



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



RATLARDA SODYUM FLORİD İLE OLUŞTURULAN
HEPATOTOKSİTE VE OKSİDATİF STRESTE
SİLİMARİN'İN KAN VE DOKU PARAMETRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Efe KURTDEDE

BİYOKİMYA ANABİLİMDALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hilal KARAGÜL

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA SODYUM FLORİD İLE OLUŞTURULAN
HEPATOTOKSİTE VE OKSİDATİF STRESTE
SİLİMARİN'İN KAN VE DOKU PARAMETRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Efe KURTDEDE

BİYOKİMYA ANABİLİMDALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hilal KARAGÜL

İkinci Danışman
Doç. Dr. Mert PEKCAN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma programınca 17L0239001
proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,
Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'Ratlarda Sodyum Florid ile Oluşturulan Hepatotoksite ve Oksidatif Streste, Silimarin'in Kan ve Doku Parametreleri Üzerine Etkileri' başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Efe KURTDEDE

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi Efe KURTDEDE tarafından hazırlanan 'Ratlarda sodyum florid ile oluşturulan hepatotoksite ve oksidatif strese, silimarin'in kan ve doku parametreleri üzerine etkileri' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından doktora tezi olarak OY ÇOKLUĞU / OY BİRLİĞİ ile kabul / ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

04.01.2019

İmza

Prof. Dr. Hilal KARAGÜL

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Nihat MERT

Üye

İmza

Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ

Üye

İmza

Prof. Dr. Tevhide SEL

Üye

İmza

Prof. Dr. Gülcan AVCI

Üye

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	
1.1 Flor bileşikleri	1
1.2 Florun doğada bulunuşu	2
1.3 Endüstriyel flor kirliliği	4
1.4 Flordan yararlanılan alanlar	4
1.5 Florun neden olduğu zararlar	6
1.6 İnsanlarda florozis	7
1.7 Hayvanlarda florozis	8
1.8 Türkiye’de yapılan florozis çalışmaları	9
1.9 Florun özellikleri ve dokulara etkisi	11
1.10 Ratlarda çeşitli antioksidanların hepatotoksite durumuna etkileri	13
1.11 Silimarin’in antioksidan etkisi	13
1.12 Oksidatif stres göstergesi hücre proteinleri	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1 Gereç	
2.1.1 Deney hayvanı	16
2.1.2 Kimyasal maddeler	16
2.1.3 Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	17
2.2. Yöntem	17

2.2.1 Etik	17
2.2.2 Deney gruplarının oluşturulması ve deney protokolü	18
2.2.3 Morfometrik parametreler	20
2.2.4 Karaciğer fonksiyon testleri	20
2.2.5 Oksidatif stres parametreleri	20
2.2.5.1 Glutasyon peroksidaz aktivite tayini	21
2.2.5.2 Süperoksit dismutaz aktivite tayini	23
2.2.5.3 MDA düzeyinin tayini	25
2.2.6 Bradford Yöntemi ile doku protein miktarı tayini	27
2.2.7 SDS-PAGE ile karaciğer doku proteinlerinin ayırımı	27
2.2.8 Western blotting	29
2.2.9 Histopatolojik inceleme	30
2.3 İstatistik hesaplamalar	31
3. BULGULAR	
3.1 Morfometrik bulgular	32
3.2 Klinik bulgular	33
3.3 Oksidatif strese işaret eden bulgular	33
3.4 Karaciğer fonksiyon testleri	36
3.5 Western blotting bulguları	37
3.6 Histopatolojik bulgular	40
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
ÖZET	57
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	61
EKLER	
EK-1 Etik Kurul Kararı	71
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖNSÖZ

Flor, yeryüzünde doğal kaynaklarda, endüstriyel atıklarda ve günlük yaşamda kullanılan çeşitli maddelerde bulunmaktadır. Florun metabolizmaya az ya da çok miktarda katılımı flor içeren maddelere maruz kalma, flor yoğunluğu, yoğun olarak az zaman dilimi içerisinde veya uzun süreler maruz kalınması etkileri bakımından önemlidir. Endüstriyel başta olmak üzere flor içeriği bulunan maddeler ile sık maruziyet veya flor bulunan maddelerle fazla temas ile etkileri ve toksite görülür.

Bu çalışmada; ratlarda ağızdan verilen sodyum floridin neden olduğu Flor toksikasyonunda, karaciğerde oluşan morfolojik, histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile silimarin'in sağaltıcı ve koruyucu etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Sonuç olarak; ratlarda sodyum florid'in karaciğerde neden olduğu yıkımın düzeyi ve silimarin'in karaciğer yıkımını önleyici ve sağaltıcı etkileri; karaciğer fonksiyon testleri, oksidatif stres parametrelerinin ölçümü ve Bax, Kaspaz-3, Nox4, p38 MAPK, Hsp60 ve Hsp27 protein düzeyleri "Western Blotlama Yöntemi" ile araştırıldı.

Tez çalışmamın konusunu belirlememde, çalışmanın yürütülmesinde ve doktora eğitimim süresinde yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam danışmanım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Hilal Karagül'e, ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Mert Pekcan'a tez izleme komitesinde bulunan hocalarım Prof. Dr. Arif Altıntaş'a, Prof. Dr. Gülcan Avcı'ya Doç. Dr. Görkem Kısmalı'ya, Biyokimya Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Berrin Salmanoğlu'na, Prof. Dr. Tevhide Sel'e, Prof. Dr. Hamdi Uysal'a Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan hocalarım Prof. Dr. Rıfkı Hazıroğlu ve Araştırma Görevlisi Kürşat Filikçi'ye, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Sefa Gürcan'a ve Araş. Gör. Ufuk Kaya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, desteği hep yanımda olan değerli anneme, babama, kardeşime ve eşime teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
°C	Derece Santigrat
F	Flor
Hsp	Isı şok proteini
SF	İçme suyu içinde 30 gün sodyum florid ve silimarin verilen grup
T	İçme suyu içinde 30 gün süreyle sodyum florid verilmesinin tamamlanmasından sonra'ın 10 gün silimarin verilen grup
kg	Kilogram
km	Kilometre
l	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
MAPK	Mitojen Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MDA	Malondialdehit
nm	Nanometre
NRC	National Research Council
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
PVDF	Polivinilidene diflorit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
K	Sadece içme suyu verilen grup (kontrol)
S	Sadece silimarin verilen grup
F	Sadece sodyum florid verilen grup
SM	Silimarin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi
U	Ünite

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Florozis'in neden olduğu mandibula ve diş lezyonları	9
Şekil 1.2. Silimarin' in kimyasal yapısı	13
Şekil 2.1. Deney hayvanı ünitesi	18
Şekil 2.2 SOD tayininin şematik gösterilmesi	23
Şekil 2.3 Kolorimetrik SOD standart eğrisi	24
Şekil 2.4 Kolorimetrik MDA standart eğrisi	27
Şekil 2.5 SDS-PAGE için ticari firma tarafından geliştirilmiş renk korumalı protein standart karışımı	29
Şekil 3.1. Çalışma gruplarına göre ratların karşılaştırmalı karaciğer ağırlığı (g) ortalama değerleri	33
Şekil 3.2. Gruplara göre ratların karşılaştırmalı karaciğer SOD ortalama değerleri	35
Şekil 3.3. Gruplara göre ratların karşılaştırmalı karaciğer MDA ortalama değerleri	35
Şekil 3.4. Gruplara göre ratların karşılaştırmalı karaciğer GSH-Px ortalama değerleri	36
Şekil 3.5. Gruplara göre Western Blotting Bax, Hsp 60, Kaspaz 3, Hsp 27, p38 MAPK, Nox 4, Beta actin bantları	38

Şekil 3.6. Ratların gruplara göre karşılaştırmalı karaciğer protein ekspresyon düzeyleri (Western Blotting verileri). Gruplarda her protein (Hsp 60, Nox 4 ve Bax) kendi arasında karşılaştırıldı. 39

Şekil 3.7. Ratların gruplara göre karşılaştırmalı karaciğer protein ekspresyon düzeyleri (Western Blotting verileri). Gruplarda her protein (Kas-3, p38a ve Hsp-27) kendi arasında karşılaştırıldı. 39

Şekil 3.8. Hafif şiddette dejenere hepatosit (ok başı), HE boyama (Kontrol grubu) 41

Şekil 3.9. Yangısal hücre infiltrasyonu (oklar), dejeneratif hepatositler (ok başları) ve düzensiz remak kordonları (R). HE boyama (Flor grubu). 42

Şekil 3.10. Düzensiz Remak kordonları (R), yangısal hücre infiltrasyonları (ok), ve dejeneratif hepatositler (ok başları). HE boyama (Silimarin + flor grubu) 43

Şekil. 3.11 Dejenere hepatositler (ok başları), şişkin Kupffer hücreleri (oklar) ve düzensiz Remak kordonları (R). HE boyama (Silimarin grubu) 44

Şekil 3.12 Hafif şiddette dejenere hepatositler (ok başı), portal bölgede hafif şiddette yangısal hücre infiltrasyonu (oklar) ve şişkin Kupffer hücreleri (kalın oklar). HE boyama (Tedavi grubu) 45

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Türkiye’de yapılan florozis çalışmaları	10
Çizelge 2.1. Tezde Yararlanılan Kimyasal maddeler	16
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	17
Çizelge 2.3. Deneme boyunca ratlara verilen standart yem içeriği	18
Çizelge 2.4 Çalışma grupları ve uygulanan işlemler	19
Çizelge 2.5 Kolorimetrik SOD çalışma standart çözeltileri	24
Çizelge 3.1. Gruplara göre ratların karaciğer ağırlığı ve serum protein ortalama değerleri	33
Çizelge 3.2. Gruplara göre ratların karaciğer SOD, MDA, Glutasyonperoksidaz düzeyleri	34
Çizelge 3.3. Gruplara göre ratların ALT ve AST değerleri	36
Çizelge 3.4. Karaciğer örnekleri mikroskopik inceleme sonuçları	46

1. GİRİŞ

Flor (F) atom numarası 9 olup halojen grubunun ilk elementidir. Atom ağırlığı 19, yoğunluğu 1,265'dir. Yüksek kimyasal reaktiviteye sahip olduğundan tüm elementlerle bileşikler oluşturur. Florun fazla reaktif olmasının nedeni oluşturduğu bağlarının kolay kopmasıdır. Flor ortaklanmış elektronları sayesinde metallerle ($-F$) şeklinde bileşikler yapabilir. Pek çok maddeye karşı, (cam, metal, su gibi) çok reaktiftir (Atkins ve ark., 2010).

Flor, ilk kez 1529'da Georgius Agricola tarafından kalsiyum florit olarak tanımlanmıştır. Fransız Henri Mouissan 1886'da potasyum hidrojen florürün susuz hidrojen florür içindeki çözeltisini elektroliz ederek floru element formunda elde etmiştir. Flor bugün de elektroliz ile elde edilmektedir (House, 2013).

1.1. Flor bileşikleri

Flor sıklıkla halojen grubu elementler başta olmak üzere pekçok element ile bileşik oluşturur. Başlıca yaptığı bileşikler ClF_3 , ClF_5 , BrF_3 , IF_5 ve IF_7 , OF_2 , $O_2 F_2$, $O_3 F_2$ ve $O_4 F_2$ 'dir. Flor inorganik maddeler ile de bileşikler oluşturur. Bunlardan bazıları uranyum hekzaflorür (UF_6), sülfür hekzaflorür (SF_6) antimon florürler (SbF_3 , SbF_5), bor triflorür (BF_3), kükürt tetraflorür (SF_4) ve halojen florür'dür. Organik florürler olarak özellikle karbon ile (CF_4 ve $C_7 F_{16}$) oluşturduğu bileşikler bilinmektedir (Atkins ve ark., 2010; House, 2013).

1.2. Florun doğada bulunuşu

Flor oldukça reaktif bir gaz olduğundan doğada serbest halde değil, flor tuzları (florit) şeklinde bulunur (NRC, 2006). Başlıca flor tuzları kalsiyum florit- CaF_2 (fluorspat), sodyum aluminium florit- Na_3AlF_6 (kriyolit, buz taşı) ve kalsiyum florofosfat- $\text{CaF}_2 \cdot \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Fluoroapatit)'tir. Kriyolit Grönland'da bol bulunurken fluorspat'a dünyanın pek çok bölgesinde rastlanır (House, 2013; Radositits ve ark., 2006).

Flor kompleksleri doğada toprak içeriğinde, kayaların yapısında, çıkarılan kilde, kömürün yapısında, su ve havada iyonlar şeklinde ve bileşikler oluşturmuş halde bulunur. Florun kriyolit, apatit, mika, topaz ve tourmalin gibi elementler içinde bulunuşu buna örnektir (Barbier ve ark., 2010). Flor kayalarda fosfatla birlikte bulunur (Radositits ve ark., 2006).

Toprak yaklaşık 330 (150-400) ppm flor içerir. Bu miktar bazı toprak örneklerinde 1000 ppm, kontamine topraklarda 3500 ppm düzeyindedir. Topraktaki florun eriyebilirliği içerdiği miktarın %10-20'si kadardır (Radositits ve ark., 2006). Flor deniz suyunda 0,8-1,4 mg/l; göl, nehir, artezyen sularında ise 0,5 mg/l'den az miktarlarda bulunur. Flor balıkta 21-761 mg/kg miktarlarında bulunur (Ülgen, 2018). Doğu Anadolu bölgesi Van/Ağrı çevresinde kaynak sularında ortalama olarak 7,67 mg/l F tespit edilmiştir (Ergun ve ark., 1987).

Havadaki flor içeriği, flor miktarı bakımından fazla olan tozdan, endüstriyel üretim aşamalarında kullanılan gazlardan, kömürün yakılması sonucu kirletici olarak ortaya çıkan ve volkanik aktiviteler sonucu geniş etki alanına dağılan kaynaklardan ortaya çıkan kirlenme ile artış gösterir. Flor düzeyi normal şartlardaki atmosferde 0,6 ppb, şehir yerleşim alanlarındaki atmosferde 50 ppb düzeyinde olabilir (Lenntech, 2018; Barbier ve ark., 2010).

Ortam havasında gaz formundaki floru bitkiler absorbe eder ve tutar. Bitkiler birkaç tür hariç floru fazla miktarda tutamazlar. Bitkilerden *Camellia spp* ve Çin çayı fazla miktarda flor tutar (Radositits ve ark., 2006). Flor bitkiler arasında yoğun olarak çayda (çayda 3,2-400 mg/kg, demlenmiş çayda 8,6 mg/kg) bulunurken tahıl, muz ve patateste ortalama 4,2 mg/kg miktarındadır (Barbier ve ark., 2010). Tütünde de yüksek miktarda flor bulunur (Küçükeşmen ve Sönmez 2008). Afrika, Avusturalya ve Brezilya'da 40 bitki çeşidi ve bazı bakteriler kendilerini herbivorlara karşı korumak için organoflorin (floroasetat) yapısında olan zehirler sentezlerler. Meralardaki flor miktarının 20-50 mg/kg'lık kısmı endüstriyel atık ve fabrika dumanından kaynaklanır. Ergun ve ark. (1987), Van ili Ağrı bölgesi çevresinde alınan bitki örneklerinde 15,24 mg/kg flor düzeyi belirlemişlerdir.

Doğu Anadolu bölgesinde Ergun ve ark. (1987), Van ve Ağrı illeri çevresinde su flor düzeyini 7,67 mg/l olarak bulmuşlardır. Tokaloğlu ve ark. (2004), Türkiye'nin değişik illerinde (İstanbul, Ankara, Tarsus, Gaziantep, Kırıkkale, Kahramanmaraş, Alanya, İzmir, Mersin, İskenderun, Nevşehir, Tokat, Sivas, Edirne, Malatya, Adapazarı) bazı semtlerden alınan içme suyu örneklerinde flor konsantrasyonunu 0,02-1,42 mg/l, 7 şişelenmiş su örneğinde 0,04-1,47 mg/l aralığında belirlemişler ve içme suyu örneklerindeki flor miktarının WHO standartlarına göre düşük düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar çayın 20 dakikalık infüzyonu sonrası elde ettikleri sıvıda ve kahvedeki flor incelemesinde 2 yerli çay infüzyonundaki flor miktarını 55 ve 127 mikrogram/g, üç ithal çay örneğindeki flor miktarlarını 56, 4, 142 ve 195 mikrogram/g, bir Türk kahve örneğinde 0,096 mikrogram/g ve diğer bir kahve örneğinde 0,17 mikrogram/g olarak belirlemişlerlerdir. Bu araştırmacılar WHO kaynaklarına dayanarak; florlu sularla hazırlanmış meyve sularındaki flor miktarını 0,9-1,3 mg/l, düşük florlu suyla hazırlanan meyve sularındaki flor miktarını 0,2-0,5 mg/l ve mineral sularındaki flor miktarını ise 1 mg/l olarak bildirmişlerdir.

1.3. Endüstriyel flor kirliliği

Aluminyum, demir-çelik, süper fosfat, cam tuğla, bakır, cam ve emaye üretimiyle ilgili fabrikalar potansiyel flor kaynaklarıdır ve fabrika etrafında rüzgar istikametinde 14 km'lik mesafede flor kontaminasyonuna yol açarlar. Kaya fosfatından süper fosfat işleyen fabrika atıklarında %3,3 oranında flor bulunur (Radositits ve ark., 2006). Endüstriyel atıklar içinde flor kontaminasyonuna yol açan maddelerin değişik formlarda olması sorunun kapsamını genişletmektedir. Hidroflorik asit (HF), silikontetra florit (SiF_4) ve flor asetamid ($\text{FCH}_3\text{CONH}_2$) toksik fabrika artığı maddelerdir. Bu maddelerden ilk ikisi sodyum florid kadar toksiktir ve genç ruminantlarda bu maddeleri kuru madde bazında 14-16 mg/kg miktarında alanlarda; diş lezyonları ve buna ilişkin klinik bulgular hafif, 25 mg/kg miktarında alanlarda bu belirtiler çok daha şiddetli olarak ortaya çıkar (Radositits ve ark., 2006).

Kayseri'de yapılan bir çalışmada (Tokaloğlu ve ark., 2004) üniversite kampüsünde araba parkı sahasından sağlanan toz örneklerinde suda eriyebilir flor içeren mineral derişimi 7-38 mikrogram/gram olarak bulunmuştur. Mineralli topraklarda çözünebilir F düzeyi 0,2-0,3 g/kg olarak bildirilmiştir (WHO, 2006).

1.4. Flordan yararlanılan alanlar

Dayanıklılığının yüksek oluması sebebiyle özellikle kimya ve termal dayanıklı malzeme üretimi aşamaları başta olmak üzere giyim, elektronik malzeme üretimi, teflon ürünler üretimi, soğutucu ve izolasyon malzeme üretiminde sık kullanılır (ATSDR, 2003). Diklor diflor metan (CF_2Cl_2) soğutma cihazlarında, tetrafloretlen (C_2F_4) plastik teflon imalatında, oktaflorsiklobutan (C_4F_8) aerosol püskürtücülerde ve halonlar (CF_3Br ile CF_2Br) yangın söndürme cihazlarında kullanılan başlıca organik flor bileşikleridir (Barbier ve ark., 2010).

Flor diş çürüklerini önlemek için şehir şebeke sularına, diş macunlarına ve ağız çalkalama sıvılarına katılır (Lenntech, 2018) Şehir şebeke suyu florlanması (çoğunlukla 1mg/L) silikoflorid bileşikleri (sodyum silikoflorid, hidroflorosilisik asit) ve sodyum florid (NaF) kullanılır (Urbansky, 2002). Diş çürüklerinin önlenmesi için Amerika’da ve Panama’da 1940’lı yıllardan itibaren şehir şebeke sularına flor katılmaya başlanmış, fakat bu uygulamadan sonra bu iki ülkede dental florozis olgularının artış göstermesi; içme sularına flor katma konusunu tartışmaya açmıştır. Flor diş macunlarında çoğunlukla sodyum monoflorofosfat şeklinde bulunur. Bu uygulama 1955’te Amerika’da başlamış, daha sonra pek çok gelişmiş ülkede ağız yıkama sıvıları, jel, köpük ve diş parlatma preparatları içine flor katılmaya başlanmıştır (Urbansky, 2002). Ülkemizde kullanılan dört farklı marka diş macunu örneğindeki flor içeriğinin, 447-1400 mikrogram/g aralığında olduğu belirlenmiştir (Tokalıoğlu ve ark., 2004).

Modern ilaç sanayinde ilaçların %20’sinde flor bulunur. Flor ilaçları metabolik enzimlerin yıkımına karşı korur ve ilacın aktif yarı ömrü uzar (Wang ve ark., 2014). Flor ilaç molekölü içerisinde tek bir atom olarak bulunsa bile ilacın kimyasal özelliğini büyük ölçüde değiştirir. İlaçtaki hidrojen bağının yerine florun geçmesi ilacın dayanıklılığını artırır. İlaçta kullanılan organik flor bileşiğinin karbon flor bağının dayanıklılığı yüksek olduğundan ilacın metabolizması ve eliminasyonu gecikir, dozajlanma aralığı uzar. Florlanmış maddelerin vücutta yağ içine sızma yeteneği artar. Karbon flor bağlarının karbon hidrojen bağına göre daha fazla hidrofobik olması nedeniyle; karbon flor bağı içeren ilacın hücre membranına girişi daha hızlı olur. Kolesterol düşüren bir ilaç olan atorvastatin, astım tedavisinde kullanılan fluticasone florlanmış maddelerdir. Çoğu modern antideprasanlar florlanmış moleküllerdir ve bunlar vücutta seçici olarak serotoninin bağlanma yeteneğini engelleyerek antidepresif etki yaparlar. Geniş spektrumlu antibiyotiklerden kinolon grubu ilaçlar (ciprofloxacin ve levofloxacin) florlanmış moleküllerdir. Flor; fluorocortisone, triamcinolone ve dexametazonda da bulunur. İnhalasyon anesteziklerinden sevoflorane, desflorane, enflurone ve isoflurone florlanmış moleküle sahip olan ilaçlardandır (Hagmann, 2008).

