

Ursodeoksikolik Asit'in İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki *in Vitro* Genotoksik Etkisi*

Songül BUDAK DİLER¹, Fikriye POLAT², Eyüp ÖZER³

ÖZET: Kenodeoksikolik asitin 7β epimeri olan ursodeoksikolik asit (UDKA), kolestatik karaciğer hastalıklarının tedavilerinde artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Ursodeoksikolik asitin, insan periferal kan lenfositlerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi hedeflendi. UDKA'nın potansiyel genotoksik ve sitotoksik etkisi, kromozom aberasyon ve mitotik indeks testleri kullanılarak *in vitro* olarak araştırıldı. İnsan periferal kan lenfositleri, 24 ve 48 saat süreyle, 10, 50 ve 100 µg/ml UDKA ile muamele edildi. Veriler SPSS istatistik programında, Tek Yönlü Anova (Post Hoc Analiz-LSD Test) testi ile analiz edildi. Elde edilen istatistik sonuçları, kontrolle karşılaştırıldığında, uygulanan UDKA konsantrasyonlarının mitotik indeks değerlerini düşürmediğini ve kromozom anomali frekanslarında da önemli bir artışa neden olmadığını göstermektedir (p>0.05). UDKA'nın insan kromozomlarında anomalileri artırmaması bulgusu, bu maddenin az da olsa insan vücudunda fizyolojik olarak üretilen bir safra asiti olması ile bağlantılı olabilir. UDKA'yı kullanan pek çok hasta olması, bu çalışmadan elde ettiğimiz bulguların önemini artırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Genotoksik etki, İnsan periferal lenfositleri, Kromozom aberasyon testi, Mitotik indeks, Ursodeoksikolik asit

In Vitro Genotoxic Effects of Ursodeoxycholic Acid in Human Peripheral Blood Lymphocytes

ABSTRACT: Ursodeoxycholic acid (UDCA), the 7β epimer of chenodeoxycholic acid has been increasingly used for the treatment of cholestatic liver diseases. In this study, it was aimed to determine the potential *in vitro* genotoxic effects of ursodeoxycholic acid in human peripheral blood lymphocytes. The potential genotoxic and cytotoxic effects of UDCA were investigated *in vitro* by using chromosome aberration and mitotic index assays. Human peripheral blood lymphocytes were treated with 10, 50 and 100 µg/ml of UDCA for 24 and 48 hours. The data were evaluated using one-way ANOVA (Post Hoc Analysis-LSD Test) test in the SPSS statistics program. Statistical results showed that the applied doses of UDCA did not cause a significant increase in chromosome aberration frequency, and also it did not cause a significant decrease in mitotic index when compared to the control (p>0.05). The finding that UDCA does not cause an increase in chromosomal aberrations may be related to the production of this substance physiologically as bile acid in the human body, even in trace amount. The fact that there are many patients using UDCA increases the importance of findings obtained from this study.

Keywords: Chromosome aberration test, Genotoxic effect, Human peripheral lymphocytes, Mitotic index, Ursodeoxycholic acid

¹ Songül BUDAK DİLER (0000-0002-7156-583X), Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde, Turkey

² Fikriye POLAT (0000-0002-5414-2501), Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kocaeli, Turkey

³ Eyüp ÖZER (0000-0001-8132-3247), Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Niğde, Turkey

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Songül BUDAK DİLER, budakdiler@gmail.com

* Bu çalışma; 11-13 Mayıs 2017'de Kayseri'de düzenlenen Ekoloji 2017 Uluslararası Sempozyum'unda, Sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Ursodeoksikolik asit (UDKA), bazı memelilerde (örn. ayı, kunduz, insan) bulunan fizyolojik bir safra asitidir (Pusul and Beuers, 2006). İnsanda bağırsak bakterileri tarafından kenodeoksikolik asitin 7 β -epimerizasyonu ile oluşturularak, safra asidi havuzunda %3 oranında bulunmaktadır (Beuers et al., 1998; Kotb, 2009). UDKA'nın karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanımı, geleneksel Çin tıbbının Tang Hanedanlığı dönemine kadar uzanmaktadır (Guarino et al., 2013). UDKA, 20. yüzyılın başında İsveçli bir araştırmacı olan Hammarsten tarafından kutup ayısının safrasında tespit edilmiş ve bu safra asiti ilk olarak ursokoleneik asit olarak isimlendirilmiştir. 1927 yılında ise Japon Shoda adlı bilim insanı tarafından kristalize edilerek, ursodeoksikolik asit adı verilmiş ve yapay olarak üretilmeye başlanmıştır (Makino and Tanaka, 1998; Guarino et al., 2013).

