

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİLYMARİNİN PRİMER KARIŞIK GLİA HÜCRELERİNİN
ÇOĞALMASINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DUYGU GEZGİN

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. RUHİ UYAR

KASIM, 2007

1. ÖZET

Silymarin bir çeşit flavonoiddir ve % 70-80 flavonolignanlar ile % 20-30 oranında tanımlanmamış bileşenlerden oluşur. Eczanelerde satılan bu madde karaciğerde çoklu koruyucu etkileri nedeniyle hastalar tarafından kullanılmaktadır. Hücre koruyucu özelliğinden dolayı ultraviole ve kimyasallarla oluşturulmuş prostat, akciğer, böbrek, pankreas, meme ve deri kanserlerine karşı anti-mitotik etkisi kanıtlanmıştır. In vitro ve in vivo araştırmalarda karaciğerin hasarlı bölgelerinde hücrelerin DNA sentezini, ribozom oluşumunu ve protein yapımını önemli ölçüde yükselterek iyileşme sağladığı görülmüştür. Silymarinin ve polifenolik bileşenlerinin güçlü antioksidan özelliği, yaşlanmayla ilişkili beyin fonksiyonlarının bozulmasını ve çeşitli hastalıkların oluşumuna neden olduğu bilinen serbest oksijen türevlerini ortadan kaldırmaktadır.

Çalışmamızda, sıçan glioma (C6) hücreleri ve 1-3 günlük sıçan yavrularının beyinlerinden elde edilen glia hücrelerine silymarinin 1, 10, 50, 75 ve 100 ng/ml dozlarını 24 veya 48 saat uygulayarak silymarinin hücre çoğalması üzerine etkisini araştırdık. Bu etkiyi gözlemleyebilmek için canlı hücre yoğunluğunu saptayan 3-(4,5- D-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue (MTT) yöntemi kullanıldı. Glia ve C6 hücrelerine 24 veya 48 saat süreyle uygulanan bu farklı silymarin dozları hücre sayısını % 73'e kadar azaltmıştır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) primer glia ve C6 hücrelerinde doza bağlı olarak toksik bir etki yapmaktadır. Silymarinin H_2O_2 toksisitesi üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için hücrelerin yaklaşık % 75'ini öldüren doz olan 100 μM H_2O_2 uygulandı. Bu dozdaki H_2O_2 ile birlikte silymarin 1 ile 100 μM arası dozlarda 3 saat uygulandı. 24 saat sonra MTT yöntemini kullanılarak hücre canlılığı araştırıldı. Silymarin 100 μM H_2O_2 oluşturduğumuz oksidatif strese karşı glia ve C6 hücrelerinde herhangi bir koruyuculuk göstermemiştir.

Anahtar kelimeler: Silymarin, Glia, oğalma, Hidrojen peroksit, Oksidatif Stres.

2. SUMMARY

Silymarin is a kind of flavonoid that contains approximately 70-80 % flavonolignans and 20-30 % non-identified polyphenolic compounds. Sold in drugstores this substance has been used by patients, because it has multiple protective effects in liver. Since it has cell protective activity, it has anti-mitotic effects against lung, breast, kidney, skin, pancreas, prostate cancer models that caused by ultraviolet and chemicals. In vitro and in vivo studies have shown that silymarin provides significant level of recovery by elevating DNA synthesis, ribosome formation and protein synthesis in defected areas of liver. The strong antioxidant activity of silymarin and polyphenolic compounds eliminates reactive oxygen radicals in age and reactive oxygen species related brain damages.

We have investigated the effects of 1, 10, 50, 75 and 100 ng/ml silymarin doses on proliferation of glial cells that were obtained from 1-3 day old rat whole brain and C6 cells for 24 or 48 hours. 3-(4,5- D- methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue (MTT) method was used for determination of percentage of the cell survival. The treatment of glial and C6 cells with different silymarin doses for 24 or 48 hours reduced the cell number down to 73 %.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) exerts a dose dependent toxic effect on cultured glia and C6 cells. For determining whether silymarin is a protective or anti-protective substance, the cells were treated with 100 μM H_2O_2 that kills 75 % of the cells. Combined with 100 μM H_2O_2 , silymarin at 1-100 μM were applied to the cells for three hours. After 24 hours, we determined the number of surviving cells by using MTT method. Silymarin did not show any protective effect against toxicity of H_2O_2 on glia and C6 cells.

Key Words: Silymarin, Glia, Proliferation, Hydrogen peroxide, Oxidative stress.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	2
2. SUMMARY	4
3. ŞEKİLLER DİZİNİ	7
4. SİMGE VE KISALTMALAR	8
5. GİRİŞ VE AMAÇ	10
6. GENEL BİLGİLER.....	12
6.1. Hidrojen Peroksit Ve Oksidatif Stres.....	12
6.2. Silymarin	18
6.3. Glia ve C6 Hücreleri	21
7. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
7.1. Glia Hücre Kültürünün Yapılması.....	24
7.1.2. Karışık glia hücrelerinin elde edilmesi.....	24
7.1.3. C6 hücrelerinin üretilmesi	26
7.1.4. Hücrelerin sayılması ve ekilmesi	26
7.2. Deney Grupları	27
7.3. MTT Yöntemi.....	27
8. BULGULAR.....	29
9. TARTIŞMA	35
10. SONUÇ.....	38
11. KAYNAKLAR DİZİNİ	39

3. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: H ₂ O ₂ 'nin karıŐtıŐı çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylar	15
Şekil 2: Glia hücrelerinin genel görüntüsü	29
Şekil 3: C6 hücrelerinin genel görüntüsü	29
Şekil 4: GFAP (+) sıçan glia hücreleri	30
Şekil 5: GFAP (+) sıçan glia hücreleri	30
Şekil 6: Silymarinin 24 saatte glia hücreleri üzerine etkisi	31
Şekil 7: Glia hücrelerine uygulanan silymarinin 48 saatte etkisi	31
Şekil 8: Silymarinin 24 saatte C6 hücre oŐalmasına etkisi	32
Şekil 9: Silymarinin 48 saatte C6 hücre oŐalmasına etkisi	32
Şekil 10: 3,5 saat uygulanan silymarinin glia yaşam oranına etkisi	33
Şekil 11: H ₂ O ₂ + Silymarinin glia hücreleri üzerine etkisi	33
Şekil 12: 3,5 saat uygulanan silymarinin C6 hücre oŐalmasına etkisi	34
Şekil 13: H ₂ O ₂ + Silymarinin C6 hücreleri yaşam oranına etkisi	34

4. SİMGE VE KISALTMALAR

• C6	Sıçan glioma hücreleri.
• H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit.
• TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa.
• OH ⁻	Hidroksil.
• O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu.
• ROO ⁻	Peroksil radikalleri.
• ¹ O ₂ ⁻	Singlet oksijen.
• SOD	Süperoksit dismutaz.
• cAMP	Döngüsel adenzin monofosfat.
• DNA	Deoksiribonükleik asit
• HOCl	Hipoklorik asit.
• NO	Nitrik oksit.
• VEGF	Damar endotel büyüme faktörü.
• EGFR	Epitel büyüme faktörü reseptörü.
• GPx	Glutasyon peroksidaz.
• GSH	Glutasyon.
• P38MAPK	P38 Mitojen aktive edici protein kinaz.
• JNK	Janus kinaz.
• IL-6	İnterlökin 6.
• PDGF-BB	Platelet kökenli büyüme faktörü.
• SKH-1	Tüysüz fare deri hücreleri.
• LD ₅₀	Hücrelerin % 50'sini öldüren doz.
• LNCaP	Kanserli prostat hücre serisi.
• A375-S2	İnsan melanoma hücreleri.
• HUVEC	İnsan göbek kordonu toplar damar endotel hücreleri.
• NGF	Sinir büyüme faktörü.
• BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör.
• GDNF	Glia kökenli nörotrofik faktör.
• CNTF	Siliar nörotrofik faktör.

• EGF	Epidermal büyüme faktörü.
• HGF	Hepatosit büyüme faktörü.
• NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat.
• TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa.
• iNOS	inducible (uyarılabılır) nitrik oksit sentaz.
• MS	Multiple skleroz.
• EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit.
• AEC	Amino etilkarbozol.
• NF-KB	Nükleer faktör kappa B.
• GFAP	Glial fibril asidik protein.
• BV-2	Mikroglia aktivasyon modeli.
• GBM	Glioblastoma multiforme.
• DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium.
• FCS	Fetal calf (=dana) serum.
• DMSO	Dimetil sülfoksit.
• HBSS	Hank's Balanced Salt Solution.
• PBS	Fosfat tampon çözeltisi.
• LLC-PK1	Renal tübüler epitel hücreleri
• VCAM-1	Damar hücre adezyon molekülü 1.
• ICAM-1	Intrasellüler adezyon molekülü 1.
• LoVo	Kanserli kolon hücre serisi.
• THP-1	İnsan monosit hücre serisi.
• CHO-K1	Çin hamster yumurtalık hücreleri.
• MTT	3-(4,5- D-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue.
• MCF-7, MDA-MB468	İnsan kanserli meme hücre serisi.
• PC-12	Sıçan nöron hücre serisi.
• HepG-2	İnsan hepatoblastoma hücreleri.

5. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle dünyanın en önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir. Kanser görülmeye sıklığı insandan insana, toplumdaki topluma ve zaman içinde değişmektedir. Son zamanlarda gelişmekte olan ülkelerde de yaygın bir tehdit oluşturmaktadır. 2000 yılı için dünyada 22 milyon kanser olayı ve 6 milyon kanserden ölüm kayıtları geçmiştir (37). Günümüzde kanserin tedavisinden daha çok kanser gelişiminin önlenmesi ve erken tanı konmasının daha yararlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle kanser gelişiminde veya önlenmesinde görev alan etkenlere yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır (42). Son on yıldır çeşitli bitkisel fenollerin ve flavanoidlerin koruyucu etkisi dikkatle incelenmektedir (25). Silymarinin de üyesi olduğu flavanoidler, damarlı bitkilerde bulunan ve düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşenler içeren geniş bir gruptur (35). Silymarin, Silybum marianum L. Gaertn (deve dikenini) ya da Carduus marianus L. (meryem ana dikenini) bitkisinin tohum ve yapraklarından elde edilen bir çeşit flavonoiddir. Silymarini, % 70-80 flavonolignanlar ve % 20-30 oranında tanımlanmamış polifenolik bileşenler oluşturur. Doğal bileşenlerinden olan silybin en etkili olandır ve silymarinin % 80'ini oluşturur (25,49). Bunun dışında isosilybin, silychristin ve silydianin diğer bileşenlerdir (21,25,26). Silymarinin ve içerdiği flavolignanlarının temel etkisi güçlü antioksidan özelliğidir. Anti-inflamatuar ve anti-kanser gibi çoklu biyolojik etkilere de sahiptirler (7,35,42).

Silymarinin kanserli kolon ve endotel hücre serilerinin birlikte yapılan kültürlerinde hücre çoğalmasını durdurduğu bulunmuştur (53). Kimyasal ve ultraviyole (UV) nedenli fare deri ve insan keratinositlerindeki hasarı engelleyerek anti-kanser etki göstermiştir (49). Eritrosit zarlarını lipid peroksidasyonuna ve hemolize karşı korur (15,26,29). Hücre koruyucu etkisinden dolayı akciğer, böbrek, meme, deri, idrar kesesi, kolon, ovaryum ve prostat kanser araştırmalarında olumlu sonuçlar vermektedir. In vitro ve in vivo çalışmalarda karaciğerde ribozom oluşumunu ve DNA sentezini önemli ölçüde yükselterek protein sentezini arttırmıştır. İlginç olan bu artışın yalnızca hasarlı karaciğer hücrelerinde gözlenmesidir (35,48). Çalışmamızın amaçlarından birisi, silymarinin yavru sıçanlardan elde edilen karışık glioma ve sıçan glioma (C6) hücrelerinin çoğalması üzerine bir etkisinin olup olmadığını ortaya koymaktır.