Medikal sahada kullanılan yapay kan veya likit soluma uygulamalarında kullanılan florlu emülsiyonlar oksijen ile karbondioksiti yüksek miktarda tutarlar. Bu maddeler suni kan olarak da isimlendirilir. Bu ürünlerden olan oxycyte florokarbonlar (üçüncü jenerasyon perflorokarbon) son zamanlarda kullanılmaya başlanan ve yüksek oksijen ve karbondioksit bağlama yeteneğinde olan preparatlardır. Bu maddeler prematüre bebeklerde ve yangın dumanına maruz kalma durumunda likit soluma şeklinde akciğerlerin kısmi veya tam olarak doldurulması amacıyla kullanılır. Sporcular tarafından kullanılması doping olarak değerlendirilir Pozitron emisyon tomografisinde radyofarmasötik bir madde olan florodeoksi glukoz (FDG) sık olarak kullanılır. Bu maddenin farmakodinamik olarak malignant tümörler ve beyin gibi glukoz ihtiyacı yüksek olan dokular tarafından tutulma özelliği vardır (Dolle ve ark., 2008).

1.5. Florun neden olduğu zararlar

Günümüzde organoflorinlerin pek çoğunun önemli çevre ve sağlık sorunu yarattığı bilinmektedir. Karbon-florid bağının kuvvetli oluşu nedeniyle çoğu sentetik florokarbonlar ve florokarbon temelli bileşikler kalıcı bulaşmaya yol açar ve yaban hayatı için tehlikedir. Bunların insan sağlığına etkisinin ne olduğu bilinmemektedir (Urbansky, 2002).

Flor çok toksik bir maddedir. Göz ve solunum yolu için iritan özelliği olduğu kadar vücutta 25 ppm'in üzerinde bulunduğu karaciğer ve böbreklerde yıkıma yol açar. Suda kimyasal olarak daha az çözündüklerinden dokulara diğer asitlere göre daha hızlı girer. Flor zehirleyici etkisini deri, göz ve solunduğu zaman akciğerlerde dokulara alındığında doku toksitesi vasıtasıyla doza bağlı etkisini gösterir (Urbansky, 2002).

Hidroflorik asit hidrojen floridin sudaki solüsyonudur ve bir kontak zehirdir. Hafif asit özellikte bir kimyasal olmasına rağmen nitrik asit sülfirik asit veya hidroflorik asit gibi kuvvetli mineral asitlerden daha tehlikelidir. Bir insan eli

büyükluğu kadar yanık ciddi sistemik toksiteye yol açar. Hidroflorik asit sinir fonksiyonlarını bozduğundan bu maddeyle oluşan yanıkta başlangıçta ağrı hissedilmez (NRC, 2006).

Flor vücuda girdiğinde diş ve kemikler hedef dokuları oluşturur. Kanda Ca ve Mg ile reaksiyona girer, hipokalsemi ve elektrolit dengesizliğine yol açar. Vücuda orta-yüksek miktarlarda flor girişi bir süre devam ederse diş ve kemiklerin yanı sıra yumuşak dokularda da bozukluklara neden olur. Suda çözünmeyen CaF_2 oluşumu şiddetli ağrıya yol açar (NRC, 2006).

Liu (1993), kanserojen olan diethylnitrozamin'i bir kez intraperitoneal olarak verdiklerinde ve devamında içme sularına 80 ppm sodyum florid'i 14 hafta süreyle eklediklerinde ratlarda stereolojik enzim histokimyası metodu ile hepatolojik prekanseröz enzim değişiklikleri (GGT pozitif, ATP'az negatif, G6P'az negatif) belirlediklerini ve sonuç olarak sodyum florid'in diethylnitrozamin'in neden olduğu prekanseröz lezyonları hızlandırdığını ifade etmektedir.

1.6. İnsanlarda florozis

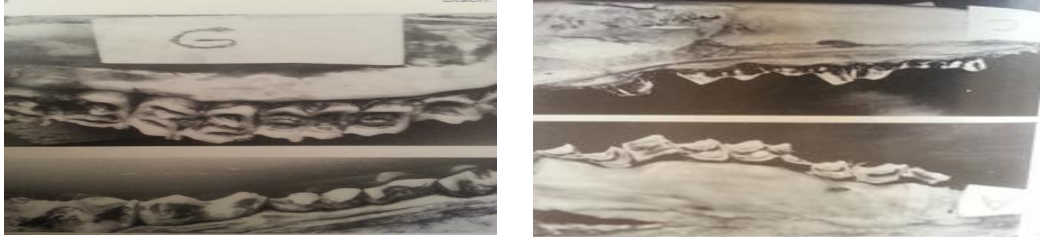
Endemik florozis günümüzde tüm kıtaları etkilemekte ve milyonlarca insanı risk altına sokmaktadır (WHO 2006). İnsanlarda günlük 0,05 mg/kg miktarında flor alınması minimal risk oluştururken (ATSDR, 2003), 0,15 mg/kg/gün dozunda flor kemik kırığı gelişme oranında artışa yol açar. İnsanlar için letal flor dozu erişkinlerde 16-64 mg/kg, çocuklarda 3-16 mg/kg'dır (ATSDR, 2003). Aşırı flor alımı uzun süre devam ettiğinde insanlarda florozis olarak isimlendirilen ciddi sağlık problemlerine yol açar. Florozis dişte beneklenme, osteoporoz ve osteoskleroz ile karakterizedir. Fazla miktarda florla temas etmenin en önemli etkisi kemiğin osteoblast ve osteoklast hücrelerinedir. Florun böbrek, endotelial, gonadal ve nörolojik hücrelerine de etkisinin olduğu gösterilmiştir (NRC, 2006).

Şentut ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 9-11 yaşındaki çocuklarda florozisli dişlerde odontoblast sayısının florozis görülmeyenlere göre azaldığını saptamışlar ve bunun operasyonlar sonrası diş iyileşmesini olumsuz etkileyecek bir bulgu olduğuna işaret etmişlerdir.

İnsanlarda günlük olarak erkeklerde 4 mg, dişilerde 3 mg flor alımı öngörülmektedir. Gıdalarla günde 2 mg flor rahatlıkla tolare edilmektedir. Bunun üzerinde flor alınması önerilmemektedir WHO (2006). Gutowska ve ark. (2011), insan kanını sodyum florid ile temas ettirerek yaptıkları çalışmada; florun makrofajlarda apoptotik etkiyi ve yangısal olayları başlattığını göstermişlerdir. Grandjean ve Olsen (2004), Danimarka/Kopenhag'da kiryolit sanayiinde çalışanlarda primer idrar kesesi kanseri görülme oranında artışa, primer akciğer kanserlerinde ise katılımcı tümör olarak bulunduğu işaret etmişlerdir.

1.7. Hayvanlarda florozis

Flor genel doku zehiridir. Florozis aşırı miktarda flor içeren suların içilmesi veya endüstriyel kirlenme sonucu ağızdan veya solunum yoluyla aşırı miktarda florun alınması veya orta-fazla miktarda florun uzun süre alınması sonucu ortaya çıkar. Bir defada çok fazla miktarda alındığında akut florozis, uzun sürede orta-yüksek miktarlarda alındığında ise kronik florozis belirtileri ortaya çıkar. Akut belirtiler ölümle sonuçlanırken, kronik belirtiler diş ve kemik lezyonları ile başlar sonra başta karaciğer, böbrek, kalp ve CNS olmak üzere yumuşak dokularda bozukluklara yol açar. Dişlerde horizontal kahverengimsi lekeler ve lezyonlar şekillenir (Şekil 1.1). Koyun keçi ve sığırlar florozise en duyarlı türlerdir. Hastalık at ve domuzlarda hafif klinik belirtilere yol açar. Kanatlılarda önemli bir bozukluk ortaya çıkmaz (McDowell ve Arthington 2005, Mert ve ark., 2016, Radositits ve ark., 2006).



Şekil 1.1. Florozis'in neden olduğu mandibula ve diş lezyonları (Ergün ve ark., 1987)

1.8. Türkiye’de yapılan florozis çalışmaları

Türkiye’de yapılmış florozis çalışmaları Çizelge 1.1’de topluca özetlenmiştir. Şendil ve Bayşu (1973), Van ili Çaldıran çevresi ve Ağrı ili Doğubeyazıt çevresinde koyun idrar örneklerinde (florozis belirtisi görülenlerde) 3,80-30,61 mg/l, su örneklerinde 5,70-15,20 mg/l mg/l, olarak flor düzeyini bulmuşlardır. Ergun ve ark (1987), Van ve Ağrı ili çevresinde kaynak sularındaki flor düzeyi ortalama olarak 7,67 mg/l, toprakda ortalama 17,4 mg/kg, bitkilerde 15,24 mg/kg, diş örneğinde 3787-5299 mg/kg (kül), kemik örneğinde 3374-5149 mg/kg (kül), koyun idrarında 8,11 mg/l olarak belirlemişlerdir. Fidancı ve ark. (1998), Eskişehir ili Kızılcaören çevresi, Kırşehir ili Kaman ve Bayındır çevresi, Akçakent ve Yenyapan çevresi ile Çiçekdağ ve Pöhrek çevresin’den aldıkları su, toprak, bitki ve koyun idrar numunelerinde flor ölçüm değerlerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Altıntaş ve ark. (2000), Eskişehir ili Kızılcaören köyü ve Van ili Çaldıran ve Muğla Yatağan çevresi meralarını beslenme amacıyla kullanan koyunların idrar örneklerinde flor düzeylerini sırasıyla ortalama 5,33, 8.13 ve 8,74 ppm bulmuşlardır. Yüksek bulunan değerlerin doğada bulunan flor konsantrasyonunun yüksek olmasıyla açıklamışlardır. Işıklı ve ark. (2000), flor madeni bölgesi olan Eskişehir ili Kızılcaören ilçesinde su örneklerinde flor miktarını ortalama 3,9 mg/l bulmuşlardır. Erdoğan (2002), Hatay ili çevresinde içme suları üzerine yaptığı çalışmada flor düzeylerini 0,140-0,751 ppm, ilçesi olan Erzin yöresinde kaynak suyu flor düzeyini ise 2,140 ppm olarak belirlemişlerdir. Öksüz (2006), Kırşehir ili Pöhrenk yöresinde sıcak su kaynaklarında, çeşme sularında ve artezyen kuyu sularında flor düzeyini sırasıyla 5,5-5,7 mg/l, 0,63-2,6 mg/l, 0,63 mg/l olarak belirlemiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye’de yapılan florozis çalışmaları

Çalışmanın yapıldığı Yöre	Tespit edilen flor miktarı		
Van ili Çaldıran yöresi ve Ağrı ili Doğubeyazıt yöresi (Şendil ve Bayşu, 1973)	- Su: 5,70 -15,20 ppm - İdrar (koyun): 3,80-30,61 ppm		
Van ve Ağrı yöresi (Ergun ve ark, 1987)	- Su: 7,67 ppm - Toprak: 17,4 ppm - Bitki: 15,24 ppm - Diş (kül): 3787-5299 ppm - Kemik (kül): 3374-5149 ppm - İdrar (koyun): 8,11 ppm		
- Eskişehir ili Kızılcaören - Kırşehir- Kaman,Bayındır - Akçakent, Yeniyapan - Çiçekdağ, Pöhrek - Konya ili Seydişehir - Kırşehir ili Merkez, - Kırıkkale ili Merkez - Ankara ili Elmadağ - Çorum ili Merkez - Muğla ili Yatağan (Fidancı ve ark, 1998)	İdrar (ppm) 12.50±0.46 3.01±0.13 1.28±0.008 3.50±0.24 31.14±3.45 1.87±0.17 1.23±0.11 2.97±0.37 1.44±0.10 7.86±0.77	Su (ppm) 4.81±0.14 2.67±0.74 0.57±0.08 0.42±0.02 0.32±0.11 0.22±0.02 0.29±0.03 0.25±0.02 0.37±0.04 0.25±0.02	Bitki (ppm) 658.9±169.0 531.0±204.0 22.2±13.7 42.7±11.3 41.4±8.7 82.2±22.7 33.8±13.6 55.4±14.5 80.4±18.5 1.95±0.11
Eskisehir ili Kızılcaören, Van ili Çaldıran ve Muğla ili Yatağan (Altıntaş ve ark, 2000) (Işıklı ve ark, 2000)	- İdrar (koyun): 5,33 ppm, 8.13 ppm; 8,74 ppm - Su: 3,9 ppm (Eskişehir/Kızılcaören)		
Hatay ili ve Erzin yöresi (Erdoğan, 2002)	- İçme Suyu: 0,140-0,751 ppm - Kaynak suyu: 2,140 ppm		
Kırşehir ili Pöhrenk yöresi (Öksüz, 2006)	- Su (sıcak): 5,5-5,7 ppm - Çeşme suyu: 0,63-2,6 ppm - Kuyu suyu: 0,63 ppm		

Endüstriyel flor kirliliğinin tespit edildiği yoğun olarak alüminyum işleme, lastik üretimi, çimento üretimi gibi çok çeşitli fabrikaların bulunduğu Konya ili Seydişehir çevresi, Kırşehir Merkezi , Ankara ili Elmadağ çevresi ve Çorum Merkez’de (Fidancı ve ark., 1998; Fidancı ve ark., 2005), kömür kullanımına bağlı olarak Muğla ili Yatağan yöresinde (Fidancı ve Sel, 2001; Fidancı ve ark., 2005) sularda, toprakta, bitkilerde ve koyunların idrarında flor düzeylerinin yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Altıntaş ve ark. (2000), Muğla/Yatağan’daki endüstriyel sebepli flor toksikasyonu şüpheli koyunların idrarlarında flor düzeylerini ortalama 8,74 olarak belirlemişlerdir.

Doğu Beyazıt yöresinde florozis görülen koyunlarda eritrosit MDA düzeyinde artış ve SOD ve Katalaz düzeylerinde ise düşüş kaydedilmiştir (Özbey ve ark., 2017). Ağrı ve yöresinde florozis görülen koyunlarda böbrek, karaciğer ve kas dokularının değişik derecelerde etkilendiği tespit edilmiş, buna karşın serum lipoprotein seviyelerinde değişim bulunamamıştır (Yur ve ark., 2013).

1.9. Florun özellikleri ve dokulara etkisi

Flor kimyasal olarak elektronegatifliği yüksek bir iz elementtir. Flor iyonu diğer elementlerle bağlanarak çeşitli bileşikler oluşturur (Bednarek ve ark., 1998, Chlubek ve ark., 2003). Ayrıca florun bir diğer önemli özelliği de doğal ve endüstriyel kirleticisi olmasıdır (Whitford, 1983). Canlılar; gıda, içme suyu, flor katkıları, diş macunları, profesyonel olarak florlu jellerin dişe uygulanması, tütsü uygulamaları, endüstride kullanılan ve flor içeren tuzlar ve hidroflorik asit aracılığıyla flora maruz kalırlar (Edmund ve ark., 1996, Shulman ve Wells 1997). İnorganik floride yoğun ve uzun süre maruz kalmak, florozis olarak adlandırılır ve önemli bir sağlık sorunudur. Floride fazla maruz kalma hayvanlarda ve hücre kültüründe toksik etki gösterir. Florun; iskelet kasları, beyin ve omurgada yapısal ve fonksiyonel bozukluklara; kan, karaciğer, böbrek ve kalp gibi organların aerobik metabolizmasında ve hücresel serbest radikal metabolizması değişim hızında artışa neden olduğu ortaya konulmuştur (Cao ve ark., 2013, Doğan ve ark., 2016, Pereira ve ark., 2013, Shashi ve Bhardwaj 2011, Yur ve ark., 2003, Zhang ve ark., 2014). Serbest radikaller membran fosfo lipidlerine

saldırarak toksik etki yapar. Bu etki lipid peroksidasyonu ile membran yıkımı, mitokondrial membran depolarizasyonu ve apoptozisdir (Barbier ve ark., 2010).

Florid hücre membranından basit difüzyonla geçer ve yumuşak dokuya sızar. Karaciğer florun başlıca atak yaptığı hedef organlardan biridir. Yapılan pek çok çalışmada (Chlubek ve ark., 2003, Pereira ve ark., 2013, Shashi ve Bhardwaj 2011, Zhang ve ark., 2014); aşırı miktardaki floridin karaciğerde metabolik işlevlerde bozukluğa ve karaciğerin detoksifikasyon kapasitesinde düşüşe yol açtığı gösterilmiştir.

Floridin hepatositlerde neden olduğu nekrozis, membran lipidlerinde neden olduğu değişiklikler ve apoptozis (He ve Chen 2006) floridin organizmada yol açtığı oksidatif stres (Zhang ve ark., 2014) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Floridlerle temas sonucu stres cevabı faktörleri, sinyal transdüksiyon bileşikleri ve apoptozisle ilişkili proteinleri ve organ spesifik enzim değişimleri ortaya çıkar. Karaciğerin dokusu metabolizma faaliyetlerinde, flor gibi toksik maddelerin etkinliğinin giderilmesinde ve uzaklaştırılmasında önemli fonksiyonu vardır. Karaciğer fonksiyon testlerinden ALT, AST, ALP, GGT ve bilirubin karaciğerin işlevlerini idame ettirmesi hususunda önemli bilgiler sunar.

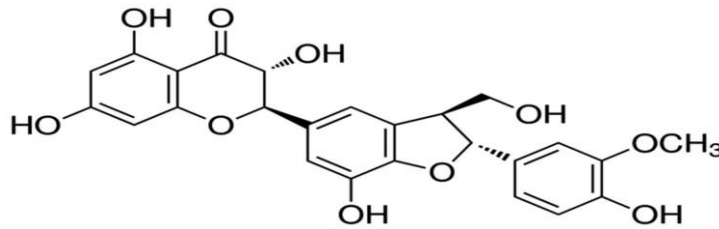
Alanin aminotransferaz (ALT): Enzim glutamat-purivat transaminaz (SGPT) olarak da isimlendirilir. ALT sitozolik olup kedi ve köpekler için karaciğer spesifik enzim olarak tanısal değere sahiptir. Hepatoselüler permeabilite artışına yol açan hastalıklarda serum ALT aktivitesinde artış ortaya çıkar (Karagül ve ark., 2000).

Aspartat aminotransferaz (AST): Enzim serum glutamat okzaloasetat transaminaz (SGOT) olarak da bilinir. Öncelikle kalp kası ve karaciğerde olmak üzere, iskelet kasları, böbrek ve pankreasta yoğun olarak bulunur. Hücrelerin sitozol ve mitokondrisinde yerleşiktir. Karaciğer ve kas yıkımının tanısının konulmasında önemlidir. Özellikle kalp kası yıkımında serumdaki düzeyi kısa sürede yükselir (Karagül ve ark., 2000; Turgut 2000).

1.10 Ratlarda çeşitli antioksidanların hepatotoksite üzerine etkileri

Ratlarda florla oluşturulan hepatotoksiteye karşı kaffeik asidin (Kanagaraj ve ark., 2015); ratlarda sodyum floridin neden olduğu karaciğer ve böbrek dokusu yıkımına karşı mor mısır pigmenti ekstratının (Zhang ve ark., 2014); sodyum floridle oluşturulan toksikasyonda ortaya çıkan oksidatif strese karşı gallik asitin (Bouasla ve ark., 2015); ratlarda sodyum florid'in neden olduğu oksidatif hepatik yıkıma karşı Epigallocatechin gallate'nin (Thangapandiyan ve Miltonprabu 2013); rat karaciğerinde fazla flor tüketimine bağlı oksidatif yıkıma karşı *Tamarindus Indica*'nın (Ekambaram ve ark., 2010) koruyucu etkisinin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca ratlarda floridin sebep olduğu oksidatif stresin azaltılmasına resveratrol'un olumlu etkisinin bulunduğu bildirilmiştir (Atmaca ve ark., 2014).

1.11. Silimarin'in antioksidan etkisi



Şekil 1.2. Silimarin' in kimyasal yapısı (MA: 482,44) (Jin ve ark. 2016)

Silimarin (SM) *Silibum marinum* (milk thistle) bitkisinin ekstrakte edilmesiyle elde edilen çeşitli flavolignanlardan biridir. Karaciğer tedavisinde kullanımı geçtiğimiz yıllarda pek çok çalışmanın konusu olmuştur (Atmaca ve ark, 2014, Bouasla ve ark, 2014, Ekambaram ve ark, 2010, Kanagaraj ve ark, 2015, Thangapandiyan ve Miltonprabu 2013 Zhang ve ark, 2014). SM'in antioksidan özellikleri nedeniyle pek çok olguda karaciğer koruyucu etkisinin olabileceği değerlendirilmiştir

Silimarin'in muhtemel antioksidan mekanizması; serbest radikallerin süpürülmesi, demir ve bakır gibi metallerle şelat oluşturması, ROS oluşturan enzimlerin inhibisyonu ile serbest radikal oluşumunun önlenmesi, mitokondrial stresin düzenlenmesi, antioksidan enzimlerin ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivasyonu ile redoks dengesinin sağlanması, NF-kB yolunun inhibisyonu ile inflamatorik yanıtın azaltılması ve bu şekilde karaciğer toksitesinde ve çeşitli karaciğer hastalıklarında koruyucu etki göstermesi ile ilişkilidir. Silimarin'in gastrointestinal flora ile etkileşimi ve hayvan beslemede kullanılan diğer karaciğer koruyucu bileşiklerle (karnitin, betain, vitamin B12 gibi) etkileşiminin araştırılması önerilmektedir (Surai, 2015).

1.12 Oksidatif stres göstergesi parametreler

Oksidatif stres biyolojik sistemlerdeki yapı taşlarını olumsuz etkilemesi sebebiyle hücre yapısında önemli hasarlar meydana getirir (Sies ve ark, 1995; Celi ve ark 2011). Oksidatif stres durumunda canlının savunma mekanizmaları yetersiz kalırsa, hücrelerde oksidatif hasar gelişir ve hücrenin fonksiyonları ciddi derecede aksar. Oksidatif doku hasarı, oksidan moleküllerinin hücrenin temel taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler üzerindeki reaksiyonlarından kaynaklanır (Yu ve ark,1999).

Oksidatif stres, genelde lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA; oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG); protein oksidasyonu; SOD, GSH-Px, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenir. Bu amaçla ya radikallerin ölçümü, ya da oksidatif hasar göstergelerinin belirlenmesi (lipid peroksidasyon ürünü MDA belirlenmesi, protein hasarının belirlenmesi, DNA hasarının belirlenmesi) veya antioksidan savunma sistemlerini oluşturan enzim (SOD, GP-x, CAT, GST, GR) aktivitelerinin değerlendirilmesi ya da alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, melatonin veya enzim kofaktörlerinin (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) ölçülür (Sies ve ark, 1995; Celi ve ark 2011; Yu ve ark,1999).

Bu çalışmada, oksidatif stres göstergesi parametrelerden başta SOD, GSH-Px, MDA olmak üzere oksidatif stres sonucu gelişen hücresel oksidatif hasar, apoptozis ve mitokondrial stres göstergesi Bax, Kaspaz-3, Nox4, p38 MAPK, Hsp60 ve Hsp27 gibi selüler proteinler incelendi.

