

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FORMALDEHİT İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA
KARŞI SİLİMARİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ferhat TAVLI

**Danışman
Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN**

BIYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARS 2018

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FORMALDEHİT İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA
KARŞI SİLİMARİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Ferhat TAVLI

Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

2018 - KARS

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde Ferhat Tavlı'nın, Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Formaldehit ile Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Silimarinin Koruyucu Etkisi" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ileKabul..... edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 26/10/2018

Adı ve Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

Üye : Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ

Üye : Doç. Dr. Oğuz MERHAN

İmza

Mahmut Karapehlivan
Muhitdin Yılmaz
Oğuz Merhan

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../ gün ve/.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Duygu KAYA

Enstitü Müdür V.

ÖNSÖZ

Çevre kirliliği ve çevresel problemler genellikle doğaya salınan kimyasal maddelerden kaynaklanmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan zararlı maddeler doğal yollarla zaman içinde yiyecek ve içeceklerle karışarak canlıların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Doğaya zararlı olan bu kimyasal maddelerden biri olan formaldehit, biyolojik örneklerin saklanması ve tıbbi alanlarda ise dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Yine bu özelliklerine ek olarak reçine, tekstil, deri ürünleri, kâğıt ve ilaçların imalatı gibi birçok endüstriyel alanda ihtiyaç duyulan bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, yiyeceklerde (bazı yöresel peynirlerde), kozmetik sanayinde ve ev temizlik ürünlerinde koruyucu katkı maddesi olarakta kullanılmaktadır. Formaldehitin gündelik hayatta bedenli sıklıkla kullanılması bu kimyasalın zararlı etkilerine maruziyeti de beraberinde getirmektedir.

Canlılarda formaldehit ve diğer birçok kimyasal maddenin sebep olduğu toksisitenin azaltılmasına yardımcı olmak amacıyla bitkilerden elde edilen doğal ekstraktlardan yararlanılmaktadır. Deve dikenini ekstraktından elde edilen silimarin de geleneksel tedavi anlayışı içerisinde uzun yıllardır tıbbi alanda kullanılmakta olup yakın zamanda literatürde birçok çalışmada yer almaktadır.

Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi bir patolojik olay sonucunda oluşan serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Canlı organizma serbest radikallerin oluşumuna bağlı olarak şekillenen oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar vasıtasıyla korunmaya çalışmaktadır. Deve dikeninden elde edilen silimarinin güçlü bir antioksidan olarak ortamda oluşan serbest radikalleri süpürücü etkisi ile hücre membranının stabilizasyonunda etkin olabileceği literatürde belirtilmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda farelerde formaldehit ile oluşturulan testis hasarına karşı silimarinin koruyucu etkisini araştırılması amaçlanmıştır.

TEŐEKKÖRLER

Tez çalıŐmam boyunca bana her tűrlű desteęi saęlayan, çalıŐmamın her aŐamasında bilgisi ve deneyimi ile beni yűnlendiren danıŐman hocam Sayın Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN'a, ArŐ. Gűr. Abdulsamed KűKűRT, ArŐ. Gűr. Seda ÇELİK, Doç. Dr. İnan KAYA ile tezimin histopatolojik deęerlendirmelerinde katkıları bulunan Prof. Dr. Serpil DAę ile Dr. Őęr. Őyesi Yasemin ADALI'ya ve her zaman desteęini esirgemeyen eŐim ve ailemin tűm bireyelerine en içten dileklerle teŐekkűr ederim.



İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER	VI
ŞEKİL DİZİNİ.....	VII
RESİM DİZİNİ.....	VIII
GRAFİK DİZİNİ.....	IX
TABLO DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	XI
SUMMARY.....	XII
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Formaldehit.....	1
1.1.1. Formaldehitin Özellikleri.....	1
1.1.2. Formaldehitin Sistemler Üzerine Etkileri.....	2
1.2. Silimarin.....	4
1.2.1. Silimarinin Sistemler Üzerine Etkileri.....	5
1.2.2. Silimarinin Anti-kanserojen Etkisi.....	6
1.2.3. Silimarinin Antioksidan Etkisi.....	7
1.3. Paraoksonaz ve Arilesreraz.....	7
1.3.1. Paraoksonazın Yapısı.....	8
1.3.2. Paraoksonazın Katabolizması.....	10
1.3.3. Paraoksonazın Sentezi ve Salınımı.....	11
1.3.4. Paraoksonazın Oksidatif Stres Üzerine Etkisi.....	12

2.MATERYAL ve METOT.....	15
2.1. Materyal.....	15
2.1.1. Deneklerden Numune Alımı ve İşlenmesi.....	15
2.2. Metot.....	16
2.2.1. Biyokimyasal Analizler.....	16
2.2.1.1. Paraoksonaz Aktivitesinin Analizi.....	16
2.2.1.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler.....	16
2.2.1.3. Deneyin Yapılışı.....	16
2.2.1.4. Sonuçların Hesaplanması.....	17
2.2.1.5. Arilesteraz Aktivitesinin Analizi.....	17
2.2.1.6. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Analizi.....	17
2.2.2.1. Doku İnceleme Aşamaları.....	18
2.2.3. İstatistiksel Analizler.....	18
3. BULGULAR.....	19
3.1. Biyokimyasal Bulgular.....	19
3.2. Histopatolojik İncelemeler.....	21
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	24
5. KAYNAKLAR.....	29

KISALTMALAR ve SİMGELER

Å	: Ångström
ADP	: Adenozin difosfat
Apo	: Apolipoprotein
ARE	: Arilesteraz
°C	: Santigrat derece
Ca ⁺²	: Kalsiyum
Co+2	: Kobalt
Cu	: Bakır
CYP3A4	: Sitokrom P450 3A4
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Enzim komitesi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Fe	: Demir
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HE	: Hematoksileneozin
IARC	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktör reseptör tip I
İ.P.	: İnterperitoneal
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
M	: Molar
Mg+2	: Magnezyum
mM	: Milimolar
Mn+2	: Mangan
nm	: Nanometre
PEG	: Polietilenglikol
PON1	: Paraoksonaz
ppm	: Milyondabir
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör -alfa
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromolar

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Silimarinin bileşenlerinin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2: İnsan serum paroksonaz enziminin yapısı.....	9
Şekil 3. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısı.	10
Şekil 4. Paraoksonaz enziminin hücreden HDL'ye transferi.....	12



RESİM DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubunun morfolojik limitlerde testis dokusu.....22

Resim 2: Formaldehit grubunda tubulus seminiferus kontortus yapılarında bozulma ve küçülme, spermatogonyum ve sertoli hücrelerinde ve diğer germ hücrelerinde kayıplar vardır22

Resim 3: Silimarin grubu fare testis dokusunda normal morfolojik yapı23

Resim 4: Silimarin+formaldehit grubundan bir fare tubulus seminiferus kontortuslarında azalmış germ hücreleri.....23



GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Gruplara göre plazma PON1 aktivitesi 19

Grafik 2: Gruplara göre plazma ARE aktivitesi 20

Grafik 3: Gruplara göre plazma HDL konsantrasyonu..... 20



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Plazma PON1, ARE aktiviteleri ile HDL konsantrasyonları21



ÖZET

Çalışmada formaldehit ile oksidatif testis hasarı oluşturulan farelerde, silimarinin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla 28 adet Swiss Albino erkek fare kullanıldı. Her grupta bulunan hayvan sayısı eşit olacak şekilde kontrol (K), Formaldehit (F), Silimarin (S) ve Silimarin+Formaldehit (SF) olmak üzere hayvanlar dört gruba ayrıldı. Toplam 14 gün boyunca K grubuna intraperitoneal serum fizyolojik, F grubuna 10 mg/kg/gün formaldehit, S grubuna 100 mg/kg/gün silimarin ve S+F grubuna 10 mg/kg/gün formaldehit ve 100 mg/kg/gün silimarin uygulandı. Uygulamalar sonunda kan örneklerinden plazma elde edildi. Elde edilen plazmalar paraoksonaz (PON1), arilesteraz (ARE) enzim aktiviteleri ile yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ölçümüne kadar derin dondurucuda (-20°C) saklandı. Testis dokusundan alınan örnekler, % 10'luk formaldehit çözeltisi içerisinde histopatolojik incelemeler için patoloji laboratuvarına gönderildi. Çalışmamızda silimarin grubunda hem PON1 hem de ARE aktivitesinde önemli düzeyde ($P<0.05$) artış tespit edilirken, formaldehit uygulanan grupta ise PON1 ve ARE aktivitesinde önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Silimarin+Formaldehit verilen grupta ise histopatolojik parametrelerin kontrol ve silimarin grubuna yakın olduğu tespit edildi. Silimarinin testiküler hücreler üzerine olan bu olumlu etkilerinin PON1 ve ARE aktivitelerinde görülen değişikliklere paralel olarak antioksidan savunma sistemini güçlendirmesiyle ilişkili olabileceği kanısını taşımaktayız. Sonuç olarak, farelerde formaldehit uygulamasının hücre hasarı ve oksidatif strese neden olabileceği, buna karşılık antioksidan olarak silimarinin testiküler hücre hasarının azaltılması ve oksidatif stresin önlenmesinde koruyucu etkilere sebep olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Silimarin, Testis hasarı, Paraoksonaz, Arilesteraz, Oksidatif stres

SUMMARY

In the study, 28 Swiss Albino male mice were used to investigate the protective effect of silymarin against formaldehyde-induced oxidative testicular damage in mice. The animals were divided into four groups, control (C), formaldehyde (F), silymarin (S) and silymarin+formaldehyde (SF), with equal numbers of animals in each group. In group C; intraperitoneal serum, in group F; 10 mg/kg/day formaldehyde, in group S; 100 mg/kg/day silymarin and in group SF; 4 mg/kg formaldehyde and 100 mg/kg/day silymarin was given for 14 days. Plasma was separated from the blood samples obtained at the end of the applications. The samples were stored at -20 °C in freezing until paraoxonase (PON1) and arylesterase (ARE) enzyme activities and HDL (high-density lipoprotein) concentration were measured. Testicular tissue samples were sent to the pathology laboratory for histopathological examinations in 10% formaldehyde solution. In our study, a significant increase in both PON1 and ARE activity ($P < 0.05$) was observed in the group given silymarin. This increase may be due to the fact that silymarin may be associated with increased antioxidant activity by synergistic action with PON1 and ARE enzymes. Similarly, in the formaldehyde treated group, a significant decrease ($P < 0.05$) in the activity of PON1 and ARE could be suggested to be related to the oxidative stress that may be caused by formaldehyde. In the group silymarin+formaldehyde, histopathological parameters were close to the control and silymarin group. We believe that these positive effects of silymarin on testicular cells may be related to the strengthening of the antioxidant defense system in parallel with the changes in PON1 and ARE activities. As a result, it has been observed that intraperitoneal formaldehyde administration in mice may cause cell damage and oxidative stress, whereas antioxidant silymarin causes protective effects in reducing testicular cell damage and preventing oxidative stress.

Keywords: Silymarin, Testicular damage, Paraoxonase, Arylesterase, Oksidatif stres

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Formaldehit

Formaldehit, Alman kimyager August Wilhem von Hofman tarafından 1867 yılında bulunmuştur (Sorg ve ark. 1996). Günümüzde formaldehit, dokuların dağılmasını ve bozulmasını engellediği için biyolojik örneklerin saklanması, kadavra ve organların tespiti ile patoloji ve histoloji laboratuvarlarında dokuların fiksasyon işleminde, dış kaplamalarının yapımında, böcek ve mikroorganizmaları öldürdüğü için dezenfektan olarak ve birçok malzemenin sterilizasyonu ile hemodiyaliz solüsyonlarında kullanıldığı gibi endüstrinin değişik birçok iş kolunda da (reçine, tekstil, deri ürünleri ile ilaç imalatı ve ilaçlarda koruyucu madde olarak) kullanılmaktadır (Sherwani ve ark. 2002).

1.1.1. Formaldehitin Özellikleri

Formaldehit, düşük molekül ağırlıklı, renksiz, suda çözünebilen, keskin kokulu, erime noktası $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$, kaynama noktası ise $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ olan yanıcı, oda sıcaklığında gaz haline dönüşebilen ve de çabuk buharlaşması nedeniyle solunum yollarını tahriş edici bir kimyasal maddedir. Katı haline para formaldehit, % 37'lik sıvı çözeltisine ise formalin adı verilmektedir. Yine sıvı formu mililitre (ml), gaz hali ise part per milyon (ppm) olarak ifade edilmektedir (Smith 1992).

