

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA TAKROLİMUS KAYNAKLI BÖBREK VE
KARACİĞER TOKSİSİTESİNE KARŞI SİLİMARİNİN
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Funda TERZİ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ

KONYA -2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA TAKROLİMUS KAYNAKLI BÖBREK VE
KARACİĞER TOKSİSİTESİNE KARŞI SİLİMARİNİN
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Funda TERZİ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı tarafından
ÖYP-053 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA -2017

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Funda TERZİ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Erkan KARADAŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi


İmza

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ
Selçuk Üniversitesi


İmza

Üye: Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI
Selçuk Üniversitesi


İmza

Üye: Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU
Selçuk Üniversitesi


İmza

Üye: Prof. Dr. Fatma İLHAN
Balıkesir Üniversitesi


İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüzyıllardan beri üzerinde yoğun olarak çalışılan organ transplantasyonları artık günümüzde yaygın olarak başarıyla yapılmaktadır. Organ nakillerinde en önemli adım doku reddinin önlenmesinde etkili olan immünosüpresif ilaçların keşfidir. Organ nakillerini takiben mutlaka uzun süreli bir immünosüpresif preparat kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan immünosüpresif ilaçlardan birisi de takrolimusdur. İmmünosüpresif ilaçların uzun süreli kullanımına ilgili sıklıkla nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkiler de görülebilmektedir (Tada ve ark 1999). Bu nedenle organ nakillerinde immünosüpresif ilaçların yanı sıra antioksidan özellikli çeşitli preparatlar da kullanılmaktadır. Bu immünosüpresif ilaçların yan etkilerini azaltmak veya hücreyi oksidatif stresten korumak için Omega-3 yağ asidi, quercetin, vitamin E, aliskiren ve ardıç yağ gibi antioksidanlar kullanılmaktadır (Boigk ve ark 1997, Tada ve ark 1999, Butani ve ark 2003, Mostafavi-Pour ve ark 2008, Goksu Erol ve ark 2013, Al-Harbi ve ark 2015).

Yaygın olarak kullanılan antioksidan flavonoidlerden bir tanesi de silimarindir. Latince ismi *Silybum marianum* (L) Gaertn olan deve dikenini bitkisinden elde edilen silimarin, uzun yıllardan beri başta Hindistan olmak üzere Uzak Doğu ülkelerinde karaciğer koruyucu bir gıda maddesi olarak bilinmektedir. Günümüzde silimarin, toksik ve iskemik karaciğer yaralanmalarında, antioksidatif, antilipidperoksidatif, antifibrotik ve hatta karaciğer yenilenmesinde tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Subir Kumar Das 2008, Kocaman ve Dabak 2015).

Takrolimusun yan etkilerine karşı koruyucu olarak silimarinin kullanıldığı deneysel bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Çalışma, yüksek antioksidan özelliği bilinen silimarinin, takrolimusun böbrek ve karaciğerde neden olduğu yan etkilere karşı koruyuculuğunun belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla çalışmada histopatolojik, in situ TUNEL ve biyokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

Doktora eğitimim süresince sürekli bana destek olan, tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ'ye teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr.

Hüdaverdi ERER, Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI, Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU, Doç. Dr. Ertan ORUÇ ve Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR'e tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. M. Burak ATEŞ'e ve her ihtiyacım olduğunda yanımda olan Araş. Gör. Banu KANDİL, Araş. Gör. Esra ÇELİK ve Doktora Öğrencisi Ayşe ÇELEBİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan, babam Faik ve annem Atiye TERZİ ile kardeşlerim Fulya ve Ahmet TERZİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Funda TERZİ

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Takrolimus..... | 2 |
| 1.1.1. Takrolimus Patogenezi | 3 |
| 1.1.2. Takrolimus ve Oksidatif Stres | 3 |
| 1.1.3. Takrolimusun Nefrotoksik Etkisi | 4 |
| 1.1.4. Takrolimusun Hepatotoksik Etkisi | 5 |
| 1.1.5. Takrolimus ve Apoptozis..... | 5 |
| 1.2. Silimarin | 6 |
| 1.2.1. Silimarinin Böbrekte Koruyucu Etkisi | 8 |
| 1.2.2. Silimarinin Karaciğerde Koruyucu Etkisi..... | 9 |
| 1.2.3. Silimarinin Diğer Doku ve Organlarda Koruyucu Etkisi | 9 |
| 1.2.4. Silimarinin Antiinflamatuvar ve Antikarsinogenezis Etkisi..... | 10 |
| 2. GEREÇ ve YÖNTEMLER | 12 |
| 2.1. Gereç | 12 |
| 2.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Etik Kurul..... | 12 |
| 2.1.2. Deneme Grupları | 12 |
| 2.1.3. Takrolimus ve Silimarin | 13 |
| 2.2. Yöntem | 13 |
| 2.2.1. Canlı Ağırlık Artışı | 13 |
| 2.2.2. Makroskobik İnceleme | 13 |
| 2.2.3. Histopatolojik İnceleme..... | 13 |
| 2.2.4. İn situ TUNEL Yöntemi | 15 |
| 2.2.5. Biyokimyasal Analizler | 16 |
| 2.3. İstatistiksel Hesaplamalar | 17 |
| 3. BULGULAR | 18 |
| 3.1. Canlı Ağırlık Bulguları..... | 18 |
| 3.2. Makroskobik Bulgular | 19 |
| 3.3. Histopatolojik Bulgular | 20 |
| 3.3.1. Böbrek..... | 23 |
| 3.3.2. Karaciğer..... | 27 |
| 3.4. Apoptozis Bulguları | 31 |
| 3.4.1. Böbrek..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.2. Karaciğer..... | 34 |
| 3.5. Biyokimyasal Sonuçlar..... | 37 |
| 3.5.1. Serum Total Oksidan Seviyesi (TOS) | 38 |
| 3.5.2. Serum Total Antioksidan Seviyesi (TAS) | 39 |
| 3.5.3. Kan Serum ALT Seviyesi | 40 |
| 3.5.4. Kan Serum AST Seviyesi | 41 |
| 3.5.5. Kan Serum GGT Seviyesi | 42 |
| 3.5.6. Kan Serum Albumin Seviyesi | 43 |
| 3.5.7. Kan Serum Total Bilirubin Seviyesi | 44 |
| 3.5.8. Kan Serum Kreatin Seviyesi..... | 45 |
| 4. TARTIŞMA | 46 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 53 |
| 6. KAYNAKLAR | 54 |
| 7. EKLER..... | 59 |
| EK A: Etik Kurul Kararı | 59 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ..... | 62 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT: Alanin Aminotransferaz

AST : Aspartat Aminotransferaz

COX-2: Cyclooxygenase Enzyme-2

CYP 3A: Cytochrom-450 III A

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

dk: Dakika

FKBP : FK506 Bağlayıcı Protein

GM-CSF: Granülosit-Makrofaj Coloni Stimule Factor

GGT: Gama-Glutamil Transferaz

GP_x : Glutasyon Peroksidaz

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

ICAM-1: İntercellular Adhesion Molecule-1

IFN: İnterferon

IL-1: İnterlökin -1

IL-2: İnterlökin -2

IL-3: İnterlökin -3

IL-4: İnterlökin -4

IL-5: İnterlökin -5

IL-7: İnterlökin -7

İP: İntraperitoneal

LOX-5: 5-Lipooxygenase

MDA: Malondialdehit

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit

NF-κB: Nuclear Factor Kappa

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

MHC : Major Histocompatibility Complex

OH^- : Hidroksil Radikalleri

O_2^- : Süperoksit Anyonları

$^1\text{O}_2$: Singlet Oksijen

ROO^- : Peroksil Radikalleri

SOD: Süperoksit Dismutaz

Sli: Silimarin

Tak: Takrolimus

TRX: Thioredoxin

TOS: Total Oksidan Seviyesi

TAS: Total Antioksidan Seviyesi

$\text{TNF-}\alpha$: Tumor Necrosis Factor Alfa

$\text{TGF-}\beta$: Transforming Growth Factor Beta

TBS: Tris Buffer Solution

UV: Ultraviöle

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

μL : Mikrolitre

μm : Mikrometre

^0C : Santigrat Derece

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Takrolimusun kimyasal formülü ($C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$) (Iwasaki 2007).....2
- Şekil 1.2.** Silybum marianum (L.) Gaertn (Deve diken) bitkisi. Çiçeklenme dönemi (Tolga 2017).....8
- Şekil 1.3.** Silimarin farklı biyokimyasal enzimatik mekanizmalara etkisi.....10
- Şekil 3.1.** Sli 200 Grubu: Karaciğer, böbrekler ve dalağın normal makroskopik görünümü.....19
- Şekil 3.2.** Kontrol Grubu: Normal histolojik yapıda glomerulus ve tubuluslar. (skor 1). Böbrek. H&E.....23
- Şekil 3.3.** Sli 100 Grubu: Normal histolojik yapıda glomerulus ve tubuluslar (skor 1). Böbrek. H&E.....24
- Şekil 3.4.** Sli 200 Grubu: Normal histolojik yapıda glomerulus ve tubuluslar (skor 1). Böbrek. H&E.....24
- Şekil 3.5.** Tak Grubu: Glomeruluslarda şiddetli derecede şişkinlik ve hiperemi (yıldız) tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon ve deskuamasyon ile lümenlerinde dilatasyon ve proteince zengin sıvı (skor 4). Böbrek. H&E.....25
- Şekil 3.6.** Tak+ Sli 100 Grubu: Glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik (yıldızlar) ve hiperemi, tubulus epitellerinde şişkinlik (skor 2). Böbrek. H&E.....25
- Şekil 3.7.** Tak + Sli 200 Grubu: Glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik ve hiperemi (yıldızlar), tubulus epitellerinde şişkinlik (skor 2). Böbrek. H&E.....26
- Şekil 3.8.** Kontrol Grubu: Normal histolojik yapıda hepatosit ve sinüzoidler (skor 1). Karaciğer. H&E.....27
- Şekil 3.9.** Sli 100 Grubu: Normal histolojik yapıda hepatosit ve sinüzoidler (skor 1). Karaciğer. H&E.....28
- Şekil 3.10.** Sli 200 Grubu: Normal histolojik yapıda hepatosit ve sinüzoidler (skor 1). Karaciğer. H&E.....28
- Şekil 3.11.** Tak Grubu: Hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve bazı hepatositlerde yağ dejenerasyonu (oklar), sinüzoidlerde ise şiddetli derecede daralma, kaybolma (skor 4). Karaciğer. H&E.....29
- Şekil 3.12.** Tak + Sli 100 Grubu: Hepatositlerde şişkinlik ve sinüzoidlerde daralma (skor 2). Karaciğer. H&E x400.....29
- Şekil 3.13.** Tak + Sli 200 Grubu: Hepatositlerde şişkinlik ve sinüzoidlerde daralma (skor 2). Karaciğer. H&E.....30

| | | |
|--------------------|--|----|
| Şekil 3.14. | Pozitif kontrol Preparatı. Apoptotik hücreler(oklar).TUNELx400..... | 31 |
| Şekil 3.15. | Tak Grubu: Tubulus epitellerinde apoptotik hücreler (oklar). Böbrek. TUNEL. DAB..... | 32 |
| Şekil 3.16. | Tak + Sli 100 Grubu: Tubulus epitellerinde apoptotik hücreler (oklar). Böbrek. TUNEL. DAB..... | 32 |
| Şekil 3.17. | Tak +Sli 200 Grubu: Glomerulus ve tubuluslarda apoptozis negatif boyanma. TUNEL. DAB..... | 33 |
| Şekil 3.18. | Tak Grubu: Hepatositlerde apoptotik hücreler (oklar). Karaciğer. TUNEL. DAB..... | 34 |
| Şekil 3.19. | Tak + Sli 100: Karaciğerde apoptotik hücreler (oklar). Karaciğer. TUNEL. DAB..... | 35 |
| Şekil 3.20. | Kontrol Grubu: Apoptotik hücre (ok). Karaciğer. TUNEL. DAB. | 35 |
| Şekil 3.21. | Apoptotik hücre (ok). Karaciğer. TUNEL. DAB..... | 36 |

ÇİZELGELER

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1. Bazı bitki ve baharatlardan izole edilen Flavonoid bileşikleri (Çoban ve Patır 2010)..... | 7 |
| Çizelge 2.1. Böbrek skorlamasında esas alınan mikroskobik bulgular..... | 14 |
| Çizelge 2.2. Karaciğer skorlamasında esas alınan mikroskobik bulgular..... | 15 |
| Çizelge 3.1. Kontrol ve deneme gruplarında ratların haftalara göre canlı ağırlık değişimleri..... | 18 |
| Çizelge 3.2. Böbrek ve karaciğerin histopatolojik skorlarının gruplara göre dağılımı. | 20 |
| Çizelge 3.3. Böbrek ve karaciğerin histopatolojik skor ortalamalarının gruplara göre istatistiksel sonuçları..... | 21 |
| Çizelge 3.4. Serum Biyokimyasal Bulguların Gruplara göre Dağılımı (X±SEM)..... | 37 |

GRAFİKLER

| | | |
|---------------------|---|----|
| Grafik 3.1. | Gruplara göre ratların canlı ağırlık artış oranları..... | 20 |
| Grafik 3.2. | Böbreklerin histopatolojik bulgu skorlarına ilgili grafik..... | 21 |
| Grafik 3.3. | Karaciğerlerin histopatolojik bulgu skorlarına ilgili grafik..... | 22 |
| Grafik 3.4. | Ortalama TOS değerlerinin gruplara göre dağılım..... | 37 |
| Grafik 3.5. | Ortalama TAS değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 38 |
| Grafik 3.6. | Ortalama ALT değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 39 |
| Grafik 3.7. | Ortalama AST değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 40 |
| Grafik 3.8. | Ortalama GGT değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 41 |
| Grafik 3.9. | Ortalama Albumin değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 42 |
| Grafik 3.10. | Ortalama Total Bilirubin değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 43 |
| Grafik 3.11. | Ortalama Kreatin değerlerinin gruplara göre dağılımı..... | 44 |

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ratlarda Takrolimus Kaynaklı Böbrek ve Karaciğer Toksisitesine Karşı Silimarinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Funda TERZİ

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ /KONYA -2017

Günümüzde yaygın olarak yapılmakta olan organ nakillerinden sonra uzun süre kullanılan immünoşüpresif ilaçların yan etkilerine karşı çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır. Bu çalışma ile sık kullanılan immünoşüpresif etken olan takrolimusun ratlarda böbrek ve karaciğerde neden olduğu toksisiteye karşı silimarinin koruyucu etkisi histopatolojik, in situ TUNEL ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır.

Çalışmada 46 adet, 8 haftalık sağlıklı dişi rat kullanıldı ve çalışma 6 hafta süreyle yapıldı. I.Kontrol Grubu; sadece pelet yemle beslendi. II. Tak Grubu; 1 mg/kg/gün takrolimus İP uygulandı. III. Sli 100 Grubu; Silimarin 100 mg/kg/gün oral; IV. Tak + Sli 100 Grubu; 1 mg/kg takrolimus İP ve silimarin 100 mg/kg/gün oral uygulandı. V. Sli 200 Grubu; Silimarin 200 mg/kg/gün oral; VI. Tak + Sli 200 Grubu; 1 mg/kg/gün takrolimus İP ve silimarin 200 mg/kg/gün oral uygulandı.

Takrolimusun İP uygulandığı Tak Grubu ratlarda canlı ağırlık artışının Kontrol Grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir. Histopatolojik değişiklikler Kontrol Grubunda 1 olmak üzere lezyonun şiddetine göre 2, 3 ve 4 rakamı ile skorlandı. Bu skorlara göre değerlendirildiğinde; her iki organdaki histopatolojik değişikliklerin Tak Grubunda anlamlı ($p<0,05$) düzeyde yüksek olduğu görüldü. Takrolimusun böbrek ve karaciğerde belirgin olarak lezyona neden olduğu tespit edildi. Çalışmada Tak + Sli 100 ve Tak + Sli 200 gruplarının skorlarında, Tak Grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) düzeyde düşüş görüldü. Buna göre de silimarinin, takrolimusun böbrek ve karaciğerde neden olduğu histopatolojik değişiklikleri önleyici sahip olduğu değerlendirildi.

Kan serumu total oksidan seviyesi (TOS), Tak Grubunda diğer gruplara göre ($p<0,05$) yüksek, total antioksidan seviyesi (TAS) ise düşük olarak tespit edildi. Takrolimusun oksidatif strese neden olduğu, silimarinin de bunu düşürücü etkiye sahip olduğu belirlendi.

Çalışmanın ALT, AST, GGT, bilirubin ve kreatin değerleri Tak Grubunda, bütün gruplardan anlamlı olarak ($p<0,05$) yüksek, Tak + Sli 100 ve Tak + Sli 200 gruplarında ise değişen seviyelerde olsa da Tak Grubuna göre düşük olduğu görüldü. Bu durum takrolimusa ilgili toksisite oluştuğu ve silimarinin bu toksisiteyi azaltıcı/engelleyici bir etkisinin olduğu şeklinde değerlendirildi. Ayrıca TUNEL yöntemi ile takrolimusun apoptozisi artırıcı, silimarinin ise apoptozisi azaltıcı etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Çalışmanın sonucunda silimarinin takrolimus nefrotoksitesini ve hepatotoksitesine karşı koruyucu olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Silimarin, Takrolimus, Nefrotoksitesite, Hepatotoksitesite, Histopatoloji, TUNEL, Rat.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of the Protective Effect of Silimarin Against Tacrolimus-induced Renal and Liver Toxicity in Rats

Funda TERZİ

Department of Veterinary Pathology

PhD THESIS/KONYA 2017

Various antioxidants have been used against the side effects of long-term immunosuppressive drugs after organ transplants which are widely performed today. In this study, the protective effect of silymarin against renal and hepatic toxicity of tacrolimus, a common immunosuppressive agent, were investigated by histopathological (H&E) and in situ TUNNEL and biochemical methods.

In the experimental study, 8 weeks old, 46 healthy male rats were used. It was done for 6 weeks. Group I, Control: only the pellet was fed. Group II: Tak; 1 mg / kg / day tacrolimus was intraperitoneally (IP) administered. Group III: Sli 100; Silymarin 100 mg / kg / day peros, Group IV: Tak + Sli 100 ; 1 mg / kg tacrolimus (IP) and silymarin 100 mg / kg / day peros were administered. Group V. Sli 200; Silymarin 200 mg / kg / day (peros); Group VI. Tak + Sli; 1 mg / kg tacrolimus (IP) and silymarin 200 mg / kg / day (peros) were administered.

Live weight gain was lower in Tak Group which tacrolimus applied IP than rats in control group. Histopathologic changes were scored by the number of 1 (group control) 2, 3 and 4 according to the lesion severity. When evaluated to these scores; histopathologic changes in Tak Group were found significant ($P < 0.05$). Tak + Sli 100 and Tak + Sli Scores of the 200 groups were statistically lower than Tak Group ($P < 0.05$). According to histopathological changes preventive effect of silymarin in the kidney and liver tissue against tacrolimus was determined.

Blood serum TOS and TAS level in Tak group higher and lower, respectively than the other groups ($P < 0.05$). Thus, tacrolimus was found to cause oxidative stress, and silymarin had a reducing effect.

The ALT, AST, GGT, bilirubin and creatinine values of the in Tak Group were higher ($p < 0.05$) than all groups. All these values in Tak + Sli 100 and Tak + Sli 200 groups were found lower than Tak Group. This was assessed as tacrolimus-related toxicity and silymarin was a reducing / reducing effect of this toxicity effect.

In addition, TUNEL method showed that tacrolimus increase and silymarin decreases apoptosis. As a result of the study, it was concluded that silymarin can be used as protective against tacrolimus nephrotoxicity and hepatotoxicity.

Key Words: Silymarin, Tacrolimus, Nephrotoxicity, Hepatotoxicity, Histopathology, TUNNEL, Rat.

1. GİRİŞ

Takrolimus (FK506), organ nakillerinde transplantın reddini önlemede ve Behçet Hastalığı, Myastenia Gravis, artritis ile atopik dermatitis gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Armstrong ve Oellerich 2001). Diğer immünoşüpresif etkenlere göre moleküler ağırlığı daha düşük olan Takrolimus T-hücresi aktivasyonunu inhibe etme potansiyelinin 10 ile 100 kat daha fazla olması nedeni ile çok güçlü bir immünoşüpresif etkiye sahiptir. Ancak takrolimusun doku nakillerinden sonra da uzun süreli kullanılıyor olması sonucu metabolitleri hücrelerde birikmekte buna ilgili de hücrelerde oksidatif strese ve dolayısıyla sitotoksositeye neden olmaktadır (Vetter ve ark 2003, Burçak ve Andican 2004).

Takrolimus ve siklosporin gibi yaygın kullanılan immünoşüpresif preparatların sitotoksik etkisi sonucu genellikle nefrotoksosite, hepatotoksosite, nörotoksosite ve diabetes mellitus gibi önemli yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu ilaçların yan etkilerini azaltmak veya hücreyi oksidatif stresten korumak için daha çok E ve C vitamini ile omega 3, susam yağı, ardıç yağı gibi flavonoidler kullanılmaktadır (Butani ve ark 2003, Goksu Erol ve ark 2013).

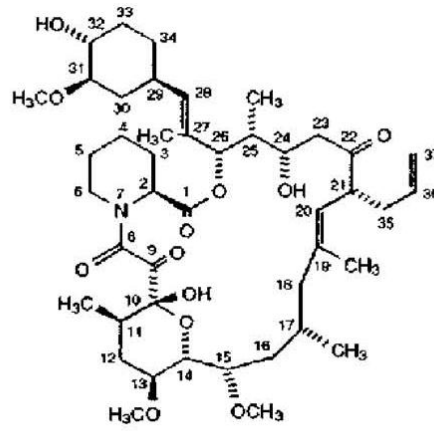
Bugüne kadar çeşitli bitkilerin yaprak, tohum, kabuk ve çiçeklerinden 4.000'in üzerinde düşük moleküler ağırlığına sahip flavonoid tespit edilmiştir (Heim ve ark 2002). Flavonoidlerin biyolojik sistemlerde koruyucu etkileri, elektronları serbest radikallere transfer etme, antioksidan enzimleri aktive etme (Elliott ve ark 1992), alfa-tokoferol radikallerini azaltma, oksidazları inhibe etme ve metal katalizörleri şelatlama (Ferrali ve ark 1997) kapasitelerine bağlı olmaktadır (Cos ve ark 1998). Bu flavonoidlerden bir tanesi de günümüzde yaygın olarak kullanılan *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Deve Dikeni) bitkisi tohumlarından elde edilen silimarin (Deve dikeni sütü)'dir. Deve dikeni tohumu yüksek antioksidan özelliği ile başta karaciğer hastalıkları, siroz, kronik hepatitis ve safra kesesi hastalıklarında destekleyici gıda olarak kullanılmaktadır (Kvasnicka ve ark 2003, Post-White ve ark 2007, Subir Kumar Das 2008).