Mitojen aktive edilmiş protein kinazlar (MAPKs), oksidatif stresin neden olduğu apoptotik yollarda anahtar rol oynar. p38 alfa MAPK'ların izorformudur ve çeşitli ksenobiyotiklere karşı proapoptotik etki gösterir (Lee ve ark., 2014; Wang ve ark., 2012). Periferel kan mononükleer hücrelerinde (Chen ve ark., 2010) ve A549 hücrelerinde, florun toksik etkisini, p38 MAPK yolunun etkinliğini artırarak (Ridley ve Matsuoka, 2009) gösterdiği ortaya konulur. Florid iyonları yüksek elektronegatifliğe sahip olduğundan enzimlerle kompleks oluşturarak onların biyolojik sistemlerdeki aktivitesini azaltır. Isı şok proteinleri (Hsp) biyolojik sistemlerde ana regülatör proteinlerdir ve şaperonlar olarak fonksiyon yaparlar. Bu fonksiyonlar protein bağlanmasını kolaylaştırma, protein agregasyonunu engelleme ve bozulmuş enzimlerin degradasyonunu sağlamadır. Hsp'lerin pek çok çeşidi olsa da, Hsp 60 ve Hsp 27, selüler strese neden olan oksidatif yıkıma ve ksenobiyotiklerin neden olduğu hipertermiye karşı sitoprotektif etki gösterirler (Parcellier ve ark., 2003; Rezzani ve ark., 2005). Önceki çalışmalarda; Hsp'lerin apoptotik kaskatın inhibisyonunda negatif regülatör etkiye sahip oldukları gösteridir (Kalmar ve Greensmith 2009). Hsp 60 ve Hsp 27'nin floridin sebep olduğu hepatotoksitedeki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Bununla birlikte, floridin hepatik fonksiyonu; Nox4, p38 alfa, MAPK, Hsp 60 ve Hsp 27, endojen antioksidanlar (süper oksit dismutaz = SOD, katalaz = Cat, Glutasyon-s-transferaz = GST) marifetiyle apoptozisi tetikleyerek etkilediği düşünüldü. Ayrıca floride kronik maruz kalmanın, kaspaz bağımlı yollar ile (kaspaz 3 ve kaspaz 9'un aktivitesinin artması) apoptozis'e yol açtığı belirlendi (Song ve ark., 2002).

Bu çalışma ile ratlarda NaF ile hepatotoksite ve oksidatif stres oluşturulması ve silimarinin tedavi edici etkisinin doku düzeyinde bazı parametrelerle incelenmesi amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Gereç

2.1.1. Deney Hayvanı

Araştırma, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Biriminden sağlanan 8-12 haftalık, 180-240 gram canlı ağırlıktaki 45 erkek ratda (Wistar Albino) gerçekleştirildi. Hayvanlar 12 saat ışık/karanlık siklusunda ve gün boyunca uygun nem ve ısıda bakıldı. Ratlar uygulamadan 5 gün önce karantinada bekletildi. Ratlara standart besleme uygulaması yapıldı. Su ad libitum olarak verildi.

2.1.2. Kimyasal Maddeler

Çizelge 2.1. Tezde Yararlanılan Kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Firma	Katalog No
Sodyum Florid	Merck	(7681-49-4)
Silimarın	Sigma	(S0292)
RIPA (Radyoimmunopresipitasyon) tamponu	Cayman	(Cayman, 100110263)
Glutasyon Peroksidaz Kit	Cayman	(Cayman, 703102)
Superoksit Dismutaz Kit	Cayman	(Cayman, 706002)
MDA Kit	Cayman	(Cayman, 100009055)
Mini Trans-Blot Filter paper	Biorad	(1703932)
2-Mercaptoethanol	Merck	(S4136340)
Amonnium Persulfate	Biorad	(161-0700)
Non-fat Dry Milk	Cell Signaling	(9999S)
Westerndot Western Blot Kit	İnvitrogen	(W10142)
Tris-Glisin-SDS Buffer	Biorad	(161-0772)
Toplam Protein Kit	Piercethermosci	(22660)

2.1.3. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Spektrofotometre	Tecan	Sunrise
Elektroforez Seti- Western Blot transfer Ekipmanı	Biorad	Mini Protean Tetra Cell
Buz Makinesi	Frocchetti	AF-100
-80°C için uygun derin dondurucu	Sanyo	MDF-03386S
Ultra saf su cihazı	Milipore	Synergy 185
Benmari	Nüve	BM402
Doku Boyama Cihazı	Leica	Leica AutostainerXL
Otomatik bloklama makinesi	Leica	Leica CV5030
Işık Mikroskobu	Olympus	Olympus BX51
Fotograf Makinası	Olympus	Olympus DP71
Doku Takip Cihazı	Leica	Leica TP1020
Bloklama Cihazı	ThermoElectron Corp.	Thermoelectron corp ShandonHistocentre3
Kesit Alma Cihazı	Leica	Leica RM2255
Santrifüj	Sigma	3K30
Vorteks	Biosan	Biovorteks VI
Hassas Terazî	Shimadzu	AUW320

2.2. Yöntem

2.2.1. Etik

Araştırma, T.C. Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 08.06.2016 tarihli toplantısında alınan (Toplantı no: 2016-15, Dosya no:2016-99) 2016-15-153 no'lu karar çerçevesinde 45 rat üzerinde gerçekleştirildi.

2.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Plan gereği 45 rat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı-Deney hayvanı ünitesi

Her grupta 9 rat olmak üzere beş grupta toplam 45 Wistar albino türü rat kullanıldı. Deneydeki tüm ratlar standart beslemeye tabi tutuldu (Çizelge 2.3).

Çizelge. 2.3. Deneme boyunca ratlara verilen standart yem içeriği

Temel Besin Maddeleri		Yem içeriği
Ham Yağ	%3,29	Soya küspesi
Ham Kül	%6,48	Mısır
Lizin	%1,32	Buğday kepeği
Fosfor	%0,98	D ve L Metiyonin
Ham Protein	%24	Kolin klorid
Ham Selüloz	%6,09	Kanatlı minerali
Metiyonin	%0,4	
Kalsiyum	%0,87	
Sodyum	%0,05	

Çalışma; herbirinde 9 rat'ın bulunduğu 5 grupta yürütüldü. Deneme; 30 gün süreyle sadece floridin verildiği grup, sodyum florid ile silimarin'in birlikte verildiği grup ve sadece silimarinin verildiği grup ile sodyum floridin 30 gün süreyle verilmesini takiben 10 gün süreyle silimarinin verildiği grup ve 40 gün süreyle aynı bakım besleme şartlarında tutulan kontrol grubunda yürütüldü (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Çalışma grupları ve uygulanan işlemler

Kontrol (K) 30 gün	Na F (F) 30 gün	NaF+Silimarin (SF) 30 gün	Silimarin (S) 30 gün	NaF 30 gün + 10 gün Silimarin (T)
n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9
İçme suyuna deneme süresi (40 gün) içinde herhangi bir madde katılmadı	İçme suyuna 30 gün süreyle NaF katıldı (300 mg/L su)	İçme suyuna 30 gün süreyle NaF (300 mg/L su) katıldı ve aynı anda silimarin suda çözdürülerek (200 ppm/gün) 30 gün gavaj ile verildi.	30 günlük deneme süresince sadece silimarin suda çözdürülerek (200 ppm/ gün) gavajla verildi	İçme suyuna 30 gün süreyle NaF katıldı (300 mg/L su) ve daha sonraki 10 gün silimarin suda çözdürülerek (200 ppm/gün) gavaj ile verildi.

Gruplardaki ratların tamamından deneme süreleri sonunda kan örnekleri alındı, ratlar sakrifiye edildi ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Toplanan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, serumlar çıkarılarak örnekler numaralandırıldı ve derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edildi.

Sakrifiye edilen ratlardan elde edilen karaciğer doku örnekleri numaralandırılarak örnek kutuları içinde derin dondurucuda -80 °C’ de muhafaza edildi.

2.2.3. Morfometrik Parametreler

Çalışma süresince ratlar günlük olarak gözlemlendi. Ratların canlı vücut ağırlıkları çalışmanın başlatılmasından önce ve çalışma süresince her hafta çalışmanın sağlıklı sürdürüldüğünün kontrol edilmesi için tartıldı. Çalışmanın sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan alınan karaciğer dokularının ağırlıkları tartıldı.

2.2.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Çalışmanın 30. gününde (n: 27 F, SF, S grupları) ve çalışmanın sonunda (n: 18 T, K grupları) anesteziye alındıktan sonra bir enjektör yardımıyla ratların kalbinden 1 ml civarında kan alındı ve alınan kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Serumlarda karaciğer enzimleri olarak aspartat aminotransferaz (AST), alanin transaminaz (ALT), ve toplam protein (TP) düzeyleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarında belirlendi.

2.2.5. Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif stres ve oksidatif hasar ile ilgili parametreler arasından karaciğer dokuları SOD, MDA, GSH-Px ve spesifik bazı hücre proteinleri (Bax, Hsp60, Hsp27, Kaspaz-3, Nox-4, p38a MAPK) seçildi ve düzeyleri belirlendi.

Karaciğer dokusunda süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve malondialdehid (MDA) düzeylerinin ölçümü için; karaciğer parçalanmadan önce fosfat tampon (PBS) ile yıkandı. Sonrasında homojenizasyon tamponu ile homojenize edilen doku örnekleri santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi ve analiz için kullanıldı. Karaciğer dokusunda GSH-Px düzeyi, Paglia ve Valente (1967) tarafından belirtilen yöntemle göre çalışan ticari test kiti (Cayman, 703102) kullanılarak ölçüldü. SOD düzeyi, Sun ve ark. (1988) tarafından geliştirilen yöntemle göre çalışan ticari test kiti (Cayman, 706002) kullanılarak ölçüldü. MDA düzeyi ise, Ohkawa ve ark. (1979)'nın geliştirdiği yöntemle göre işleyen MDA test kiti (Cayman, 100009055) kullanılarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ölçümler kit protokollerine uygun olarak yapıldı. Ayrıca tüm karaciğer doku örneklerinin protein miktarı dokular homojenize edilip çözelti haline getirildikten sonra protein test kiti ile otoanalizörde (Erba XL 600) ölçüldü.

2.2.5.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivitesi: GSH-Px aktivite tayin yönteminde, H_2O_2 varlığında indirgenmiş glutasyon (GSH) enzim tarafından okside glutatona (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbandaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir. GSH-Px aktivitesi doku için U/g protein ya da kullanılan kite göre nmol/g protein olarak ifade edilir.

Kullanılan çözeltiler: 86,0 g sakkaroz, 0,372 g EDTA, 0,606 g tris tartılarak 1 litrelik balonda distile su ile çözüldü ve pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra distile su ile işaretine tamamlandı. Bu çözelti homojenizasyon tamponu olarak kullanıldı.

Doku örnekleri -80^0 C 'den çıkarılarak $+4^0\text{ C}$ 'de çözündürüldü ve süzgeç kağıdı ile kurulandı. Karaciğer örneklerinden 300 mg tartıldı. Tartılan örnekler cam tüpe

aktarıldı. Üzerine 3 ml homojenizasyon tamponu eklendi. Ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus UW 3100) yardımıyla 5 dakika boyunca homojenize edildi. (%50 güçte 5 saniye uygulama, 3 saniye boşluk şeklinde). Ardından örnekler 2000 x g de 10 dakika +4⁰C’ de santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılarak başka bir tüpe aktarıldı. 12 000 x g’de bir kez daha santrifüje edildi. Elde edilen süpernatantlar analizler gerçekleştirilinceye kadar -80⁰ C’ de saklandı. Örnekler çalışılmadan önce oda ısısına getirildi.

Yapılışı:

Okuma yapılacak 96 kuyucuklu plate üzerinde 3’er adet kuyucuk background (zemin) ve pozitif kontrol seçildi. Diğer kuyucuklar ise ölçümleri yapılacak örnekler için kullanıldı.

1. Background plate kuyucuğuna 120 µl çalışma tamponu* ve 50 µl co-substrat** karışımı eklendi.
2. Pozitif kontrol kuyucuklarına 100 µl çalışma tamponu ve 50 µl co-substrat karışımı ve 20 µl seyreltilmiş glutasyon peroksidaz (kontrol) eklendi.
3. Her örnek için 2 kuyucuğa 100 µl çalışma tamponu, 50 µl co-substrat karışımı ve 20 µl örnek eklendi.
4. Her kuyucuğa reaksiyonu başlatmak için gerekli olan 20 µl Cumene Hidroperoksit*** eklendi.
5. Plate birkaç saniye hafif şiddette çalkalandı.
6. Örnekler ve kontroller 340 nm’de her dakikada bir olmak üzere toplam 6 kez okutuldu (Absorbans düşüşü izlendi).
7. Hesaplamalar kitte belirtilen formüle göre hesaplandı:

$$\text{Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi} = \Delta A_{340} / \text{min} / 0,00373 \mu\text{M}^{-1} \times 0,19 \text{ ml} / 0,02 \text{ ml} \times \text{örnek dilüsyonu} = \text{nmol/dakika/ml}$$

(*), (**), (***): Ticari test kitinin hazır çözeltileri

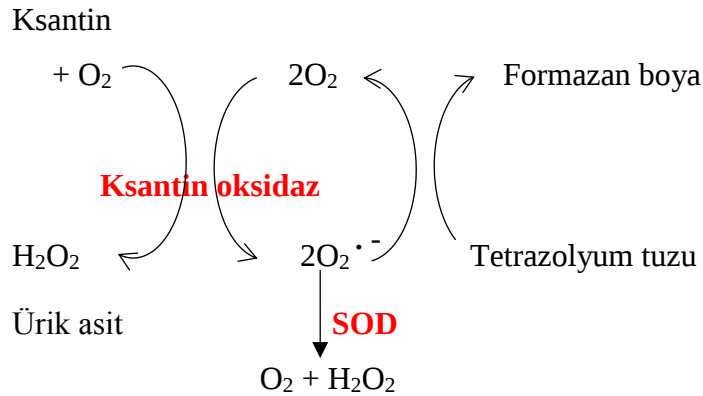
2.2.5.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi: Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, I.N.T. (Iodonitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Doku SOD aktivitesi U/g protein olarak ifade edilir

Kullanılan çözeltiler: 50 mmol/L KH_2PO_4 ve 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ olacak şekilde madde tartılarak bir miktar suda çözündürüldü ve pH'sı 7,8'e ayarlandı. Üzerine Tween 20 (% 0,5) 5 ml eklendi. Daha sonra distile su ile litreye tamamlandı.

Örnekler glutasyon peroksidaz ölçümündeki gibi uygulamadan önce oda ısısına getirildi.

Testin Çalışma Prensipleri: Ksantin oksidaz ve hipoksantin'in süperoksit radikali oluşturmaları ile test kitinin tetrazolyum tuzlarını kullanarak tespit edilmesi esasına dayanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. SOD tayininin şematik gösterilmesi

SOD standart çözeltisi: Bu çözelti ticari test kitinden hazır olarak sağlandı (No: 706005).

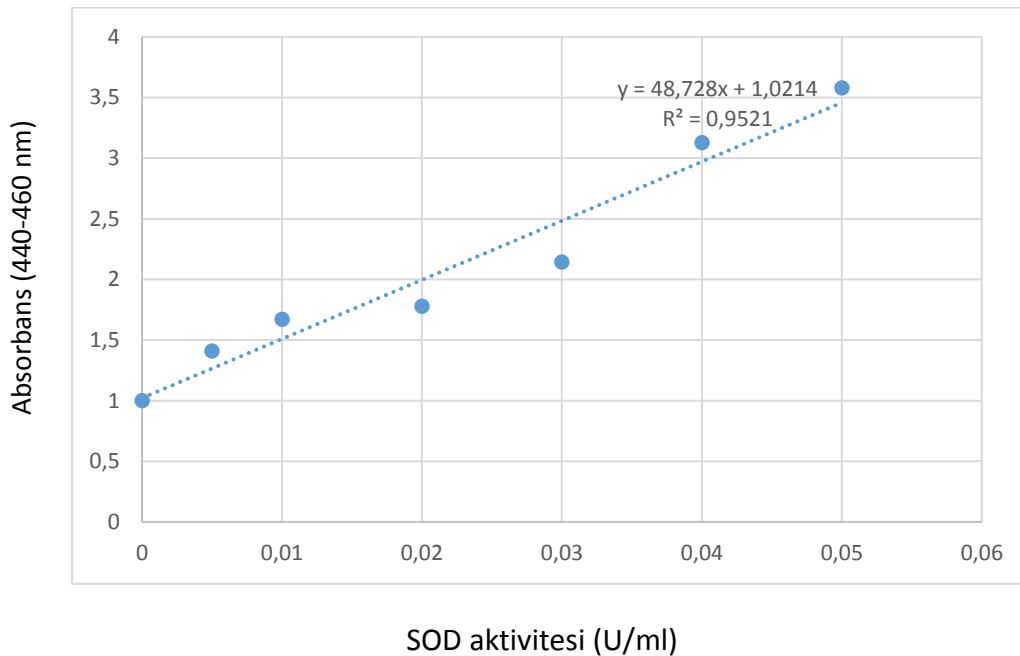
Çalışma tamponu (sample buffer) (No: 706003): Hazır kit çözeltisi

SOD stok standart çözeltinin hazırlanması: SOD standart çözeltisinden 20 µl alındı üzerine 1,98 ml çalışma tamponu eklenerek stok oluşturuldu.

SOD çalışma standart çözeltilerin hazırlanması: Stok çözeltilerden sırasıyla 0, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 µl alınarak çalışma tamponu ile 1 ml'ye tamamlanır. Herbirinin karşılığı SOD aktivitesine göre bir grafik hazırlanır (Çizelge 2.5 ve Şekil 2.3).

Çizelge 2.5 Kolorimetrik SOD çalışma standart çözeltileri

Tüp	SOD Stok (µl)	Çalışma Tamponu (µl)	SOD aktivitesi (U/ml)
A	0	1.000	0.000
B	20	980	0.005
C	40	960	0.010
D	80	920	0.020
E	120	880	0.030
F	160	840	0.040
G	200	800	0.050



Şekil 2.3 Kolorimetrik SOD standart eğrisi

Testin Yapılışı:

1. Kuyucuklara 10 µl standart kondu, üzerine 200 µl seyreltilmiş radical detector (706004) eklendi.
2. Benzer şekilde, kuyucuklara 10 µl örnek konuldu. Ardından radical detector seyreltilmiş halde 200 µl eklendi.
3. Reaksiyonun başlaması için gerekli olan ksantin oksidaz'dan 20 µl eklendi.
4. Horizontal karıştırıcıda oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
5. Plate okuyucu 440 nm'ye ayarlanarak absorbans ölçümü gerçekleştirildi.
6. Hesapalama kit'te belirtildiği gibi yapıldı.

SOD (U/ml): [(Sample LR- y-intercept)/slope) x (0,23 ml/ 0.01 ml)] x dilüsyon

Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi U/g olarak verildi. Test kitinde bildirilen aktivite ise U/ml'dir. CGS sistemine göre U/ml karşılığı U/g olup doku proteini ile değerlendirildi.

2.2.5.3. MDA Düzeyinin Tayini

Doku MDA düzeyinin belirlenmesi: Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA tayini, tiyobarbütirik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanır. Sonuçlar plazma için nmol/ml, doku için ise nmol/g olarak tanımlanır.

Kullanılan çözeltiler: Radyoimmünopresipitasyon (RIPA) tamponu (Cayman 100010263): Bu tampon çözelti ticari test kitinden hazır olarak sağlandı.

Testin çalışma prensibi: MDA-tiobarbütik asit yapılarının oluşması için yüksek ısıda (100 °C) ve asidik ortamda bekletilip kolorimetrik olarak ölçüm gerçekleştirildi. Hesaplamalarda kalibrasyon eğrisinden yararlanıldı (Şekil 2.4)

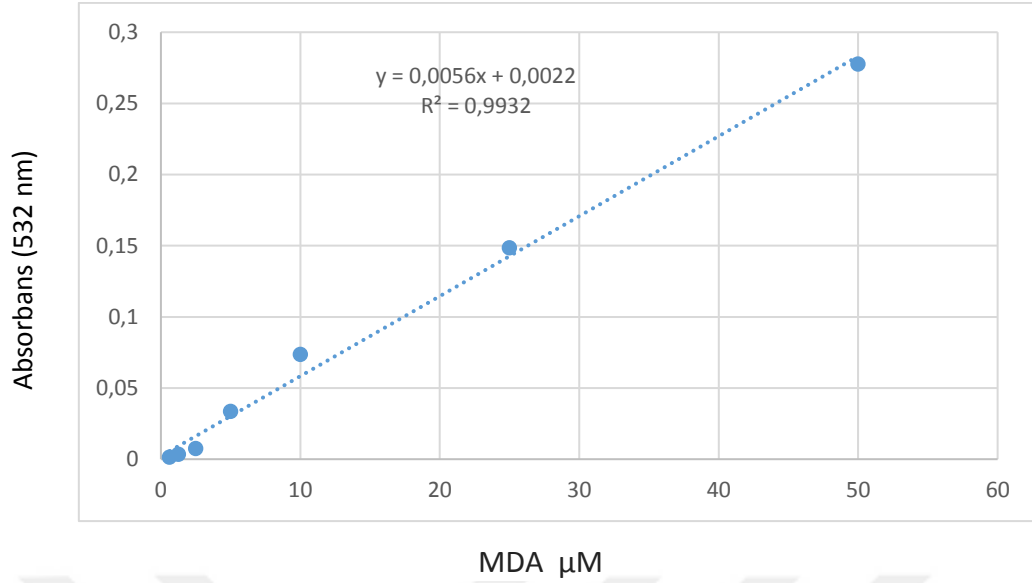
Testin Yapılışı:

250 µl MDA standartına (500 µM) 750 µl su eklendi. Böylece stok çözelti 125 µM olarak oluşturuldu. Daha sonra bu stok çözeltiden çalışma standartları hazırlandı.

