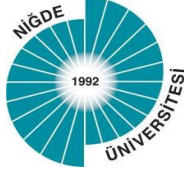


E. ÖZER, 2016

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NIĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



T.C.  
NIĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

URSODEOKSİKOLİK ASİT'İN İNSAN PERİFERAL KAN  
LENFOSİTLERİNDEKİ *İN VİTRO* GENOTOKSİK ETKİSİ

EYÜP ÖZER

Haziran 2016



T.C.  
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

URSODEOKSİKOLİK ASİT'İN İNSAN PERİFERAL KAN  
LENFOSİTLERİNDEKİ *İN VİTRO* GENOTOKSİK ETKİSİ

EYÜP ÖZER

Yüksek Lisans Tezi

Danışman  
Doç. Dr. SONGÜL BUDAK DİLER

Haziran 2016

**Eyüp ÖZER** tarafından **Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER** danışmanlığında hazırlanan “**Ursodeoksikolik Asit’in İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki İn Vitro Genotoksik Etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Fikriye POLAT (Kocaeli Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER (Niğde Üniversitesi)

Üye : (Doç. Dr. Recep KARA) (Niğde Üniversitesi)

**ONAY:**

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ....../....../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun ....../....../20.... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Eyüp ÖZER



## ÖZET

### URSODEOKSİKOLİK ASİT'İN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDEKİ *İN VİTRO* GENOTOKSİK ETKİSİ

ÖZER, Eyüp

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman

: Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER

Haziran 2016, 31 sayfa

Bu çalışmada, Ursodeoksikolik asitin, insan periferal kan lenfositlerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilacın, 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda, sitotoksik etkiyi ve kromozom anomalilerini saptamak için *in vitro* kromozom aberasyon testi yapılmıştır. Hücreler, ilacın belirlenen konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat süresince muamele edilmiştir. Kromozomlarda oluşan anomaliler SPSS istatistik programında, ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analiz-LSD Test) testi ile analiz edilmiştir. Yapılan istatistik analizine göre, uygulanan konsantrasyonların, hücrelerde mitotik indeks değerlerini düşürmediği ve kromozom anomalilerini kontrole göre önemli derecede artırmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre, Ursodeoksikolik asitin genotoksik ve sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

*Anahtar Sözcükler:* Ursodeoksikolik asit, Sitotoksik, Genotoksik, Kromozom Aberasyonu

## SUMMARY

### THE *IN VITRO* GENOTOXIC EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

ÖZER, Eyüp

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor

: Associate Professor Dr. Songül BUDAK DILER

June 2016, 31 pages

In this study, it is aimed to determine the potential *in vitro* genotoxic effects of ursodeoxycholic acid on human peripheral blood lymphocytes. Its was prepared with 10, 50 ve 100 µg/mL concentrations. In the prepared concentrations, construction of cell cultures *in vitro* chromosome aberration test was done to detect chromosomal abnormalities. Concentrations were treated at 24 and 48 hours. Chromosome abnormalities were analyzed with ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analysis-LSD Test) test in the SPSS statistics program. According to the analyses contorted, it was found that the applied concentrations did not induce the mitotic index values in cells or did not increase chromosome anomolies significantly compared to the control. As a result, ursodeoxycholic acid was found on human peripheral blood lymphocytes that had no the genotoxic effect and the cytotoxic effect.

*Keywords:* Ursodeoxycholic acid, Cytotoxic, Genotoxic, Chromosome Aberration

## ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tezinde, Ursodeoksikolik asit'in insan periferal kan lenfositlerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, genotoksik etkiyi belirlemek için, metafaz safhasındaki kromozomlar incelenmiştir. Ayrıca sitotoksik etkiyi belirlemek için mitotik indeks hesaplanmıştır. Elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analiz neticesinde, Ursodeoksikolik asitin, genotoksik ve sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, deneylerin yapılmasında yardımcı olan ve her türlü desteği sağlayan danışman hocam sayın Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ÖN SÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ .....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR .....	xiii
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
1.1 UDKA'nın Etkileşimde Bulunduğu Sistem ve Organlar .....	2
1.1.1 Biliyer sistemi .....	2
1.1.2 Safra metabolizmasında karaciğer .....	2
1.1.4 Safra metabolizmasında pankreas .....	6
1.1.5 Safra metabolizmasında ince bağırsak .....	6
1.2 UDKA'nın Özellikleri .....	6
BÖLÜM II LİTARATÜR ÖZETLERİ .....	9
2.1 İnsan Periferik Kanları Üzerine Yapılan Sitotoksik Ve Genotoksik Çalışmalar.....	9
2.1.1 Formik asitin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi.....	9
2.1.2 Perkloretilenin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi	9
2.1.3 Tenofovir Disoproksil Fumarat (TDF)'in insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi.....	10
2.1.4 Sitrininin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi.....	10
2.1.5 Lityum karbonatın insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi .....	10
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT.....	12
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları .....	12
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler .....	12
3.1.1.1 Ursodeoksikolik asitin özellikleri.....	12
3.1.1.2 Etanol.....	13

3.1.1.3 Kromozom medyumu .....	13
3.1.1.4 Kolşisin (Colchicine) .....	13
3.1.1.5 Hipotonik eriyik .....	14
3.1.1.6 Fiksatif .....	14
3.1.1.7 Sorensen tamponu (Sorensen Buffer).....	14
3.1.1.8 Giemsa (Merck).....	14
3.1.1.9 Entellan (Merck).....	15
3.1.1.10 Nitrik asit (HNO <sub>3</sub> ).....	15
3.1.1.11 Mitomycin C (MMC).....	15
3.1.2 Kullanılan deney ekipmanları .....	15
3.1.2.1 Hassas terazi .....	15
3.1.2.2 Santrifüj.....	15
3.1.2.3 İnkübatör .....	16
3.2 Lamların Temizlenmesi .....	16
3.3 Sitotoksisite ve Genotoksisite Çalışmaları.....	16
3.3.1 Kromozom Anomalilerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması .....	16
3.3.1.1 Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi.....	16
3.3.1.2 Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması .....	17
3.3.2 Kromozom anormalliği için hazırlanan preparatlarda mikroskopik inceleme .....	18
3.3.2.1 Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme.....	18
3.3.2.2 Genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme.....	18
3.3.2.3 İstatistiksel analiz ve sonuçların değerlendirilmesi .....	18
<b>BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>20</b>
4.1 Ursodeoksikolik Asit'in Kromozom Anomalileri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri..	20
4.2 Ursodeoksikolik Asit'in Mitotik İndeks (MI) Üzerindeki Etkileri .....	22
4.3. Tartışma.....	23
<b>BÖLÜM V SONUÇ .....</b>	<b>26</b>

KAYNAKLAR.....	27
ÖZGEÇMİŞ .....	27



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Değişik konsantrasyonlarda Ursodeoksikolik asit'in (UDKA) ile 24 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri.....	20
Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda Ursodeoksikolik asit'in (UDKA) ile 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri.....	22

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Biliyer sistem .....	2
Şekil 1.2 Safra kesesi ve safra yolları.....	3
Şekil 1.3 Safranın dolaşımı.....	5
Şekil 3.4 UDKA'nın Formülü.....	12



## FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 4.1. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (10 µg/ml UDKA, 24 saat muamele, X1000).....	21
Fotoğraf 4.2. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (50 µg/ml UDKA, 24 saat muamele, X1000).....	21
Fotoğraf 4.3. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (50 µg/ml UDKA, 48 saat muamele, X1000).....	23
Fotoğraf 4.4. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (100 µg/ml UDKA, 48 saat muamele, X1000).....	23
Fotoğraf 4.5. UDKA tarafından internukleozomal DNA'da parçalanma indüksiyonu.....	24

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
g	Gram
dk	Dakika
°C	Santigrat
%	Yüzde
rpm	Dakikadaki devir sayısı
N	Normal
ppm	Milyonda bir
pH	Bir çözeltinin asidik ya da bazik derecesi
P	Önemlilik
R2	Regresyon
♀	Dişi
♂	Erkek

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
KA	Kromozom Aberasyonu
MMC	Mitomycin C
MI	Mitotik İndeks
MN	Mikronükleus

B'	Kromatid Kırığı
B''	Kromozom Kırığı
DS	Disentrik Kromozom
SU	Sister Union
F	Fragment
HepG <sub>2</sub>	Karaciğer Kanseri Hücresi
LiCO <sub>3</sub>	Lityum Karbonat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
TDF	Tenofovir Disoproksil Fumaratın
LD50	Letal Doz
MTT	Metil Tiyazol Tetrazolyum
UDKA	Ursadeoksikolik Asit
TUDKA	Tauroursodeosikolik Asit
AOM	Azoksimetan
MS	Metabolik Sendrom
KKD	Kardeş Kromatit Değişimi

