

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RENAL HİSTOLOJİ VE RENAL FONKSİYONLAR ÜZERİNE
SİLİMARİNİN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. BURAK DUMLUDAĞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÜLVER DERİCİ

ANKARA

2016

KABUL VE ONAY
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ TUTANAĞI

Adı Soyadı	BURAK DUMLUDAĞ
Baba Adı	NAHİT
Doğum Yeri/Tarihi	ERZURUM – 26.03.1985
Diploma Tarihi/Diploma No	2011-09-0020
Mezun Olduğu Fakülte	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı	İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
İhtisas Süresi	4 YIL 6 AY
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Renal Histoloji ve Renal Fonksiyonlar Üzerine Silimarinin Etkileri

TEZ SAVUNMA TARİHİ: 10.08.2016

JÜRİ KARARI: İç Hastalıkları Anabilim Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ:

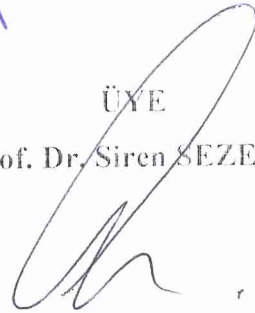
TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülver DERİCİ



ÜYE
Prof. Dr. Turgay ARINSOY



ÜYE
Prof. Dr. Siren SEZER



TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında emeği olan ve beni her zaman cesaretlendiren değerli hocam Prof. Dr. Ülver Derici'ye şükran borçluyum. Bu vesileyle öncelikli teşekkürlerimi saygı değer hocama sunmak isterim.

Bununla birlikte tezimde önemli katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Kürşat Derici'ye, Dr. Betül Ögüt'e ve Doç. Dr. İpek Işık Gönül'e, desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu ve Özge Tuğçe Paşaoğlu'na, Prof. Dr. Siren Sezer'e teşekkürlerimi sunmak isterim.

Yaptığımız bilimsel çalışmaya olan destekleri için Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği'ne;

Bu süreçte her zaman yanımda olan eşim Dr. Ayşegül Dumludağ'a ve ailemizde 5 aydır olan, evimizin neşe kaynağı minik kızım Bahar'a; yıllardır emeklerini esirgemeyen, varlıklarıyla bana güç veren anneme, babama, kardeşlerime;

Beraber nöbet tuttuğumuz son dört yılımda varlıklarıyla bana destek olan arkadaşlarıma; Uzm. Dr. Muhammet Cemal Kızılarışlanoğlu'na, Uzm. Dr. Mustafa Karaca'ya, Dr. Derda Gökçe'ye, Dr. Osman Sütçüoğlu'na,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Burak DURLUDAĞ

Ağustos 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
±	: Artı eksi
≤	: Küçük ya da eşit
≥	: Büyük ya da eşit
μmol	: Mikromol
ABH	: Akut böbrek hasarı
ABTS	: 2,2'-azino-bis 3-etilenbenzotiazolin- 6-sülfonik asit
ACE	: Anjiotensin Converting enzim
ADH	: Anti diüretik hormon
ADQI	: Acute Dialysis Quality Initiative
AKIN	: Acute Kidney Injury Network
ALT	: Alanin aminotransferaz
ARB	: Anjiotensin reseptör blokeri
AST	: Aspartat amino transferaz
ATN	: Akut tübüler nekroz
Cc	: Cubic centimetre
CD 8	: Cluster of differentiation 8
CMV	: Sitomegalovirüs
Cys-C	: Sistatin-C
dl	: Desilitre

DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EBV	: Epstein barr virüs
ELISA	: Enzyme linked immuno sorbent assay
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
GGT	: Gama glutamil transferaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
Gr	: Gram
GSGG	: Glutasyon disülfid
GSH	: Glutasyon
H ⁺	: Hidrojen iyonu
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HIV	: Human immun defency virüs
HRP	: Horse radish peroxidase
IU	: International units
İv	: İntravenöz
İç	: İdrar çıkışı
İm	: İntramuskuler
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcomes
Kg	: Kilogram
Kr	: Kreatinin
L	: Litre
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre

Mmol	: Milimol
Nm	: Nanometre
NSAİİ	: Non steroid antiinflatuar ilaçlar
O ₂ .–	: Süperoksit serbest radikali
O ₂ [–]	: Moleküler oksijen
°C	: Santigrat derece
pO ₂	: Parsiyel oksijen basıncı
PPI	: Proton pompa inhibitörleri
RAS	:Renin-anjiyotensin sistemi
RIFLE	:Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease
Rpm	: Rounds per minute
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
SLE	: Sistemik lupus eritomatozus
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
SS	: Standart Sapma
TAS	: Total antioxidant status
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Thiobarbituric acid reactive substances,
TOS	: Total oxidant status