1. Standartlardan (0; 0,625; 1,125; 2,5; 5; 10; 25; 50 µM) ve örneklerden 5 ml'lik viallere 100'er µl eklendi.
2. 10 µl SDS çözeltisi (kit no: 10009203) eklendi.
3. 4 ml renk ayırıcı (kit color reagent) eklendi.
4. Kaynayan su banyosunda 1 saat bekletildi.
5. Bir saatlik süresinin sonunda vialler buz içerisine alındı ve 10 dakika bekletildi.
6. Vialler'in buzda bekletme işleminden sonra +4 °C' de 1600 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Oda ısısında 30 dakika bekletildi.
8. Örneklerden ve standartlardan 150'şer µl plate kuyucuklarına konuldu. 530-540 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi.
9. Hesaplama kitte belirtildiği gibi yapıldı:

$$\text{MDA } (\mu\text{M}): [(\text{ölçülen absorbans}) - (\text{y-intercept})/\text{slope}]$$

Çalışmada karaciğer doku MDA düzeyleri kalibrasyon grafiğinden µM olarak hesaplandı. Daha sonra doku proteini ile ilişkili şekilde nmol/g protein birimine çevrildi. Hesaplamalarda MDA molekül ağırlığı 72.0636 dikkate alındı.



Şekil 2.4 Kolorimetrik MDA standart eğrisi

2.2.6 Bradford Yöntemi ile doku protein miktarı tayini

Doku örneklerinin protein ölçümleri Bradford yöntemi ile yapıldı (Bradford, 1976).

Bradford yönteminin uygulanışı: 150 µl reaktif ve 10 µl örnek ve standart alındı. 5 dakika oda ısısında bekletildi ve 660 nm’de ölçüm gerçekleştirildi.

Hesap (µg/µl): $OD_{test} / OD_{standart} \times Derişim_{Standart}$

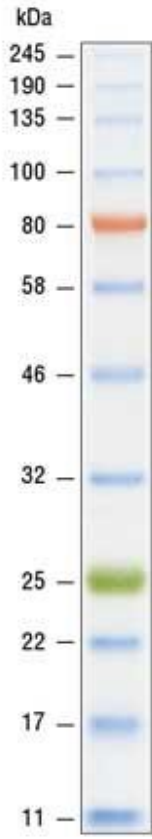
2.2.7 SDS-PAGE ile karaciğer doku proteinlerinin ayırımı

Elektroforez; ortam pH’sına göre (+) ya da (-) olarak yüklenen proteinlerin bir elektrik alanında, kendi net yüklerine zıt kutba (anot veya katod) doğru farklı hızlarda sürüklenmeleri olayıdır. Bu yöntem ile karışım halindeki proteinler elektrik yükü veya molekül büyüklüğüne göre farklı uzaklıklarda bantlar vermek suretiyle birbirlerinden ayırt edilebilirler.

SDS-PAGE ile proteinlerin yaklaşık moleköl ağırlıkları belirlenir. Burada renk korumalı protein standardı [geniş aralıklı (11–245 kDa)] kullanıldı (Şekil 2.5). Renk korumalı protein standardı, yüksek oranda saflaştırılmış, korunmuş proteinlerin, mavi bir kromoforla kovalent olarak birleştiği ve iki referans bandının (sırasıyla 80 kDa ve 25 kDa'da bir turuncu ve bir yeşil), 12 keskin bandta çözölen bir karışımıdır (0.2 mg/ml).

SDS-PAGE (% 12 akrilamid + % 10 SDS) ve sonrası membran üzerine protein transfer etkinliğinin doğrulanması (western blot) SDS-PAGE ile protein bandlarının flüoresan görüntölenmesini ve hücresele protein basımı hakkında bilgi içerir.

Karaciğer doku örneklerinin protein miktarı eşit olacak şekilde hesaplandı. Elektroforez yöntemi için jel hazırlandı. Elektroforez jelinin hazırlanması esnasında jelin dököleceğı cam plakalar etanol ile temizledi ve boşluk oluşturacak spacer düzeneğıne yerleştirildi. Düzeneğinin sızdırmadığı test edildikten sonra jel hazırlanıp dököldükten sonra tarak eklendi. Jelin donmasıyla birlikte elektroforez işleme için elektroforez tankına alınarak tarak çıkarıldı. Protein örnekleri %12'lik SDS PAGE jelinde 20 mikrogram/20 mikrolitre miktarında elektroforez jeli kuyucuklarına eklendi. Örnekler stacking jelden geçinceye kadar 10 mA, geçtikten sonra 20 mA akım uygulanarak separasyon jelde proteinlerin ayrılması sağlandı. Örneklerin bulunduğı jele moleköl ağırlıkları 11-245 kDa arasında olan protein standardı uygulandı (Biolabs Kat. No: P7712S).



Şekil 2.5. SDS-PAGE için ticari firma tarafından geliştirilmiş renk korumalı protein standart karışımı

2.2.8. Western Blotting

Jel, proteinlerin SDS-PAGE ile yürüme işlemi sonrası plakalardan ayrılarak distile suda 15 dakika yıkandı. Western blotting işlemi öncesinde Polivinilidene diflorit (PVDF) membran kesildi ve metanol içerisinde aktif hale gelinceye kadar (5-6 saniye) bekletildi. Sonrasında towbin buffer ile [25 mM Tris, 192 mM Glisin , %20 Metanol, pH 8,3 (Biorad Towbin Buffer 10x)] kullanılarak diğer blotlama materyalleri ile birlikte ıslatılması sağlandı. Blotlama kasetleri arasına blotlama kağıdı, PVDF membran, jel ve tekrar blotlama kağıdı olarak yerleştirildi. Western Blotting kasetleri tanka yerleştirildikten sonra 200 mA akımda 2 saat boyunca jelden PVDF membrana proteinler aktarıldı. Blotlama işlemi bittikten sonra membran % 5 yağsız sığır serum

albümini (fat-free BSA) ile 4⁰C’de bir gece boyunca bloklama yapıldı. Membranlar primer antikorlar beta actin (Cell Signaling 8457), Bax (Cell Signaling 14796), kaspaz-3 (Cell Signaling 9654S), Nox4 (ab 154244), p38a MAPK (2387), Hsp60 (Cell Signaling 12165) ve Hsp27 (Cell Signaling 9709) ile inkübe edildi. Sonrasında yıkama çözeltisi [0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,5% Tween-20, pH 7,4 (Biorad 10 x Towbin Buffer)] ile yıkama 3 kez 15 dakika süreyle tekrarlandı. Sekonder antikor (Invitrogen, Biotin-xx goat anti-rabbit) eklendi. İki saat çalkalayıcıda bekletildi. Tekrar yıkama çözeltisi ile 3 kez 15 dakika süreyle yıkandı. “Qdot® 625 Streptavidin Conjugate” eklendi ve bantlar görüntülendi. Görüntüleme sistemi olarak Kodak Molecular Imaging Software (v.4.0.1) (Kodak Gel Logic 200) kullanıldı.

2.2.9. Histopatolojik İnceleme

Patoloji Anabilim Dalı’na iletilen 45 rata ait karaciğer örnekleri, %10’luk nötral formaldehit içerisinde tespit olduktan sonra trimlenerek kasetlere yerleştirildi ve bunu takiben akar su’da 12 saat boyunca yıkandı. Ardından dokular rutin doku takip cihazına (Leica TP1020) alınarak, parafinde bloklandı (ThermoElectron Corp. Shandon Histocentre 3). Her bir bloktan 5 µm kalınlığında mikrotomla (Leica RM2255) hazırlanan kesitler; otomatik boyama makinesinde (Leica Autostainer XL) deparafinizasyon ve dehidrasyon aşamalarından sonra Harris’in Hematoksilen-Eozin (HE) yöntemiyle boyanarak; otomatik kapatma makinesinde (Leica CV5030) lamel ile kapatıldı. Tüm bulgular ışık mikroskobu altında (Olympus BX51) değerlendirilerek tanıları konuldu, derecelendirildi ve gerekli görülen alanlar fotoğraflandı (Olympus DP71). Bulgular semikantitatif olarak 10 farklı sahada iki uzman tarafından, 10’luk ve 40’lık objektifte patolojik değişiklikler (hiperemi, remak kordonlarında bozulma, parankim dejenerasyonu, hücre infiltrasyonu ve kanama yönünden) şiddetine göre derecelendirildi. Buna göre; (-) negatif, (+) hafif şiddette, (++) orta şiddette ve (+++) şiddetli olarak değerlendirildi.

2.3. İstatistik Hesaplamalar

Çalışma verilerinden elde edilen tüm değişkenler, önemlilik testlerine geçilmeden önce, normallik yönünden parametrik test varsayımlarından Shapiro Wilk ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Değişkenler arası farklılığın istatistik açıdan kontrolü Varyans analizi (One-Way ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testinden yararlanıldı. Tüm istatistik analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. Morfolojik parametreler One-Way ANOVA ve Duncan testi ile değerlendirildi. İstatistiki hesaplamalarda SPSS 14.01 paket programı kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Morfometrik Bulgular

Karaciğer ağırlıklarındaki artış istatistik olarak değerlendirildiğinde; 30 gün süreyle sodyum florid verilen F grubu ortalama canlı ağırlığı değişikliği; K, SF ve S grubu ratlardaki değişikliklerden istatistik olarak farklı bulundu ($p < 0.001$).

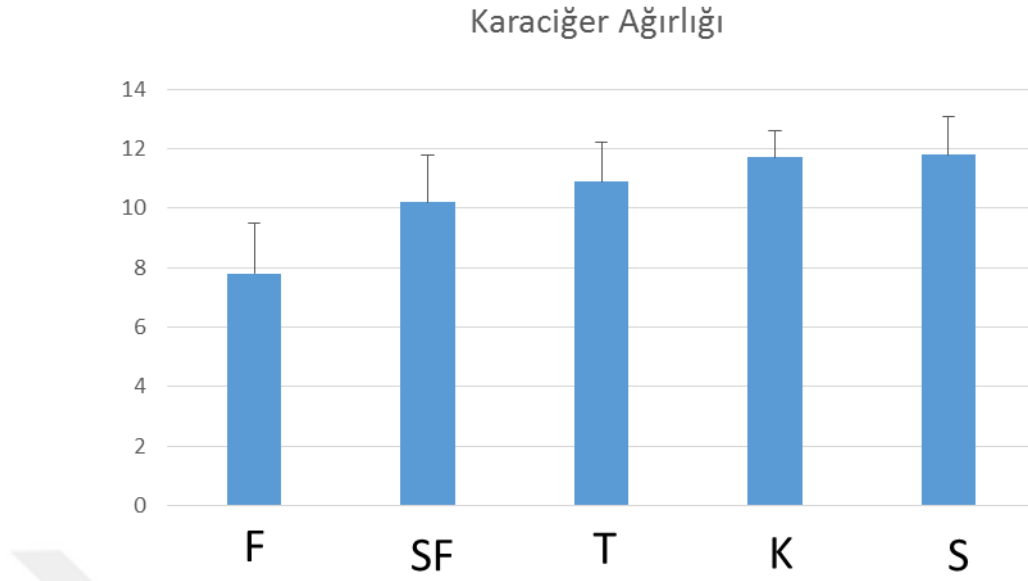
Çizelge 3.1. Gruplara göre ratların karaciğer ağırlığı ve serum protein ortalama değerleri

Çalışma Grupları	Karaciğer ağırlığı (g) $X \pm S_x$	Canlı Ağırlık Farkları* (g)
Kontrol (K)	11,7 $\pm$ 0,9 ^a	26,1 $\pm$ 8,7
Na F (F)	7,8 $\pm$ 1,7 ^b	-39,4 $\pm$ 48,5
NaF+Silimarin (SF)	10,2 $\pm$ 1,6 ^a	54,6 $\pm$ 27,4
Silimarin (S)	11,8 $\pm$ 1,3 ^a	105,5 $\pm$ 60
NaF + Silimarin Tedavi (T)	10,9 $\pm$ 1,3 ^a	26,7 $\pm$ 44,3

* Çalışmanın başlangıcındaki canlı ağırlık ölçümü ve çalışma bitimi canlı ağırlık ölçümü arasındaki fark alınmıştır.

$x \pm S_x$: Ortalama $\pm$ standart hata

^{a,b} Aynı sütundaki gruplar arası farklılıkları gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 3.1. Çalışma gruplarına göre ratların karşılaştırmalı karaciğer ağırlığı (g) ortalama değerleri

3.2. Klinik Bulgular

Çalışma sırasında herhangi bir rat kaybı yaşanmamıştır. Deney süresince ratlarda herhangi bir anormal klinik bulgu gözlenmemiştir.

3.3. Oksidatif Strese İşaret Eden Bulgular

Flor ve silimarin' in oksidatif stres parametrelerine etkileri özetlenmiştir.

Karaciğer dokusu SOD aktivitesi bakımından, 30 gün süreyle sodyum florid verilen gruptan (F) elde edilen ortalama değer istatistik olarak K ve S gruplardaki değerlerden istatistik önemli düzeyde ($p < 0,05$) düşük bulundu (Şekil 3.2).

Karaciğer dokusu MDA aktivitesi bakımından; 30 gün süreyle NaF verilen F grubundaki ratlardan elde edilen ortalama değer kontrol değerlerden ve diğer gruplardaki değerlerden istatistik olarak yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 3.3).

Karaciğer dokusu Glutasyon Peroksidaz aktivitesi bakımından; 30 gün süreyle NaF verilen F grubundaki ratlara ait ortalama değerler kontrol (K) ve sadece silimarin verilen (S) gruba ait değerlerden istatistik olarak önemli düzeyde ($p<0.001$) düşük bulundu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Gruplara göre karaciğer SOD, GSH-Px ve MDA ortalama düzeyleri

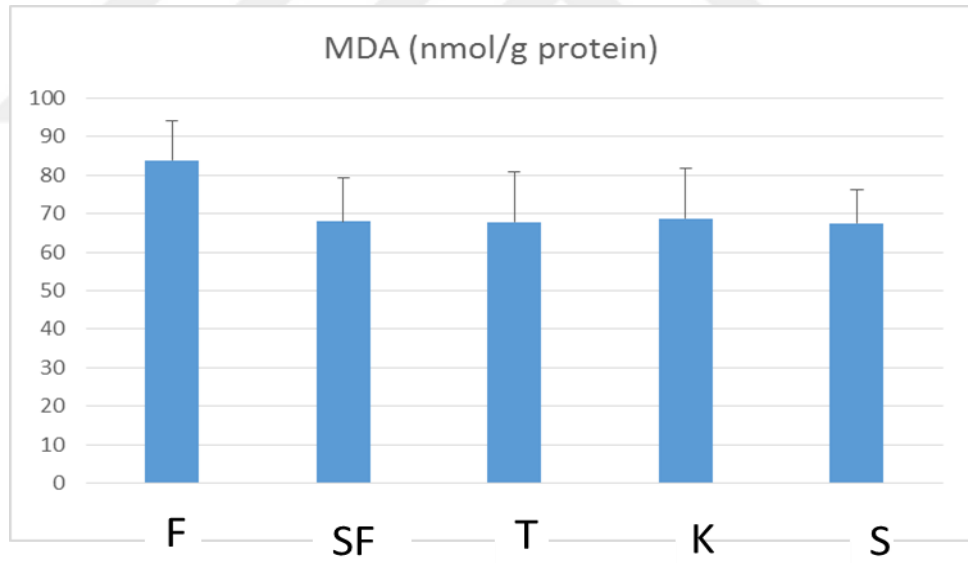
Çalışma Grupları (n=9)	Parametreler		
	SOD (U/g protein) $\bar{x}\pm Sx$	MDA (nmol/g protein) $\bar{x}\pm Sx$	GSH-Px (nmol/g protein) $\bar{x}\pm Sx$
Kontrol (K)	72,1 $\pm$ 10,1 ^a	68,7 $\pm$ 13,1 ^a	63,6 $\pm$ 12,7 ^b
Na F (F)	63,6 $\pm$ 7,1 ^b	83,8 $\pm$ 10,3 ^b	52,6 $\pm$ 9,0 ^a
NaF+Silimarin (SF)	77,6 $\pm$ 10,3 ^a	67,9 $\pm$ 11,3 ^a	80,6 $\pm$ 11,4 ^c
Silimarin (S)	77,0 $\pm$ 6,1 ^a	67,5 $\pm$ 8,6 ^a	81,0 $\pm$ 15,2 ^c
NaF+Silimarin Tedavi (T)	72,4 $\pm$ 7,3 ^a	67,8 $\pm$ 13,0 ^a	63,6 $\pm$ 12,1 ^b

$\bar{x}\pm Sx$: Ortalama $\pm$ standart hata

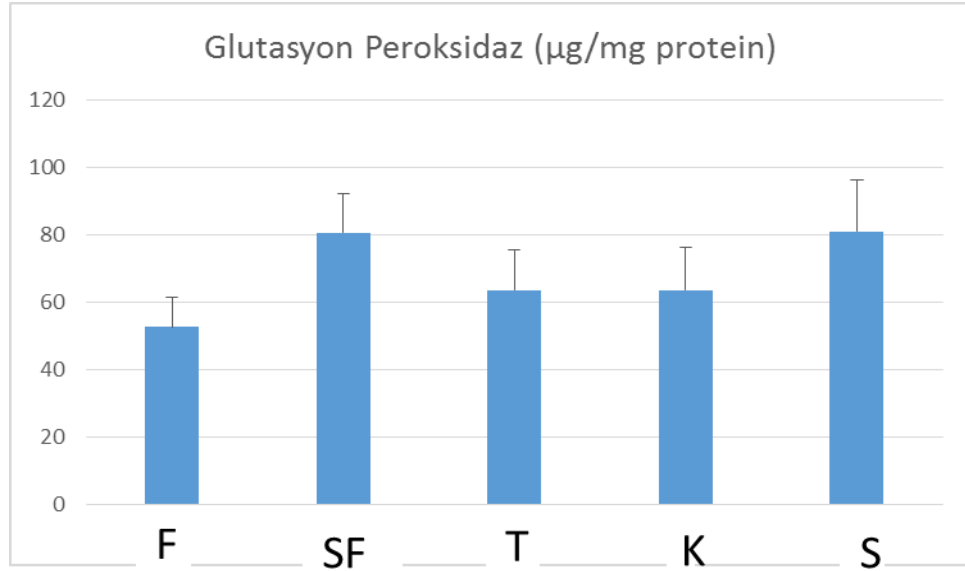
^{a,b,c} Aynı sütundaki gruplar arası farklılıkları gösterir ($p < 0.001$).



Şekil 3.2. Gruplara göre ratların karşılaştırmalı karaciğer SOD ortalama değerleri



Şekil 3.3. Gruplara göre ratların karşılaştırmalı karaciğer MDA ortalama değerleri



Şekil 3.4. Gruplara göre ratların karşılaştırmalı karaciğer GSH-Px ortalama değerleri

3.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Serum ALT aktivitesi bakımından; gruplararası fark bulunmazken; serum AST aktivitesi bakımından; sodyum florid verilen gruptan (F), sodyum florid ile birlikte silimarin verilen grup (SF) ve kontrol grubundan (K) elde edilen ortalama değerler arasında istatistik olarak önemli ($p < 0.001$) farklılıklar bulundu (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Gruplara göre ratların serum ALT ve AST ortalama değerleri

Çalışma Grupları	Parametreler			
	n	AST (IU/L) X ± Sx	ALT (IU/L) X ± Sx	Serum protein (g/dl) X ± Sx
Kontrol (K)	9	96,2±27,0 ^a	68,0±37,6	4,8±0,7
Na F (F)	9	200,9±70,5 ^d	128,3±71,9	5,0±0,9
NaF+Silimarin (SF)	9	102,6±35,2 ^a	54,9±21,2	4,9±0,4
Silimarin (S)	9	117,0±36,1 ^{ab}	59,1±12,2	4,7±0,4
NaF+Silimarin Tedavi (T)	9	149,9±38,2 ^c	88,9±48,9	4,8±0,8

x±Sx: Ortalama ± standart hata

*a,b,c,d Aynı sütundaki gruplar arası farklılıkları gösterir ($p < 0.001$).

3.5. Western Blotting Bulguları

Karaciğer dokusundan elde edilen homojenizat ile yapılan Western Blotting sonucu dansite ölçümlerinde Bax proteini ekspresyon düzeyi açısından F ve SF grubundan elde edilen değerler; kontrol grubundan elde edilen ortalama değerlerden istatistik olarak farklı bulundu ($p<0.001$). Kontrol grubu ile T grubu karşılaştırıldığında ise T grubunun istatistik açıdan farklı olduğu belirlendi ($p<0.01$). Western blot sonrası bandların dansite ölçümlerinde F, SF ve S grubuna ait Bax protein değerleri kontrol grubu Bax değerlerinden yüksek bulundu (Şekil 3.6).

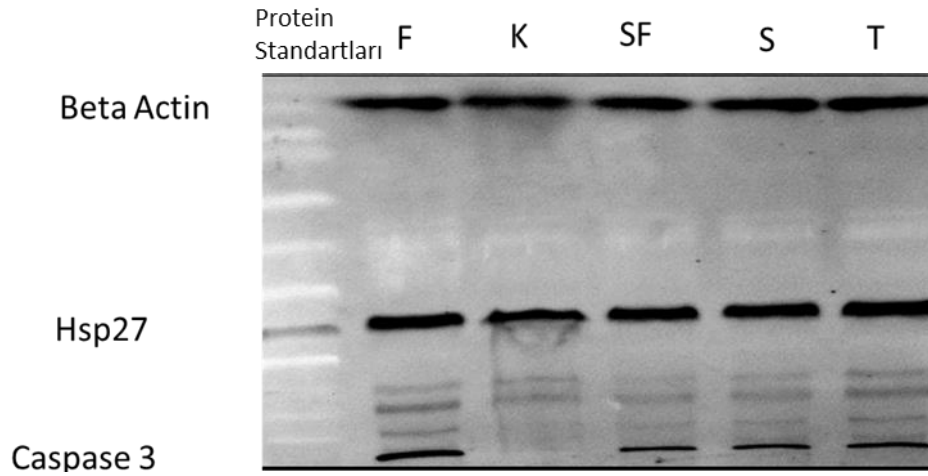
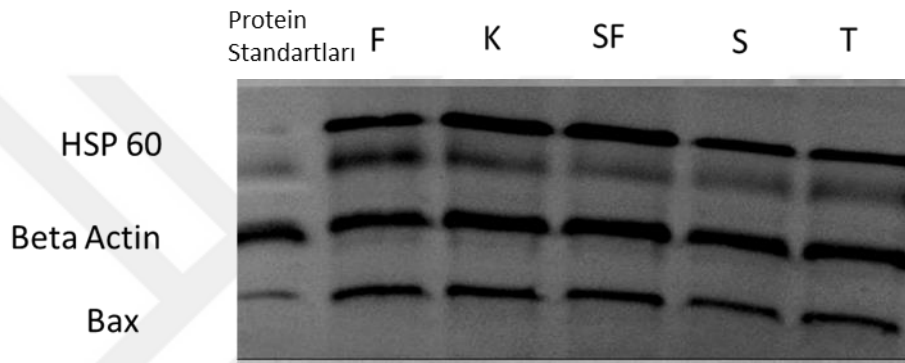
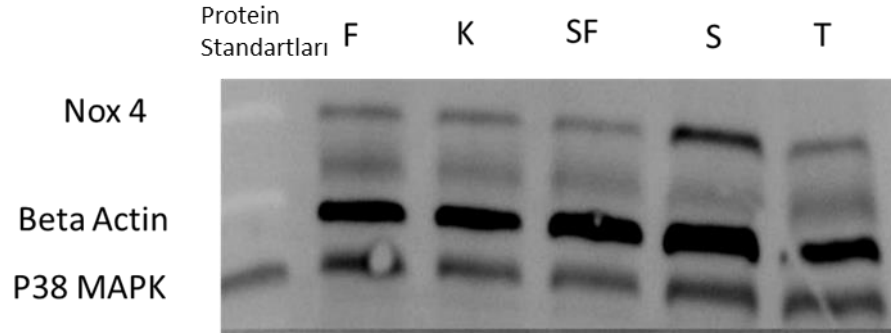
Kaspaz-3 proteini bakımından; F, SF ve T grubundan elde edilen değerler kontrol grubu değerlerinden istatistik olarak yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 3.7).