Serbest oksijen radikal düzeyinin artması yaşam riski oluştururken, antioksidanlar yaşam kaynağı olarak görev yaparlar (16). Fenoller gibi antioksidanlar kullanılarak serbest oksijen türevlerinin neden olduğu doku hasarlarının engellenebileceğine inanılmaktadır (35). Antioksidanlar kimyasal yapıları sayesinde, zincir yapıyı bozan güçlü antioksidanlar olarak serbest radikal temizleyici ve metal bağlayıcıdır (3,15,38). Silymarinin viral hepatit, toksik hepatit, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar ve radyasyon toksisitesinde güçlü antioksidan özelliği kanıtlanmıştır (15,26,39). Hiperglisemik sıçanlarda silymarin hem plazma glukoz düzeyini hem de pankreatik lipid peroksidasyonundaki artışı engelleyebilmiştir (25). Silymarinin glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin yapımını uyardığı bilinmektedir (12). Silymarin, sıçan pankreatik β hücrelerinde insülin eksikliği sonucu ciddi nekroza neden olan alloksan uygulaması sonrasında oluşan diyabetes mellitusta, antioksidan enzimlerin pankreatik aktivitesini uyardığı ve pankreas fonksiyonlarını düzenlediği görülmüştür (25,47). Yapılan bir çalışmada silymarin tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) neden olduğu apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu etki göstermektedir. Silymarin insan deri hücrelerinde (HuCaT keratinositler) ve fare fibroblastlarında H_2O_2 ve UVA uygulaması sonucu oluşan oksidatif stresi de engellemiştir (49). Silymarinin beyin üzerindeki antioksidan etkisiyle ilgili veriler az sayıdadır (35). Etanole bağlı hasara karşı dopaminerjik nöronları ve fetal sıçan beynini koruduğu gözlenmiştir (25). Güçlü antioksidan özelliği nedeniyle nöron hasarını ve nörotoksik süreçlerin engellenebilmesi açısından yararlı olabileceği düşünülmektedir (35).

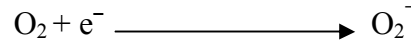
Oksidatif stresle ilgili klinikte geniş araştırmalar yapılmaktadır. Merkezi sinir sisteminde oksidatif strese bağlı olarak olduğu düşünülen multiple skleroz, Parkinson, Alzheimer gibi hastalıklar dikkatleri nöron ve glia hücreleri üzerinde yapılan çalışmalara çekmiştir (25,30,31). Yaş ile ilişkili beyin fonksiyonlarının bozulmasının ve çeşitli önemli hastalıkların oluşum nedeninin oksidatif stresle ilgili olabileceği düşünülmektedir (35). Serbest oksijen türevlerinin antioksidan savunma sistemini yetersiz bırakmasıyla ya da ortadan kaldırmasıyla bu durum gerçekleşmektedir (16). Beyin dokusu oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Artmış peroksidazlaşabilen doymamış yağ asitleri, yüksek oksijen tüketimi ve beyin zayıf gelişen antioksidan savunma mekanizması beyin için risk oluşturmaktadır (35). Bu çalışmadaki diğer amacımız ise, sıçan glioma (C6) ve yeni doğan sıçanlardan elde edilen karışık glia hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturacağımız strese karşı silymarinin antioksidan etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

6. GENEL BİLGİLER

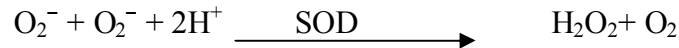
6.1. Hidrojen Peroksit Ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres serbest oksijen türevlerinin oluşumuyla ilgili olup inflamasyon, immunosupresyon, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda ve yaşlanmada önemli rol oynamaktadır. Serbest oksijen türevleri, hidroksil radikalleri (OH^-), süperoksit anyonları (O_2^-) ve peroksil radikalleri (ROO^-) ile onların singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit ve ozon gibi aktif habercilerini de kapsamaktadır (16,49). Serbest oksijen türevleri, enerjilerini oksijenli solunum ile elde eden canlılar tarafından hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda üretilmektedir. Bu radikaller mitokondride elektron taşıma zinciri ile oksijenin indirgenmesi sırasında oluşur (16). Bunlar yüksek derecede reaktif, hücre zarı lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümüne neden olan kararlı olmayan kimyasallardır (39). Serbest oksijen türevleri DNA, karbohidrat ya da proteinler gibi makromoleküllere hasar verme özelliğine sahiptirler (17).

Aerobik organizmalarda tüketilen O_2 nedeniyle oluşan serbest oksijen türevlerinin miktarı ihmal edilemez. Mitokondride yaklaşık olarak % 2-4 oranında tüketilmiş oksijen iyonu bulunur. Solunum sonucu oksijenin indirgenmesiyle süperoksit iyonları oluşur (39).



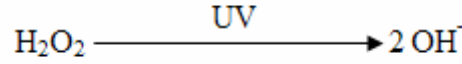
Süperoksit radikalinin oluşumu diğer radikallerin oluşumuna öncülük etmektedir. Süperoksit radikalinin yarılanma ömrü çeşitli hücresel alanlardaki süperoksit dismutaz (SOD) enzimine bağlıdır. Bu enzim ile süperoksit radikali H_2O_2 'ye dönüşür (17).



Süperoksit radikali H_2O_2 'den daha toksiktir ve hızla yıkılması hücre için çok önemlidir. H_2O_2 daha kararlı ve daha zayıf reaktiftir (17).

H_2O_2 soluk mavi renkli, kovalent bağlardan oluşan, suda çözünen ve hücre zarlarından kolaylıkla geçebilen bir moleküldür (17). İkinci haberciler olarak bilinen Ca^{2+} , diaçilgliserol

ve cAMP'ye göre daha kararlı bir yapısı vardır (39). H₂O₂ sitotoksik bir maddedir. Antioksidan savunma enzimleri olan katalaz, glutatyon peroksidaz ve tioredoksine bağlı sistemler aracılığıyla in vivo ortamdan yok edilir. Lipidler, proteinler ve DNA gibi çoğu biyolojik moleküllerle kolaylıkla tepkimeye girmez. H₂O₂'nin tehlikesi, hem ultraviolele maruz kalarak hem de in vivo ortamda demir iyonlarını değişikliğe uğratarak etkileşime girmesi ve reaktif hidroksil radikaline dönüşmesidir (16,17,49).

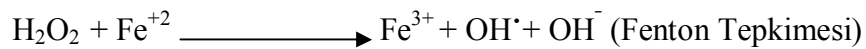


H₂O₂'nin yüksek yoğunlukları (yoğunlukla $\geq 50 \mu\text{M}$) bakteri, hayvan ve bitki hücrelerinde büyük oranda sitotoksiktir. LD₅₀ değerleri ve hücrenin ölümüne neden olan miktarı kullanılan hücre tipine, demir içeriğine, H₂O₂'ye maruz kalma süresine, kullanılan H₂O₂ yoğunluğuna ve kültür ortamına bağlı olarak değişir. Yirmi μM ve altındaki düzeylerde çoğu hücre üzerinde sınırlı derecede hasar vermektedir. Bu molekülün hücreler arası ve hücre içi sinyal molekülü olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (17).

H₂O₂ medikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan, inflamasyon sırasında görev alan hücrelerin savunma mekanizmasında kilit rol oynayan bakteriyostatik bir maddedir. İdrarda, kanda ve atılan solukta varlığı kanıtlanmıştır. Dolayısıyla beden sıvılarında ve atılan solukta H₂O₂ ölçümleri fizyolojik ve patolojik durumlarda oksidatif stresin düzeyiyle ilgili bilgi verebilir (39).

H₂O₂ genel olarak üç mekanizmayla indirgenmektedir (9,16,17,37,39):

1. Katalaz ve glutatyon peroksidaz ile H₂O ve O₂'ye indirgenir.
2. H₂O₂ demir (Fe⁺²) ya da bakırın (Cu⁺) katalizlediği Fenton tepkimesi ile güçlü bir radikal olan hidroksil (OH[·]) radikaline dönüşür.



3. H_2O_2 nötrofillerde myeloperoksidaz enzimi ile hipoklorik asite (HOCl) dönüştürülür. H_2O_2 ve HOCl tepkimeye girerek singlet oksijeni ve suyu oluşturur.

Proteinlerin yapısındaki reaktif SH grubu H_2O_2 ve serbest oksijen türevleri ile oluşturulan kimyasal değişikliklere karşı duyarlıdır. Böylelikle H_2O_2 sinyal iletim yollarına karışarak protein kinaz ve fosfatazların etkilerini değiştirir. Bunu sistein kalıntısındaki serbest SH gruplarını oksitleyerek, disülfid köprülerini oluşturarak ya da metionin kalıntılarını sülfoksitler ile sülfonlara oksitleyerek yapar. Serbest oksijen türevleri, spesifik tirozin ve sistein gibi hassas amino asitlerin kalıntılarını azotlamasıyla protein gen yapımını ve proteinin yarı ömrünü değiştirir (16,39).

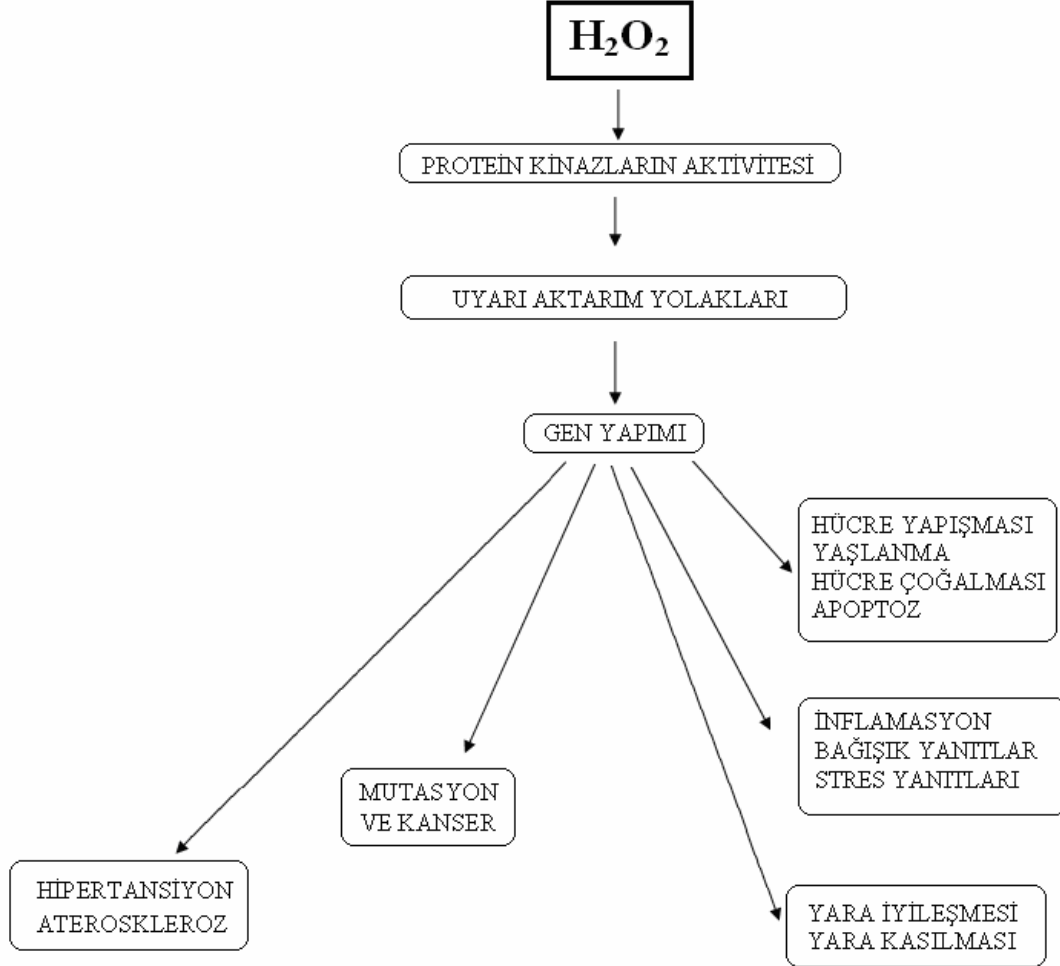
H_2O_2 , nitrik oksit (NO) oluşumunu uyarır. NO mitokondrideki oksijen tüketimini artırır ve H_2O_2 üretimiyle paralel olarak artış gösterir. NO serbest oksijen türevlerinin oluşumunu daha da artırır. NO, O_2^- ile peroksinitrit oluşturmak üzere tepkimeye girer. Peroksinitrit yüksek derecede reaktiftir (39).

H_2O_2 ikinci haberci olarak hareket edebilen ve gen ekspresyonunu düzenleyen bir özelliğe de sahiptir. DNA hasarına neden olur ve gen ekspresyonunu sağlayan faktörlerin yapılarını değiştirerek bir dizi moleküler kompleks aracılığıyla H_2O_2 , gen ekspresyonunu uyarır veya baskılar (37).