# BÖLÜM I

## GİRİŞ

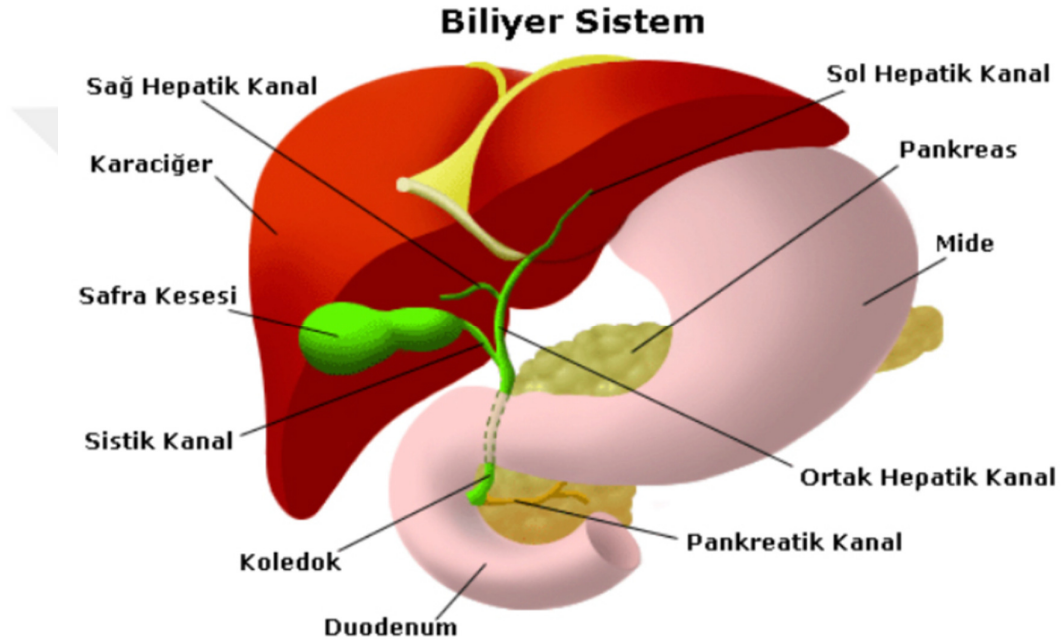
Ursodeoksikolik asit (UDKA), yüzyıllardır insanlar tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Özellikle Çin’de, *Shorea spp.* (Meranti ağacı) ve yetişkin siyah ayıların kurutulmuş safraları ile hepatobiliyer hastalıkları tedavi edilmiştir. UDKA’yı, Çin geleneksel tıbbı, Tang hanedanlığı zamanında karaciğer hastalıklarının tedavisi için sıklıkla kullanmıştır. Bilimsel olarak UDKA, 20.yy’ın başlarında (1902), Hammarsten tarafından keşfedilmiştir. Japonya Okayama üniversitesinden Shoda adlı bilim adamı tarafından 1927 yılında kristalize edilerek (latince Urso= ayı), Ursodeoksikolik asit adı verilmiş ve yapay olarak üretilmeye başlanmıştır (Guarino vd., 2013). 1970’den itibaren kolestatik karaciğer enfeksiyonlarında kullanılmaya başlanmış ve 1980’den sonra da ilaç endikasyonları üzerine araştırmalar çoğalmıştır. İlk defa 1985’te Lechner ve arkadaşları, UDKA’yı kolesterol safra taşını eritmek amacıyla denemişler ve kronik aktif hepatite sahip hastaların aminotransferaz düzeylerinin belirgin bir şekilde düştüğünü gözlemlemişlerdir. UDKA’nın, hepatosit membranında kolesterol ve fosfolipit çözünürlüğünü azaltarak, toksik safra tuzlarının hepatotoksik etkisini bloke ettiği düşünülmektedir (Gülmen, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, ilaç olarak kullanılan UDKA’nın, DNA onarımı, koenzim A, siklik AMP, p53, fagositoz ve nitrik oksit sentataz indüksiyonunu inhibe ettiğine dair araştırmalar bulunmaktadır (Kotb, 2012). Ayrıca UDKA’nın apoptoz ve mikronükleus oluşumu üzerine de çalışma yapılmış (Fimognari vd., 2001) fakat literatürde kromozom aberasyonu ile ilgili her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle biz de bu çalışmamızda, insanda çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak ve sürekli kullanılan UDKA’nın insan kromozomlarında anomali yapıp yapmadığını araştırdık. Yaptığımız bu çalışma, hem UDKA’yı kullanan insanların ilaca olan güvenlerini arttıracak hem de bilimsel alandaki önemli bir boşluğu dolduracaktır.

## 1.1 UDKA'nın Etkileşimde Bulunduğu Sistem ve Organlar

### 1.1.1 Biliyer sistemi

Biliyer sistem, safra kesesi, sistik kanal, orta safra kanal ve oddi sfinkterden meydana gelmiştir (Şekil 1.1). Biliyer sistemin görevleri arasında, safrayı depolama, konsantre etme ve karaciğerden duodenuma aktarılması bulunmaktadır (Al ve Yıldırım, 2008).



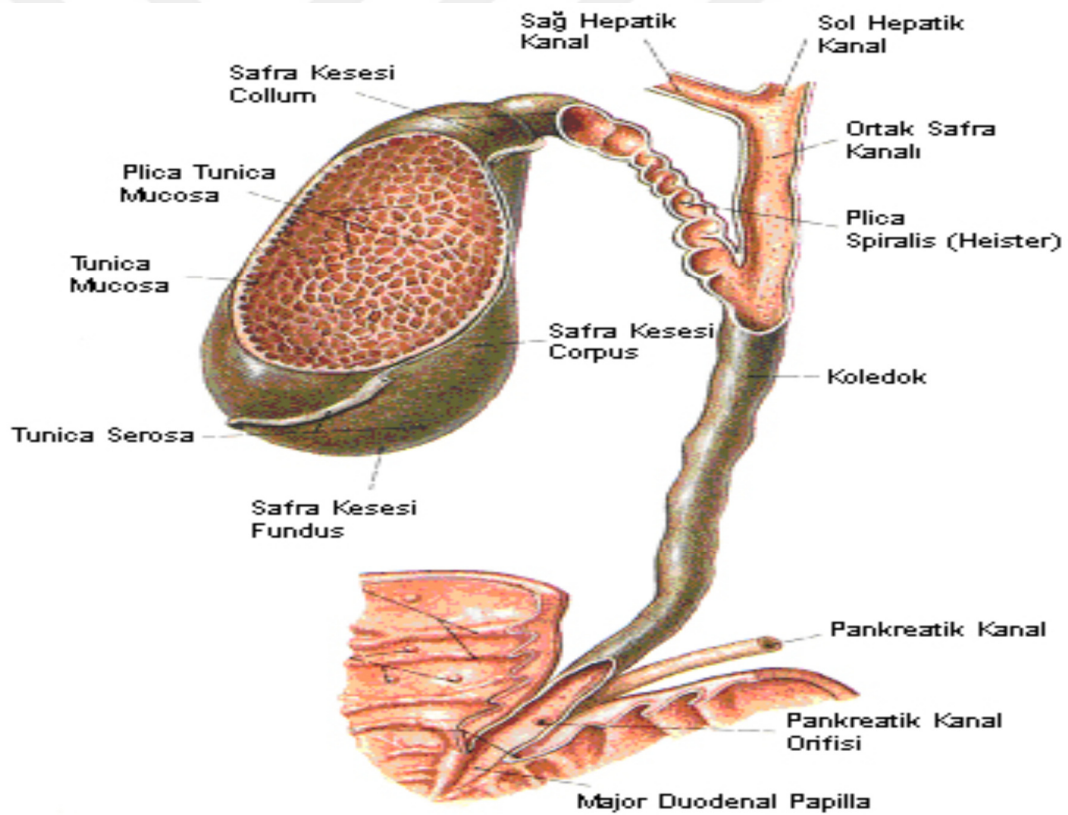
Şekil 1.1 Biliyer sistem (Kozan, 2006)

### 1.1.2 Safra metabolizmasında karaciğer

Karaciğer, abdominal boşlukta yer alır ve vücudumuzun en büyük organıdır. En önemli görevleri protein sentezi, safra sentezi ve safranın salgılanmasıdır (Barret vd., 2001). Ayrıca gastrointestinal sistemle absorbe edilen karbonhidratlar, vitaminler, mineraller, aminoasitler venae portae (kapı toplardamar) ile karaciğere toplanarak depolanır ve kullanılır (Ergün ve Ergün, 2009).

### 1.1.3 Safra metabolizmasında safra kesesi

Safra kesesi, uzunluğu 7-10 cm, hacmi 30-60 ml olan, karaciğerden salgılanan safrayı muhafaza ve konsantre eden, armuda benzeyen, ince duvarlı yapıda olan bir organdır. Safra kesesine bağlanan yapılar: Sağ ve sol hepatik kanallar (ductus hepaticus dexter at sinister); Karaciğerden gelen safranın ilk giriş yaptığı kanallardır. Birleşik hepatik kanal (ductus hepaticus communis); sağ ve sol hepatik kanallarının birleştiği kısımdır. Sistik kanal (ductus cysticus); safra kesesinden uzanan kanaldır. Koledok kanalı (ductus choledocus); birleşik hepatik kanalla sistik kanalın birleşmesiyle meydana gelir (Songur vd., 2009).



