaciğer bozukluğuna neden olan serebral fonksiyondaki değişiklikleri tanımlamada kullanılan terimdir. Hepatik hastalık hücrelerin ve dokuların, yapı ya da karaciğer fonksiyonunun bozulduğunu belirtir. HE'yi bazı ilaçlar, toksik bileşikler, alkolün aşırı tüketimi gibi farklı kimyasalların etkisinin yanı sıra biyolojik faktörler ve otoimmün hastalıklar indükleyebilir. Deneysel olarak karbon tetraklorür (CCL₄), tiyoasetamid (TAA) ve D-galaktozamin gibi maddeler karaciğer hasarını oluşturmada kullanılmaktadır. HE'nin oluşum mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ancak son zamanlarda miRNA'ların HE patogenezi belirlemede önemli katkı sağlayabileceği yönünde düşünceler gelişmiştir. Bununla birlikte, TAA ile oluşturulan HE modelinde miRNA'ların rolü ile ilgili benzer bir çalışmaya literatürde daha önce rastlanmamıştır. HE'nin erken teşhisinde miRNA'ların belirteç olarak kullanılabilmesini öngörmekteyiz. Böylece muhtemel erken tedavinin yapılabilmesi mümkün olabilecektir. Diğer taraftan gereksiz ilaç kullanımı ile iş ve ekonomik kaybın önüne geçilmiş olacaktır.

Bitkisel ilaçların çok yönlü etkiye sahip olmaları, bitkiler ve aktif bileşenleri ile ilgili çalışmaların artmasına neden olmuştur. Çağımızın önemli hastalıkları ile mücadelede doğal ürünlerin kullanımını yaygınlaştırmak önemlidir. Ülkemiz bu doğal alternatif bitki kaynakları bakımından oldukça zengindir. Ancak, bu kaynakları yeterince değerlendirecek eğitilmiş insan gücü ve altyapıya sahip değildir. Bu alandaki bilimsel çalışmaların artırılması gerekmektedir. Nitekim, teknolojinin gelişmesi bu bitki kaynaklarından tedavide, gıda ve sağlık sektöründe önemli oranda yararlanılmasının önünü açacaktır.

Deneysel çalışmamızda, silimarin (Sm)'nin TAA nedenli karaciğer ve beyin toksisitesi üzerine etkisi gösterilmiş olup, karaciğerdeki çeşitli miRNA'ların aktivitesi belirlenmiştir. Buna göre karaciğer yenileyici özelliği bilinen Sm'nin beyin hasarını giderme de etkili olduğu gösterilmiştir. Sm'nin karaciğer hasarını gidermede bir ilaç katkı maddesi olarak preparat haline getirilmesi ve hem hastalarda hem de sağlıklı insanlarda bilimsel olarak kullanılabilmesinin sağlanması gerekmektedir.