Ozon tabakasının delinmesiyle oluşan ultraviyole ışın artışı, hava kirliliği, sis, radyasyon, sigara dumanı, gıda maddelerinin hazırlanmasında doğal E vitamini kaybı ve endüstri atıkları gibi dış faktörler oksidatif stresi artırır ve fizyolojik antioksidan sistemi bu durumda yetersiz kalabilir (1,16). Serbest oksijen türevlerinin yanmalarda ve güneş yanıklarında doku hasarına katkıda bulunduğu ve iyileşme sürecini bozduğu kabul edilmektedir. Fenoller gibi antioksidanlar kullanılarak serbest oksijen türevlerinin neden olduğu hasarların engellenebileceğine inanılmaktadır. Son on yıldır çeşitli bitkisel fenollerin ve flavanoidlerin koruyucu etkisi dikkatle incelenmektedir (49).

Oksidatif stresi kapsayan yaygın lezyonlardan biri de güneşe aşırı maruz kalma sonucunda deride UVB hasarı ve kanser lezyonlarının artmasıdır. Serbest oksijen türevleri keratinositlerde damar endotel büyüme faktörünün (VEGF) yapımını uyarır ve epitel büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) fosforilasyonunda önemli rol oynamaktadır (2). Bundan dolayı

serbest oksijen türevlerinin birikimi ve bunun hastalıklardaki rolü ile oksidatif strese karşı korumada antioksidanların etkisi hakkında yapılan yaygın araştırmalar, UVB'nin DNA'da yaptığı hasarı değiştirebileceği yönündedir (16,39,50). Şekil 1'de H₂O₂'nin neden olduğu olaylar özetlenmektedir.



Şekil 1: H₂O₂'nin karıştığı çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylar (39)

Homeostasisin sürdürülebilmesi için serbest oksijen türevlerinin aşırı birikimi yerel antioksidan savunma sistemi olarak da adlandırılan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından hızla uzaklaştırılır. Bu sistem sayesinde zararlı etkiler engellenir ve prooksidan/antioksidan dengesi sürdürülmüş olur (16,49). Bu sistemler enzimatik olup olmadıklarına göre sınıflandırılmaktadır. Katalaz, SOD, glutatyon peroksidaz (GPx) enzimatik antioksidan savunma sistemini oluşturur. Askorbat, tokoferol, glutatyon (GSH)

gibi zincir yapıyı bozan antioksidanlar enzimsel olmayan antioksidanlar sınıfına girer. Enzimatik olmayan antioksidan elemanlarından olan feritin, transferin, laktoferin gibi depo ve taşıyıcı proteinler ile demir iyonlarının bağlanması sonucunda demir düzeyinin düşmesi ile süperoksit radikalının oluşumu azaltılabilir. Antioksidan enzimler hücre içindeki serbest oksijen türevlerinin yıkımını katalizler (16,39). Diğer bir deyişle zincir yapıyı bozan antioksidanlar güçlü elektron vericidirler ve önemli moleküller hasara uğramadan önce serbest radikallerle etkileşime girerler (46). Metale bağlı proteinlerin geçişi, geçiş proteinleri arasındaki etkileşimi demir ve bakırda olduğu gibi engeller. Böylece yüksek reaktif özellik gösteren hidroksil radikallerinin oluşumu engellenmiş olur. Aşırı serbest oksijen türevlerinin üretimi veya bunları elimine eden hücrelerin kapasitesindeki azalma homeostastik değişimlere ve oksidatif strese yol açar (16,39).

İnflamasyon sırasında görev alan hücreler, plazma zarındaki NADPH oksidaz yoluyla H_2O_2 üretirler. Bu yüzden inflamasyon boyunca ve aşırı kolajen depolanmasında serbest oksijen türevleri birçok olayın gerçekleşmesinden sorumludurlar (9,39). Örneğin:

1. Makrofajları ve damar düz kas hücrelerini de içeren çeşitli hücre tiplerinde kemotaktik göçe neden olurlar.
2. Miyofibroblastlar tarafından kolajenin aşırı depolanmasını sağlarlar.
3. Mutasyonu uyarırlar.
4. Hücre yapışmasını kolaylaştırırlar. Son çalışmalar H_2O_2 'nin, insan eozinofil hücrelerinin göbek kordonu ven endotel hücrelerine yapışmasını arttırdığını göstermiştir.
5. İmmun yanıtlarda değişikliğe neden olurlar. Fare dalak lenfositlerinde lipopolisakkarit tarafından uyarılan P38MAPK ve Janus kinaz'ın (JNK) fosforilasyonunu durduran immün sistem baskılayıcılarıdır.
6. Büyüme faktörlerini ve sitokinleri uyarırlar. H_2O_2 , akut faz sitokin interlökinleri IL-6, TGF- β 'yi içeren sitokinlerin ve bağlayıcı doku büyüme faktör yapımına neden olur. Çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri H_2O_2 'nin neden olduğu mekanizmalarla kendi biyolojik aktivitelerini gösterirler. Hücre tipine bağlı olarak aynı radikal farklı etkiler doğurabilir. TGF- β 1 tarafından uyarılan H_2O_2 epitel hücrelerin çoğalmasını engellerken; hücre çoğalmasında rol oynayan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF)-BB tarafından uyarılan H_2O_2 , ikinci haberci olarak davranabilmektedir. Diğer yandan, TNF- α uyarımlı apoptosis sürecinde H_2O_2 önemli bir araçtır (7,27,39).

Genel olarak oksidatif stresin ve H₂O₂'nin yaşlanmada görev aldıkları bilinmektedir. Ciltteki kromoforlar tarafından emilen UVA, UVB ve UVC ışınlarının fibroblastlarda kolajen üreten hücreleri etkilediği, hücredeki katalaz içeriğini % 85'e kadar ve glutatyon içeriğini de % 15'e kadar azalttığı belirlenmiştir (16,50). Çoklu değişikliklerin meydana geldiği farklı hücre kültürü çalışmalarında serbest oksijen türevleri ile kültürdeki hücrelerin yaşlanması hızlandırılabilir. İnsan fibroblastlarında yapılan bir çalışmada H₂O₂'nin subtoksik dozlarında 3 gün uygulanması sonucunda hücreler yaşlanma sürecine girmişlerdir (39).

Antioksidan savunma sistemi sayesinde radikal metabolit üretimi engellenir ve üretilmiş radikaller temizlenir. Antioksidan enzimlerden olan katalaz H₂O₂ ile etkin bir şekilde tepkimeye girerek peroksidaz aktivitesi ve H⁺ vericileri ile H₂O ve moleküler oksijen oluşturur (16). Genel olarak peroksizomlarda bulunmakla birlikte hücrenin diğer bölgelerdeki miktarı netlik kazanmamıştır (43). Çünkü peroksizomlar hücre manipulasyon işlemleri sırasında kolayca bozulabilen yapıdadırlar. Katalazın, oksidatif strese tolerans kazanmada önemli bir rolü vardır. Glutatyon peroksidaz (GPx), H₂O₂ ve diğer hidroksi peroksidazları kullanarak glutatyonun oksidasyonunu katalizler. GPx, H₂O₂ substratını katalazla paylaşır (39,47). Ayrıca lipid ve diğer organik hidroksiperoksidazlarla etkin bir biçimde tepkimeye girer. Bu enzimler hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korumada önemlidir. GPx'lerin büyük çoğunluğu memelilerde temel antioksidan savunma mekanizmalarından biridir. Büyük bir kısmı sitozol ve mitokondride yerleşmişlerdir ve bunlar hücre içinde H₂O₂'nin temel süpürücüsü olarak varsayılmaktadır.

E vitamini farklı antioksidan özellik gösteren, radikalleri yakalama yeteneğine sahiptir. Fizyolojik olarak zara bağlı zincir yapıyı bozan antioksidan olarak serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücre zar lipidlerini korur. Karotenoidler, yapısal olarak A vitaminiyle ilişkili yağda eriyen yaklaşık 600 antioksidan grubunu içermektedir. İnsan plazma ve dokularında yüksek oranda döngüsel (β -karoten, α -karoten) ve döngüsel olmayan karotenoidler (likopen, fitoen) ile birtakım ksantofiller (zeaksantin, lutein ve β -kriptoksantin) tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin çoklu antioksidan etkileri bulunmaktadır. Bunlardan birisi singlet oksijeni temizleme yeteneğidir. Karotenoidler lipid peroksidasyonunu engellemede önemlidirler (39).

GSH hücredeki redoks durumunu sürdürmede ve hücreleri oksidatif strese karşı korumada görevlidir. Hemen hemen bütün memeli hücrelerinde yüksek düzeyde ve genellikle sitoplazmada bulunur (3,16). Hücreleri serbest oksijen türleri ve özellikle H₂O₂ toksisitesine

karşı korumada rol oynamaktadır. Glutasyon peroksidazın aktivitesi için temel faktördür. GSH, glutasyon peroksidaz ile enzimatik olarak; H₂O₂ ile enzimatik olmayan yoldan oksitlenir (35,36,47).

Silymarinin de üyesi olduğu flavonoidler, damarlı bitkilerde bulunan ve düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşenler içeren geniş bir gruptur. Antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser gibi çoklu biyolojik etkileri vardır. Kimyasal yapıları sayesinde, zincir yapısını bozan güçlü antioksidanlar olarak serbest radikal temizleyici ve metal bağlayıcıdır (15). Süperoksit anyonu, H₂O₂, singlet oksijen ve perhidroksi, hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi serbest oksijen türevlerinin oluşumunu engelleyebilir (17,39).

6.2. Silymarin

Yüzyıllardır karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve kanser araştırmalarında bitki kaynaklı çeşitli koruyucular kullanılmaktadır. Bunlardan birisi de Milk Thistle olarak da bilinen ve *Silybum marianum*'un L. Gaertn (deve dikenini) ya da *Carduus marianus*'un L. (meryem ana dikenini) yaprak ve tohumlarından elde edilen silymarindir (12). Silymarin Asteraceae (Compositae) familyasından polifenolik bir flavanoiddir (15,25,29). Molekül ağırlığı 482,44 g olan silymarin, 7-kromanol-3-methyl-taxifolin yapısıyla ana bileşen olarak kabul edilir (26).

Flavonoidler benzo gamma- pyrone familyasına aittirler. Şu ana kadar bilinen 4000'den fazla farklı flavonoid vardır. Silymarinin bileşenlerinin yapısı 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır (15). Silymarini % 70-80 flavonolignanlar ve % 20-30 oranında tanımlanmamış polifenolik bileşenler oluşturur. Silymarinin doğal bileşenlerinden olan silybin en etkili olandır ve silymarinin % 80'ini oluşturur (25,41,49). Bunun dışında isosilybin, silychristin ve silydianin diğer bileşenlerdir (36,44,49). *Silybum marianum*'un tohumlarında bulunan diğer flavonolignanlar ise dehydrosilybin, desoxysilychristin, desoxysilydianin, silandrin, silybinome, silyhermin ve neosilyhermindir (19,26,35).

Silymarin suda çok az çözünür. Ağız yoluyla kapsül halinde alındığında sindirim kanalından yayılma gösterir (karaciğer, mide, bağırsak, pankreas). Plazmadaki en yüksek değeri hem insan hem hayvan safra tuzlarında 4 ile 6 saat arasında bulunmuştur. Silybin ve silymarinli diğer bileşenler karaciğerde sülfat ve glukronik asitle hızla konjuge olurlar. Konjugatlar plazmaya ve safraya geçer. Bulgulara göre silymarin enterohepatik bir dolaşım göstermektedir; bağırsakta emilim, karaciğerde konjugasyon, safradan salınım, bağırsak florası tarafından hidroliz, bağırsaktan tekrar emilim. Silymarin temel olarak safrayla, daha az bir kısmı ise idrarla atılır. Yarı ömrü 6-8 saattir. Toksisitesi oldukça düşüktür. Embriyotoksik bir özelliği bulunmamaktadır. Silymarinin akut toksisitesine ait çalışmalar fare, sıçan, tavşan ve köpekte damar içine verildikten sonra çalışılmıştır. LD50 değerleri farede 400 mg/kg, sıçanda 385 mg/kg, tavşan ve köpekte 140 mg/kg dır. Bu değerlerinin birbirine yakınlığı infüzyon hızıyla orantılıdır (15).