Formaldehit, genellikle organizmaya oral yolla, gıda sterilizasyonu ve gıda ambalajlarının bileşiminden geçerek gastrointestinal irritasyona sebep olarak gastrit oluşturmaktadır. Formaldehitin, oral etkisinin subakut dönemde 4 haftada, kronik dönemde ise iki yılda gastrik mukoza hasarına neden olduğu kaydedilmektedir (Canbilen ve ark. 1999). İki yıl boyunca içme suyuna formaldehit eklenerek beslenen sıçanlarda, atrofik gastrit, mide mukozasında kalınlaşma, fokal hiperkeratoz ve ülserasyon görülme sıklığında artış olduğu bildirilmektedir (Til ve ark. 1989). Yine dışarıdan maruz kalınan formaldehit, müköz membranlar için irritan olmakta ve proteinler, nükleik asitler, doymamış yağ asitleri ile birleşme eğilimi göstermektedir. Formaldehit irritasyonuna bağlı olarak karın ağrısı, kramplar, kusma, ishal gibi

semptomlar (Burkhart ve ark. 1990) görülmekle ile birlikte immun duyarlılık, mutajenite ve kanserojeniteye bağlı toksik etkiler de görülmektedir. Yapılan deneysel araştırmalarda formaldehit'in; solunum, sindirim ve sinir sistemi gibi birçok sistem üzerinde zararlı etkiler gösterdiği, deri iltihabı, göz yangısı, astım, rinit, farenjit ve akciğer ödemi gibi klinik tablolara neden olduğu kaydedilmektedir. Organizmaya dışarıdan alınan formaldehit, vücut içerisinde depo edilmeyip formaldehit dehidrogenaz enzimi aracılığıyla, karaciğer ve eritrositlerde formik asite dönüşerek, idrar ve dışkı yoluyla ya da karbondioksite okside olarak solunum yoluyla dışarı atılmaktadır (Green ve ark. 1987).

1.1.2. Formaldehitin Sistemler Üzerine Etkileri

Formaldehit hemen her ortamda gaz haline dönüşebilmektedir. Çok düşük konsantrasyonlarda formaldehite maruz kalınması durumunda bile müköz membranlar üzerinde şiddetli irrite edici etkiler yaratması nedeniyle alt-üst solunum yollarına zarar verebilmektedir (Heck ve ark. 1990). Formaldehitin solunum fonksiyonlarını olumsuz etkilediği, neoplastik olmayan lezyonları tetiklediği, solunum sisteminde duyuşal irritasyon ve solunum yollarında kanser oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir (ATSDR. Agency for Toxic. 1999).

Akut formaldehit maruziyeti sonucu, boğaz ağrısı, göz ve burun hassasiyetinin meydana gelmesi, formaldehitin kokusunun keskin ve rahatsız edici olmasından kaynaklanmaktadır (Witek ve ark. 1987). Duyusal irritasyonun başladığı, kişilerin formaldehit dumanını hissedebilecekleri sınır, 1 ppm formaldehit dumanı olarak belirtilmektedir (Heck ve ark. 1990). Nazal epitellerde silia kaybı ile birlikte epitelyum hasarına, metaplaziye ve goblet hücre hiperplazisine neden olduğu kaydedilmektedir (Vural 1993).

Deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada, düşük dozlarda verilen formaldehit maruziyeti sonucu üst solunum yollarında inflamatuvar hücre değişikliklerinin meydana geldiği ve 10-20 ppm doz aralığında formaldehite maruz kalan kişilerde, nefes darlığı, öksürük, pulmoner semptomlar görüldüğü kaydedilmektedir. Yine formaldehite yüksek dozlarda maruz kalanlarda larinks ödeminin şekillendiği, 50-100 ppm doz aralığında formaldehite maruz kalanlarda ise

pnömoni, pulmoner inflamasyon ve ödemin gözlemlendiği belirtilmektedir (Heck 1999).

Formaldehitin üreme hücrelerine zarar verdiği, dişi ve erkek üreme hücrelerinde primer ve sekonder infertiliteye neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca menstrüel fonksiyonlarda bozukluklara neden olduğu ve gebelikte embriyonel oluşum üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Halperin ve ark. 1983).

Yapılan çalışmalarda, formaldehite maruz kalan hamile laboratuvar çalışanlarında spontan abortlar ile düşük doğum ağırlıklı-anemik bebeklerin doğduğu gösterilmektedir. Erkeklerde ise sperm sayısı, ejakulat miktarı, testis ağırlıklarında ve seminifer tübül çaplarında azalmaların olduğu; leydig hücrelerinde de histopatolojik değişikliklerin oluştuğu ve serum testosteron, çinko, bakır, demir değerlerinde düşümlere sebep olduğu belirtilmektedir (Özen ve ark. 2005).

Formaldehit ciltte kaşıntı, yanma ve kızarıklık meydana getirmekte ve dermatitlere neden olabilmektedir. Kobaylara topikal uygulanan formaldehit sonrasında kobayların derilerinde ödem, eritem, çatlama, pullanma ve cilt kalınlığında artma görüldüğü bildirilmektedir (Wahlberg 1993).

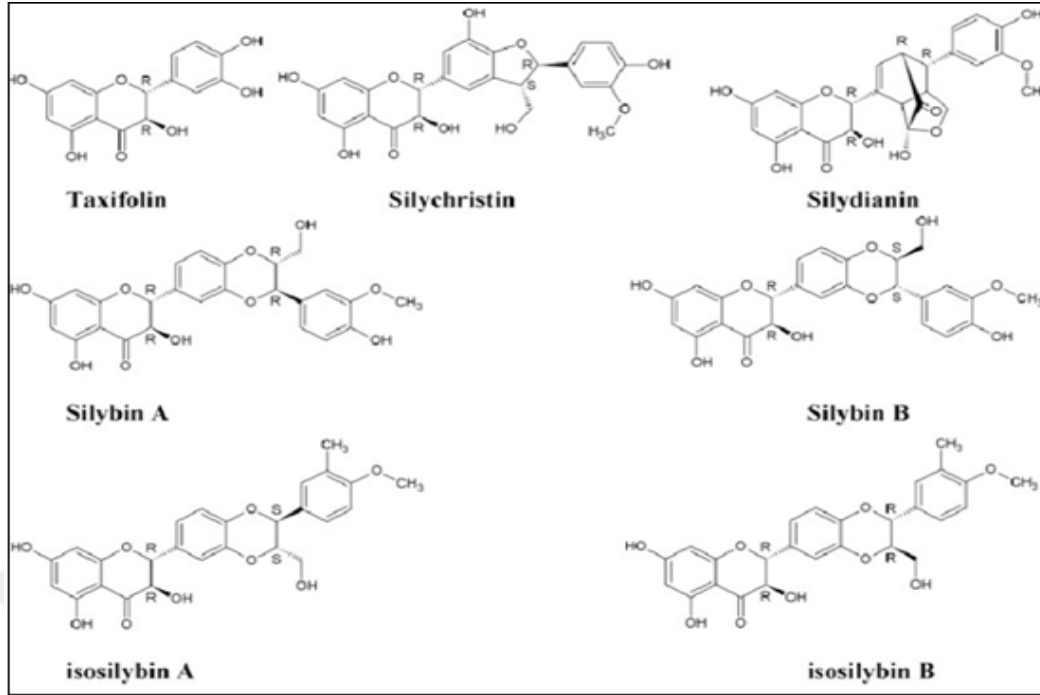
Formaldehitten en çok etkilenen organlardan biri de göz'dür. Mesleki Güvenlik ve Sağlık İdaresi'nin bildirdiği rapora göre, 0.05-25 ppm aralığında formaldehit solunması sonucu % 88 oranında göz sağlığının olumsuz etkilendiği; gözde ağrı, kızarıklık, sulanma ve bulanık görmenin şekillendiği bildirilmektedir (Occupational Safety and Health Administration – OSHA 1994).

Nükleik asit ve proteinlerle tepkimeye giren formaldehit, DNA ve RNA'ya geri dönüşümsüz olarak bağlanmaktadır (Heck 1999). İn vitro çalışmalarda formaldehitin bakteriler ve lenfoid hücreler üzerinde mutajenik etkiler gösterdiği söylenmektedir (Smith 1992). Formaldehitin insanlarda lenfoblast mutasyonlarına, drosofilalarda ise DNA kopmalarına sebep olduğu ve de inkübe edilen memeli hücrelerinde DNA çapraz bağlantılarında ve DNA ipliklerinde kırılmalara neden olduğu rapor edilmektedir (Canbilen ve ark. 1999).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu tarafından formaldehit, kanserojenik özelliği nedeniyle, Grup 2A olarak sınıflandırılmıştır (IARC: International Agency For Research On Cancer, 2012). Formaldehite maruz kalan sanayi işçilerinde kanser görölme olasılığının arttığı, özellikle nazofarinks kanserinin sık görüldüğü, akciğer kanserine yakalanma riskinin arttığı gözlenmektedir (Arts ve ark. 2006). Amerikalı Anatomistler Birliği'ne üye 2239 erkek anatomistin ölüm sebepleri arasında en sık beyin kanserleri ile lösemilerin görölmesinin formaldehite maruz kalmalarından olabileceği kaydedilmektedir (Blair ve ark. 1990)

1.2. Silimarin

Silybum marianum, ölkemizde deve dikenini, Meryem ana dikenini, Avrupa'da milk thistle olarak bilinen ve yaklaşık 2000 yıldır karaciğer ve safra rahatsızlıklarında kullanılan Asteraceae familyasından bir bitkidir (şentürk ve ark. 2010). Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde yaygın olarak yetişen, yüksekliği 30-100 cm olabilen, yaprakları açık yeşil renkli, meyvesi mor ve nadiren beyaz renkli olan bu bitkinin ekstraktı, polimerik ve oksitlenmiş polifenolik bileşikleri içeren yaklaşık %70-80'i silimarin ve geriye kalan %20-30 oranında kimyasal yapısı tam tanımlanmamış fraksiyonları içeren silimarindir. *Silybum marianum* (Meryem ana dikenini)'un tohumlarından elde edilen kompleks bir bileşik olan silimarinin esas içeriğini silybin oluştırmakta ve yapısında diğer flavoligananlardan isosilybin, silychristin, silydianin ile bir flavonid olan taxifolin bulundurmaktadır (Ramasamy ve ark. 2008).



Şekil 1. Silimaritin bileşenlerinin kimyasal yapısı (Kevin ve ark. 2013).

1.2.1. Silimaritin Sistemler Üzerine Etkisi

Slybum marianum bitkisinin ekstraktı yüzlerce yıldır başta karaciğer olmak üzere gastrointestinal hastalıkları önlemek için kullanılmıştır. Son yıllarda siroz, kronik hepatit, alkole bağlı karaciğer hastalıkları, sarılık, safra kesesi bozuklukları ile çevresel toksik maddelerin zararlı etkilerinin önlenmesinde son derece yararlı olduğu kaydedilmektedir (Kren ve ark. 2005, Tyler 1993).

Silimaritin karaciğer koruyucu etkisinin, içeriğindeki silikristin ve silidianin'den geldiği kaydedilmektedir. Bu bileşikler karaciğer hücresinin dış membranına toksin girişini ve bağlanmasını engellemektedir (Kocaman ve Dabak 2015). Silibinin, süperoksit anyon radikalleri ve nitrik oksit üretimini azaltarak, Kupffer hücrelerinin lökotrien formasyonunu inhibe ederek etki gösterdiği bilinmektedir Silimaritin karaciğer, barsak ve mide tarafından salgılanan glutatyon sentezini artırarak, karaciğerdeki detoksifikasyon hücrelerince hormon, kimyasal madde ve ilaçların metabolizmasında kullanılır. Silibininde fazla miktarda alınan demire bağlı oluşan hepatit ve mitokondrial glutatyonun oksidasyonunu azalttığı kaydedilmektedir. Fosfotidilkolin sentezini stimüle ederek kolinosfotidiltransferaz

aktivitesini arttırdığı belidirilmektedir. (Gunaratne ve Zhang, 2003; Dehmlow ve ark., 1996).