Nox 4 proteini değerlendirilmesi sonucunda kontrol grubundan elde edilen değerler F, SF ve T grubu değerlerinden istatistik olarak düşük bulundu (F ve SF grubu için $p<0.001$; T grubu için $p<0.05$) (Şekil 3.6).

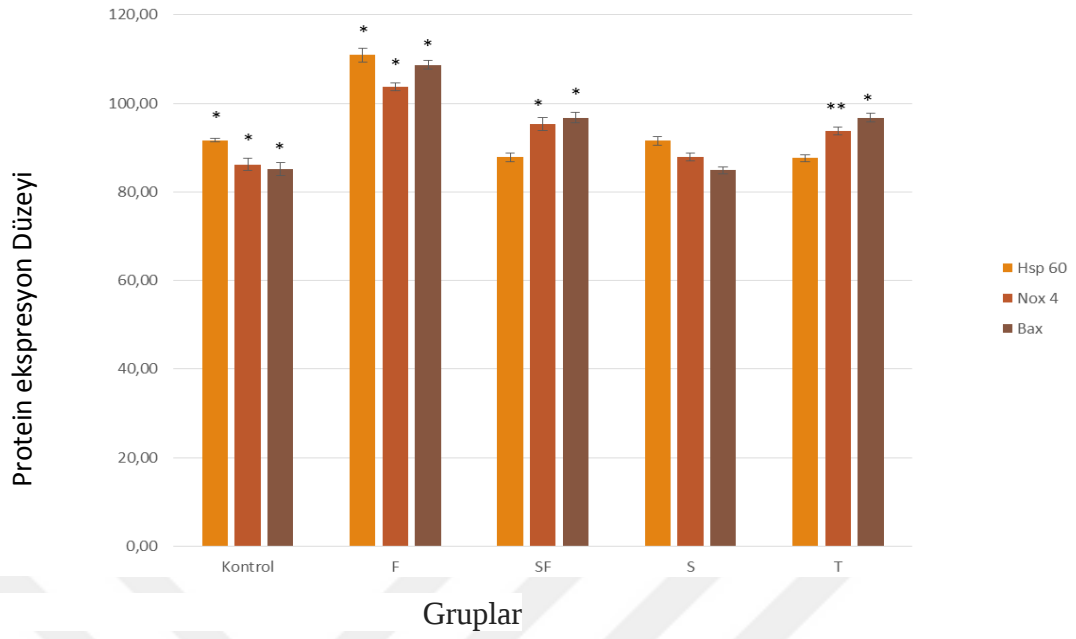
p38a MAPK proteini ölçümleri sonucunda kontrol grubundan elde edilen değerler F, SF ve T grubu değerlerinden istatistik olarak düşük bulundu ($p<0.001$) (Şekil 3.7).

Hsp 60 proteini bakımından; F grubundan elde edilen değerler kontrol (K) değerinden istatistik olarak yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 3.6).

Flor verilen grup (F) ile SF ve T gruplarına ait Hsp27 protein değerleri kontrol grubuna (K) ait değerlerden istatistik olarak önemli düzeyde ($p<0.001$) düşük bulundu (Şekil 3.7).

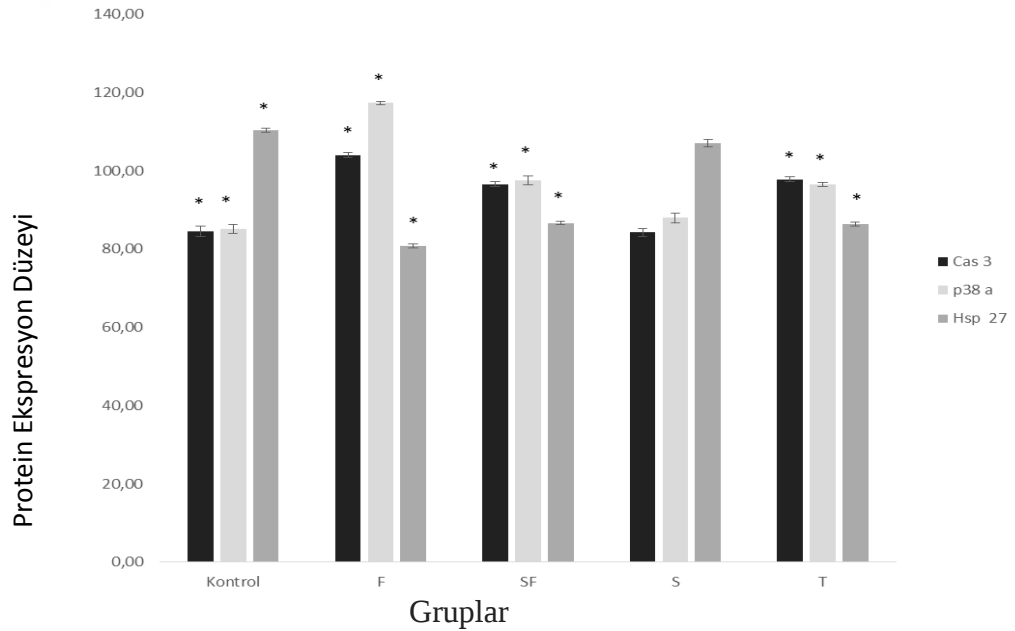


Şekil 3.5. Gruplara göre Western Blotting Bax, Hsp 60, Kaspaz 3, Hsp 27, p38 MAPK, Nox 4, Beta actin bantları (F: 30 gün süreyle flor verilen grup, K: Kontrol grubu SF: 30 gün süreyle flor ile birlikte silimarin verilen grup, S : Sadece 30 gün silimarin verilen grup, T: Tedavi grubu 30 gün florun ardından 10 gün silimarin verilen grup)



Şekil 3.6. Ratların gruplara göre karşılaştırmalı karaciğer protein ekspresyon düzeyleri (Western Blotting verileri). Gruplarda her protein (Hsp 60, Nox 4 ve Bax) kendi arasında karşılaştırıldı.

- Aynı proteine ait sütunlar arasındaki farklılığın önemliliğini ($p < 0.001$) gösterir.
- ** Aynı proteine ait sütunlar arasındaki farklılığın önemliliğini ($p < 0.05$) gösterir.



Şekil 3.7. Ratların gruplara göre karşılaştırmalı karaciğer protein ekspresyon düzeyleri (Western Blotting verileri). Gruplarda her protein (Kas-3, p38a ve Hsp-27) kendi arasında karşılaştırıldı.

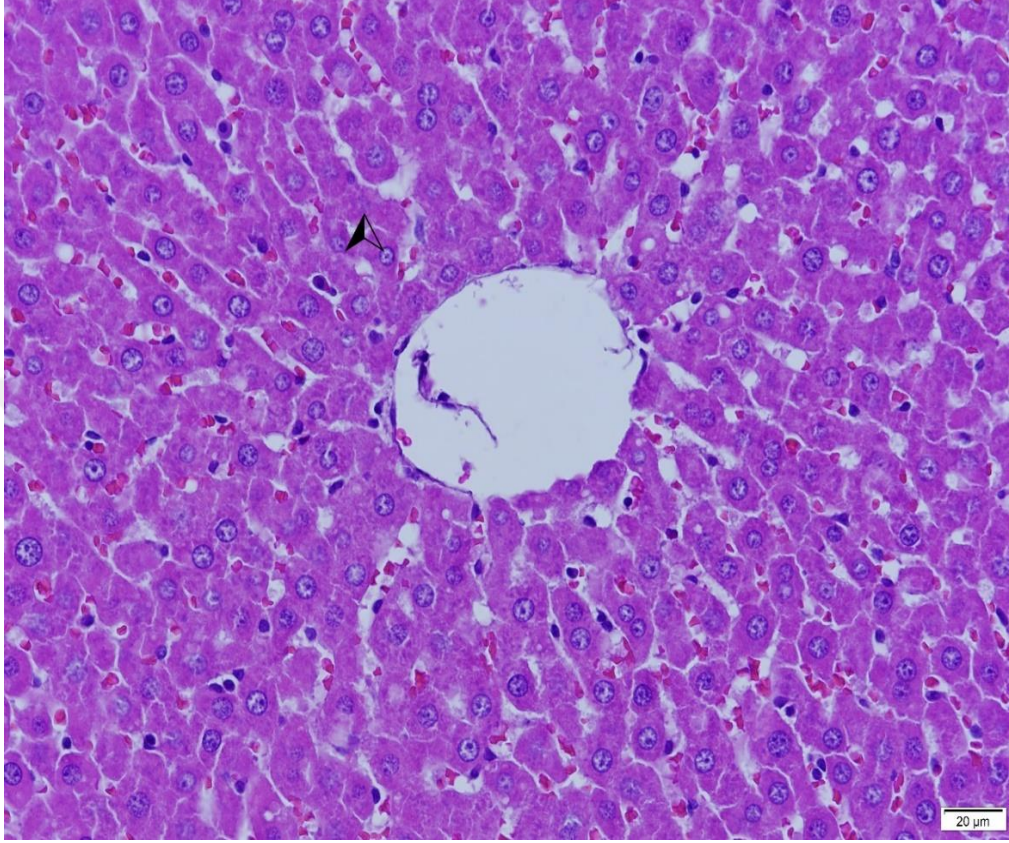
- * Aynı proteine ait sütunlar arasındaki farklılığın önemliliğini ($p < 0.001$) gösterir.

3.6. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik inceleme sonuçlarının değerlendirmesinde; F grubu remak kordonlarında bozulma, dejenerasyon, kanama, hiperemi ve hücre infiltrasyonu verileri kontrol grubu verilerinden daha yüksek pozitif değerlere sahip olduğu belirtildi. Ayrıca F grubu verileri T, SF, S grubu verilerinden remak kordonlarında bozulma, dejenerasyon, hiperemi ve hücre infiltrasyonu yüksek pozitif değerlere sahip olduğu saptandı.

Yapılan istatistik değerlendirmede remak kordonlarında bozulma bakımından flor verilen grup (F) ile S grubu ve T grubu arasında fark bulundu ($p<0.01$). Ayrıca dejeneratif değişimler değerlendirildiğinde flor grubu ile T grubu ve SF grubu arasında fark anlamlı bulundu ($p<0.001$). Hipereminin değerlendirilmesinde ise flor grubu ile SF ve S grubu arasında istatistik fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Hücre infiltrasyonu bakımından F grubu ile SF, S ve T grubu arasında fark anlamlı bulundu ($p<0.05$).

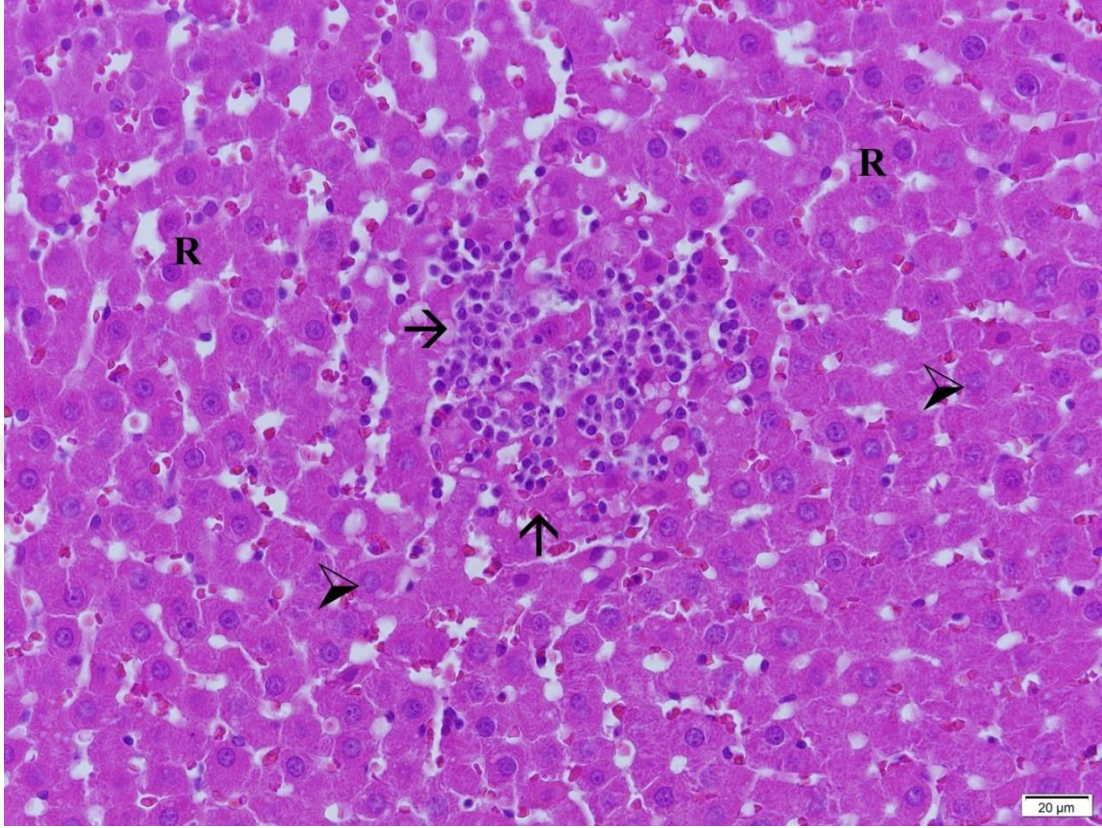
Kontrol grubu: Altı hayvanda hepatositlerin bazı kesitlerinde hafif şiddette dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Genel olarak, damarlarda hiperemi (2 ++ ve 7 +) mevcuttu (Şekil 3.8 ve Çizelge 3.4).



Şekil 3.8. Hafif şiddette dejenerere hepatosit (ok başı), HE boyama (Kontrol grubu)

Flor grubu: Mikroskopik incelemede çoğunlukla karaciğer epitel hücrelerinin eozinofilik sitoplazmalı, veziküler ve/veya iri çekirdekli bazı sahalarda çekirdekçiğin daha soluk (parankim dejenerasyonu) olduğu görüldü (Şekil 3.9). **Bu değişiklikler 6 hayvanda şiddetli (+++) gözlenirken 3 hayvanda orta şiddette (++) idi** (Çizelge 3.4). Söz konusu dejeneratif değişikliklerin yanı sıra Remak kordonları düzensizdi (5 +++; 3 ++ ve 1 +). Küçük çaplı damarlarda yoğun hiperemi (2 +++; 6 ++ ve 1 +) ve özellikle portal bölgelerde 4 hayvanda şiddetli, 5 hayvanda ise orta şiddetli perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Çizelge 3.4). Bu

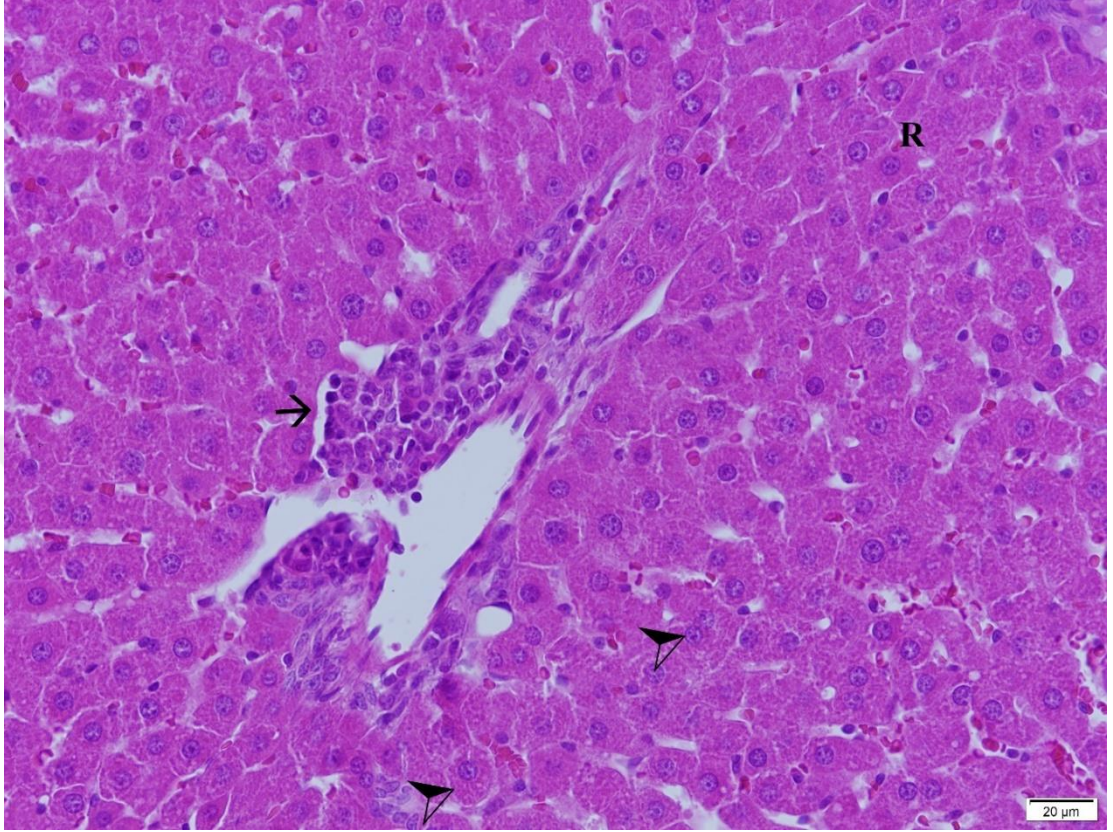
hayvanların 2'sinde yer yer fokal kanama alanları (2++) da mevcuttu (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.8).



Şekil 3.9. Yangısal hücre infiltrasyonu (oklar), dejeneratif hepatositler (ok başları) ve düzensiz remak kordonları (R). HE boyama (Flor grubu).

Silimarin + flor grubu: Özellikle periasiner yerleşimli karaciğer epitel hücrelerinin eozinofilik sitoplazmalı oldukları, sitoplazmalarının granüler görüldüğü, çekirdeğin tül perdesi arkasındaymış gibi soluk ve mat olduğu görüldü (Şekil 3.10). **Söz konusu değişiklikler 2 hayvanda orta şiddette, 4 hayvanda hafif şiddetteydi** (Çizelge 3.4). Remak kordonları düzensizdi (4++; 3+ ve 2-). Bazı kesitlerde portal bölgelerdeki damarların çevresinde **1 hayvanda şiddetli (+++), 5 hayvanda orta şiddetli (++)**, **3 hayvanda ise hafif şiddetli (+)** (Çizelge 3.4) perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonlarıyla birlikte bu bölgelerde ödem görülürken

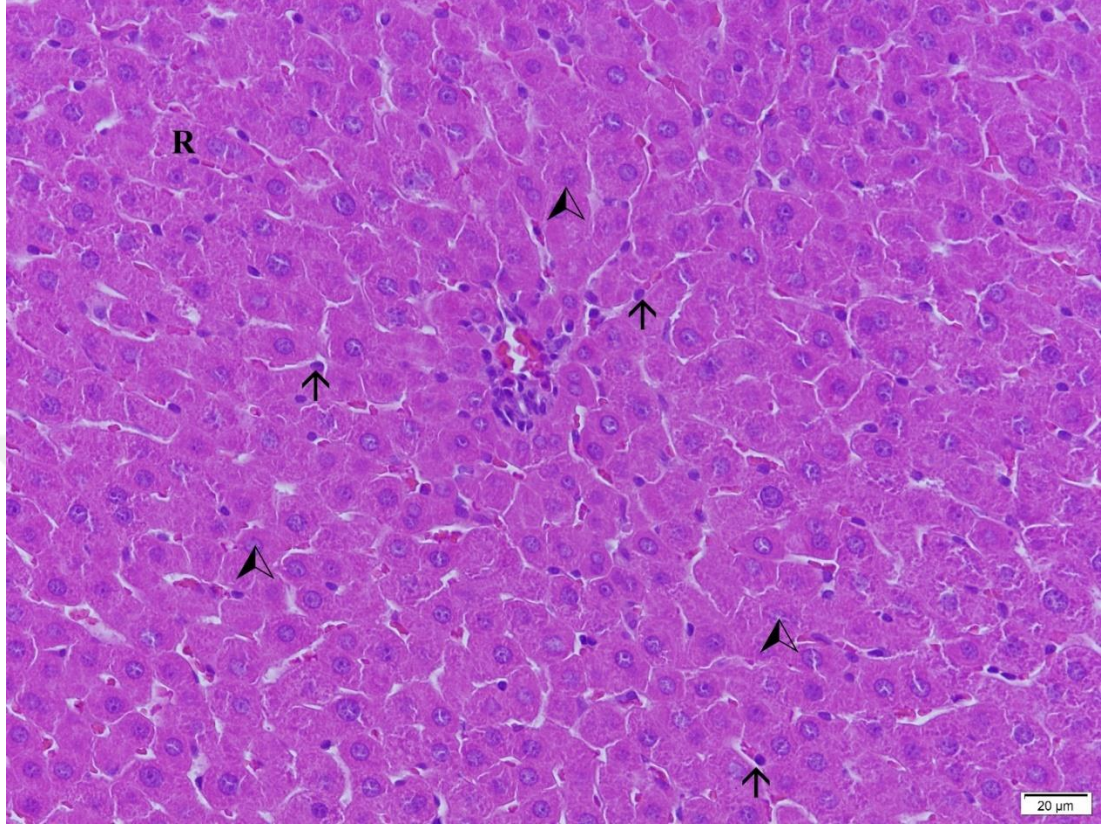
bazılarında ise sadece portal bölgelerde ödem gözlemlendi. Bazı kesitlerde küçük çaplı damarlarda hafif şiddetli hiperemi (5 +) görüldü (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.9).