Bu çalışma ile intraperitoneal yolla takrolimus uygulanan ratlarda silimarinin oksidatif stres, hepatotoksosite ve nefrotoksosite üzerine koruyucu etkilerinin

histopatolojik, in situ TUNEL ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Takrolimus

Japonyada Dr. T.S. Kuba tarafından 1984 yılında bulunan Takrolimus (FK506), *Streptomyces tsukubaensis* mantarından elde edilen ve 822 dalton ağırlığında immunosüpresif bir ilaçtır (Kansu 2002). Takrolimusun kimyasal formülü ise $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ 'dur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Takrolimusun kimyasal formülü ($C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$) (Iwasaki 2007).

Takrolimusun emilimi alınış şekline göre büyük ölçüde değişken olduğundan kan konsantrasyonları da farklı olmakta ve böylece biyoyararlanım oranı da %5-67 arasında (ortalama %29) değişmektedir. Takrolimus oral yolla alındığında, gıda ile alınmasına ve gıdanın yağlı olup olmamasına ilgili emilim oranı % 13 ile % 23 arasında değişiklik gösterir. Takrolimusun bağırsaklardan emiliminden sonra yaklaşık %99'u α -acit glikoprotein ve albümin ile eritrositlere bağlanır (Vicari-Christensen ve ark 2009). Bu nedenle kan konsantrasyonu plazmadan daha yüksektir (Ayna ve ark 2009). Takrolimus atılmadan önce neredeyse tamamen metabolize edilir (Iwasaki 2007).

Takrolimus karaciğerde sitokrom P-450 III A enzimi yoluyla metabolize edilir (Vicari-Christensen ve ark 2009). Ana metaboliti olan M1 formasyonundaki 13-O-dimetil-Takrolimus immunosüpresif etki gösterir (Karanam ve ark 1994, Iwasaki 2007). Peros yolla verilen takrolimusun sadece % 1'i böbreklerden, büyük kısmı ve metabolitleri de dışkı ile atılır (Iwasaki ve ark 1998, Iwasaki 2007).

1.1.1. Takrolimus Patogenezi

T lenfositler, klasik doku reddinin sorumlusu olan hücresele bağışıklıkta rol oynayan temel hücrelerdir. Takrolimus immünosüpresif etkisini T hücreleri ile etkileşime girerek gösterir. T hücrelerine girdikten sonra buradaki bağılayıcı proteine (FKBP) bağılanarak yeni bir kompleks molekül (FK506/FKBP) oluşur. FK506/FKBP molekülü de hücrede defosforilasyon, kinaz ve fosfataz aktivitesinde ve protein ekspresyonunda görev alan kalsinörine bağılanarak, kalsinörini inhibe etmektedir (Campistol ve Sacks 2000, Kansu 2002, Gawel ve ark 2004, Kşen ve Walterova 2005, Naesens ve ark 2009). Kalsinörinin takrolimus tarafından bloke edilmesi ile IL-2,-3,-4,-5,-7, interferon- γ , Tumor necrosis factor alfa (TNF- α), granülosit makrofaj koloni stimülan faktör gibi T hücresi kaynaklı sitokinlerin üretimi durdurulmaktadır (Busauschina ve ark 2004, Miyata ve ark 2005). Böylece takrolimus, T lenfositlerin aktivitesini baskılayarak doku reddini önlemektedir (Liu 1993, Busauschina ve ark 2004).

1.1.2. Takrolimus ve Oksidatif Stres

Takrolimus gibi immünosüpresif ajanlar, hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu teşvik etmektedir (Vetter ve ark 2003). Serbest oksijen radikalleri; hidroksil radikalleri (OH $^-$), süperoksit anyonları (O $_2^-$) ve peroksil radikalleri (ROO $^-$) ile onlara ilgili oluşan singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit ve ozondur (Gök ve ark 2006, Çaylak 2011).

Süperoksitlerin patojen etkilerinin önlenmesi için süperoksit dismutaz (SOD) adlı antioksidan enzim ile süperoksitler, hidrojen peroksit (H $_2O_2$) ve oksijene çevrilir. Hidrojen peroksit ya dokulardaki katalaz, peroksidaz ve glutasyon peroksidaz (GP $_x$) gibi enzimlerle, su ve oksijene, ya da biyolojik membranlardan geçerek metal iyonlarla reaksiyonuna girerek (Fenton reaksiyonu) daha reaktif hidroksil radikallerine dönüşebilir (Mercan 2004, Çaylak 2011).

Serbest radikaller ile antioksidan mekanizması arasındaki denge, fazla miktarda oluşan serbest radikallerin, lipid, protein, karbonhidrat ve DNA ile etkileşmesi sonucu bozulur. Dengenin serbest radikaller lehine bozulması sonucu da hücrede yapısal ve metabolik değışiklikler meydana gelir. Serbest oksijen radikalleri özellikle hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid

peroksidasyonunu oluştururlar. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan malondialdehit (MDA), hücre membranında bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak iyon geçirgenliğini artırır (Mercan 2004, Tabakoğlu ve Durgut 2013).

İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda, takrolimus hücrelerde NADPH oksidaz geni ve protein ekspresyonu ile TGF- β salınımında artışa, buna ilgili olarak da hücre içi serbest glutatyon (GSH) konsantrasyonunda azalmaya ve dolayısıyla hücrelerde oksidatif strese neden olmaktadır. Yine takrolimus, hücrede antioksidan bir enzim olan SOD ve TRX salınımını da azaltmaktadır (Khanna ve Pieper 2006).

Serbest oksijen radikallerinin ve total antioksidanların serum (veya plazma) konsantrasyonları laboratuvarlarda total oksidan seviyesi (TOS) ve total antioksidan seviyesi (TAS) ölçümleri şeklinde çeşitli metotlarla yapılmaktadır. En yaygın kullanılanı 2,2V-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTSS⁺) tabanlı kolorimetrik yöntemdir (Erel 2004).

1.1.3. Takrolimusun Nefrotoksik Etkisi

Takrolimus böbreklerde renin-angiotensin sistemini, prostoglandinleri ve endotelin I'i aktive ederek afferent arteriollerde vazokonstriksiyon oluşturmakta, buna ilgili olarak da dokularda hipoksi ve tubulus epitellerinde hipoksiyle ilgili değişiklikler meydana gelmektedir (Campistol ve Sacks 2000). Bu arada hem hipoksiye ve hem de takrolimusun plazmada bulunan yüksek seviyedeki toksik metabolitlerine ilgili tubulusların epitellerinde serbest oksijen radikalleri (süperoksit, hidrojen peroksit) ve nitrojen radikalleri oluşmaktadır (Simon ve ark 2000). Bu serbest oksijen radikalleri de lipit peroksidasyonuna neden olmakta ve böylece membran geçirgenliği bozularak hücre dejenerasyonu meydana gelmektedir (Yarsan 1998, Çaylak 2011).

Histopatolojik olarak; tubul epitel hücrelerinde akut hücre şişkinliği, vakuolizasyon ve nekroz gözlenmektedir (Ural ve ark 2005, Al-Harbi ve ark 2015). Takrolimus preparatının uzun süreli kullanımında ise histopatolojik olarak interstisyel fibrozis, tubüler atrofi, arteriyoler hiyalinozis, glomerüler fibrozis ve tubüler mikrokalsifikasyonların oluştuğu kaydedilmiştir (Liptak ve Ivanyi 2006, Naesens ve ark 2009).

Takrolimus nefrotoksisitesinde kanda kreatin, üre, nitrojen, potasyum ve BUN seviyelerinde artışlar tespit edilir (Akbaba 2009).

1.1.4. Takrolimusun Hepatotoksik Etkisi

Takrolimus, hepatositlerde serbest oksijen radikallerinin birikmesine ve böylece de dejenerasyona neden olmaktadır. Takrolimus kullanılan hastaların karaciğer biyopsilerinde histopatolojik olarak hepatositlerde periasiner yerleşimli hafif dereceli hücre şişkinliği, balonumsu dejenerasyon ve nekroza kadar giden lezyonlar görüldüğü kaydedilmektedir (Khettry ve ark 2002, Taniai ve ark 2008). Ayrıca kronik olaylarda Kupfferin yıldız hücrelerinde artış ve portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonları da görülebilir (Demetris ve ark 1990). Biyokimyasal olarak da takrolimus karaciğer enzimlerinden ALT, AST, GGT seviyelerinde artış ile hiperbilirubinemiye neden olur (Sanchez-Campos ve ark 1998, Akar ve ark 2005, Taniai ve ark 2008, Yadav ve ark 2013).

1.1.5. Takrolimus ve Apoptozis

Apoptozis, bir hücrenin kendi nükleer DNA'sını, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini yıkımlayacak enzimleri aktive etmesiyle gerçekleşen programlı bir hücre ölümü çeşididir. Apoptozis, doku ve organlarda hücrelerin yaşam siklusu süresince yapım ve yıkım dengesini sürdürmede görev alır (Eröz ve ark 2012).

Apoptozis, kaspaz adı verilen enzimlerin aktivasyonu ile gerçekleşir. Kaspaz aktivasyonu pro- ve anti- apoptotik protein üretim ve yıkımları arasında hassas dengeye bağlıdır. Kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan iki yolak vardır. Ölüm reseptörü (Ekstrensek) yolağı; birçok hücre yüzeyinde, ölüm reseptörleri adı verilen ve apoptozu tetikleyen moleküller bulunmaktadır (Eröz ve ark 2012). Bu sinyal yolağında TNF reseptör gen süpreser ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içeren transmembran reseptörleri görev almaktadır. Ölüm yolağında FasL/FasR, TNF- α /TNFR1 reseptörlerinin uyarılması ile kaspaz 8 aktive olur ve hücrede apoptozis başlar (Kaya ve ark 2012). Kaspaz 8 ve 9 çok sayıda hedefi etkilemesiyle DNA'yı ve nükleer proteinleri parçalayan nükleaz enzim aktivasyonuna neden olur. Kaspazlar ayrıca çekirdek matriksinin ve hücre iskeletinin diğer bileşenlerinin yıkımına da neden olarak hücrenin parçalanmasına yol açarlar. Mitokondrial (İntrensek) yolak olarak bilinen sitokrom C ve endojen apoptoz inhibitörlerini

nötralle eden proteinler apoptoza neden olur (Li ve ark 1998). Hücrenin ölmesi veya yaşamaya devam etmesi arasındaki tercih prototipi Bcl-2 olan 20'den fazla sayıda protein tarafından denetlenen mitokondri geçirgenliği ile belirlenir (Li ve ark 1998, Kaya ve ark 2012). Anti-apoptotik proteinlerin bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG'ı içerir. Pro-apoptotikler ise Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Bık'ı içermektedir. Bu proteinler apoptozisi başlatma ve sonlandırma işleminde görev alırlar. Sitokrom C'nin aktive olduğu durumlarda diğer bazı faktörlerle birlikte kaspaz-9'u aktive eder ve hücre çekirdeğinin parçalanmasıyla son bulur (Nagata 1997, Eröz ve ark 2012).

Takrolimus (FK506), kaspaz-3 aktivasyonu ile Bak protein ekspresyonunun, mitokondriyal disfonksiyona ve nükleer parçalanma ile apoptozise neden olmaktadır (Choi ve ark 2008). Takrolimus FK506 ile in vivo yapılan bir çalışmada periferik T-lenfositlerin apoptozisine neden olduğu belirlenmiştir (Migita ve ark 1995). Yine fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmada takrolimusun beyinde kapiller damarların endotel hücrelerinde apoptozis indüksiyonuna neden olarak kısmi bir ensefalopatiye yol açtığı gösterilmiştir (Kochi ve ark 2000).

1.2. Silimarin

Silimarin, deve diken bitkisinden (Şekil 1.2) elde edilen bir flavonoiddir. Flavonoidler bitki metabolizmasının ürünü olup farklı fenolik yapılara sahiptir. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet (tekli) oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanır (Rice-Evans ve ark 1996). Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbonhidrat, nükleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarda bulunan hidrojeni verir (Burda ve Oleszek 2001).



Şekil 1.2. *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Deve diken) bitkisi ve tohumları. Çiçeklenme dönemi (Tolga 2017).

Flavonoid bileşikleri, antibakteriyel, antitrombotik, vazodilatör, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip etken maddeleri vardır (Çizelge 2.1). (Middleton ve ark 2000). Flavonoidler, kimyasal yapıları, biyoyararlanımı ve dağılımına bağlı olarak organizmada farklı metabolik etkileşime neden olmaktadır (Rice-Evans ve ark 1996).

Çizelge 2.1. Bazı bitki ve baharatlardan izole edilen Flavonoid bileşikleri (Çoban ve Patır 2010).

| Bitki ve baharatlar | Latince ismi | Etken maddesi |
|----------------------------|-------------------------------------|---|
| Devedikeni | <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn | Silimarin, Silybin, İsosilybin, Silychristin, Silydianin |
| Biberiye | <i>Rosemarinus officinalis</i> | Karnosik asit, Karnosol, Rosmanol, Rosemarinik asit. |
| Adaçayı | <i>Salvia officinalis</i> | Karnosol, Karnosik asit, Rosmanol, Rosmarinic asit |
| Kekik | <i>Thymus vulgaris</i> | Thmol, karvakrol, p-cunen |
| Karanfil | <i>Eugenia caryophyllata</i> | Eugenol, Gallatlar |
| Zerdeçal | <i>Curcuma longa</i> L. | Kurkumin |
| Karabiber | <i>Piper nigrum</i> | Fenolik Amidler, Flavonoidler |
| Soğan | <i>Allium cepa</i> | Antosiyaninler, Kuarsetin, Alkil/alkalen Sistein sülfoksitler |

Bu flavonoidlerden bir tanesi de deve dikenini bitkisinin tohumlarından elde edilen silimarindir. Latince ismi *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Asteraceae familyası) olan deve dikenini bitkisi uzun yıllardan beri başta Hindistan olmak üzere Uzak Doğu ülkelerinde şifa verici bir gıda olarak kullanılmaktadır (Subir Kumar Das 2008).

Silimarin (Deve dikenini sütü) silybin, isosilybin, silychristin ve silydianin olmak üzere dört isomerin karışımının oluşturduğu bir flavonoiddir (Kvasnicka ve ark 2003, Post-White ve ark 2007, Subir Kumar Das 2008). Silimarin ve aktif bileşiği olan silybin antioksidan aktivitesini, serbest oksijen radikallerini uzaklaştırıp, böylece de lipid peroksidasyonunu inhibe etmek suretiyle oluşturmaktadır (Dehmlow ve ark 1996, Farghali ve ark 2000, Subir Kumar Das 2008).

Bu bitki 2000 yıldan daha fazla süredir, alkol ve çeşitli kimyasal maddeler ile mantar zehirlenmelerine, yılan, böcek sokmalarına karşı karaciğeri koruyucu olarak, hepatitis, siroz, sarılık gibi karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında da tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Kvasnicka ve ark 2003, Kşen ve Walterova 2005). Silimarin, antioksidatif etkisini serbest oksijen radikallerini uzaklaştırarak ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek gösterir (Dehmlow ve ark 1996, Farghali ve ark 2000, Subir Kumar Das 2008). Ayrıca silimarinin antiinflamatuvar, antifibrotik, antilipidperoksidatif, hücre membranlarının geçirgenliğini düzenleyici ve hepatositlerin rejenerasyonu gibi biyolojik fonksiyonları da bulunmaktadır (Radko ve Cybulski 2007). Bu özellikleri ile karaciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan silimarinin, diğer organ ve dokular üzerinde de koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Varzi ve ark 2007, Taşdemir 2016).

1.2.1. Silimarinin Böbrekte Koruyucu Etkisi

Böbrek transplantasyonu sırasında soğuk iskemi ve reperfüzyon döneminde oluşan serbest oksijen radikallerinin tubul epitellerinde oluşturduğu hasarı önlemede Silybinin etkili olduğu kaydedilmektedir (Gazak ve ark 2007). Silimarin, diyabete ilgili gelişen süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu artırarak, serbest radikallerin hasarına karşı koruyucu etki oluşturur. Bu nedenle silimarin diyabetik olgularda gelişen nefropatilere karşı koruyucu olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Soto ve ark 2010). Yine

Sonnenbichler ve ark (1999) tarafından in vitro yapılan bir çalışmada böbrek hücrelerinde parasetamol, sisplatin ve vincristin gibi kimyasal maddelerle birlikte silybin verilmesinin nefrotoksik etkileri azaltabileceği veya önleyebileceği bildirilmiştir. Silimarinin geçici iskemi ve reperfüzyonun yol açtığı hasarlara karşı da koruyucu olarak kullanılabilmesi ve yapılacak çalışmalarla da yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği vurgulanmıştır (Gazak ve ark 2007).

1.2.2. Silimarinin Karaciğerde Koruyucu Etkisi

Silimarinin, hücre membranlarında permeabilityi düzenlemek suretiyle hepatositlerin dejenerasyonlara karşı korumasını sağladığı gibi, RNA polimeraz I'i aktive ederek ribozomal protein sentezini artırdığı ve böylece hepatositlerin rejenerasyonunda da etkili olduğu kaydedilmektedir (Fraschini ve ark 2002). Ayrıca silimarinin karaciğer koruyucu etkisine ilgili pro-apoptotik bax protein düzeylerini azaltarak karaciğeri apoptozdan koruduğu da bildirilmiştir (Post-White ve ark 2007). Kronik alkol ve karbontetraklorüre ilgili karaciğer toksikasyonlarında hepatositlerin yıkılmasının yanı sıra, stellata hücrelerin kollajenleri ve diğer hücre dışı matris bileşenlerini sentezlemesi ile fibrojenesis aktive edilmektedir. Silimarinin, Kupffer hücrelerinin proliferasyonu inhibe ettiği, böylece de fibrinogenezisi azalttığı bildirilmiştir (Boigk ve ark 1997, Subir Kumar Das 2008). Silimarin sitokrom P450 detoksifikasyon sistemini (faz I) inhibe eder (Fraschini ve ark 2002).

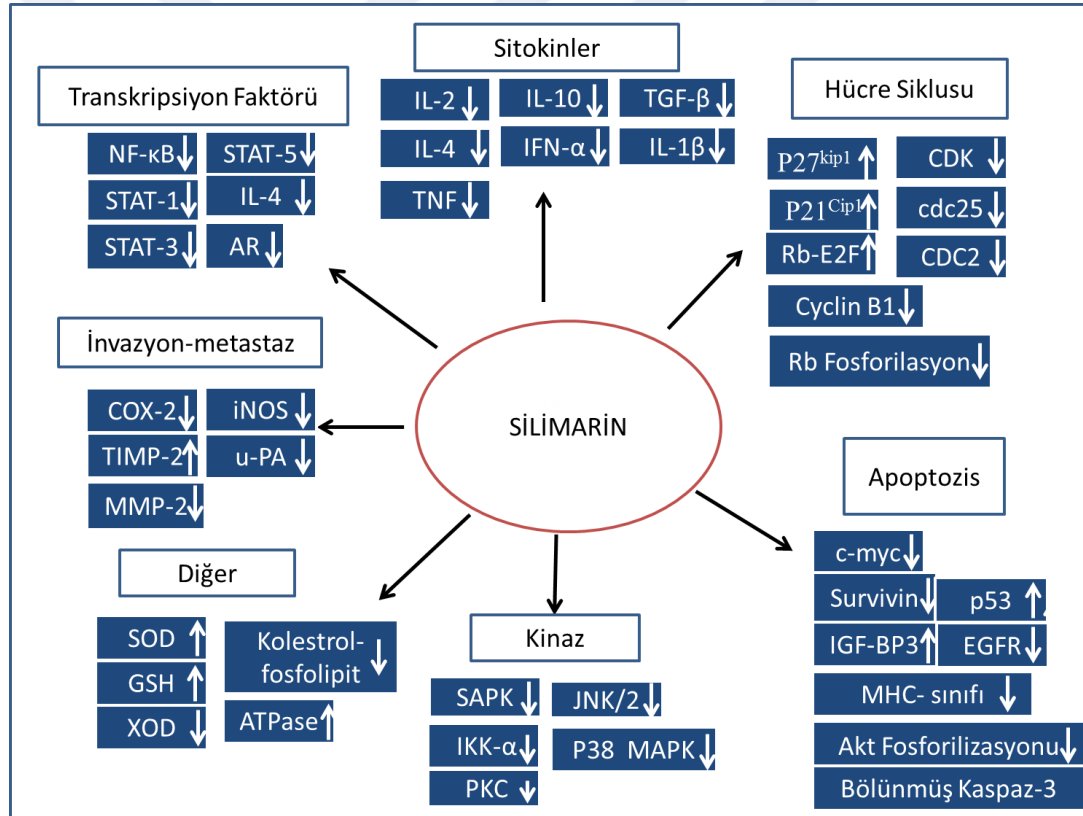
1.2.3. Silimarinin Diğer Doku ve Organlarda Koruyucu Etkisi

Silimarinin, kalp kasında oksidatif stres ve kardiyotoksitenin neden olduğu apoptozisi önlediği bildirilmiştir (Gazak ve ark 2007). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlarla birlikte silimarinin kullanıldığı olgularda anti apoptotik maddeler olan Bcl-xL ve p53'ü arttırarak kemoterapötik ilaçların kardiyotoksik etkisini azalttığı da kaydedilmiştir (Patel ve ark 2010, Rašković ve ark 2011).

Silimarinin nörotoksisite ve nörodejeneratif etkileri antioksidan mekanizmayla önlediği de düşünülmektedir. Bu nedenle silimarin nörotoksisiteye karşı koruyucu olarak da kullanılmaktadır (Wang ve ark 2013).

1.2.4. Silimarinin Antiinflamatuvar ve Antikarsinogenezis Etkisi

Silimarin ve silybinin antikarsinogenezis ve antiinflamatuvar etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Silimarinin, nötrofil ve Kupffer hücrelerinin migrasyonu ile lökotriyen ve prostoglandin sentezini de inhibe ettiği belirlenmiştir (Fraschini ve ark 2002). Silimarin, COX-2 ve 5-lipooxygenase (LOX) sitokinlerini baskılayarak, NF-k β 'yi inhibe eder. Tümör nekrosis faktör, IL-1 ve IL-6, lenfotoksin, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve interferon (IFN- γ) interlökinlerin üretimine katkıdan bulunan NF-k β 'nin inhibisyonuyla ilişkili olabileceği kabul edilmektedir (Şekil 1.3) (Kşen ve Walterova 2005). Silimarin reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimine ve lipid peroksidasyonuna neden olan TNF- α 'yı inhibe ederek, apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu olmaktadır (Manna ve ark 1999).