Silymarinin temel aktivitesi polifenolik içerenlerinin antioksidan etkisidir. Bu yüzden bu konudaki çoğu çalışma silymarin ve silybin üzerine odaklanmıştır (14). In vivo ve in vitro çalışmalarda çeşitli toksinlere karşı koruyucu etkisi çeşitli organ ve hücre tipleri üzerinde farklı mekanizmalarla kanıtlanmıştır. Özellikle oksidatif stresle mücadelede serbest oksijen türevlerini ortadan kaldırmasıyla dikkat çekmektedir (25).

Eczanelerde kapsül halinde satılan bu madde özellikle karaciğerde çoklu etkileri sebebiyle birçok karaciğer hastası tarafından kullanılmaktadır. Silymarinin medikal uygulamalarında en çok siroz, hepatit gibi karaciğer hastalıklarında koruyucu özelliği üzerinde durulmaktadır (15,18,40). Bu gibi hastalıklarda silymarine destekleyici tedavi olarak başvurulmaktadır (7,26). Birçok karaciğer toksini serbest radikal mekanizmalarla hasar verici etkiler oluşturur. Silymarinin karaciğer yenilenmesindeki şaşırtıcı etkisi; protein sentezini uyarması, hücrel glutatyon seviyesini arttırması ve lipid peroksidasyonunu baskılamasıyla açıklanabilir. Glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin pankreatik aktivitesini uyarır (25,35).

Silymarin önceleri yalnızca karaciğerde koruyucu ve yenileyici olarak bilinmekteydi. Hayvan modellerinde ve insan hepatositlerinin primer kültüründe karbon tetraklorid, D-galaktozamin, tioasetamid, etanol, parasetamol, benzopiren, thallium, bakteriyel endotoksinleri, viral hepatit, toksik hepatit, alkol nedenli karaciğer hastalıklarına bağlı

karaciğer hasarına karşı korumaktadır (5,8,10,11,14). Ayrıca Amanita mantarı zehirlenmelerinde de koruyucu etkileri bulunmaktadır (12,21,29,33).

Silymarinin antioksidan etkisi, protein sentezini uyarması ve hücre yenilenme etkisiyle birçok kanser tipinin yayılmasını azaltabileceği düşünülmektedir (13,32,51). Silymarin hayvan modellerinde fotokarsinogenesisine karşı koruyucu etki göstermektedir. Tüysüz fare modelinde (SKH-1) deride lokal silymarin uygulaması UVB nedenli tümörü, silymarin uygulanmamış hayvanlardaki tümör büyüklüğüyle karşılaştırıldığında azaltıcı etkisi görülmüştür. Steroid hormon reseptörüne bağlı kanserli prostat hücre serisinde (LNCaP) hücre çoğalmasını engelleyerek anti-androjenik etkisi kanıtlanmıştır. İnsan deri hücrelerinde yapılan bir çalışmada silymarinin UVA nedenli oksidatif stresi engellediği görülmüştür (2,44,49). Ayrıca insan melanoma hücrelerinde de (A375-S2) UV uygulamasına karşı koruyuculuk göstermiştir (20,25).

Hepatik stellat hücreleri karaciğer fibrogenesisinde önemli patolojik göreve sahiptirler. Bazı fibrotik etkilere yanıt olarak çoğalırlar ve karaciğerdeki kolajen fiberlerinin depolanmasına yanıt olarak myofibroblastlara dönüşürler. Silymarin sıçan hepatik stellat hücrelerinin myofibroblastlara dönüşümünü ve fibrosis için gerekli hücre dışı matriks içeriğinin gen ekspresyonunu da azaltmıştır. Bu çalışma silymarinin anti-fibrotik etkisini kanıtlamaktadır (25,29). Silymarinin anti-anjiyojenik etkisi insan göbek kordonu toplar damar endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde çalışılmıştır. Bu etkisinin doza bağlı olarak ve vasküler endotel büyüme faktörünü (VEGF) azaltmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu etki insan ovaryum kanserinde de kanıtlanmıştır (25,53).

Silymarinin koruyucu etkisi sıçanlarda cisplatin uyarımlı nefrotoksisitede de kanıtlanmıştır. Cisplatinden önce silymarin uygulamasıyla glomerular ve böbrek toksisitesinde önemli düşüşler gözlenmiştir (25,51).

Antioksidan özelliğine bağlı olarak silymarinin bazı nörodejeneratif ve nörotoksik süreçlerin engellenmesinde ve tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (35,45). Lipopolisakkarit uyarımlı BV-2 (mikroglia aktivasyon modelinde) hücrelerinde silymarin doza bağlı olarak iNOS üretimini baskılamaktadır (35,45).

6.3. Glia ve C6 Hücreleri

Sinir sisteminde iki temel hücre tipi bulunmaktadır: sinir hücreleri (nöronlar) ve glia hücreleri. Glia hücreleri destekleyici hücrelerdir ve isim olarak kökeni Grekçe 'glue' sözcüğünden gelmektedir. Sayıca nöronlardan daha fazladır. İnsan beynindeki hücrelerin % 90'ını glia hücreleri oluşturmaktadır (19,22). Glialar, nöronların hücre gövdelerinin, aksonlarının ve dendritlerinin etrafını sararlar ve onları desteklerler. Gliaların elektriksel sinyallere doğrudan karıştığına dair bir kanıt yoktur. Sinyalleme nöron hücrelerinin işlevidir. Yapılan son çalışmalar glia hücrelerinin beyin gelişimi ve fonksiyonunda daha etkili ve gerekli görevlerinin olduğunu göstermektedir. Gliaların, en az 8 farklı yaşamsal görevlerinin olduğu düşünülmektedir ve aşağıda özetlenmiştir (19,22,31).

1. Nöronları destekleyerek beyin dokusunu oluştururlar. Ayrıca nöron gruplarını ve sinaptik bağlantıları birbirinden ayırırlar.
2. Oligodendrositler ve Schwann hücreleri sinir hücre aksonlarını izole eden myelin tabakayı oluşturarak elektriksel iletinin daha hızlı olmasını sağlarlar.
3. Bazı glia hücreleri süpürücüdür. Hasar ya da nöronal ölümlerden sonra kalan artıkları uzaklaştırırlar.
4. Glia hücreleri nöronlar arasındaki uyarıları kolaylaştırırlar. Örneğin, bazı glialar sinaptik ileti sırasında nöronlardan salınan kimyasal transmitterleri alarak ortamdan uzaklaştırırlar.
5. Beyin gelişimi sırasında radial glia gibi belirli glia hücre çeşitleri nöron göçüne rehberlik ederler ve akson büyümesine yol gösterirler.
6. Bazı durumlarda, omurgalıların sinir kas kavşağında olduğu gibi, glia hücreleri presinaptik uçtaki özellikleri aktif olarak düzenler.
7. Bazı glia hücreleri örneğin astrositler, kan beyin engelinin oluşumuna katkıda bulunarak kandan beyine toksik maddelerin girişini engellemiş olurlar.
8. Sinaps oluşumunu ve sinaptik plastisiteyi düzenleyen büyüme faktörleri ile nöromodulatorleri salarak glia hücrelerinin sinapslarla ilişkisini sürdürmesini sağlarlar ve sinir hücrelerinin beslenmesine yardım ederler. Bu nörotrofik faktörlerden bazıları şunlardır; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), glia kökenli nörotrofik faktör (GDNF), siliar nörotrofik faktör (CNTF), glia kökenli neksin, epidermal büyüme faktör (EGF) ve hepatosit büyüme faktör (HGF).

Merkezi sinir sisteminde 3 genel tip glia hücresi bulunmaktadır: Bunlar mikroglia, oligodendrosit ve astrositlerdir. Glia çeşitlerinin bazı özellikleri aşağıdadır (19,22,31).

Mikroglialar fagositik hücrelerdir ve makrofajlardan köken alırlar. Embriyolojik ya da fizyolojik olarak sinir sistemindeki diğer hücre tipleriyle ilişkili değildirler. Dinlenme durumunda mikrogliaların nasıl davrandıkları çok fazla bilinmemekle birlikte enfeksiyon, hasar ve travma sırasında aktive oldukları ve durumu iyileştirme yönünde çalıştıkları bilinmektedir. Mikrogliaların multiple skleroz (MS), kazanılmış immün eksiklik hastalığı (Acquired Immuno Deficiency Syndrome, AIDS) ilişkili demans, çeşitli kronik nörodejeneratif hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer gibi çok sayıda hastalıkta aktive olduğu düşünülmektedir (22,52).

Oligodendrositler ve Schwann hücreleri daha küçük hücre tipleridir. Her iki tip hücre de elektriksel uyarıların iletimini arttıran myelin kılıfı oluşturarak aksonu çevresinden izole ederler. Bir oligodendrosit merkezi sinir sisteminde ortalama 15 aksonal internodu sararken Schwann hücreleri periferik sinir sisteminde yalnızca bir aksonun bir internodunu sarabilmektedir (22,31).

Astrositler glial hücrelerinin sayıca en fazla olanıdır. Hücre gövdeleri düzensiz yıldız biçimine benzediği için bu adı almışlardır (22,52). Glial fibril asidik protein (GFAP) astrositler ve diğer glia hücrelerinde bulunduğu bilinen aracı bir filamenttir (30). Bazı astrositler omurilik ve beyinde sinir hücrelerinin yüzeylerinde uç ayak oluşturarak bu hücrelere besin getirmede rol oynayabilirler. Diğer bazı astrositler beyin kan damarlarındaki uç-ayakta yerleşmişlerdir ve damar endotel hücrelerinin sıkı bağlantılar kurmasını sağlayarak koruyucu kan beyin engelini oluşturmuşlardır (22). Astrositler ayrıca nöronlar arası ekstrasellüler alandaki K^+ iyon düzeyinin korunmasına yardım ederler. Bu hücreler potasyuma yüksek derecede geçirgendir ve artmış potasyum miktarını içlerine alarak komşu nöronları fazla potasyumdan korurlar (30). Ayrıca sinaptik bölgelerden salınımdan sonra nörotransmitterleri tutabilirler ve bu çevredeki transmitterleri uzaklaştırarak sinaptik aktiviteleri düzenlemeye yardımcı olurlar (22,52). Glutamat ve dopamin gibi nörotransmitter düzeylerini düzenledikleri bilinmektedir (28). Astrositler nöronal metabolizma için merkez teşkil ederler. Astrositler bazı aminoasitlerin beyinde sentezi için önemli bir merkez görevi görür (19,30). Astrositler enerji metabolizması için gerekli glukozu laktik aside dönüştürerek nöronlara verirler. Nöronlar da enerji metabolizması için pirüvata çevirirler. CO_2 pirüvatin

oksidatif metabolizmasının sonrasında nöronlar tarafından üretilir. Astrositler bulundukları karbonik anhidraz enzimiyle asit-baz dengesini düzenler (30). Fakat astrositlerin en yaygın olarak bilinen görevi destekleyici eleman olmalarıdır (22).

Gliyal tümörler santral sinir sistemi tümörlerinin en geniş grubudur. Gliyal tümörlerin içerisinde en sık görüleni glioblastoma multiformedir (GBM). Glioblastomalar gliomaların en malign şeklidir. Glioblastoma multiforme hücrelerin merkezi sinir sistemine yayılması sonucu nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açan bir kanserdir. Malign astrositoma olarak da bilinmektedir. Hücreleri malign olup fusiform, yuvarlak ve kromatince zengin olurlar.

Malign astrositomalar anjiogenesisi önemli derecede uyarırlar. Bu değişikliğin hücre genetiğiyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Bazı kimyasallar ve bedenin baş kısmının röntgen ışınlarına maruz kalmasının hücre genetiğini bozduğu ve astrositoma oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Organizmanın zayıf immun yanıtı da tümör oluşumunu kolaylaştırmaktadır.

Glioma (C6) oluşumunda genetik faktörlerin önemli bir yer tuttuğu artık bilinmektedir. Genetik yapıya ait değişikliklerin iki tanesi ön plandadır: Hücre bölünmesini ortaya çıkaran onkojenlerin varlığı ve tümör baskılayıcı genlerini kaybetmiş hücrelerin ortaya çıkması. Tümör baskılayıcı genler astrositomaların 10 ve 17. kromozomlarında yerleşmişlerdir.

C6 hücreleri yüksek mitotik aktivite, endotel çoğalması, hücre göçü, hücre çekirdeklerindeki farklılık, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahiptirler. Hayvan beyin tümörlerinin insan beyin tümörüyle olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanması açısından oldukça yol göstericidir. C6 sıçan glia tümör modeli insan glioblastomasına benzerliğinden dolayı bu araştırmalardan kullanılmaktadır (24).