Şekil 1.2. Safra kesesi ve safra yolları (Kozan,2006)

Safra, karaciğerden günlük 600-1000 ml salgılanan, sindirim ve metabolik son ürünlerin atıldığı bir sıvıdır. Birincil görevi, pankreastan salgılanan lipazın etkinliğini artırarak, gıdalardaki büyük moleküllü yağların parçalanmasını sağlar ve bağırsak mukozasında yağların emilimine yardımcı olur. İkincil görevi ise, kandaki önemli atıkların; hemoglobinin yıkımı sonucu oluşan bilirubin ve fazla kolesterolün boşaltılmasını sağlar

(Guyton ve Hall, 2000). Safra, %97 su, %0.7 safra tuzları, %0.2 safra pigmentleri, %0.06 kolesterol, %0.7 inorganik tuzlar, %0.15 yağ asitleri, %0.1 lesitin, %0.1 yağ ve alkali fosfatlardan meydana gelir (Barret vd., 2001). Safrayı oluşturan maddelerin önemli bir kısmı su ve suda çözülmüş veya çözünmekte olan organik ve inorganik bileşiklerden meydana gelir. İçerdiği kompozisyonda; Glukoz, protein, steroid hormonlar, inorganik elektrolitler; sodyum (Na<sup>+</sup>), potasyum (K<sup>+</sup>), kalsiyum (Ca<sup>+</sup>), klor (Cl<sup>-</sup>) ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bulunur (Marin, 2008). Ayrıca safra pigmentleri (bilirubin, biliverdin), safra tuzları, kolesterol, fosfolipit (lesitin) yer alır (Üçok vd., 2010).

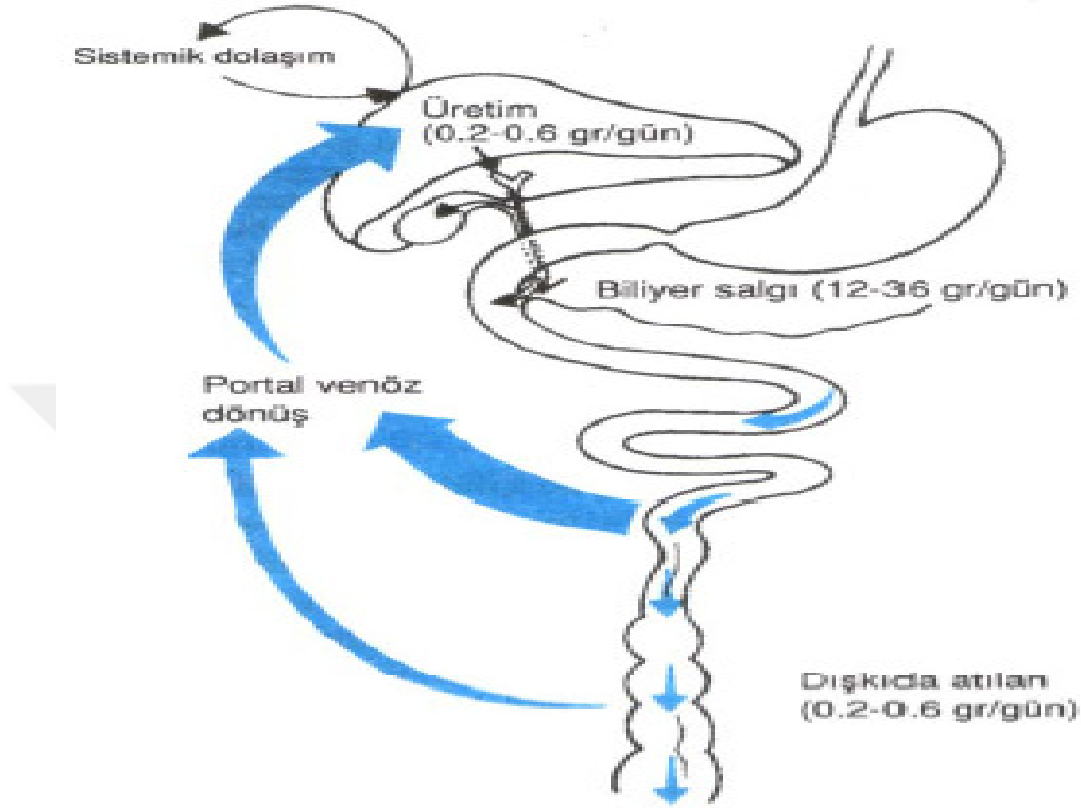
Kolesterolden ortaya çıkan en önemli ürün safra asitleridir (Tok ve Aslım, 2007). Safra asitleri primer ve sekonder safra asitleri olarak gruplandırılır. Kolesterolden oluşan primer safra asitler; kenodeoksikolik asit ve kolik asittir. Ayrıca bağırsakta bakterilerin etkisiyle oluşan sekonder safra asitleri de vardır. Bunlar ise litokolik asit ve deoksikolik asittir (Stamp ve Jenkins, 2009).

Primer safra asitleri gastrointestinal kanalda sodyum ve potasyum katyonları sayesinde safra tuzlarını oluşturur. Safra tuzlarının barsaktaki birinci görevi, yağ moleküllerini emülsifiye ederek yüzey gerilimini azaltmak ve yağ globüllerinin daha küçük yapılara parçalanmasını sağlamaktır. Safra tuzları ve fosfolipitlerin nonpolar kısımları, yağ damlacığının nonpolar iç bölümleriyle kaynaşır ve polar uçlar su ile temas kurar. Böylelikle emülsifiye edici bu maddelerle kaplanmış lipid damlacıkları birbirlerini iterek birleşmeleri engellenir. Safra tuzlarının ikinci görevi, lipidler ile miçel denilen kompleks yapılar oluşturmaktır. Safra tuzları safrada belli konsantrasyon düzeyinin üstüne çıktığı zaman miçelleşme eğilimine girer. Miçeller kolesterol ve vitaminlerin taşınmasını sağlar (Üçok vd., 2010).

Lesitin de suda erimeyen ve safrada, safra tuzundan sonra fazla bulunan bir elemandır. Lesitin, safra tuzlarının meydana getirdiği miçellerin içine girerek miçelin büyümesini daha fazla kolesterolü taşıyabilmesine olanak sağlar (Durgun, 2002).

Primer safra asitleri taurin ve glisinle etkileşerek primer safra tuzlarını, sekonder safra asitleri de sekonder safra tuzlarını oluşturur (Önür ve Beyler, 2001). Bağırsaklara gelen safra asitlerinin %95'i bağırsaklardan karaciğere portal venöz yolla tekrar absorbe edilerek, tekrar kullanılırlar. Buna enterohepatik sirkülasyon denir. %5'i ise bakteriler

tarafından dönüşüme uğratarak deoksikolik asit ve litokolik asit meydana getirilir (Aksoy, 2012).



**Şekil 1.3** Safraın dolaşımı (Kozan,2006)

Safra taşı dünyada ve ülkemizde çok sık görülen bir hastalıktır. Ülkemizde safra taşı prevalansı ile ilgili araştırma azdır. 2008 yılında Tokat'ta yetişkin kişilerde yapılan araştırmada %7,5 oranında safra taşı bulunmuştur (Çavuş ve Karaca, 2013). ABD'de erişkinlerin %15-20'sinde safra taşı tespit edilmiştir. Dünya genelinde insanların %6-20'sinde safra taşı gözlemlenmiştir. Safra taşı, erkeklere oranla kadınlarda 2 kat daha fazla görülür (Kalender, 2005).

Safra taşı oluşumuna etki eden faktörler: 1-Yaş; artan yaşla beraber risk artar. 2-Ailesel öykü, 3-Yüksek kolesterol, 4- Obezite, 5- Hormanlar 6-Genetik faktörler (Marschall ve Einarsson, 2007). Safra taşları az gelişmiş ülkelerde daha az rastlanır.

Morfolojik ve ihtiva yönünden safra taşları 3 çeşittir. 1-Kolesterol taşları: En çok görülen, tamamen ya da kısmen kolesterolden oluşmuş olan safra taşlarıdır. 2-Siyah pigment taşları: tamamen kalsiyum bilirubinat veya kalsiyum, bakır ve münin

glukoproteinlerin oluşturduğu komplike taşlardır. Sirozda ve kronik hemolizde bu taşlar daha sık görülür. 3-Kahverengi pigment taşları: Kalsiyum tuzları, ankonjuge bilirubin, kolesterol ve proteinden oluşan taşlardır. Safra taşları safra kesesinde veya safra kanallarında gelişebilir (Yönem vd., 2006). Genel olarak, Safra taşının yapısında kolesterol, kalsiyum, az miktarda demir, safra pigmenti, proteinler, karbonatlar, karbonhidratlar, fosfor, mukus ve hücre artıkları bulunur (Hoşçoşkun, 2008).