Hidrofilik dihidroksi safra asiti olan UDKA'nın kimyasal yapısı: 3 α , 7 β -dihidroksi-5 β -kolanolik asit şeklindedir (Pusul and Beuers, 2006). Bu ilaç, 1970'den itibaren kolestatik karaciğer hastalıklarında kullanılmış ve 1980'den sonra endikasyonları üzerine araştırmalar yapılarak, tedavideki etkinliği ve güvenilirliği teyit edilerek, dünyada kullanımı yaygınlaşmıştır (Makino and Tanaka, 1998; Hofman, 2011).

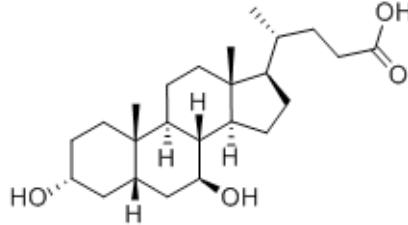
Ağız yoluyla alınan UDKA'nın yaklaşık %90'nının ince bağırsakta absorbe edildiği, absorpsiyonu takiben portal vene girdiği ve enterohepatik dolaşım süresince kenodeoksikolik asite (KDKA) dönüştürüldüğü belirlenmiştir. (Owen et al., 1988; Beuers et al. 1998; Salvioli et al., 1983). UDKA'nın bakterial enzimatik tepkimeye maruz kalarak, 7 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (7 β -HSDH) ile 3 α -hidroksi-5 β -7-okso-kolanolik asit (7KLA)'e oksitlendiği ve oluşan 7KLA'nın ise ya kolonik flora (Higashi et al., 1978; Owen et al., 1988) ya da sitokrom P450-bağımlı karaciğer enzimleri aracılığı ile KDKA'ya redüklendiği tespit edilmiştir (Owen et al., 1988; Kotb, 2009). UDKA'nın ayrıca kolonik bakteriler aracılığı ile litokolik asite dehidrosillenebildiği ve litokolik asitin de daha sonra feçes ile atıldığı saptanmıştır (Owen et al., 1988; Dodo et al., 1984).

UDKA ilaç olarak, kolesterole bağlı safra taşları, primer bilier siroz (PBS), primer sklerozan kolanjit

(PSK), akut viral hepatit, kronik hepatitler, siroz, kolon kanseri ve gebelik kolestazının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Glantz et al 2005; Hofmann and Hagey, 2008; Song et al., 2011). Opak beyaz kapsül ya da süspansiyon şeklinde hastalara verilen ve hastalığın durumuna göre yıllarca kullanılabilen UDKA'nın tedavi edici etkisinin yanısıra diare, ateş, kolanjit, hepatit, karaciğer yetmezliği, pnömoni, konvülsiyon ve mutajenik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Kotb 2009; Lindor et al., 2009; Burnat et al., 2010). Son yıllarda yapılan bir araştırmada, UDKA'nın DNA onarımı, koenzim A, siklik AMP, p53, fagositoz ve nitrik oksit sentataz indüksiyonunu inhibe ettiği ortaya çıkartılmıştır (Kotb, 2012). Ayrıca Fimognari et al., (2001) tarafından UDKA'nın insan lenfositlerinde apoptoz ve mikronükleus oluşumu üzerine yaptıkları bir araştırmada belirli bir dozun üzerinde potansiyel olarak genotoksik olabileceği saptanmıştır. İnsan periferik kan lenfositlerinde UDKA'nın kromozom anomalilerine neden olup olmadığı ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle biz de çalışmamızda, insanda çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak ve sürekli kullanılan UDKA'nın insan kromozomlarında anomali yapıp yapmadığını, insan periferik kan lenfositlerinde kromozom aberasyon (KA) testi ve mitotik indeks (MI) yöntemlerini kullanarak araştırmayı uygun bulduk. Yaptığımız bu çalışma, hem UDKA'yı kullanan insanların ilaca olan güvenlerini arttıracak hem de bilimsel alandaki önemli bir boşluğu dolduracaktır.