Şekil 1.3. Silimarinin farklı biyokimyasal enzimatik mekanizmalara etkisi.

Silimarinin antikarsinogenik etkisi, kanser hücrelerinde sitokrom C salınımının indüklenmesi, kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonu, Bax/Bcl-2 genlerinin oranlarında görülen değişikliklere neden olarak apoptozisi arttırdığı belirlenmiştir (Katiyar ve ark 2005). Ayrıca silimarin tümör hücresi gelişiminde aktif rol alan NF-k β oluşumunu baskılar ve dolayısıyla da hücre siklusunu ve tümör

proliferasyonunu durduğu bildirilmiştir (Bharti ve Aggarwal 2002). Kanserli dokularda epitelyal apoptozisi indükler ve anjiogenezisi inhibe eder (Kşen ve Walterova 2005). Silimarin, TNF- α kaynaklı proteinleri ve adezyon molekülünün (VCAM-1, ICAM-1 ve E-selectin, HUVEC) mRNA ekspirasyonunu baskılar (Kşen ve Walterova 2005).

Ultraviole (UV) ışınlarının sebep olduğu deri kanserlerinde hem silimarin hem de silybinin çeşitli hayvan türlerinde fotokarsinogenezisi önlediği belirlenmiştir (Katiyar ve ark 2005).



2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1. Gereç

2.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Etik Kurul

Deneyisel çalışmada 46 adet 8 haftalık sağlıklı dişi rat kullanıldı. Ratlar, Selçuk Üniversitesi Deneyisel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilerek, deneyisel prosedür uygulandı. Hayvanlara yapılacak uygulamalar için SÜDAM etik kurulundan 17.03.2015 tarih ve 2015/49 numaralı etik kurul onayı alındı ve aynı merkezde çalışma yapıldı.

2.1.2. Deneme Grupları

Kontrol grubunda 6 adet (Etik Kurul önerisiyle), diğer gruplarda ise 8'er adet rat kullanıldı. Çalışmada takrolimus uygulamaları 1 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal (İP) olarak, silimarin uygulamaları ise 100 mg/kg/gün ve 200 mg/kg/gün dozunda, fizyolojik tuzlu su içinde sulandırılarak, gavaj ile oral yolla verildi.

Gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

- I. **Kontrol Grubu:** Çalışma boyunca (6 hafta) sadece pelet yemle ad libitum beslendi.
- II. **Takrolimus (Tak) Grubu:** 1 mg/kg/gün olmak üzere takrolimus 6 hafta süreyle İP uygulandı.
- III. **Silimarin 100 (Sli 100) Grubu:** Silimarin 100 mg/kg/gün 6 hafta süreyle gavaj ile oral yolla verildi.
- IV. **Takrolimus + Silimarin 100 (Tak + Sli 100) Grubu:** 1 mg/kg/gün takrolimus İP ve silimarin 100 mg/kg/gün süreyle gavaj ile oral yolla 6 hafta süreyle birlikte uygulandı.
- V. **Silimarin 200 (Sli 200) Grubu:** Silimarin 200 mg/kg/gün 6 hafta süreyle gavaj ile oral yolla verildi.
- VI. **Takrolimus+ Silimarin 200 (Tak + Sli 200) Grubu:** 1 mg/kg/gün takrolimus İP ve silimarin 200 mg/kg/gün gavaj ile oral yolla 6 hafta süreyle birlikte uygulandı.

2.1.3. Takrolimus ve Silimarin

Çalışmada her biri 1ml olan ve 10 ampül içeren 5 kutu Prograf (5mg/ml konsantre takrolimus) (Astellas Ireland Co.Ltd. İrlanda) ve 50 gr. Silymarin (Sigma-Aldrich Co. LLC. St. Louis, Missouri, ABD) fizyolojik tuzlu su içinde çözdürülerek kullanıldı. Silymarin medikal firma aracılığıyla yurt dışından temin edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Canlı Ağırlık Artışı

Denemede kullanılan bütün ratlar denemenin başlangıcında, çalışma süresince her hafta ve çalışmanın sonunda olmak üzere toplamda 7 kez tartılarak canlı ağırlıkları tespit edildi.

2.2.2. Makroskobik İnceleme

Çalışmanın sonunda biyokimyasal analizler için önce ratların kuyruk veninden kan alındı, daha sonra thiopental anestezisi ile ötenazi edildi. Çalışma sırasında ölen 5 ratın (Tak + Sli 100 grubundan 1 adet 10. gün ve 1 adet 20. gün, Tak + Sli 200 grubundan 1 adet 20. gün ve 2 adet 22. gün) ve ötenazi edilen diğer bütün ratların sistematik nekropsileri yapılarak böbrekler, karaciğer, makroskobik olarak patolojik değişiklikler yönünden incelendi. Histopatolojik incelemeler için karaciğer ve böbreklerden örnekler alınarak, %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Çalışma süresi içerisinde ölen ratlar çalışmadan çıkarılmış, değerlendirmeye dahil edilmemiştir.

2.2.3. Histopatolojik İnceleme

Tamponlu nötral formmalinde tespiti yapılan dokular trimleme işleminden sonra kasetlere alınarak musluk suyunda 16 saat yıkandı. Yıkamayı takiben Leica TP 1020 doku takip cihazında % 70 alkolde 2 saat, %80'lik alkolde 1 saat, %90'lık alkolde 1 saat, %96'lık alkolde 1'er saat, % 100'lük alkolde 30'ar dk, Ksilol 30'ar dk, ksilol-parafinde 30 dk, yumuşak parafinde (46-48 °C) 20 dk ve sert parafinde (56-58 °C) 20 dakika bekletildikten sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan mikrotom (Leica RM 2125RT) ile 5 µm kalınlığında kesilen doku örnekleri sıcak su banyosunda (37°C) açılması sağlanarak poly-L-lysinli lamlara

alındı. Kesitler lam kutularında 56⁰C'lik etüvde bir gece bekletilerek lamlara yapışması sağlandı. Ksilol serilerinden 3 kez 5'er dk süreyle geçirilerek deparafinizasyonu gerçekleştirildi. Kesitler azalan dereceli alkol serisinden absolut alkol 3 dk, %96'lık alkolde 3 dk, %80'lik alkolde 3 dk, %70'lik alkolde 3 dk bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkandı. Sonra hematoksilen solüsyonunda 3 dk boyandı. Çeşme suyunda 2 dk yıkılarak %1 asit alkol solüsyonuna 1 kez daldırıldı. Tekrar yıkaması yapılarak amonyaklı suya daldırıldı ve yıkaması yapıldıktan sonra yaklaşık 1 dk alkolik eozin solüsyonuna bekletildi. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkollerden %96'lık (I) 1 dk, %96'lık (II) 1 dk, %100'lük (I) alkolde 1 dk, %100'lük (II) alkolde 1 dk dehidrasyonu yapılarak, 3 ayrı ksilol'de 5'er dk süreyle şeffaflaştırıldı. Son olarak ksilolden çıkarılan kesitler entellan ile kapatıldı.

Çalışmada Hematoksilen-Eosin yöntemi ile boyanan karaciğer ve böbrek kesitlerinin mikroskopik incelemelerinde gözlenen bulgular; histopatolojik bir değişiklik belirlenemeyen kesitler 1; histopatolojik değişiklik görülenler ise oluşan değişikliğin şiddetine göre 2, 3 ve 4 rakamı ile skorlandı. Skorlamada esas alınan histopatolojik değişiklikler ve skor numaraları Çizelge 2.1-2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Böbrek skorlamasında esas alınan mikroskopik bulgular.*

| Skor No | Böbrek |
|---------|--|
| 1 | Glomeruler ve tubuler yapılar normal. Histopatolojik değişiklik yok. |
| 2 | Glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde şişkinlik. |
| 3 | Glomeruluslarda orta şiddette şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon. |
| 4 | Glomeruluslarda şiddetli derecede şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon ile lümenlerinde dilatasyon ve proteince zengin sıvı, interstisyel dokuda hiperemi. |

Çizelge 2.2. Karaciğer skorlamasında esas alınan mikroskopik bulgular.

| Skor No | Karaciğer |
|---------|--|
| 1 | Hepatositler ve sinüzoidler normal. Histopatolojik bir değişiklik yok. |
| 2 | Hepatositlerde şişkinlik, sinüzoidlerde hafif daralma. |
| 3 | Hepatositlerde şişkinlik ve hidropik dejenerasyon, sinüzoidlerde belirgin bir daralma. |
| 4 | Hepatositlerde hidropik dejenerasyon, nekroz ve bazı hepatositlerde vakuol oluşumları, sinüzoidlerde ise şiddetli derecede daralma ve yer yer gözden kaybolma. |

2.2.4. İn situ TUNEL Yöntemi

Mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesilen doku örnekleri polilizinli lamlara alınarak Calbiochem TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Kit (QIA33) prosedürüne göre boyandı. Dokular deparafinizasyon ve rehidrasyonu takiben 1:100 oranında 10 mM TRİS (pH 8) içinde sulandırılan Proteinaz K ile 20 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından 1X TBS ile yıkandı ve kesitlerde endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için kesitler 1:10 oranında % 3 H₂O₂'i oda ısısında 5 dakika inkübasyonu yapıldı. Tekrar 1 X TBS ile yıkanan kesitler 1X TdT Equilibration Buffer 10 dk muamele yapıldı. Daha sonra TdT Labelling solüsyonda 37 °C'de 1.5 saat inkübe edildi ve 1X TBS ile slayt yıkama yapıldı. Kesitler Stop Solution ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Her bir kesite 100 µl Blocking Buffer dökülerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi ve ardından 1X Konjugat (50 X Konjuge: 1:50 oranında Blocking Buffer'da seyreltildi) ile muamele edilen kesitler oda ısısında 30 dk bekletildi. Daha sonra TBS ile yıkanan kesitler, DAB (3,3' Diaminobenzidine) solüsyonunda 15 dk bekletildi. Metilen mavisi solüsyonuyla kontrast boyamayı sağlamak için 3 dk oda ısısında bekletildi ve ardından alkol ve ksilollerden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

2.2.5. Biyokimyasal Analizler

2.2.5.1. Kan AST, ALT, Total Bilirubin, Albumin ve Kreatin ölçümü

Biyokimyasal analiz için AST, ALT, Total Bilirubin, Albumin ve Kreatin düzeyleri Roche modular cihazında enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüldü.

2.2.5.2. Total Antioksidan Seviyesinin Ölçümü

Total Antioksidan ölçümü Rel Assay Diagnostics (Türkiye) kit prosedürüne göre örneklerdeki antioksidanların koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikal katyonunun renk kaybı prensibine dayanmaktadır. Numunedeki antioksidan moleküller, mavi-yeşil renkteki ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirgerler ve karakteristik renginin kaybına neden olurlar. Spektrofotometrede 660 nm'deki absorbans değişikliği örnekteki antioksidan miktarı ile ilişkilidir. Vitamin E analogu olan Trolox Equivalent adlı standart antioksidan solüsyonu ile kalibre edildi. Sonuçlar, mmol Trolox equiv./L olarak belirtildi.

Alınan kan serum örneklerinden pleytlere 30 µl serum örnekleri koyuldu. Ardından her bir playte 500 µl Reagent 1 eklendi ve 30 saniye sonra 660 nm dalga boyunda ELİSA Reader (MWG Lambda Scan 200) cihazında ölçümü yapıldı. Sonuçlar A1 olarak kaydedildi. Ardından her birine 75 µl Reagent 2 eklendi ve 37⁰ C 5 dakika inkübe edildi ve sonra ikinci ölçümü ELİSA Reader (MWG Lambda Scan 200) cihazında yapıldı. Sonuçlar A2 olarak kaydedildi.

Analiz İçin Kullanılan Reaktif ve Standartlar

Reaktif 1: Test tamponu (Acetate Solüsyonu 0.4 mol/L Ph 5.8)

Reaktif 2: Prochromogen Solüsyonu (ABTS 30 mmol/L)

Standart: Trolox 30 mmol/L

QC Seyive 1: Trolox 0,5 mmol/L

QC Seyive 2: Trolox 2,0 mmol/L H₂O

Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Örnek})}{(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Standart})}$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = A2 - A1$$

$$\Delta\text{Abs Standart} = A2 - A1$$

2.2.5.3. Total Oksidan Seviyesinin Ölçümü

Total Oksidan ölçümü Rel Assay Diagnostics (Türkiye) kit prosedürüne uygun olarak Spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirildi. Numunelerde bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarına bağlı oluşan renk değişikliği prensibine göre yapıldı. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edilerek, sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edildi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{L}$).

Alınan serum örneklerinden pleyt kuyucuklarına 75 μl konuldu. Ardından her bir kuyucuğa 500 μl Reagent 1 eklendi ve 30 saniye sonra ELİSA Reader (MWG Lambda Scan 200) cihazında ilk ölçümü (A1) yapıldı. Ardından her birine 25 μl Reagent 2 eklendi ve 5 dakika 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubasyona bırakıldı. Daha sonra ELİSA Reader (MWG Lambda Scan 200) cihazında ikinci (A2) ölçümü gerçekleştirildi. Spektrofotometrede 660 nm'deki absorbans değişikliği örnekteki oksidan miktarı ile ilişkilidir.

Analiz İçin Kullanılan Reaktif ve Standartlar

Reaktif 1: Test Tamponu (H_2SO_4 25 mM, Ph 1.75)

Reaktif 2: Tampon solüsyonu (H_2SO_4 25 mM, Ph 1.75, Demir iyonları 5Mm, O-dianisidine 10 mM).

Stabize edilmiş Standart Solüsyon: 10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L

Sonuçların Hesaplanması:

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta\text{Abs Örnek})}{(\Delta\text{Abs Standart})} \times \text{Standart Kontrol}$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = \text{A2} - \text{A1}$$

$$\Delta\text{Abs Standart} = \text{A2} - \text{A1}$$

2.3. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel analizlerinde, SPSS 22-0 Windows İstatistik programı kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı ilişki tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. İstatistiksel olarak çoklu karşılaştırma (*post hoc*) analiz testlerinden, Duncan testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ($X \pm \text{SEM}$) şeklinde belirtildi.

3.BULGULAR

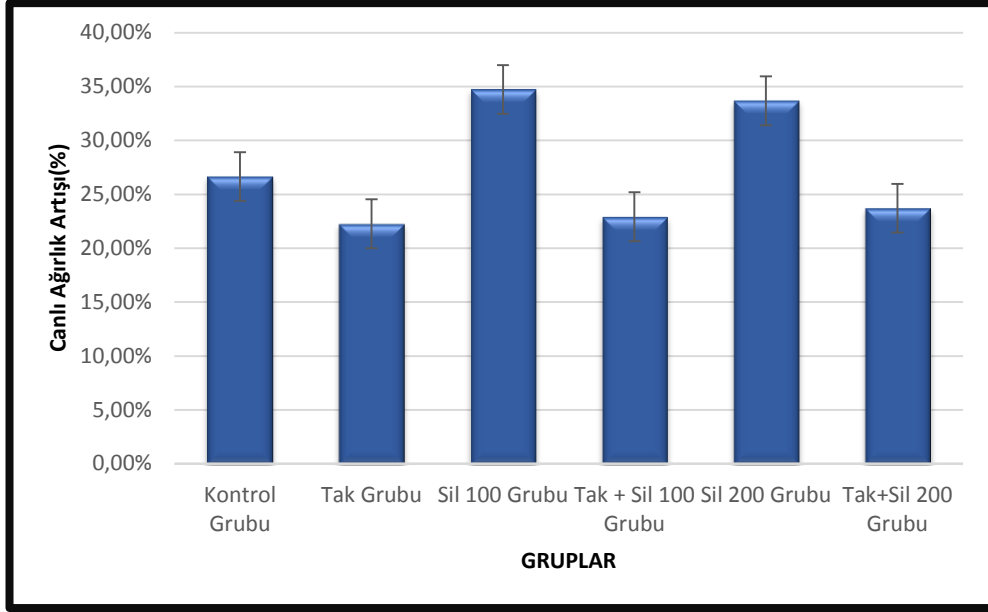
3.1. Canlı Ağırlık Bulguları

Çalışmada kullanılan ratların denemenin başlangıcında, çalışma sürecindeki ve çalışmanın sonunda belirlenen canlı ağırlıklarına ilgili verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları ve her gruba ait ortalama canlı ağırlık artış oranları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kontrol ve deneme gruplarında ratların haftalara göre canlı ağırlık değişimleri.

| | Kontrol Grubu | Tak Grubu | Sli 100 Grubu | Tak + Sli.100 Grubu | Sli 200 Grubu | Tak+ Sli 200 Grubu |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Başlangıç Tartım | 225±0,81 ^a | 220±0,70 ^b | 190±1,01 ^e | 205±0,73 ^c | 190±0,92 ^e | 194±0,70 ^d |
| 1. hafta | 240±3,79 ^a | 231±1,73 ^a | 206±1,84 ^{ab} | 212±6,92 ^{ab} | 199±6,10 ^b | 200±7,6 ^{ab} |
| 2.hafta | 254±3,95 ^a | 242±5,86 ^{ab} | 221±3,23 ^c | 224±3,75 ^{bc} | 212±7,56 ^c | 208±11,0 ^c |
| 3. hafta | 267±4,82 ^a | 248±4,61 ^a | 227±4,83 ^b | 223±3,37 ^b | 225±7,26 ^b | 212±13,6 ^b |
| 4.hafta | 281±3,56 ^a | 259±3,13 ^b | 241±4,75 ^{bc} | 240±6,11 ^{bc} | 236±6,57 ^c | 226±13,9 ^c |
| 5.hafta | 281±1,60 ^a | 262±3,28 ^b | 246±5,54 ^{bc} | 241±6,09 ^{cd} | 248±7,09 ^{bc} | 226±12,7 ^d |
| 6.hafta | 285±3,60 ^a | 269±4,60 ^{ab} | 256±6,62 ^{bc} | 252±4,26 ^{bc} | 254±7,20 ^{bc} | 240±10,2 ^c |
| Canlı Ağırlık Artışı (gr) | 60,1±3,77 ^{bc} | 49,6±4,58 ^{abc} | 66,3±6,51 ^c | 44,2±4,37 ^{bc} | 64,2±6,40 ^a | 38,4±11,7 ^c |
| Canlı Ağırlık Artışı (%) | % 26,66 | % 22,27 | % 34,73 | % 22,92 | % 33,68 | % 23,71 |

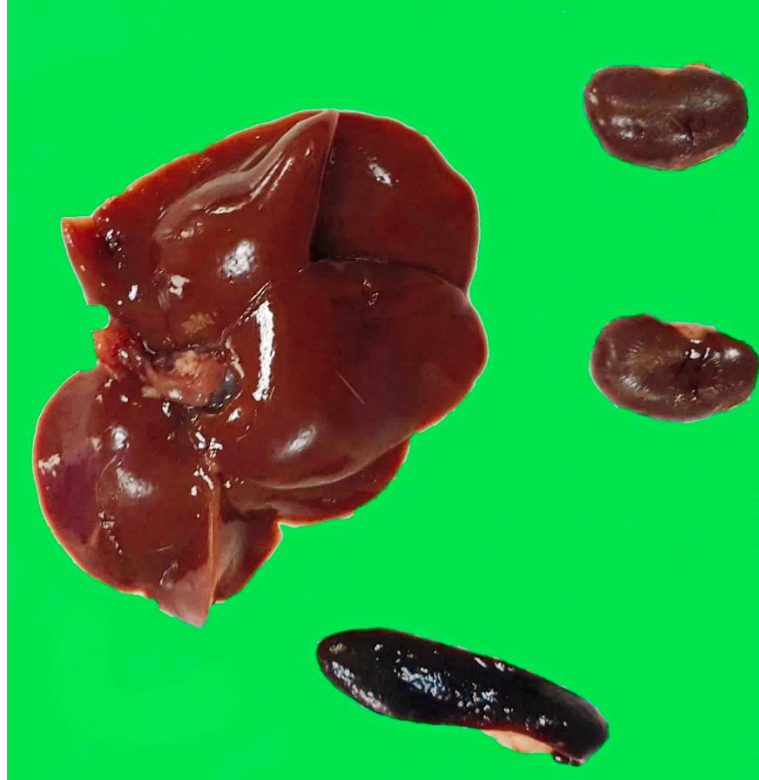
Her bir değer Ortalama ± SEM gösterir (One way ANOVA). a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında farklılık önemlidir (p<0.05).



Grafik 3.1. Gruplara göre ratların canlı ağırlık artış oranları.

3.2. Makroskobik Bulgular

Çalışmada kullanılan ratların nekropsilerinde bütün organlarda genel olarak kayda değer makroskobik bir lezyona rastlanılmadı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sli 200 Grubu: Karaciğer, böbrekler ve dalağın normal makroskobik görünümü.

3.3. Histopatolojik Bulgular

Çalışmada kullanılan ratların karaciğer ve böbreklerinin mikroskopik incelemelerinde gözlenen histopatolojik bulgulara ilgili belirlenen skorlar Çizelge 3.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Böbrek ve karaciğerin histopatolojik skorlarının gruplara göre dağılımı.

| Organ | Skor* | Kontrol Grubu | Tak Grubu | Sli 100 Grubu | Tak+Sli 100 Grubu | Sli 200 Grubu | Tak+Sli 200 Grubu |
|------------------|-------|---------------|-----------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| Böbrek | 1 | 6/6 | - | 8/8 | - | 6/8 | - |
| | 2 | - | - | - | 5/6 | 2/8 | 5/5 |
| | 3 | - | - | - | 1/6 | - | - |
| | 4 | - | 8/8 | - | - | - | - |
| Karaciğer | 1 | 6/6 | - | 6/8 | - | 8/8 | 1/5 |
| | 2 | - | - | 2/8 | 5/6 | - | 4/5 |
| | 3 | - | - | - | 1/6 | - | - |
| | 4 | - | 8/8 | - | - | - | - |

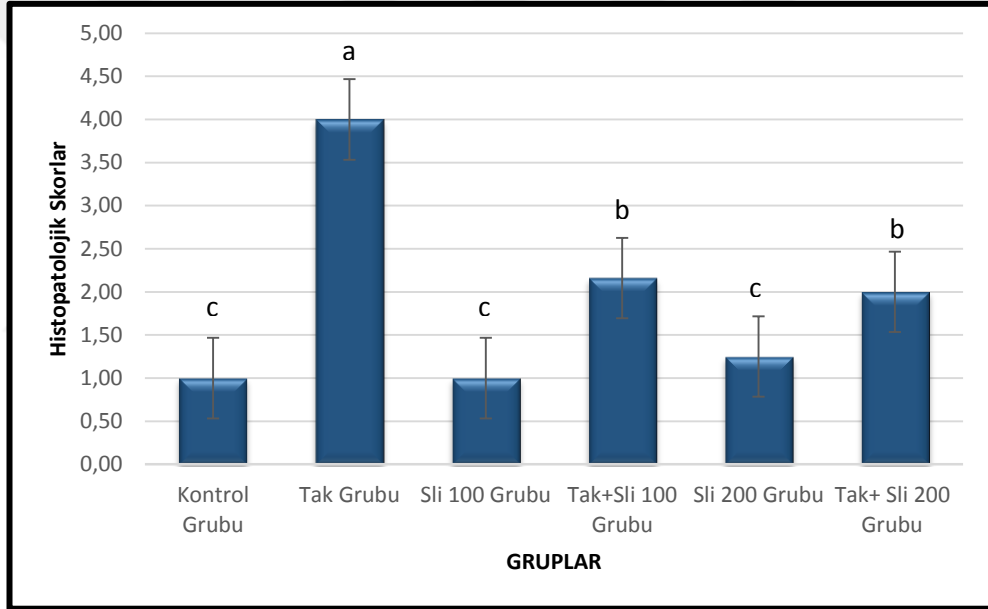
*1: Lezyon yok, 2: Hafif, 3: Orta, 4: Şiddetli lezyon.