Deve dikeninin bileşiminde bulunan silimarin ve silibin bileşikleri antioksidan olarak görev yapmakta ve aynı zamanda karaciğer rejenerasyonunu uyarmaktadır. Deve dikeninin insan karaciğer hücreleri üzerine etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, araştırmacılar, nispeten düşük konsantrasyonlardaki silimarinin karaciğer CYP3A4 enzim aktivitesinin % 100'den % 50'ye kadar düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Venkataramanan ve ark. 2000).

1.2.2. Silimarinin Anti-kanserojen Etkisi

Oksidatif stres, deri kanseri oluşumunu etkileyen önemli bir etkidir. Bu nedenle deri kanseri profilaksisinde ve tedavisinde güçlü antioksidan maddelerin kullanılması birçok araştırmaya konu olmaktadır. Hem hayvan hem de hücre kültürü çalışmalarında, bir polifenolik flavonoid antioksidan olan silimarin, deri kanserine karşı önleyici ve antikanserojenik etki göstermektedir. Örneğin; silimarin serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini süpürerek antioksidan sistemi güçlendirmek suretiyle farelerde deri tümörü oluşumunu engellediği kaydedilmektedir. Silimarinin antikanserojenik bu etkisini TNF- α 'yı engelleyerek yaptığı bildirilmektedir (Singh and Agarwal, 2002). Diğer bir çalışmada, silimarinin mitoz bölünmeyi ve hücrelerin hayatta kalma yeteneğini engellediği ve de apoptozisi uyardığı belirtilmiştir (Singh ve Agarwal, 2002). Buna ek olarak, silimarin hücre döngüsü düzenleyicilerini ve kontrol noktalarını, bölünmenin engellenmesi yönünde değiştirmekte ve hücre döngüsünün G0-G1 ve G2-M safhalarında büyümeyi durdurduğu ifade edilmektedir. Deney modellerinde gözlenen silimarinin antikanserojenik etkisinden dolayı, insanlarda deri kanseri ve epitel orjinli diğer kanserlerin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (Singh ve Agarwal, 2002).

Hücrede, hücre bölünmesinin kontrol noktalarının sistemli bir şekilde geçilmesi özelleşmiş proteinler olan siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve onların inhibitörleri tarafından denetlenmektedir. Deve dikeninin silibini, bu proteinlerin etkilerini değiştirmekte ve hücre büyüme engelleyicisi olan kaspaz 3'ü aktive etmekte ve kanser hücrelerine dönüşen insan mesane hücrelerinin apoptotik ölümüne

neden olmaktadır (Tyagi 2004). Bir başka çalışmada, deve dikenini silibininin insan papilloma hücrelerine dönüşen mesane hücrelerinin büyümesinin engellenmesi sonucunda hayatta kalma sürelerini azalttığı ve kaspaz-poli ADP riboz polimeraz (PARP)'ları süpürdüğü belirtilmektedir (Tyagi 2003).

Deve dikenini ekstraktının insan prostat kanserinde antikanserojenik olduğu kaydedilmektedir. Epidermal büyüme faktör reseptörü, insülin benzeri büyüme faktör reseptör tip I (IGF-I) ve nükleer faktör Kappa B sinyalleşmesi aracılığıyla silibininin antikanserojenik olabileceği ifade edilmektedir (Singh 2004). Başka bir çalışmada ise; deve dikenini silibininin 5 alfa-dihydrotestosteronu down regüle edebildiği ve böylece deve dikeninin prostat için faydalı olabileceği düşünülmektedir (Davis ve Searles 2005).

1.2.3. Silimarinin Antioksidan Etkisi

Silimarinin serbest radikallere direkt etki etmek suretiyle Fe ve Cu gibi metalleri bağlayarak metal iyonlarının oluşturduğu oksidatif stres hasarını önleyerek antioksidan etki gösterdiği kaydedilmektedir (Di Meo ve ark. 2013). Silimarinin antioksidan aktivitesinin E vitamininden en az 10 kat daha fazla olduğu rapor edilmektedir (Adzet 1986).

Yapılan bir çalışmada silimarinin antioksidan etkilerinin, antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu ve SOD, GSH-Px, katalaz gibi serbest radikal hasarlarına karşı koruma mekanizmalarının çoğunu arttırarak gerçekleştirdiği rapor edilmektedir (Karimi ve ark. 2011).

Silimarinin birçok deneysel hayvan modelinde lipit peroksidasyonuna karşı hücreyi koruduğu, lipooksijenaz yolağında lökotrien sentezini önleyerek enzim peroksidasyonunu engellediği bildirilmektedir (Sotoa ve ark. 2003).

1.3. Paraoksonaz ve Arilesteraz

Hayvansal dokularda organofosfatları hidrolize eden bir enzimin varlığının tespit edilmesinin ardından insan serumu PON1 enzimi 1950'lerin başında tanımlanmıştır (Aldridge 1953, Manzur 1946). Kanın elektroforezi sonrasında,

paraoksonaz enzimi 1961 yılında HDL immuno presipitatında bulunmuştur (Uriel 1961). Mackness ve ark (1996), koyun paraoksonaz aktivitesinin ağırlıklı Apo AI içerikli partiküllerin yapısında HDL ile birlikte bulunduğunu yine insanlardan elde edilen serumun ultrasantrifüjasyonu ile enzimin kanda HDL ile taşındığını bulmuşlardır. Son yıllarda PON1'in LDL lipoperoksitlerinin oluşumunu önlediği ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğunun anlaşılması sonucu PON1 enzimine ilginin son derece arttığı kaydedilmektedir (Mackness ve ark. 1996).

Paraoksonaz enzimi ilk olarak, aromatik esterleri (p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat) hidrolize etme yeteneğinde olduğundan "A-esteraz" (arilesteraz aktivitesi, EC 3.1.1.2) sınıfında yer almıştır. Paraoksonaz enzimi, Parationun toksik metaboliti olan paraoksonazı hidrolize etme yeteneğinde olduğundan dolayı paraoksonaz (EC 3.1.8.1) olarak adlandırılmıştır (Draganov ve La Du 2004).

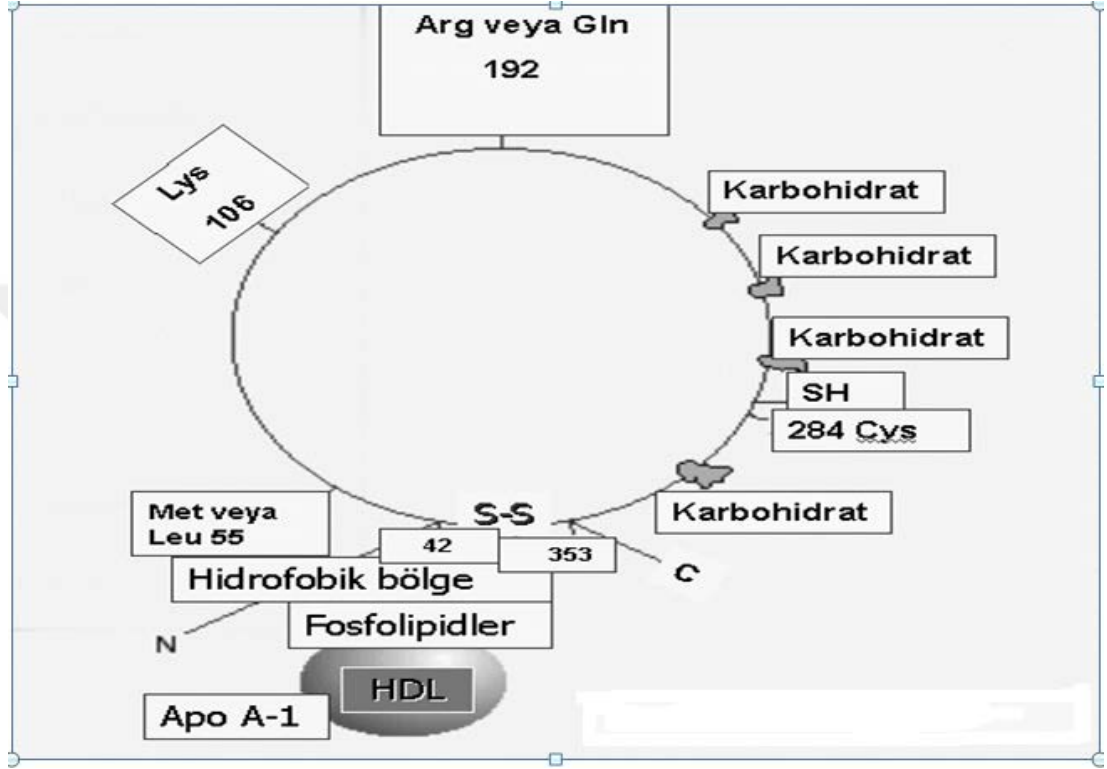
İnsan ARE'ı ile PON1 enzimi, bir takım aromatik asitlerin esterlerini ve organofosfatların çoğunluğunu hidrolize etme kabilyetine sahip, bir enzim tarafından katalizlenmektedir (Hong-Liang ve ark. 2003). Bu enzimler farklı substratlara sahip olmasına rağmen, PON1 enzimi sadece fenil asetatı hidroliz etmektedir. ARE ve PON1 enzimlerinin ortak özelliği; organofosfatları, aril ve alkil halojenürleri hidrolize etmesidir (Fuhrman ve ark. 2008).

Paraoksonaz enziminin antioksidan özelliği; hidrojen peroksit ile diğer oksijen radikallerini nötralize etme kapasitesi ve LDL oksidasyonunu koruyucu özelliğidir. fenilasetatı substrat olarak kullanan PON1'in, arilesteraz aktivitesi söz konusudur. PON1'in fenilasetatı hidroliz etme aktivitesi ölçülerek arilesteraz aktivitesi tespit edilmektedir. Arilesteraz aktivitesinin tayininde, Fenil asetat sıklıkla kullanılmaktadır (Fuhrman ve ark. 2008).

1.3.1. Paraoksonazın Yapısı

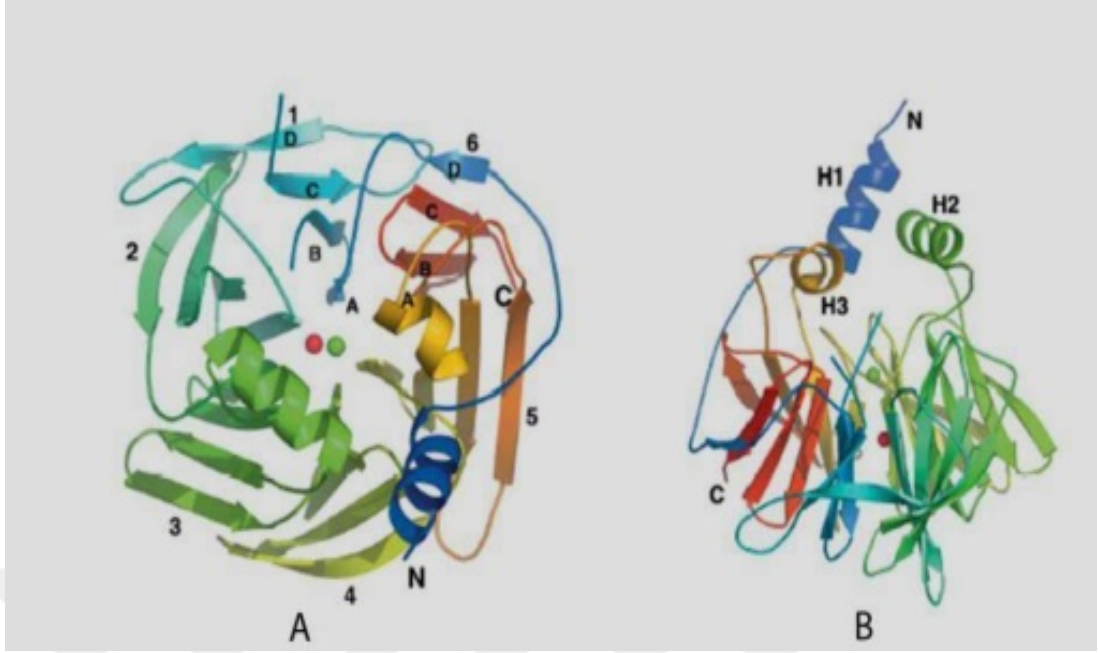
İnsan PON1 enzimi, 354 aminoasit ve yaklaşık 40 kilo dalton ağırlığında bir glikoproteindir. Bunu % 15,8'i proteine 4 farklı şekilde bağlanmış karbonhidrat üniteleri oluşturmakta ve izo elektrik noktası ise 5,1'dir (Şekil 3) (La Du ve ark.