Şekil 3.10. Düzensiz Remak kordonları (R), yangısal hücre infiltrasyonları (ok), ve dejeneratif hepatositler (ok başları). HE boyama (Silimarin + flor grubu)

Silimarin grubu: Hepatositlerin sitoplazma sınırlarının genellikle belirsiz, sitoplazmalarının eozinofilik ve granüler yapıda olduğu, çekirdeklerinin veziküler ve tül perde arkasındaymış gibi görüldüğü ve Kupffer hücrelerinin belirgin ve şişkin oldukları dikkati çekti (Şekil 3.11). Bu dejeneratif değişiklikler 2 hayvanda şiddetli şekilde (+++), 3 hayvanda orta şiddetli (++) ve 2 hayvanda düşük şiddetli (+) olarak gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Bunların yanı sıra hafif şiddetli hiperemi (2 ++; 4 + ; 3 -) ve bazı preparatlarda özellikle portal bölgelerde 2 hayvanda orta şiddetli, 4 hayvanda düşük şiddetli mononükleer hücrelerden oluşan perivasküler hücre infiltrasyonları

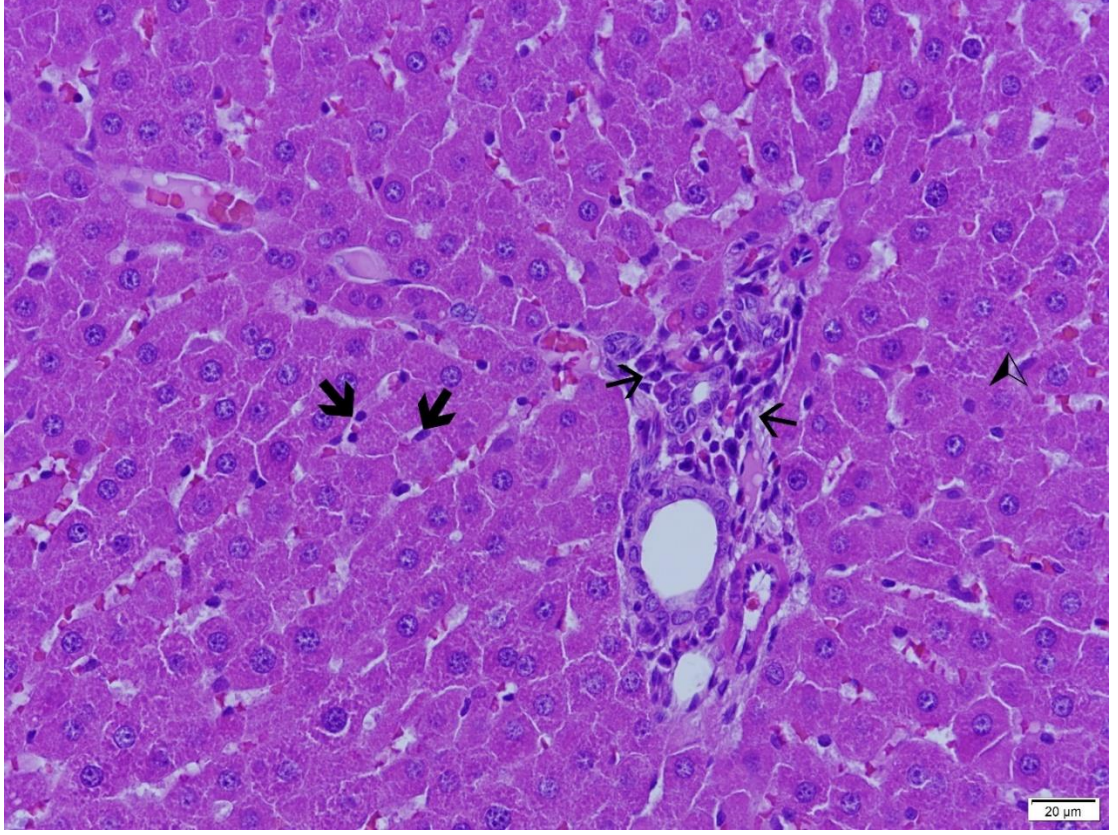
(2++; 4+ ve 3-) gözlendi (Çizelge 3.4). Ayrıca 1 hayvanda (S5) nötrofil lökosit odakları tespit edildi.



Şekil 3.11. Dejenere hepatositler (ok başları), şişkin Kupffer hücreleri (oklar) ve düzensiz Remak kordonları (R). HE boyama (Silimarin grubu)

Tedavi grubu: Bazı hepatositler koyu eozinofilik sitoplazmalı, şişkin ve veziküler çekirdeğe sahipti. Az sayıda Remak kordonlarında bozulma gözlendi (3+ ve 6-). Dejeneratif değişiklikler 2 hayvanda orta şiddetli (++) iken, geri kalan 7 hayvanda düşük şiddetliydi (+) (Çizelge 3.4). Kupffer hücreleri belirginleşmişti. Damarlarda orta şiddette hiperemi görüldü. Portal bölgelerdeki damarların çevresinde 1 hayvanda şiddetli (+++), 2 hayvanda orta şiddetli (++), 4 hayvanda düşük şiddetli (+)

mononükleer hücre infiltrasyonları görülürken bazılarında söz konusu hücre infiltrasyonu gözlenmedi (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Hafif şiddette dejenere hepatositler (ok başı), portal bölgede hafif şiddette yangısal hücre infiltrasyonu (oklar) ve şişkin Kupffer hücreleri (kalın oklar). HE boyama (Tedavi grubu)

Çizelge 3.4. Karaciğer örnekleri mikroskopik inceleme sonuçları

Çalışma Grupları		Remak Kordonlarında Bozulma	Dejenerasyon	Kanama	Hiperemi	Hücre İnfiltrasyonu
Kontrol (K) Grubu	K1	-	+	-	++	-
	K2	-	+	-	+	-
	K3	-	-	-	+	-
	K4	-	-	-	+	-
	K5	-	+	-	+	-
	K6	-	+	-	+	-
	K7	-	-	-	++	-
	K8	-	+	-	+	-
	K9	-	+	-	+	-
Flor Grubu (F)	F1	+++	+++	-	++	++
	F2	+	+++	-	++	+++
	F3	++	++	++	+++	++
	F4	+++	++	-	+++	+++
	F5	+++	++	-	++	++
	F6	++	+++	++	+	+++
	F7	++	+++	-	++	+++
	F8	+++	+++	-	++	++
	F9	+++	+++	-	++	++
Silimarin + Flor Grubu (SF)	SF1	++	-	-	+	++
	SF2	+	++	-	-	+
	SF3	+	-	-	+	++
	SF4	++	++	-	-	+
	SF5	++	+	-	-	++
	SF6	-	+	-	+	+
	SF7	++	+	-	+	+++
	SF8	-	-	-	-	++
	SF9	+	+	-	+	++
Silimarin Grubu (S)	S1	-	++	+	++	-
	S2	+	+	-	+	+
	S3	+	++	+	-	-
	S4	-	++	-	++	+
	S5	-	+++	+	+	++
	S6	-	+	-	+	-
	S7	+	-	-	+	+
	S8	-	+++	-	-	++
	S9	-	-	-	++	+
Tedavi Grubu (T)	T1	-	+	-	-	+
	T2	+	+	-	-	+
	T3	-	++	-	++	+++
	T4	-	+	-	+	++
	T5	+	+	-	++	-
	T6	+	+	-	++	+
	T7	-	++	-	+	-
	T8	-	+	+	+	+
	T9	-	+	-	+++	++

4. TARTIŞMA

Florun, doğada bulunuşu, yanı sıra endüstride, ilaç sanayiinde kullanımı, görüntüleme yöntemi olarak kullanımı sonucu günümüzde canlıların maruz kaldığı flor oranı giderek artmaktadır. Organizma içerisinde artan flor miktarı ile birlikte çeşitli organlarda; oksidatif stres, DNA yıkımı, iyon kanalları modülasyonları ve hücre içi protein yıkımlanmaları yoluyla çeşitli dejenerasyonlar ortaya çıkmaktadır. Florun bu etkisi dokulara özgü reaksiyonlara neden olmasından kaynaklanır. Bu reaksiyonların metabolik yansımasının en tipik göstergelerinden biri oksidatif stres parametrelerindeki artıştır. Vücuda giren çeşitli uyarıcıların yol açtığı oksidatif stres durumunun eksojen antioksidanlar kullanılarak geriletilmesine ilişkin araştırmalar son yılların en gözde çalışmalarıdır (Chouhan ve Flora 2008; Chouhan ve ark., 2010).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda flor toksikasyonunun etkilerinin hafifletilmesinde veya giderilmesinde etkin sonuç alınabilecek tedaviler araştırılmış fakat bulunamamıştır. Son yıllarda flor toksikasyonunda antioksidan ile yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Antioksidan bir madde olduğu bilinen Silimarin'in karaciğerdeki fonksiyonel ve morfolojik bozuklukların düzeltilmesinde yararlı sonuçlar alındığından söz edilmektedir (Freitag ve ark., 2015; Prabu ve ark., 2017; Sabiu ve ark., 2015). Silimarin ile yapılan çalışmalarda silimarinin karaciğeri koruyucu etkilerinin olduğu ve asetaminofen, etanol, karbon tetraklorür, doksorubisin (Cecen ve ark., 2011; Kazemifar ve ark., 2012; Freitag ve ark., 2015; Yaman ve Atasever, 2016) gibi toksinlerden koruduğu bildirilmiştir. Silimarin hepatoprotektif etkisi; bu maddenin antioksidan özelliğine (Surai, 2015), lipid peroksidasyonunu önleyici etkisine (Sabiu ve ark 2015; Abascal ve Yarnell 2003) ve hepatik glutasyon üretim mekanizmalarını aktive edici etkisine (Vargas-Mendoza ve ark., 2014; Cetinkunar ve ark., 2015; Surai, 2015;) bağlı olarak gerçekleşmektedir. Silimarin'in mast hücre stabilizasyonu (Fantozzi ve ark., 1986), antienflamatorik (Alaca ve ark., 2017), immün fonksiyonu düzenleyici (Lovelace ve ark., 2015; Alaca ve ark., 2017; Esmaeil ve ark., 2017) ve antifibrosis oluşturucu (Jeong ve ark., 2005) etkileri vardır.

Ayrıca silimarin serbest radikalleri süpürücü ve membranları stabilize edici etkileri; lipidperoksidasyon ve hepatotoksik etkilerin giderilmesinde rol oynar (Abascal ve Yarnell 2003). Bu araştırmada; silimarinin sodyum florid ile oluşturulan hepatotoksite ve oksidatif strese karşı profilaktik ve terapötik etkileri hem SOD, GSH-Px gibi antioksidatif enzimlerin aktivelerinde hem lipid peroksidasyonunun göstergesi MDA düzeylerindeki değişiklikler metabolik ürünlerdeki değişiklikler hem de western blot ile gözlenen Bax, kaspaz-3, Nox4, p38a MAPK, Hsp60 ve Hsp27 gibi hücre protein düzeylerindeki değişiklikler dikkate alınarak değerlendirildi.

Florun organizmaya ve karaciğer dokusuna etkisinin ratlar üzerinde denendiği bu çalışmada; karaciğer ağırlıkları açısından F ve SF grubundaki ortalama değerler kontrol grubu değerlerden istatistik olarak önemli düşük bulundu ($p < 0.05$). NaF uygulamasının yapıldığı F grubundaki ratların karaciğer ağırlıklarındaki önemli farklılık ($p < 0.05$) florun toksik etkisi olarak değerlendirildi (Çizelge 3.1). Perera ve ark. (2018) çalışmamıza benzer şekilde, flor verilen grupta karaciğer ağırlığının diğer gruplardan daha düşük olduğunu fakat gruplar arasındaki farkın istatistik önemli olmadığını belirtmişlerdir.

Karaciğerde bir hasardan söz edebilmek için karaciğer enzim düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Bu araştırmadaki gruplarda belirlenen serum ALT değerleri arasında belirgin artışa rağmen istatistik olarak önemli fark bulunmazken serum AST aktivitesinde sodyum florid verilen grup ile sodyum florid ile birlikte silimarin verilen ve kontrol grubu arasında istatistik önemli fark ($p < 0.001$) saptandı (Çizelge 3.3). Yapılan çeşitli çalışmalarda (Iheka ve ark., 2015; Emejulu ve ark., 2016; Perera ve ark., 2018) flor verilen grupta serum AST ve ALT değerlerinin bulunan değerlerden daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Aynı araştırmacılar antioksidan uygulamalarının florun söz konusu enzim aktivelerine olan etkisinin giderebileceğine dair veriler ortaya koymuşlardır. Yapılan bir çalışmada (Perera ve ark., 2018) çalışma öncesi değerlere göre çalışmanın 30. gününde belirledikleri ALT değerinde istatistiksel bir fark bulunamazken, 60. günde belirledikleri değerin istatistik olarak farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde kontrol grubu ALT değerleri ile çalışmanın 30. gününde belirlenen ALT değerleri arasında istatistik olarak bir fark

bulunamadı. Kontrol grubuna göre, Flor uygulanan gruptaki (F) ALT ve AST değerlerindeki belirgin artış (Çizelge 3.3) karaciğer yıkımını gösterirken, silimarin ile birlikte flor uygulanan grup (SF) ve flor uygulamasını takiben silimarin uygulanan gruptaki (S) enzim düzeylerindeki düşüşler silimarinin flor toksikasyonundaki etkinliğine yorumlandı.

Oksidatif stresin hücre ölümüne neden oluşu genellikle lipid peroksidasyonu (LPO) ile birlikte olur. LPO'da lipidlerin oksidatif dejenerasyonu söz konusudur. Bu dejenerasyon lipid membranlarında elektron kaybı sonucu oluşur. Bu olay özellikle çok doymamış yağ asitlerinde meydana gelir. LPO durumu; LPO'nun yan ürünü olan MDA'in belirlenmesiyle ortaya konulmaktadır (Agalakova ve Gusev 2011). Bu araştırmada, karaciğer dokusu MDA aktivitesi bakımından; Flor verilen gruptaki (F) ratlardan elde edilen MDA ortalama değeri, kontrol grubundan ve diğer gruplardan elde edilen ortalama değerlerden istatistik önemde ($p<0,05$) yüksek bulundu (Çizelge 3.2). Yapılan bir çalışmada (Iano ve ark., 2014), serum MDA düzeyinin flor uygulanan gruplarda azaldığı belirtilirken, çalışmamızdaki verilerle uyumlu olarak, flor uygulanan gruplarda MDA düzeyinin arttığını belirten çalışmalar da mevcuttur (Vasant ve Ekambaram ve ark., 2010; Narasimhacharya, 2011; Afolabi ve ark., 2013).

O_2^- , süperoksit dismutaz (SOD) tarafından yıkımlanır ve H_2O_2 ve O_2 ortaya çıkar. Birkaç çeşit farklı SOD bulunmaktadır. Bunlar; bakır, çinko enzimi (en geçerli olanı), mangan SOD ve nadiren demir SOD'dur. Bu enzimlerin tümü benzer reaksiyonları katalize eder. O_2^- 'nin doğal yoldan elimine edilmesi için daha az reaktif olan fakat potansiyel olarak daha tehlikeli kabul edilen H_2O_2 şekillenir (Edwards ve ark., 1980).

H_2O_2 'nin detoksifiye edilmesi için iki farklı enzim sistemi devreye girer. Protoporfirin yapıdaki katalaz ve peroksidaz H_2O_2 'yi direk olarak H_2O ve O_2 'ye dönüştürür. Bu enzimler tüm dokularda bulunur ve aktiviteleri H_2O_2 'nin konsantrasyonuna bağlıdır. Glutation peroksidaz H_2O_2 'yi H_2O ve oksijene çevirir. Flor ve silimarin'in oksidatif stres parametrelerinden olan SOD üzerine etkileri incelenmiştir. Bu araştırmada; karaciğer dokusu SOD aktivitesi bakımından; F grubundaki ratlardan elde edilen ortalama değer; Kontrol grubu (K) ve Silimarin grubundan (S) elde edilen ortalama değerlerden istatistik önemde ($p<0,05$) düşük

bulundu (Çizelge 3.2). Iano ve ark. (2014) yaptıkları bir araştırmada. flor verilen grupta SOD düzeyini düşük bulduklarına ilişkin verinin çalışmamız sonuçlarıyla uyumlu olduğu belirlendi.

Karaciğer dokusu GSH-Px aktivitesi bakımından; flor verilen gruptaki (F) ratlardan elde edilen ortalama değer; kontrol grubu (K) ve tek başına silimarin verilen gruptan (S) elde edilen ortalama değerlerden istatistik olarak önemli ($p<0,001$) düşük bulundu (Çizelge 3.2). Flor + silimarin grubu (SF) ve tek başına silimarin grubu (S) GSH-Px ortalama değreleri diğer çalışma gruplarına ait ortalama değerlerden yüksek hesaplandı (Çizelge 3.2). Iano ve ark. (2014) ile Vasant ve Narasimhacharya (2011)'nin yaptıkları çalışmalarda; glutasyon peroksidaz aktivitesinin flor uygulanan gruplarda arttığı belirtilirken; bir başka çalışmada (Kanagaraj ve ark., 2015) flor uygulanan grupta glutasyon peroksidaz düzeyinin düştüğü ifade edilmektedir. Çalışmamızda; flor uygulanan gruptaki SOD ve glutasyon peroksidaz değerlerinde azalma ve MDA düzeylerinde artış olması karaciğer dokusunda oksidatif hasarı gösterirken, silimarin ile birlikte flor uygulanan (SF) grupta ve flor uygulamasını takiben silimarin uygulanan (T) grupta tersine SOD ve glutasyon peroksidaz düzeylerinin yüksek, MDA düzeylerinin düşük bulunması; silimarinin antioksidan özelliği sebebiyle karaciğeri flor toksikasyonuna karşı korumuş olmasının bir göstergesi olarak yorumlandı.

Bcl-2 ailesinin apoptozisin düzenleyici üyelerinden olan Bax BH1, BH2 ve BH3 (Bcl-2 homolog domain) etkin bölge ve hidrofobik özellikte membrana bağlanma bölgesinden oluşmaktadır. Diğer Bax ailesi üyeleri (Bak, Bok, Bik, Bad, Bid gibi) benzer olarak BH3'ü bulundururken BH1 ve BH2 etkin bölgeleri hidrofobik özellikte membrana bağlanma bölgesini bulundurmaz. Bax mitokondrial membrandan sitokrom c'nin salınımında ve apoptotik hücre ölümünde rol oynar (Pawlowski ve Kraft 2000). Sodyum florid verilen ratlarda Bax düzeyinin arttığı, flor ile birlikte kaffeik asit verilen gruptaki Bax düzeyinin sadece flor verilen gruptaki Bax düzeyine göre daha düşük olduğu belirtilmektedir (Kanagaraj ve ark., 2015). Ratlarda oluşturulan deneysel flor toksikasyonu üzerine mor mısır pigmentlerinin etkisini araştıran bir çalışmada

(Zhang ve ark., 2014) sadece flor verilen grupta karaciğer Bax düzeyinde artış belirlenirken mor mısır pigmenti ile birlikte flor verilen grupta Bax düzeyinin, sadece flor verilen gruptaki Bax düzeyinden daha düşük olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda; karaciğer hücre protein seviyelerinde Bax, Hsp60, Hsp27, Caspase-3, Nox-4, p38a MAPK genlerinin ifadeleri Western blot ile belirlenmiştir. Western blot ile elde edilen bandların dansite ölçümleri sonucunda kontrol grubu Bax proteini düzeylerinin F, SF ve T gruplarındaki düzeylerden düşük ve farkın istatistik önemli ($p<0.001$) olduğu saptandı (Şekil 3.6). Bax sitokrom c salınımında rol oynar ve apoptozis yolu ile hücre ölümünü gösterir. Bu konuda yukarıda bahsedilen çalışmalardaki bulgular çalışmamızdaki bulgulara benzerlik arz etmekte ve flor verilen gruplarda hücre hasarı sebebiyle kontrol grubundan farklı bulundu.

p53 hücre stresi esnasında görev yapan bir anahtar regülatör moleküldür. p53 p21, c-myc, Bcl-2, TGF-B, IL-2, Fas ve BAX genlerinin ekspresyonuna ortam oluşturur. Hücre tipine göre hücre çevresine ve onkogenik değişikliklere bağlı olarak p53'ün aktivasyonu hücre gelişimi (progresyon) ve farklılaşmasında (diferansiyasyon) inhibisyona yol açar (Vousden ve Lu 2002).

Kaspazlar programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) önemli mediatörleridir. Bunlar arasında kaspaz-3 sık sık hücre ölüm proteazı olarak önemli anahtar proteinlerin spesifik yıkılmasında görev alır. Ayrıca kaspaz-3 apoptozisin önemli göstergelerinden olan kromatin kondenzasyonu ve DNA fragmentasyonu oluşumunda önemli rol oynar (Porter ve Janicke 1999). Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada (Kanagaraj ve ark., 2015), flor verilen grupta kaspaz-3 düzeyinin arttığı; kafeik asit ile birlikte flor verilen grupta ise kaspaz-3 düzeyinin sadece flor verilen gruptaki kaspaz-3 düzeyine göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada (Song ve ark., 2015) flor verilen gruplarda kaspaz-3 düzeyinde artıştan bahsedilmektedir. Çalışmamızda; F, SF ve T gruplarına ait western blotting dansite ölçümleri sonucu belirlenen kaspaz-3 proteini düzeylerinin; kontrol grubundan elde edilen kaspaz-3 düzeylerinden istatistik önemli olarak ($p<0.001$) yüksek bulundu (Şekil 3.7). Konu ile ilgili olarak yukarıda bildirilen çalışmalarda, flor verilen gruplarda, kaspaz-3 artışı çalışmamız sonuçlarını destekler niteliktedir. Hücrede

kaspaz-3 düzeyindeki anlamlı artışın hücrede oksidatif hasar sebebiyle olduğu düşünülebilir.