TAA nedenli HE'de beyincikte herhangi bir hasar görülmemesinin nedeni, kan beyin bariyerinin heterojen yapısından kaynaklandığı düşünölmektedir. TAA'nın dozu ve/veya uygulama süresi arttırılarak beyincikte de hasar oluşturulması mümkündür. Bununla ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, karaciğeri koruduğı bilinen Sm'nin karaciğer hastalıklarının aynısıra HE tedavisinde de kullanılabilceğı ve ilaç protokollerine eklenebileceğı belirlenmiştir. Ancak Sm'nin etken maddelerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan, miRNA analizleri genişletilerek HE tedavisinde epigenetik ilaçların da yer alabileceğı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiology Disease*, 37, 13-25.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiology. Disease*, 37, 13.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E., 2006, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 41–53.
- Abboud, G., Kaplowitz, N., 2007, Drug induced liver injury, *Drug Safety*, 30, 227-294.
- Abdelaziz, R.R., Elkashef, W.F., Said, E. 2015, Tranilast reduces serum IL-6 and IL-13 and protects against thioacetamide-induced acute liver injury and hepatic encephalopathy, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 259-267.
- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010, Liver Anatomy, *Surgical Clinics North America*, 90, 4, 643–653.
- Abul, H., Mathew, T.C., Dashti, H.M., Al-Bader, A., 2002, Level of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Uric Acid in Thioacetamide-Induced Cirrhotic Rats, *Anat. Anatomia Histologia Embryologia*, 31, 66–71.
- Afifi, N.A., Ibrahim, M.A., Galal, M.K., 2018, Hepato-protective influence of quercetin and ellagic acid on thioacetamide induced hepatotoxicity in rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2018 Jun;96(6):624-629.
- Afifi, O.K., Embaby, A.S., 2016, Histological Study on the Protective Role of Ascorbic Acid on Cadmium Induced Cerebral Cortical Neurotoxicity in Adult Male Albino Rats, *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4, 1, 36-45.
- Ahboucha, S., Butterworth, R.F., 2004, Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint, *Metabolic Brain Diseases*, 19, 331–343.
- Almazroo, O.M., Miah, M.K., Venkataramanan, R., 2016, Drug Metabolism in the Liver, *Clinical Liver Disease*, 21, 1, 1-20.
- Alvarez-Buylla. A., Lim, D.A., 2004, For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain, *Neuron*, 41, 683–686.
- Ambros, V., 2004, The functions of animal microRNAs, *Nature*, 431, 7006, 350–355.
- Ann-Charlotte, J., Hanna, A., Cathrine, N., Katarina, K., Karin, R., Karin, vd., 2010, Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization, *Apoptosis*, 15, 527–540.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Antoine, D.J., Dear, J.W., Lewis, P.S., Platt, V., Coyle, J., vd., 2013, Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital, *Hepatology*, 58, 2, 777–787.
- Anonim, 2019, Blood-Brain Barrier, <http://www.wikizero.biz/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvQmxvb2TigJNlcmFpbl9iYXJyaWVy>, 04.01.2018.
- Anonim, 2018, Dorsolateral prefrontal cortex, <http://www.wikizero.biz/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRG9yc29sYXRlcmFsX3ByZWZyb250YWxfY29ydGV>, 12.11.2018.
- Anonim, 2018, Liver segment, <http://www.wikizero.biz/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvTG12ZXJfc2VnbWVudA>, 26.09.2018
- Anonim, 2018, *Silybum marianum*, <http://www.wikizero.biz/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvU2lseWJ1bV9tYXJpYW51bQ>, 14.12.2018.
- Anonim, 2018, Elevated liver enzymes, <https://www.mayoclinic.org/symptoms/elevated-liver-enzymes/basics/definition/sym-20050830>, 11.01.2018.
- Aslan, A., Can, M.I., Kuloglu, T., Baspinar, S. 2016. Milk thistle may induce apoptosis in development of carbon tetrachloride-induced liver DNA damage in rats, *Progress in Nutrition*, 18, 2, 146-151.
- Auguet, T., Vidal, F., Lopez-Dupla, M., Broch, M., Gutierrez, C., Olona, M., Oltra, C., Aguilar, C., Gonzalez, E., Quer, J.C., Sirvent, J.J., Richart, C., 2008, A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease, *Drug and Alcohol Dependence*, 92, 91–99.
- Arataki, K., Hayes, C.N., Akamatsu, S., Akiyama, R., Abe, H., vd., 2013, Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B, *Journal of Medical Virology*, 85, 5, 789–798.
- Arıcı, S., 2008, Toksik Hepatit, *Pamukkale Tıp Dergisi*, 1, 2, 113-119.
- Arrese, M., Eguchi, A., Feldstein, A.E., 2015, Circulating microRNAs: Emerging Biomarkers of Liver Disease, *Seminars Liver Disease*, 35, 43–54.
- Bacon B.R., 2008, Cirrhosis and Its Complications, *Harrison's Principle of Internal Medicine* p, 1971-1980.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bains, J.S., Shaw, C.A., 1997, Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain research. Brain research reviews*, 25, 335–358.
- Bajt, M.L., Cover, C., Lemasters, J.J., Jaeschke, H., 2006, Nucleartranslocation of endonuclease G and apoptosis-inducingfactor during acetaminophen-induced liver cell injury, *Toxicology Science*, 94, 217–225.
- Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin I., vd., 2012, Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases, *Hepatology*, 56, 5, 1946–1957.
- Bardi, D.A., Halabi, M.F., Hassandarvish, P., Rouhollahi, E., Paydar, M., vd., 2014, *Andrographis paniculata* Leaf Extract Prevents Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in rats, *PLoS ONE*, 9, 10, e109424.
- Bartel, D.P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116, 281–297.
- Bartel, D.P., 2009, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136, 2, 215–233.
- Bayramiçli, M., 2005, *Deneysel Mikrocerrahi*, Argos, 6, s.687.
- Benedetti MS, Whomsley R, Poggesi I, Cawello. W., Mathy, F.X., vd., 2009, Drug metabolism and pharmacokinetics, *Drug Metabolism Reviews*, 41, 3, 344–90.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., Bentwich, Z., 2005, Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs, *Nature Genetics*, 37, 766e770.
- Berke, G., 1995, The CTL's kiss of death, *Cell*, 81, 9–12.
- Bernal, W., Hyyrylainen, A., Gerai, A., Audimoolam, V.K., McPhail M.J., 2013, Lessons from look-back in acute liver failure? A single centre experience of 3300 patients, *Journal of Hepatology*, 59, 74-80.
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., Roumier, A., 2007, Microglial control of neuronal death and synaptic properties, *Glia*, 55, 233–238.
- Bihrer, V., Friedrich-Rust, M., Kronenberger, B., Forestier, N., Haupenthal, J., vd., 2011, Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection, *The American Journal of Gastroenterology*, 106, 9, 1663–1669.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P.N., Shaw, P.J., 2009, Astrocyte Function and Role in Motor Neuron Disease: A Future Therapeutic Target?, *Glia*, 57, 1251–1264.
- Bosoi, C.R., Rose, C.F., 2009, Identifying the direct effects of ammonia on the brain, *Metabolic Brain Disease*, 24, 95–102.
- Bouzier-Sore, A.K., Merle, M., Magistretti, P.J., Pellerin, L., 2002, Feeding active neurons: (Re)emergence of a nursing role for astrocytes, *Journal of Physiology-Paris*, 96, 273–282.
- Boya, P., Kroemer, G., 2008, Lysosomal membranepemeabilization in cell death, *Oncogene*, 27, 6434–6451.
- Broulac-Sage, P., Balabaud, C., 2004, Toxic and drug induced disorders of the liver, Saunders, p.833–61.
- Bruck, R., Aeed, H., Avni, Y., Shirin, H., Matas, Z., 2004, Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stres and protects against thioacetamide induced liver damage in rats, *Journal of Hepatology*, 40, 86–93.
- Brzoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Pilat-Marcinkiewicz, B., Sawicki, B., 2003, Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol, *Alcohol Alcohol*, 38, 2-10.
- Buckner, R.L., Krienen, F. M., Castellanos, A., Diaz, J.C., Yeo, B.T., 2011, The organization of the human cerebellum estimated by intrinsic functional connectivity, *Journal of Neurophysiology*, 106, 5, 2322–2345.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1999, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.*, W. B. Saunders Company, p1125-1177.
- Capocaccia, L., Cangiano, C., Cascino, A., Calcaterra, V., Cardelli, P., Rossi, F.F., 1979, Influence of phenylethanolamine on octopamine plasma determination in hepatic encephalopathy, *Clinica Chimica Acta*, 93, 371–376.
- Cascales, M., Feijoo, B., Cerdan, S., Cascales, C., Santos-Ruiz, A., 1979, The effect of thioacetamide on urea cycle enzymes of rat liver, *The Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 17, 129–132.
- Catheline, G., Touquet, B., Lombard, M.C., Poulain, D.A., Theodosis, D.T., 2006, A study of the role of neuro-glial remodeling in the oxytocin system at lactation, *Neuroscience*, 137, 309–316.
- Cauli, O., Llansola, M., Agustí, A., Rodrigo, R., Hernández-Rabaza, V., vd., 2013, Cerebral edema is not responsible for motor or cognitive deficits in rats with hepatic encephalopathy, *Liver International*, 34, 3, 379-387.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cermelli, S., Ruggieri, A., Marrero, J.A., Ioannou, G.N., Beretta, L., 2011, Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, *PLoS One*, 6, 8, e23937.