Çalışmada karaciğer ve böbrekte histopatolojik bulgulara ilgili belirlenen skorların istatistiksel analizleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Böbrekler ve karaciğere ilgili analiz sonuçları incelendiğinde rakamsal olarak bazı farklılıklar varsa da, istatistiksel grup ortalamalarının genelde benzer olması nedeniyle böbrek ve karaciğer birlikte değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre, Kontrol, Sli 100 ve Sli 200 grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı, ancak bu gruplar ile Tak Grubu arasındaki farkın önemli olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Tak + Sli 100 ve Tak + Sli 200 grupları ile Tak Grubu arasında pozitif anlamda, Kontrol ve Sli 100 ve Sli 100 grupları arasında negatif anlamda, farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.2-3.3).

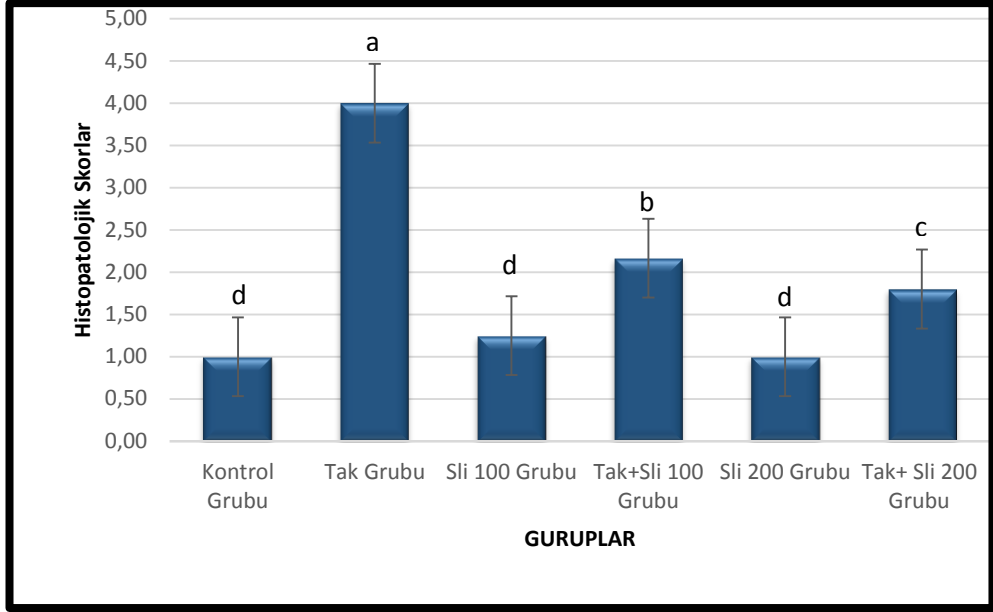
Çizelge 3.3. Böbrek ve karaciğerin histopatolojik skor ortalamalarının gruplara göre istatistiksel sonuçları.

| | Kontrol Grubu | Tak Grubu | Sli 100 Grubu | Tak +Sli 100 Grubu | Sli 200 Grubu | Tak+Sli 200 Grubu |
|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Böbrek | 1,00±0,00 ^c | 4,00±0,00 ^a | 1,00±0,00 ^c | 2,16±0,16 ^b | 1,25±0,16 ^c | 2,00±0,00 ^b |
| Karaciğer | 1,00±0,00 ^d | 4,00±0,00 ^a | 1,25±0,16 ^d | 2,16±0,16 ^b | 1,00±0,00 ^d | 1,80±0,20 ^c |

Her bir değer ortalama ± SEM gösterir (One way ANOVA). a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında farklılık önemlidir (p<0.05).



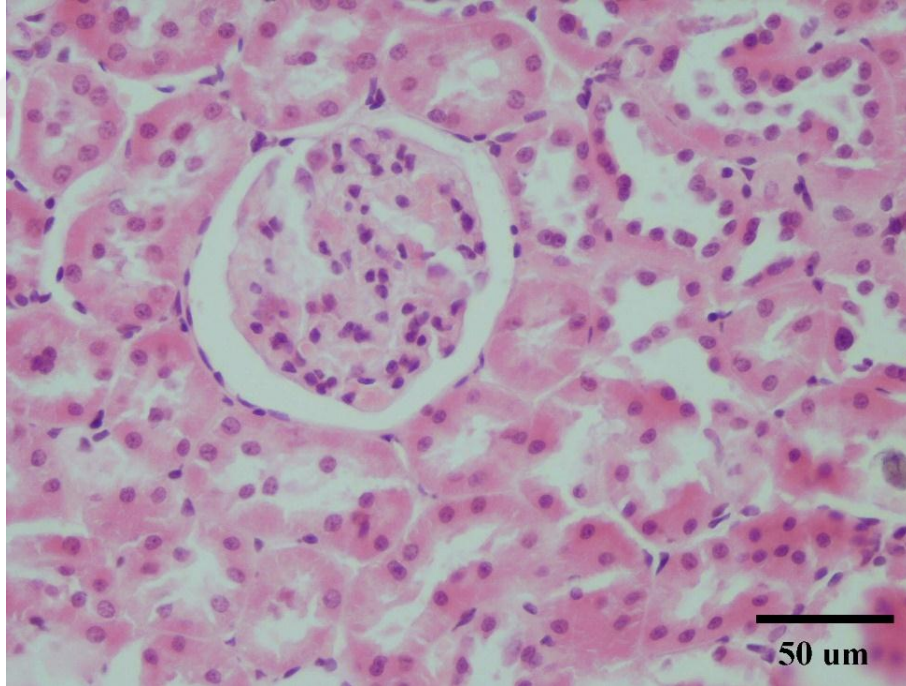
Grafik 3.2. Böbreklerin histopatolojik bulgu skorlarına ilgili grafik.



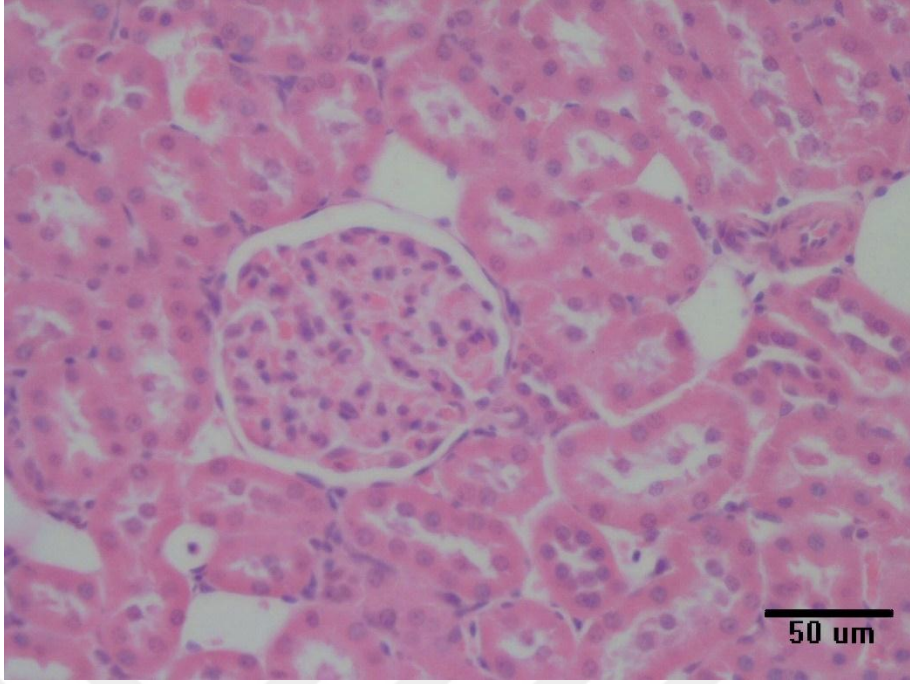
Grafik 3.3. Karaciğerlerin histopatolojik bulgu skorlarına ilgili grafik.

3.3.1. Böbrek

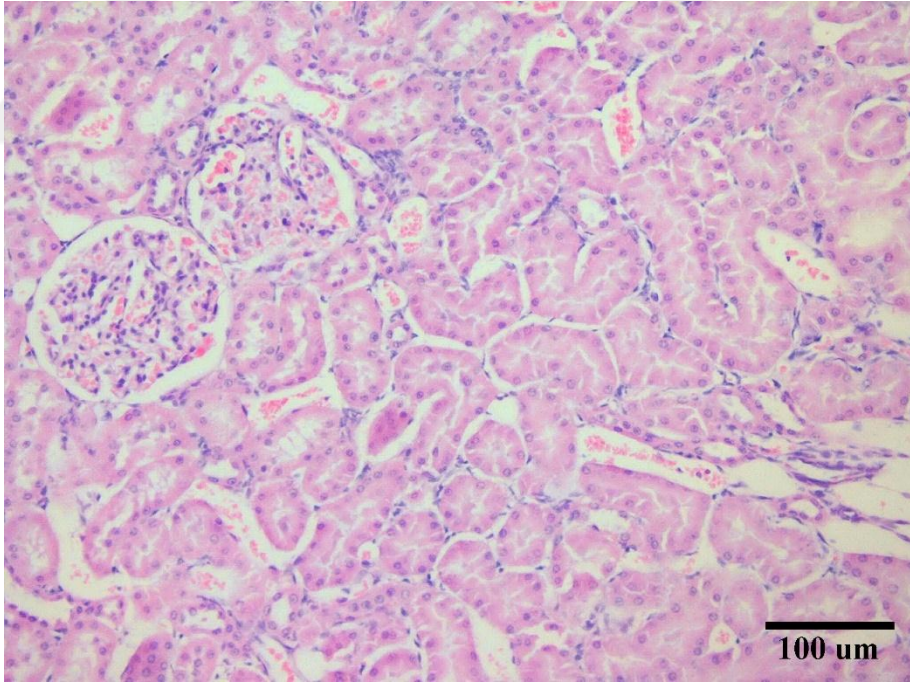
Histopatolojik incelemelerde; Kontrol ve Sli 100 grubu ratların tamamı ile Sli 200 grubu 6 ratta glomerulus ve tubuluslarda patolojik bir değişikliğin şekillenmediği, normal görünümde (skor 1) olduğu (Şekil 3.2.-3.3.-3.4), Sli 200 Grubu 2 ratta ise glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde şişkinlik (skor 2) belirlenmiştir. Tak Grubu ratların hepsinde glomeruluslarda şiddetli derecede şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon ve deskuamasyon ile lümenlerinde dilatasyon ve proteince zengin sıvı, interstisyel dokuda hiperemi (skor 4) ile beliren şiddetli derecede patolojik değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 3.5). Yine Tak + Sli 100 ile Tak + Sli 200 gruplarındaki 11 rattan 10'unda glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde şişkinlik (skor 2) (Şekil 3.6 -3.7), 1'inde ise glomeruluslarda şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon (skor 3) olduğu tespit edilmiştir.



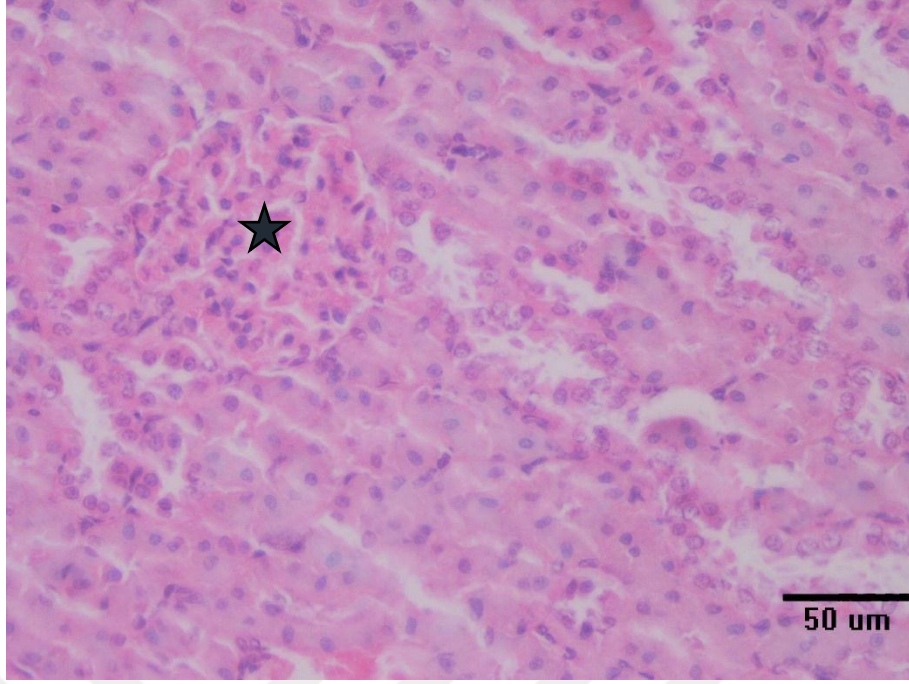
Şekil 3.2. Kontrol Grubu: Normal histolojik yapıda glomerulus ve tubuluslar (skor 1). Böbrek. H&E.



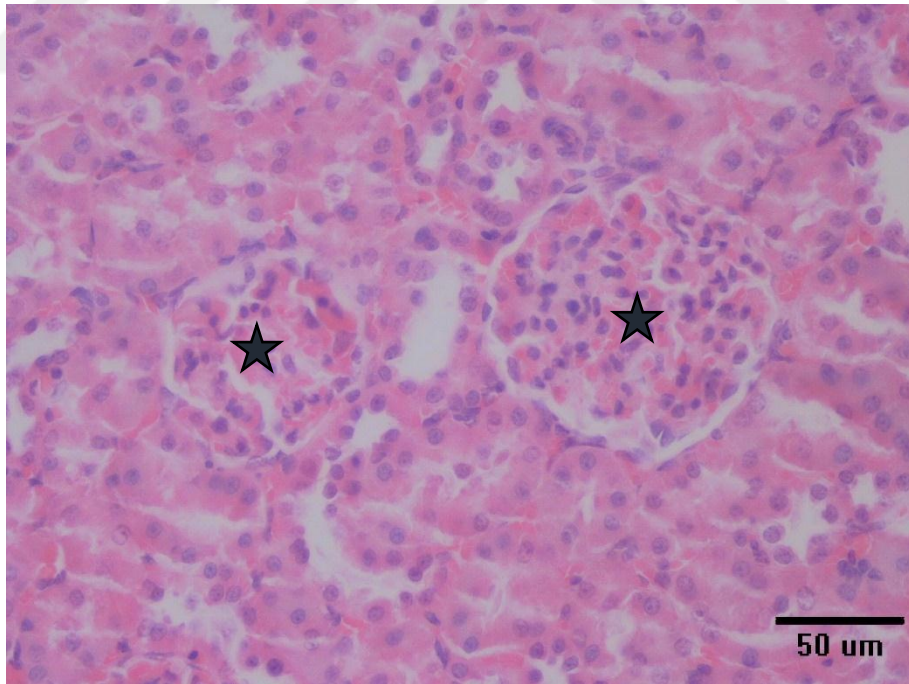
Şekil 3.3. Sli 100 Grubu: Normal histolojik yapıda glomerulus ve tubuluslar (skor 1). Böbrek. H&E.



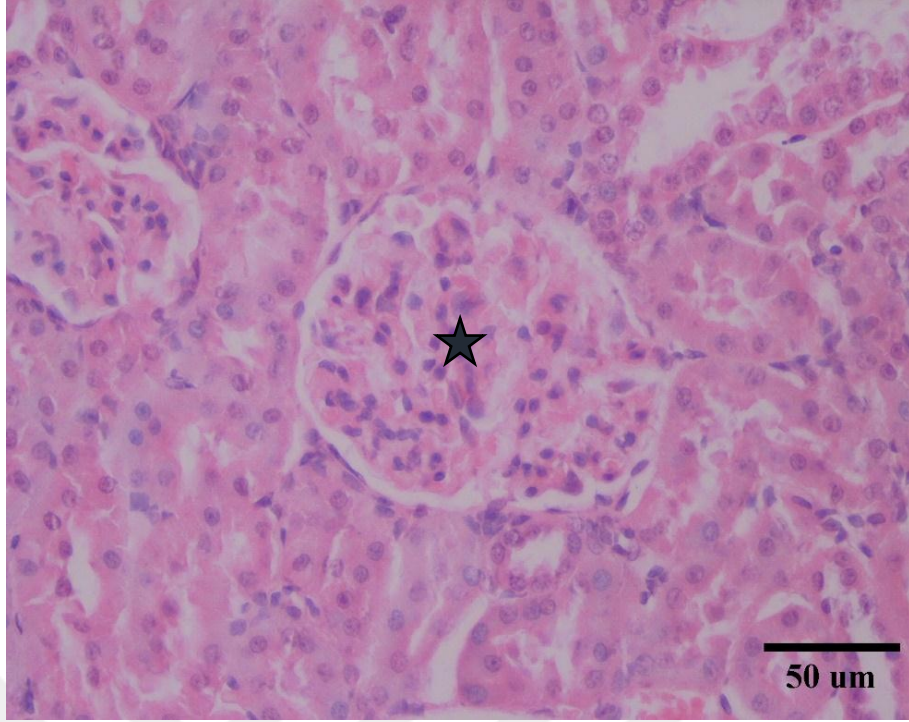
Şekil 3.4. Sli 200 Grubu: Normal histolojik yapıda glomerulus ve tubuluslar (skor 1). Böbrek. H&E.



Şekil 3.5. Tak Grubu: Glomeruluslarda şiddetli derecede şişkinlik ve hiperemi (yıldız) tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon ve deskuamasyon ile lümenlerinde dilatasyon ve proteince zengin sıvı (skor 4). Böbrek. H&E.



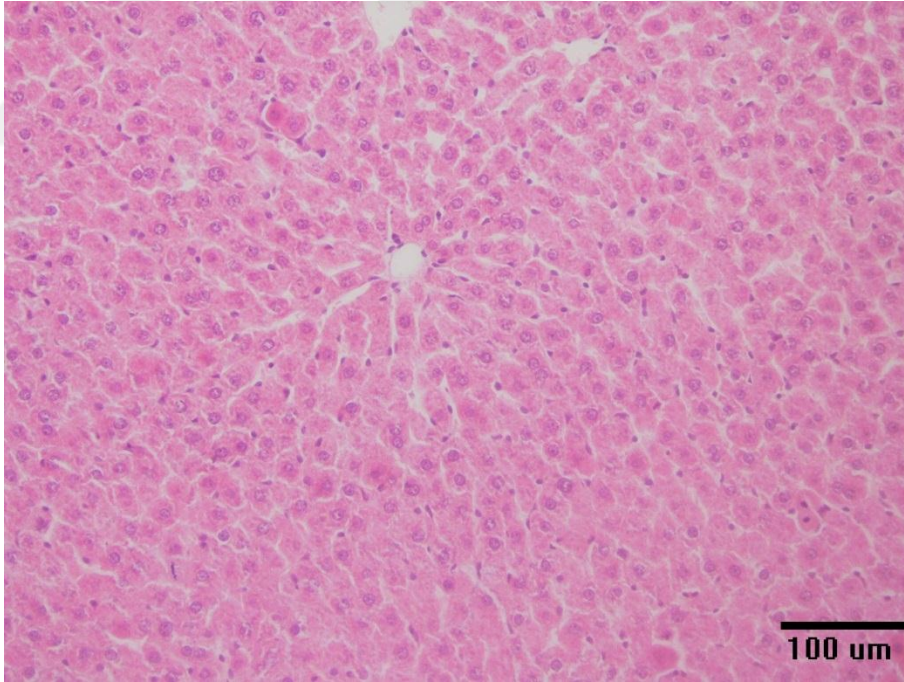
Şekil 3.6. Tak+ Sli 100 Grubu: Glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik (yıldızlar) ve hiperemi, tubulus epitellerinde şişkinlik (skor 2). Böbrek. H&E.



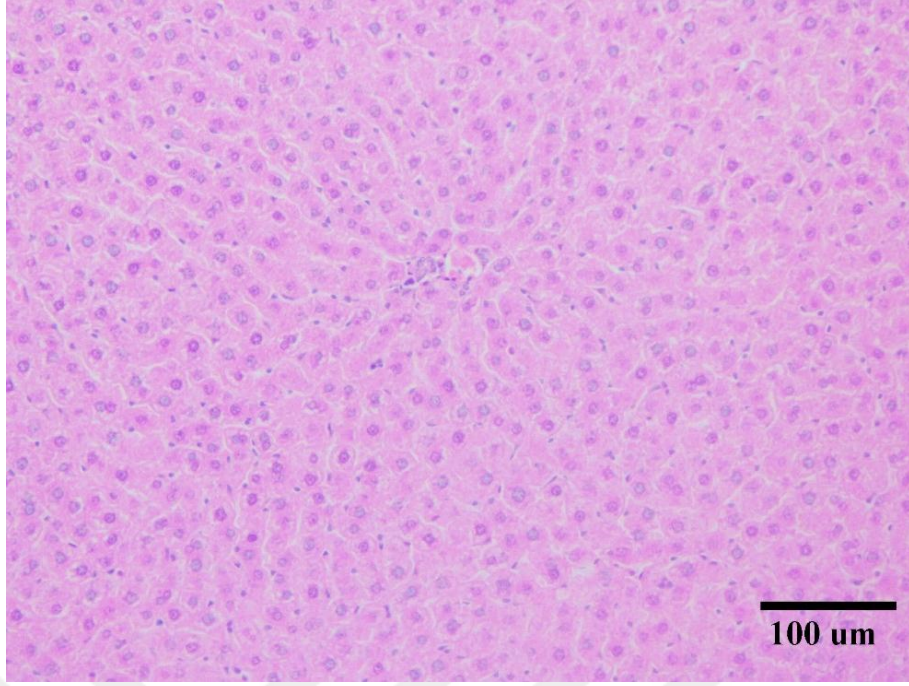
Şekil 3.7. Tak + Sli 200 Grubu: Glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik ve hiperemi (yıldız), tubulus epitellerinde şişkinlik (skor 2).Böbrek. H&E.