7. GEREÇ VE YÖNTEM

7.1. Glia Hücre Kültürünün Yapılması

Hücre kültürü fizyolojik ve patolojik olayların araştırılması, sinyal mekanizmalarının açıklanması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarının aydınlatılabilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çoğu hücre kültürleri % 95 O₂ ve % 5 CO₂ ile temel olarak hiperoksik bir ortamdır ve in vivo ortama benzetilmeye çalışılır. Kültürdeki hücreler in vivo'dan farklı olan bu ortama uyum sağlayarak şartlar izin verdiği sürece gelişip çoğalırlar (17).

7.1.2. Karışık glia hücrelerinin elde edilmesi

Çalışmada yeni doğan Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Üretim ve Bakım Biriminden temin edildi. 1-3 günlük sıçanların baş kısımları % 80'lik alkolle temizlendi ve makas yardımıyla kesildi. Başlar, buz üzerinde duran ve içinde besiyeri bulunmayan petri içine aktarıldı. İki adet ince uçlu penset yardımıyla baş derisi çıkarıldıktan sonra kafatası penset yardımıyla ayrıldı. Beyin bütün olarak yine buz üzerindeki soğuk Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) + penisilin-streptomisinli besiyeri bulunduran başka bir petri kabına aktarıldı. Beyin üzerindeki zarlar besiyeri içinde ayrılıp, beyin başka bir petriye aktarıldıktan sonra üzerine steril DMEM eklendi. Steril DMEM içindeyken kan damarları ve zarlar temizlendikten sonra, dokular bir makas ya da iki ince uçlu penset yardımıyla mümkün olduğunca ufak parçalara ayrıldı. Ayrılan parçalar pastör pipetiyle 15 mililitrelik santrifüj tüpü içerisine kondu. Santrifüj tüpü içinde yaklaşık olarak 2.5 mililitrelik besiyeri bulunmalıdır. Pastör pipeti ile dokular iki üç kez çekilip bırakıldı. Üzerine yaklaşık 5.5 ml oluncaya kadar DMEM eklendikten sonra 25-30 kez tekrar pastör pipetiyle homojenizasyona devam edildi. Tüpün içine 1/10 oranında % 0.25 tripsin- Etilen diamin tetraasetikasit (EDTA) eklendi. Santrifüj tüpü tripsinin etkisini gösterebilmesi için 37°C'de 10-15 dakika su banyosunda bekletildi. Bu süreden sonra tripsinin etkisini yok etmek için daha önceden su banyosunda bekleyen besiyerinden 3-4 damla kondu. Tüpler 1200 devir/dk, 4°C de 5 dakika döndürüldü. Santrifüjden sonra yeni bir pastör pipetiyle üst kısımda kalan sıvı uzaklaştırıldı. Üzerine 37°C'ye getirilmiş besiyerinden 3 ml konduktan sonra pastör pipetiyle birbirine

yapışan hücrelerin ayrışması için 25-30 kere homojenize edildi. Hücreler petri içerisinde DMEM + %1 penisilin + streptomisin ve % 10 fetal dana serumu (fetal calf serum=FCS) içeren besiyeri içerisinde % 5 CO₂, 37°C ve % 100 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler petri kabını % 85-90 oranında kaplayınca tripsin uygulanarak büyük flasklara aktarıldı. Bir grup flask, ürettiğimiz primer hücrelerin glia kökenli olup olmadığını belirleyen tavşan anti-gliyal asidik proteini (GFAP) antikorunu kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyama için ayrıldı. Kalan flaskların besiyerleri 3 günde bir değiştirilerek, flasklardaki hücreler % 85-90 oranında flask tabanını kaplayacak şekilde çoğaltıldı ve sonraki aşamalara hazır duruma getirildi.

Boyama için gerekli malzemeler

Primer antikor : GFAP antikorunu.

Sekonder antikor : Keçi anti- tavşan IgG (Sigma).

Peroksidaz solüsyonu.

Asetat tamponu (2,5 mol/L, pH= 5.0).

AEC Kromojen: N-dimetilformamid içinde 3 –amino-9 ethylcarbozole (AEC).

H₂O₂ (%3).

Bloklayıcı serum : Normal keçi serumu (Sigma).

Saf soğuk etanol, tris solüsyonu, deiyonize su ve hematoksilen.

Ekilen hücrelerin glia olduğunu belirlemek amacıyla üzerinde hücrelerin büyüyeceği lameller ve besiyeri bulduran iki petri ayrıldı. Ayrılan bu petrilerdeki hücreler saf soğuk etanol ile yıkanarak sabitlendi. Sabitlenen hücreler daha sonra 2 damla % 3'lük H₂O₂ ile 10 dakika muamele edildi. Tris solüsyonu ile yıkanarak bloklayıcı serumla 10 dakika inkübe edildikten sonra lamel yüzeyini kaplayacak şekilde GFAP antikorunu eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra hücreler tekrar Tris ile yıkanarak üzerine 2 damla sekonder antikor eklendi ve 20 dakika inkübasyonda kaldı. Sonra tekrar Tris solüsyonuyla yıkanarak 2 damla peroksidaz ile 20 dakika inkübe edildi. Tris ile yıkanan lamel için şu karışım hazırlandı: 4 ml deiyonize su, 2 damla asetat tamponu, 1 damla %3 lük H₂O₂, 1 damla AEC kromojeni.

Bu karışım hücreler üzerine döküldükten sonra 10 dakika inkübe edildi ve 5 dakika deiyonize su ile yıkandı. Yıkamadan sonra hücreler hematoksilenle 10 saniye boyandı.

Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra inverted mikroskopta inceleme yapıldı. İnceleme sonucu kırmızı-kahverengi renkte görülen hücreler glia olarak değerlendirildi.

7.1.3. C6 hücrelerinin üretilmesi

Sıvı nitrojen içinde dondurulmuş olarak saklanan C6 hücreleri, oda sıcaklığında çözündükten sonra 1:1 oranında DMEM, % 10 FCS ve % 1 penisilin+streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir/dk, 4°C'de 5 dakika döndürüldü. Üstteki süpernatant atılarak dondurma işleminde kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) uzaklaştırıldı. Dipteki hücreler, besiyeri bulunan flasklar içerisinde % 5 CO₂, 37°C ve % 100 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı ve hücreler flask tabanını % 85-90 oranında kapladıktan (ortalama 3 gün) sonra deneye alındı.

7.1.4. Hücrelerin sayılması ve ekilmesi

Flaskların (75 cm²) tabanını kaplayan besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Daha sonra flasklar Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklardaki hücreler 15 dakika % 25 tripsin-EDTA ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve bir santrifüj tüpüne alınarak 4 °C'de 1200 devir/dk'da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte kalan sıvı kısım atıldı ve altta kalan hücre çözeltisinden bir damla pipet yardımıyla alınıp mikroskopta sayılarak 1 mililitrede bulunan hücre sayısı belirlendi. Her bir kuyucuğa 2×10⁴ hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu steril kaplara ekildi. 24 saat kuluçka süresine bırakıldı.

Silymarin ve H₂O₂ dozlarının hazırlanması

Kullandığımız bütün çözeltiler her deneyden önce taze olarak hazırlandı. Toz halinde bulunan silymarin, DMSO içinde çözüldü. Hazırlanan depo çözeltiler seyreltilerek silymarininin 1, 10, 50, 75, 100 ng/ml dozları elde edildi. DMEM kullanılarak % 30'luk H₂O₂ çözeltisinden 1 ile 100 µM arası dozlar hazırlandı.

7.2. Deney Grupları

1. **Kontrol grupları:** Glia ve C6 hücrelerine, sadece besiyeri uygulandı (n=18).
2. **Silymarin grubu:** Glia ve C6 hücrelerine 1, 10, 50, 75, 100 ng/ml silymarin dozları, % 5 FCS ve % 1 penisilin+streptomisin içeren DMEM içinde her grup için 24 veya 48 saat uygulandı (n=18).
3. **Silymarin + H₂O₂ grubu:** Glia ve C6 hücrelerine önce 30 dakika tek başına silymarin ön inkübasyonunun ardından serumsuz ortamda 100 µM H₂O₂ ile birlikte 1, 10, 50, 75 ve 100 ng/ml silymarin eş zamanlı olarak 3 saat uygulandı (n=18). Bu sürenin sonunda ilaç ortamdaki uzaklaştırılarak yerine besiyeri eklendi.
4. **Silymarin kontrol grubu:** Glia ve C6 hücrelerine serumsuz ortamda 3,5 saat süreyle 1, 10, 50, 75, 100 ng/ml silymarin dozları uygulandı. Sonrasında 24 saatlik iyileşme sürecine bırakıldı (n=18).

7.3. MTT Yöntemi

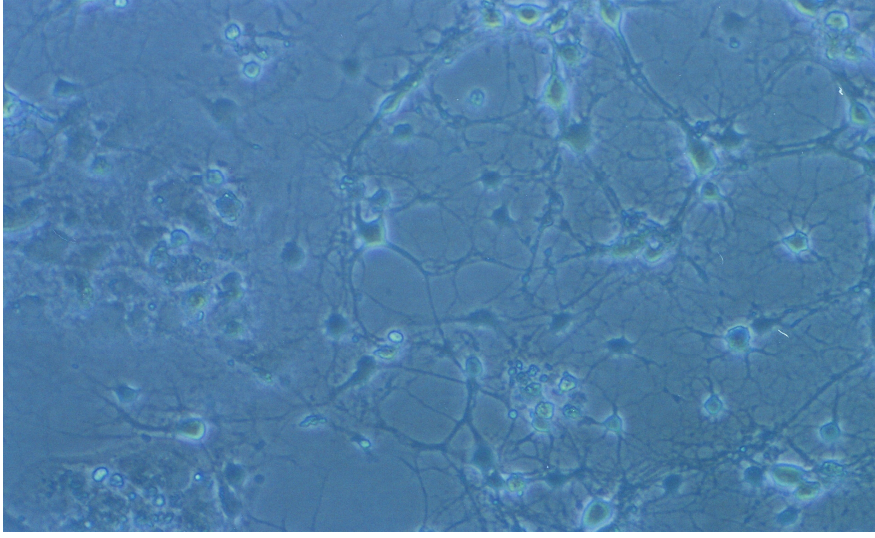
İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksitesisi Mossmann tarafından tanımlanan ve Alley tarafından geliştirilen MTT spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (4,34). MTT (Sigma), fosfat tampon çözeltisi (PBS) içinde çözülerek hazırlandı ve filtre edildi. Her 250 µl besiyeri için 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 37 °C de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri çekilerek 100 µl DMSO eklendi. Kaplar 5-8 dakika çalkalanarak beklendi. 550 nm'de oluşan formazan boya absorbansı spektrofotometrede (Bio Tek) okundu. Canlı hücrelerin mitokondrisinde oluşan ve MTT ürünü olan formazan, yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden, ilaç verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

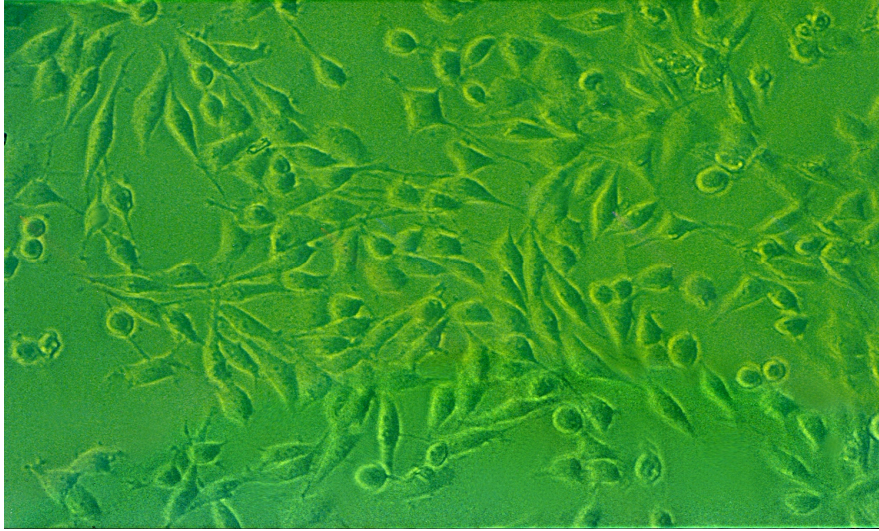
Elde edilen veriler kontrolün ortalama % fraksiyonu \pm standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi.