- Cervinkova, Z., Drahota, Z., 1998, Enteral administration of lipid emulsions protects liver cytochrome c oxidase from hepatotoxic action of thioacetamide, *Physiological Research*, 47, 151–154.
- Chan, R.C.K., Shum, D., Touloupoulou, T., Chen, E., 2008, Assessment of executive functions: Review of instruments and identification of critical issues, *Archives of Clinical Neuropsychology*, 2, 23, 2, 201–216.
- Chang, H.Y., Yang, X., Baltimore, D., 1999, Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: Requirement of FADD binding for apoptosis but not JunN-terminal kinase activation, *Proceedings of the National Academy of Science*, 96, 1252–1256.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J.L., Maeda, S., vd., 2006, The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF alpha-induced cell death by inducing c-FLIP (L) turnover, *Cell*, 124, 601–613.
- Chekulaeva, M., Filipowicz, W., 2009, Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells, *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 3, 452–460.
- Cheung, O. Puri, P., Eicken, C., Contos, M.J., Mirshahi, F., 2008, Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic microRNA expression, *Hepatology*, 48, 1810–1820.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mallowney, C.E., Hell, J.W., vd., 2005, Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis, *Cell*, 120, 421–433.
- Cieslik, E., 2013, Is There "One" DLPFC in Cognitive Action Control? Evidence for Heterogeneity From Co-Activation-Based Parcellation, *Cerebral Cortex*, 23, 11, 2677–2689.
- Clarke, J.D., Sharapova, T., Lake, A.D., Blomme, E., Maher, J., vd., 2014, Circulating microRNA 122 in the methionine and cholinedeficient mouse model of non-alcoholic steatohepatitis, *Journal of Applied Toxicology*, 34, 6, 726–732.
- Clayton, B.E., Round, M., 1994, *Chemical Pathology and the Sick Child*, Blackwe Scientific Publications, p.20-192.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Collins, M.L., Nelson, C.A., 2001, Handbook of developmental cognitive neuroscience, MIT Press, p.105-132.
- Corazza, N., Jakob, S., Schaer, C., Frese, S., Keogh, A., vd., 2006, TRAIL receptor-mediated JNK activation and Bim phosphorylation critically regulate Fas mediated liver damage and lethality, *Journal of Clinical Investigation*, 116, 2493–2499.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Fausto, N., Nelso, F., Robbins, SL., vd., 2005, Robbins and Cotran pathologic basis of disease, Elsevier Saunders, p878.
- Cronk, J.C., Kipnis, J., 2013, Microglia - the brain's busy bees, *F1000Prime Reports*, 5, 53.
- Cullen, B.R., 2006, Viruses and microRNAs, *Nature Genetics*, 38, 25–30.
- Czaja, M.J., 2003, The future of GI and liver research: editorialperspectives III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284, G875–G879.
- D'Angelica, M., Fong, Y., 2004, The liver, Elsevier Saunders, p1513-1569.
- David, C., Rodrigues, G., Bona, S., Meurer, L., Gonzalez-Gallego, J., vd., 2011, Role of Quercetin in Preventing Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats, *Toxicologic Pathology*, 39, 949-957.
- Dehmlow, C., Erhard, J., de Groot, H., 1996, Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin, *Hepatology*, 23, 749-754.
- Dixit, N., Baboota, S., Kohli, K., Ahmed, S., Ali, J., 2007, Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approach, *Indian Journal of Pharmacology*, 39, 172-179.
- Doya, K., 2000, Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control, *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 6, 732–739.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J., 2000, Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species, *European Journal of Biochemistry*, 267, 4912–4916.
- Dubin, P.H., Yuan, H., Devine, R.K., Hynan, L.S., Jain, M.K., vd., 2014, Acute Liver Failure Study Group. Micro-RNA-122 levels in acute liver failure and chronic hepatitis C, *Journal of Medical Virology*, 86, 9, 1507–1514.
- Duve, C., 1959, Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles, Ronald Press, p128–159.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duve, C., 1983, Lysosomes revisited, *European Journal of Biochemistry*, 137, 391–397.
- El Awdan, S.A., Amin, M.M., Hassan, A., 2011, Cilostazol attenuates indices of liver damage induced by thioacetamide in albino rats through regulating inflammatory cytokines and apoptotic biomarkers, *European Journal of Pharmacology* 822, 168-176.
- Emre, A., 2002, Karaciğerin Cerrahi Anatomisi, Nobel Tıp Kitabevleri, s1083-1086.
- Ersoy, O., 2012, Karaciğer Enzim Yüksekliğinin Değerlendirilmesi, *Ankara Medical Journal*, 12, 3, 129-135.
- Esau, C. Davis S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., vd., 2006 miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting, *Cell Metabolism*, 3, 87–98.
- Falasca, K., Ucciferri, C., Dalessandro, M., Zingariello, P., Mancino, P., vd., 2006, Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 36, 144–150.
- Fausto, N., Campbell, J.S., 2003, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation, *Mechanisms of Development*, 120, 117-130.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., vd., 1998, Hepatic encephalopathy – definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998, *Hepatology*, 35, 716–721.
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2004, Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 24, 722–732.
- Figlewicz, DP., Ioannou, G., Jay, JB., Kittleson, S., Savard, C., vd., 2009, Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat, *Physiology Behavior*, 98, 5, 618-24.
- Fine, E.J., Ionita, C.C., Lohr, L., 2002. The history of the development of the cerebellar examination, *Seminars in Neurology*, 22, 4, 375–84.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R., 2008, Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections, *Cold Spring Harbor Protocols*, 1 2008, pdb.prot4986.
- Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A., 1948, Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide, *Science*, 108, 626–628.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D., 2002, Pharmacology of Silymarin, *Clinical Drug Investigation*, 22, 1, 51-65.
- Fu, H.; Lin, M.; Muroya, Y.; Hata, K.; Katsumura, Y.; Yokoya, A.; Shikazono, N.; Hatano, Y. Free radical scavenging reactions and antioxidant activities of silybin: Mechanistic aspects and pulse radiolytic studies. *Free Radic. Res.* 2009, 43, 887–897.
- Fuchs, E., Tumber, T., Guasch, G., 2004, Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche, *Cell*, 116, 769–778.
- Garwood, J., Rigato, F., Heck, N., Faissner, A., 2001, Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/phosphacan—Structuring the neural extracellular matrix during development and repair, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 19, 51–64.
- Gegg, M.E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J.P., Clark, J.B., Moncada vd., 2003, Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: Implications for neuroprotection/neurodegeneration?, *Journal of Neurochemistry*, 86, 228–237.
- Ghez, C., Fahn, S., 1985, The cerebellum, *Principles of Neural Science*, Elsevier, p.502–522.
- Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., 2010, Membrane transporters in drug development, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 3, 215–36.
- Goldman-Rakic, P.S., 1995, Architecture of the Prefrontal Cortex and the Central Executive, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 769, 71–83.
- Gomez-Lechon, M.J., Tolosa, L., Castell, J.V., Donato, M.T., 2010, Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP Project, *Toxicology in Vitro*, 24, 1879–1889.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., vd., 1995, In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note, *Hepatology*, 21, 1465–1468.
- Guyton A. C. , Hall J. E. *Tıbbi Fizyoloji Bölüm 64: 13th de.* 2017; 827-29.
- Hahn, M., Massen, O., Nencki, M., 1883, Die Eck's Fistel zwischen der unteren Holvene und der Pfortader und ihre Folgen fuer den Organismus, *Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1883, 13, 161-210.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hajovsky, H., Hu, G., Koen, Y., Sarma, D., Cui, W., vd., 2012, Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes, *Chemical Research in Toxicology*, 25, 1955–1963.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007, The tripartite synapse: Roles for gliotransmission in health and disease, *Trends in Molecular Medicine*, 13, 54–63.
- Hamilton, J.P., Potter, J.J., Koganti, L., Meltzer, S.J., Mezey, E., 2014, Effects of vitamin D3 stimulation of thioredoxin-interacting protein in hepatocellular carcinoma, *Hepatology research*, 44, 1357–1366.
- Hampton, R.Y., 2000, ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins, *Current Biology*, 10, R518–R521.
- Hanisch, U.K., Kettenmann, H., 2007, Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain, *Nature Neuroscience*, 10, 1387–1394.
- Haussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F., Vom, D.S., 2000, Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?, *Journal of Hepatology*, 32, 1035–1038.
- Haydon, P.G., 2001, GLIA: Listening and talking to the synapse, *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 185–193.