1999). Yapısında yer alan 3 sistein aminoasitinden 284. sırada bulunan aminoasit, serbest haldeyken, 42. ve 353. sırasında ki sistein kalıntıları tek disülfit bağı ile bağlıdır (Mackness ve ark. 1996, Harel ve ark. 2004) (Şekil 4).



Şekil 2: İnsan paraoksonaz'ın yapısı (Harel ve ark 2004)

Karaciğerde sentezlenip dolaşıma katılan PON1'in HDL'nin yapısında bulunduğu bildirilmektedir (Mackness ve ark. 1996). PON1'in, HDL'ye (hidrofobik N-terminal bölgesiyle) kolayca bağlanabilme özelliğinde olduğu kaydedilmektedir (Deakin ve James 2004). PON1'i bağlayan HDL, protein yapıları olan Apo A1 ve Apo J'yi içerdiğinden, Apo A1 ve Apo J'nin bağlanmada etkili olabileceği kaydedilmektedir (Deakin ve James 2004).



Şekil 3. Paraoksonaz'ın tersier yapısı. [(A) β-kırmalı ve (B) H1, H2, H3'le işaretli hidrofobik bölgelerin β-kırmalı tabakalaradaki gösterimi] (Harel ve ark. 2004).

Üç boyutlu yapısının gösterildiği şekil 4'te beta-kırmalın ortasında 7,4 Å aralıklarla iki adet Ca^{+2} iyonu yer almaktadır. Ca^{+2} iyonlarından biri yapısal özellikte olup, uzaklaştırılması halinde geriye dönüşümsüz bir denatürasyonun şekillendiği bildirilmektedir. Diğer Ca^{+2} iyonunun ise katalitik aktividen sorumlu olduğu kaydedilmektedir. Katalitik aktiviteden sorumlu olan Ca^{+2} iyonu 2,1-2,5 Å aralığında Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Gl'tenu 53 oluşan 5 tane aminoasit, fosfat'ın oksijeni ve bir su molekülü ile etkileşim halindedir (Khaschsorur ve ark 2000).

1.3.2. Paraoksonazın Katabolizması

Paraoksonaz'ın, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat, fosfotriesteraz aktivitesi içinse paraokson substratları kullanılmaktadır. Her iki substratın uygun pH aralıkları tespit edilmiş ve yapılarında yer alan yan zincirin reaksiyonlarda direkt katalitik etkiye sahip olmadığı kaydedilmektedir (Bastos ve ark. 1998).

PON1'in, arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi için Ca^{+2} iyonu gerekli olup, bu özelliği ile Co^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları kullanan diğer esterazlardan farklılık

göstermektedir. PON1'in hidrolitik aktivitesi (organofosfat substratlarına karşı) 2 mol Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç gösterirken, lipid peroksidasyonunu engellemede ise sadece 1 mol Ca^{+2} iyonunun gerekli olduğu ifade edilmektedir (Khaschror ve ark. 2000).

PON1'in katabolizmasında, Ca^{+2} iyonlarının iki önemli görev üstlendiği kaydedilmektedir;

1. Direkt olarak reaksiyona katılmak suretiyle enzimin aktif bölgesinin uygun konformasyonunun sürekliliğini sağlamak,

2. Dietilfosfatın, reaksiyon sonucu ortamdan daha kolay uzaklaştırılmasını sağlamaktır.

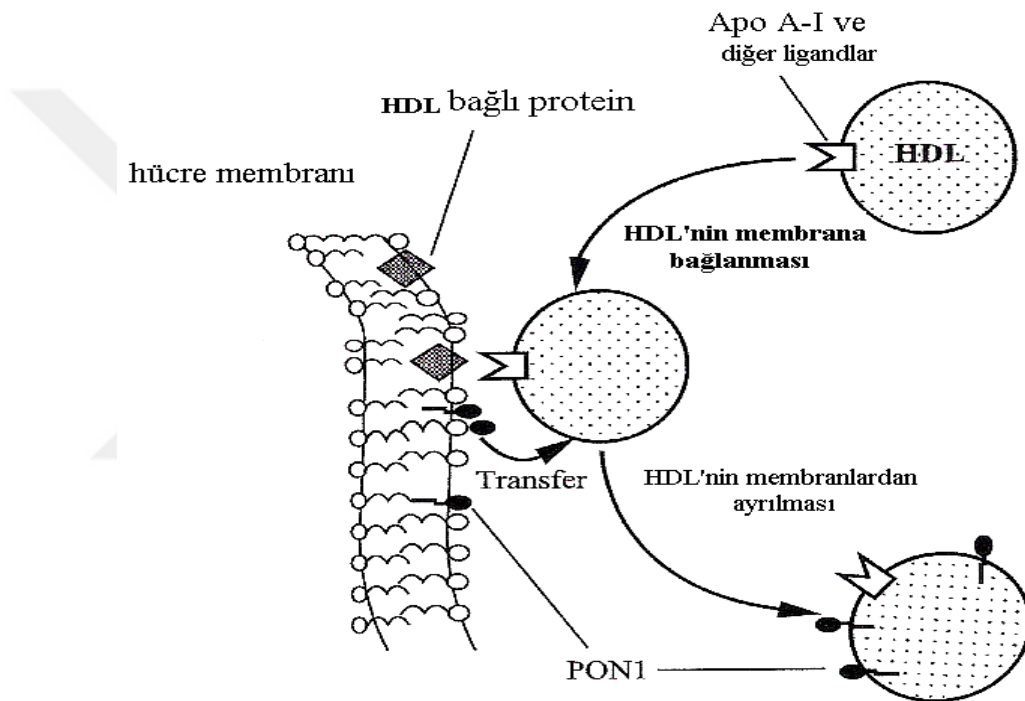
Ca^{+2} iyonları paraoksonaz'ın aktivitesi ve stabilitesi için gereklidir. Bu sebeple paraoksonaz ve arilesterazın enzim aktivitesinin tayininde EDTA'lı tüplerden elde edilen plazma kullanılmaktadır (Reddy ve ark. 2001).

PON1'in yapısında bulunan 354 aminoasit içinde, enzimin substratını tanıyarak bağlaması için gerekli üç sistein kalıntısı bulunmaktadır. Bu üç sistein kalıntısından 284. pozisyondaki sistein serbest iken (Cys 42-352) diğerleri arasında tek disülfid bağı mevcuttur. Esteraz enziminin aktif bölgesinin anahtar bileşeni sistein amino asitleridir. Sülfidril bileşikler ile enzim inhibe olmakta ve sistein amino asitleri ile inhibisyonun geri dönüşümü sağlanmaktadır. Buradan enzimin serbest tiyol grupları ile antioksidan kapasitesi arasında bir orantının olduğunu bildirilmektedir (Jaouad ve ark. 2006). PON1 insektisit ve sinir gazı yapımında kullanılan organofosfatlı bileşiklerin hidrolizini katalizlemekte olup ksenobiyotik metabolizması ve toksikolojik araştırmalar için büyük öneme sahip bir enzim olduğu kaydedilmektedir (Aldridge 1953).

1.3.3. Paraoksonazın Sentez ve Salınımı

PON1 öncelikle karaciğerde sentezlenip, karaciğer, böbrek, beyin, ince bağırsak ve akciğer dokularının endotelial tabakasından immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmektedir (Draganov ve ark. 2000). Paraoksonaz'ın sentezinin

dengeğinde hepatositlerdeki kolesterol önem arz etmektedir. Karaciğerde sentezlenen Paraoksonaz'ın serum HDL'sine yada karaciğer mikrozoamlarına bağlanabilmesi için enzimin N-terminal hidrofobik bölgeye sahip olması gerekmektedir (Harel ve ark. 2004). Bu hidrofobik bölge enzimin bağlanmasında ayırt edici olduğu kadar salgılanmada da önemlidir. Karaciğerde sentezlenen paraoksonaz önce mikrozoamlara sonra hücrenin dış yüzeyine bağlanmaktadır. Hücre zarının dış yüzeyinden salınarak HDL'ye bağlanmasında fosfolipit kompleksinin önemli olduğu bildirilmektedir (Kuo ve La Du 1998).



Şekil 4. Paraoksonaz'ın hücreden HDL'ye nakli (Deakin ve James 2004).

Karaciğerdeki sentez yerinden dolaşıma geçen PON1'in, salınımını etkileyen tüm faktörler serum konsantrasyonunuda etkilemektedir (Deakin ve James 2004). Deakin ve ark.'ları (2002) fosfolipid misellerinin ve HDL'nin PON1'in salınımını arttırdığını buna karşın LDL ve lipitsiz apoAI'nin etkisiz kaldığını bildirmişlerdir (Deakin ve ark. 2002). 1.3.4. PON1 Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

PON1'in organofosfat türevi sinir gazlarını ve insektisitleri hidrolize etmek süretiyle zararsız hale getirdiği kaydedilmektedir. Enzimin bu etkisi sadece kan ve

doku düzeylerinden kaynaklanmayıp, bu etkiden enzimin izo-enzimleride sorumlu tutulmaktadır (Watson ve ark. 1995).

Canlılarda metabolizmanın normal seyri esnasında üretilen oksijen içerikli moleküller reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılmaktadır. Aşırı ROT üretimi sonucu oluşabilecek hasarları (oksidatif stres) ortadan kaldırmak için vücudun antioksidan savunma sistemi bunları detoksifiye edebilmektedir (Altındağ ve ark. 2007). Oksidatif stresin, makrofajlar, lipoproteinler ile arteriyal hücrelerin lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu kaydedilmektedir. PON1'in lipoproteinleri ve arteriyel hücreleri, spesifik okside kolesterol esterleri ve fosfolipidler gibi lipid peroksidlerinin hidrolizi ile oksidasyona karşı koruduğu belirtilmektedir (Mackness ve ark. 1996). Oksidatif stres durumunda lipoproteinler ile birlikte membran lipidlerinde lipid peroksidasyonuna uğramaktadır (Chait ve ark. 2005). Okside olmuş makrofajlar normal LDL'yi okside LDL'ye dönüştürme kabiliyetine sahip yapılarıdır (Aviram ve ark. 1998). PON'in, LDL ve HDL'yi oksidasyondan korumak süretiyle antioksidatif etki gösterdiği kaydedilmektedir (Deakin ve ark. 2002).

Karaciğerde sentezlenip kana verilen paraoksonaz, HDL'ye bağlanarak, HDL'nin periferik hücrelerden, kolesterolün karaciğere taşınmasını sağlamaktadır HDL'nin yapısında fosfolipit, kolesterol, kolesterol esterleri, apolipoprotein A1 bulunmaktadır (Deakin ve ark 2002). Hidrofobik N terminal uç ile sonlanan paraoksonazın potansiyel membrana bağlanma yüzeyini oluşturan, H2 ve H1 hidrofobik heliksler triptofan ve tirozin yan zincirleri ile HDL ara yüzeyine girebilmekte ve HDL'nin oksidasyonu sonucu paraoksonaz aktivitesinde azalmaya neden olabilmektedir (Précourt ve ark 2011).

Son yıllarda aterosklerozisin oluşumunun önlenmesi ve birçok ilacın metabolize edilmesinde paraoksonaz enziminin önemli olduğu bildirilmektedir (Draganov ve La Du 2004, Mackness ve ark. 1996).