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
1.1 Akut Böbrek Hasarı.....	1
1.1.1 Tanım.....	1.
1.1.2 ABH Nedenleri.....	5
1.1.2.1 Prerenal ABH.....	5
1.1.2.2 Renal ABH.....	6
1.1.2.3 Postrenal ABH.....	8
1.2 İlaç İlişkili Akut Böbrek Hasarı.....	9
1.2.1 Nefrotoksisitede risk faktörleri.....	10
1.2.2 Nefrotoksisitenin Önlenmesi.....	11
1.3 Silybum Marianum(Silimarin)(Meryem ana dkeni).....	13
1.3.1 Silimarinin Farmokokinetik Özellikleri.....	14
1.3.2 Silimarin Endikasyonları.....	15
1.3.3 Etki Mekanizması.....	16
1.3.4 Metabolizma.....	18
1.3.5 Dozaj/ Toksisite.....	18
2. AMAÇLAR VE RAT ÇALIŞMA MODELİ.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1 Laboratuvar Koşulları, Çalışma Planı ve Materyalin Toplanması...21	
3.2 Böbrek Preparatlarının Hazırlanması ve Histopatolojik İnceleme....22	
3.3 Serum Örneklerinin Çalışılması.....23	
3.4 İstatistiksel Analiz.....25	
3.5 Etik Kurul Onayı.....25	
4. BULGULAR.....	26
4.1 Günlük Ağırlık Takibi.....26	
4.2 Günlük Sıvı Alımları.....27	
4.3 Serum Üre ve Kreatinin değerleri.....28	
4.4 Serum Sistatin C Değerleri.....29	
4.5 Serum Süper Oksit Dismutaz (SOD) Değerleri.....29	

4.6 Serum Glutatyon Peroksidaz (GPX) Değerleri.....	30
4.7 Serum Malondialdehit (MDA) Değerleri.....	32
4.8 Serum Total Anti Oksidan Kapasitesi (TAS).....	32
4.9 Serum Total Oksidan Kapasitesi (TOS).....	33
4.10 Histopatolojik Değerlendirme.....	34
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ.....	46
7. KAYNAKLAR.....	48
8. ÖZET.....	52
9. SUMMARY.....	53
10. ÖZGEÇMİŞ.....	54

TABLÖLAR – ŞEKİLLER - RESİMLER

Tablo 1 ABH tanısında RIFLE Kriterleri.....	2
Tablo 2 ABH tanısında AKIN Kriterleri.....	3
Tablo 3.1: Tübüler dejenerasyon skollama sistemi	23
Tablo 4.1.1 Günlük ağırlık ortalamaları (mg).....	26
Tablo 4.1.2 Ortalama kilo kaybı.....	27
Tablo 4.2.1 Günlük alınan sıvı ortalamaları (ml).....	27
Tablo 4.2.2 Alınan sıvı ortalamaları.....	28
Tablo 4.3.1 Grup 1 ve 2 arasında kreatinin ortalamalarının karşılaştırması...28	
Tablo 4.3.2 Grup 1 ve 2 arasında üre ortalamalarının karşılaştırması.....28	
Tablo 4.4.1 Sıstatın C ortalamaları.....	29
Tablo 4.5.1 Grupların SOD ortalamaları.....	30
Tablo 4.6.1 GPX ortalama değlerleri.....	31
Tablo 4.6.2 Grup 1 ve Grup 2'nin GPX değlerleri.....	31
Tablo 4.7.1 Grupların MDA ortalamaları.....	32
Tablo 4.8.1 TAS ortalaması.....	33
Tablo 4.8.2 Grup 1 ve Grup 2'nin TAS değlerleri.....	33
Tablo 4.9.1 TOS değler ortalaması.....	34
Resim 4.10.1 Normal proksimal tüböl.....	35
Resim 4.10. 2 Normal proksimal tüböl.....	36
Resim 4.10.3 Normal distal tüböl.....	37
Resim 4.10.4 Normal distal tüböl.....	38
ŞEKİL 1 Silimarinin moleköler yapısı.....	13

1. GİRİŞ

1.1 Akut Böbrek Hasarı:

1.1.1 Tanım:

Akut böbrek hasarı (ABH) ; hızlı gelişen böbrek hasarı olarak bilinen bu tablo, böbrek fonksiyonlarındaki azalma sonucu idrar çıkışının azalması, kandaki metabolik atıkların uzaklaştırılmasının azalması ve bu sorunların kliniğe yansımaları olarak tanımlanabilir. Akut böbrek hasarı, artık akut böbrek yetmezliği teriminin yerini almıştır. Bu tanım, organın yetmezliğine varmadan önceki, morbidite ve mortalite nedeni olan, geniş hastalık spektrumunu da içermektedir. Akut böbrek yetmezliği ise, renal replasman tedavisi gerektiren ABH için kullanılmaktadır.

ABH insidansı son yıllarda hem toplum hem de hastanede yatan hastalarda giderek artmaktadır(1)(2) Hesaplanan insidansı 2-3/1000'dir (3) Hastanede yatan hastaların %7'sinde ve yoğun bakımda yatan hastaların üçte ikisinde ABH gelişir (2) ve genellikle multipl organ disfonksiyonu sendromunun bir parçasıdır(4)

Geçmişten günümüze kadar ABH için 30'dan fazla değişik tanımlama yapılmıştır. 2004'te Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) grubu, RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease) kriteri isimli bir konsensus ve kanıta dayalı bir tedavi kılavuzu oluşturmuştur (Tablo 1) (5,6). Ardından RIFLE kriterlerinin bir modifikasyonu, ADQI grubunu da içeren, Acute Kidney Injury Network (AKIN) tarafından sunulmuştur.(2)(5) Yakın zamanda bir

tanımlama da, RIFLE ve AKIN tanımlarını harmonize eden bir modifiye tanım, Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) tarafından yapılmıştır (6)