- Herculano-Houzel, S., 2010, Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons, *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 12.
- Hernández-Goñi, P., Tirapu-Ustárrroz, J., Iglesias-Fernández, L., Luna-Lario, P., 2010, The role of the cerebellum in the regulation of affection, emotion and behavior, *Revista de Neurología*, 51, 10, 597–609.
- Hodos, W., (2009), *Evolution of Cerebellum*, *Encyclopedia of Neuroscience*, Springer, p.1240–1243.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., vd., 2016, Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models, *Science*, 352, 712–716.
- Hoshi, E., 2006, Functional specialization within the dorsolateral prefrontal cortex: a review of anatomical and physiological studies of non-human primates, *Neuroscience Research*, 54, 2, 73–84.
- Hsu, S.H., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., 2012, Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver, *Journal of Clinical Investigation*, 122, 2871–2883.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, W.L., Li, Q.H., Huang, Y.X., Xie, Y.F., Xu, J.H., vd., 2018, Protective effects of silymarin on triptolide-induced acute hepatotoxicity in rats, *Molecular Medicine Reports*, 17, 1, 789–800.
- Hussaini, S.H., Farrington, E.A., 2007, Idiosyncratic drug induced liver injury: an overview, *Expert Opinion Drug Safety*, 6, 673-684.
- Ichimura, R., Mizukami, S., Takahashi, M., Taniai, E., Kemmochi, S., 2010, Disruption of Smad-dependent signaling for growth of GST-P-positive lesions from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 246, 128-140.
- Ingawalea, D.K., Mandlik, Naik, S.R., 2014, Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion, *Environmental toxicology and pharmacology*, 37, 118–133.
- Ionescu, C., Caira, M.R., 2005, *Drug metabolism: current concepts*, Springer, p.41-170.
- Iwama, H., Kato, K., Imachi, H., Murao, K., Masaki, T., 2013, Human microRNAs originated from two periods at accelerated rates in mammalian evolution, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 613e626.
- İliçin, G., Ünal, S., Biberoğlu, K., Akalın, S., Süleymanlar, G., 1996, *Temel İç Hastalıkları, Güneş Kitapevi*, 1077-1167.
- Jakel, S., Dimoui L., 2017, Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 11, 24.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A, Pessayre, D., vd., 2002, Mechanisms of hepatotoxicity, *Toxicology Science*, 65, 166-176.
- Jeschke, M.G., Gauglitz, G.G., Song, J., Kulp, G.A., Finnerty, C.C., vd., 2009, Calcium and ER stress mediate hepatic apoptosis after burn injury, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 1857–1865.
- Jeschke, M.G., Mlcak, R.P., Finnerty, C.C., Herndon, D.N., 2007, Changes in liver function and size after a severe thermal injury, *Shock*, 28, 172–177.
- Ji, F., Yang, B., Peng, X., Ding, H., You, H., vd., 2011, Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *Journal of Viral Hepatitis*, 18, 7, e242–e251.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Junquera, C., Carneiro, J., Kelly, R.O., 1998, Sindirim Kanalına Bağlı Bezler, Temel Histoloji Konu ve Atlas, (Çev. Solakoğlu, S., Erdoğan, A., Mutlu, H.S.), 8, s.295-348.
- Kan, Z., Ivancev, K., Lunderquist, A., McCuskey, P.A., McCuskey, R.S., vd., 1995, In vivo microscopy of hepatic metastases: dynamic observation of tumor cell invasion and interaction with Kupffer cells, *Hepatology*, 21, 487-494.
- Kaplan, J.T., Gimbel, S.I., Harris, S., 2016, Neural correlates of maintaining one's political beliefs in the face of counterevidence, *Nature: Scientific Reports*, 1-11.
- Kaplowitz, N., 2004, Drug induced liver injury, *Clinical Infectious Diseases*, 38, 544-548.
- Karagül, H., Fidancı, UR., Altıntaş, A., Sel, T., 2000, Klinik Biyokimya, Medisan Yayıncılık, s.448.
- Katz, G.G., Shear, N.H., Malkiewicz, I.M., Valentino, K., Neuman, M.G., 2001, Signaling for ethanol-induced apoptosis and repair in-vitro, *Clinical Biochemistry*, 34, 219-227.
- Ke, C., Poon, W.S., Ng, H.K., Pang, J.C., Chan, Y., 2001, Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats, *Neuroscience Letters*, 301, 21-24.
- Keaney, J., Campbell, M., 2015, The dynamic blood-brain barrier, *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 282, 4067-4079.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011, Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91, 461-553.
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snøve, O., Rossi, J.J., 2008, MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 42, 16230-16235.
- Kim, S.U., de Vellis, J., 2005, Microglia in health and disease, *Journal of Neuroscience Research*, 81, 302-313.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 1997, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275, 1132-1136.
- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H., Makuuchi, M., 1999, A comparative study of the anatomy of rat and human livers, *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 6, 171-175.
- Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I., Zimmers, T.A. 2003, Liver Regeneration. *Journal of the American College of Surgeons*, 197, 634-59.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Köberle, V., Kronenberger, B., Pleli, T., Trojan, J., Imelmann, E., vd., 2013, Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma, *European Journal of Cancer*, 49, 16, 3442–3449.
- Kraft, A.D., Johnson, D.A., Johnson, J.A., 2004, Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tertbutylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult, *Journal of Neuroscience*, 24, 1101-1112.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenborg, L., vd., 2005, Combinatorial microRNA target predictions, *Nature Genetics*, 37, 5, 495–500.
- Kreutzberg, G.W., 1996, Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, *Trends Neuroscience*, 19, 312–318.
- Krol, S., Macrez, R., Docagne, F., Defer, G., Laurent, S., M. vd., 2012, Therapeutic benefits from nanoparticles: the potential significance of nanoscience in diseases with compromise to the blood brain barrier, *Chem. Rev.* 113, 1877-1903.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., 2005, Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’, *Nature*, 438, 685–689.
- Kunutsor, S.K., 2016, Gamma-glutamyl transferase-friend or foe within?, *Liver International*, 36, 12, 1723-1734.
- Kurose, I., Higuchi, H., Miura, S., Saito, H., Watanabe, N., vd., 1997, Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication, *Hepatology*, 25, 368–378.
- Lafortune, M., Madore, F., Patriguin, H., 1991, Segmental anatomy of the liver, *Radiology*, 181, 443- 448.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science*, 294, 853–858.
- Lambou-Gianoukos, S., Heler, S.J., 2008, Lithogenesis and metabolism, *Surgical Clinics of North America*, 88, 6, 1175-94.
- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., vd., 2010, Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327, 198–201.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001, An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 294, 858–862.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lecomte, J., 1975, Pharmacologic properties of silybin and silymarin, *Revue Medicale De Liege*, 30, 110-114.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001, An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862–864.
- Lee, S.W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., vd., 2003, SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier, *Nature Medicine*, 9, 900-906.
- Li, C.C., Hsiang, C.Y., Wu, S.L., Ho, T.Y. 2012, Identification of novel mechanisms of silymarin on the carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice by nuclear factor- κ B bioluminescent imaging-guided transcriptomic analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1568–1575.
- Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L., Gage, F.H., 2004, Neurogenesis in the adult brain: New strategies for central nervous system diseases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 399-421.
- Llinas, R.R., Walton, K.D., Lang, E.J., 2004, *The Synaptic Organization of the Brain*, Oxford University Press, p. 271-311.
- Lotkova, H., Cervinkova, Z., Kucera, O., Rousar, T., Krivakova, P., 2007, S-Adenosylmethionine exerts a protective effect against thioacetamide-induced injury in primary cultures of rat hepatocytes, *Alternatives to Laboratory Animals*, 35, 363–371.
- Lozeva, V., Montgomery, J.A., Tuomisto, L., Rocheleau, B., Pannunzio, M., vd., 2004, Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis, *Journal of Hepatology*, 40, 742–748.
- Luedde, T., Schwabe, R.F., 2011, NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8, 108–118.
- Luper, S., 1998, A review of plants used in the treatment of liver diseases, *Alternative Medicine Review*, 410-421.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., Bright, N.A., 2007, Lysosomes: fusion and function, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 622–632.
- Mahvadi, S., Khodarahmi, P., Roodbari, N.H., 2018, Effects of cadmium on Bcl-2/ Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus, *Human & Experimental Toxicology*, 37, 3, 321-328..