Paraoksonaz'ın aterosklerozis'e karşı koruyucu etkisini LDL ve HDL'nin oksidasyonunu engellemek süretiyle yada oluşan lipid peroksidlerini metabolize ederek göstermektedir (Deakin ve ark. 2002). Paraoksonaz antioksidan bir enzim gibi davranarak diyabet, alzheimer, parkinson, sepsis ve kardiyovasküler hastalıklara

karşı koruyucu etki göstermektedir (Draganov ve La Du 2004). Bu bağlamda çalışmamızda farelerde deneysel formaldehit ile oluşturulan testis hasarında silimarinin plazma paraoksonaz, arilesteraz ve HDL düzeylerine karşı koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜHADEK) Başkanlığının verdiği (KAÜ-HADYEK/2016-056 kodlu) izninden sonra yapılmıştır. Çalışma materyalini ad libitum olarak beslenen 37,225 ±4,110 g ağırlığında, 2-3 aylık toplam 28 adet Swiss Albino erkek fare oluşturdu. Denekler uygulamadan önce 10 gün süreyle adaptasyona tabi tutuldu. Günlük dozlar saat 09:00-10:00 arasında uygulandı. Uygulama boyunca deneklerin genel durumları gözlemlenerek kayıtları tutuldu. Denekler; Kontrol (K), Formaldehit (F), Silimarin (S) ve Silimarin+Formaldehit (S+F) olmak üzere 4 eşit gruba (n=7) ayrılarak, 14 gün boyunca uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

Kontrol Grubu (K) : Çalışma süresince kontrol grubuna intraperitoneal (İ.P) serum fizyolojik uygulandı.

Formaldehit Grubu (F) : 10 mg/kg/gün formaldehit 14 gün süre ile gün aşırı İ.P olarak uygulandı.

Silimarin Grubu (S) : 100 mg/kg/gün 14 gün süre ile gün aşırı İ.P olarak uygulandı.

Formaldehit+ Silimarin Grubu (F+S) : 10 mg/kg/gün formaldehit + 100 mg/kg/gün silimarin 14 gün süre ile gün aşırı İ.P olarak uygulandı.

2.1.1. Deneklerden Numune Alınımı ve İşlenmesi

Uygulama süresi sonunda (15.gün) farelerden intrakardial yöntem ile antikoagülanlı tüplere kan örnekleri alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile farelere ötenazi yapıldı. Kan örnekleri, 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. Paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktiviteleri ile HDL konsantrasyonu ölçümüne kadar plazmalar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Testis doku örnekleri ise % 10'luk formaldehit çözeltisi içerisine alınarak, histopatolojik incelemeler için patoloji laboratuvarına gönderildi.

2.2. Metot

2.2.1. Biyokimyasal Analizler

2.2.1.1. Paraoksonaz Aktivitesinin Analizi

Deneyin Prensibi; paraoksonun (0,0-dietil-0-p-nitrofenilfosfat), PON1 vasıtasıyla 25°C'de hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün 412 nm'de spektrofotometrik olarak absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Eckerson ve ark. 1983, Gülcü ve Gürsu 2003).

2.2.1.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

- a) 0,1 M HCl çözeltisi (a): 10 ml'lik 1 M HCl çözeltisinin hacmi, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- b) 0,1 M Tris Çözeltisi (b): 1,21 g tris, distile suda çözüldü ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- c) Tris-HCl Tamponu (20 mM, pH: 8): 29 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırılarak, pH'sı 8'e ayarlandı. pH'sı 8 ayarlanan karışımın hacmi, distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- d) Çalışma Ayıracı [kalsiyum klorür (2 mM)-paraokson (2 mM)]: 29,4 mg kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), bir miktar tris-HCl tamponunda çözüldü. Üzerine 1,5 mL asetonda çözülen, 44 μL paraokson eklenerek tris-HCl tamponu ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- e) Aseton: Normal saflıktaki aseton şişesinden alınarak kullanıldı.

2.2.1.3. Deneyin Yapılışı

Numune ve kör kuyucuklarına 280 μL çalışma ayıracı konulur. Daha sonra kör kuyucuğuna 8 μL distile su, numune kuyucuğuna ise 8 μL plazma ilave edilir. 25°C'de, 2 dk boyunca köre karşı numunenin 412 nm'deki absorbans artışı ölçülür ($\Delta A/\text{dk}$: dakikadaki absorbans farkı).

2.2.1.4. Sonuçların Hesaplanması:

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = ((\Delta A/\text{dk} \times \text{SF} \times 10^6) / (18290)) \times 1/0,6$$

$\Delta A/\text{dk}$: Bir dakikadaki absorbans değişimi.

18290 : mevcut deney şartları için p-nitrofenolün molar absorpsiyon katsayısı.

SF : Seyreltme faktörü (Toplam hacim/Numune hacmi)

10^6 : μmole çevirme faktörü

1/0.6 : Plate ışık yolunun uzunluğu

2.2.1.5. Arilesteraz Aktivitesinin Analizi

Deneyin Prensipleri; Substrat olarak fenil asetat'ın, arilesteraz vasıtasıyla enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenolün 25 °C'de 270 nm'de spektrofotometrik olarak absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Molar absorpsiyon katsayısı 1310 (ϵ) alınarak (Furlong ve ark. 2000, Mackness ve ark. 1991) arilesteraz aktivitesi için 1 ünite, 1 mikromol fenol/ml serum/dk. olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar paroksanzdaki enzim aktivitesi formülüne göre hesaplandı ve U/mL olarak değerlendirildi.

2.2.1.6. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Analizi

HDL ölçümü, enzimatik kolorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Plazma örnekleri Roche Sistem otoanalizöründe Roche Diagnostic firmasının reaktifi kullanılarak çalışıldı. Analizde HDL konsantrasyonu, polietilenglikol (PEG) kolesterol esteraz ve PEG kolesterol oksidaz kullanılarak enzimatik olarak tespit edildi. PEG ile modifiye edilmiş kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz lipoprotein fraksiyonlarına karşı selektif katalitik aktivite göstermektedir. Kolesterol esterleri, PEG kolesterol esteraz enzimi etkisiyle serbest kolesterol ve yağ asitlerine ayrılır. Kolesterol, kolesterol oksidaz enziminin etkisiyle D4-Kolestenon ve hidrojen peroksit'e çevrilir. Hidrojen peroksit, peroksidaz enziminin etkisiyle 4-aminofenazon

ve N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimetoksianilin (HSDA) ile etkileşerek pembe mavi renkte bileşik meydana getirir. Oluşan bu rengin yoğunluğu HDL konsantrasyonu ile doğru orantılı olup, spektrofotometrik olarak 600 nm'de belirlendi.

2.2.2.1. Doku İnceleme Aşamaları

Çalışmanın sonunda; tüm deneklerden alınan testis doku örnekleri Bouin solüsyonunda tespit edildi. Rutin laboratuvar işlemlerinin ardından hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 mikron kalınlığında kesitler, histopatolojik değişikliklerin saptanması amacıyla hematoxilen eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelendi.

2.2.3. İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen verilerin biyoistatistiksel analizi için SPSS 20 paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki değişkenlerin değerlendirilmesi için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey testi yapıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi.

3. BULGULAR

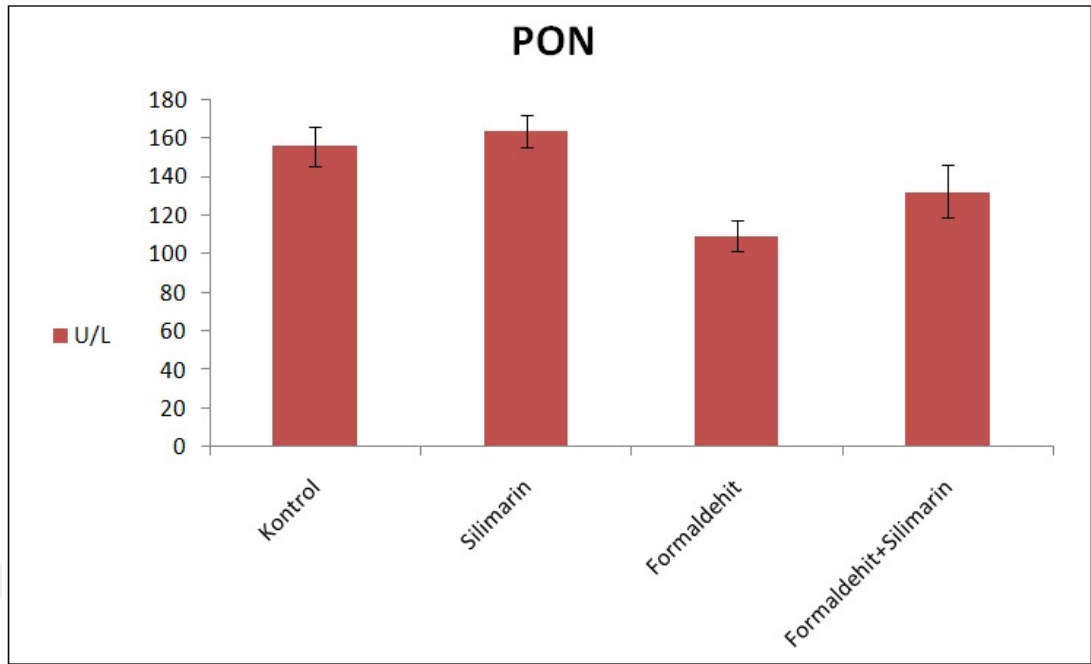
3.1. Biyokimyasal Bulgular

Plazma PON1 ve ARE aktivitesi ile HDL konsantrasyonları ve bunların aralarındaki istatistiksel farklar Tablo 1, Grafik 1, Grafik 2 ve Grafik 3'te verildi. PON1 ve ARE aktivitelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı farklar bulundu ($p<0,01$). Çalışmada formaldehit grubu PON1 aktivitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde düşük olduğu gözlemlendi. Yine kontrol grubu PON1 aktivitesi, silimarin ve formaldehit+silimarin gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmedi. ARE aktivitelerinde ise kontrol grubuna göre formaldehit grubunda istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde azalmaların olduğu tespit edildi. silimarin grubu ARE aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek olup istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Formaldehit+Silimarin gruplarında ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi. HDL düzeylerinde kontrol grubuna göre silimarin, formaldehit ve formaldehit+silimarin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Tüm parametreler ve gruplar arasında herhangi bir korelasyon gözlemlenmemiştir.

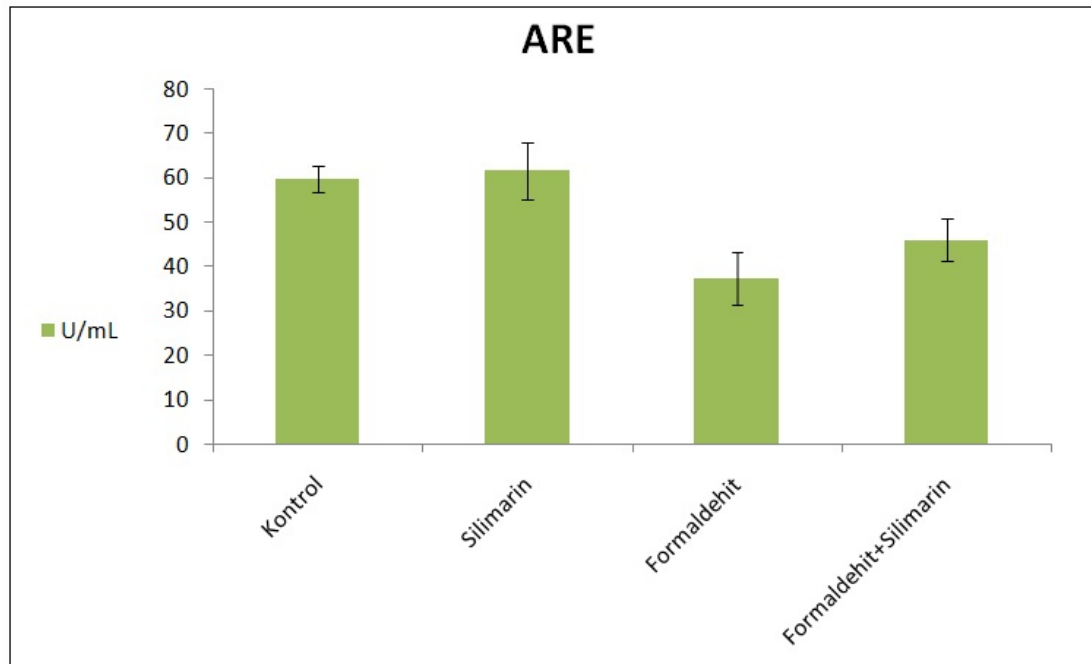
Tablo 1. Plazma PON1, ARE aktiviteleri ile HDL konsantrasyonları