MATERYAL VE METOT

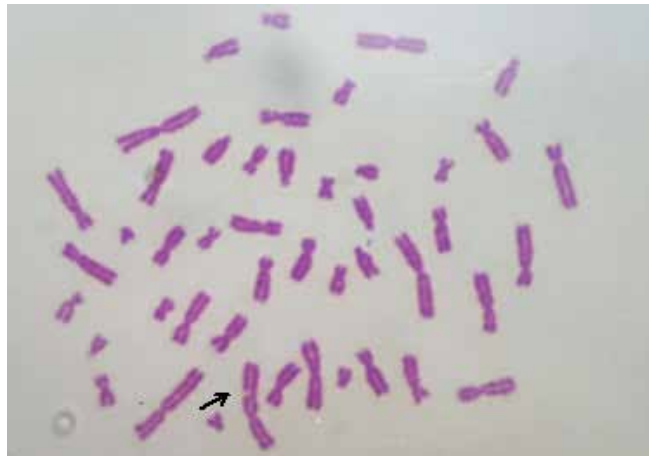
Bu araştırmada ilaç, alkol gibi maddeleri kullanmayan, sigara içmeyen ve aynı yaş grubunda olan (20-24 yaşlarında), sağlıklı iki bayan ve iki erkek bireyden uzman kişilerce alınan periferik kan, materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada test maddesi olarak, genel adı ursodeoksikolik asit ve ticari adı Ursactive (Pharmactive ilaç san. ve Tic. A.Ş., Tekirdağ, Türkiye) olan moleküler grade olmayan ilacın, suda hazırlanmış solüsyonları kullanılmıştır. Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30.07.2015 tarih ve 2015/366 nolu kararı ile onaylanmıştır. UDKA'nın kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir.

Kimyasal Adı (IUPAC): (3 α ,5 β ,7 β)-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:** C₂₄H₄₀O₄**Açık Formül:****Molekül Ağırlığı:** 392.572 g/mol**Erime Noktası:** 203 °C

Evans et al., (1984) kullandığı protokol esas alınarak, kromozom aberasyonu testi için preparatlar hazırlanmıştır. Litaratüre göre (Fimognari et al., 2001) belirlenen test maddesinin suda çözülerek hazırlanan 3 farklı konsantrasyonu (10, 50 ve 100 μ g/ml) kültür ortamına 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 0.06 μ g/ml kolşisin eriyiği ilave edilmiştir. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde, tüpler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üstte kalan süpernatant atılmış ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvıya, hipotonik eriyik (%0,4 KCl) ilave edilerek, hücreler 37°C'de 15 dk muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler tekrar 1200 rpm'de santrifüj edilerek, her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiş ve bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmış ve son santrifüjden sonra dipte kalan hücre süspanسیونundan preparatlar hazırlanmıştır. Bu

şekilde hazırlanan preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve %5'lik Giemsa boya eriyiği ile 20 dk boyanmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak, mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

Test maddesinin hücrelerdeki sitotoksik etkisini belirlemek için MI hesaplanmıştır. MI'yi belirlemek için çalışılan her bir kişinin her konsantrasyonuna ait preparatlarda toplam 3000 hücre incelenmiş ve mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir. Ayrıca maddenin genotoksik etkisinin belirlenmesi için de, iyi dağılmış kromozomlara sahip 100 hücrede (iki bayan, iki erkek toplam dört kişiden 400 hücre) KA'lar saptanmıştır. Preparatların incelenme aşamasında, hücrelerde gözlenen kromatid kırığı (Şekil 1), kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, sister union (kardeş kromatid birleşimi) gibi yapısal KA verileri ayrı ayrı kaydedilmiştir. Bu çalışmada inceleme sırasında sayısal KA (poliploidi ve endoreduplikasyon) saptanmamış ve 'gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 1. Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı (50 μ g/ml UDKA, 24 saat muamele, X1000)

İstatistiksel analiz SPSS 15.0 Windows programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Yapısal KA'lar ve MI değerleri ile 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde farkın önemli olup olmadığı Tek Yönü Anova (Post Hoc Analiz-LSD Test) ile analiz edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

İnsan periferel kan lenfositleri, UDKA'nın literatüre (Fimognari et al., 2001) göre belirlenen 10, 50 ve 100

$\mu\text{g/ml}$ 'lik suda çözülerek hazırlanmış konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat süresince muamele edilmiştir.