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mallory, A.C., Vaucheret, H., 2006, Functions of microRNAs and related small RNAs in plants, *Nature Genetics*, 38, S31–36.
- Manto, M., Mariën, P., 2015, Schmahmann's syndrome-identification of the third cornerstone of clinical ataxiology, *Cerebellum & Ataxias*, 2, 2.
- Marchesini, G., Fabbri, A., Bianchi, G., Brizi, M., Zoli, M., 1996, Zinc supplementation and amino acid-nitrogen metabolism in patients with advanced cirrhosis, *Hepatology*, 23, 1084-1092.
- Mas, A., 2006, Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to treatment, *Digestion*, 73, 86-93.
- Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto A, vd., 2001, CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294, 1354-1357.
- McCance, K., Huether, S.E., 2006, Alterations in Immunity and Inflammation, *Pathophysiology The Biologic Basis For Disease in Adult and Children*, Elsevier Mosby, 264-265.
- Miller, B.L., Cummings, J.L., 2007, *The Human Frontal Lobes: Functions and Disorders*, The Guilford Press, p.355.
- Minami, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Omura, K., Kanki, M., Horinouchi, A., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y., Urushidani, T., 2014, miRNA expression atlas in male rat, *Scientific Data*, 1, 140005.
- Mohri, T. Nakajima, M., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y., vd., 2010, Human CYP2E1 is regulated by miR-378, *Biochemical Pharmacology*, 79, 1045–1052.
- Mokry, J., Cizkova, D., Osrerreicher, J., 2004, Subependymal zone: Immunohistochemically distinct compartment in the adult mammalian forebrain, *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 47, 235-242.
- Moore, K.L., 1992, *Clinically Oriented Anatomy*, Wiliams & Wilkins, p.127-242.
- Morgagni, G.B., *De sedibus, et causis morborum per anatomen indagatis*, Venezia: typographia Remondiniana, 1761.
- Moss, E.G., Lee, R.C., Ambros, V., 1997, The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA, *Cell*, 88, 637-646.
- Mumtaz, K., Ahmed, U.S., Abid, S., Baig, N., Hamid, S., vd., 2010, Precipitating factors and the outcome of hepatic encephalopathy in liver cirrhosis, *Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 20, 514-518.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., vd., 1996, FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex, *Cell*, 85, 817-827.
- Mylius, V., Ayache, S.S., Ahdab, R., Farhat, W.H., Zouari, H.G., vd., 2013. Definition of DLPFC and M1 according to anatomical landmarks for navigated brain stimulation: inter-rater reliability, accuracy, and influence of gender and age, *NeuroImage*, 78: 224-32.
- Naik, S.R., 2003, Antioxidants and their role in biological functions: an overview, *Indian Drugs*, 40, 501-516.
- Naji, K.M., Al-Shaibani, E.S., Alhadi, F.A., Al-Soudi, S.A., D'souza, M.R. 2017, Hepatoprotective and antioxidant effects of single clove garlic against CCl₄-induced hepatic damage in rabbits, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 411.
- Narci, C., Teoh, G.C., 2006, Farrell. *Liver Disease Caused by Drugs*, Saunders, 1807-1843.
- Nayrac, P., 1961, Troubles neurologiques au cours des maladies du foie. Reports at the VII International Congress of Neurology, Roma: Società Grafica Romana.
- Neuman, M.G., Brenner, D.A., Rehermann, B., Taieb, J., Chollet-Martin, S., vd., 2001, Mechanisms of alcoholic liver disease: Cytokines, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2, 251S-253S.
- Neuman, M.G., Shear, N.H., Bellentani, S., Tiribelli, C., 1998, Role of cytokines in ethanol-induced cytotoxicity *in-vitro* in HepG2 cells, *Gastroenterology*, 115, 157-166.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., vd., 1995, Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, *Nature*, 37, 37-43.
- Nicotera, P., Bellomo, G., Orrenius, S., 1990, The role of Ca₂⁺ in cell killing, *Chemical Research in Toxicology*, 3, 484-494.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F., 2005, Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-1318.
- Obermeier, B., Daneman, R., Ransohoff, R.M., 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19, 1584-1596.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oja, S.S., Saransaari, P., Korpi, E.R., 2017, Neurotoxicity of Ammonia, *Neurochemical Research*, 42, 3, 713-720.
- Oria, M., Chatauret, N., Chavarria, L., Romero-Giménez, J., Palenzuela, L., vd., 2010, Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis, *Hepatology*, 52, 2077–2085.
- Pan, G., O'Rourke, K., Dixit, V.M., 1998, Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5841-5845.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., vd., 1994, Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling, *Nature*, 369, 744-747.
- Parri, H.R., Crunelli, V., 2001, Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes in situ, *Neuroreport*, 12, 3897-3900.
- Pepping, J., 1999, Milk thistle: *Silybum Marianum*, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 56, 1195-1197.
- Pineau, I., Sun, L., Bastien, D., Lacroix, S., 2010, Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88- dependent fashion, *Brain, Behavior, and Immunity*, 24, 540-553.
- Pirola, C.J., Fernández-Gianotti, T., Castaño, G.O., Mallardi, P., San Martino, J., vd., 2014, Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis, *Gut*, 64, 5, 800-12.
- Pocok, G., Richards, C.D., 1999, *Human Physiology: The Basis of Medicine*, Oxford University Press, 416-417.
- Poordad F.F., 2007, Review article: the burden of hepatic encephalopathy, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25, 3-92.
- Povero, D., Eguchi, A., Niesman, I.R., Andronikou, N., du Jeu, E.M., vd., 2013, Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells, *Science Signaling*, 6, 296, ra88
- Pradhan, S.C., Girish, C., 2006, Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine, *Indian Journal of Medical Research*, 124, 491-504.
- Purves, D., 2011, Dale Purves, ed. *Neuroscience*, Sinauer. p.417-423.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qi, P., Cheng, S.Q., Wang, H., Li, N., Chen, Y.F., vd., 2011, Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS ONE*, 6, 12, e28486.
- Ramachandran, A., Lebofsky, M., Baines, C.P., Lemasters, J.J., Jaeschke, H., 2011, Cyclophilin, D Deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury, *Free Radical Research*, 45, 156-164.
- Ramadori, G., Armbrust, T., 2001, Cytokines in the liver, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13, 777-784.
- Rapp, B., 2001, *The Handbook of Cognitive Neuropsychology: What Deficits Reveal about the Human Mind*, Psychology Press, p.481.
- Reif, S., Aeed, H., Shilo, H., Reich, R., Kloog, Y., vd., 2004, Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid, *Journal of Hepatology*, 41, 235-241.
- Reuben, A., Tillman, H., Fontana, R.J., Davern, T., McGuire, B., 2016, Outcomes in adults with acute liver failure between 1998 and 2013: an observational cohort study, *Annals of Internal Medicine*, 164, 724-32.
- Riordan, S.M., Williams, R., 1997, Treatment of hepatic encephalopathy, *New England Journal of Medicine*, 337, 473-479.
- Ron, D., Walter, P., 2007, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nature Review Molecular Cell Biology*, 8, 519-529.
- Saito, C., Lemasters, J.J., Jaeschke, H., 2010, c-Jun N-terminalkinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity, *Toxicology Applied Pharmacology*, 246, 8-17.
- Saldinger, P.F., Blumgart, L.H., 2002, *Handbook of Hepatobiliary Surgery*. Landes Bioscience, p.254-271.
- Saller, R., Meier, R., Brignoli, R., 2001, The use of silymarin in the treatment of liver disease, *Drugs*, 61, 2035-63.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., vd., 2004, Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration, *Nature*, 427, 740-744.
- Sathyasaikumar, K.V., Swapna, I., Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K., Roy, K.R., vd., 2007, Co-administration of C-Phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats, *Journal of the Neurological Sciences*, 252, 67-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saukkonen, J.J., Cohn, D.L., Jasmer, R.M., Schenker, S., Jereb, J.A., vd., 2006, An official ATS statement: hepatotoxicity of anti tuberculosis therapy, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174, 935–952.
- Saydam, F., Değirmenci, İ., Güneş, H.V., 2011, MikroRNA'lar ve kanser, *Dicle Tıp Dergisi*, 38, 1, 113-120.
- Scherlock, S., Dooley, S., 2002, *Diseases of the Liver and Biliary System*, Blackwell Publishing, 1-17.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., vd., 1997, TRAIL receptors 1(DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB, *Immunity*, 7, 831–836.
- Schuppan, D., Jia, J.D., Brinkhaus, B., Hahn, E.G., 1999, Herbal products for liver diseases: Atherapeutic challenge for the new millennium, *Hepatology*, 30, 1099-104.
- Schwabe, R.F., Brenner, D.A., 2006, Mechanisms of liver injury. TNF- α induced liver injury: role of IKK, JNK and ROS pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290, G583–G589.
- Seifert, G., Schilling, K., Steinhauser, C., 2006, Astrocyte dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective, *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 194-206.
- Sendensky, A., Dufour, JF., 2011, *Clinical Gastroenterology: Chronic Liver Failure*, 32-45.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A., 2001, Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus, *Journal of Neuroscience*, 21, 7153-7160.
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., Friedman, A., 2015, Anatomy and physiology of the blood-brain barrier, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 38, 2.
- Shigehara, K., Yokomuro, S., Ishibashi, O., Mizuguchi, Y., Arima, Y., vd., 2011, Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer, *PLoS ONE*, 6, 8, e23584.
- Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., vd., 2003, Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress, *Journal of Neuroscience*, 23, 3394-3406.
- Sies, H., 1985, *Oxidative Stress*, Academic Press, p. 10-35.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, S., Trigun, S.K., 2010, Activation of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Cerebellum of Chronic Hepatic Encephalopathy Rats is Associated with Up-regulation of NADPH-Producing Pathway, *Cerebellum*, 9, 384-397.
- Singh, S., Mondal, P., Trigun, S.K., 2014, Acute Liver Failure in Rats Activates Glutamine- Glutamate Cycle but Declines Antioxidant Enzymes to Induce Oxidative Stress in Cerebral Cortex and Cerebellum, *PLoS ONE*, 9, 4, e95855.