Tablo 1 ABH tanısında RIFLE Kriterleri

Derece	GFH kriteri	İdrar çıkışı (İÇ)
Risk (Risk)	SKr x 1,5 ya da GFH'nın %25'den daha fazla azalması	İÇ < 0,5 mL/kg/saat x 6 saat
Injury (Hasar)	SKr x 2 ya da GFH'nın %50'den daha fazla azalması	İÇ < 0,5 mL/kg/saat x 12 saat
Failure (Yetmezlik)	SKr x 3 ya da GFH'nın %75'den daha fazla azalma olması ya da SKr > 4 mg/dl olması	İÇ < 0,3 mL/kg/saat x 24 saat
Loss (Kayıp)	Akut böbrek yetmezliğinin 4 haftadan daha uzun sürmesi	
End Stage Kidney Disease (Son Dönem Böbrek Yetmezliği)	3 aydan daha uzun süreyle böbrek fonksiyonlarının tam kaybı	

SKr: Serum Kreatinin değeri

GFH: Glomerüler filtrasyon hızı

İÇ: İdrar çıkışı

ABH tanısında AKIN Kriterleri

AKIN kriterleri ,2007 yılında RIFLE kriterlerinin bir modifikasyonu olarak geliştirilmiştir(6)

Tablo 2. AKIN kriterleri

Evre	Kreatinin	İdrar çıkışı (İÇ)
1	Serum Kreatinininde 1,5-1,9 kat artış ya da bazal değerden 0.3 mg/dl ($\geq 26.5 \mu\text{mol/l}$) artış	İÇ < 0,5 mL/kg/saat x 6 saat
2	Serum Kreatinininde 2-2,9 kat artış	İÇ < 0,5 mL/kg/saat x 12 saat
3	Serum Kreatinininde 3 kat artış ya da serum kreatinin ≥ 4 mg/dl ya da renal replasman ihtiyacının oluşması	İÇ < 0,3 mL/kg/saat x 24 saat

GFH: Glomerüler filtrasyon hızı

AKIN grubu, iki durumu özellikle vurgulamaktadır. Birincisi tanısıl kriterlerin ancak volüm durumu stabilize olduktan sonra ortaya konması; ikincisi, oligüri bir kriter olarak kullanılacaksa, postrenal obstrüktif sebeplerin hızlıca değerlendirilmesi gerektiğidir.

AKIN grubu evreleme sistemi; RIFLE sınıflamasının ilk üç kriteri ile karşılaştırılabilir. Ancak RIFLE’da kayıp ve SDBY olarak tanımlanan son iki kriter evre değil netice olarak tanımlanmaktadır.

AKIN grubunun bu modifikasyonu hastaların evrelemesinde değişiklik oluşturmamış; ayrıca hastane mortalitesini belirlemede ek katkı sağlamamıştır (6). Bununla birlikte RIFLE sınıflamasına göre daha sadeleştirilmiş bir evreleme sistemi olması itibariyle klinik kullanımda kendine bir yer bulmuştur. Her iki evreleme sistemine dair şüpheler ve sorunların devam etmesi ve bu durumun klinisyenlerin akut böbrek hasarlı bireyleri tedavi ederken uygulayacakları yaklaşımları etkilemesi itibariyle evreleme üzerine arayışlar hep devam etmiştir. KDIGO’nun akut böbrek hasarı evrelemesine dair 2012’de yayınladığı kılavuzu da bu arayışların bir yansıması olarak literatüre girmiştir.

RIFLE ve AKIN için KDIGO modifikasyonu:

KDIGO 2012 yılında bir kılavuz oluştururken AKIN evreleme sistemini korumuş; fakat ABH tanımını revize etmiştir. KDIGO kılavuzunda bazal değere göre 0,3 mg/dl’lik kreatinin yükselişi için zaman aralığı AKIN grupta olduğu gibi 48 saat olarak; bazal değere göre %50’lik artış için ise zaman aralığı RIFLE kriterinde belirtildiği gibi 7 gün olarak kabul edilmiştir. KDIGO’ya göre ABH;

➤ serum bazal kreatinin düzeyinde 48 saat içinde 0.3 mg/dl ya da daha fazla artış

- serum kreatinininde 7 gün içinde olduğu bilinen veya tahmin edilen 1,5 katlık artış
- idrar volümünün altı saat ya da daha uzun süre 0,5 ml/kg'da daha az olması

KDIGO'ya göre evreleme (6)

Evre 1: Serum kreatinin değerinin bazal değerden 1.5-1.9 kat ya da ≥ 0.3 mg/dl artışı veya 6-12 saat idrar çıkışının 0,5 ml/kg altında olmasıdır.

Evre 2: Serum kreatinin değerinin bazal değerden 2.0-2.9 kat artışı ya da idrar çıkışının ≥ 12 saat 0,5 ml/kg altında olmasıdır.