UDKA'nın 3 farklı konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen insan periferel kan lenfositlerindeki yapısal KA, toplam KA/hücre ile MI değerleri Çizelge 1'de göstermiştir.

Uygulanan muamele süresinde (24 saat) meydana gelen KA'lar, kontrol ve pozitif kontrol (Mitomisin C; MMC) ile karşılaştırıldığında gruplar arasında farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 1. Değişik konsantrasyonlarda UDKA ile 24 saat muamele edilmiş olan insan periferel kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri*

Test maddesi	Muamele		Kromozomal Anomaliler 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)	24	0.125	47	22	0.17 \pm 0.04	2.89 \pm 0.04
UDKA	24	10	14	2	0.04 \pm 0.01	6.16 \pm 0.59
		50	13	4	0.04 \pm 0.01	5.99 \pm 0.36
		100	16	3	0.04 \pm 0.01	5.87 \pm 1.11

*Toplam 400 hücre incelendi. KA; Kromozomal anomaliler, MI; Mitotik indeks, MMC; Mitomisin C, PK; Pozitif kontrol, UDKA; Ursodeoksikolik asit.

İnsan periferel kan lenfositleri, UDKA'nın 10, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonları ile 48 saat süresince muamele edilmiş ve yapısal KA, toplam KA/hücre ile MI değerleri Çizelge 2'de göstermiştir. Uygulanan

48 saatlik muamele süresinde meydana gelen KA'lar, kontrol ve pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında gruplar arasında farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 2. Değişik konsantrasyonlarda UDKA ile 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel kan lenfositlerindeki kromozom anomalileri*

Test maddesi	Muamele		Kromozomal Anomaliler 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
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

*Toplam 400 hücre incelendi. KA; Kromozomal anomaliler, MI; Mitotik indeks, MMC; Mitomisin C, PK; Pozitif kontrol, UDKA; Ursodeoksikolik asit.

UDKA'nın mitoz bölünme üzerindeki etkisini tespit etmek için MI hesaplanmıştır. Bu test maddesinin mitoz bölünme üzerindeki etkisine baktığımızda, hem 24 saatlik hem de 48 saatlik muamele sürelerinde, tüm konsantrasyonlarda (10, 50, 100 µg/ml) kontrol ve pozitif kontrole göre farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 1 ve Çizelge 2).

Dihidroksi safra asiti olan UDKA'nın kronik kolestatik karaciğer hastalıklarının tedavisinde artan bir şekilde kullanıldığı ve ayrıca immün modülatör özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Roma et al., 2011). Çeşitli karaciğer hastalıklarında etkili antioksidan terapi olarak önerilen UDKA'nın gastroözofagal varislerin gelişimini geciktirdiği ve PBS'li hastalarda uzun süreli sağ kalımı sağladığı gösterilmiştir (El-Sherbiny et al., 2009; Liu et al., 2007).

UDKA toksisitesi ile moleküler mekanizmaları ve yan etkileri üzerine yapılan bir derlemede, UDKA'nın biyolojik olarak litokolik asite dönüştüğü ve bu asitin de DNA zincir kırıklarına neden olduğu rapor edilmiştir (Kotb, 2009). Bu araştırmaya göre UDKA'nın, sitotoksik ve antiproliferatif olduğu, ayrıca immün sistemi baskıladığı ve P53'ü inhibe ettiği de bildirilmiştir (Kotb, 2009). Kotb'un aksine bazı bilim adamları araştırmalarında, UDKA'nın hepatotoksisiteyi azaltacağını ve karaciğer koruyucusu olarak rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Galle et al., 1990; Ishizaki et al. 2005; Lukivskaya et al., 2006).