Parametreler	Kontrol (n=7)	Silimarin (n=7)	Formaldehit (n=7)	Formaldehit+ Silimarin (n=7)	P
PON1 (U/L)	155,59±27,63 ^a	163,09±21,90 ^a	109,19±20,37 ^b	132,16±35,92 ^{ab}	0,004
ARE (U/mL)	59,71±7,77 ^a	61,56±16,94 ^a	37,15±15,91 ^b	45,91±12,45 ^{ab}	0,008
HDL (mg/dL)	130,29±17,41	138,86±37,79	108,57±19,79	117,14±8,86	0,102

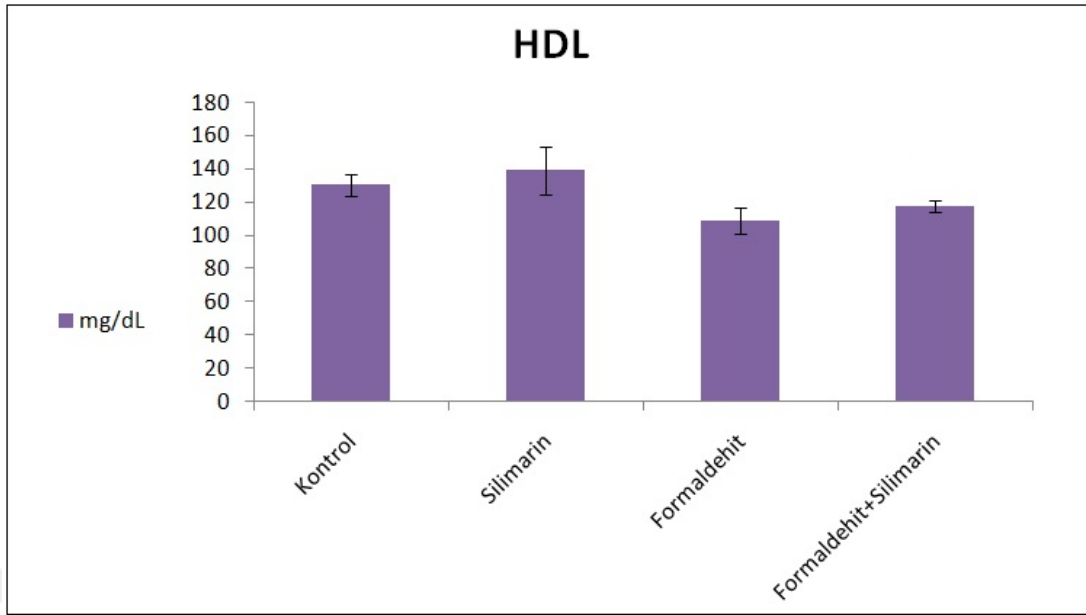
^{a,b}: Her satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir.



Grafik 1: Gruplara göre plazma PON1 aktivitesi



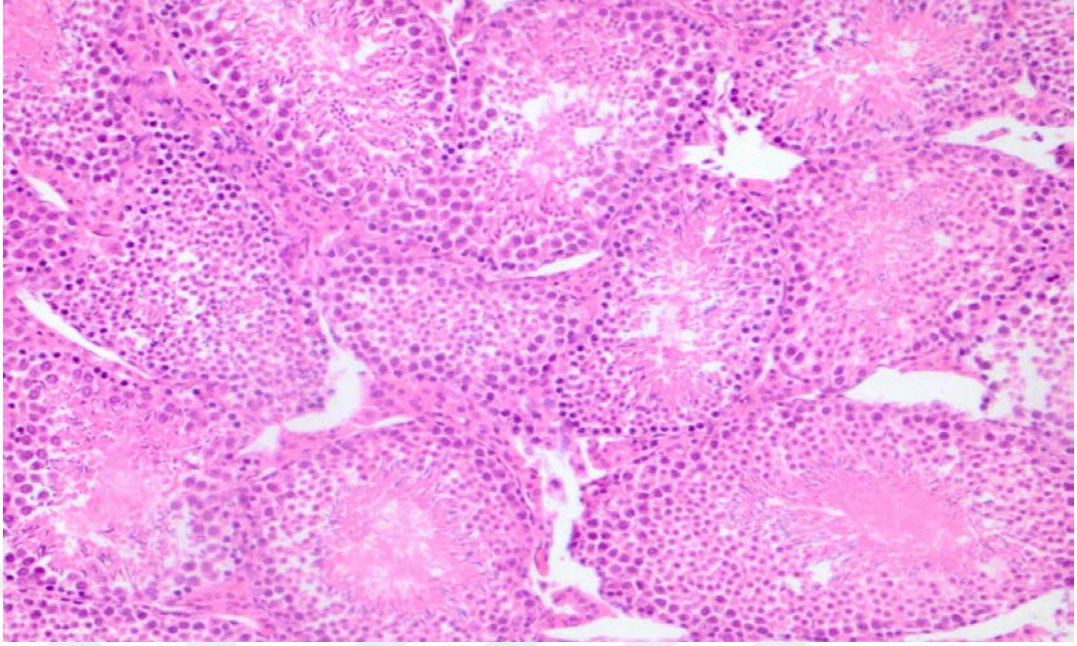
Grafik 2: Gruplara göre plazma ARE aktivitesi



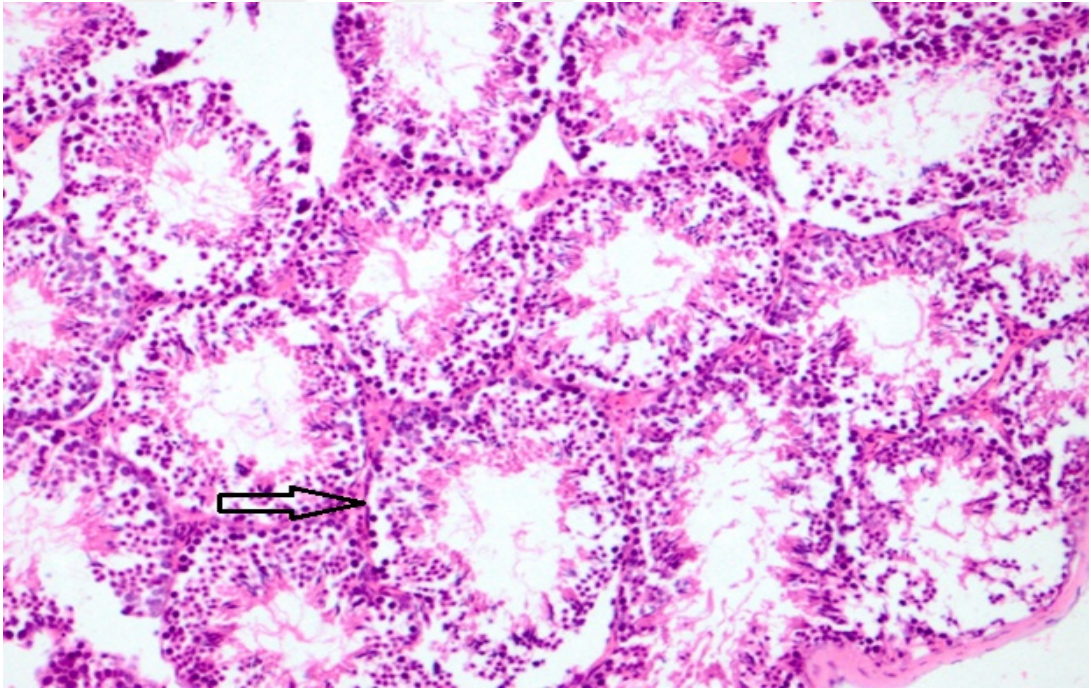
Grafik 3: Gruplara göre plazma HDL konsantrasyonu

3.2. Histopatolojik Bulgular

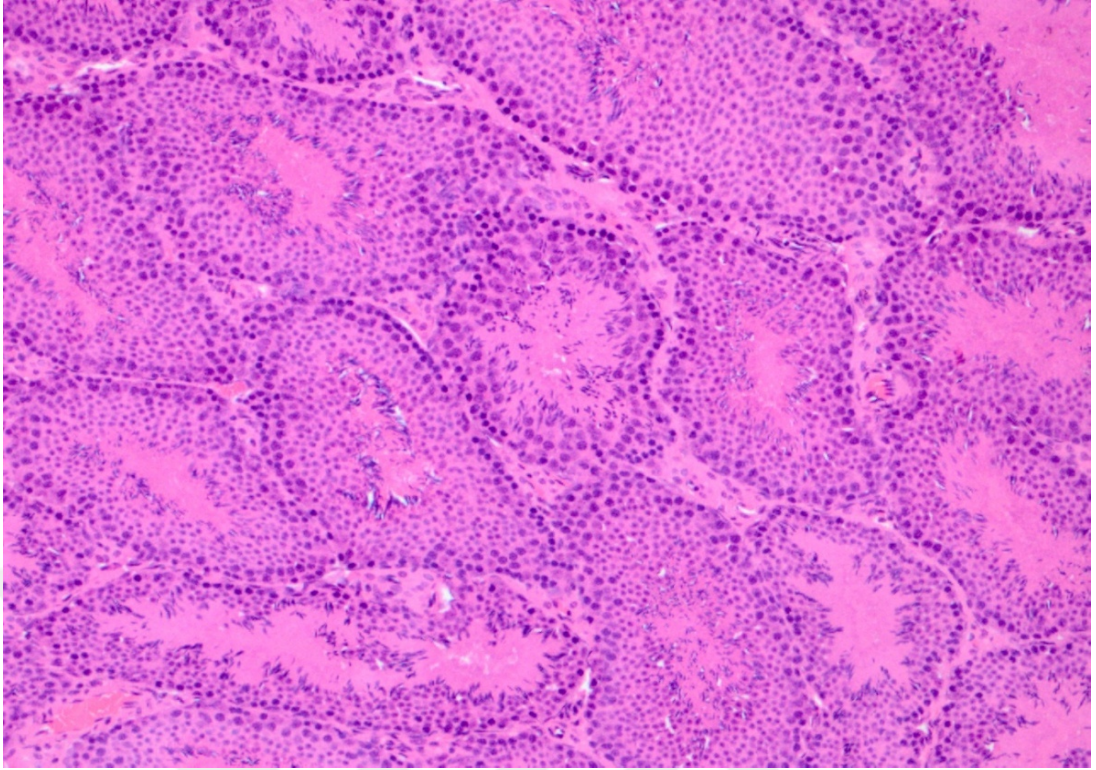
Histopatolojik değerlendirmeler resim 1, resim 2, resim 3 ve resim 4'te gösterildi. Histopatolojik incelemelerde kontrol grubunda seminifer tübül içindeki germ hücre sayısı, leydig ve sertoli hücrelerinin sayıları, seminifer tübül yapıları ve spermatogenez, morfolojik limitlerde izlendi. Silimarin grubunda da kontrol grubuna benzer şekilde germ hücre sayıları ve spermatogenez morfolojik limitlerde saptandı. Aynı zamanda bu grupta leydig ve sertoli hücreleri normal sayıda ve morfolojik limitlerde izlendi. Formaldehit grubunda seminifer tübül yapılarında bozulma ve germ hücrelerinde yıkımlanma saptandı. Leydig ve sertoli hücrelerinde azalma gözlenirken seminifer tübül çaplarında daralma ve kondansasyon dikkati çekti. SF grubunda; kontrol ve silimarin grubuna benzer şekilde seminifer tübüller ve lümen çapları morfolojik limitlerde izlenmiştir. Bu gruba ait deneklerde, germ hücre sayıları bazı hayvanlarda hafif azalmış olmasına rağmen, spermatogenez normaldi.