Evre 3: Serum kreatinin değerinin bazal değerden 3 kat artışı ya da Serum kreatinin >4.0 mg/dl veya ≥ 24 saat idrar çıkışının 0,3 ml/kg'dan az olması veya ≥ 12 saat anüri olması ya da 18 yaş altı bireylerde eGFH'nın 35'in altına inmesidir

1.1.2 ABH Nedenleri:

ABH, etyolojik olayın yerine göre, prerenal, renal ve postrenal olmak üzere üç kategoride incelenebilir. *Prerenal ABH* en sık görülen tipidir (%55-60). Böbrek parankim bütünlüğünün korunduğu, renal perfüzyon bozukluğu sonucu gelişen bir durumdur. *Renal (intrinsik) ABH*, tüm olguların %35-40 kadarını oluşturur. İskemik ya da nefrotoksik olaylar sonucu gelişen akut tübüler nekroz (ATN) renal ABH'lerin %90'dan fazlasından sorumludur. *Postrenal ABH*, üriner traktusun akut tıkanıklığı ile birlikte olan hastalıklar sonucu gelişir ve tüm ABH olguları içinde %5'den az yer tutar. (7)

1.1.2.1 Prerenal ABH

Prerenal ABH’da böbrek parankim fonksiyonları normaldir; fakat renal perfüzyonun intravasküler volümün azalması, arteriyel kan basıncının düşmesi gibi nedenlerle GFH’da düşme gerçekleşir. Otoregülatuar vazokonstriktör-antinatriüretik mekanizmalar; sempatik sinir sistemi, renin-anjiyotensin sistemi (RAS) ve antidiüretik hormon (ADH); GFH’nı korumak için azalmış renal perfüzyona yanıt olarak devreye girer (8). Ağır hipoperfüzyon durumunda ise bu kompensatuvar mekanizmalar yetersiz kalır ve prerenal ABH oluşur.

Prerenal ABH nedenleri;

- İntrarenal vazokonstriksiyon (ilaçlar, örn; Nonstreoid antiinflamatuvarlar, ACE inhibitörleri, ARB’ler, siklosporin ve takrolimus, kardiyorenal sendrom, hepatorenal sendrom, abdominal kompartman sendromu ve hiperkalsemi)
- sistemik vazodilatasyon (sepsis, nörojenik şok)
- volüm kayıpları (aşırı diüretik kullanımı, osmotik diürez, kusma, diyare, kanama...)

1.2.2.2 Renal ABH

Renal ABH, böbreğin etkilenen komponentine göre kategorize edilebilir (tübüler, glomerüler, interstisyel ve vasküler).

Akut tübüler nekroz (ATN), renal ABH’nın en sık görülen nedenidir. Genellikle iskemik ya da nefrotoksik ajanlara bağlıdır. Toksik nedenlere bağlı ATN’de hücre hasarı multifaktöriyeldir. Toksinin intrarenal vazokonstriksiyona

yol açması, intratübüler obstrüksiyona neden olması veya direk hücresel hasar yapması ABH'nı oluşturabilir. Başlangıç, idame ve iyileşme olmak üzere genellikle üç fazı vardır. Başlangıç fazında; serum üre ve kreatinin değerinde hızlı yükselme olur, idame fazında GFH'da ciddi bozulma mevcuttur. İyileşme fazında tübüler fonksiyonlar genellikle geriye döner ve poliürik bir dönem oluşabilir. Renal hasarın derecesine bağlı olarak böbreklerde kalıcı hasar oluşabilir ve renal replasman tedavisi gerekebilir.

Glomerüler nedenler; glomerül ya da kan damarlarının akut inflamasyonu sonucunda oluşmaktadır. Glomerülo nefritler genellikle sistemik bir hastalığa sekonder (SLE, Wegener vb) ortaya çıkabilecekleri gibi primer olarak da görülebilirler (7)

Akut interstisyel nefrit ise genellikle ilaç kullanımına sekonder oluşmaktadır ve anamnezde alınacak iyi ilaç öyküsü ile kolay tanı konulabilir. Üçte bir hastada eritematöz rash, ateş, artralji ya da bu semptomların kombinasyonları görülebilir. Ayrıca eozinofilüri de akut interstisyel nefritli hastalarda görülebilir (9).

Renal arter ve venleri etkileyen patolojiler de renal ABH'ya neden olur. Renal arteriyel tıkanma genellikle invaziv girişimler sonrasında gözlenen bir sebep olarak göze çarpmaktadır.

Renal ABH nedenler (7);

- Glomerüler (postenfeksiyöz ya da diğer glomerülo nefritler)
- İnterstisyel

✓ ilaç ilişkili, örn; penisilin analogları, sefalosporinler, sülfonamid, siprofloksasin, asiklovir, rifampin, fenitoin, interferon, proton pompa inhibitörleri (PPI), nonsteroid antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ)

✓ enfeksiyonlar; renal parankim enfeksiyonları ya da sistemik enfeksiyonlar

✓ virüsler; EBV, CMV, HIV

✓ bakteriyel; streptokok türleri, Legionella türleri

✓ fungal; kandida, histoplazma

✓ sistemik hastalık; sarkoidoz, sistemik lupus eritematozus

○ Tübüler

✓ prerenal nedenlerin uzaması

✓ nefrotoksik; kontrast maddeler, aminoglikozidler, sisplatin, metotreksat, etilenglikol, amfoterisin b, rabdomyoliz, tümör lizis sendromu vb.