Deney hayvanlarında UDKA konjugatlarının; kolik asit konjugatları ile deoksikolik asit ve litokolik asitin neden olduğu ve karaciğer hasarı ile kolestazi engellediği rapor edilmiştir. Ayrıca yapay ya da biyomembranların milimolar düzeyde hidrofobik safra asitlerine maruz bırakıldıklarında, UDKA konjugatlarının membranı stabilize edici etkiye sahip olduğu da ifade edilmiştir (Beuers et al. 1998). İntrahepatik gebelik kolestazi (İGP), gebeliğin ilerleyen dönemlerinde annede kaşıntı ve sarılıkla karakterize, erken doğum ve ölü doğum riski bulunan nadir bir hastalık olup, gebelik süresince UDKA ile tedavi olan kadınların çocuklarında herhangi bir yan etki rapor edilmemiştir. UDKA gebeliğin üçüncü trimestrisinde İGP'de güvenli bir tedavi edici olarak düşünülmesine rağmen UDKA tedavisi tavsiye edilmeden önce daha kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğu rapor edilmiştir (Beuers et al. 1998).

UDKA'nın hücre koruyucu etkisinin, olasılıkla membranları koruma yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Heumen and Bajaj, 1994). Nitekim UDKA'nın, *in vitro* olarak, izole edilmiş insan hepatosit

safrakanal membranında, kenodeoksikolik asit ile çözülen kolesterol ve fosfolipid miktarını düşürdüğü bulunmuştur (Lim et al., 1995). Bu çalışmada UDKA'nın daha çok hidrofobik asitlerle temas ettiği ve böylece polariteyi düşürdüğü, ayrıca membranlara bağlanarak, membranların akıcılığını ve stabilitesini etkileyebildiği ileri sürülmüştür (Lim et al., 1995).

Yeni safra asit türevlerinin insan göğüs karsinom hücrelerinde p53'ten bağımsız bir yolla apoptozu uyardığı belirtilmiştir (Im et al., 2001). Aynı şekilde başka bir çalışmada da, UDKA'nın apoptoz ve proliferasyon inhibisyonunu uyararak insan hepatomasını önlemek ve tedavi etmek için kimyasal bir ajan olarak kullanılabilirliği önerilmiştir (Liu et al., 2007). Fimognari et al., (2001), insan lenfositlerinde UDKA'nın mikronükleus indüksiyonu, hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücrel stres belirteçlerini çalışmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada, 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 1000 µg/ml dozlarını kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada, UDKA'nın 100 µg/ml dozunda mikronükleusu indüklediğini fakat diğer dozlar ile TUDKA'nın dozlarının mikronükleus oluşumunu etkilemediğini belirtmişlerdir. Biz de yaptığımız bu çalışma ile UDKA'nın uyguladığımız tüm dozlarında (10, 50 ve 100 µg/ml) kontrole göre hem MI'yı hem de KA'yı etkilemediğini belirledik.

Kotb, (2009) ve Fimognari et al. (2001) tarafından yapılan araştırmalarda UDKA'nın genotoksik etkileri olabileceği bildirilmesine rağmen insan periferik kan lenfositlerinde *in vitro* olarak yaptığımız bu çalışmada, herhangi bir sitotoksik ve genotoksik etki bulamadık. Yıllarca bu ilacı kullanmak zorunda olan hastalar açısından düşünüldüğünde tarafımızca bulunan sonuçlar sevindiricidir.

Sonuç olarak, test maddesi olarak kullandığımız UDKA'nın, uyguladığımız dozlarda insan periferik kan lenfositlerinde, sitotoksik ve genotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Ayrıca gelecekte, ileri genotoksite testleri kullanılarak yapılacak başka çalışmalarla, bu ilacın genotoksik etkisine dair bilgilerin güncellenmesi önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FEB 2016/06-HIDEP).