- Singh, S., Trigun, S.K., 2014, Low grade cirrhosis induces cognitive impairment and motor dysfunction in rats: Could be a model for minimal hepatic encephalopathy, *Neuroscience Letters*, 559, 136-140.
- Song, L.H., Binh, V.Q., Duy, D.N., Bock, T.C., Kremsner, P.G., vd., 2004, Variations in the serum concentrations of soluble Fas and soluble Fas ligand in Vietnamese patients infected with hepatitis B virus, *Journal of Medical Virology*, 73, 244-249.
- Song, Z., Deaciuc, I., Song, M., Lee, D.Y., Liu, Y., vd., 2006, Silymarin protects against acute ethanol induced hepatotoxicity in mice, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30, 407-413.
- Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E., van den Heuvel F.A., Koornstra, J.J., 2004, Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52, 6, 821-831.
- Stankova, P., Kucera, O., Lotkova, H., Rousar, T., Endlicher, R., vd., 2010, The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro, *International Journal of Toxicology*, 24, 2097-2103.
- Starkey-Lewis, P.J., Dear, J., Platt, V., Simpson, K.J., Craig, D.G., vd., 2011, Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury, *Hepatology*, 54, 5, 1767-1776.
- Steindler, D.A., Laywell, E.D., 2003, Astrocytes as stem cells: Nomenclature, phenotype, and translation, *Glia*, 43, 62-69.
- Stepanova, M., Mishra, A., Venkatesan, C., Younossi, Z.M., 2012, In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10, 1034-1041.
- Stryer, L., 1995, Fatty acid metabolism, W.H. Freeman and Company, p.603-628.
- Su, Y.W., Chen, X., Jiang, Z.Z., Wang, T., Wang, C., vd., 2012, A panel of serum microRNAs as specific biomarkers for diagnosis of compound- and herb-induced liver injury in rats, *PLoS ONE*, 7, 5, e37395.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sun, G. Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., vd., 2009, SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function, *RNA*, 15, 1640-1651.
- Susan Standring; Neil R. Borley; et al., eds. 2008, *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*, Churchill Livingstone, p. 297-302.
- Sutherland, F., Harris, J., Claude, C., 2002, A passion for the liver. *Archives of Surgery*, 137, 11, 1305-10.
- Szabo, G., Bala, S., 2013, MicroRNAs in liver disease, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10, 9, 542-552.
- Taub, R., 2004, Liver Regeneration: From myth to mechanism, *Nature*, 5, 836-847.
- Tiwari, A., 2001, Imbalance in antioxidant defense and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy, *Current Science*, 81, 1179-1187.
- Tryndyak, V.R., Latendresse, J.R. Montgomery, B., Ross, S.A., Beland, F.A., vd., 2014, Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1, 262, 1, 52-59.
- Tsai, W.C., Hsu, S.D., Hsu, C.S., Lai, T.C., Chen, S.J., 2012, MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis, *Journal of Clinical Investigation*, 122, 2884-2897.
- Turner, B.M., Paradiso, S., Marvel, C.L., Pierson, R., Boles Ponto, L.L., vd., 2007, The cerebellum and emotional experience, *Neuropsychologia*, 45, 6, 1331-41.
- Ueno, Y., Ishii, M., Yahagi, K., Mano, Y., Kisara, N., vd., 2000, Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease, *Hepatology*, 31, 966-974.
- Van Caulert, C., Deviller, C., Halff, M., 1932, Troubles provoques par l'ingestion de sels ammoniacaux chez l'homme atteint de cirrhose de Laennec, *Comptes Rendus Biologies*, 111, 739-740.
- Van Den Bos, W., Van Dijk, E., Westenberg, M., Rombouts, S.A.R.B., Crone, E.A., 2010, Changing Brains, Changing Perspectives: The Neurocognitive Development of Reciprocity, *Psychological Science*, 22, 1, 60-70.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van der Meer, A.J., Farid, W.R., Sonneveld, M.J., de Ruiter, P.E., Boonstra, A., vd., 2013, Sensitive detection of hepatocellular injury in chronic hepatitis C patients with circulating hepatocyte-derived microRNA-122, *Journal of Viral Hepatitis*, 20, 3, 158–166.
- Vasek, M.J., Garber, C., Dorsey, D., Durrant, D.M., Bollman, B., vd., 2016, A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment, *Nature*, 534, 538-543.
- Viegas, M.S., Martins, T.C., Seco, F., do Carmo, A., 2007, An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues, *European Journal of Histochemistry*, 51, 1, 59-66.
- Ventura, R., Harris, K.M., 1999, Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes, *Journal of Neuroscience*, 19, 6897-6906.
- Volkman, X., Fischer, U., Bahr, M.J., Ott, M., Lehner, F., vd., 2007, Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver, *Hepatology*, 46, 1498-1508.
- Yamada, H., Suzuki, K., Ichino, N., Ando, Y., Sawada, A., vd., 2013, Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver, *Clinica Chimica Acta*, 424, 99–103.
- Waidmann, O., Bihrer, V., Pleli, T., Farnik, H., Berger, A., vd., 2012, Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection, *Journal of Viral Hepatitis*, 19, 2, e58–e65.
- Wang, B., Majumder, S., Nuovo, G., Kutay, H., Volinia, S., 2009, Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice, *Hepatology*, 50, 1152-1161.
- Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., vd., 2009, Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 4402-4407.
- Wang, Y., Singh, R., Lefkowitz, J.H., Rigoli, R.M., Czaja, M.J., 2006, Tumor necrosis factor induced toxic liver injury results from JNK2-dependent activation of caspase-8 and the mitochondrial death pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 15258-15267.
- Watanabe, A., Takei, N., Higashi, T., Shiota, T., Nakatsukasa, H., vd., 1984, Glutamic acid and glutamine levels in serum and cerebrospinal fluid in hepatic encephalopathy, *Biochemical Medicine*, 32, 225-231.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., vd., 2010, The microRNA spectrum in 12 body fluids, *Clinical Chemistry*, 56, 11, 1733-1741.
- Weisser, S.B., McLarren, K.W., Kuroda, E., Sly, L.M., 2013, Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages, *Methods in Molecular Biology*, 946, 225-239.
- Wienholds, E., Plasterk, R.H., 2005, MicroRNA function in animal development, *FEBS Letters*, 579, 5911-5922.
- Wijdicks, E.F.M., 2016, Hepatic Encephalopathy, *New England Journal of Medicine*, 375, 1660-70.
- Wilhelm, I., Nyul-Toth, A., Suci, M., Hermenean, A., Krizbai, I.A., 2016, Heterogeneity of the blood-brain barrier, *Tissue Barriers*, 4, 1, e1143544.
- Winther, T.N., Heiberg, I.L., Bang-Berthelsen, C.H., Pociot, F., Høgh, B., 2013, Hepatitis B surface antigen quantity positively correlates with plasma levels of microRNAs differentially expressed in immunological phases of chronic hepatitis B in children, *PLoS ONE*, 8, 11, e80384.
- Wolf, U., Rapoport, M.J., Schweizer, T.A., 2009, Evaluating the affective component of the cerebellar cognitive affective syndrome, *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 21, 3, 245-53.
- Wolff, J., 1968, The role of the astroglia in the brain tissue, *Acta Neuropathologica*, 4, 33-39.
- Woolbright, B.L., Antoine, D.J., Jenkins, R.E., Bajt, M.L., Park, B.K., vd., 2013, Plasma biomarkers of liver injury and inflammation demonstrate a lack of apoptosis during obstructive cholestasis in mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273, 3, 524-531.
- Wu, J.P., Tsai, C.C., Yeh, Y.L., Lin, Y.M., Lin, C.C., vd., 2015, Silymarin Accelerates Liver Regeneration after Partial Hepatectomy, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 603529.
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B.A., Stevens, B., 2015, Microglia: dynamic mediators of synapse development and plasticity, *Trends Immunology*, 36, 605-613.
- Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., 2010, Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis, *Mol Carcinogenesis*, 50, 2, 136-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yoshida, Y., Higashi, T., Nouse, K., Nakatsukasa, H., Nakamura, S.I., vd., 2001, Effects of zinc deficiency/zinc supplementation on ammonia metabolism in patients with decompensated liver cirrhosis, *Acta Medica Okayama*, 55, 349-355.
- Yoshioka, W., Higashiyama, W., Tohyama, C., 2011, Involvement of microRNAs in dioxin-induced liver damage in the mouse, *Toxicological Sciences*, 122, 457-465.
- Zamore, P.D., Haley, B., 2005, Ribo-gnome: the big world of small RNAs, *Science*, 309, 5740, 1519-1524.
- Zhang, H., Li, Q.Y., Guo, Z.Z., Guan, Y., Du, J., vd., 2010, Serum levels of microRNAs can specifically predict liver injury of chronic hepatitis B, *World Journal of Gastroenterology*, 18, 37, 5188–5196.
- Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., vd., 2003, ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression, *Neuron*, 40, 971–982.
- Zhao, L., Guo, Q.L., You, Q.D., Wu, Z.Q., Gu, H.Y., 2004, Gambogic acid induces apoptosis and regulates expressions of Bax and Bcl-2 protein in human gastric carcinoma MGC-803 cells., *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 998–1003.
- Zhou, J., Yu, L., Gao, X., Hu, J., Wang, J., vd., 2011, Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 29, 36, 4781–4788.
- Zimmerman, H.J., Ishak, K.G., 2002, Hepatic injury due to drugs and toxins, *Churchill Livingstone*, 14, p.622–709.
- Zlokovic, B.V., 2008, The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders, *Neuron* 57, 178-201.
- Zwingmann, C., Richter-Landsberg, C., Brand, A., Leibfritz, D., 2000, NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-(13)C] alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: Implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism, *Glia*, 32, 286-303.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama A: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 12. 05. 2016
TOPLANTI SAYISI	: 96
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 513-2
KARAR NUMARASI	: 513-2
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Adnan AYHANCI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK Yrd. Doç. Dr. Mustafa CENGİZ Doktora Öğrencisi Özgün TEKSOY Yrd. Doç. Dr. Behçet İNAL
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Sprague-Dawley (36 adet Erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji/Genel Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Adnan AYHANCI'nın araştırma yürütücüsü olduğu 513-2/2016 kayıt numaralı ve "Silimarin ile tedavi edilen tiyoasetamid indüklü kronik hepatik ensefalopatili sıçanlarda miRNA profilinin belirlenmesi " konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Kevsir EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. ÇİNEŞ (Üye)