○ Vasküler;

✓ renal ven trombozu, malign hipertansiyon, skleroderma renal krizi,

renal ateroembolik hastalık.

1.1.2.3 Postrenal ABH

Üriner traktusta bilateral tıkanmaya neden olabilecek patolojilerden dolayı idrar akımının engellenmesi ve staza sekonder oluşan böbrek hasarıdır.

Nedenleri;

○ Ekstrarenal obstrüksiyon; prostat hipertrofisi, nörojenik mesane, retro-peritoneal fibrozis, prostat- serviks kanseri

- İntrarenal obstrüksiyon; taş, kristal, tümör

1.2 İLAÇ İLİŞKİLİ AKUT BÖBREK HASARI

Toplumda ve hastanede yatan hastalarda görülen akut böbrek hasarının yaklaşık olarak %20'sine ilaçlar neden olmaktadır(3)(4)(10). Yaşlı bireylerde ilaç ilişkili nefrotoksisite %66 oranında görülmektedir (11).

Patojenik mekanizma:

Birçok ilaç nefrotoksik etkisini bir ya da daha fazla patojenik mekanizmayla ortaya koyar. Bu patojenik mekanizmalar intraglomerüler hemodinamide değişim, tübüler toksisite, inflamasyon, kristal nefropatisi, rabdomyoliz ve trombotik mikroangiopatidir (12) (13).

1- İntraglomerüler hemodinamide değişim; sağlıklı bir bireyde dakikada ortalama 120 ml plazma filtre edilir ve glomerüler filtrasyon hızı (GFH) olarak değerlendirilir. GFH, afferent ve efferent arteriel tonuslarından etkilenen intraglomerüler basınçla regüle edilir. İntraglomerüler basınçta değişim yapan ilaçlar GFH'da düşmeye neden olabilir .Örneğin NSAİİ, ACE inhibitörleri, Anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB)...(14). Kalsinörin inhibitörleri, doz ilişkili olarak afferent arteriolde vazokonstriksiyon yaparak riskli hastalarda GFH'da düşmeye neden olabilirler (15).

2- Tübüler toksisite; renal tübüler hücreler özellikle proksimal tübül hücreleri toksik etkilere çok duyarlıdır(16). İlaçlar tübüllerin mitokondrial fonksiyonlarını, transport mekanizmalarını etkileyerek ya da oksidatif stres ve serbest radikal oluşturarak etkileyebilirler. Bu grup ilaçlara örnek olarak kolistin, aminoglikozidler, amfoterisin B, sidofovir, sisplatin verilebilir (16) (17).

3- İnflamasyon; ilaçlar glomerülde, tübüler hücrelerde, interstisyumda inflamasyonu tetikleyebilir. Bu grup ilaçlara örnek olarak NSAİİ,altın tuzları, interferon alfa ve lityum verilebilir (16) (17).

4- Kristal nefropatisi; ilaçlar idrarda çözünmeyen kristal oluşumuna neden olabilir. İdrarda oluşan çözünmeyen kristaller özellikle distal nefronda obstruksiyona neden olarak inflamasyonu tetikler. Bu grup ilaçlara ampisilin, siprofloksasin, sulfonamidler, antiviraller örnek gösterilebilir (16) (17).

5- Rabdomyoliz; kas hücreleri yıkımı sonucu oluşan myoglobin direkt toksisite, tübüler obstrüksiyon ve GFH'da azalmaya neden olur. Bu grup ilaçlara örnek; statinler, eroin- kokain fazla kullanımı, metamfetamin verilebilir (18).

6- Trombotik Mikroanjiopati; organ hasarı mikro sirkülasyonda oluşan trombozlar nedeniyledir. İmmun aracılı olarak endotel hasarı oluşur ve trombotik süreç tetiklenir. Bu grup ilaçlara ise örnek olarak klopidoğrel, tiklopidin gibi antitrombosit ajanlar ve siklosporin verilebilir (19).

1.2.1 Nefrotoksisitede risk faktörleri

İlaç ilişkili nefrotoksisite bazı hasta gruplarında ve bazı spesifik klinik durumlarda daha sık görülür.Bu risk faktörlerinin bilinmesi nefropati gelişebilecek hastaları tahmin etmeye ve dolayısıyla koruyucu yaklaşımların önceden alınmasını sağlayabilir. Risk faktörleri hasta ve ilaç ilişkili olmak üzere ikiye ayrılabilir (16).

Hasta ilişkili risk faktörleri

1.Yaş $\geq$ 60 olması

2. Diabetes mellitus

3.Çoklu nefrotoksin maruziyet

4.Kalp yetmezliği

5.Sepsis

6.Efektif intravasküler volümün azaldığı diğer durumlar

7.GFH< 60 ml/dk olması

İlaç ilişkili risk faktörleri

Aminoglikozidler, amfoterisin B, sisplatin, kontrast maddeler ve siklosporin gibi bazı ilaçların diğerlerine göre daha nefrotoksik olduğu bilinmektedir.Örneğin; kontrast nefropatisi hastanede gelişen akut böbrek hasarının 3. en sık nedenidir .Kontrast ilişkili nefropati, kullanılan ajanın tipi, hastanın hidrasyon durumu ve eşlik eden kronik böbrek hastalığı, diyabet gibi komorbiditelerle ilişkilidir.