KAYNAKLAR

- Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G, 1998. Ursodeoxycholic Acid in Cholestasis: Potential Mechanisms of Action and Therapeutic Applications. *Hepatology*, 28(6): 1449-1453.
- Burnat G, Majka J, Konturek PC, 2010. Bile acids are multifunctional modulators of the Barrett's carcinogenesis. *J. Physiol. Pharmacol.*, 61: 185-192.
- Dodo M, Owen RW, Thompson MH, Hill MJ, 1984. A comparison of the effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid treatment on faecal bile acid profiles in healthy subjects. *Biochem. SOC. Trans.*, 12: 862-863.
- El-Sherbiny GA, Taye A, Abdel-Raheem IT, 2009. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of hepatotoxicity caused by amoxicillin-clavulanic acid in rats. *Ann Hepatol.*, 8(2):134-40.
- Evans HJ, Kilbey BJ, Legator M, Nicholls W, Ramel C (1984) Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Human Peripheral Blood Lymphocytes for The Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Tests. Elsevier Science Publishers, BV, 405-406.
- Fimognari C, Nüsse M, Cesari R, Forti GC, and Hrelia P, 2001. Micronuklei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes. *Mutation Research*, 495: 1-9.
- Galle PR, Theilmann L, Raedsch R, Otto G, Stiehl A, 1990. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology*, 12 (3 Pt 1):486-91.
- Glantz L, Avramovich A, Trembovler V, Gurvitz V, Kohen R, Eidelman LA, Shohami E, 2005. Ischemic preconditioning increases antioxidants in the brain and peripheral organs after cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 192: 117-124.
- Guarino MPL, Altomare A, Cocca S, Emerenziani S, Cicala M, 2013. Ursodeoxycholic acid therapy in gallbladder disease, a story not yet completed. *World J Gastroenterol*, 19(31): 5029-5034.
- Heuman DM, Bajaj R, 1994. Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol-rich membranes by bile salts. *Gastroenterology*, 106: 1333-41.
- Higashi H, Setoguchi T, and Katsuki T, 1978. Interconversion between chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid in anaerobic cultures of intestinal bacteria and reduction of 7-ketolithocholic acid to both bile acids. *Acta Hepatol. Jpn.* 19: 803.
- Hofmann AF, 2011. Herbert Falk: a vital force in the renaissance of bile acid research and bile acid therapy. *Dig Dis. Sci.*, 29: 23-3.
- Hofmann AF, Hagey LR, 2008. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 2461-2483.
- Im EO, Choi YH, Paik KJ, Suh H, Jin Y, Kim KW, Yoo YH, Kim ND, 2001. Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett*, 163: 83-93.
- Ishizaki K, Imada T, Tsurufuji M, 2005. Hepatoprotective bile acid 'ursodeoxycholic acid (UDCA)' Property and difference as bile acids. *Hepato Res.*, 33(2):174-7.
- Kotb MA, 2009. Ursodeoxycholic acid in neonatal hepatitis and infantile paucity of intrahepatic bile ducts: Review of a historical cohort. *Dig. Dis. Sci.*, 54: 2231-2241.
- Kotb MA, 2012. Molecular Mechanism of Ursodeoxycholic Acid Toxicity & Side Effects: Ursodeoxycholic Acid Freezes Regeneration & Induces Hibernation Mode. *Molecular Sciences*, 13: 8882-8914.
- Lim AG, Jazrawi RP, Northfield TC, 1995. The ursodeoxycholic acid story in primary biliary cirrhosis. *Gut*, 37 (3): 301-304.
- Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VAC, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, Harnois D, Jorgensen R, Petz J, Keach J et al., 2009. High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing Cholangitis. *Hepatology*, 50: 808-814.
- Liu H, Oin CY, Han GO, Xu HW, Meng M, Yang Z, 2007. Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol*, 13 (11): 1652-1658.
- Lukivskaya O, Zavodnik L, Knas M, Buko V, 2006. Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis. *Adv Med Sci.*, 51:54-9.
- Makino I, Tanaka H, 1998. From a choleric to an immunomodulator: Historical review of ursodeoxycholic acid as a medicament. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13: 659-664.
- Owen RW, Wait R, Bilton RF, 1988. Biotransformation of ursodeoxycholic acid by *Pseudomonas* sp NCIB 10590. *Journal of Lipid Research*, 29: 459-468.
- Pusl T, Beuers U, 2006. Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol*, 12(22): 3487-3495.
- Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, 2011. Sánchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid In cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond)*, 121(12):523-44.
- Salvioli G, Salati R, Lugli R, Zanni C, 1983. Medical treatment of biliary duct stones: effect of ursodeoxycholic acid administration. *Gut*, 24: 609-614.
- Song P, Zhang Y, and Klaassen CD, 2011. Dose-Response of Five Bile Acids on Serum and Liver Bile Acid Concentrations and Hepatotoxicity in Mice. *Toxicological Sciences*, 123(2): 359-367.