3.3.2. Karaciğer

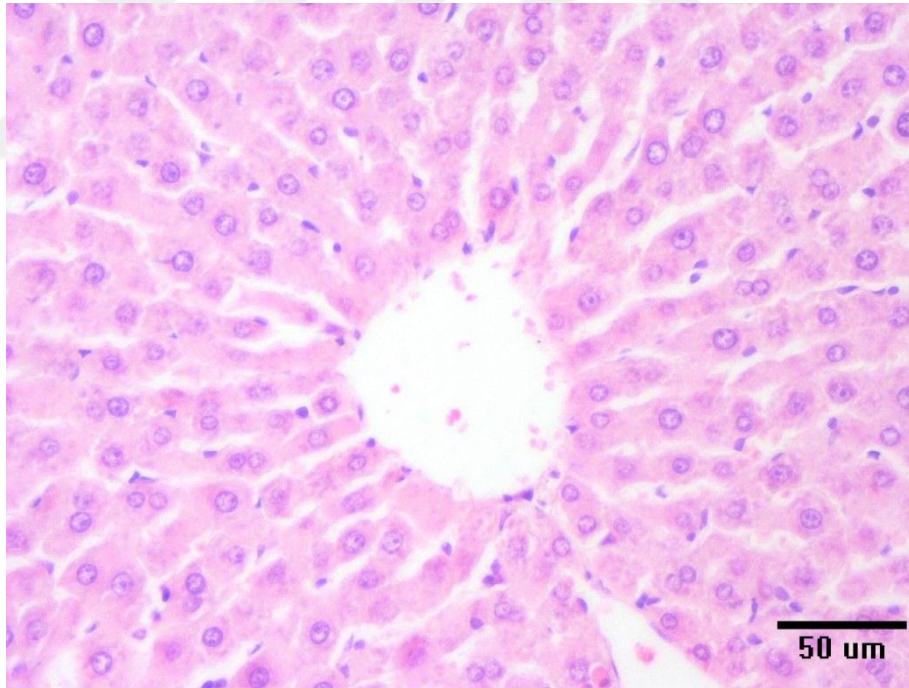
Karaciğerin mikroskopik incelemesinde Kontrol Grubu ile Sli 200 Grubunda bütün ratlarda, Sli 100 Grubunda ise 6 ratta hepatositlerde ve sinüzoidlerde herhangi bir değişikliğin (Şekil 3.8-3.9-3.10) şekillenmediği (skor 1), Sli 100 Grubu 2 ratta ise hepatositlerde şişkinlik ve sinüzoidlerde daralmanın (skor 2) geliştiği belirlenmiştir. Tak Grubu ratların hepsinde (8) hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve bazı hepatositlerde vakuol oluşumları ile sinüzoidlerin ise şiddetli derecede daraldığı ve seçilemediği (skor 4) dikkati çekmiştir (Şekil.3.11). Tak + Sli 100 Grubu ratların 5'inde hepatositlerde şişkinlik ve sinüzoidlerde daralmanın (Şekil.3.12) bulunduğu (skor 2), 1'inde ise hepatositlerde şişkinlik ve hidropik dejenerasyon ile sinüzoidlerde belirgin bir daralma olduğu (skor 3) tespit edilmiştir. Yine Tak + Sli 200 Grubu ratlardan 4'ünde hepatositlerde şişkinlik ve sinüzoidlerde daralmanın (Şekil 3.13) şekillendiği (skor 2), 1'inde ise hepatositlerde ve sinüzoidlerde herhangi bir değişikliğin (skor 1) şekillenmediği belirlenmiştir.



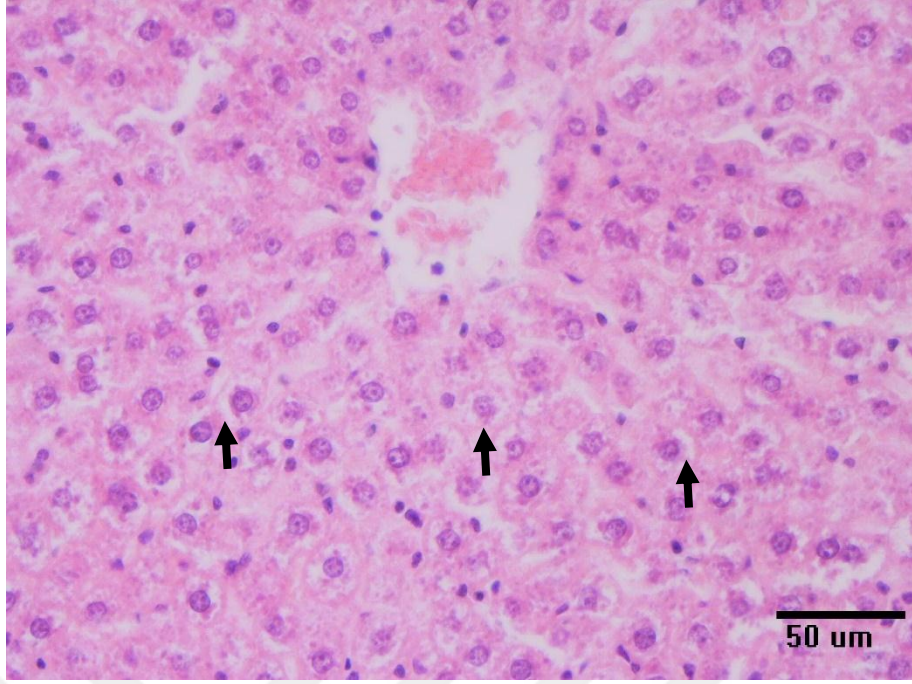
Şekil 3.8. Kontrol Grubu: Normal histolojik yapıda hepatosit ve sinüzoidler (skor 1). Karaciğer. H&E.



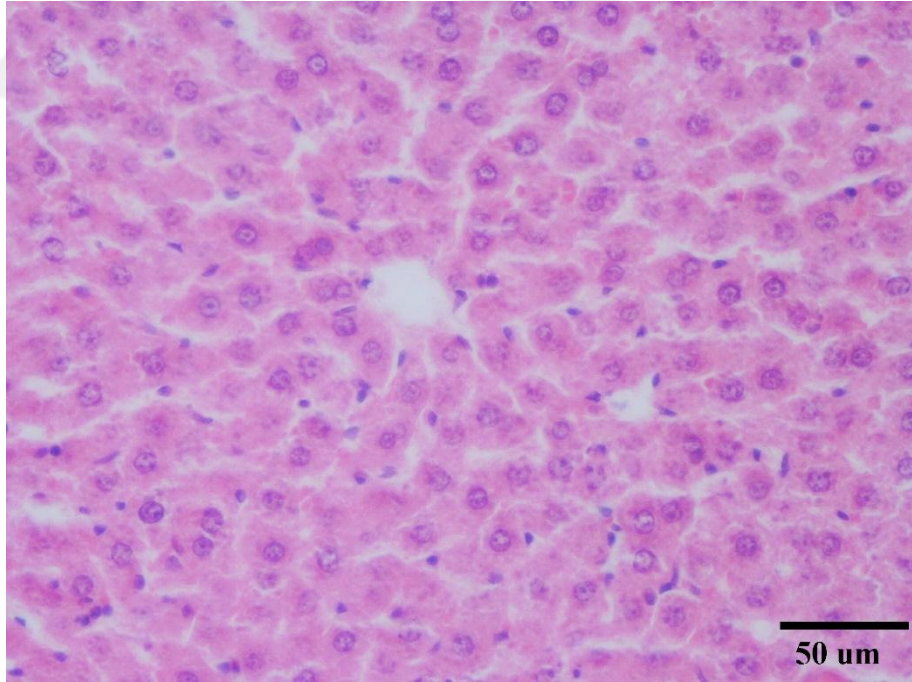
Şekil 3.9. Sli 100 Grubu: Normal histolojik yapıda hepatosit ve sinüzoidler (skor 1). Karaciğer. H&E.



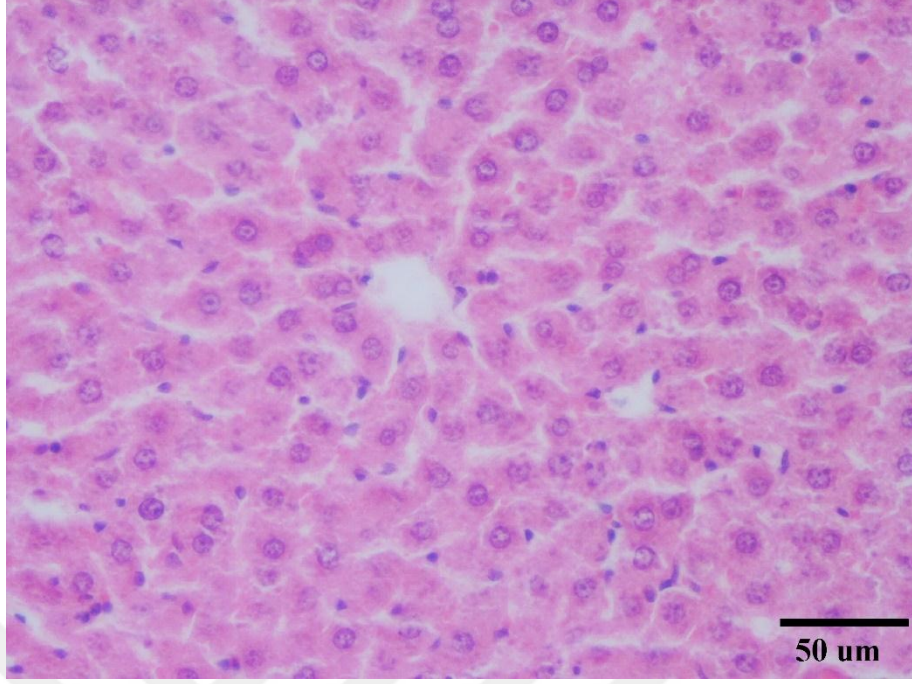
Şekil 3.10. Sli 200 Grubu: Normal histolojik yapıda hepatosit ve sinüzoidler (skor 1). Karaciğer. H&E.



Şekil 3.11. Tak Grubu: Hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve bazı hepatositlerde vakuol oluşumları (oklar), sinüzoidlerde ise şiddetli derecede daralma ve gözden kaybolma (skor 4). Karaciğer. H&E.



Şekil 3.12. Tak + Sli 100 Grubu: Hepatositlerde hafif dereceli bir şişkinlik ve sinüzoidlerde daralma (skor 2). Karaciğer. H&E.

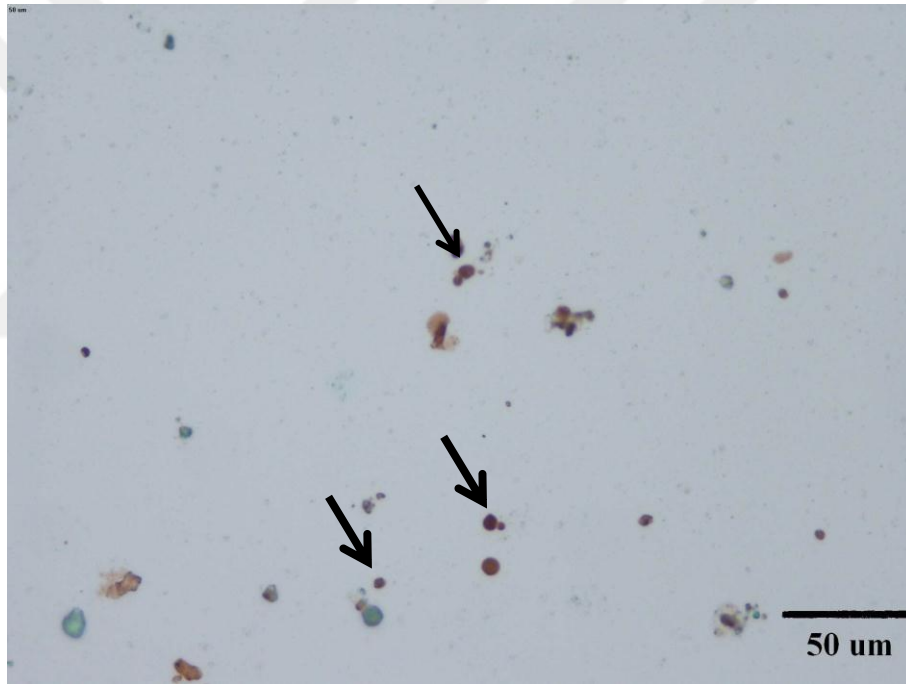


Şekil 3.13. Tak + Sli 200 Grubu: Hepatositlerde hafif dereceli bir şişkinlik ve sinuzoidlerde daralma (skor 2). Karaciğer. H&E.

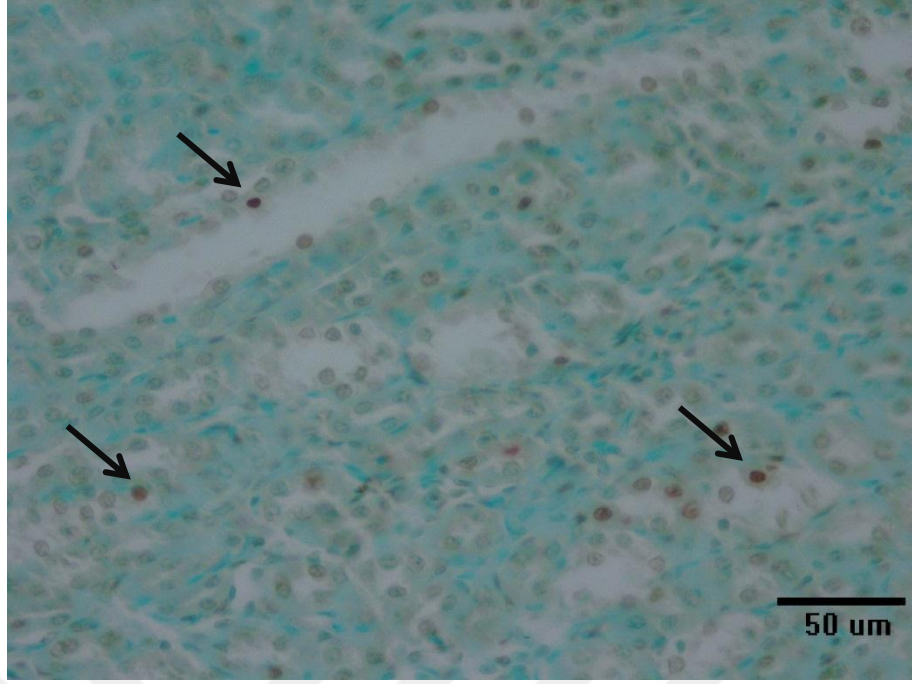
3.4. Apoptozis Bulguları

3.4.1. Böbrek

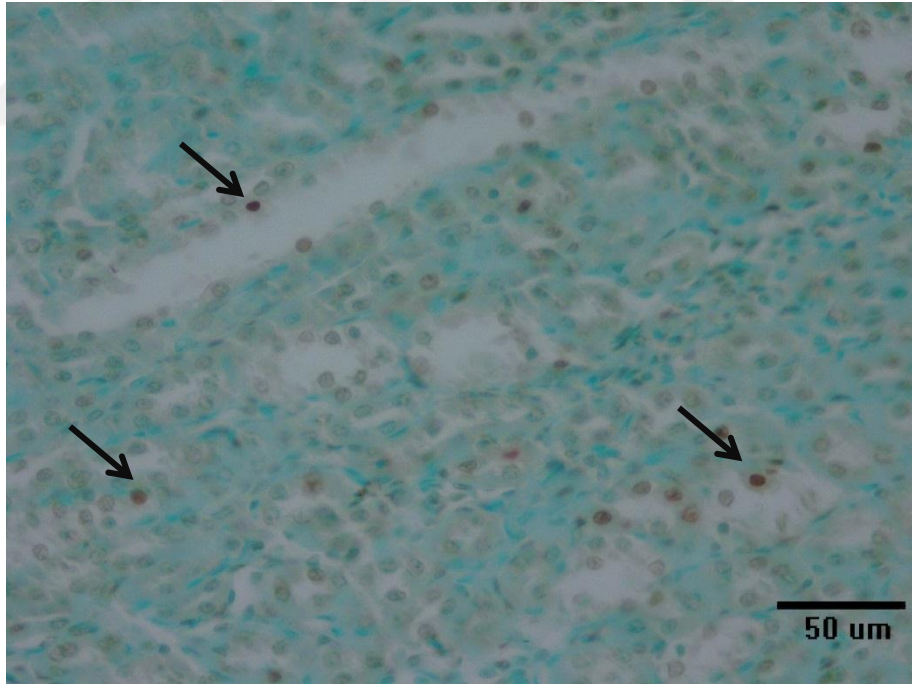
Böbrek dokusunda apoptozisi belirlemek amacıyla yapılan in situ TUNEL boyamalarında tubulus epitellerinde DNA kırılmalarını işaret eden apoptotik hücrelerin TUNEL pozitif reaksiyonlarına en belirgin olarak, pozitif kontrol preparatında (Şekil 3.14) ve Tak Grubunda rastlanılmıştır (Şekil 3.15). Bu grupta pozitif reaksiyonun görüldüğü sahalarda 40'lık büyütmede ortalama en az 6 adet pozitif reaksiyon gözlenmiştir. TUNEL pozitif reaksiyonların gözlendiği Tak + Sli 100 Grubunda 40'lık büyütmede 3 adet apoptotik hücre belirlenmiştir (Şekil 3.16). Diğer gruplarda ise TUNEL pozitif reaksiyona rastlanılamamıştır (Şekil 3.17).



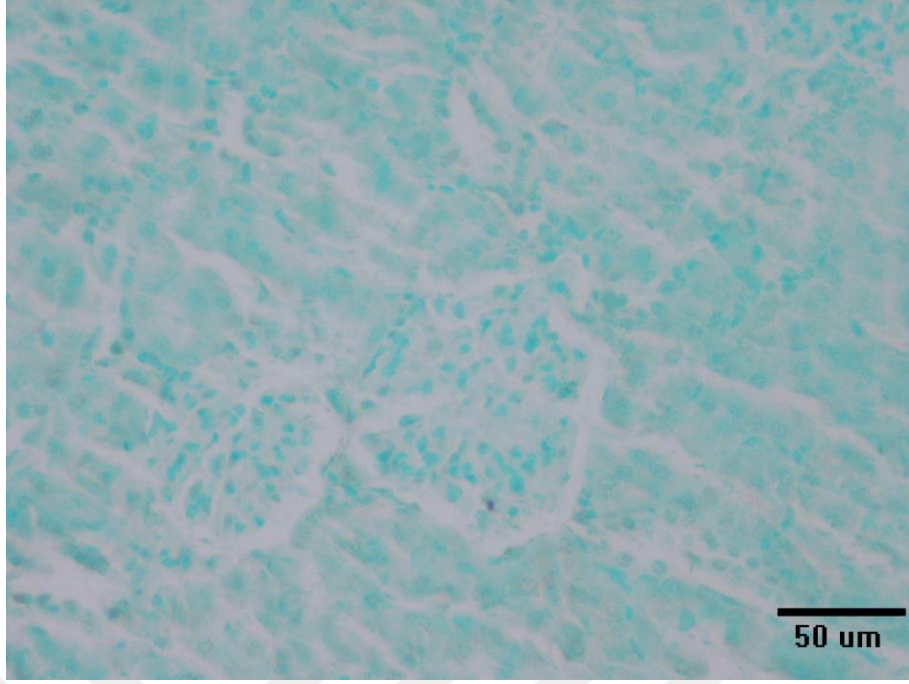
Şekil 3.14. Pozitif Kontrol Preparatı: Apoptotik hücreler (oklar).TUNEL. DAB.



Şekil 3.15. Tak Grubu: Tubulus epitellerinde apoptotik hücreler (oklar). Böbrek. TUNEL. DAB.



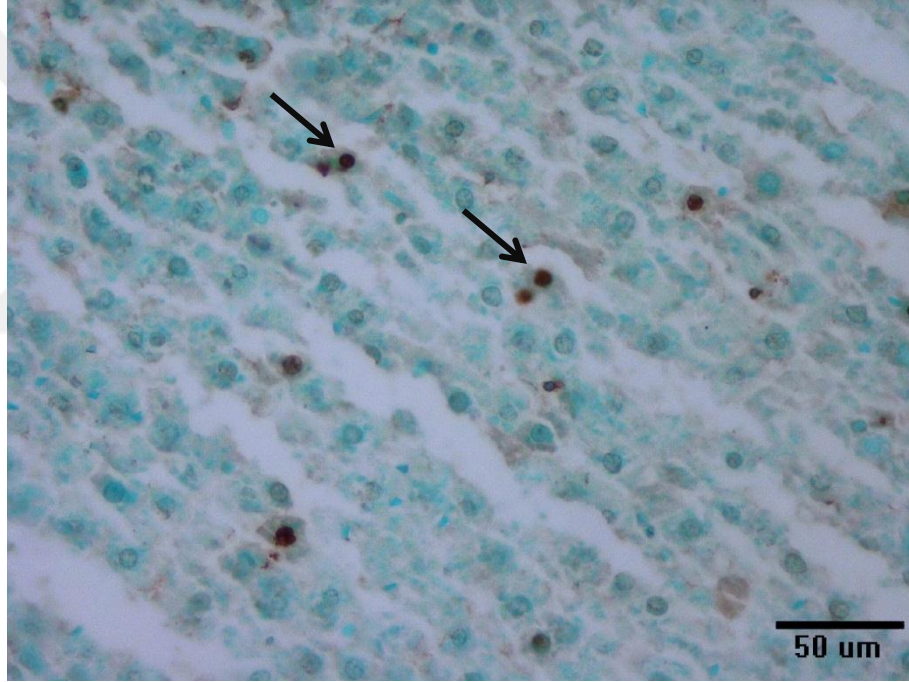
Şekil 3.16. Tak + Sli 100 Grubu: Tubulus epitellerinde apoptotik hücreler (oklar). Böbrek. TUNEL. DAB.