8. BULGULAR

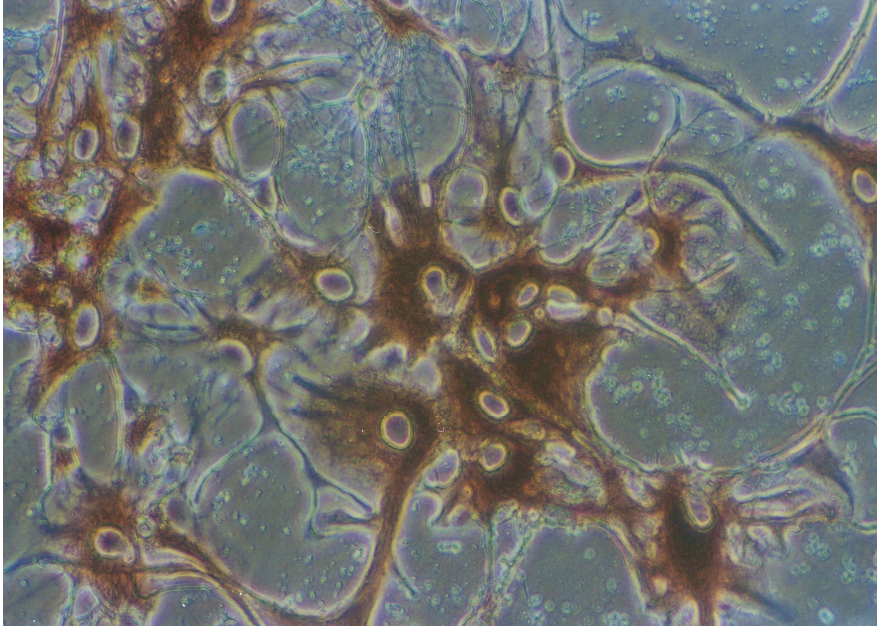
Şekil 2 kültürdeki primer karışık glia hücrelerinin genel görüntüsüdür. C6 hücrelerinin genel görüntüsü Şekil 3’te görüldüğü gibiydi. Şekil 4 ve 5 kültürdeki glia hücrelerinin GFAP pozitif görüntülerini içermektedir.



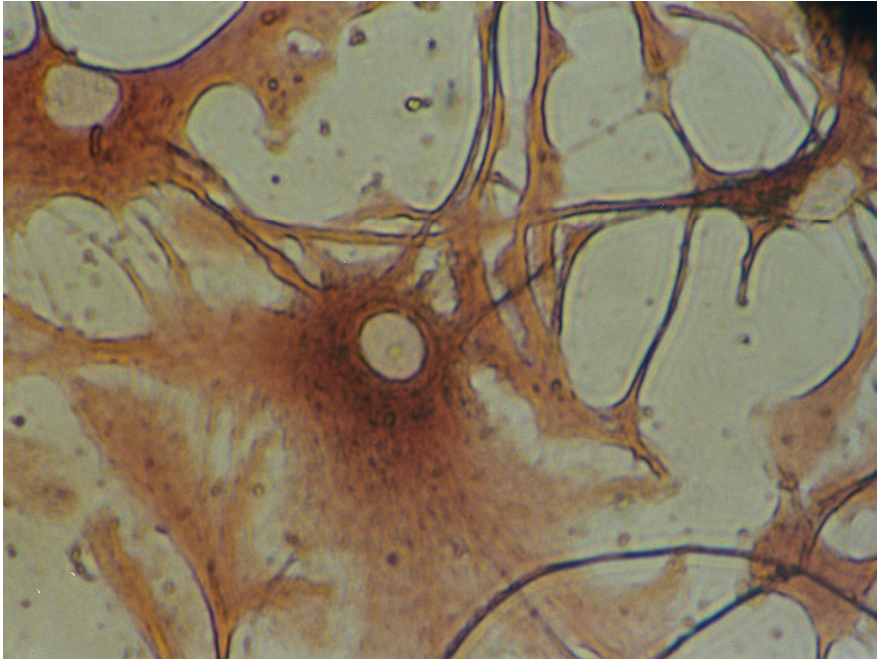
Şekil 2: Glia hücrelerinin genel görüntüsü (200X).



Şekil 3: C6 hücrelerinin genel görüntüsü (200X).

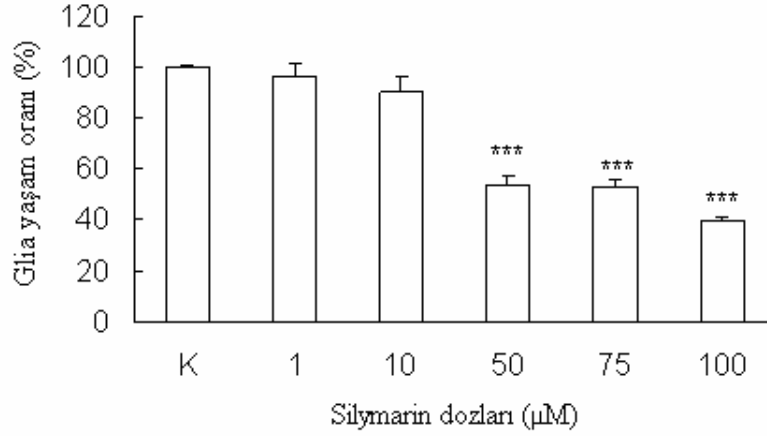


Şekil 4: GFAP (+) sıçan glia hücreleri (200X).



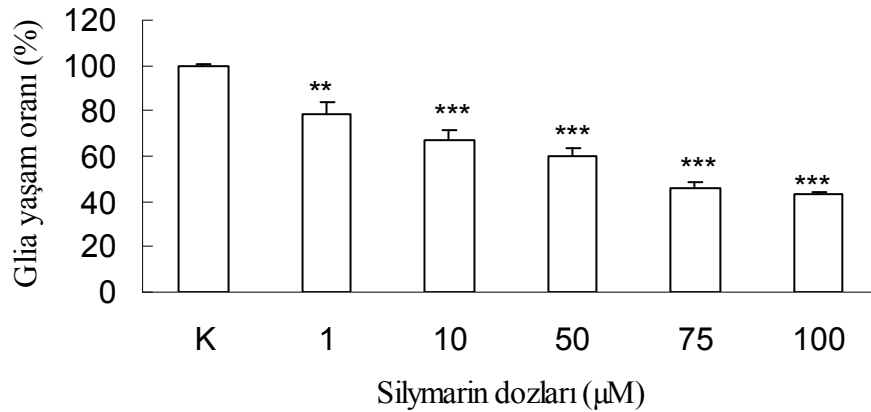
Şekil 5: GFAP (+) sıçan glia hücreleri (400X).

Silymarin tek başına 1, 10, 50, 75 veya 100 μM dozlarında primer karışık glia hücrelerine 24 saat süreyle uygulandı. Kontrolle kıyaslandığında 1 ve 10 μM dozları anlamlı bir fark ortaya koyamadı ($p>0,05$). Kontrol grubunu % 100 olarak kabul ettiğimizde, glia hücre yaşam oranı 50 μM 'da % 53, 75 μM 'da % 52, 100 μM 'da ise % 37 olarak bulundu. 50 μM 'dan itibaren silymarin tüm gruplarda glia yaşam oranını azalttı ($p<0,001$, Şekil 6). Karışık glia hücrelerine 24 saat silymarin verildiğinde IC_{50} değeri 79 μM olarak hesaplandı.



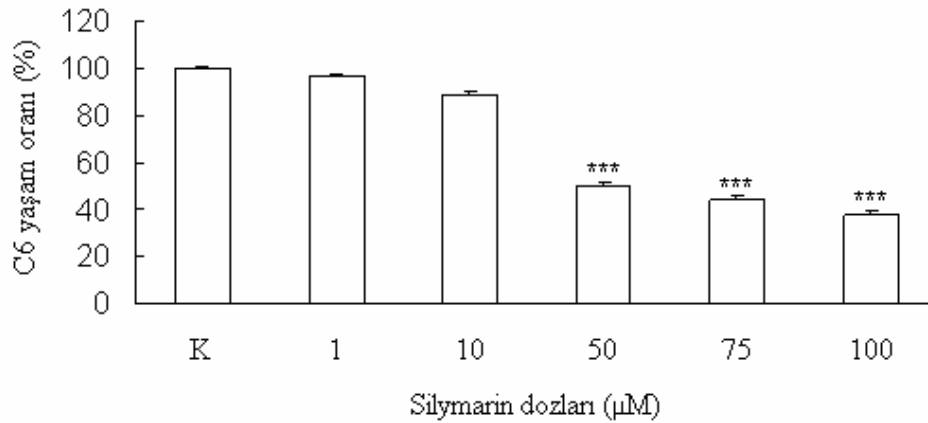
Şekil 6: Silymarinin 24 saatte glia hücreleri üzerine etkisi (***: $p<0,001$)

Silymarin karışık primer glia hücrelerine 48 saat süreyle 1, 10, 50, 75 veya 100 μM dozlarında uygulandı. Kontrol grubunu % 100 olarak kabul ettiğimizde hücre canlılıkları 1 μM 'da % 78, 10 μM 'da % 67, 50 μM 'da % 60, 75 μM 'da % 46, 100 μM 'da % 43 olarak bulundu. 1 μM 'dan başlayarak silymarin tüm gruplarda canlı hücre sayısını azalttı ($p<0,001$, Şekil 7). Karışık glia hücrelerine 48 saat silymarin verildiğinde IC_{50} değeri 67,5 μM olarak belirlendi.



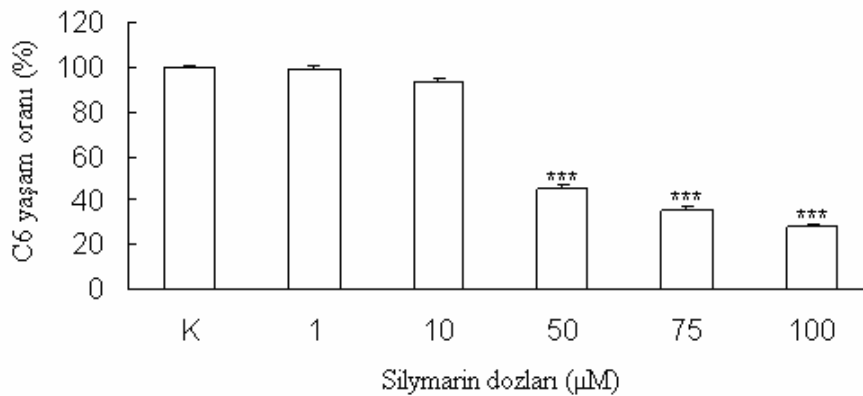
Şekil 7: Glia hücrelerine uygulanan silymarinin 48 saatte etkisi (** : $p<0,01$)

Tek başına silymarin C6 hücrelerine 1, 10, 50, 75 veya 100 μM dozlarında 24 saat süreyle uygulandı. Kontrol grubunu %100 olarak kabul ettiğimizde C6 hücre yaşam oranı 50 μM 'da % 50, 75 μM 'da % 43, 100 μM 'da % 37 olarak hesaplandı. Tek başına silymarin uygulaması 50 μM 'den başlayarak canlı hücre oranını azalttı. 50 μM 'dan itibaren tüm gruplarda istatistiksel olarak kontrol grubundan anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$, Şekil 8). C6 hücrelerine 24 saat silymarin verildiğinde IC_{50} değeri 50 μM olarak hesaplandı.



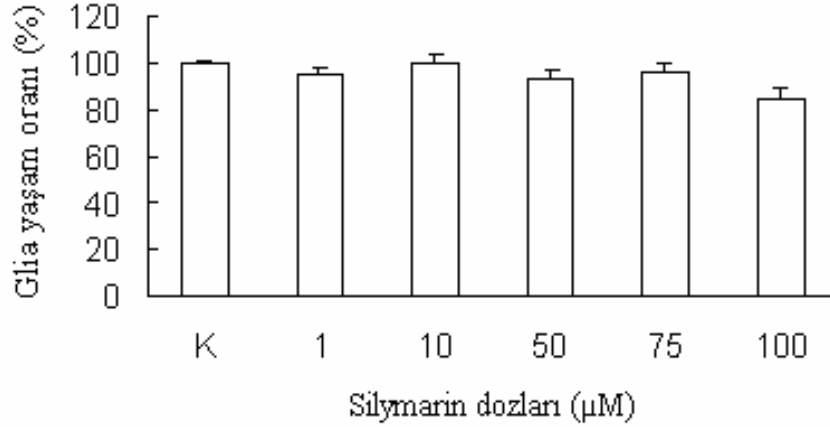
Şekil 8: Silymarinin 24 saatte C6 hücre çoğalmasına etkisi

Silymarin tek başına 1, 10, 50, 75 veya 100 μM dozlarında C6 hücrelerine 48 saat süreyle uygulandı. Kontrolle kıyaslandığında 1 μM ve 10 μM dozlarında anlamlı değildi, fakat yaşayan hücre oranı 50 μM 'da % 44, 75 μM 'da % 35, 100 μM 'da % 27 olarak bulundu. 50 μM 'dan başlayarak silymarin tüm gruplarda C6 yaşam oranını azalttı ($p < 0,001$, Şekil 9). IC_{50} değeri 43 μM olarak bulundu.