Asetaminofen, NSAİİ, lityum, asiklovir,metotreksat gibi kronik intersitisyel nefrit ve kristal depozisyonu yapan nefrotoksik ajanların nefrotoksisitesi doz ilişkilidir ve kullanım süreleriyle orantılıdır.

Nefrotoksik etkisi bilinen ilaçların hastaların tedavisinde kombine olarak kullanılması sinerjistik etki göstererek toksisiteyi artırabilir (16) (17).

1.2.2 Nefrotoksisitenin Önlenmesi

Nefrotoksinler zararlı etkilerini en fazla tübülointerstisyel sistemde gösterirler. İlaça bağlı ABH düşünülen hastaların böbrek biyopsilerinde %25 oranında akut tübülointerstisyel nefrit saptanmaktadır(13,16)

Nefropati gelişme riski olan hastalarda ve renal hasar oluşturabilecek yüksek riskli ilaçların kullanımından önce toksisite gelişmesini önlemek için, günümüze kadar çok çeşitli ajan denenmiş ve bu konudaki çalışmalarda hala devam etmektedir. Hastaneye yatışlarda özellikle karşımıza çıkan ve çoğu iatrojenik olarak oluşan ilaca bağlı akut nefrotoksisitelerin tedavisi, bir kısmı sonradan kronikleşerek böbrek hasarının devamına sebep olan durumların önlenmesinde son derece önem arz etmektedir. Bu konuyla ilgili pek çok klinik araştırma yapılmaktadır. Toksikiteyi önlemek için alınacak önlemler genel ve ilaca özgü olarak ikiye ayrılabilir.

Genel önlemler olarak, nefrotoksik ilaç dışında farklı bir tedavi ajanı ya da görüntüleme yönteminin uygulanabilirliği tekrar gözden geçirilmelidir. İlaç başlanacaksa GFH hesabı yapılarak uygun dozda başlanmalıdır. Renal perfüzyonu artırmak için hastalar volüm durumları kontrol edilerek hidrate edilmelidir (En uygun solüsyon, sıvı veya zamanlama hakkında tam bir görüş birliği yoktur). Nefrotoksik olduğu kesin olarak bilinen ilaç kombinasyonlarından kaçınılmalıdır(17).

İlaça özgü önlemler olarak; farklı ajanların kullanımı yoluyla ilaçların özellikle tübüler sistem üzerinde oluşturdukları nefrotoksik etkinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Örneğin; kontrast nefropatisi gelişmesini önlemek için intravenöz hidrasyonla beraber n-asetil sistein kullanımı faydalı yaklaşımlar olarak klinik kullanımda en fazla kendine yer bulmuş uygulama gibi görünmektedir. Amfoterisin-B ilişkili toksiteyi önlemek için ilaç öncesi ve sonrası izotonik salin infüzyonu yapılması, amfoterisinin lipozomal

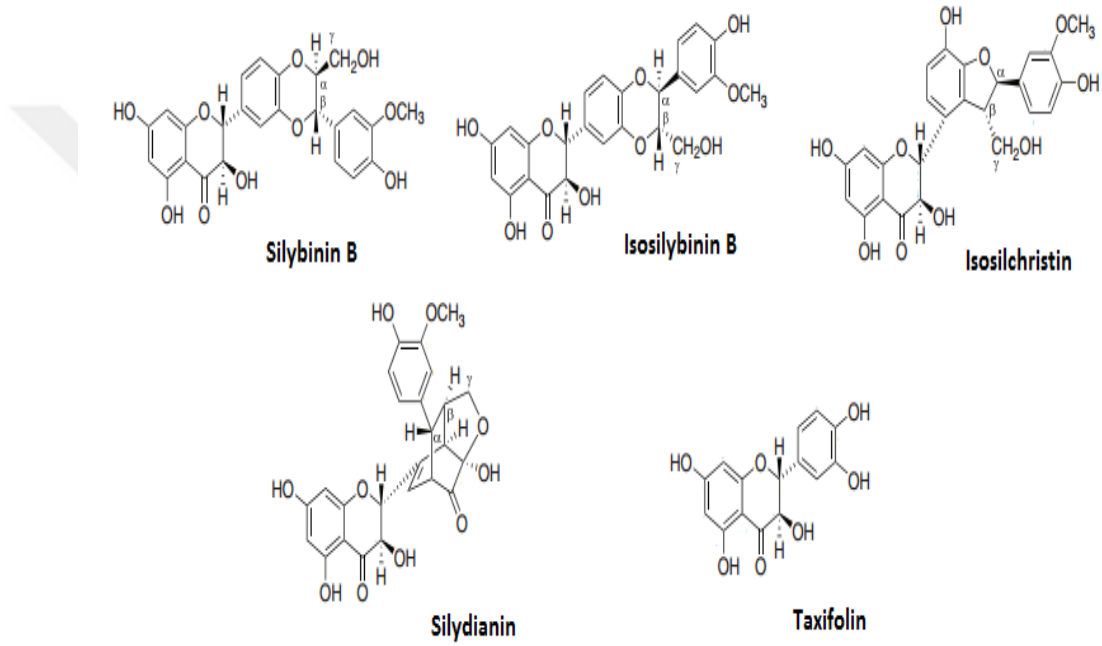
formulasyonun kullanılması ve tedavi süresinin olabildiğince kısa tutulması uygulanabilir yaklaşımlar arasındadır. Fakat etkinliği büyük ölçüde kanıtlanmış bu ve benzeri önlemlerin alınmasına rağmen ilaç ilişkili tübül hasarı ve nefropati görüldüğü için günümüzde hala farklı koruyucu ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tübül hasarını engellemek amaçlı askorbik asit, melatonin, astraksantin, vitamin E, üzüm çekirdeği ekstresi, silimarin gibi maddelerin klinik araştırmalarda kullanımları ve etkinlik testleri hala devam etmektedir. Özellikle karaciğer hastalıklarında hepatositler üzerinde antioksidan özelliği gösterilmiş bir ajan olarak silimarinin, böbrek tübül hücresi üzerinde de olumlu etkiler gösterebileceğine dair beklentiler ortaya çıkmıştır.