#### **1.1.4 Safra metabolizmasında pankreas**

Pankreas hem iç salgı (endokrin) hem de dış salgı (ekzokrin) yapan bir organdır (Çağlar vd., 2014). Yağ metabolizmasında pankreastan salgılanan lipazın çok etkin bir görevi vardır. Lipazın etkin hale gelmesini sağlayan maddeler; safra tuzları,  $Ca^{++}$  iyonu ve sabunlardır. Lipaz suda eridiği için, lipitlere etki alanı yağ/su yüzeyindedir. Bundan dolayı bağırsağın peristaltik hareketi ve safra tuzlarının etkisiyle yüzeyleri genişleyerek mikroemülsiyon halini alırlar. Mikroemülsiyon haline gelen lipidler hidroliz neticesinde, trigliseridler,  $\beta$ -monogliseritler ve serbest yağ asitlerine parçalanır (Ası, 1999)

#### **1.1.5 Safra metabolizmasında ince bağırsak**

Besin sindiriminin ve emiliminin büyük bir kısmı ince bağırsaklarda gerçekleşir. Pankreas salgısını boşaltan pankreas kanal ve safra boşaltan koledok, ince bağırsağın duodenuma (on iki parmak bağırsağı) açılır. Safra tuzlarının geri emilimi ince bağırsağın son bölümü ileumdan gerçekleşir (*Sindirim sistemi*, 2012).

### **1.2 UDKA'nın Özellikleri**

Ursodeoksikolik asit (UDKA) primer safra asidi olan kenodeoksikolik asitin  $7\beta$  epimeridir ve kolon bakterilerinin etkisiyle oluşur. UDKA, ince bağırsakta miçel oluşumu ve solubilizasyonu (çözündürmesi) yönünden etkili olmayıp, ince bağırsaktan iyi emilemez (Aydoğdu, 2006). Safra havuzunun sadece %1'ini teşkil ettiği ve bu nedenle normal bir insanın safrasında çok az miktarda bulunduğu gösterilmiştir. Hidroksil grubunun  $\beta$  yerleşimi kenodeoksikolikasit'ten daha çok hidrofilik olduğu ve bu özelliğinden dolayı da daha az hepatotoksik olabileceği bilinmektedir (Küçük, 2011).

UDKA'nın, karaciğer hücre zarının lipit tabakasını, hidrofobik safra tuzlarının toksikitesine karşı koruduğu ve ayrıca kronik kolestatik karaciğer hastalığı ile safra taşlarının eritilmesinde de çok önemli bir görevinin olduğu belirlenmiştir (Bektaş, 2000).

UDKA'nın, kanda ve safrada kolesterol seviyesini düşürdüğü, kolesterolün safra asidine dönüşümünü sağladığı ve ayrıca endojen safra asitlerinin ileal absorpsiyonunu da etkilediği tespit edilmiştir. UDKA'nın, safra asit hepatik ekskretuar (salgı) düzeylerinin ve zamanlamasının düzenli olmasını sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca kolanjiyositleri safra asit havuzundan çıkartarak, hidrofobik safra asitlerinin sitotoksik etkisinden koruduğu belirlenmiştir. UDKA'nın, safra üretim ve atılım hızını artırıcı kolorektik etkisinin üst düzeyde olduğu ve hepatobiliyer salgılarını baskılayarak, zehirli maddelerin karaciğerde birikmesine engel olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca UDKA hepatoselüler hasarda rol oynayan T hücrelerini azalttığı ve antioksidatif, neoplazm (tümör) hücrelerinin çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir (Oygür ve Selçuk, 2013).

UDKA'nın, nontoksik hidrofilik bir safra asiti olduğu için ve kolestazda biriken endojen safra asitlerinin zararlı hepatotoksitesini ortadan kaldırdığı için tıp alanında kullanımı yaygınlaşmıştır. Kolestatik karaciğer hastalığında, safra asitlerinin hepatositlerden atılımını hızlandırdığı, ayrıca bağırsaklardan emilimine mani olarak karaciğere tekrar dönüşümünü azalttığı ve böylece endojen safra asit yoğunluğunu düşürerek, hepatositlerin daha sağlıklı iş görmesine olanak sağladığı belirlenmiştir (Tümgör vd., 2005).

UDKA'nın gebelerde, plasentadan safra asitlerinin geçişini minimize ederek amniyotik sıvıda ve kordon kanında safra asitlerinin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (Yıldırım vd., 2007).

UDKA, klinikte çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaç olup, kullanıldığı hastalıklar şunlardır. Primer bilier siroz, primer sklerozan kolanjt, gebeliğin intrahepatik kolestazi, kolelitiazis, nonalkolik steatohepatit 21, akut viral hepatit, kronik hepatitler, alkolik karaciğer hastalığı, siroz, İlaça bağlı kolestaz, hepatik graft versus host hastalığı, kistik fibrozis, progresif familial intrahepatik kolestazis (Byler hastalığı), total paranteral nutrisyona bağlı kolestazis, kolon kanseri ve diğer kanser hastalıklarında

yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Kalender, 2005). UDKA'nın, immünomodölatör etkiye sahip olup, hepatik boşatımı düzenleyici olduğu, hücreleri koruduğu ve endojen toksik hidrofobik safra asitlerini azalttığı tespit edilmiştir (Lim vd., 1995).



## BÖLÜM II

### LİTARATÜR ÖZETLERİ

#### **2.1 İnsan Periferel Kanları Üzerine Yapılan Sitotoksik ve Genotoksik Çalışmalar**

Lenfositlerin, insan vücudundaki doku ve organlarda, uzun süreli bir dolaşımı olduğu bilinmektedir. Tüm periferel kan lenfositleri mitotik interfazın G0 veya G1 aşamasında meydana gelir ve normal bireylerde, lenfositler nadir olarak in vivo mitotik çoğalma gösterebilirler. Yapılan çalışmalarla, lenfositlerin, mitojen vasıtasıyla kültür ortamında çoğaltılmalarının kolay olduğu belirlenmiş ve böylece de genotoksik ve sitotoksik çalışmalarda kullanımlarının uygun olduğu tespit edilmiştir (Erol, 2010).

##### **2.1.1 Formik asitin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi**

Karıncalardan izole edilerek elde edilen ve karınca asidi anlamına gelen formik asit, çok geniş kullanım alanına sahip olup, özellikle gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Formik asit'in, deri ile temasta yanmaya, vücuda alındığı zaman körlüğe ve ileri aşamada ölüme neden olduğu bilinmektedir. Formik asitin 20, 40, 60 ve 80mM dozları insan lenfositleriyle muamele edildiklerinde MN indeksinin arttığı, bölünme indeksinin düştüğü hücrede apoptoza ve nekroza yol açtığı ortaya konulmuştur (Demirci, 2013).

##### **2.1.2 Perkloretilenin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi**

Kuru temizleme, otomotiv ve metal sektöründe çok yaygın bir şekilde kullanılan perkloretilen, uçucu bir solvent olup yağ atıklarının temizlenmesinde kullanılır. Bu çalışmada perkloretilen ve üç donör kullanılarak hazırlanan, 1mM, 3mM ve 5mM konsantrasyonlar 48 saat işleme tabi tutulmuş, KKD (kardeş kromatit değişimi) analizi için, hücre başına düşen KKD hesaplanmış ve netice itibariyle konsantrasyona bağlı olarak düşük, KKD/hücre sayısında, kontrole ve negatif kontrole (dimetilsülfoksit) göre anlamlı bir yükseliş gözlemlenmiştir. Ancak pozitif kontrole (mitomycin-c) kıyaslandığında 5mM konsantrasyonunun daha anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. KA testi sonucuna göre, Perkloretilen'in kromozom kırıkları artırarak, klastojenik etkiye neden olduğu ortaya konulmuştur.(Ünsal, 2013)

### **2.1.3 Tenofovir Disoproksil Fumarat (TDF)'ın insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi**

TDF, AIDS tedavisinde kullanılan retroviral ve nükleotid revers transkriptaz inhibitörü bir ilaçtır. TDF'in, 24 ve 48 saat saatlik muamele süresi ile 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml'lik dört farklı adet konsantrasyon işlemine tabi tutulmuştur. TDF'in, KKD ve KA testi verilerine göre bu konsantrasyonların kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadığı tespit edilmiştir (Kurt vd., 2015).