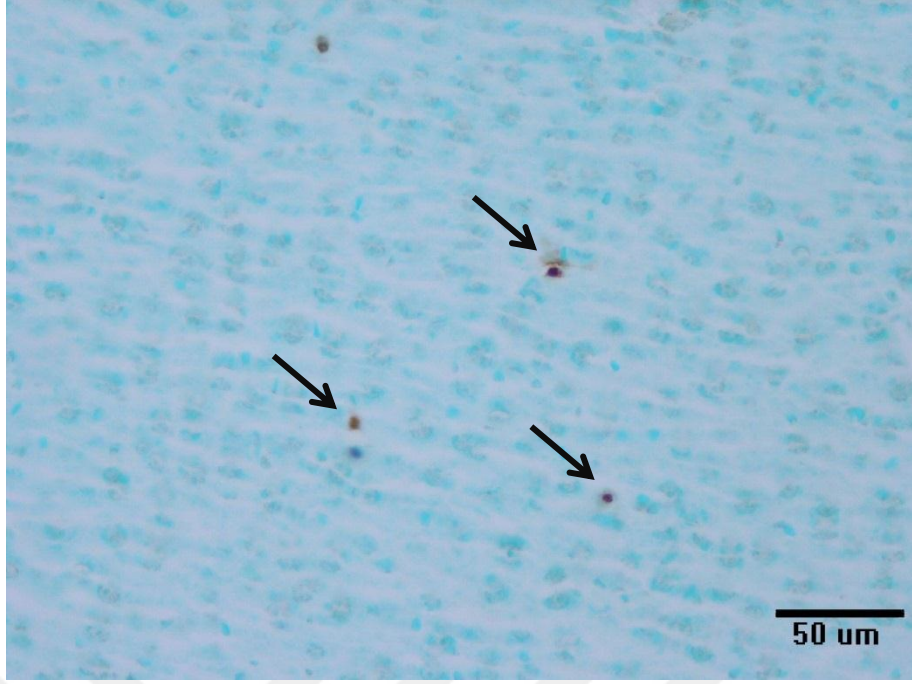
Şekil 3.17. Tak +Sli 200 Grubu: Glomerulus ve tubulusta TUNEL negatif boyanma. TUNEL. DAB.

3.4.2. Karaciğer

Karaciğerde apoptozisi belirlemek amacıyla yapılan in situ TUNEL boyamalarında hepatositlerde, DNA kırılmalarını işaret eden apoptotik hücrelerin TUNEL pozitif reaksiyonlarına en belirgin olarak, Tak Grubunda belirlenmiştir (Şekil 3.18). Bu grupta pozitif reaksiyonun görüldüğü sahalarda 40'lık büyütmede ortalama en az 6 adet pozitif reaksiyon gözlenmiştir. TUNEL pozitif reaksiyonların gözlendiği Tak + Sli 100 Grubunda ise 40'lık büyütmede 3 adet apoptotik hücre belirlenmiştir (Şekil 3.19). Diğer gruplarda 40'lik büyütmelerde genelde 1 adet apoptotik hücre tespit edilebilmiştir (Şekil 3.20.-3.21).



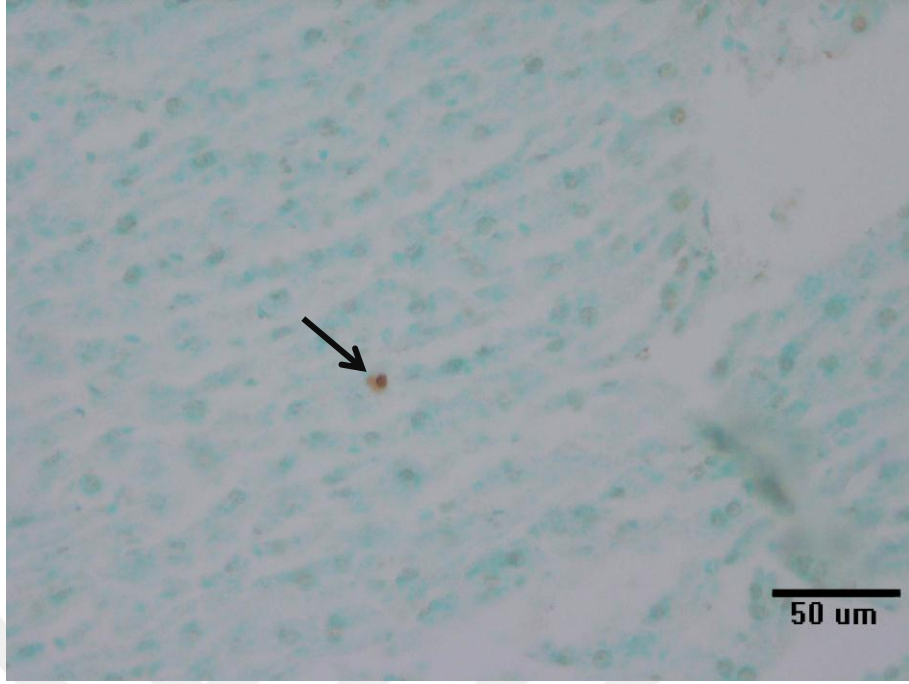
Şekil 3.18. Tak Grubu: Hepatositlerde apoptotik hücreler (oklar). Karaciğer. TUNEL. DAB.



Şekil 3.19. Tak + Sli 100: Karaciğerde apoptotik hücreler (oklar). Karaciğer. TUNEL. DAB.



Şekil 3.20. Kontrol Grubu: Apoptotik hücre (ok). Karaciğer. TUNEL. DAB.



Şekil 3.21.Tak + Sli 200: Apoptotik hücre (ok). Karaciğer. TUNEL. DAB.

3.5. Biyokimyasal Sonuçlar

Deneysel çalışmanın sonunda alınan kan serum örneklerinden TOS, TAS ile ALT, AST ve GGT, Albumin, Bilirubin, Kreatin düzeyleri tayin edilmiştir. Bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3.4.'de sunulmuştur.

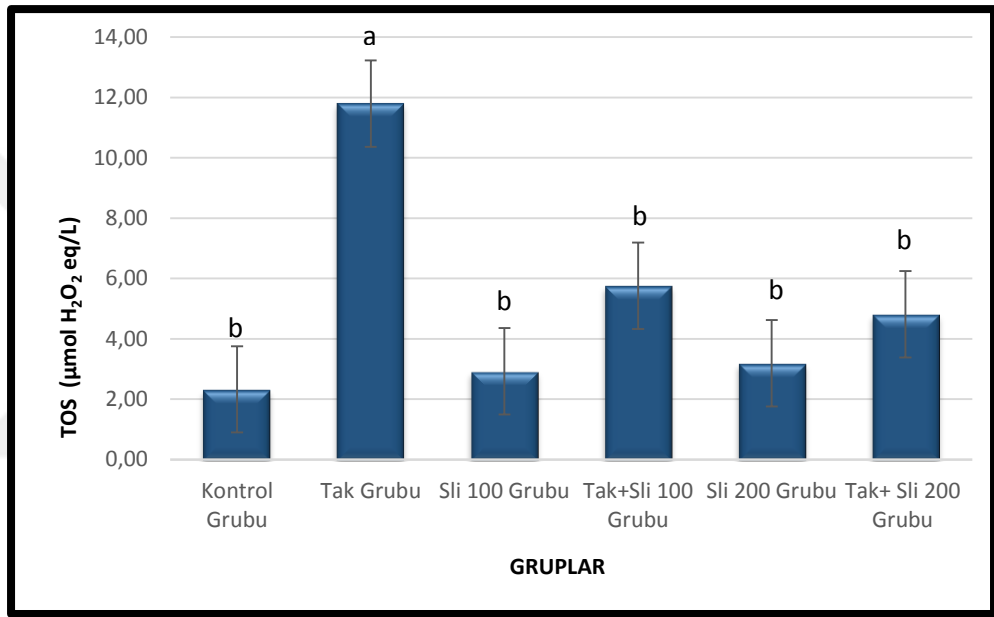
Çizelge 3.4.Serum Biyokimyasal Bulguların Gruplara göre Dağılımı (X±SEM).

| | Kontrol Grubu | Tak Grubu | Sli 100 Grubu | Tak+ Sli 100 Grubu | Sli 200 Grubu | Tak +Sli 200 Grubu |
|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| TOS (µmol H₂O₂ eq/L) | 2,33±0,45 ^b | 11,8±2,40 ^a | 2,93±0,38 ^b | 5,76±2,05 ^b | 3,19±1,25 ^b | 4,82±1,76 ^b |
| TAS(mmol Trolox eq/L) | 3,05±0,32 | 2,04±0,16 | 3,22±0,27 | 3,03±0,17 | 3,01±0,73 | 3,57±0,58 |
| ALT(U/L) | 58,6±2,48 ^b | 67,3±1,70 ^a | 60,1±1,84 ^b | 48,6±1,69 ^c | 59,5±2,61 ^b | 60,75±2,71 ^b |
| AST(U/L) | 99,0±3,52 ^b | 133,1±10,1 ^a | 94,1±3,01 ^b | 79,2±2,72 ^c | 99,0±5,75 ^b | 96,7±10,5 ^b |
| GGT(UI/L) | 1,66±0,21 ^{bc} | 2,42±0,20 ^a | 1,85±0,14 ^{abc} | 2,20±0,20 ^{ab} | 1,50±0,22 ^c | 2,50±0,28 ^a |
| Albumin(g/dl) | 4,20±0,06 | 3,94±0,07 | 4,10±0,08 | 4,02±0,05 | 4,12±0,07 | 4,00±0,07 |
| Total Biluribin(mg/dl) | 0,24±0,02 ^b | 0,31±0,34 ^a | 0,20±0,00 ^b | 0,18±0,02 ^b | 0,18±0,02 ^b | 0,20±0,03 ^b |
| Kreatin(mg/dl) | 0,56±0,02 ^b | 0,68±0,22 ^a | 0,55±0,01 ^b | 0,66±0,00 ^a | 0,55±0,03 ^b | 0,60±0,01 ^b |

a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık önemlidir (p<0,05).

3.5.1. Serum Total Oksidan Seviyesi (TOS)

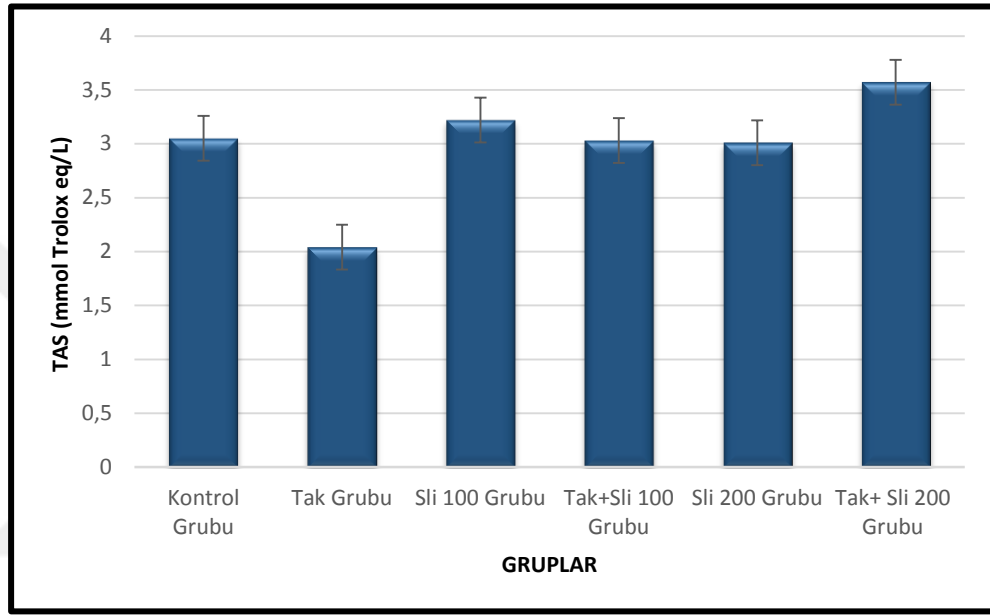
Kan serumu TOS en düşük olarak Kontrol Grubunda ($2,33\pm 0,45$), en yüksek olarak da Tak Grubunda ($11,8\pm 2,40$) belirlenmiştir. Sli 100 Grubu ($2,93\pm 0,389$) ile Sli 200 Grubunda ($3,19\pm 1,25$) kontrol grubuna yakın, Tak + Sli 100 Grubu ($5,76\pm 2,05$) ile Tak + Sli 200 Grubunda ($4,82\pm 1,76$) ise Tak grubuna yakın olarak bulunmuştur. İstatistiksel analizlerinde Tak Grubu ile diğer deneme grupları arasında istatistiksel anlamda önemli ($p < 0,05$) oranda farklılıklar bulunmuştur.



Grafik 3.4. Ortalama TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.2. Serum Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

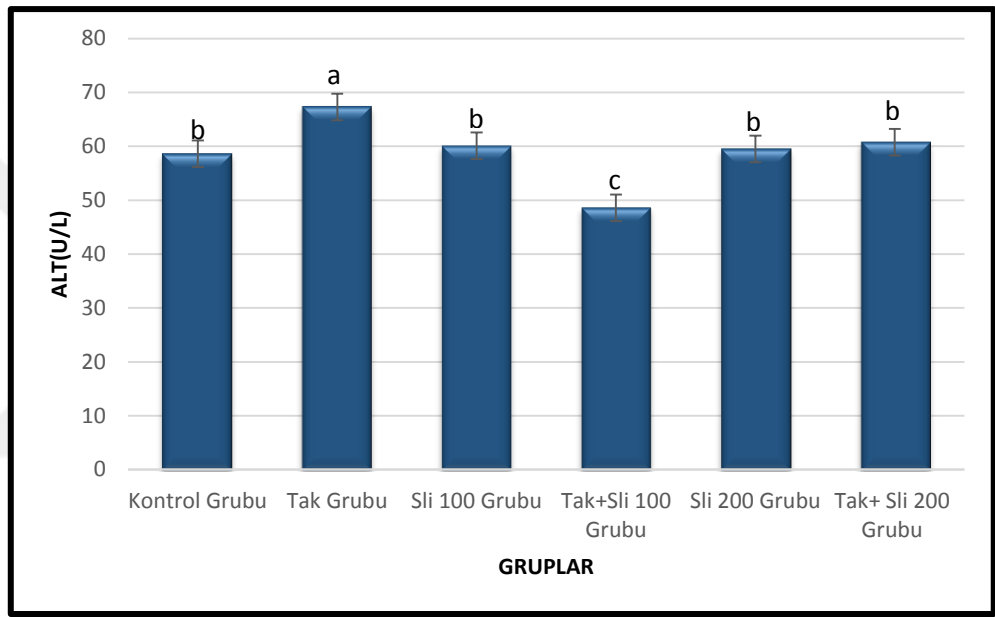
Kan serumu TAS, en düşük seviyede Tak Grubunda ($2,04 \pm 0,16$), en yüksek seviyede Tak +Sli 200 Grubunda ($3,57 \pm 0,58$) bulunmuştur. Diğer gruplarda ise bu iki değer arasında tespit edilmiştir. (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.5). Gruplar arasında TAS düzeyi farklılıklarının istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0,05$) belirlenmiştir.



Grafik 3.5. Ortalama TAS değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.3. Kan Serum ALT Seviyesi

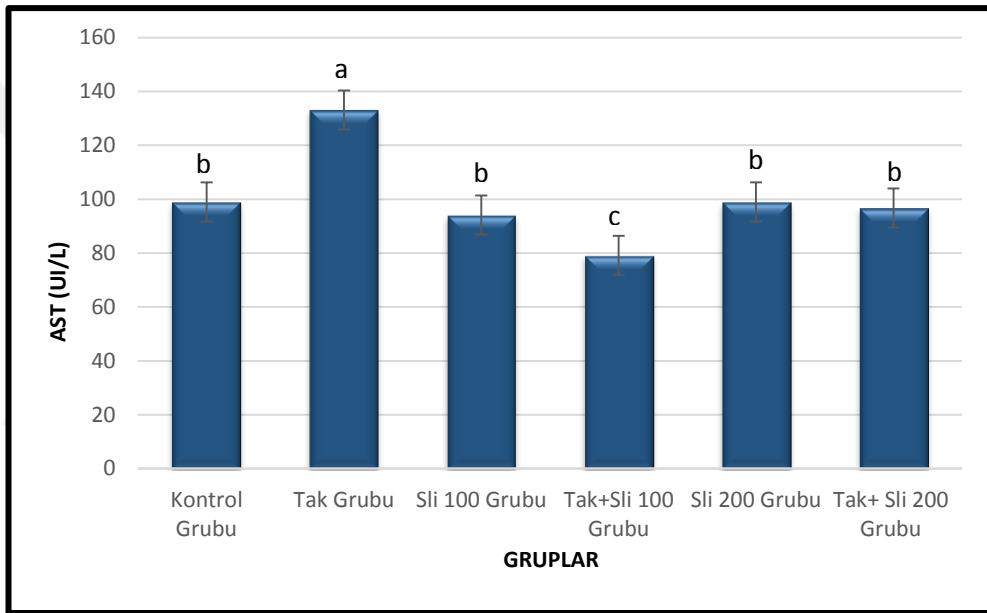
Kan serumu ALT seviyesi, en yüksek olarak Tak Grubunda ($67,3 \pm 1,70$) tespit edilmiştir. Kontrol Grubunda $58,6 \pm 2,48$; Sli 100 Grubunda $60,1 \pm 1,84$; Tak + Sli 100 Grubunda $48,6 \pm 1,69$; Sli 200 Grubunda $59,5 \pm 2,61$; Tak + Sli 200 Grubunda $60,75 \pm 2,71$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.6). Bu sonuçlar ile yapılan analizde gruplar arası ALT değerleri istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur.



Grafik 3.6. Ortalama ALT değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.4. Kan Serum AST Seviyesi

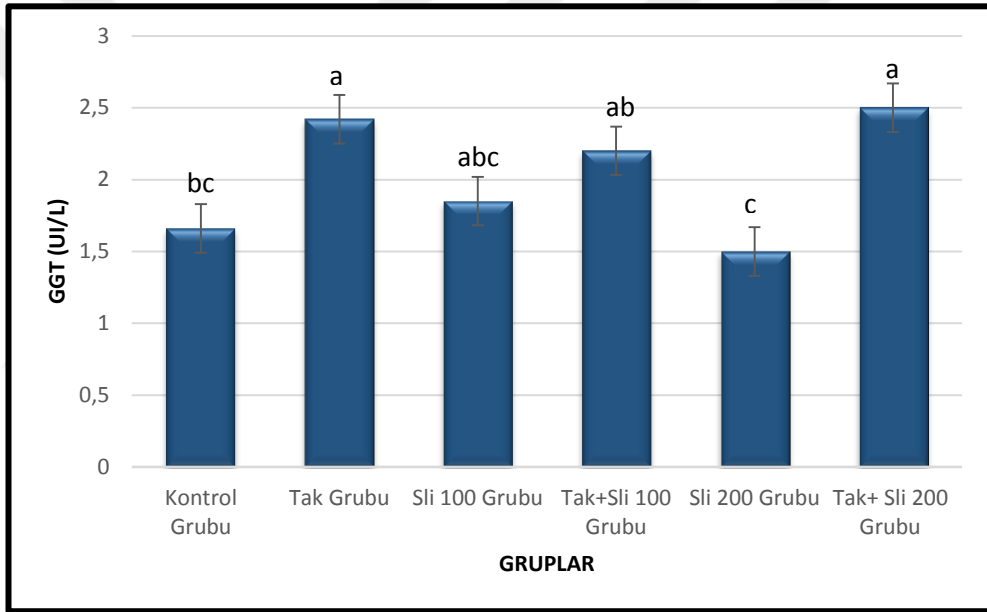
Çalışmada kan serum AST seviyesi, en yüksek olarak Tak Grubunda (133,1±10,1) ve en düşük olarak Tak +Sli 100 Grubunda (79,2±2,72) tespit edilmiştir (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.7). Kontrol Grubunda 99,0±3,52; Sli 100 Grubunda 94,1±3,01 Sli 200 Grubunda 99,0±5,75; Tak + Sli 200 Grubunda 96,7±10,5 olarak belirlenmiştir. Kan serumu AST sonuçlar ile yapılan analizde gruplara arası AST değerleri istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.



Grafik 3.7. Ortalama AST değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.5. Kan Serum GGT Seviyesi

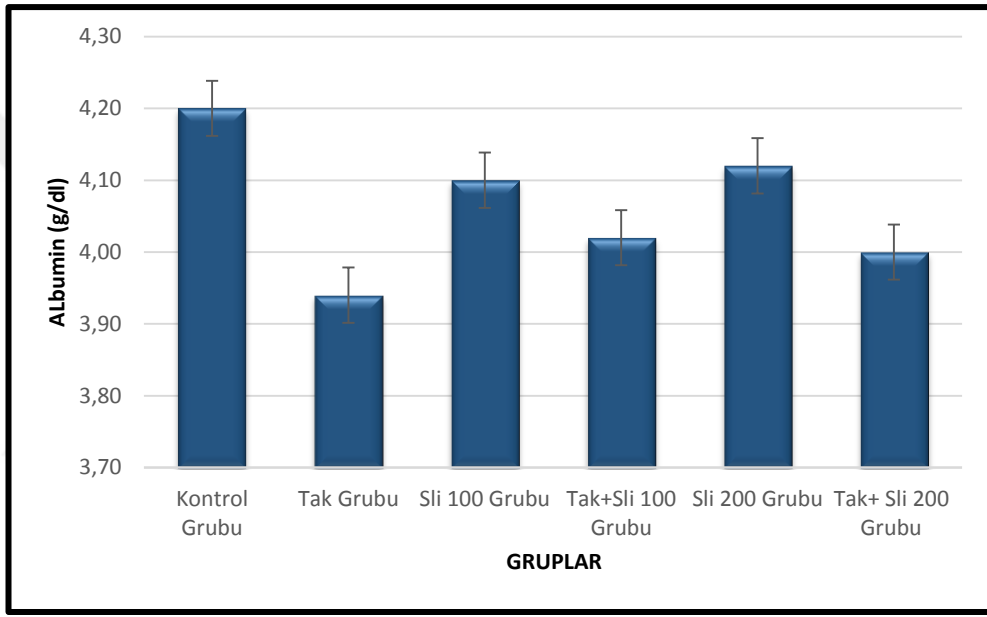
Çalışmada kan serumu GGT seviyesi, en düşük olarak Sli 200 Grubunda ($1,50\pm 0,22$) tespit edilmiştir. Kontrol Grubunda $1,66\pm 0,21$; Tak Grubunda $2,42\pm 0,20$; Sli 100 Grubunda $1,85\pm 0,142$; Tak +Sli 100 Grubunda $2,20\pm 0,20$; Tak + Sli 200 Grubunda $2,50\pm 0,28$; olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.8). Kan serumu GGT sonuçlar ile yapılan analizlerde gruplara arası GGT değerleri istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.