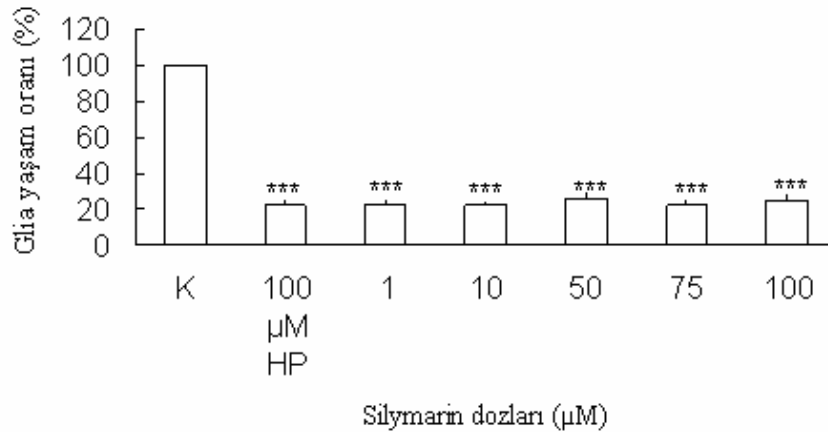
Şekil 9: Silymarinin 48 saatte C6 hücre çoğalmasına etkisi

Karışık primer glia hücrelerine 1, 10, 50, 75 veya 100 μM dozlarında 3,5 saat süreyle tek başına uyguladığımız silymarin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı (Şekil 10).



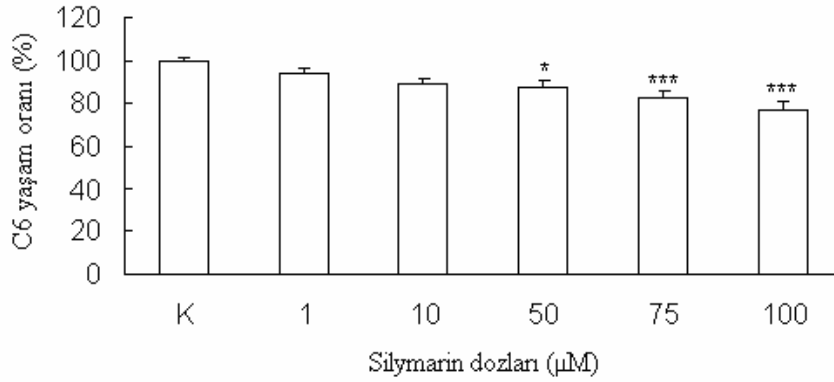
Şekil 10: 3,5 saat uygulanan silymarinin glia yaşam oranına etkisi

Hücrelerin % 75'inin ölümüne neden olan 100 μM H_2O_2 dozu kullanıldı. Primer karışık glia hücrelerine önce 30 dk tek başına silymarin ön inkübasyonunun ardından 3 saat boyunca 100 μM H_2O_2 ile eş zamanlı olarak farklı silymarin dozları uygulandı. Silymarin gruplarının tümü H_2O_2 grubundan anlamlı bir fark oluşturmadı ve glia yaşam oranını % 21'e düşürdü. Bu gruplarda silymarinin herhangi bir koruyucu etkisi gözlenmedi (Şekil 11).



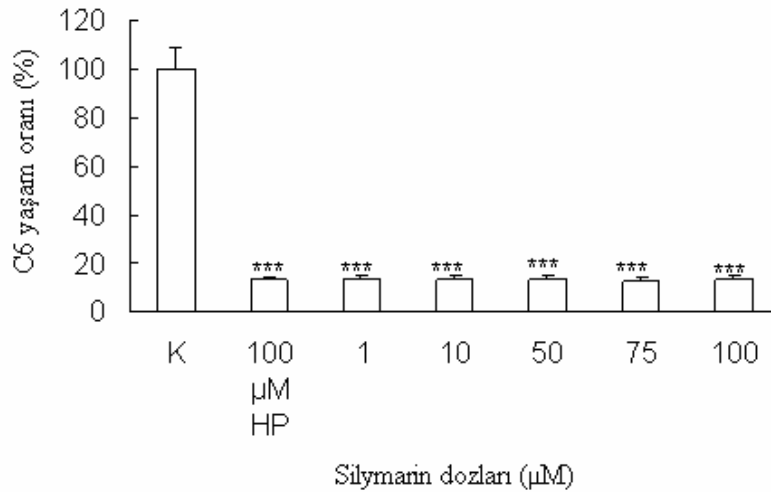
Şekil 11: H_2O_2 + silymarinin glia hücreleri üzerine etkisi

C6 hücrelerine 3,5 saat süreyle 1, 10, 50, 75 veya 100 μM dozlarında silymarin uygulanmıştır. Kontrol grubunu % 100 olarak kabul ettiğimizde C6 hücre yaşam oranı 50 μM 'da % 87, 75 μM 'da % 82 ve 100 μM 'da % 77 olarak bulundu. 50 μM 'dan itibaren silymarin tüm gruplarda C6 yaşam oranını azalttı (Şekil 12).



Şekil 12: 3,5 saat uygulanan silymarinin C6 hücre çoğalmasına etkisi (* : $p < 0,05$)

Hücrelerin % 75'inin ölümüne neden olan 100 μM H_2O_2 dozu kullanıldı. Önce 30 dk sadece silymarin verildi. Ardından 3 saat uyguladığımız H_2O_2 ile birlikte uyguladığımız silymarin, C6 hücre yaşam oranını % 13'e düşürdü ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). H_2O_2 ile birlikte uygulanan farklı silymarin gruplarının hepsi, sadece H_2O_2 alan grupta kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmadı. Bu gruplarda H_2O_2 toksisitesine karşı herhangi bir koruma gözlenmedi (Şekil 13).



Şekil 13: H_2O_2 + silymarinin C6 hücreleri yaşam oranına etkisi

9. TARTIŞMA

Çalışmamızda 50, 75 ve 100 µM dozlarında tek başına uyguladığımız silymarin, kontrole göre glia ve C6 hücre yaşam oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koymuştur. Silymarin glia hücrelerinde 24 ve 48 saat içinde yaşayan hücre sayısını en fazla % 63'e kadar azaltmıştır. C6 hücrelerinde ise bu oran % 73'e düşmüştür. Glia hücrelerine 3,5 saat süreyle uygulanan silymarin hücre yaşam oranını etkilemezken C6 hücrelerinde % 23'e kadar azaltmıştır. Sonuçlarımızı destekler biçimde yapılan bir çalışmada silymarinin 10⁻⁴ mol/l dozunda sıçan hepatik stellat hücrelerinin çoğalmasını ve myofibroblastlara dönüşümünü % 75 oranında azalttığı görülmüştür (29). Yapılan bir çalışmada silymarin kanserli prostat ve meme hücre serisinde VEGF'nin salınmasını azaltıp damar oluşumunu engelleyerek anti-mitotik etki göstermiştir (44). Kanserli prostat hücre serisinde silymarin, steroid hormon reseptörüne bağlı kanserli hücre çoğalmasını engellemiştir (25). Yapılan benzer iki ayrı çalışmada, aynı anda kültüre alınan kanserli kolon (LoVo) ve endotel hücre serilerinde silymarin endotel hücre göçünü, kemotaksisi ve hücre farklılaşmasını baskılamıştır (53). İnsan göbek kordonu toplar damar endotel hücreleri ile insan monosit hücre serisi (THP-1) birlikte ekildiğinde, silymarin arter duvarlarına monosit göçüne aracılık eden TNF-α uyarımlı VCAM-1, ICAM -1 ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin gen ekspresyonunu engellemiştir (23). Silymarin UV nedenli insan kanserli rahim ağzı hücrelerinde serumsuz besiyerinde, 80 µM'ın altındaki dozlarda hücre apoptozisini uyarırken, 160 µM dozunda nekroza götürmüştür (20). SKH-1 tüysüz fare modelinde bölgesel silymarin uygulaması UVB nedenli tümörü, ödemi baskılayarak apoptotik hücre ölümünü sağlamıştır (25).

Yaptığımız çalışmada sıçan glia ve C6 glioma hücrelerine silymarinin yarım saat ön uygulamasının ardından hücrelerin yaklaşık % 75'inin ölümüne neden olan 100 µM H₂O₂ dozu ile silymarin birlikte 3 saat süreyle uygulandı. H₂O₂ toksisitesine karşı 1, 10, 50, 75 ve 100 ng/ml dozlarında uygulanan silymarin hücre canlılığını üzerinde koruyucu bir etki gösterememiştir. Sonuçlarımızı destekler şekilde sıçan nöron hücre kökenli PC-12 feokromotoma hücre serisinde yapılan bir çalışmada da silymarin N-metil-4-fenilpiridinium iyonunun neden olduğu nörotoksisitede ve L-glutamata bağlı hücre ölümünde koruyuculuk göstermediği bulunmuştur (35).

Silymarinin insan keratinositlerinde UVA uygulaması sonucu oluşan oksidatif stresi engellediği görülmüştür. Bu çalışma, ayrıca UV ışığına maruz bırakılan insan keratinositlerinde ve okadaik asit ile lipopolisakkarit uygulanmış insan hepatoblastomada (HepG-2) yapılmış ve silymarinin transkripsiyon faktörü NF-KB'yi çok düşük konsantrasyonlarda (12 mg/ml) baskıladığı görülmüştür. Fakat silymarin forbol ester, lipopolisakkarit, okadaik asit ve seramide bağlı NF-KB aktivasyonunu engellerken, H₂O₂ nedenli NF-KB aktivasyonunu önemli ölçüde etkilememektedir (50). Çin hamster yumurtalık hücrelerinde (CHO-K1) yapılan bir çalışmada silymarin lipit peroksidasyonuna karşı hücre dayanıklılığını arttırmıştır (6). Östrojen bağımlı ve östrojenden bağımsız insan kanserli meme hücre serilerinde (MCF-7 ve MDA-MB468) 25 nM Doxorubicin'e karşı silymarin 100 µM dozunda baskılayıcı etki göstermiştir (25). Silymarin, sıçan pankreatik β hücrelerinde insülin eksikliği sonucu ciddi nekroza neden olan alloksan uygulaması sonrasında diyabetes mellitusta antioksidan enzimlerin pankreatik aktivitesini uyardığı ve pankreas fonksiyonlarını düzenlediği görülmüştür (47). Ayrıca silymarin radikal temizleyici ve hücre zarı stabilizasyon özelliğiyle kardiyomyositleri, kardiyotoksik bir ilaç olan Doxorubicin'nin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyarak sıçan kalp mikrozomlarında ve mitokondrideki Doxorubicin-Fe⁺³ komplekse bağlı olarak hasarı azaltmaktadır (25). Bir çalışmada silymarinin kültüre alınmış renal tübüler epitel hücrelerinde (LLC-PK1) cisplatin toksisitesi üzerinde koruyucu etkisi gözlenmiştir. İnsan keratinositleri ve fare fibroblastlarında yapılan bir diğer çalışmada H₂O₂ toksisitesine karşı silymarinin her iki hücre serisini de doza bağlı olarak koruduğu bulunmuştur (49). Ayrıca silymarin insan hepatositlerinin primer kültüründe karbon tetraklorit, galaktozamin, thioasetamid, etanol, parasetamol, benzopyren, thallium ve bakteriyel endotoksinler gibi toksinlerin neden olduğu karaciğer hasarına karşı koruyuculuk göstermiştir (8,12,13,21).