### **2.1.4 Sitrininin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi**

*Penicillium citrinum*'dan izole edilen sitrinin, bir mikotoksin olup, aflatoksin gibi hububatlarla bulaştığı ve vücuda alındığında, nefrotoksik, hepatotoksik ve embriyotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Sağlıklı altı kişiden alınan kan örnekleri, sitrinin 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM ve 100µM konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve sitrinin konsantrasyonları ile binuklear/mononuklear bağlantı korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, sitrinin doz bağılı olarak binuklear/mononükleer hücre oranını değiştirdiği ve MN'lu binuklear hücre sayısını konsantrasyona bağılı olarak artırdığı saptanmıştır. Mitotik indeksi ise konsantrasyona bağılı olarak azalttığı ortaya konulmuştur (Dumlupınar., 2006).

### **2.1.5 Lityum karbonatın insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi**

Lityum, düşük yoğunluklu bir metal olup, pil, cam, yağ, aliminyum, eczacılık ve seramik, gibi çok yaygın sanayi alanında kullanımının yanı sıra, tıbbi olarak kullanılan bir ilaçtır. Dermatolojik, gastrointestinal, oftalmojik, endokrinal ve uzun süreli kullanımda nefrolojik yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Lityum karbonat (LiCO<sub>3</sub>)'nın, 16mM, 8 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM içeren konsantrasyonlu hücre kültürü ile 100µM(mikromolar) hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pozitif kontroller ve lityum karbonat içermeyen kontroller hazırlanmıştır. 24 saat MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Bu teste göre 1mM konsantrasyonda lityumun'un sitotoksik etki göstermediği, ancak artan konsantrasyonlarda lityumun etkisinin arttığı ve canlılığın azaldığı saptanmıştır. Lityum'un letal dozu (LD50) 5mM

olarak tespit edilmiş ve 36 saat sonrasında Comet Assay yöntemiyle genotoksitesini gözlemlenmeye çalışılmıştır. Konsantrasyonlar total antioksidan seviyesi yönünden kıyaslandığında, 1mM lityum karbonat verilen grup, diğer gruplara göre yüksek, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmayıp, negatif kontrole göre ise anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Pozitif kontrol ise, negatif kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre anlamlı bulunmuştur. Total oksidan seviyeleri yönünden pozitif kontrol diğer konsantrasyonlara göre istatistiksel olarak yüksek ve anlamlı çıkmıştır. Lityum verilen konsantrasyonlar negatif kontrol grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Oksidatif stres indeksi yönünden kıyaslandığında 1mM lityum kullanılan konsantrasyon, negatif kontrole göre istatistiksel olarak düşük ve anlamlı bulunmuştur. DNA aberasyonu bakımından, pozitif kontrol grubu diğer konsantrasyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek çıkmış, konsantrasyonlar birbirleri ve negatif grupla kıyaslandığında anlamlı çıkmamıştır (Adar, 2015).

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOT

Bu araştırmada ilaç, alkol gibi maddeleri kullanmayan, sigara içmeyen ve aynı yaş grubunda olan (20-24 yaşlarında), sağlıklı iki bayan ve iki erkek bireyden uzman kişilerce alınan periferik kan, materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada test maddesi olarak, genel adı Ursodeoksikolik Asit ve ticari adı Ursactive olan ilaç kullanılmıştır.

Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30.07.2015 tarih ve 2015/366 nolu kararı ile onaylanmıştır.

### 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

#### 3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

##### 3.1.1.1 Ursodeoksikolik asitin özellikleri

**Kimyasal Adı (IUPAC):** (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ )-3,7-Dihydroxycholan-24-oic acid.

**Genel Adı:** Ursodeoksikolik Asit

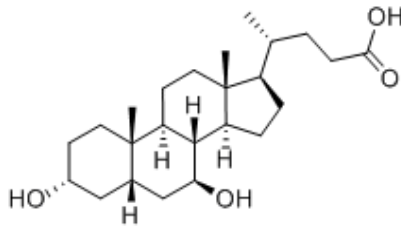
**Sinonimleri:** Ursodeoxycholic acid, Actigall, Ursosan, Urso, Urso Forte

**Ticari adı:** Ursactive

**Cas No. (Reg No.):** 128-13-2

**Kapalı Formül:** C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>

**Açık Formül:**



Şekil 3.4 UDKA'nın Formülü (Milani, 2014)

**Molekül Ağırlığı:** 392.572 g/mol

**Erime Noktası:** 203 °C

### 3.1.1.2 Etanol

Bu çalışmada etanol (Merck) lamaların temizlenmesinde kullanılmıştır.

### 3.1.1.3 Kromozom medyumu

Sağlıklı kişilerden alınan periferel kan örneklerinden *in vitro* hücre kültürünün yapılması aşamasında, Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (cat. no. F 5023) kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde, aşağıda miktarları belirtilen bileşikler bulunmaktadır:

#### Chromosome Medium B

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Yukarıda içeriği verilen Chromosome Medium B, steril kültür tüplerine 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılarak, deneylerde kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan kültür tüpleri steril olarak satın alınmıştır.

### 3.1.1.4 Kolşisin (Colchicine)

Hücre kültüründe metafaz kromozom preparatlarının hazırlanmasında, mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma Cat. No. C-9754) kullanılmıştır. Saf su içerisinde hazırlanan Kolşisin eriyiği, kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolşisinin kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir:

**Kimyasal adı:** Colchicine

**Kapalı formülü:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>

**Molekül ağırlığı:** 399.4

**Etil asetat içeriği:** % 3,4

**Kloroform içeriği:** < % 0,1

**Sigma No:** C-9754

### **3.1.1.5 Hipotonik eriyik**

Bu çalışmada hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Hipotonik eriyik bidistile suda stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı bir cam kapta ve buzdolabında +4 °C saklanmıştır. Her preparat yapım aşamasından yaklaşık 2 saat önce, buzdolabındaki stok solüsyondan yeteri miktar alınıp, 37°C'deki inkübatörde ısıtılarak kullanılmıştır.

### **3.1.1.6 Fiksatif**

Çalışmada kullanılan fiksatif, hücre kültüründen yapılan kromozom aberasyonu (KA) deneylerinde, 1 hacim glasiyel asetik asetin, 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. Kullanılmadan iki saat önce ve taze olarak hazırlanmış olan fiksatif, buzdolabında soğumaya bırakılmıştır. Yukarıdaki gibi hazırlanan soğuk fiksatif, her preparasyon işleminde kullanılmıştır.

### **3.1.1.7 Sorensen tamponu (Sorensen Buffer)**

Sorensen Tamponu, Giemsa boyasının (%5'lik) hazırlanması aşamasında kullanılan ve tampon A ile tampon B olmak üzere iki ayrı stok çözelti halinde hazırlanmıştır.

#### **Hazırlanışı:**

Tampon A: 11.34 gr  $KH_2PO_4$  250 ml saf su içinde eritilmifitir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  250 ml saf su içinde eritilmifitir (pH=9.3).

### **3.1.1.8 Giemsa (Merck)**

Kromozom preparatlarını boyamak için, Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olan Giemsa boyası, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde %5'lik boya eriyiği şeklinde hazırlanarak, kullanılmıştır.

### 3.1.1.9 Entellan (Merck)

Entellan (Merck, Cat. No. 7961), hücre kültüründen yapılmış olan preparatları, daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılmıştır.

### 3.1.1.10 Nitrik asit (HNO<sub>3</sub>)

Lamların temizlenmesi için 1 N HNO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti olarak şişede saklanarak, kullanılmıştır.

### 3.1.1.11 Mitomycin C (MMC)

Bu çalışmada, pozitif kontrol olarak Mitomycin C kullanılmıştır. Mitomycin C'nin kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir.

**Kimyasal adı:** Mitomycin C

**Kapalı formülü:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Molekül ağırlığı:** 334.327 g/mol

**Erime noktası:** 360 °C

**CAS no:** 50-07-7

## 3.1.2 Kullanılan deney ekipmanları

### 3.1.2.1 Hassas terazi

Kimyasal maddelerin tartılmasında, hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetinde olan RADWAG - AS 220/C/2 marka terazi kullanılmıştır.

### 3.1.2.2 Santrifüj

Bu çalışmada, devir hızı 4000 rpm'e kadar çıkabilen, maksimum 30 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli KA-1000 marka santrifüj kullanılmıştır.

### **3.1.2.3 İnkübatör**

Hücre kültürünün yapılması ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye kadar ısıtılmasında, ST-055 marka inkübatör kullanılmıştır.

### **3.2 Lamların Temizlenmesi**

Hücre preparatı yapımında kullanılan etiketli lamlar şaleye dizilmiş ve üzerlerine 1 N nitrik asit konmuştur. Lamlar bu şekilde, şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra lamlar, akan çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve 3-4 defa saf sudan geçirilmiştir. Sonra olarak şalede bulunan lamların üzerine saf su ile doldurulmuş ve buzdolabında saklanmıştır.