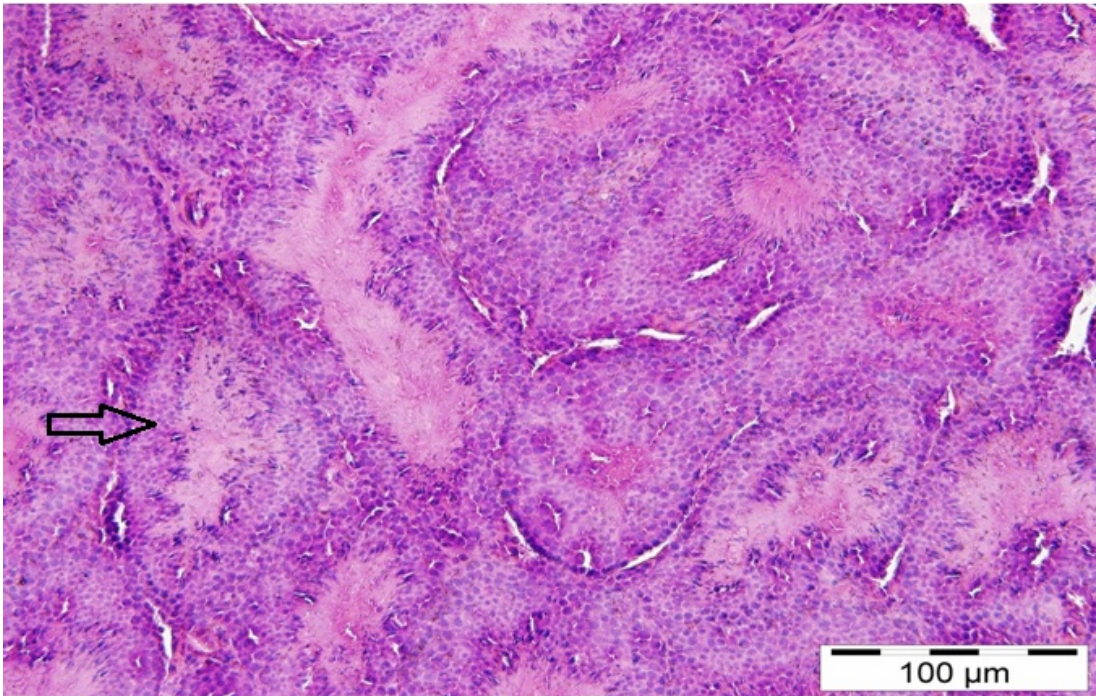
Resim 1: Kontrol grubunun morfolojik limitlerde testis dokusu (H&E, 200x)



Resim 2: Formaldehit grubunda tubulus seminiferus kontortus yapılarında bozulma ve küçülme, spermatogonyum ve sertoli hücrelerinde ve diğer germ hücrelerinde kayıplar vardır (H&E, 200x)



Resim 3: Silimarin grubu fare testis dokusunda normal morfolojik yapı (H&E, 200x)



Resim 4: Silimarin+Formaldehit grubundan bir fare tubulus seminiferus kontortuslarında azalmış germ hücreleri (H&E, 200x)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel atıklarla bulaşmış suların içerisinde bulunan kimyasallar, sulardaki canlıların yok olmasına neden olmakta ve ekosistemi olumsuz etkilemektedir. Bu atık kimyasallardan biri olan formaldehitin, içme sularına karışması önemli sağlık problemlerini ortaya çıkarmaktadır (Borzov 2006). Formaldehit biyolojik örneklerin saklanması yanında dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Medikal alanlar dışında, reçine, kontraplak, tekstil, deri ürünleri, kâğıt ve ilaçlar imalatı gibi pek çok endüstriyel alandada ihtiyaç duyulan bir kimyasal maddedir. Böylelikle, formaldehitin gündelik hayatta sıklıkla kullanılması bu kimyasalın zararlı etkilerine maruziyeti de beraberinde getirmektedir. Yine, bazı bölgesel peynirlerde, kozmetik ve temizlik ürünlerinde koruyucu madde olarak formaldehit kullanıldığı bildirilmektedir (Sorg ve ark.1996).

Formaldehit organizmaya alındıktan sonra, stoklanmayıp formaldehit dehidrogenaz vasıtasıyla karaciğer ve eritrositlerde formik asite dönüştürülmektedir. Bu madde idrar, dışkı veya karbondioksit yükseltgenerek akciğerler vasıtasıyla atılmaktadır (Ensafi ve Abassi 1999). Mukoz membranlar için iritan olan formaldehit nonenzimatik olarak protein, nükleik asit ve doymamış yağ asitleri bağlanma eğilimi göstermektedir (Green ve ark. 1987).

Silimarinin çeşitli hastalıklarda yararlı etkilerini gösteren birçok çalışma olmasına rağmen kimyasal kaynaklı toksisiteye karşı potansiyel koruyucu etkileri ile ilgili çalışmaların sayısının oldukça sınırlı olduğu yapılan literatür taramalarında görülmektedir (Köksal E ve ark. 2009). Anti-inflamatuar, serbest radikal temizleme, antioksidan savunma sistemlerinin geliştirilmesi, membran stabilizasyonu, demir şelatlama aktivitesi ve apoptoz inhibisyonu gibi bazı mekanizmaların silimarinin önemli koruyucu etkilerinden olduğu da kaydedilmektedir (Razavi ve Karimi 2016).

Kimyasalların neden olduğu toksisitenin ortada kaldırılması yada azaltılması amacıyla bitki özütlerinden yararlanıldığı kaydedilmektedir (Sharma ve ark. 1999). Taşlı ve ark.'ları (2015) farelerde formaldehit toksisitesine karşı *Camellia sinensis* (yeşil çay) özütünü koruyucu olarak kullandıkları çalışmalarında; yeşil çay özütünün oral yolla 150 mg/kg dozunda uygulamasının formaldehit tarafından oluşturulan

genotoksisiteye karşı etkin bir koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Sajedianfard ve ark.'ları (2016) ratlarda yaptıkları bir çalışmada; antineoplastik bir ilaç olan busulfan ile oksidatif stres oluşturulmuşlar ve *Silybum marianun* (devedikeni) bitkisinden izole edilen silimarinin koruyucu etkisi araştırmışlardır. Bu çalışmada doğal bitkisel bir ürün olarak güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu belirtilen silimarinin, 14 gün intraperitoneal 20 mg/kg/gün busulfan uygulamasını takiben 14 gün oral yolla 175, 250 ve 375 mg/kg/gün uygulaması sonrasında testiküler süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde önemli artışta ve malondialdehit düzeylerinde ise azalmalaa sebep olduğu bildirilmekte olup, çalışmada silimarinin lipid peroksidasyonunu azaltarak önemli bir antioksidan rol oynadığı sonucuna varıldığı da belirtilmektedir (Sajedianfard ve ark. 2016). Çalışmamızda Silimarin ve S+F uygulanan gruplarda PON1 ve aril esteraz aktivitelerinde elde edilen artışlar yukarıda belirtilen çalışmadaki süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ile paralelik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda farelerde formaldehitin testislerde oluşturduğu toksik etkileri azaltmak için intraperitoneal yolla 100 mg/kg dozunda silimarin kullanılmış olup, silimarinin serum HDL düzeyleri ile antioksidan savunma sisteminde önemli olan PON1 ve ARE aktiviteleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Rousselot ve ark.'ları (1999) HDL'nin LDL'yi lipid peroksidasyonuna karşı koruduğunu ve antioksidan özelliğinin A ve E vitaminlerinden daha yüksek olduğunu ileri sürülmektedir. Silimarinin, yüksek kolesterol diyetinde diyet takviyesi olarak serum kolesterol düzeyini azaltmakla kalmayıp aynı zamanda HDL kolesterolünü de arttırdığı kaydedilmektedir (Krecman 1998). Başka bir çalışmada standart laboratuvar diyeti ile beslenen ve 100 g vücut ağırlığı için 40 mg/ml oral yolla silimarin verilen ratlarda serum kolestrol düzeyinin değişmemiş olmasına rağmen, HDL'nin silimarine karşı duyarlılığını gösteren HDL_b kolesterolünde hafif artış olduğu saptanırken, HDL kolesterol ve ateroskleroz gelişimi arasındaki ters korelasyon nedeniyle silimarinin kan kolesterol düzeyleri üzerinde yararlı etkileri olabileceği ileri sürülmektedir (Skottová 1998). Çalışmamızda formaldehit verilen grupta HDL konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber düşüş olduğu tespit edilmiş olup, buna karşılık silimarinin koruyucu olarak verildiği silimarin grubunda kontrol grubuna

göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir artışın olduğu gözlenmiştir. Yine formaldehit grubuna göre F+S grubunda da istatistiksel olarak önemsiz olmakla birlikte bir artış olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde, silimarinin, antioksidatif kapasitede önemli olan HDL düzeyleri üzerine yararlı etkilerinin olabileceği vede oksidatif stresin neden olduğu ateroskleroz ve diğer kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği kanaatini taşımaktayız.

Birçok çalışmada; formaldehitin testiküler dokular dâhil olmak üzere çeşitli dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini artırdığı bildirilmektedir (Gurel ve ark. 2005). ROT'ların artmasıyla oksidatif strese bağlı olarak hücre membranında çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip olan malondialdehit, kronik hastalıkların etiyopatogenezisi ile yakın ilişkili olup, sperm hücrelerinde membran tahribatına, motilite kaybına ve yüksek kromatin hasarına neden olduğu belirtilmektedir (Aitken ve Krausz 2001, Kaya 2015). Yapılan bu çalışmada, testis dokusunun patolojik ve biyokimyasal sonuçları yukarıda belirtilen çalışmalarla paralellik gösterdiği ve de tübüler, peritübüler yapılar ve germ hücrelerinde hasarların olduğu gözlemlenmiştir.

Canlı organizmada fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda oluşan serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Akyol Ö.1994). Canlılar oksidatif hasara karşı enzimatik (PON1 ve ARE gibi) ve nonenzimatik (silimarin gibi) antioksidan maddeler ile korunmaya çalışmaktadır (Akyol 1994). Deve dikeninden elde edilen silimarinin güçlü bir antioksidan olduğu ve ortamda oluşan serbest radikalleri süpürücü etkisi ile hücre zarı stabilizasyonunda etkili bir madde olduğu belirtilmektedir (Köksal ve ark. 2009). Oksidatif stres varlığında özellikle membran lipitleri yoğun bir serbest radikal saldırısına uğrayarak, lipit peroksidasyonuna maruz kalmaktadır. PON1 ve ARE gibi antioksidan enzimler, hücre lipoproteinleri ile arteriyel hücrelerin spesifik okside kolesteril esterleri ve fosfolipidleri gibi lipid peroksitlerinin hidrolizi sonucu oluşan oksidasyona karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir (Mackness ve ark. 1991). Çalışmamızda silimarin grubunda PON1 ve ARE aktivitesinde önemli düzeyde artış tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Bu artışa silimarinin PON1 ve ARE enzimleri ile sinerjik etki göstermek

suretiyle antioksidan aktiviteyi artırmış olabileceği kanaatini taşımaktayız (Gürel ve Ark.2005). Yine formaldehit grubu PON1 ve ARE aktivitesinde önemli düzeyde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Formaldehit grubu PON1 ve ARE aktivitesindeki azalmaların şekillenen serbest radikaller sonucu oluşan oksidatif stres'e bağlı olabileceğini düşünmekteyiz (Gurel ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalarda silimarinin testiküler doku metabolizması için önemli fonksiyonlara sahip olabileceği ileri sürülmektedir (Eskandari ve Momeni 2016, Abedi ve ark. 2016). Abedi ve ark'ları (2016) ratlarda silimarinin spermatogenezis, testiküler doku ve hipotalamik pitüiter gonadal aks değişiklikleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 100 ve 150 mg/kg silimarinin, kontrol grubuna kıyasla spermatid ve sperm hücrelerinin sayısını arttırdığını bildirmişlerdir. Silimarinin, antioksidan özelliğinden dolayı ratlarda testosteron, lüteinleştirici hormon (LH), folikül stimüle edici hormon (FSH) ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) miktarını da önemli miktarda artırdığı kaydedilmektedir (Abedi ve ark. 2016).

Koç'larda sperm canlılığı, motilitesi ve mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise spermatozonlara sodyum arsenit uygulamasını müteakip uygulanan silimarinin sperm plazma membranlarını ve akrozom bütünlüklerini önemli oranda koruduğu bildirilmektedir (Eskandari ve Momeni 2016). Yukarıdaki çalışmada, akrozom bütünlüğünün korunması, lipit peroksidasyonundan etkilenen Na/K pompa sistemi için yararlı olan silimarinin sperm hücrelerinde antioksidan/oksidan denge sisteminin korumasına bağlanmıştır.