Silymarinin beyin üzerinde antioksidan etkisiyle ilgili veriler az sayıdadır. Fakat antioksidan özelliğine bağlı olarak bazı nörodejeneratif ve nörotoksik süreçlerin engellenmesinde ve tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (35). Nöronal hücre kültüründe yapılan bir çalışmada silymarinin lipopolisakkarite bağlı nörotoksositeye karşı dopaminerjik nöronları etkili bir biçimde koruduğu gösterilmiştir (35). Yine sıçan nöron hücre kökenli PC-12 feokromotoma hücre serisinde silymarinin hücre farklılaşmasına ve hücrelerin canlılığını sürdürmesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Silymarin sıçan PC-12 hücrelerinin farklılaşmasını arttırmış ve oksidatif stresin uyardığı apoptosise karşı primer hippokampal nöronları korumuştur (25).

Çalışmalarımız sonucunda, antioksidan olarak bilinen silymarin H_2O_2 ile oluşturduğumuz oksidatif strese karşı glia ve C6 hücrelerini korumamıştır. Çalışmamızda silymarin glioma hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak anti-kanser etki göstermektedir. Yalnız kullandığımız dozlarda silymarinin, normal glia hücre çoğalmasını da baskıladığı için bir anti-kanser ilaç olarak kullanılması sakıncalı olabilir. Silymarinin bu hücre tipleri üzerine olan etkisinin daha detaylı araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

10. SONUÇ

Serbest oksijen türevlerinin cinsine göre değişik hasar tiplerinin oluşabileceği ve pek çok radikalın aynı anda oluşması halinde ortaya çıkan hasarın derecesinin hem ortamdaki serbest türevlerin çeşidine ve seviyesine, hem de savunma sistemlerinin etkinliğine bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Geçen birkaç yıl boyunca oksidatif stresin hastalıklardaki rolü, mekanizması ve serbest oksijen türevleri nedeniyle oluşan hücre hasarının daha iyi anlaşılması, antioksidan terapilerdeki gelişmeyi de beraberinde getirmiştir. Birleşik terapi ya da biyolojik aktivitesi arttırılmış ve/veya daha güçlü yeni bileşenlerin geliştirilip uygulanması başarıyı arttıracaktır.

Çalışmamızda kullandığımız farklı silymarin dozları, sıçan glia ve C6 glioma hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde baskılamıştır. Glia ve C6 hücrelerinde 100 µM H₂O₂ ile oluşturduğumuz toksisiteye karşı silymarin koruyucu bir etki de gösterememiştir.

11. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. AHAMED, M., SIDDIQUI, M. K. J., 2007, Low level lead exposure and oxidative stress current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383, 1-2, 57-64 p.
2. AHMAD, N., GALI, H., JAVED, S., AGARWAL, R., 1998, Skin cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signalling and perturbation in cell cycle progression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248, 294-301 p.
3. ALIDOOST, F., GHARAGOZLOO, M., BAGHERPOUR, B., JAFARIAN, A., SAJJADI, S. E., HOURFAR, H., MOAYEDI, B., 2006, Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from β -thalassemia major patients. *International Immunopharmacology*, 6, 1305-1310 p.
4. ALLEY, M. C., SCUDIERO, D. A. et al., 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro-culture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48, 589-601 p.
5. BARRETO, R., KAWAKITA, S., TSUCHIYA, J., MINELLI, E., PAVASUTHIPAISIT, K., HELMY, A., MAROTTA, F., 2005, Metal-induced oxidative damage in cultured hepatocytes and hepatic lysosomal fraction: beneficial effect of a curcumin/absinthium compound. *Chinese Journal of Digestive Diseases*, 6, 31-36 p.
6. BONGIOVANNI, G. A., SORIA, E. A., EYNARD, A. R., 2007, Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 6, 971-976 p.
7. CHANG, J. W., KIM, C. S., KIM, S. B., PARK, S. K., PARK, J. S., LEE, S. K., 2006, Proinflammatory cytokine-induced NF- κ B activation in human mesengial cells is mediated through intracellular calcium but not ROS: Effects of silymarin. *Nephron Experimental Nephrology*, 103, 156-165 p.
8. CHRUNGOO, V. J., SINGH, K., SINGH, J., 1997, Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by carbon tetrachloride, paracetamol and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35, 611-617 p.
9. CIPOLLONE, F., FAZIA, M. L., MEZETTI, A., 2007, Oxidative stress, inflammation and atherosclerotic plaque development. *International Congress Series*, 1303, 35-40 p.
10. CROCENZI, F. A., PELLEGRINO, J. M., POZZI, E. J., MOTTINO, A. D., GARAY, E. A., ROMA, M. G., 2000, Effect of silymarin on biliary bile salt secretion in the rat. *Biomedical Pharmacology*, 59, 1015-1022 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

11. CROCENZI, F. A., POZZI, E. J. S., PELLEGRINO, J. M., GARAY, E. A., MOTTINO, A. D., ROMA, M. G., 2003, Preventive effect of silymarin against tauroolithocholate-induced cholestasis in the rat. *Biomedical Pharmacology*, 66, 355-364 p.
12. DVORAK, Z., KOSINA, P., WALTEROVA, D., SIMANEK, V., BACHLEDA, P., ULRICHOVA, J., 2003, Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicology Letters*, 137, 201-212 p.
13. FARGHALI, H., KAMENIKOVA, L., HYNIE, S., KMONICKOVA, E., 2000, Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: A Study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharmacological Research*, 41, 2, 231-237 p.
14. FLORA, K., HAHN, M., ROSEN, H., BENNER, K., 1998, Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 93, 2, 139-143 p.
15. FRASCHINI, F., DEMARTINI, G., ESPOSTI, D., 2002, Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*, 22, 1, 51-65 p.
16. GÖKTÜRK, E., 1999, Serbest radikaller ve antioksidanlar. *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20, 1.
17. HALLIWELL, B., CLEMENT, M.V., RAMALINGAM, J., LONG, L.H., 2000, Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo. *IUBMB Life*, 50, 251-257 p.
18. HE, Q., RILEY, R. T., SHARMA, R. P., 2002, Pharmacological antagonism of fumonisin B₁ cytotoxicity in porcine renal epithelial cells (LLC-PK₁): A model for reducing fumonisin – induced nephrotoxicity in vivo. *Pharmacology & Toxicology*, 90, 268-277 p.
19. HE, F., SUN, Y.E., 2007, Glial cells more than support cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 661-665 p.
20. HUANG, Q., WU, L. J., TASHIRO, S., I., ONODERA, S., LI, L. H., IKEJIMA, T., 2005, Silymarin augments human cervical cancer HeLa cell apoptosis via P38/JNK MAPK pathways in serum-free medium. *Journal of Asian Natural Products Research*, 7, 5, 701-709 p.
21. JACOBS, B. P., DENNEHY, C., RAMIREZ, G., SAPP, J., LAWRENCE, V. A., 2002, Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 113, 6, 506-515 p.
22. KANDEL, E. R., 2000, Principles of neural science, (KANDEL, E. R., SCWARTZ, J. H., JESSELL, T. M., ed), Fourt ed., 20-21, United States of America.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

23. KANG, J. S., PARK, S. K., YANG, K. H., KIM, H. M., 2003, Silymarin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Letters*, 550, 89-93 p.
24. KEMERLİ, Ç., TASKIN, M. M., SÜTPIDELER, N., KAPLAN, N., ETHEMOĞLU, B., 2005, Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model. *Turkish Neurosurgery*, 13, 5, 109-115 p.
25. KREN, V., WALTEROVA, D., 2005, Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed Papers*, 149, 1, 29-41 p.
26. KVASNICKA, F., BIBA, B., SEVCIK, M., VOLDRICH, M., KRATKA, J., 2003, Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*, 990, 239-245 p.
27. LARBI, A., KEMPF, J., PAWELEC, G., 2007, Oxidative stress modulation and T cell activation. *Experimental Gerontology*, 42, 9, 852-858 p.
28. LOPEZ, M. V. N., CUADRADO, M. P. G. S., RUIZ-POVEDA, O. M. P., DEL FRESNO, A. M. V., ACCAME, M. E. C., 2007, Neuroprotective effect of individual ginsenosides on astrocytes primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1770, 9, 1308, 1316 p.
29. LUPER, S., 1998, A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. *Alternative Medicine Review*, 3, 6, 410-421 p.
30. MARAGAKIS, N. J., ROTHSTEIN, D., 2006, Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2, 10, 679-689 p.
31. MARKIEWICZ, I., LUKOMSKA, B., 2006, The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp*, 66, 343-358 p.
32. MATSUDA, T., FERRERI, K., TODOROV, I., KURODA, Y., SMITH, C. V., KANDEEL, F., MULLEN, Y., 2004, Silymarin protects pancreatic β -cells against cytokine mediated toxicity: Implication of c-Jun NH₂-Terminal Kinase and Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology*, 146, 1, 175-185 p.
33. MODRIANSKY, M., ULRICHOVA, J., BACHLEDA, P., ANZENBACHER, P., ANZENBACHEROVA, E., WALTEROVA, D., SIMANEK, V., 2000, Human hepatocyte – A model for toxicological studies, functional and biochemical characterization. *Gen Physiol Biophys*, 19, 223-235 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

34. MOSSMANN, T., 1983, Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immun Method*, 65, 55-63 p.
35. NENCINI, C., GIORGI, G., MICHELI, L., 2007, Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine*, 14, 129-135 p.
36. OLIVEIRA, C. P. M. S., LOPASSO, F. P., LAURINDO, F. R. M., LEITAO, R. M. C., LAUDANNA, A. A., 2001, Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil. *Transplantation Proceedings*, 33, 3010-3014 p.
37. OTT, M., GOGVADZE, V., ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B., 2007, Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12, 913-922 p.
38. RAMADAN, L. A., ROUSHDY, H. M., ABU SENNA, G. M., AMIN, N. E., EL-DESHW O. A., 2002, Radioprotective effect of silymarin against radiation induced hepatotoxicity. *Pharmacological Research*, 45, 6, 447-454 p.
39. ROJKIND, M., DOMINGUEZ-ROSALES, J.A., NIETO, N., GRENWEL, P., 2002, Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *CMLS*, 59, 1872-1891 p.
40. ROLO, A. P., OLIVEIRA, P. J., MORENO, A. J. M., PALMEIRA, C. M., 2003, Protection against post-ischemic mitochondrial injury in rat liver by silymarin or TUDC. *Hepatology Research*, 26, 217-224 p.
41. SANCHEZ-SAMPEDRO, M. A., FERNANDEZ-TARRAGO, J., CORCHETE, P., 2005, Enhanced silymarin accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1177-1182 p.
42. SANCHEZ-SAMPEDRO, M. A., FERNANDEZ-TARRAGO, J., CORCHETE, P., 2007, Silymarin synthesis and degradation by peroxidases of cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 5, 669-674 p.
43. SCHRADER, M., DARIUSH FAHIMI, H., 2004, Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol Rev*, 122, 383-393 p.
44. SINGH, R. P., TYAGI, A. K., ZHAO, J., AGARWAL, R., 2002, Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis*, 23, 3, 499-510 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

45. SOLIMAN, K. F., MAZZIO, E. A., 1998, In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *Proc Soc Exp Biol Med*, 218, 4, 390-397 p.
46. SON, S. M., 2007, Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77, 3, 65-70 p.
47. SOTO, C., RECOBA, R., BARRON, H., ALVAREZ, C., FAVARI, L., 2003, Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 205-212 p.
48. SRIVASTAVA, S., SRIVASTAVA, A. K., SRIVASTAVA, S., PATNAIK, G. K., DHAWAN, B. N., 1994, Effect of picroliv and silymarin on liver regeneration in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 26, 19-22 p.
49. SVOBODOVA, A., WALTEROVA, D., PSOTOVA, J., 2006, Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂- induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. *Burns*, 32, 973-979 p.
50. SVOBODOVA, A., ZDARILOVA, A., MALISKOVA, J., MIKULKOVA, H., WALTEROVA, D., VOSTALOVA, J., 2007, Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. *Journal of Dermatological Science*, 46, 1, 21-30 p.
51. TAGER, M., DIETZMANN, J., THIEL, U., NEUMANN, K. H., ANSORGE, S., 2000, Restoration of the cellular thiol status of peritoneal macrophages from CAPD patients by the flavonoids silibinin and silymarin. *Free Rad Res*, 34, 137-151 p.
52. TEMBURNI, M. K., JACOB, M. H., 2001, New functions for glia in the brain. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 7, 3631-3632 p.
53. YANG, S. H., LIN, J. K., CHEN, W. S., CHIU, J. H., 2003, Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *Journal of Surgical Research*, 113, 1, 133-138 p.

ÖZGEÇMİŞ

20.02.1981 yılında Manisa Akhisar'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Akhisar'da tamamladı. 2004 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Halen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimini sürdürmektedir.