1.3 Silybum Marianum(Silimarin)(Meryem ana dikenii)

Silybum marianum, Asteraceae familyasından bir tür bitkidir. Bu bitkinin tohumları karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında, zehirlenmelerde karaciğeri korumada kullanılır. Aynı zamanda mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumlarda da uzun süredir kullanılmaktadır. Bu nedenle karaciğer hastalıklarının tedavisinde en çok araştırılmış bitkilerden biridir. Bu bitkinin aktif bileşenlerinin tamamına silimarin denilmektedir. Silimarinin yapısı 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır. Yapısını % 70-80'i flavonolignanlar ve % 20-30'unu tanımlanmamış polifenolik bileşenler oluşturur. Silimarinin %80 kısmını oluşturan en etkili bileşeni silibindir; diğer bileşenler ise; isosilibin, taxifolin, silikristin, dihidrosilibin ve silidianindir(20). Silybum Marianum bitkisinin tohumları ayrıca betaine ve esansiyel yağ asitleri de içermektedir. Bu

maddelerin hepatoprotektif özellikleri de kanıtlanmıştır. Ayrıca içeriğindeki bu maddeler anti inflamatuvar etki de göstermektedirler.

Silimarinin Moleküler Yapısı:



1.3.1 Silimarinin Farmokokinetik Özellikleri

Silimarinin suda çözünürlüğü çok azdır(0,04mg/ml).Bu nedenle bitkisel çay olarak kullanılamamaktadır. Kapsüllenmiş bitki ekstresi şeklinde bulunur. Oral alım sonrası emilim göreceli olarak azdır. Ratlarda yapılan çalışmalarda silimarin oral uygulamadan 24 saat sonra safrada %2-3 oranında bulunmuştur. Hayvanlarda ve insanlarda pik plazma konsantrasyonuna oral alımı takiben 4-6 saat sonra ulaşılır(21). Yarılanma ömrü 6-8 saattir, Vücuttan atılımı büyük oranda safra yolu ile, az bir kısmı da böbrekler yolu ile olmaktadır(21).

1.3.2 Silimarin Endikasyonları

Klinikte en önemli kullanım endikasyonu Amanita mantar zehirlenmesidir. Bu mantar, amanitin ve phalloidin olarak bilinen çok güçlü hepatotoksinler içermektedir. Bu mantarların yanlışlıkla alımına bağlı her yıl Amerika ve Avrupa’da ortalama 60 zehirlenme vakası görülmektedir. Zehirlenme sonrasında mortalite % 30 gibi çok yüksek düzeylere kadar çıkmaktadır(22)

Yapılan çalışmalarda, farelerde silimarinin Amanita toksikasyonundan hemen önce veya maruziyetten sonraki 10 dakika içinde uygulanması karaciğer toksitesini %100 oranında önlemiştir. Ayrıca silimarinin zehirlenmenin ilk 24 saati içinde uygulanması ağır karaciğer hasarı ve mortaliteyi engellemiştir(23). Bununla beraber, insanlarda amanita toksini maruziyeti sonrası hepatoprotektif etkisi defalarca gösterilmiştir. Silimarin ile tedavi edilen 18 hasta serisinde, 1 hasta dışında tüm hastalar hayatta kalmıştır. Silimarinin, Amanita phalloides mantar alımından 48 saat sonra dahi uygulanması ağır karaciğer hasarını engellemede etkili olduğu gösterilmiştir(24).

Silimarinin hepatoprotektif etkisini kanıtlayan birçok çalışma yapılmıştır. Çoğu alkol alımına bağlı karaciğer enzim yüksekliği olan hastaların 420 mg/gün silimarin kullanımı ile 4 haftalık takibinde, silimarinin karaciğer enzimlerini belirgin olarak gerilettiği gözlenmiştir. Karaciğer biyopsilerinde histolojik olarak anlamlı düzeltilmeler saptanmıştır(25).

Karaciğer sirozu ile takipli 170 hasta ile yapılan bir Avusturya çalışmasında 420 mg/gün ortalama 41 ay olmak üzere silimarin uygulaması sağkalım süresini belirgin olarak uzatmıştır. Silimarin grubunda sağkalım %58 iken plasebo grubunda sağkalım %39 olarak bulunmuştur(26).