Çalışmamızın, histopatolojik incelemelerinde kontrol ve silimarin grubu seminifer tübül içi germ hücre sayısı, leydig, sertoli hücreleri sayıları, seminifer tübül yapıları ve spermatogenezin morfolojik limitlerde olduğu tespit edilmiştir. Formaldehit grubunda ise seminifer tübül ve germ hücrelerinin morfolojik yapılarının bozulduğu, leydig ve sertoli hücrelerinde de azalmaların olduğu saptanmıştır. Silimarin+formaldehit verilen grupta ise histopatolojik parametrelerin kontrol ve silimarin grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Silimarinin testiküler hücreler üzerine olan bu olumlu etkileri PON1 ve ARE aktivitesinde görülen

değişikliklere paralel olarak antioksidan savunma sistemini güçlendirmesiyle ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, farelerde intraperitoneal formaldehit uygulamasının hücre hasarı ve oksidatif strese neden olabileceği, antioksidan bir madde olan silimarinin testiküler hücre hasarının önlenmesinde ve oksidatif strese karşı koruyucu olabileceği kanaatini taşımaktayız. Yine silimarinin, testiküler hücreler ve bu hücrelerin metabolizması üzerine olan etkileri bakımından sağlıklı bir üreme sistemi için önemli olabileceğini düşünmekteyiz.



5. KAYNAKLAR

Abedi H, Jahromi HK, Hashemi SA, Hojatollah KJ, Jahromi ZK, Pourahmadi M: The effect of silimarin on spermatogenesis process in rats. *Int J Med Res Health Sci*, 5(6):146-150, 2016.

Adzet T: Polyphenolic compounds with biological and pharmacological activity. *Herbs Spices Med Plants*, 1: 167-184, 1986.

Aitken RJ, Krausz C: Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 122: 497-506, 2001.

Akyol Ö: Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. Ankara Üniv, Tıp Fak, Uzmanlık tezi, Ankara, 1994.

Aldridge WN: Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*, 53: 110-117, 1953.

Aldridge WN: Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J*, 53: 117-124, 1953.

Altındağ O, Karakoç M, Soran N, Çelik H, Çelik N, Selek Ş: Paraoxonase and arylesterase activities in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatism*, 22 (4): 132-136, 2007.

Arts JHE, Rennen MAJ, de Heer C: Inhaled formaldehyde: Evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 44: 144-160, 2006.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN: Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that

required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(10):1617-1624, 1998.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paro SL, La Du BN: Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*, 101(8): 1581-1590, 1998.

Bastos VLFC, Rossini A, Alves MV, Ceccarelli PS, Lima JAF, Bastos JC: Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* Valenciennes (Siluridae). *Revtabras Zool*, 15(3): 665, 1998.

Blair A, Stewart PA, Hoover RN: Mortality from lung cancer among workers employed in formaldehyde industries. *Am J Ind Med*, 17(6): 683-699, 1990.

Borzov IN, Beta-decay rates, *Nucl Phys A*, 777: 645-675, 2006.

Burkhart KK, Kulig KW, McMartin KE: Formate levels following a formalin ingestion. *Vet Hum Toxicol*, 32(2), 135-137, 1990.

Canbilen A, Sezen S, Avunduk MC, Con NE: Formaldehit ve toksik etkileri. *Genel Tıp Derg*, 9: 33-9, 1999.

Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW: Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res*, 46: 389-403, 2005.

Gunaratne C, Zhang T: Application of liquid chromatography-electrospray ionizations trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silibinin in human liver microsomes. *Jo Chromatog*, 794: 303-310, 2003.

Dehmlow C, Murawski N, Degroot H: Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Sci*, 58: 1591-600, 1996.

Davis-Searles PR: Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, 65(10):4448-57, 2005

Deakin S, James RW: Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme Paraoxonase-1. *Clin Sci*, 107(5): 435-447, 2004.

Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini GA, James RW: Enzymatically active Paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem*, 277: 4301-4308, 2002.

Di Meo F, Lemaury V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux JL, Olivier, Y: Free radical scavenging by natural polyphenols: Atom versus electron transfer. *J Phys Chem A*, 117(10): 2082-2092, 2013.

Draganov D, La Du BN: Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 369(1): 78-88, 2004.

Draganov DI, Stetson PL, Wateon Ce, Billecke SS, La Du BN: Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 275(43): 33435-33442, 2000.

Eckerson HW, Romson J, Wyte CM, La Du BN: The human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet*, 35(2): 214-227, 1983.

Ensafi AA, Abassi S: Sensitive reaction rate method for the determination on low levels of formaldehyde with photometric detection. *Fresenius J Anal Chem*. 363: 376-379, 1999.

Fuhrman B, Khateeb J, Nitzan O, Karry R, Volkova N, Aviram M: Urokinase Plasminogen Activator Upregulates Paraoxonase 2 Expression in Macrophages

Via An NADPH Oxidase-Dependent Mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 1361-1367, 2008.

Furlong CE, Li WF, Brophy VH, Jarvik GP, Richter R J, Shih DM, Lusic AL, Costa L G: The PON1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 21: 581-587, 2000.

Green DJ, Sauder LR, Kulle TJ, Bascom R: Acute response to 3.0 ppm formaldehyde in exercising healthy nonsmokers and asthmatics. *Am Rev Respir Dis*, 135: 1261–66, 1987.

Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA: Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat* 29: 173–178, 2005.

Gülcü F, Gürsu MF: Paraoksonaz ve aril esteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *Turk J Biochem*, 28(2): 45-49, 2003.

Halperin WE, Goodman M, Stayner L, Elliot LJ, Keenlyside RA, Landrigan PJ: Nasal cancer in a worker exposed to formaldehyde. *JAMA*, 249: 510-16, 1983.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, Mccarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Dan S, Tawfik: Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Struc Mol Biol*, 11: 412-419, 2004.

Heck H, Casanova M, Starr TB: Formaldehyde toxicity – new understanding. *Critical Reviews in Toxicology*, 20: 397-426, 1990.

Heck H, Casanova M: Pharmacodynamics of formaldehyde: applications of a model for the arrest of DNA replication by DNA-protein cross- links. *Toxicol Appl Pharmacol*, 160: 86-100, 1999.

IARC: International Agency For Research On Cancer, 2012.

Jaouad L, Guise CD, Berrougui H, Clouiter M, Isabellea M, Fulop T, Payette H, Khalil A: Age-related decrease in HDL's antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis*, 185: 191-200, 2006.

Karaman N, Dabak ÖD: Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. *Fırat Tıp Derg.* 20(3):128-132, 2015.

Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M: "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iran J Basic Med Sci*, 14(4): 308-17, 2011.

Kaya I, Deveci HA, Ekinci UV, Karapehlivan M, Kaya MM, Alpaly M: The effect of ellagic acid and sodium fluoride intake on total sialic acid levels and total oxidant/antioxidant status in mouse testicular tissue. *ARRB*, 7(5): 329-335, 2015.

Kevin P Anthony, Gitanjali Subramanya, Susan L Uprichard, Saleh MA: Antioxidant and Anti-Hepatitis C Viral Activities of Commercial Milk Thistle Food Supplements. *Antioxidants (Basel)*, 2: 23-36, 2013.

Khaschsorur GA, Winklhofer-Roob BM, Rabl H: Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia*, 52: 181-184, 2000.

Köksal E, Gülcin I, Beyza S, Sarikaya O, Bursal E: In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme. Inhib Med Chem*, 24: 395-405, 2009.

Krecman V, Skottová N, Walterová D, Ulrichová J, Simánek V: Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Medica*, 64: 138-142, 1998.

Kren V, Walterova D: Silybin and silymarin new effects and applications. *Biomed Papers*, 149(1): 29-41, 2005.

Kuo CL, La Du BN: Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity, *Drug Metab Dispos*, 26(7): 653-660, 1998.

La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ: On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact*, 119-120: 379-388, 1999.

Hong-Liang L, De-Pei L, Chihj-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med*; 81: 766-779, 2003.

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN: Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 286:152-154, 1991.

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA: Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*, 7(2): 69-76, 1996.

Mazur A: An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem*, 271-289, 1946.

Occupational Safety and Administration-OSHA, 1984.

Özen OA, Akpolat N, Songur A, Kus I, Zararsiz I, Ozacmak VH, Sarsilmaz M: Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study. *Toxicol Ind Health*, 21(10): 249-54, 2005.

Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E: The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*, 214(1): 20-36, 2011

Ramasamy K, Agarwal R: Multitargeted therapy of cancer by silimarin. *Cancer Lett*, 269(2): 352-362, 2008

Razavi B M, Karimi G: Protective effect of silimarin against chemical-induced cardiotoxicity. *Iran J Basic Med Sci*, 19(9): 916-923, 2006.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M, Fogelman AM: Human paraoxonase-3 is an HDL associated enzyme with biological activity similar to Paraoxonase- 1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 21(4): 542-547, 2001.

Rousselot DB, Therond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delatre J: High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*, 37: 939-949, 1999.

Sajedianfard J, Nazifi S, Izadi A, Chahardahcherik M, Honarmand M: Effect of Various Doses of Silimarin on the Oxidative Stress Induced by Busulfan Administration in the Different Organs of Rats. *Turk J Pharm Sc*, 13(2): 233-240, 2016.

Sharma N, Trikha P, Athar M, Raisuddin S: Protective effect of cassia occidentals extract on chemical-induced chromosomal aberrations in mice. *Drug Chem Toxicol*, 22 (4): 643–653, 1999.

Sherwani R, Siddiqui RA, Khan KM, Sharma SC: Nasal Mucosa changes in students exposed to formaldehyde vapour. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 54(1): 18-19, 2002.

Singh RP, Agarwal R: Flavonoid antioxidant silimarin and skin cancer. *Antioxid Redox Signal*, 4(4): 655-63, 2002.

Singh RP: A cancer chemopreventive agent silibinin targets mitogenic and survival signaling in prostate cancer. *Mutat Res*, 555(1-2): 21-32, 2004.

Skottová N, Krecman V, Walterová D, Ulrichová J, Kosina P, Simánek V: Effect of silimarin on serum cholesterol levels in rats. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 141 87-9, 1998.

Smith AE: Formaldehyde. *Occup Med*. 42: 83-88, 1992.

Sorg BA, Willis JR, Nowatka TC, Ulibarri C, See RE, Westberg HH: Proposal animal neurosensitization model for multiple chemical sensitivity in studies with formalin. *Toxicology*, 11: 135-145,1996.

Sotoa C, Recobaa R, Barrona H, Alvareza C, Favarib L: Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 136:205-212, 2003.

Şentürk H, Kolankaya D, Şahin Y: Renal İskemi-Reperfüzyonu sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına silimarinin etkisi. *Çankaya Üniv J Sci Engin*, 7(1):59-74, 2010.

Taşlı B, Çiçek F, Demirtaş G, Yalçın E, Çavuşoğlu K: Formaldehit Toksisitesine Karşı Yeşil Çay Özütünün Koruyucu Etkisi: Swiss Albino Farelerde Genotoksik Değerlendirme. *Science Journal (CSJ)*, 36(2): 63-73, 2015.

Til HP, Woutersen 3. RA, Feron VJ, Hollanders VH, Falke HE, Clary JJ: Twoyear drinking-water study of formaldehyde in rats. *Food Chem Toxicol*, 27: 77-87,1989.

Tyagi A: Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. *Carcinogenesis*. 25(9):1711-20, 2004.

Tyagi AK: Silibinin down-regulates survivin protein and mRNA expression and causes caspases activation and apoptosis in human bladder transitional-cell papilloma RT4 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 26; 312(4):1178-84, 2003.

Tyler VE: Milk Thistle." In: *The Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*, 3rd edd., edited by M.C. Smith. Binghamton, NY: pharmaceutical Products Press, pp. 209-10, 1993.

Uriel A: "Characterisation des cholinesterases et d'eutres esterases arboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I;applications a l'etude des esterases du serum humain normal, *Am Insit Pasteur*, 101-104, 1961.

Venkataramanan R, Ramachandran V, Komoroski BJ, Zhang S, Schiff PL, Strom SC: Milk thistle, a herbal supplement, decreases the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos*, 28(11): 1270-1273, 2000.

Vural G: Formaldehit soluyan sıçanlarda görülen histopatolojik değişiklikler. *Türk Patoloji Derg*, 9, 42-47, 1993.

Wahlberg JE: Measurement of skin-fold thickness in the guinea pig. Assesment of edema inducing capacity of cutting fluids, acids, alkalis, formalin and dimethyl sulfoxide. *Contact Dermatitis*, 28: 141-145, 1993.

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 96(6): 2882-2891, 1995.

Witek TJ, Schacter EN, Tosun T, Leaderer BP: An evaluation of respiratory effects following exposure to 2.0 ppm formaldehyde in asthmatics: Lung function symptoms, airway reactivity. *Arch Environ Health*, 42: 230-237, 1987.