Prof. Dr. İsmet ULUPINAR (Üye)

Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd.Doç.Dr.Nurdan KIRIMLIOĞLU (Üye)

Yrd.Doç.Dr. Vet.Hek Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / (45 63)



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)



GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji/Genel Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Adnan AYHANCI'nın araştırma yürütücüsü olduğu 513-2/2016 kayıt numaralı ve "Silimarin ile tedavi edilen tiyoasetamid indüklü kronik hepatik ensefalopatili sıçanlarda miRNA profilinin belirlenmesi" konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Çalışmada Sprague-Dawley (36 adet Erkek) kullanılacaktır.

Çalışmamızda intraperitoneal (i.p.) olarak verilen 0,5 mL 50mg/kg (%0,2 DMSO'da çözülmüş) tiyoasetamid ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda oral yolla verilen 0,5 mL 50 mg/kg ile 100 mg/kg (%0,9 NaCl'de çözülmüş) silimarinin (Sm) karaciğer ve beyin üzerindeki koruyucu etkisi araştırılacaktır. Sm, sıçanlara ön koruma olarak ilk 14 gün boyunca her gün oral olarak TAA ise, ikinci 14 gün boyunca her gün i.p olarak verilecektir. Doku homojenatlarından ve serumdan; malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) ile serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalin fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), ürik asit, kan üre azotu (BUN) ve amonyak aktiviteleri ölçülerek ve miRNA-122, miRNA-192 ve miRNA-194 seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenecektir. Karaciğer ve beyin dokuları histopatolojik olarak da incelenerek karaciğer ve beyin dokusunda Bcl-2, Bax, Annexin-V, Tunel, TNF- α ve kaspaz-3 immünohistokimyasal olarak belirlenecektir.

Bu projeden ÖZGÜN TEKSOY isimli doktora öğrencisi için doktora tezi çıkarılması planlanmaktadır.

Deneyler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvar'ında gerçekleştirilecektir.

YÖNTEM

Deneysel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 200±20 gram ağırlıkta, yaklaşık 3 aylık, Sprague Dawley cinsi, albino sıçanlar kullanılacaktır. Tüm deney hayvanları T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TİCAM)'nden temin edilerek deney süresince 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2 C°) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılacaklar. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyonu sağlanacak [Watanabe et al., 2001]. Bu adaptasyon sürecinde tüm sıçanlar paslanmaz çelik kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenecek ve çeşme suyu verilecektir.

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / (45 63)



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)



Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

TAA ve Sm ticari olarak temin edilecektir. Bu maddelerden, TAA'nın 50 mg'ı %0,9 NaCl'de çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirilecektir (Singh ve Trigun, 2014). TAA enjeksiyonu çözeltinin taze olarak hazırlanmasından sonra steril tek kullanımlık enjektörler ile intraperitoneal (i.p.), Sm ise çözeltinin taze olarak hazırlanmasından sonra oral olarak uygulanacaktır. Sm'nin 50 ve 100 mg/kg dozu % 0.2 DMSO'da çözülerek hazırlanacaktır. Kilo kaybını, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğini en aza indirmek için deney süresince içme suyu yoluyla %0,45 NaCl içeren %5 dekstroz ve 20 meq/L KCl verildi.

Bütün hayvanlar deneyden önce tartılarak ağırlıkları saptanacak ve böylece uygulanacak ilaç dozları belirlenecektir. İlk 14 gün boyunca deney gruplarına Sm ön koruyucu olarak gavaj yoluyla ve ikinci 14 günde de deney gruplarına TAA i.p olarak verilecektir. Son enjeksiyondan bir gün sonra hayvanlar anestezi edilerek periferik kan, karaciğer ve beyinleri alınacaktır [Goldberg et al., 1986; Sriover et al., 1989; Moore et al., 1995; Ayhanci et al., 2009].