Nox ailesi NADPH oksidaz proteinleridir ve biyolojik membranlardan elektron geçişinde rol oynar. Burada, elektron akseptörü genellikle oksijendir ve elektron transferi sonucu süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Nox ailesi enzimlerinin biyolojik fonksiyonu sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Nox 4, ROS üretiminin önemli kaynaklarından olup karaciğerde sentezi diğer dokulara göre yüksek düzeydedir. Hepatik fonksiyon bozukluğuna yol açan çeşitli patolojilerde Nox 4 önemli rol oynar ve proapoptotik yolları başlatır (Jiang ve ark., 2012; Pan ve ark. 2011; Zhan ve ark., 2006). Rat spermatozoasında florid ile oluşturulan oksidatif yıkımda NADPH oksidazın da rol oynadığı bildirilmektedir (Izquierdo-Vega ve ark., 2008). Yapılan benzer bir çalışmada (Kanagaraj ve ark., 2015) sadece flor verilen grupta Nox 4 düzeyinin arttığı, kafeik asit ile birlikte flor verilen grupta ise Nox 4 düzeyinin sadece flor verilen grubun Nox 4 değerine göre düşük olduğu rapor edilmektedir. Çalışmamızda; F, SF ve T grubundan elde edilen Nox4 protein düzeylerinin; kontrol grupdan elde edilen Nox 4 düzeylerinden istatistik önemde ($p<0.001$) yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3.6). Artışın, flor toksikasyonu sonucu, karaciğer dokularında gelişen oksidatif hasar ile ilişkili olduğu görüşündeyiz.

p38 mitogen-activated protein kinazlar (p38 MAPKs) UV radyasyonu, ozmotik şok, hipoksi, proinflamatorik sitokinler ve oksidatif stres gibi ekstraselüler stres durumlarında sinyal iletiminde görev alırlar. p38 MAPK, hücrelerde oksidatif stres sensörü gibi görev alır ve oksidatif stres durumunda aktive olur. Ayrıca redoks dengesinde, hücrenin canlılığının devamında, hücre farklılaşmasında, çoğalmasında ve yaşlanmasında görev alır (Tormos ve ark. 2013). Bununla birlikte p53 yaşlanmayı ve apoptozi başlatır (Vousden ve ark., 2002). p38 ve JNK gibi proteinleri içeren mitojenle aktive edilmiş protein kinazların (MAPK) aktivasyonu floridin akciğer epiteliyal hücrelerinde hücre siklusuna etkisini gösteren G proteini aktivasyonu mekanizmasının göstergesidir (Thrane ve ark., 2001). Bir başka çalışmada (Kanagaraj ve ark., 2015) flor verilen grupta p38a MAPK düzeyinin arttığı, kafeik asit ile birlikte flor verilen grupta ise düzeyin düştüğü bildirilmektedir. Çalışmamızda; western

blotting dansite ölçümleri sonucu elde edilen p38a MAPK proteininin kontrol F, SF ve T grup değerlerinin kontrol grup değerlerinden istatistik önemli düzeyde ($p < 0.001$) yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.7). Hücrede p38a MAPK protein artışının selüler oksidatif stresin varlığına işaret ettiği düşünülebilir kanısındayız.

Isı şok proteinleri (Hsp) moleküler şaperon olarak biyolojik sistemlerin başlıca düzenleyici proteinleridir. Hsp fonksiyonları protein katlanmasında görev almak, protein kümelenmesini (agregasyon) önlemek ve bozulmuş enzimlerin yıkımında (degredasyon) görev almaktır. Hsp 60 ve Hsp 27 oksidatif yıkım gibi hücresel stres durumlarında hücre koruyucu etkiye sahiptirler (Parcellier ve ark 2003; Rezzani ve ark 2005). Hsp 27 stres durumunda kısa süreli olarak yüksek miktarda sentezlenir. Hsp 27 stres durumunda; 1) Hücre iskeletini stabilize eder ve yıkımlanmış proteinlerin tamirini kolaylaştırır ya da uzaklaştırılmasını sağlayarak hücrenin normal fonksiyonunu sürdürmesini sağlar. 2) Apoptozis'e sebep olabilecek kaspaz aktivasyonunu önlemek için sitokrom c ve prokaspaz 3'ün birleşmesini önler ve redoks modülatörü olarak görev alır (Concannon ve ark, 2003).

Mitokondriyal şaperon Hsp 60'ın pro ve antiapoptotik fonksiyonu vardır. Hsp 60 oksidatif strese primer cevap olarak ortaya çıkar ve hücrelerde apoptozis oluşumuna işaret olarak kabul edilir. Süperoksit (O_2^-) oluşumu Hsp 60'ın mitokondriden sitoplazmaya geçişine (translokasyon) sebep olur ve hücrede apoptotik süreçlere işaretir (Sarangi ve ark 2013). Flor verilen ratların karaciğerinde Hsp 60 düzeyinin, kontrol grubundaki ratların karaciğerine göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Pereira ve ark., 2013). Benzer bir başka çalışmada (Kanagaraj ve ark., 2015), flor verilen grupta Hsp60 düzeyinde artış belirlenirken, kafeik asit ile birlikte flor verilen grupta Hsp60 düzeyinin F verilen gruba göre düşük olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca Panneerselvam ve ark. (2017), flor verdikleri ratların myokardiyum dokusundaki Hsp 60 düzeyinin, kontrol grubu ratların myokardiyum dokusundan elde ettikleri değerden yüksek olduğunu bildirmektedirler. Çalışmamızda, F grubuna ait karaciğer Hsp 60 protein düzeyi kontrol grubundan elde edilen Hsp 60 düzeyinden istatistik önemli derecede ($p < 0.001$) yüksek olduğu kaydedildi (Şekil 3.6). Hsp 60 proteindeki bu artışının hücrede primer oksidatif strese cevap niteliği taşıdığı kanaatindeyiz.

Çalışmamızdaki diğer gruplara ait değerlerin kontrol değerlerden istatistik anlamlı düzeyde farklı olmadıkları saptandı (Şekil 3.6).

Kanagaraj ve ark. (2015) benzer bir çalışmada, flor verdikleri grupta karaciğer Hsp27 düzeyinin azaldığını; kafeik asit ile birlikte flor verilen grupta ise karaciğer Hsp27 düzeyinin sadece flor verilen gruptaki Hsp27 düzeyine göre daha yüksek olduğunu belirtmektedirler. Benzer şekilde, Panneerselvam ve ark. (2017), flor grubu ile kontrol grubu ratların myokardiyum dokularındaki Hsp 27 düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, Hsp 27 düzeyinin flor verilen grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu dile getirmektedirler. Çalışmamızda, western blotting dansite ölçümleri sonucu elde edilen F, SF ve T gruplarına ait Hsp27 protein yoğunluğunun kontrol grubuna ait Hsp27 değerlerinden istatistik olarak önemli düzeyde ($p < 0.001$) düşük olduğu belirlendi (Şekil 3.7). Hsp 27 proteindeki bu düşüşün hücrede primer oksidatif stres süresi ile alakalı olabileceği ve önlenemeyen kaspaz aktivasyonu sonucu hücre apoptozisine yol açacağı kanaatini taşımaktayız. Çünkü, apoptozis'e sebep olabilecek kaspaz aktivasyonunu önlemek Hsp 27 proteinin görevleri arasındadır ve stres durumunda kısa süreli olarak yüksek miktarda sentezlenir (Concannon ve ark, 2003). Kanagaraj ve ark. (2015)'nin elde ettikleri sonuçlar çalışmamıza benzer; Panneerselvam ve ark. (2017)'nin verileri ise çalışmamıza zıt nitelikte bulundu.

Karaciğer hücrelerinin remak kordonlarında bozulma, dejenerasyon, kanama, hiperemi ve hücre infiltrasyonu histopatolojik incelemede esas alındı. Kontrol grubuna ait karaciğer doku kesitlerinin mikrobik değerlendirilmesinde remak kordonlarında bozulma, kanama ve hücre infiltrasyonu (-) olarak yorumlandı. Dejenerasyon ve hiperemi kriterlerinin kontrol grubunda hafif derecede olduğu değerlendirildi (Çizelge 3.4).

Aynı kriterler dikkate alınırsa F grubunda değişikliklerin daha çok şiddetli olduğu (+++), SF, S ve T gruplarında ise histopatolojik kriterlerin hafiflediği saptandı (Çizelge 3.4).

Kontrol grubuna (K) ait remak kordonlarında bozulma bakımından flor verilen grup (F) ile S grubu ve T grubu arasında istatistik önemli fark bulundu ($p<0.01$). Ayrıca dejeneratif değişimler açısından F grubu ile T grubu ve SF grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Hipereminin değerlendirilmesinde ise flor grubu ile SF ve S grubu arasında istatistik fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Hücre infiltrasyonu bakımından F grubu ile SF, S ve T grubu arasında fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Perera ve ark. 2018, yaptıkları çalışmada karaciğerin portal bölgesindeki hücrelerde saptadıkları yangısal değişikliklerin çalışmamızdaki bulgularla benzeştiği dikkati çekti. Samanta ve ark. (2016), flor verilen gruptaki olguların karaciğerlerinde histolojik olarak orta derecede yağlanma, selüler infiltrasyon, kanama alanlarının şekillendiği bulguları bu çalışmada saptanan değişikliklerle uyumlu olduğu saptandı. Sadece flor uygulanan gruplarda Nox 4, p 38 MAPK, Hsp 60 düzeylerinde artış ve Hsp 27 düzeyinde düşüş; oksidatif yıkımı, apoptozisi ve mitokondrial stres nedenli olabilecek hücre dejenerasyonu durumunu (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12) gösterdiği düşünüldü. Bu verilere bakarak, silimarinin sinyal transdüksiyon yolu ile ilişkili protein ve gen ekspresyonunu etkilediği ve flor alımına bağlı olarak gelişen histopatolojik değişimlerin önlenmesi ve düzeltilmesinde etkili olduğu kanısına varıldı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sodyum florid verilerek toksik etki oluşturulan ratlarda; flora bağılı oluşan bu toksik etkinin silimarin ile hafifletilebildiği belirlendi. Çalışmadaki analiz sonuçlarına göre; hücre yıkımı belirteçlerinin, enzim değerlerinin ve histopatolojik değişikliklerin, özellikle flor ile birlikte silimarin verilen grupta, sadece flor verilen gruba göre beklendiği üzere daha hafif derecede ortaya çıktığı saptandı. Ayrıca aynı parametrelerin karşılaştırıldığı; sadece flor verilen grup ile 30 gün süreyle sadece flor verilen ve sonrasında 10 gün süreyle sadece silimarin verilen grup arasında yapılan değerlendirmede beklendiği üzere silimarinin florun oluşturduğu toksik etkiyi hafiflettiği görüldü. Aynı parametrelerin karşılaştırıldığı kontrol grubuyla sadece silimarin verilen grup arasında herhangi bir fark belirlenmedi. Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen hücre yıkımı belirteçlerinin, enzim, değerlerinin ve histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesinde; ratlarda sadece silimarin'in verilmesinin önemli etkilere yol açmadığı, sadece flor verilen ratlarda önemli patolojik değişikliklerin ortaya çıktığı; silimarinin flor ile birlikte verilmesinin sadece flor verilen ratlardaki değişikliklerin daha hafif olarak ortaya çıkmasını sağladığı; ayrıca sadece flor verilen ve patolojik değişiklikler oluşan ratlarda daha sonra 10 gün süreyle silimarin verilmesinin patolojik değişiklikte önemli hafifletici etki yaptığı kanısına varıldı.

Silimarin'in özellikle hepatoprotektif etkisi göz önüne alınarak, florozis olgularında silimarin uygulamasının sistemik ve hücresel düzeyde etkisinin hücre sinyal yollarının aydınlatılması bakımından yararlı olacağı, ayrıca flor toksikasyon modelinde silimarin'in etkisi ve diğer moleküllerle kombine etkilerinin incelenmesi florozis olgularında veya flor ile maruziyet durumlarında uygulanabilecek tedavi seçeneklerine yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Ratlarda Sodyum Florid İle Oluşturulan Hepatotoksite Ve Oksidatif Streste Silimarin'in Kan Ve Doku Parametreleri Üzerine Etkileri

Flor oldukça reaktif bir element ve halojen ailesinin bir üyesidir. Bu çalışmada ratlarda florid kaynaklı hepatotoksisite ve oksidatif hasara karşı silimarin'in koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Ratlara bu amaçla, içme suyu ile 300 ppm NaF ad libitum verildi. Tedavi grubuna silimarin 200 ppm/gün gavaj ile verildi. Toplam 45 rat ile planlanan çalışma herbiri 9 rattan oluşan 5 grup (K, F, SF, S ve T) üzerinde gerçekleştirildi.

Flor uygulanan grupta (F) karaciğer enzimlerinden AST aktivitesinin kontrol grubuna (K) göre istatistik önemde yüksek ($p<0.001$), ALT aktivitesinin ise istatistik önemde olmamakla beraber belirgin yüksek olması flor toksikasyonuna bağlı olarak doku yıkımını gösterdiği kanısına varıldı. Enzim aktivitelerinin flor ile birlikte silimarin uygulanan grupta (SF) ve 30 gün flor uygulanması sonrası 10 gün silimarin uygulanan grupta (T) flor uygulanan gruba (F) göre bariz düşük oluşu flor toksikasyonuna karşı silimarinin karaciğer koruyucu (hepatoprotektif) etkisi olarak değerlendirildi. Bu bulgu histopatolojik verilerle de açıkça desteklendiği görüldü.

Flor uygulanan grupta (F) karaciğer dokusunda SOD ve GSH-Px değerlerindeki düşüş ile MDA düzeyindeki artış karaciğer dokusunda oksidatif hasarı gösterirken, silimarin ile birlikte flor uygulanan grupta (SF) ve 30 gün flor uygulamasını takiben 10 gün silimarin uygulanan tedavi grubunda (T) SOD ve GSH-Px düzeylerinin yüksek, MDA düzeylerinin düşük bulunması çalışmada kullanılan silimarinin antioksidan özelliği sebebiyle karaciğeri flor toksikasyonu sonucu gelişen oksidatif doku hasarına karşı korumuş olmasının bir göstergesi olarak yorumlandı.

Karaciğer dokusunda ALT, AST, SOD ve GSH-Px gibi enzim aktivitelerinde ve lipid peroksidasyon belirteci olan MDA gibi ürünlerin düzeylerinde saptanan

değişiklikler ile western blot sonucu Bax, Kaspaz-3, Nox4, p38 MAPK, Hsp60 ve Hsp27 protein hatlarında gözlenen değişiklikler hem florun hepatotoksik ve oksidatif etkileri hem de silimarinin bu olumsuz etkilere karşı profilaktik ve terapötik etkileri olarak değerlendirildi.

Flor uygulanan grupta (F) saptanan Nox 4, p 38 MAPK, Hsp 60 düzeylerindeki artış ve Hsp 27 düzeyindeki düşüş; oksidatif hasarı, apoptozisi ve mitokondrial stres nedenli olabilecek hücre hasarını gösterdiği kanısına varıldı.

Silimarin'in özellikle hepatoprotektif etkisi göz önüne alınarak, ileri düzeyde planlanacak benzer florozis model çalışmalarında silimarinin sistemik etkisinin ve hücresel düzeyde sinyal iletim yollarının aydınlatılmasında yararlı olacağı düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: Bax, Flor, glutasyon peroksidaz, hepatotoksite, Hsp60, Hsp27, MDA, oksidatif stres, SOD, Kaspaz-3, Nox-4, p38a MAPK.

SUMMARY

The Effects Of Silymarin In Sodium Fluoride-Induced Hepatotoxicity And Oxidative Stress In Rats

Fluorine is a highly reactive element and a member of the halogen family. In this study, it was aimed to investigate the protective effect of silymarin against oxidative damage and oxidative damage in rats. For this purpose, 300 ppm NaF ad libitum was given to the rats with drinking water. The treatment group was given 200 mg / day gavage. A total of 45 rats were planned to be performed on 5 groups (K, F, SF, S and T) each consisting of 9 rats.

It was concluded that AST activity of liver enzymes in F group (F) was significantly higher than control group (K) ($p < 0.001$) and ALT activity was statistically significant but not statistically significant, indicating tissue destruction due to fluorine toxicity. Enzymatic activity of the group with fluoride in the group with silymarin (SF) and 30 days after administration of fluoride 10 days in the group (s) applied to the group of fluoride (F) compared to the fluorine group (F) was considered to be the liver protective (hepatoprotective) effect of silimar against fluorine toxicity. This finding was clearly supported by histopathological data.

In the F group (F), the decrease in SOD and GSH-Px levels in liver tissue and the increase in MDA levels showed oxidative damage in liver tissue, while in the fluorine treated group (SF) with silymarin (SF) and in the treatment group (T) in the treatment group (T) for 10 days following fluorine administration. and the high levels of GSH-Px and low levels of MDA were interpreted as an indicator of the fact that the silimarine used in the study protected the liver from oxidative tissue damage caused by fluoride toxicity due to its antioxidant properties.

Changes in enzyme activity in liver tissue such as ALT, AST, SOD and GSH-Px and metabolite levels such as MDA, and changes in Bax, Caspase-3, Nox4, p38 MAPK, Hsp60 and Hsp27 protein lines as a result of western blot result in both hepatotoxic and oxidative effects of fluoride. de silimarine were evaluated as prophylactic and therapeutic effects against these adverse effects.

Nox 4, p 38 MAPK, Hsp 60 levels and decrease in Hsp 27 level detected in F group applied in fluorine group (F); It was concluded that it shows cell damage caused by oxidative damage, apoptosis and mitochondrial stress.

Considering the hepatoprotective effect of silymarin, it was thought that the systemic effect of silimarine and similar signal transduction pathways at the cellular level could be helpful in the study of similar fluorosis model.

Keywords: Bax, Fluor, glutation peroxidase, hepatotoxicity, Hsp60, Hsp27,MDA, oxidative stres, SOD, Caspase-3, Nox-4, p38a MAPK

KAYNAKLAR

- ABASCAL K, YARNELL E (2003). The many faces of silibum marianum (milk thistle) :Part 2 - Clinical Uses, Safety, and Types of Preparations. *Alt Comp Ther*, **9**: 251-256.
- AFOLABI OK, OWEYO EB, ADEKUNLE AS, ADEDOSU OT, ADEDEJI AL (2013). Correlation Between Oxidation And Dyslipidemia/Inflammatory Cytokines In Fluoride Exposure. *Arh Hig Rada Toksikol*, **64**: 521-529.
- AGALAKOVA NI, GUSEV GP (2011). Fluoride-induced death of rat erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, **25**, **8**: 1609-1618.
- ALACA N, ÖZBEYLİ D, USLU S, ŞAHİN HH, YİĞİTTÜRK G, KURTEL H, ÖKTEM G, YEĞEN CB (2017). Treatment with milk thistle extract (Silibum marianum), ursodeoxycholic acid, or their combination attenuates cholestatic liver injury in rats: Role of the hepatic stem cells *Turk J Gastroenterol*, **28**: 476-84.
- ALTINTAŞ A, FİDANCI UR, SEL T, DURU Ö, BAŞSATAN A (2000). Doğal ve endüstriyel florozisli koyunlarda böbrek fonksiyonu ve serum protein elektroforezi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **47**: 105-114.
- ANURADHA C.D., KANNO S., HIRANO S., (2001). Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL- 60 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**: 367-373.
- ATKİNS PW, OVERTON TL, ROURKE JP, WELLER MT, ARMSTRONG FA. (2010). The Group 17 Elements, *Inorganic Chemistry*, Ed., PW Atkins, TL Overton, JP Rourke., MT Weller, FA Armstrong, 5th Ed. Publisher Great Britain by Oxford University Press, W. H. Freeman and Company, 41 Madison Avenue, New York, NY 10010, p:419-439.
- ATMACA N, ATMACA H, KANİCİ A, ANTEPLİOĞLU T (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.*, **70**: 191-197.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2003). Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. u.s. department of health and human services, public health service, Atlanta, GA, September.
- BARBIER O, ARREOLA-MENDOZA L, DEL RAZO LM (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Hemico Biological Interactions*, **188**: 319-333.
- BEDNAREK D, ZDZIŚIŃSKA B, KONDRACKI M, RZESKI W, LOKAJ I, KANDEFER-SZERSZEN M (1998). Alterations in peripheral blood leukocytes functions during enzootic bronchopneumonia calves. Effect of treatment with antibiotics and immunomodulators. *DTW*, **105**: 194-199.