Grafik 3.8. Ortalama GGT değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.6. Kan Serum Albumin Seviyesi

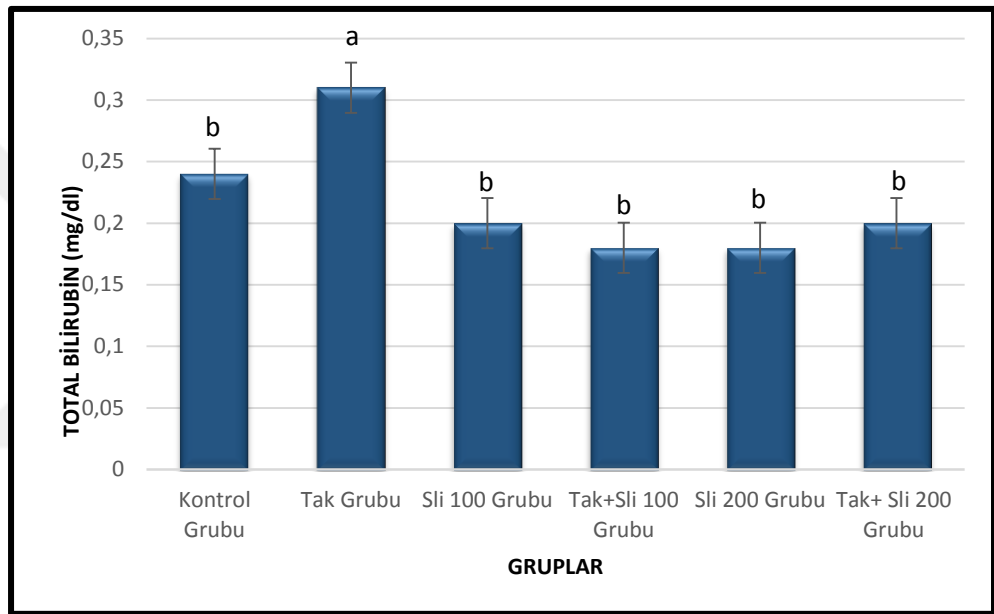
Kan serumu Albumin seviyesi, en yüksek Kontrol Grubunda ($4,20\pm 0,06$) ve en düşük olarak Tak Grubunda ($3,94\pm 0,007$) tespit edilmiştir. Sli 100 Grubunda $4,10\pm 0,08$; Tak + Sli 100 Grubunda $4,02\pm 0,05$; Sli 200 Grubunda $4,12\pm 0,07$; Tak + Sli 200 Grubunda $4,00\pm 0,07$ olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.9). Kan serumu Albumin düzeyi sonuçlar ile yapılan analizlerde gruplar arasında Albumin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) bir fark bulunmamıştır.



Grafik 3.9. Ortalama Albumin değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.7. Kan Serum Total Bilirubin Seviyesi

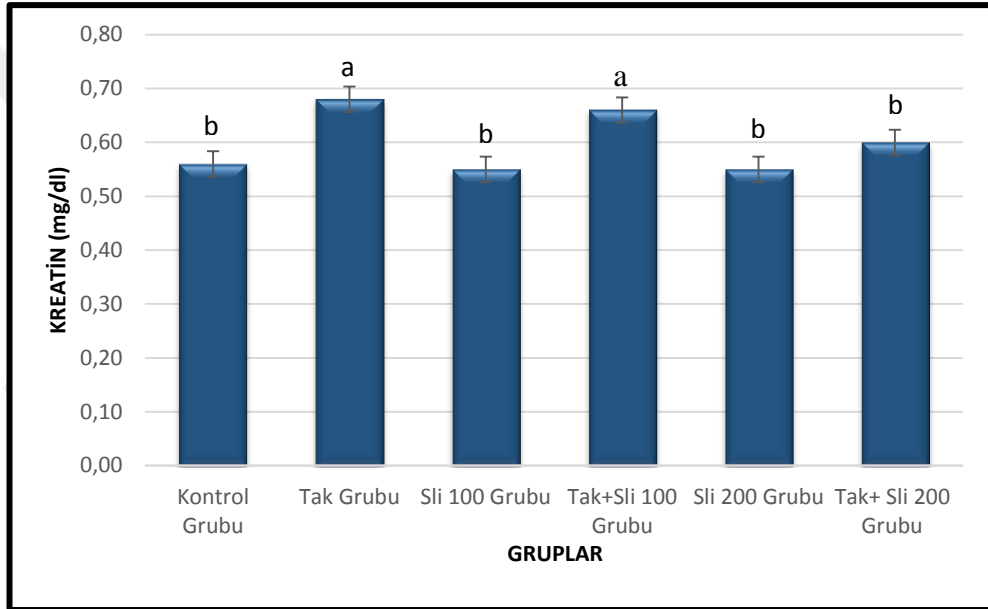
Kan serumu Total Bilirubin seviyesi, en yüksek olarak Tak Grubunda ($0,31\pm0,34$) belirlenmiştir. Kontrol Grubunda $0,24\pm0,02$; Sli 100 Grubunda $0,20\pm0,00$; Tak + Sli 100 Grubunda $0,18\pm0,02$; Sli 200 Grubunda $0,18\pm0,02$; Tak + Sli 200 Grubunda $0,20\pm0,03$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.10). Çalışmada gruplar arasında serum Total Bilirubin seviyeleri farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.



Grafik 3.10. Ortalama Total Bilirubin değerlerinin gruplara göre dağılımı.

3.5.8. Kan Serum Kreatin Seviyesi

Çalışmada kan serum Kreatin seviyesi, en yüksek Tak Grubunda ($0,68\pm0,22$) belirlenmiştir. Kontrol Grubunda $0,56\pm0,02$; Sli 100 Grubunda $0,55\pm0,01$; Tak + Sli 100 Grubunda $0,66\pm0,00$; Sli 200 Grubunda $0,55\pm0,03$; Tak + Sli 200 Grubunda $0,60\pm0,01$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.4 ve Grafik 3.11). Kan serumu Kreatin sonuçlar ile yapılan analizlerde gruplara arası Kreatin değerleri istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.



Grafik 3.11. Ortalama Kreatin değerlerinin gruplara göre dağılımı.

4. TARTIŞMA

Organ transplantasyonlarının vazgeçilmezi olan immünosüpresif ilaçlar uzun süreli kullanıldığında kronik toksisiteye ilgili yan etkiler her zaman önemli sorun olarak görülmektedir (Popli ve Prabhakar 2015). İmmünosüpresif ilaç uygulamalarına erken ara verilirse veya dozu düşürülecek olursa transplant dokunun reddi riski olduğundan bu ilaçların yeterli dozda ve yeterli sürede uygulanması gerekmektedir. Bu nedenle immünosüpresif ilaçların yan etkilerine karşı koruyucu olarak antioksidan maddeler yaygın olarak kullanılmaktadır (Butani ve ark 2003, Al-Harbi ve ark 2015). Bu çalışmada takrolimusun yan etkilerine karşı koruyucu olarak yüksek antioksidan özelliğe sahip *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Deve Dikeni) bitkisi tohumlarından elde edilen silimarin (Deve dikenii sütü) kullanılmıştır.

Silimarinin, hücrelerde glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimleri artırarak lipid peroksidasyon oluşumunu engellediği ve böylece doku ve organlarda oksidatif strese karşı koruyucu olduğu kabul edilmektedir. Silimarin, hücre membranlarında permeabilityi düzenlemek suretiyle hepatositlerin dejenerasyonlara karşı koruyucu olmasının yanı sıra, RNA polimeraz I'i aktive ederek ribozomal protein sentezini artırması ve böylece de hepatositlerin rejenerasyonunda etkili olması nedeniyle karaciğer koruyucu ve sirozu engelleyici olarak yüzyıllardır geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır (Kşen ve Walterova 2005, Post-White ve ark 2007). Bu çalışma ile takrolimusun nefrotoksik ve hepatotoksik etkilerine karşı silimarinin koruyuculuğunun histopatolojik, in situ TUNEL ve biyokimyasal metodlarla araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan ratların çalışma boyunca canlı ağırlık artışları değerlendirildiğinde; Tak Grubu canlı ağırlık artış oranı % 22,27, Kontrol Grubunun ise % 26,66 olduğu dikkate alınınca, takrolimusun canlı ağırlık artışını olumsuz etkilediği anlaşılmaktadır. Mollison ve ark (1998) ile Abdelhadi ve ark (2002) tarafından yapılan çalışmalarda da takrolimusun canlı ağırlık artışını ve büyümeyi olumsuz etkilediği kaydedilmiştir. Sunulan çalışmada Sli 100 Grubunda % 34,73, Sli 200 Grubunda ise % 33,68 olması, her iki grubun canlı ağırlık artış oranının kontrol grubundan daha fazla olduğunu göstermekte, bu durum da silimarinin canlı ağırlık artışını hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu şeklinde de yorumlanabilir. Ayrıca Tak + Sli 100 Grubunda % 22,92, Tak + Sli 200 Grubunda %

23.71 olarak belirlenen canlı ağırlık artış oranının kontrol grubundan düşük, Tak Grubundan az da olsa yüksek çıktığı dikkati çekmekte, bu bulgulardan hareketle silimarinin, takrolimusun canlı ağırlık artışı üzerindeki olumsuz etkisini kısmen önlediği anlaşılmaktadır. Zhang ve ark (2013) tarafından ratlarda etanol hepatotoksitesine karşı silimarinin kullanıldığı çalışmada, etanol + silimarin verilen ratların canlı ağırlık artışının etanol grubuna göre daha fazla olduğu kaydedilmektedir. Bu durum da, çalışmamızda ifade edildiği gibi silimarinin canlı ağırlık artışı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir.

Takrolimusun immünoşüpresif amaçla uzun süreli kullanımında en önemli yan etkisi nefrotoksisite olduğu için bu konuda çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır (Naesens ve ark 2009, Kedzierska ve ark 2011). Al-Harbi ve ark (2015) ratlara 14 gün süre ile 2 mg/kg ip yolla takrolimus vererek yaptıkları çalışmada, histopatolojik olarak takrolimusun böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon ve vakuolizasyona, glomerüllerde hiperemi ve şişkinliğe, ayrıca interstisyel dokuda da mononükleer hücre infiltrasyonuna neden olduğunu kaydetmişlerdir. Kedzierska ve ark (2011) takrolimus ve siklosporini birlikte kullandıkları çalışmada proksimal tubul epitellerine zarar verdiğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada da Tak Grubu ratların hepsinde glomeruluslarda şiddetli derecede şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon ile tubuluslarda dilatasyon, lümenlerinde proteince zengin sıvı, interstisyel dokuda hiperemi (skor 4) ile beliren şiddetli derecede patolojik değişiklikler takrolimusun nefrotoksik etkisini ifade eden bulgulardır. Beşeri hekimlikte böbrek biyopsi örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda (Randhawa ve ark 1997, Naesens ve ark 2009) interstisyel fibrozis, tubuler atrofi, tubuler mikrokalsifikasyonlarla birlikte, arterioler hiyalinozis gibi kronik nefrotoksisite bulgularının da görüldüğü kaydedilmektedir. Takrolimus organ nakillerini takiben genellikle ilk 3 ayda yüksek dozda olmak üzere, çok uzun süreli kullanılan bir preparattır. Bu nedenle doğal olgularda genellikle kronik nefrotoksisiteyle ilgili bulguların görülmesi olağandır. Yapılan bu çalışmada takrolimusun ratlara 6 hafta gibi kısa denilebilecek bir süreyle verilmiş olmasından kronik nefrotoksisiteye ilgili lezyonlara rastlanmamıştır.

Takrolimus nefrotoksitesine karşı silimarinin kullanıldığı çalışmalara rastlanılamamışsa da, sisplatin ve adriamisin gibi kemoterapötik ilaçların nefrotoksitesine karşı böbrek koruyucu olarak silimarinin kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (El-Shitany ve ark 2008, Abdelmeguid ve ark 2010). Abdelmeguid ve ark (2010) histopatolojik olarak sisplatin ve silimarin ile yaptıkları çalışmada, glomerulus ve tubulus hücrelerinde sisplatinin neden olduğu dejeneratif ve nekrotik etkileri silimarinin büyük ölçüde engellediğini bildirmişlerdir. Yine El-Shitany ve ark (2008) adriamycin nefrotoksitesine karşı koruyucu olarak silimarinin kullanıldığı çalışmada histopatolojik incelemelerde silimarinin renal tubuler hasarı engellediğini kaydetmişlerdir. Sunulan çalışmada ise tubulus ve glomeruluslardaki değişikliklerin hem Tak + Sli 100 Grubunda (5 olguda skor 2, 1 olguda skor 3) ve hem de Tak + Sli 200 Grubunda (olguların tamamında skor 2) glomeruluslarda hafif dereceli şişkinlik ve hiperemi, tubulus epitellerinde şişkinlik gibi Tak Grubuna (olguların tamamında skor 4) göre oldukça hafif düzeyde değişikliklerin belirlenmiş olması, bu çalışma ile de silimarinin takrolimus toksitesine karşı önemli derecede koruyucu bir etkisinin olduğunu göstermiştir.

Çalışmada elde edilen histopatolojik bulgulara ilgili skorların istatistiksel sonuçları değerlendirildiğinde; Tak Grubu ile diğer gruplar arasında gözlenen farkın anlamlı olması ($p < 0,05$) takrolimusun böbrek dokusunda önemli düzeyde lezyonlara neden olduğunun bir ifadesidir. Yine istatistiksel değerlendirmede Tak + Sli 100 ve Tak + Sli 200 gruplarının skorları rakamsal olarak Kontrol, Sli 100 ve Sli 200 grupları ile Tak Grubu arasında kaldığı, fakat Kontrol, Sli 100 ve Sli 200 gruplarına daha yakın olduğunun belirlenmiş olması ise silimarinin lezyonları önlemede etkili olduğunun diğer bir istatistiksel sonucudur.

Deneysel olarak yapılan bu çalışma ile takrolimusun hepatotoksitesine ilgili akut ve/veya subakut histopatolojik bulgular kaydedilmiştir. Çalışmada Tak Grubu ratların tamamında (8 rat) hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve bazı hepatositlerde yağ dejenerasyonu, sinüzoidlerde ise şiddetli derecede daralma, gözden kaybolma gibi lezyonların (skor 4) belirlenmiş olması, takrolimusun hepatotoksik etkisinin önemli düzeyde olduğunun bir göstergesidir. Çalışmada histopatolojik olarak, böbreklerde olduğu gibi, karaciğerde de hepatositlerde dejenerasyonlar, sinüzoidlerde daralmalar gibi sadece akut ve/veya subakut

değişiklikler gözlenmiş, bağ doku ve safra kanallarında artış gibi kronik hepatotoksisiteye ilgili bulgulara rastlanılmamıştır. Beşeri hekimlikte takrolimusun hepatotoksisitesine ilgili biyopsi örnekleri ile yapılan çalışmalarda (Demetris ve ark 1990, Khettry ve ark 2002, Taniai ve ark 2008) Kupffer hücrelerinde artış ve sentrilobüler fibrozis gibi kronik hepatotoksisiteyi ifade eden bulgular görüldüğü kaydedilmiş olması, takrolimusun tedavi maksadıyla uzun süreli kullanılması sonucudur.

Karbondetralörür, parasetamol, benzopiren D galaktozamin, tioasetamid, thallium, mantar toksinleri, hatta bakteriyel endotoksinler, viral hepatit ve alkol orijinli karaciğer hasarlarına karşı silimarinin koruyucu etkisinin incelendiği çok sayıda deneysel çalışma mevcuttur (Fraschini ve ark 2002, Salam ve ark 2009, Abenavoli ve ark 2010). Bu maksatla Salam ve ark (2009) karbondetralörür, Madani ve ark (2008) ise tiyoasetamid hepatotoksisitesine karşı koruyucu olarak silimarin kullandıkları deneysel çalışmalarda, silimarinin hepatositlerde vakuolizasyon ile büyük damlalı yağlanma, yaygın nekroz gibi lezyon oluşumlarını önemli düzeyde azalttığını, yani karaciğer koruyucu etkisinin yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Silimarinin karaciğeri koruyucu etkisinin biliniyor olmasına rağmen, takrolimus hepatotoksisitesine karşı silimarinin koruyucu olarak kullanıldığı deneysel bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Deneysel olarak yapılan bu çalışma ile takrolimusun hepatotoksisitesine karşı silimarinin koruyucu etkisi histopatolojik olarak ilk kez belirlenmiş olmaktadır.

Çalışmada Tak Grubu ratlarda (olguların tamamında skor 4) hepatositlerde vakuol oluşumuna kadar giden şiddetli dejenerasyonların gözlenmiş olmasına karşın, hem Tak + Sli 100 Grubu (5 olguda skor 2 ve 1 olguda skor 1) ve hem de Tak + Sli 200 Grubu ratlarda (4 olguda skor 2, 1 olguda skor 1) hepatositlerde sınırlı düzeyde dejenerasyon gibi oldukça hafif dereceli lezyonların belirlenmiş olması, takrolimusun neden olduğu hepatotoksisiteye karşı silimarinin önemli düzeyde bir koruyucu etkisinin göstergesidir. Ayrıca Sli 100 (6 adedinde skor 1, 2 adedinde 2) ve Sli 200 (skor 1) gruplarının histopatolojik bulgularının Kontrol Grubu (skor 1) ile benzer olması, her iki doz uygulamasından da iyi sonuç alındığını, fakat 200 mg/kg dozunun daha uygun olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada karaciğere ilgili elde edilen histopatolojik skorların istatistiksel analizi değerlendirildiğinde, diğer gruplar ile Tak Grubu arasında anlamlı düzeyde farkın ($p<0,05$) belirlenmiş olması da, takrolimusun hepatotoksik etkisini istatistiksel olarak ortaya koymaktadır. Ayrıca Tak Grubu ile Tak + Sli 100 ve Tak + Sli 200 gruplarının arasındaki farkın anlamlı düzeyde ($p<0,05$) düşük olarak belirlenmiş olması da, silimarinin takrolimus toksisitesine karşı karaciğeri koruduğunun bir göstergesidir.

İmmünoşüpresif ajanlar, hidroksil radikalleri (OH^-), süperoksit anyonları (O_2^-) ve peroksil radikalleri (ROO^-) gibi serbest oksijen radikallerinin oluşumunu teşvik etmek suretiyle hücre ve dokularda değişikliklere neden olmaktadır (Palomero ve ark 2001). Takrolimusun da toksisitesini hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu artırarak, total antioksidan seviyelerini azaltarak gösterdiği, çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Khanna ve Pieper 2006, Ara ve ark 2011). Bu maksatla yapılan çalışmalarda Ara ve ark (2011) takrolimusun ratlarda böbrek serbest oksijen radikallerinde, Khanna ve Pieper (2006) ise NADPH oksidaz yolağının aktivasyonunda artışa, antioksidan enzimlerden peroksit dismutaz (SOD) ve tioredoksin (TRX) seviyesini ise düşüşe neden olduğunu belirlemişlerdir. Al-Harbi ve ark (2015) yaptıkları çalışmada ise takrolimusun katalaz ve glutatyon gibi antioksidanların azalmasına neden olduğunu kaydetmişlerdir. Bu çalışmada da serum TOS düzeylerinde Tak Grubunda belirgin bir artışın ($p<0,05$) olduğu gözlenmiş ve diğer araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Silimarinin hücre ve dokulardaki koruyucu etkisine ilgili olarak Turgut ve ark (2008) tarafından ratlarda yapılan ve böbrek iskemi / reperfüzyon (I / R) hasarı için silmarinin kullanıldığı çalışmada silimarinin TOS'ni anlamlı düzeyde ($p<0,01$) düşürdüğünü, TAS'ni ise artırdığını ve böylece koruyucu etkiyi sağladığını vurgulamışlardır. Koçarlan ve ark (2016) tarafından abdominal aorta iskemi / reperfüzyon ile yapılan çalışmada, silimarinin kullanıldığı grupta istatistiksel olarak TOS'nin düşük ($p<0,001$) ve TAS'nin ise yüksek olduğu kaydedilmiştir. Yapılan bu çalışmada da TOS'nin Tak + Sli 200 ve Tak + Sli 100 gruplarında Tak Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde daha düşük seviyede tespit edilmiş olması, diğer araştırmacıların (Turgut ve ark 2008, Koçarlan ve ark 2016) sonuçlarını destekler özelliktedir. Çalışmanın TAS değerlendirildiğinde, Tak + Sli 100 ve Tak

+ Sli 200 gruplarında, Tak Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ($p>0,05$), silimarinin TAS'nin artışında etkili olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların (Turgut ve ark 2008, Koçarslan ve ark 2016) bulguları ile uyumlu sonuçlardır.

Beşeri hekimlikte doku nakillerinden sonra takrolimusun hepatotoksitesini kontrol etmek için kan serumu ALT, AST, GGT, Alkalın Fosfataz, Bilirubin seviyelerinin ölçümleri sıklıkla yapılır. Karaciğer fonksiyon testleri olarak da bilinen bu enzimlerden ALT artışı hafif dereceli karaciğer hasarına, AST seviyesinde artış hücre nekrozlarına, GGT ve bilirubin seviyelerinde artış ise karaciğer yetersizliğine yorumlanmaktadır (Whitfield 2001, Sonsuz 2007). Hepatoselüler dejenerasyonun bir diğer göstergesi de albümin seviyesindeki düşüşlerdir. Bu nedenle çalışmada da takrolimus ile ilgili hepatotoksiteyi belirleyebilmek için kan serumu ALT, AST, GGT, bilirubin ve albumin gibi enzim düzeyleri kontrol edilmiştir. Çalışmada elde edilen ALT, AST, GGT ve bilirubin seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde, öncelikle Tak Grubunda diğer gruplardan yüksek olduğu, bu farkın istatistiksel anlamda önemli seviyede ($p<0,05$) olduğu dikkati çekmektedir. Bir diğer önemli bulgu ise, bu değerlerin Tak + Sli 100 ve Tak+ Sli 200 gruplarında da değişen seviyelerde olsa da Tak Grubundan düşük olduğu görülmektedir. Bu durum silimarinin, takrolimusun hepatotoksik etkisini önlediği ve/veya azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada elde edilen albumin sonuçları ele alındığında, Tak Grubunda bütün gruplardan daha düşük olması, bu grupta hepatoselüler bir dejenerasyonun varlığına işaret etmektedir. Ayrıca Tak + Sli 100 ve Tak + Sli 200 gruplarının kontrol gruplarından düşük, fakat Tak Grubundan yüksek seviyede olması ise, silimarinin hepatoselüler dejenerasyonu azalttığı, fakat tamamen önleyemediği şeklinde ifade edilebilir.