### **3.3 Sitotoksisite ve Genotoksisite Çalışmaları**

#### **3.3.1 Kromozom Anomalilerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması**

##### **3.3.1.1 Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi**

Hücre kültürü olarak, Evans'ın geliştirdiği yöntem, modifiye edilerek kullanılmıştır (Evans, 1984). Bu çalışmada, kromozom anomalilerini saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılmasında 'Kromozom Aberasyonu' testi uygulanmıştır.

Sigara, ilaç ve alkol kullanmayan, sağlıklı, 20-24 yaşları arasında iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri (0.2 mL) kromozom medyumlarına steril şartlarda ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Kan ilavesinden sonra, kültür 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Ön çalışma sonucunda belirlenen test maddesinin 3 konsantrasyonu (10, 50 ve 100 µg/mL) kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 ve 48 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Hücre kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/mL) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice

karıştırılmıştır. Kültürde bulunan hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuş ve 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 2000 devir/dk (rpm)'da 5 dk santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj yapılan kültür tüplerinin üstte kalan süpernatantı atılmış ve dipte kalan hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 mL'lik sıvıya, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik olan KCl ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar hazırlanmaktadır. Her tüpe 5 mL hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 15 dk hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk 1200 devir/dk'da santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 mL olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde, süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine alınan 4-5 damla hücre süspansiyonu daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamların üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olacak şekilde damlatılmıştır. Böylece hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine özen gösterilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

### **3.3.1.2 Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması**

Kuruyan preparatları %5'lik Giemsa boya eriyiği ile boyanması için şalelere dizilmiştir. Giemsa boyası (%5'lik); 5 mL tampon A, 5 mL tampon B, 5 mL Giemsa boyası ve 100 ml saf suya tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan boya, preparatların bulunduğu şalelere dökülerek yaklaşık olarak 20 dk bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar

boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek, preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Daha sonra preparatlar dik konumda tutularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

### **3.3.2 Kromozom anormalliği için hazırlanan preparatlarda mikroskopik inceleme**

#### **3.3.2.1 Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme**

Uygulanan maddenin hücrelerdeki sitotoksik etkisini belirlemek için, mitotik indeks (MI) hesaplanmıştır. MI'yı hesaplamak için hazırlanmış olan preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). İncelemeler her preparat için 3000 hücre sayılarak yapılmıştır. 3000 hücrede bölünen hücreler belirlenmiş ve yüzdesi alınmıştır. MI yüzdesi belirlenen preparatların verileri, SPSS 15.0 analiz programı kullanılarak bilgiler girilmiştir.

#### **3.3.2.2 Genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik inceleme**

Uygulanan maddenin genotoksik etkisini belirlemek için hazırlanan preparatlar, Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10 x 100 = 1000 büyütmede). İyi dağılmış kromozomlara sahip 100 hücre (İki bayan, iki erkek toplam dört kişiden 400 hücre) kromozom anomaliliğini (KA) saptamak amacıyla incelenmiştir. Preparatları inceleme aşamasında hücrelerde gözlenen kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment (F), disentrik kromozom (DS), sister union (SU=kardeş kromatit birleşimi) gibi yapısal KA verileri kaydedilmiştir. Yaptığımız çalışmada sayısal KA (poliploidi ve endoreduplikasyon) saptanmamıştır. Bu araştırmada 'gap' lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir.

#### **3.3.2.3 İstatistiksel analiz ve sonuçların değerlendirilmesi**

İstatistiksel analiz SPSS 15.0 for Windows programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar  $P \leq 0,05$  anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. KA'lı hücre oranları, KA'lı hücre sayıları, MI oranları 48 ve 24 saat muamele ile birlikte farkın anlamlı olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analiz-LSD Test) ile analiz

edilmiştir. Ayrıca doz-etki ilişkisi olup olmadığı regresyon ve korelasyon analizi ile belirlenmiştir.



## BÖLÜM IV

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1 Ursodeoksikolik Asit'in Kromozom Anomalileri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Ursodeoksikolik asit'in (UDKA) 10, 50 ve 100 µg/mL'lik dozları suda çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan konstrasyonlar 24 ve 48 saat süresince insan periferel kan lenfositleri ile muamele edilmiştir. UDKA ile farklı konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 µg/mL) 24 saat muamele edilen, insan periferel kan lenfositlerindeki kromozomal anormallikler ve toplam KA / hücre ile MI değerleri Çizelge 4.1 göstermiştir. 24 saat'lik muamele süresinde meydana gelen KA'liklerinin, kontrol ve pozitif kontrolle istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p \geq 0.05$ ). Ayrıca UDKA ile 24 saat muamele edilen kültürlerde yapısal KA taşıyan hücre %'si de istatistiksel olarak konsantrasyona bağlı olarak önemli bir artış göstermemiştir ( $p \geq 0.05$ ). UDKA ile 24 saat muamele edilen kültürlerde meydana gelen kromatid tipi kırklar fotoğraf 4.1 ve 4.2 de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Değişik konsantrasyonlarda Ursodeoksikolik asit'in (UDKA) ile 24 saat muamele edilmiş olan insan periferel kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri

Test maddesi	Muamele		Kromozomal Anormallikler		Toplam KA/Hücre ± SD	MI ± SD
	Süre saat	Kons. µg/ml	Kromatid tipi	Kromozom tipi		
Kontrol	--	--	12	3	0,03±0,01	6,06±1,02
MMC (PK)	24	0,125	47	22	0,17±0,04	2,89±0,04
Ursodeoksikolik asit (UDKA)	24	10	14	2	0,04±0,01	6,16±0,59
		50	13	4	0,04±0,01	5,99±0,36
		100	16	3	0,04±0,01	5,87±1,11



**Fotoğraf 4.1.** Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (10 µg/ml UDKA, 24 saat muamele, X1000)



**Fotoğraf 4.2.** Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (50 µg/ml UDKA, 24 saat muamele, X1000)

Ursodeoksikolik asit'in (UDKA) 10, 50 ve 100 µg/mL'lik suda çözülerek hazırlanan konstrasyonları, 48 saat süresince insan periferel kan lenfositleri ile muamele edilmiştir. UDKA ile farklı konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 µg/mL) 48 saat muamele edilen, insan periferel kan lenfositlerindeki kromozomal anormallikler ve toplam KA / hücre ile MI değeri Çizelge 4.2 göstermiştir. 48 saat'lik muamele süresinde meydana gelen KA'liklerinin, kontrol ve pozitif kontrolle istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar

arasında farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p \geq 0.05$ ). Ayrıca UDKA ile 48 saat muamele edilen kültürlerde yapısal KA taşıyan hücre %'si de istatistiksel olarak konsantrasyona bağlı olarak önemli bir artış göstermemiştir ( $p \geq 0.05$ ). UDKA ile 48 saat muamele edilen kültürlerde meydana gelen kromatid tipi kırklar fotoğraf 4.3 ve 4.4 de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Değişik konsantrasyonlarda Ursodeoksikolik asit'in (UDKA) ile 48 saat muamele edilmiş olan insan periferik kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri

Test maddesi	Muamele		Kromozomal Anormallikler Yapısal KA		Toplam KA/Hücre $\pm$ SD	MI $\pm$ SD
	Süre saat	Kons. $\mu\text{g/ml}$	Kromatid tipi	Kromozom tipi		
Kontrol	--	--	12	3	0,03 $\pm$ 0,01	6,06 $\pm$ 1,02
MMC (PK)	48	0,125	53	25	0,19 $\pm$ 0,04	3,12 $\pm$ 0,38
Ursodeoksikolik asit (UDKA)	48	10	17	4	0,05 $\pm$ 0,01	6,15 $\pm$ 1,41
		50	15	3	0,04 $\pm$ 0,02	6,53 $\pm$ 1,22
		100	18	4	0,05 $\pm$ 0,01	6,46 $\pm$ 0,97

#### 4.2. Ursodeoksikolik Asit'in Mitotik İndeks (MI) Üzerindeki Etkileri

Mitotik İndeks (MI) UDKA'nın mitoz bölünme üzerinde oluşturduğu etkiyi göstermektedir. UDKA'nın, mitoz bölünme üzerindeki etkisine baktığımızda, MI 24 saatlik muamelede, tüm konsantrasyonlarda (10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) kontrole ve pozitif kontrole göre önemli derecede bir azalma göstermemiştir (Çizelge 4.1). UDKA'nın mitoz bölünme üzerinde, 48 saat'lik sürede oluşturduğu etkiye baktığımızda, MI'si 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda (10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) kontrole ve pozitif kontrole göre farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