- BOUASLA A, BOUASLA I, BOUMENDJEL A, EL FEKİ A, MESSARAH M (2015). Hepatoprotective role of gallic acid on sodium fluoride-induced liver injury in rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **29**: 2, 14-18.
- BRADFORD MM (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- CAO J, CHEN J, WANG J, JIA R, XUE W, LUO Y, GAN X (2013). Effects of fluoride on liver apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, **91**: 1203-1212.
- CECEN E, DOST T, CULHACI N, KARUL A, ERGUR B, BİRİNCİOĞLU M (2011). Protective effects of silimarin against doxorubicin-induced toxicity. *Asian Pac J Cancer Prev*, **12** **10**: 2697-704.
- CETİNKUNAR S, TOKGÖZ S, BİLGİN BC, ERDEM H, AKTİMUR R, CAN S, EROL HS, ISGÖREN A, SOZEN S, POLAT Y (2015). The effect of silimarin on hepatic regeneration after partial hepatectomy: is silimarin effective in hepatic regeneration? *Int J Clin Exp Med* **8** **2**: 2578-2585.
- CHEN Q, WANG Z, XIONG Y, ZOU X, LIU Z (2010). Comparative study of p38 MAPK signal transduction pathway of peripheral blood mononuclear cells from patients with coal-combustion-type fluorosis with and without high hair selenium levels. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **213**: 381-386.
- CHLUBEK D, GRUCKA, MAMCZAR E, BIRKNER E, POLANIAK R, STAWIARSKA-PIETA B, DULIBAN H (2003). Activity of pancreatic oxidative enzymes and malondialdehyde concentrations in rats with hyperglycemia caused by fluoride intoxication. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ Society for Minerals and Trace Elements*, **17**: 57-60.
- CHOUHAN S, FLORA JS (2008). Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. *Toxicology*, **254**, **2**: 61-67.
- CHOUHAN S, LOMASH V, FLORA JS (2010). Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats, *Journal of Applied Toxicology*, **30**, **1**: 63-73.
- CONCANNON CG, GORMAN AM, SAMALI A (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, **8**: 61-70.
- DOĞAN İ, MERT H, İRAK K, MERT N (2016). Investigation of Antioxidant Compounds in Fluorotic Sheep. *Scientific Works. Series C Vet Med*, **2**: 23-26

- DOLLE F, ROEDA D, KUHNAST B, LASNE MC (2008). Fluorine-18 Chemistry for molecular imaging with positron emission tomography. In: *Fluorine and Health*. Edts: Tressound, A. and Haufe, G., Elsevier B. V. p.: 4-25.
- EDMUND WJ, MEDLEY GF, NOKES DJ (1996). Vaccination against hepatitis B virus in highly endemic areas: waning vaccine-induced immunity and the need for booster doses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 436-440.
- EDWARDS AA, LLOYD DC, PURROTT RJ (1980). Dicentric chromosome aberration yield in human lymphocytes and radiation quality: a resume including recent results using alpha-particles. In: *Seventh Symposium on Microdosimetry*, Edts: BOOZ J, EBERT HG, Hartfield HD, Harwood Academic Publishers. 1263-1273.
- EKAMBARAM P, NAMITHA T, BHUVANESWARİ S, ARULJOTHİ S, VASANTH D, SARAVANAKUMAR M (2010). Therapeutic Efficacy Of Tamarindus Indica (L) To Protect Against Fluoride-Induced Oxidative Stress In The Liver Of Female Rats. *Fluoride*, **43(2)**: 134–140.
- EMEJULU AA, ALİSİ CS, ASİWE ES, IGWE CU, NWOGU LA, ONWULİRİ VA (2016). Renal and Hepato-Protective Effects of *Irvingia gabonensis* Juice on Sodium Fluoride-Induced Toxicity in Wistar Rats. *J Clin Toxicol*, **6**:296.
- ERDOĞAN, S. (2002). Hatay bölgesi içme suyu örneklerinde flor düzeyleri. *Vet Bil. Derg.*, **18**: 1-2.
- ERGUN HS, RÜSSEL-SİNN HA, BAYSU N, DÜNDAR Y (1987). Studies on the fluoride contents in water and soil, urine, bone and teeth of sheep, and urine of human from eastern and western parts of Turkey. *Dtsch. Tierarstl. Wschr*, **94**: 381-440.
- ESMAEİL N, BALOUCHİ AS, GHARAGOZLOO M, MOAYEDİ B (2017). Silimarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks, *International Immunopharmacology*, **50**: 194-201.
- FANTOZZI R, BRUNELLESCHI S, RUBINO A, (1986). FMLP-activated neutrophils evoke histamine release from mast cells. *Agents Actions*, **18**: 155-158.
- FİDANCI UR, SEL T (2001). The industrial florozis couused by coal-burning power station and its effects on sheep. *Türk J. Vet. Anim. Sci*, **25**: 735-741.
- FİDANCI UR, KARAGÜL H, SEL T, SALMANOĞLU B (2005). Türkiye’de doğal ve endüstriyel florozis. I. Tıbbi Jeoloji Sempozyumu, 1-3 Aralık 2005, MTA Kültür Sitesi, Ankara, 46-47.

- FİDANCI UR, SALMANOĞLU B, MARAŞLI Ş, MARAŞLI N (1998). İç Anadolu Bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ve bunun hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences*, **22**: 537-544.
- FREİTAG AF, GABRIEL FEC, BRUNO AR, RAFAEL PA, FRANÇIELLI MSSC, RİCARDO AS, RENATA G, SİLvana-CİOMAR MCA, AMADO AB, ROBERTO KNC (2015). Hepatoprotective effect of Silimarin (*Silimum marianum*) on hepatotoxicity induced by acetaminophen in spontaneously hypertensive rats. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* p. 538317.
- GRANDJEAN P, OLSEN J H (2004). Extended follow-up of cancer incidence in fluoride-exposed workers, *J. National Cancer Inst*, **96**, **10**: 802-803.
- GUTOWSKA I, BARANOWSKA-BOSIACKA I, SIENNICKA A, BASKIEWICZ M, STACHOWSKA BE, CHLUBEK D (2011). Fluoride and generation of pro-inflammatory factors in human macrophages. *Fluoride*, **44**, **3**: 125-134.
- HAGMANN WK (2008). The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.*, **51**: 4359-4369.
- HE LF, CHEN JG (2006). Dna damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosa cells and hepatocytes. *World J. Gastroenterol.*, **12**: 1144-1148.
hekimligi&sayfa2=flour Erişim Tarihi: 03.07.2018.
- HOUSE JE (2013). Chemistry of Non-metallic Elements III Grups VIA-VIIIA, (2013). Inorganic Chemistry, James E. House, Academic Press of Elsevier, 225 Wyman Street Waltham MA 02451,USA, 2013, Elsevier. 499-549.
- IANO FG, FERREIRA MC, QUAGGIO GB, FERNANDES MS, OLIVEIRA RC, XIMENES VF, BUZALAF MAR (2014). Effects of chronic fluoride intake on the antioxidant systems of the liver and kidney in rats *J. Fluor. Chem*, **168**: 212-217.
- IHEKA CU, ONYEGEME-OKERENTA B M, ANACLETUS FC (2015). Impact of fluoride Toxicity and Ameliorative Effects of Some Antioxidants on Selected Biochemical Indices of Male Rats. *AASCIT Journal of Health*, **2(6)**: 87-92.
- IŞIKLI, B., KALYONCU, C., METİNTAŞ, S., DEMİR, TA. (2000). Eskişehir yöresindeki içme sularında florür düzeyleri. *Ekoloji Çevre dergisi*, **9**, **36**: 28-30.
- IZQUIERDO-VEGA JA, SANCHEZ-GUTIERREZ M, DEL RAZO LM (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **230**: 352-357.

- JEONG DH, LEE GP, JEONG WI, DO S, YANG H, YUAN D, PARK H, KİM K, JEONG K (2005). Alterations of mast cells and TGF-beta1 on the silimarin treatment for CCl (4)-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*, **11**: 1141-1148.
- JIANG JX, CHEN X, SERIZAWA N, SZYNDRALEWIEZ C, PAGE P, SHRÖDER K, BRANDES RP, DEVARAJ S, TÖRÖK NJ (2012). Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* **53**: 289-296.
- JIN Y, ZHAO X, ZHANG H, LI Q, LU G, ZHAO X (2016). Modulatory effect of silymarin on pulmonary vascular dysfunction through HIF-1 α -iNOS following rat lung ischemia-reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 1135-1140.
- KALMAR B, GREENSMİTH L (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**: 310-318.
- KANAGARAJ VV, PANNEERSELVAM L, GOVİNDARAJAN V, AMEERAMJA J, PERUMAL E (2015). Caffeic Acid, a Phyto Polyphenol Mitigates Fluoride Induced Hepatotoxicity in Rats: A possible Mechanism. *Biofactors*, 90-100.
- KARAGÜL, H., ALTINTAŞ, A., FİDANCI, U.R., SEL, T. (2000). Klinik Biyokimya, Ankara, Medisan 1. Baskı.
- KAZEMİFAR AM, HAJAGHAMOHAMMADI AA, SAMİMİ R, ALAVİ Z, ABBASİ E, ASL MN (2012). Hepatoprotective Property of Oral Silimarin is Comparable to N-Acetyl Cysteine in Acetaminophen Poisoning. *Gastroenterology Research*, **5**: 190-194.
- KÜÇÜKEŞMEN Ç, SÖNMEZ H (2008). Diş Hekimliğinde Florun, İnsan Vücudu ve Dişler Üzerine etkilerinin değerlendirilmesi. *S.D.Ü. Tıp. Fak. Derg.* **15**: 3. 43-53.
- LEE J, LEE SJ, LİM KT (2014). Preventive effects of ZPDC glycoprotein (24kDa) on hepatotoxicity induced by mercury chloride in vitro and in vivo. *Cell Biochem. Funct.* **31**: 579–588.
- LENNTech (2018). Periodic table Elements Fluorine, Fluorine – F, Chemical properties of fluorine - Health effects of fluorine - Environmental effects of fluorine Erişim <http://www.lenntech.com/periodic/elements/f.htm> Erişim Tarihi: 25.09.2018.
- LIU YQ (1993). Promotive action of sodium fluoride on precancerous lesions of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine (den) in rats- stereologic study of enzyme histochemistry. *Zhounghua Bing Li Xue Za Zhi*, **22**, 5: 299-301.

- LOVELACE ES, , WAGONER J, MACDONALD J, BAMMLER T, BRUCKNER J, BROWNELL J, BEYER PR, ZİNK EM, KİM Y, KYLE JE, WEBB-ROBERTSON BM, WATERS KM, METZ TO, FARİN F, OBERLİES NH, POLYAK SJ (2015). Silimarin Suppresses Cellular Inflammation By Inducing Reparative Stress Signaling *Journal of Natural Products*, 78 **8**: 1990-2000.
- MERT H, COMBA B, MERT N, CİNAR A, APAYDİN B (2016). Advanced oxidation protein products (Aopp) levels and kidney function in fluorotic Sheep. *Fluoride*, 49, **3**: 336-342.
- McDOWELL LR, ARTHINGTON JD (2005). Flourine. In: *Minerals for grazing ruminants in tropical regions*. University of Florida IFAS Edts.: McDOWELL, L. R., ARTHINGTON, J. D. . Fourth Edition. Bulletin. p.:44-46.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). (2006). Fluoride in Drinking-Water. A scientific review of EPA's standards, Washington DC.
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K (1979). Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*, **95**: 351- 358.
- OZBEY U, DEGER Y, YUR F, ÇAMBAY Z, OZBEYE G (2017). Investigation of blood antioxidant enzyme levels and glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase gene polymorphism in sheep with fluorosis. *Fluoride*. **50**: 374-382.
- ÖKSÜZ S. (2006). Pöhrenk (Kırşehir) sıcak su kaynaklarının hidrojeokimyasal incelemesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Jeoloji Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Adana, 2006.
- PAGLIA DE, VALENTINE WN (1967). Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70**: 158-169.
- PAN X, DAI Y, LI X, NIU N, LI W, LIU F, ZHAO Y, YU Z (2011). Inhibition of arsenic induced-rat liver injury by grape seed extract through suppression of NADPH oxidase and TGF- β /Smad activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **254**: 323-331.
- PANNEERSELVAM L, RAGHUNATH A, PERUMAL E (2017). Differential expression of myocardial heat shock proteins in rats acutely exposed to fluoride. *Cell Stress and Chaperones*, 22(5): 743–750.
- PARCELLIER A, SCHMITT E, GURBUXANI S, SEIGNEURIN-BERNY D, PANCE A, CHANTOME A, STEPHANIE PLENCHETTE S, KHOCHBIN S, SOLARY E, GARRIDO C (2003). HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I- β Ba proteasomal degradation. *Mol. Cell Biol.* **16**: 5790-802.

- PAWLOWSKI J, KRAFT AS (2000). Bax-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci*, **97**: 529-531.
- PEREIRA HA, LEITE ADE L, CHARONE S, LOBO JGM, CESTARI TM, PERES-BUZALAF C, RABELO MA, BUZALAF AR. (2013). Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. *PloS One*, **8**: 1-11.
- PERERA T, RANASINGHE S, ALLES N, WADUGE R (2018). Effect of Fluoride on Major Organs with the different time of Exposure in Rats. *Environmental Health and Preventive Medicine*, **23**: 17.
- PORTER GA, JANICKE RU (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death and Differentiation*. **6**: 99-104.
- PRABU K, KANCHANA N, SADIQ AM (2017). Hepatoprotective effect of *Eclipta alba* on paracetamol induced liver toxicity in rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **1**, **3**: 75-79.
- RADOSTITS O, GAY C, HINCHCLIFF K, CONSTABLE P. (2006), Disease associated with inorganic and farm chemicals. In ' *Veterinary Medicine, A textbook of the disease of cattle, horse, sheep, pigs and goats*' Ed. Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., Constable, P., 10th Edition. Saunders Ltd. London, Toronto. p.:1815-1819.
- REZZANI R, BUFFOLI B, RODELLA L, STACCHIOTTI A, BIANCHI R (2005). Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 1397–1405.
- RIDLEY W, MATSUOKA M (2009). Fluoride-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in A549 human pulmonary epithelial cells. *Toxicol. Lett.*, **188**: 180–185.
- SABIU S, SUNMONU TO, AJANI EO, AJIBOYE TO. (2015). Combined administration of silimarin and vitamin C stalls acetaminophen-mediated hepatic oxidative insults in Wistar rats. *Rev. bras. farmacogn.* **25** **1**: 29-34. SABIU S, SUNMONU TO, AJANI EO, AJIBOYE TO (2015). Combined administration of silimarin and vitamin C stalls acetaminophen-mediated hepatic oxidative insults in Wistar rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **25** **1**: 29-34.
- SARANGI U, SINGH KM, ABHIJNYA KVV, REDDY LPA., PRASAD BS, PITKE VV, PAITHANKAR K, SREEDHAR, AS (2013). Hsp60 chaperone acts as barrier to pharmacologically induced oxidative stress mediated apoptosis in tumor cells with differential stress response, *Drug Target Insights*. **7**: 35-51.
- SHASHI A, BHARDWAJ M (2011). Study on blood biochemical diagnostic indices for hepatic function biomarkers in endemic skeletal fluorosis. *Biological Trace Element Research*, **143**: 803-814.

- SHULMAN JD, WELLS LM (1997). Acute fluoride toxicity from ingesting home-use dental products in children, birth to 6 years of age. *Journal of Public Health Dentistry*, **57**: 150-158.
- SAMANTA A, BANDYOPADHYAY B, DAS N (2016). Fluoride Intoxication and Possible Changes in Mitochondrial Membrane Microviscosity and Organ Histology in Rats. *International Journal Of Scientific Research*, **5 6**: 42-45
- SONG JS, LEE HY, LEE E, HWANG HJ, KİM JH (2002). Cytotoxicity and apoptosis induction of sodium fluoride in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11, 2**: 85-91.
- SONG GH, HUANG FB, GAO JP, LİU ML, PANG WB, Lİ WB, YAN XY, HUO MJ, YANG X (2015). Effects of Fluoride on DNA Damage and Kaspaz-Mediated Apoptosis in the Liver of Rats. *Biol Trace Elem Res*. **166, 2**:173-82.
- SUN Y, OBERLEY LW, Lİ Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Nephrol*, **53**: 9-17.
- SURAI PF (2015). Silimarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, **4**: 204–247.
- ŞENDİL Ç, BAYŞU N (1973). İnsan ve hayvanlardaki Ağrı İli Doğubayazıt ilçesi köylerinde görülen flor zehirlenmesi ve bunun van ili muradiye ilçesi köylerinde de saptamamızla ilgili ilk tebliğ.
- ŞENTUT T, KIRZIOĞLU Z, GÖKÇİMEN A, ASLAN H, ERDOĞAN Y (2012). Quantitative analysis of odontoblast cells in fl uorotic and nonfl uorotic primary tooth pulp. *Turk. J. Med. Sci*, **42, 2**: 351-357.
- THANGAPANDİYAN S, MİLTONPRABU S (2013). Epigallocatechin gallate effectively ameliorates fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in the liver of rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91 7**: 528-53.
- THRANE EV, REFSNES M, THORESEN GH, LAG M, SCHWARZE PE (2001). Fluoride induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP Kinases p38 and possibly JNK. *Toxicol. Sci*, **61**: 83-91.
- TOKALIOĞLU Ş, KARTAL Ş, UĞUR Ş (2004) Determination of fluoride in various samples and some infusions using a fluoride selective electrode. *Türk. J. Chem.*, **28**: 203-211.
- TORMOS AM, TALENS-VİSCONTİ R, NEBREDAR, SASTRE J (2013). p38 MAPK: A dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. *Free Radical Research*, **47, 11**: 905-916.

- TURGUT K. (2000). Klinik Enzimoloji, In: Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis, Kürşat Turgut (Ed). Bölüm 6, 180-201, 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş.
- URBANSKY ET (2002). Fate of fluorosilicate drinking water additives. *Chem. Rev.*, **102**: 2837-2854.
- ÜLGEN R (2018). Flour http://www.dentarem.com/index.php?sayfa=koruyucu_dis_hekimligi&sayfa2=flour Erişim Tarihi: 26.09.2018.
- VARGAS-MENDOZA N, MADRİGAL-SANTİLLAN E, MORALES-GONZÁLEZ Á, ESQUİVEL-SOTO J, ESQUİVEL-CHIRINO C, GARCÍA-LUNA Y GONZÁLEZ-RUBİO M, GAYOSSO-DE-LUCİO JA, MORALES-GONZÁLEZ, JA (2014). Hepatoprotective effect of silimarín. *World Journal of Hepatology*, **6** 3: 144-149.
- VASANT, RA, NARASİMHACHARYA, A (2011). Amelioration of fluoride induced oxidative stress by *Mangifera indica* L. fruit. *Spatula DD*, **4**: 181-188.
- VOUSDEN KH, LU X (2002). Live or Let Die: The Cell's Response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 594-604.
- WANG L, KOU MC, WENG CY, HU LW, WANG YJ, Wu M (2012). Arsenic modulates heme oxygenase-1, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells: roles of ROS, NF- κ B, and MAPK pathways. *Arch. Toxicol*, **86**: 879-896.
- WANG J, SÁNCHEZ-ROSELLÓ M, ACENA J L , DEL POZO C, SOROCHİNSKY A E, FUSTERO S, SOLOSHONOK V A, LİU H (2014). Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001-2011) *Chemical Reviews*. **114** 4: 2432-2506.
- WHİTFORD GM (1983). Fluorides: metabolism, mechanisms of action and safety. *Dental hygiene*, **57**: 16-24.
- WORLD HEALTH ORGANİZATİON(WHO). (2006). In: Bailey K, Chilton J, Dahi E, M.Lennon, Jackson P, Fawell J(Eds.), Fluoride in Drinking-water, WHO Press, Switzerland.
- YAMAN D, ATASEVER A (2016). Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Yıkımı Üzerine Biberiye Ekstraktının (*Rosmarinus officinalis*) Etkisi. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* **13** 2: 83-100.
- YUR F, BELGE F, MERT N, YÖRÜK İ (2003). Changes in erythrocyte parameters of fluorotic sheep. *Fluoride*, **36**: 152-156.
- YUR F, MERT N, DEDE S, DEĞER Y, ERTEKİN A, MERT H, YAŞAR S, DOĞAN İ, İŞİK A (2013). Evaluation of serum lipoprotein and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride*, **46** 2: 90-96.

ZHAN XA, WANG M, XU ZR, LI WF, LI JX (2006). Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **20**: 83-87.

ZHANG Z, ZHOU B, WANG H, WANG F, SONG Y, LIU S, XI S (2014). Maize purple plant pigment protects against fluoride-induced oxidative damage of liver and kidney in rats. *International. Journal of Environmental Research and Public Health*, **11**: 1020-1033.



EKLER

EK-1 Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 20/07/2016
TOPLANTI NO : 2016-15
DOSYA NO : 2016-99
KARAR NO : 2016-15-153

Yürüttüğü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Hilal Karagül'ün yaptığı, araştırmacı olarak Arş.Gör.Efe Kurtde'de'nin katıldığı "Ratlarda Sodyum Florid ile Oluşturulan Hepatotoksite ve Oksitadif Streste, Silymarin'in Kan ve Doku Parametreleri Üzerine Etkileri" başlıklı araştırma projesi Kurulumuzun 08/06/2016 tarihli toplantısında alınan 2016-13-138 sayılı kararı uyarınca düzeltilmiş haliyle yeniden incelenmiştir. Söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11. maddesi ölçütlerine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Siçan
Hayvan Sayısı : 45
Geçerlilik Süresi : 01/01/2017-01/01/2018

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatın CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Efe KURTDEDE

Doğum tarihi: 20.05.1987

Doğum yeri: Kahramanmaraş

Medeni hali: Evli

İletişim: Ankara Üniversitesi Biyokimya Anabilimdalı

efekurtdede@gmail.com

05362494109

II. Eğitim

Yüksek lisans Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2013-2018

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2006-2011

Lise: Cumhuriyet Anadolu Lisesi 2002-2006

III. Ünvan

Veteriner Hekim, 2011

IV. Mesleki Deneyim

10/2013 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı

V. Yayınlar

Berrin Salmanoğlu, Gizem Aralan, Efe Kurtdede, İbrahim Çiftçi, Gingivitisli Köpeklerde Bazı Sistemik Yangı Parametrelerinin Değerlendirilmesi, Kafkas Üniv Vet Fak Derg 23 (3): 391-394, 2017.

Efe Kurtdede, Mert Pekcan, Hilal Karagül Türkiye’de Florozis Sorunu ve Florun Biyokimyasal Etkileşimi Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2017; 12(3): 320-326.

VI. Sunumlar

1. Salmanoğlu B., Aralan G., Kurtdede E., Çiftçi İ (2015). Evaluation of some systemic inflammatory parameters in gingivitis dogs. 7th National Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress, Samsun/Türkiye. ISBN: 9786050300727, 53-54. Oral Presentation Samsun, Türkiye.

2. Kurtdede E, Pekcan M, Karagül H (2017). Therapeutic and Prophylactic Effects of Silymarin in Sodium Fluoride-Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats. International Congress of Chemistry and Materials Science congress, Oral presentation Ankara, Türkiye.

3. Kurtdede E, Cengiz RS, Gök A, Kaya U, Kısmalı G (2017). The effects of silymarin on the cell viability in F-98 cell culture. 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology, 16. Oral presentation Mention Sarajevo, Saray Bosna

4. Alpay, M.; Eröz, R.; Kısmalı, G.; Kurtdede, E. Determination (2017). of Silymarin Molecule Activity in Colon Cancer by AgNOR Technique. *Proceedings*, 1, 987. Poster Presentation Kayseri, Türkiye.

5. Cengiz, R.S.; Gök, A.; Kurtdede, E.; Kısmalı, G.; Sel, T. (2017). The Antiproliferative Effect of Alpha Tocopherol in F98 Cell Culture. *Proceedings, 1*, 1054. Poster Presentation Kayseri, Türkiye.

6. Gök, A.; Kurtdede, E.; Cengiz, R.S.; Kısmalı, G.; Sel, T. (2017). The Effect of Tocopherol- α on the Cell Viability in Caco-2 Cell Line. *Proceedings, 1*, 1062. Poster Presentation. Kayseri, Türkiye.

7. Cengiz RS, Kurtdede E, Gök A, Gülendağ E, Kısmalı G (2017). The Antiproliferative Effect of EGCG İn F-98 Cell Culture. Gazi Pharma Symposium Series. Ankara, Türkiye.