Böbrek lezyonlarını belirlemede yaygın olarak kullanılan kriterlerden bir tanesi de serum kreatin düzeyleridir (Set ve Şahin 2003). Bu nedenle çalışmada serum kreatin düzeylerine de bakılmıştır. Yaptığımız çalışmada Tak Grubu kreatin seviyesinin diğer grupların hepsinden yüksek seyretmesi, takrolimusun böbreklerde hasara neden olduğunun diğer bir ifade şeklidir. Al-Harbi ve ark (2015), McLaughlin ve ark (2003), Chen ve ark (2007), takrolimus ile yaptıkları deneysel çalışmalarda da sunulan bu çalışmada olduğu gibi takrolimusun kreatin seviyesini yükselttiğini kaydetmişlerdir. Tak + Sli 100 ve Tak + Sil 200 gruplarında ise

kreatinin Tak Grubuna göre daha düşük, fakat Kontrol Grubundan daha yüksek çıkmış olması da Silimarinin yükselen kreatin değerlerini düşürmede etkili olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca Sli 100 ve Sli 200 gruplarında Kontrol Grubundan da düşük çıkması silimarinin böbrek dokusunu destekleyici, koruyucu bir özelliği sahip olduğunun işaretidir. Kreatin seviyelerinin istatistiksel analizinde de, Tak Grubu ile Tak + Sli 100 Grubu arasındaki farkın anlamlı olmamasına ($p>0,05$) karşın Tak + Sli 200 grubu arasındaki farkın anlamlı olması ($p<0,05$) silimarinin bu dozda kullanılmasının daha uygun olacağına yorumlanabilir. Karimi ve ark (2005) sisplatin, Amien ve ark (2015) ise siklofosamid gibi kanser ilaçlarının yan etkilerini azaltmak için yaptıkları çalışmalarda silimarinin serum kreatin seviyesinin düşük olmasında etkili olduğunu belirlemişlerdir.*0

Takrolimus (FK506), hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonu ile Bak protein ekspresyonuna, mitokondriyal disfonksiyona ve nükleer parçalanma ile apoptozise neden olmaktadır (Choi ve ark 2008). Kim ve ark (2017) yaptıkları deneysel çalışmada, TUNEL yöntemi boyamalarda böbrek dokusunda apoptotik hücre sayısında belirgin bir artış belirlediklerini kaydetmişlerdir. Böbrek ve karaciğer dokularındaki apoptozisi belirleyebilmek için çalışmamızda da TUNEL metodu ile boyamalar yapılmıştır. Çalışmada TUNEL pozitif reaksiyonlarına en yoğun olarak (apoptotik hücre sayısı 6) hem böbrek ve hem de karaciğerde Tak Grubunda rastlanmış olması diğer araştırmacıların (Choi ve ark 2008, Kim ve ark 2017) bulgularını desteklemektedir. Apoptotik hücre sayılarının Tak + Sli 100 (apoptotik hücre sayısı 3) ve Tak + Sli 200 (apoptotik hücre sayısı 1) gruplarının her ikisinde de daha az sayıda olması silimarinin böbrek ve karaciğer dokusunu koruyucu etkisinin farklı bir işaretidir. Dabak ve Kocaman (2015) metoksan, Sozmen ve ark (2014) fumosin-B'nin yan etkilerine karşı silimarin kullanarak yaptıkları çalışmalarda, sunulan çalışmanın sonuçlarında olduğu gibi silimarinin apoptozisi engellediğini kaydetmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; takrolimusun böbrek ve karaciğerde yol açtığı nefrotoksisite ve hepatotoksisite ile oluşan dejeneratif değişikliklere karşı, silimarinin koruyuculuğu histopatolojik, in situ TUNEL ve biyokimyasal yöntemlerle ilk kez araştırılmıştır.

Çalışmada 1 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak kullanılan takrolimusun ratlarda akut/subakut nefrotoksisite ve hepatotoksisiteye neden olduğu belirgin olarak gözlenmiştir.

Takrolimusun böbrek ve karaciğerde neden olduğu dejeneratif etkilerine karşı kullanılan silimarinin, hem 100 mg/kg/gün ve hem de 200 mg/kg/gün dozunda koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiş, takrolimus nefrotoksisitesi ve hepatotoksisitesine karşı koruyucu olarak güvenle kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Yalnız silimarinin bu etkisinin Tak +Sli 100 grubuna göre, Tak +Sli 200 grubunda elde edilen verilerin ışığında dikkate alındığında, toksisite etkilerine karşı silimarinin 200 mg/kg dozunda kullanılmasının daha uygun olabileceği kanısına varılmıştır. Sli 100 ve Sli 200 gruplarında histopatolojik ve biyokimyasal değerlerin Kontrol Grubu ile benzer, canlı ağırlık artışının ise daha iyi olması dikkate alındığında, bu dozlarda silimarin kullanımının yan etkisinin olmadığı şeklinde değerlendirilebilir.

Çalışma süresinin 6 hafta olması nedeniyle takrolimusun dozu doğal kullanımdan daha yüksek olarak uygulanmıştır. Bu durum takrolimusun toksik etkisinin daha erken gelişmesine ve silimarinin koruyucu etkisinin baskılanmasına yol açmış olabilir. Takrolimus ve diğer immünosüpresif ilaçların organ nakli olgularında uzun süreli kullanımları dikkate alındığında, gerek takrolimusun kronik yan etkilerinin ve gerekse silimarinin koruyucu etkilerinin daha net ortaya konulabilmesi için daha uzun süreli deneysel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- Abdelhadi M, Ericzon BG, Hultenby K, Sjöden G, Reinholt FP, Nordenström J, 2002. Structural skeletal impairment induced by immunosuppressive therapy in rats: cyclosporine A vs tacrolimus. *Transplant international*, 15, 4, 180-187.
- Abdelmeguid NE, Chmairie HN, Zeinab NSA, 2010. Protective effect of silymarin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pak J Nutr*, 9, 7, 624-636.
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F, 2010. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24, 10, 1423-1432.
- Akar Y, Yucel G, Durukan A, Yucel I, Arici G, 2005. Systemic toxicity of tacrolimus given by various routes and the response to dose reduction. *Clinical & experimental ophthalmology*, 33, 1, 53-59.
- Akbaba D, 2009. İmmunosupresif kan ilaç düzeyi izleminin ve elde edilen test sonuçlarıyla biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. *Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Uzmanlık Tezi*, 13-19.
- Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Iqbal M, Nadeem A, Al-Shahrah OA, Korashy HM, Al-Hosaini KA, Ahmed M, Bahashwar S, 2015. Treatment with aliskiren ameliorates tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16, 4, 1329-1336.
- Amien AI, Fahmy SR, Abd-Elgleel FM, Elaskalany SM, 2015. Renoprotective effect of *Mangifera indica* polysaccharides and silymarin against cyclophosphamide toxicity in rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, 154-162.
- Ara C, Dirican A, Unal B, Bay Karabulut A, Piskin T, 2011. The effect of melatonin against FK506-induced renal oxidative stress in rats. *Surgical innovation*, 18, 1, 34-38.
- Armstrong VW, Oellerich M, 2001. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clinical Biochemistry*, 34, 1, 9-16.
- Ayna TK, Çiftçi HŞ, Tozkır H, Gürtekin M, Çarın M, 2009. İmmunosupresif ilaçların etki mekanizmaları. *Gaziantep Medical Journal*, 15, 3, 42-47.
- Bharti AC, Aggarwal BB, 2002. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical pharmacology*, 64, 5, 883-888.
- Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D, 1997. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology*, 26, 3, 643-649.
- Burçak G, Andican G, 2004. Okdatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35, 4, 159-169.
- Burda S, Oleszek W, 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 6, 2774-2779.
- Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ, 2004. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*, 36, 2, 229-233.
- Butani L, Afshinnik A, Johnson J, Javaheri D, Peck S, German JB, Perez RV, 2003. Amelioration of tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats using juniper oil. *Transplantation*, 76, 2, 306-311.
- Campistol JM, Sacks SH, 2000. Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation*, 69, 12, 5-10.
- Chen Y, Liang Y, Chen L, Liang J, Zhang J, Qiu J, Li W, Hu J, Xie K, Zhong W, 2007. Prevention of diltiazem in tacrolimus-induced nephrotoxicity: experiment with rats. *Zhonghua yi xue za zhi*, 87, 32, 2235-2237.
- Choi S, You H, Chung S. Tacrolimus-induced apoptotic signal transduction pathway. *Transplantation proceedings*. 40,8, 2734-2736.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Berghe DV, 1998. Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61, 1, 71-76.

- Çaylak E, 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9, 1, 73-83.
- Çoban ÖE, Patır B, 2010. Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 2, 7-19.
- Dabak DO, Kocaman N, 2015. Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Renal failure*, 37, 4, 734-739.
- Dehmlow C, Erhard J, de Groot H, 1996. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, 23, 4, 749-754.
- Demetris A, Fung J, Todo S, Banner B, Zerbe T, Sysyn G, Starzl T. Pathologic observations in human allograft recipients treated with FK 506. *Transplantation proceedings*, 22, 1, 25-34.
- El-Shitany NA, El-Haggag S, El-Desoky K, 2008. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 7, 2422-2428.
- Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS, 1992. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids: a structure-activity study. *Biochemical pharmacology*, 44, 8, 1603-1608.
- Erel O, 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37, 4, 277-285.
- Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S, 2012. Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 14, 2, 87-101.
- Farghali H, Kamenikova L, Hynie S, Kmonickova E, 2000. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 41, 2, 231-237.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M, 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters*, 416, 2, 123-129.
- Fraschini F, Demartini G, Esposti D, 2002. Pharmacology of silymarin. *Clinical drug investigation*, 22, 1, 51-65.
- Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P, 2004. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek*, 57, 9-10, 453-455.
- Gazak R, Walterova D, Kren V, 2007. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. *Current medicinal chemistry*, 14, 3, 315-338.
- Goksu Erol AY, Avci G, Sevimli A, Ulutas E, Ozdemir M, 2013. The protective effects of omega 3 fatty acids and sesame oil against cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol*, 36, 2, 241-248.
- Gök V, Kayacier A, Telli R, 2006. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 35-40.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13, 10, 572-584.
- Iwasaki K, 2007. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 22, 5, 328-335.
- Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Teramura Y, Kawamura A, Hata T, Ninomiya S, Esumi Y, 1998. Absorption, distribution, metabolism and excretion of tacrolimus (FK506) in the rat. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 13, 3, 259-265.
- Kansu E, 2002. İmmünesüpresif ajanların genel özellikleri ve etki mekanizmaları. *ANKEM Derg*, 16, 3, 194-198.
- Karanam B, Vincent S, Newton D, Wang R, Chiu S, 1994. FK 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. *Drug metabolism and disposition*, 22, 5, 811-814.
- Karimi G, Ramezani M, Tahoonian Z, 2005. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 3, 383-386.

- Katiyar SK, Roy AM, Baliga MS, 2005. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Molecular cancer therapeutics*, 4, 2, 207-216.
- Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z, 2012. Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3, 11.
- Kedzierska K, Sporniak-Tutak K, Bober J, Safranow K, Olszewska M, Jakubowska K, Domański L, Gołembiewska E, Kwiatkowska E, Laszczyńska M. Oxidative stress indices in rats under immunosuppression. *Transplantation proceedings*, 3939-3945.
- Khanna AK, Pieper GM, 2006. NADPH oxidase subunits (NOX-1, p22phox, Rac-1) and tacrolimus-induced nephrotoxicity in a rat renal transplant model. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22, 2, 376-385.
- Khettry U, Backer A, Ayata G, Lewis WD, Jenkins RL, Gordon FD, 2002. Centrilobular histopathologic changes in liver transplant biopsies. *Human pathology*, 33, 3, 270-276.
- Kim HS, Lim SW, Jin L, Jin J, Chung BH, Yang CW, 2017. The Protective Effect of Febuxostat on Chronic Tacrolimus-Induced nephrotoxicity in rats. *Nephron*, 135, 1, 61-71.
- Kocaman N, Dabak DÖ, 2015. Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. *Firat Med J*, 20, 3, 128-132.
- Kochi S, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, 2000. Induction of apoptosis in mouse brain capillary endothelial cells by cyclosporin A and tacrolimus. *Life sciences*, 66, 23, 2255-2260.
- Koçarslan A, Koçarslan S, Aydın MS, Gunay Ş, Karahan MA, Taşkın A, Üstunel M, Aksoy N, 2016. Intraperitoneal Administration of Silymarin protects end organs from multivisceral Ischemia/Reperfusion Injury in a rat model. *Brazilian journal of cardiovascular surgery*, 31, 6, 434-439.
- Kşen V, Walterova D, 2005. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomedical Papers*, 149, 1, 29-41.
- Kvasnicka F, Biba B, Sevcik R, Voldrich M, Kratka J, 2003. Analysis of the active components of silymarin. *Journal of chromatography. A*, 990, 1-2, 239-245.
- Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J, 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 4, 491-501.
- Liptak P, Ivanyi B, 2006. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nature clinical practice. Nephrology*, 2, 7, 398-404.
- Liu J, 1993. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunology today*, 14, 6, 290-295.
- Madani H, Talebolhosseini M, Asgary S, Naderi G, 2008. Hepatoprotective activity of Silybum marianum and Cichorium intybus against thioacetamide in rat. *Pak J Nutr*, 7, 1, 172-176.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB, 1999. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-κB, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *The Journal of Immunology*, 163, 12, 6800-6809.
- McLaughlin GE, Schober M, Perez M, Ruiz P, Steele BW, Abitbol C, 2003. Benefit of theophylline administration in tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *Pediatric Nephrology*, 18, 9, 860-864.
- Mercan U, 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg*, 15, 1-2, 91-96.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC, 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52, 4, 673-751.
- Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Tsukada T, Mizokami A, Nagataki S, 1995. FK506 augments activation-induced programmed cell death of T lymphocytes in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 96, 2, 727.
- Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S, 2005. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflammation Research*, 54, 1, 1-9.

- Mollison KW, Fey TA, Krause RA, Andrews JM, Bretheim PT, Cusick PK, Hsieh GC, Luly JR, 1998. Nephrotoxicity studies of the immunosuppressants tacrolimus (FK506) and ascomycin in rat models. *Toxicology*, 125, 2, 169-181.
- Mostafavi-Pour Z, Zal F, Monabati A, Vessal M, 2008. Protective effects of a combination of quercetin and vitamin E against cyclosporine A- induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Hepatology Research*, 38, 4, 385-392.
- Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M, 2009. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 4, 2, 481-508.
- Nagata S, 1997. Apoptosis by death factor. *cell*, 88, 3, 355-365.
- Palomero J, Galán AI, Muñoz MaE, Tuñón MaJ, González-Gallego J, Jiménez R, 2001. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 8, 836-845.
- Patel N, Joseph C, Corcoran GB, Ray SD, 2010. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicology and applied pharmacology*, 245, 2, 143-152.
- Popli P, Prabhakar P, 2015 Significance of Tacrolimus monitoring to optimize immunosuppressive Therapy. *Int J Pharm Bio Sci*, 6, 2, 191 - 198.
- Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM, 2007. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr Cancer Ther*, 6, 2, 104-109.
- Radko L, Cybulski W, 2007. Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 1, 1.
- Randhawa PS, Starzl TE, Demetris AJ, 1997. Tacrolimus (FK506)-associated renal pathology. *Advances in anatomic pathology*, 4, 4, 265.
- Rašković A, Stilinović N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M, 2011. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 16, 10, 8601-8613.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20, 7, 933-56.
- Salam OM, Sleem AA, Omara EA, Hassan NS, 2009. Hepatoprotective effects of misoprostol and silymarin on carbon tetrachloride- induced hepatic damage in rats. *Fundamental & clinical pharmacology*, 23, 2, 179-188.
- Sanchez-Campos S, Lopez-Acebo R, Gonzalez P, Culebras JM, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, 1998. Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by tacrolimus (FK506) in the rat. *Transplantation*, 66, 1, 84-88.
- Set T, Şahin EM, 2003. Birinci basamak hekimi için böbrek fonksiyon testleri. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 12, 344.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F, 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 5, 5, 415-418.
- Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R, 1999. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 290, 3, 1375-1383.
- Sonsuz A, 2007. Karaciğer Fonksiyon Bozukluklarına Klinik Yaklaşım. *Sempozyum Dizisi*, 58.69-78.
- Soto C, Pérez J, García V, Uría E, Vadillo M, Raya L, 2010. Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. *Phytomedicine*, 17, 14, 1090-1094.
- Sozmen M, Devrim AK, Tunca R, Bayezit M, Dag S, Essiz D, 2014. Protective effects of silymarin on fumonisin B1-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of veterinary science*, 15, 1, 51-60.
- Subir Kumar Das SMaDV, 2008. Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin an overview. *Natural Product Radiance* 7, 2, 182-192.

- Tabakoğlu E, Durgut R, 2013. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. AVKAE Dergisi, 3, 1, 69-75.
- Tada H, Yanagiwara S, Ito K, Suzuki T, 1999. Role of Diltiazem on Tacrolimus Pharmacokinetics in Tacrolimus- Induced Nephrotoxic Rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 84, 6, 241-246.
- Taniai N, Akimaru K, Ishikawa Y, Kanada T, Kakinuma D, Mizuguchi Y, Mamada Y, Yoshida H, Tajiri T, 2008. Hepatotoxicity caused by both tacrolimus and cyclosporine after living donor liver transplantation. Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi, 75, 3, 187-191.
- Taşdemir B, 2016. Ratlarda indometazinle oluşturulan gastrik ülser üzerine silimarinin koruyucu etkilerinin araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1-54.
- Tolga A, 2017. Deve dikeninin faydaları nelerdir?. Erişim Tarihi 1 Temmuz 2017. Erişim adresi, <http://www.aysetolgaiviyaşam.com>.
- Turgut F, Bayrak O, Catal F, Bayrak R, Atmaca AF, Koc A, Akbas A, Akcay A, Unal D, 2008. Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. International urology and nephrology, 40, 2, 453-460.
- Ural M, Özgüner M, Şenal D, Sütçü R, Delibaş N, 2005. Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 12, 4.
- Varzi H, Esmailzadeh S, Morovvati H, Avizeh R, Shahriari A, Givi M, 2007. Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin- induced nephrotoxicity in dogs. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 30, 5, 477-481.
- Vetter M, Chen Z-J, Chang G-D, Che D, Liu S, Chang C-H, 2003. Cyclosporin A disrupts bradykinin signaling through superoxide. Hypertension, 41, 5, 1136-1142.
- Vicari-Christensen M, Repper S, Basile S, Young D, 2009. Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. Progress in Transplantation, 19, 3, 277-284.
- Wang L-G, Ma J, Xue C-Y, Wang W, Guo C, Chen F, Qin J-P, Huang N-H, Bi Y-Z, Cao Y-C, 2013. Dynamic distribution and tissue tropism of infectious laryngotracheitis virus in experimentally infected chickens. Archives of virology, 158, 3, 659-666.
- Whitfield J, 2001. Gamma glutamyl transferase. Critical reviews in clinical laboratory sciences, 38, 4, 263-355.
- Yadav DK, Gera DN, Gumber MR, Kute VB, Patel MP, Vanikar AV, Trivedi HL, 2013. Tacrolimus-induced severe cholestasis complicating renal transplantation. Renal failure, 35, 5, 735-737.
- Yarsan E, 1998. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 9, 1, 89-95.
- Zhang W, Hong R, Tian T, 2013. Silymarin's protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats. Biomolecules & therapeutics, 21, 4, 264.

7. EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜ

Sayı : 41475755-2015/49
Konu : Etik Kurulu Onayı

17.03.2015

Sayın Prof.Dr. M.Kemal Çiftçi

"Ratlarda Takrolimus Kaynaklı Böbrek ve Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarinin Koruyucu ve Onarıcı Etkisinin Araştırılması" isimli ve 2015/49 sayılı projeniz 17.03.2015 tarihinde yapılan Etik Kurul Toplantısında kabul edilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç.Dr. Yasemin ÖZNURLU
ETİK KURUL BAŞKAN VEKİLİ

A handwritten signature in blue ink, corresponding to the name Doç.Dr. Yasemin Öznurlu.



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜ

Sayı : 41475755-51.99/ 17
Konu : Etik Kurulu Kararı

29.09.2015

Sayın Prof.Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ

İlgi: 21.08.2015 ve 13 sayılı dilekçe.

İgide dilekçenizde belirtilen 2015/49 karar sayısı ile 17.03.2015 tarihinde kurulumuzdan etik kurul onayı alınmış olan "**Ratlarda Takrolimus Kaynaklı Böbrek ve Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarinin Koruyucu ve Onarıcı Etkisinin Araştırılması**" isimli çalışmanızla ilgili ek dilekçenizde belirtilen revizyon talebiniz kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Nokudan

Prof.Dr. Nilse OKUDAN
ETİK KURUL BAŞKANI

T.C.
Selçuk Üniversitesi
Deneysel Tıp Araştırma Ve Uygulama Merkez Müdürlüğüne

Anabilim Dalımız Doktora öğrenci Funda TERZİ'nin 'Ratlarda Takrolimus Kaynaklı Böbrek ve Karaciğer Toksisitesine Karşı Silimanin Koruyucu ve Onarıcı Etkisinin Araştırılması' isimli tez çalışması için SÜDAM etik kurulundan 17.03.2015 tarihinde 2015/49 numaralı etik kurul onayı alındı. Ancak Tez Savunması sırasında jüri üyeleri kararıyla tez başlığında 'Onarıcı' ifadesinin çıkarılmasına ve başlığın 'Ratlarda Takrolimus Kaynaklı Böbrek ve Karaciğer Toksisitesine karşı Silimanin Koruyucu Etkisinin Araştırılması' şeklinde değiştirilmesine karar verilmiştir. Çalışmanın materyal metodlarında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Bununla ilgili olarak tarafınızdan verilen Etik Kurul raporunda bu değişikliğin yapılması hususunda; gereğini bilgilerinize arz ederim.22.11.2017

Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ
Anabilim Dalı Başkanı

2017-14

Mehmet YAVUZ
Selçuk Üniversitesi
Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama
Merkezi

8. ÖZGEÇMİŞ

30.06.1988 tarihinde İstanbul ili Fatih ilçesinde doğdu. İlkokulu Nuripaşa İlköğretim Okulunda, Ortaokulu Saniye Sezgin Elmas İlköğretim okulunda, liseyi Bakırköy lisesinde tamamladı. 2011 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldu. Aynı yıl Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2012 Yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı. Halen bu Anabilim Dalındaki görevine devam etmektedir.