Deney Grupları

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=7' şer sıçan olmak üzere toplam 5 grup oluşturulacaktır. Bunlar;

Grup 1 : Kontrol: Her hayvana ilk 14 boyunca gavaj yoluyla Sm'nin çözücüsü olan 0,5 mL % 0.2 DMSO verilecektir ve ikinci 14 gün boyunca da i.p olarak TAA'nın çözücüsü olan 0.5 mL %0,9 SF enjeksiyonu yapılacaktır.

Grup 2: Her hayvana ikinci 14 gün boyunca 50 mg/kg TAA enjeksiyonu yapılacaktır.

Grup 3: Her hayvana ilk 14 gün boyunca 50 mg/kg Sm ve ikinci 14 gün boyunca da 50 mg/kg TAA enjeksiyonu yapılacaktır.

Grup 4 : Her hayvana ilk 14 gün boyunca 100 mg/kg Sm ve ikinci 14 gün boyunca da 50 mg/kg TAA enjeksiyonu yapılacaktır.

Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Ketamin/Ksilazin ile uyutulmuş hayvanlardan intrakardiyak kan alımı yapılacaktır. Intrakardiyak kan alımından sonra hayvanlar servikal dislokasyon ile yaşamlarına son verilecek ve karaciğer ve beyin dokuları çıkarılacaktır. Alınan kan örnekleri 10 dakika 3000 rpm devirde santrifüjlenecek ve serumlar elde edilecektir [Theocharis et al., 2001]. Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C derin dondurucuda korunacaktır.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / (45 63)

ÖZGEÇMİŞ

1.ADI-SOYADI : ÖZGÜN TEKSOY

2.TELEFON : 05052636220

3.MAİL : ozgunteksoy@gmail.com

4.DOĞUM TARİHİ : 26/09/1987

5.ÜNVANI : BİYOLOG

6.ÖĞRENİM DURUMU: DOKTORA

7.ALES : 69,25

YÖKDİL :71,25

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	BİYOLOJİ	PAMUKKALE	2005-2010
Yüksek Lisans	BİYOLOJİ	ULUDAĞ	2010-2013
Doktora	BİYOLOJİ	ESKİŞEHİR OSMANGAZİ	2014-

8. YÜKSEK LİSANS TEZİ : BİTKİSEL FENOLİK BİR BİLEŞİK OLAN KLOOROJENİK ASİDİN RADYODUYARLILIK OLUŞTURMA ETKİSİNİN İN VİTRO GENOTOKSİSİTE VE ENZİM TEST SİSTEMLERİ YARDIMIYLA ARAŞTIRILMASI

9. YAYINLAR

9.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Yılmaz, D., Teksoy, O., Bilaloglu, R., Cinkilic, N. 2015. Anti-genotoxic effect of naringin against bleomycin-induced genomic damage in human lymphocytes in vitro. Drug. Chem. Toxicol., 5:1-5.

Cengiz, M., Cetik Yildiz, S., Demir, C., Kulcanay Sahin, İ., Teksoy, O., Ayhanci A. 2019 Hepato-preventive and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 53 (2019) 1–7

9.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Kara, Y., Mammadov, R., Parlak, M., Teksoy, Ö., Yıldıztekin, M. Investigation for the effect of extracts isolated from (*Brassica napus* sp. *Oleifera*) (Kanola-Kolza) species on replication of rat hepatocytes. IV International Conference, Extraction of the Organic Compounds ICDC -2010, September 20-24, Voronej, Rusya-2010.

Cengiz, M., Teksoy, O., Sahinturk, V., Tekin, Y., Gunes, S., Ayhanci, A., Ameliorative effects of Carcavrol on Cyclophosphamide-induced testes damage and oxidative stress. II. International Conference, Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, 08-11.11.2017. Kayseri, Turkey.

Kaygısız, B., Özatik, Y., Özatik, O., Bayraktar, D., Teksoy, Ö. Çengelli Ünel, Ç., Erol, K. 2015. The contribution of resveratrol to the antiepileptic effects of diazepam and gabapentin. *An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, 9:1 49-50.

Senanur Can, Varol Sahintürk, Songül Çetik, Cumali Keskin, Özgün Teksoy, Adnan Ayhancı, Protective Effects Of *Hipericum Triquetrifolium* Turra upon Chemotherapy-Induced Testicular Toxicity in Rats, 1. International Congress On Medicinal And Aromatic Plants, 10-12.05.2017, Konya, Turkey.

Teksoy O., Ayhancı A., Cengiz M., Birlik B., Tanrıverdi D.T., Köroglu E., Tiyoasetamid İndüklü Karaciğer Hasarında Silimarinin Karaciğer ve Periferik Kandaki Koruyucu Rolü, International Eurasian Conference on Biologica land Chemical Sciences, 26-27.04.2018, Ankara, Turkey

Teksoy O., Cengiz M., Ayhancı A. The Protective effects of boron against cyclophosphamide induced hemotoxicity in rats. International Conference on Applied Biological Sciences, 03-05.05.2018, Eskişehir, Turkey.

Teksoy O., Cengiz M., Köroglu E., Sahintürk, V., Inal, B., Kacar, S., Ayhancı, A. 2018. Hepatoprotective effects of silymarin against thioacetamide-induced hepatic injury in rats, 1. Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress, 27-30.10.2018, Antalya, Turkey

9.3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Sarı, F., Kırac, A., Akın, S., Fak, Ç., Teksoy, Ö., Kesim, A. 2010. Dalaman-Sarıgerme Kumsallarında Deniz Kaplumbağa Yavru Morfolojisine Etki Eden Ekolojik Faktörlerin Araştırılması. 19. ULUSAL BİYOLOJİ KONGRESİ, 520.

Kaska, Y., İli, P., Kırac, A., Akın, S., Sarı, F., Fak, Ç, Teksoy, Ö., Kesim, A. Madımak, E.2010. Dalaman-Sarıgerme Kumsallarında Deniz Kaplumbağa Yavru Cinsiyet Oranlarının,Zamansal ve Mekansal Açından Farklılıklarının Araştırılması. 19. ULUSAL BİYOLOJİ KONGRESİ, 212.

Teksoy, Ö., Çinkılıç, N., Çavaş, T., Vatan, Ö., Yılmaz, D. Bitkisel Fenolik Bir Bileşik Olan Klorojenik Asidin Radyoduyarlılık Oluşturma Etkisinin İn Vitro Genotoksisite ve Enzim Test

Sistemleri Yardımıyla Araştırılması, 22. ULUSAL BİYOLOJİ KONGRESİ, 709.

Kumbıçak, U.,Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Kumbıçak, Z., Teksoy, Ö. 2014. Bakır Çinko Alaşım Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin XTT ve Klonojenik Test Yöntemleriyle Değerlendirilmesi. 22. ULUSAL BİYOLOJİ KONGRESİ, 662.

Kaygısız, B.,Özatic, Y., Özatic, O., Bayraktar, D., Teksoy, Ö. Çengelli Ünel, Ç., Erol, K.2015. Resveratrolün diazepam ve gabapentinin antikonvülsan etkisine katkısının araştırılması.

13. ULUSAL SİNİRBİLİM KONGRESİ, 148.

10. ALDIĞI EĞİTİMLER

Genetik çalışmalarda biyoinformatik uygulamalar, Tübitak, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 06-08.09.2006

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Uludağ Üniversitesi, 04.07.2011

Nörodejeneratif Hastalıkların Hayvan Modelleri, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D. ve Türk Biyofizik Derneği, 08.09.2014

TÜBİTAK PROJE YAZMA EĞİTİMİ, Türk Fizyoloji Derneği, 16-19.01.2018