**Fotoğraf 4.3.** Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (50 µg/ml UDKA, 48 saat muamele, X1000)

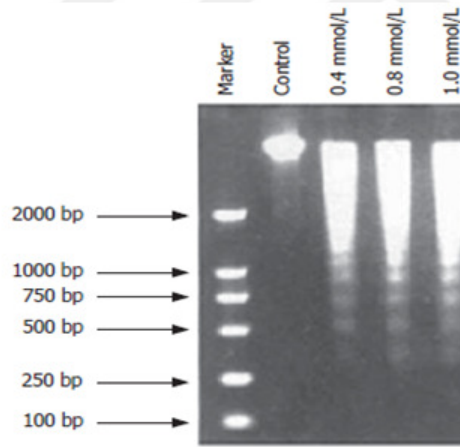


**Fotoğraf 4.4.** Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (100 µg/ml UDKA, 48 saat muamele, X1000)

#### 4.3. Tartışma

Liu ve arkadaşları (2007), UDKA'nın, insan karaciğer tümörü hücreleri üzerine apoptotik etkilerini araştırmak üzere, insan karaciğer tümörü hücre kültürü olan HepG2 ve BEL7402 ile farklı konsantrasyonlardaki UDKA'yı muamele etmişlerdir. Araştırmacılar, kontrol olarak hepatic line L-02 hücre hatlarını kullanılmışlardır. Bu çalışmada, hücre çoğalması, apoptozis ve gen ekspresyonunun tespiti için MTT (metil tiazol tetrazolyum) deneyi, akış sitometrisi, western blot, immünsitokimya, DNA ladder

deneyi ve elektron mikrokobisi teknikleri kullanılmıştır. Canlı HepG2 ve BEL7402 hücre kültürü, 0.2 ile 1.0 mmol/L konsantrasyonlu UDKA ile inhibe edilmiştir. 48 saat UDKA ile 0.92 mmol/L HepG2'nin IC50 ve 0.86 mmol/L BEL 7402 muamele etmişlerdir. Sonuç olarak, bu araştırmacılar tarafından UDKA'nın inhibisyon etkisinin doza bağlı olduğu ortaya çıkartılmıştır. UDKA'nın farklı konsantrasyonlarıyla 48 saat muamele edilen hücreler ile HepG2 ve BEL7402 baskılanan hücre oranlarıyla pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur. 48 saat'lik muamelede, apoptoz ve hücre dağılımı, UDKA'nın konsantrasyonlarına göre kontrol gruplarıyla karşılaştırılmış ve apoptozun UDKA dozuna bağlı olarak arttığı saptanmıştır. Hücre döngüsü sayısının, UDKA gruplarına göre, G0 ve G1 fazının yüksek olduğu, S ve G2-M fazının ise önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca agaroz jel elektroforeziyle, DNA, 0.4 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L UDKA konsantrasyonlarıyla değerlendirilmiştir (Fotoğraf 4.5) (Liu, 2007).



**Fotoğraf 4.5.** UDKA tarafından internukleozomal DNA'da parçalanma induksiyonu (Liu, 2007).

Sekonder safra asitlerinin, hem insan hem de deneysel modeller üzerine yapılan çalışmalarda tümör gelişimini teşvik ettiği saptanmıştır. Wali ve arkadaşları, UDKA'nın azoksimetan (AOM) kaynaklı kolon tümörünün meydana gelmesi ve meydana gelmeden öncesi etkilerini incelemek için araştırma yapmışlar ve UDKA'nın sıçanlarda azoksimetanla indüklenen kolon kanseri gelişimini engellediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, erkek fisher 344 fareler, 2x3 faktöriyel tasarımla bölünmüş, AOM veya taşıyan ve %0.4 UDKA takviyeli besinle beslenen olarak, gruplandırılmıştır. Besinler her ay taze hazırlanmış ve 4C°'de saklanmıştır. Otuz iki hafta sonra farelerde, tümör histolojisi belirlemişler ve kolonları, aberant crypt foci

(kolon astarı içinde tüp benzeri bezlerin kümelemesi) (ACF) için incelemişlerdir. Sonuç olarak kansorejenle muamele edilmiş besinle beslenen kontrol grubunun tümör insidansı %72.3 ve tümör çeşitliliğini tümör taşıyan her farede ortalama 1.9 olarak bulmuşlardır. UDKA'nın, yeni başlamış ve ilerlemiş safhadaki tümör insidansını sırasıyla %46.2 ve %38.4 ( $P<0.05$ ), tümör çeşitliliğini ise tümör taşıyan fare başına ortalama sırasıyla 1.4 ve 1.3 ( $P<0.05$ ) olarak düşürdüğün saptamışlardır. Fakat UDKA'nın, tümör boyutunu, histolojisini ve lokasyonunu değiştirmedini belirlemişlerdir (Wali vd., 2002).

Mahmoud ve arkadaşı, UDKA'nın farelerde früktoza bağlı metabolik sendromu engellediğini göstermek için bir çalışma yapmışlardır. Metabolik sendrom (MS), obezite, insülin direnci, hipertansiyon, dislipidemi ve aterosklerozla karakterize olan patolojik bir durumdur. Metabolik sendrom insidansının artmasının fruktoz tüketimiyle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışmalarla UDKA'nın antioksidan ve antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğu ve insülin direncini artıran bir steroid safra asidi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, 12 hafta boyunca, 150 mg/kg UDCA verilen farelere, 10% fruktoz içeren içme suyu içirilerek, kontrol fareleriyle karşılaştırılmış ve UDKA tedavisinin fruktozun zararlı etkilerini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca UDKA'nın vasküler dokularda ürik asit seviyesini düşürme, insülin direncini iyileştirme ve oksidatif stresi azaltma yeteneği gözlemlenmiştir. Ancak bu konuda insan üzerinde daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu da bu çalışmada belirtilmiştir (Mammoud ve Elshazly, 2014)

Fimognari ve arkadaşları (2001), insan lenfositlerinde ursodeoksikolik asidin mikronükleus indüksiyonu, hücre döngüsü gecikme ve apoptoz olarak hücrel stres belirteçlerini çalışmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada, ursodeoksikolik asit (UDKA)'nın ve tauroursodeoksikolik asit (TUDKA)'nın insan lenfosit hücreleri üzerindeki etkisine bakmışlardır. UDKA'nın 10, 30 ve 100 µg/ml dozları ile TUDKA'nın 10, 30, 100, 300 ve 1000µg/ml dozlarını kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada, UDKA'nın 100 µg/ml dozunda mikronükleusu indüklediğini fakat diğer dozlar ile TUDKA'nın dozlarının mikronükleusu oluşumunu etkilemediğini belirlemişlerdir. Biz de yaptığımız bu çalışmada, UDKA'nın uyguladığımız tüm dozlarında (10, 50 ve 100 µg/ml) kontrole göre hem MI'yı hem de KA'yı etkilemediğini belirledik. Bu ilaçla ilgili insana yönelik daha farklı genotoksik testlerin yapılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

## BÖLÜM V

### SONUÇ

Bu araştırma, Ursodeoksikolik Asit (UDKA)'nın insan periferel kan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Yaptığımız bu çalışmada, insan periferel kan lenfosit kültürüne, UDKA'nın 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonları ile 24 ve 48 saatlik iki farklı muamele süresi uygulanmıştır. Çalışmada hem sitotoksik etki, hem de genotoksik etki belirlenmiştir. Bu iki etkiyi belirlemek için uygun yöntemler kullanılarak, deney aşamasında hazırlanan hücre kültürlerinde preparatlar yapılmıştır. Yapılan preparatlarda sitotoksik etkiyi tespit etmek için mitotik indeks (MI) hesaplanmıştır. Hesaplanan MI verilerinin, istatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows kullanılmış ve sonuçlar  $P \leq 0,05$  anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Ayrıca UDKA'nın genotoksik etkisini belirlemek için de, yapılan preparatlardaki kromozomal anormallikleri (KA) ve KA'lı hücre oranları, iki farklı muamele süresinde incelenerek, ONE WAY ANOVA (Post Hoc Analiz-LSD Test) ile analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında etken madde olarak kullandığımız UDKA'nın, insan periferel kan lenfositlerine uyguladığımız dozlarda, sitotoksik ve genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca bizim yaptığımız bu çalışmaya ek olarak, ileri genotoksite testleri kullanılarak, yapılacak başka çalışmalarla, bu ilacın genotoksik etkisine dair bilgilerin güncellenmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

Adar, B., Lityum Karbonatın *In Vitro* Ortamda İnsan Lenfositlerindeki Sitotoksisite, Genotoksisite ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, **Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi**, Şanlıurfa, s.3-7, 2015.

Aksoy, H., Deneysel Koledok Kanal Tıkanıklığı Sonrası Oluşan Bakteriyel Translokasyon Üzerine Tauroursodeoksikolik asit ve Moksifloksasinin Etkisi, Uzmanlık Tezi, **Trakya Üniversitesi**, Edirne, s. 8-11, 2012.

Al, B. ve Yıldırım, C., “Bilyer Sistem Hastalıkları”, **Klinik Gelişim Dergisi** 21(4), 130, 2008.

Ası, T., Tablolarla Biyokimya, II, **Ankara Üniversitesi**, Ankara, 1999. Web: [http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders\\_Notlari/Tablolarla\\_Biyokimya/TB-Lipid\\_Metabolizmasi.pdf](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Tablolarla_Biyokimya/TB-Lipid_Metabolizmasi.pdf) adresinden 06 Haziran 2016’da alınmıştır.

Australian Government, Australian Public Assessment Report for Ursodeoxycholic asid. **Australian Government**, Australia, 2010.

Aydoğdu, S., “Kolestazda Medikal Tedavi”, **Güncel Pediatri** 4(1), s.125, 2006.

Barret, K., Brooks, H., Boitano, S. and Barman, S., “Transport & Metabolic Functions of the Liver”, **Review of Medical Physiology**, s. 482-488, 2001.

Bektaş, A., “Nonalkolik Steatohepatite Ursodeoksikolik Asit Tedavisi”, **Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası** 51(4) , s.201 , 2000.

Coşgun Dumlupınar, G., İnsan Kan Lenfositlerinde Sitrininin Mikronükleus Etkilerinin İnsan Periferik enfosit Kültüründe İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Kafkas Üniversitesi**, Kars, s.34-36, 2006.

Çağlar, V., Gönül, Y. ve Songur, A., “Pankreas Anatomisi ve Varyasyonları”, **International Journal of Clinical Research**, 2(2), s.77-82, 2014.

Çavuş, B. ve Karaca, Ç., “Safra Taşı Hastalığı”, **İç Hastalıkları Dergisi**, 20, s.151-160, 2013.

Demirci, D., Formik Asit’in Kardeş Kromatid Değişim (KKD=SCE) Oranına Sıklığı ve Mitotik İndeks Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **Erciyes Üniversitesi**, Kayseri, s.45-46, 2013.

Durgun, AV., “Safra Taşları”, **Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları**, İstanbul, s.130, 2002.

Ergün, Y. ve Ergün., Y., “Karaciğer Sirozu ve Nitrik Oksit”, **Arsiv Kaynak Tarama Dergisi** 18(2), s.93, 2009

Erol, B., Kimya Öğrencilerindeki Genotoksik etkisinin Kromozom Aberasyonu Testiyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans tezi, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde, s.20, 2010.

Evans, H.J., Kilbey, B.J., Legator, M., Nicholls, W. and Ramel, C. (Eds.), “Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Human Peripheral Blood Lymphocytes For The Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Tests”, *Elsevier Science Publishers BV*, s.405-406, 1984.

Fimognari, C., Nüsse, M., Cesari, R., Forti, G.C., and Hrelia P. “Micronuklei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes”, *Mutation Research* 495, s.1-9, 2001.

Guarino, M.P.L., Altomare, A., Cocca, S., Emerenziani, S. and Cicala, M., “Ursodeoxycholic acid therapy in gallbladder disease, a story not yet completed”, *World J Gastroenterol* 19(31), s.5029-5034, 2013.

Guyton , AC. and Hall, JE., “Secretory Functions of the Alimentary Tract”, *Textbook of Medical Physiology*, s.802, 2000.

Gülmen, M., Tıkanma sarılığı oluşturan modelde ursadeoksikolik asit ve glutaminin bakteriyel translokasyon, karaciğer fonksiyon testleri ve karaciğer histopatolojisine olan etkileri, Uzmanlık Tezi, *T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi*, İstanbul, s.23, 2005.

Hoşoşkun, Z., Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel cerrahi Kliniğinde Uygulanan Açık ve Laparoskopik Kolesistektomilerin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, *Trakya Üniversitesi*, Edirne, s.7, 2008.

Kalender, S., Kolesistektomi Sonrası Hastalarda Alakalen Reflü Gastrit Gelişimi Ve Tedavisinde Ursodeoksikolik Asitin Etkinliği, Uzmanlık Tezi, *Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, İstanbul, s.4, 2005.

Kotb, M.A., “Molecular Mechanism of Ursodeoxycholic Acid Toxicity & Side Effects: Ursodeoxycholic Acid Freezes Regeneration & Induces Hibernation Mode”, *Molecular Sciences* 13, s.8882-8914, 2012.

Kozan, B.R., Biliyer sistemin Anatomik Varyasyonlarında Manyetik Rezonans Kolonjiyopankreatografi Bulguları, Uzmanlık Tezi, *Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, İstanbul, s.5-14, 2006.

Kurt, K., Dönbak, L. ve Kayraldız, A., “Tenofovir disoproksil fumarat'ın insan lenfositlerinde genotoksik aktivitesinin incelenmesi”, *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 41(2), s.230-231, 2015.

Küçük, A., Krinik Obstruktif Sarılık Prepubertal Sıçanlarda Karaciğer Hasarı Üzerine Ursodeoksikolik Asit ve Selektif Siklooksijenaz-2 İnhibitörü Selekoksib'in Koruyucu Etkileri, Uzmanlık Tezi, *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Düzce, s.11, 2011.

Lim, AG., Jazrawi, RP. and Northfield, TC., “The ursodeoxycholic acid story in primary biliary cirrhosis”, *Gut* 37, s.301-304, 1995.

Liu, H., Oin, C.Y., Han, G.O., Xu, H.W., Meng, M. and Yang, Z., “Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines”, *World J Gastroenterol* 21 (11), s.1652-1658, 2007.

Mahmoud, A.A.A. and Elshazly, S.M., “Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Fructose-Induced Metabolic Syndrome in Rats”, *Plos One* 9(9), s.1-7, 2014.

Marin, J.G.J., “Physiology of bile secretion”, *World J Gastroenterol* 7, s.37, 2008

Marschall, H.U. and Einarsson, C., “Gallstone disease”, *Journal of Internal Medicine* 261, s.529, 2007.

Milani, M., “Ursodeoxycholic Acid (UDCA) in Biliary Diseases: A Clinical Review”, *British Journal of Medicine & Medical Research* 4(9), s.1783-1790, 2014.

Oygür, Ç.Ş. ve Selçuk, H., “Udka 2013”, *Güncel gastroentoloji* 17(3), s.248-250, 2013.

Önür, N.D. ve Beyler, A.R., “Safra Asitleri Metabolizması”, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 54 (1), s.65-76, 2001.

Rencüzoğulları E. and Topaktaş M., “The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B”, *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 5(3), s.19-24, 1991.

Salmanzade, Ş., Yöner, Ö. ve Bayraktar, Y., “Safra Taşı Hastalığı”, *Hacettepe Tıp Dergisi* 37, s.65, 2006.

“Sindirim Sistemi”, *Milli Eğitim Bakanlığı*, Ankara, s.20, 2012. <http://mtegm.meb.gov.tr/program/dokuman/modul/ANESTEZ%DD%20VE%20REAN%DDMASYON/ANATOM%DD%20VE%20F%DDZYOLOJ%DD/Sindirim%20sistemi.pdf> adresinden 05 Haziran 2016’da alınmıştır.

Songur, A., Çağlar, V., Gönül, Y. ve Özen Aslan, O., “Safra Kesesi ve Safra Yolları Anatomisi”, *Cerrahi Sanatlar Dergisi* 2(2), s.1, 2009.

Stamp, D. and Jenkins, G., “An Overview of Bile-Acid Synthesis, Chemistry and Function”, *Issues in Toxicology*, s.3, 2009.

Tok, E. ve Aslan, B., “Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri”, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi* 37(1), s.62-68, 2007.

Tümgör, G., Arıkan, Ç. ve Aydoğdu, S., “Çocukluk çağına tanınmış kolestatik hastalığı: ilerleyici ailevi intrahepatik kolestaz”, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 48, s.355-360, 2005.

Üçok, K., Mollaoğlu, H., Genç, A., Akkaya, M. ve Şener, Ü., “Safra Sistemi Fizyolojisi”, *Cerrahi Sanatlar Dergisi* 3 (1), s.1-8, 2010.

Wali R.K., Stoiber, D., Nguyen, L., Hart, J., Sitrin, M.D., Brasitius T. and Bissonnette, M., “Ursodeoxycholic Acid Inhibits the Initiation and Postinitiation Phases of Azoxymethane-induced Colonic Tumor Development”, *Cancer Epidemiology* 11, s.1316–1321, 2002.

Yıldırım, G., Aslan, H., Asar, E., Gedikbaşı, A., Güngördük, K., Şafak, I. ve Ceylan, Y., “İntrahepatik Kolestazda Gebelik Sonuçları”, *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi* 4(4), s. 250-253, 2007.



## ÖZGEÇMİŞ

Eyüp ÖZER 1983 tarihinde Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Niğde’de tamamladı. 2001 yılında girdiği Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Bölümünü 2003 yılında, 2004 yılında girdiği Anadolu Üniversitesi Kamu Yönetimi Bölümünü 2008 yılında, 2006 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2014 yılında tamamladı. 2015-2016 öğretim yılında Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Haziran 2016 yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Halen Niğde Altınhisar İlçe Devlet Hastanesinde çalışmaktadır.