1.3.3 Etki Mekanizması

Silimarinin karaciğer hücrelerini asetaminofen, etanol, karbontetraklorid ve D-galaktozamin gibi pek çok toksine karşı koruduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte iskemik hasar, radyasyon, demir toksitesi ve viral hepatitte etkili olduğu görülmüştür(27). Hepatoprotektif özelliklerine temel oluşturabilecek esas etki mekanizmaları; antioksidasyon, güçlü detoksifikasyon ,anti lipid peroksidasyonu ve glutatyon azalmasını önlemesidir(27) Silimarin, lipooksijenaz enzimini inhibe eder ve bunun sonucunda karaciğerde lökotrien oluşumu engellenir. Ayrıca silimarinin hepatosit protein sentezini arttırması, tümör prekürsörlerinin aktivitesini azaltması, mast hücrelerini stabil etmesi, immun fonksiyonları modüle etmesi de koruyucu mekanizmalarından bazılarıdır.Silimarinin ayrıca antifibrotik ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir.(27) İn vivo ve in vitro yapılan deneylerde protein sentezinde artış, yeni ribozom oluşumu ve DNA sentezinde belirgin artış bulunmuştur. Artmış protein sentezi sadece silimarin kullanılan hasarlı karaciğerde (parsiyel hepatotektomi) saptanmış, kontrol grubunda herhangi protein sentezinde artış gözlenmemiştir (28)

Silimarinin hayvanlarda yapılan çalışmalarda, karaciğer fibrozisini yavaşlattığı ve iyileşme sağladığı gösterilmiştir.Örneğin; safra yolları total oklüde edilen ratlarda inflamasyon olmadan progresif karaciğer fibrozisi gelişmektedir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında oluşan bu fibrozisi, 50 mg/kg/gün dozda uygulanan silimarin , %30-35 oranında azaltmıştır. Safra kanalı total oklüzyonu sonrası sürekli 6 hafta ya da sadece son 2 hafta silimarin uygulaması eşit derecede etkili bulunmuştur. Silimarinin düşük doz (25/mg/kg/gün) uygulanmasının fibrozisi önlemede etkili olmadığı görülmüştür(29)

Silimarin, sitokrom P450 sisteminde inhibitör etkilidir. Farelerde yapılan bir çalışmada silimarinin spesifik birçok P450 enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir(30). Amanita zehirlenmesinde protektif olmasının nedeni bu enzim sistemini bloke etmesidir. Amanitin toksini,P450 sistemi ile aktive edilir ve böylece hepatositler için zararlı hale gelir . Ayrıca, silimarin ve antioksidanlarla benzer şekilde P450 enzimleri ile oluşan serbest radikallere karşı hücrelerde koruma sağlar (30)

Silimarinin karaciğer üzerine immunomodulator etkisi olduğu da bilinmektedir. Bununla ilgili birçok çalışma yapılmıştır.Bu çalışmalardan birincisinde biyopsi ile kanıtlanmış alkole bağlı karaciğer sirozu olan hastalarda görülen düşük T-hücre sayısı, yüksek CD 8+ hücre sayısı ve artmış lenfosit sitotoksitesi, 6 aylık silimarin uygulaması ile hepatik fibrozis gerilemiştir(31).İkinci çalışmada ise 40 alkolik siroz hastasına silimarin, amino imidazol karboksamidfosfat veya plasebo 1 ay boyunca çift-kör olarak uygulanmıştır. Tedavi gruplarında silimarin serum, ALT, AST GGT ve total bilirubin düzeylerini normale doğru indirmiş ve lenfotoksiteyi baskılamıştır(32).

Böbrek nakillerinde kullanılan soğuk iskemi/reperfüzyon işlemi sırasında oluşan serbest radikaller, renal tübül hücrelerini etkileyerek; protein-DNA biyosentezinde ve laktat dehidrogenaz aktivitesinde artışa yol açmakta ve sonuç olarak kimyasal hasara neden olmaktadır. Silimarin kullanımı ile nakil işlemi esnasında oluşacak iskemi reperfüzyon hasarının azaltılabileceği ya da tamamen önlenileceği bildirilmektedir(33). Ratlarda sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede silimarinin koruyucu etkisi araştırılmış ve sisplatinden önce silimarin uygulanmasının sisplatine bağlı renal toksisiteyi azalttığı gözlenmiştir (34). Bu çalışmalarda silimarinin olumlu etkilerinin, maddenin antioksidan özelliklerine bağlı olabileceği kanaati hakimdir.

1.3.4 Metabolizma

Silimarin karaciğerde faz 1 ve faz 2 biyotransformasyona uğrar. CYP450-2C8 enzimi ile metabolize olur. Faz 2 reaksiyonlar sonrasında çoklu konjugasyon reaksiyonlarına girer ve silibin monoglukronid, silibin diglukronid, silibin monosulfat ve silibin diglukronid sulfata konjuge olur. Silimarinin metabolitlerinin büyük bir kısmı safra ve daha az oranda idrar yoluyla atılır (21).

1.3.5 Dozaj/Toksisite

Silimarin suda çözünürlüğü azdır. Standart kapsüllenmiş bitki ekstresi şeklinde oral olarak kullanılır. Hayvanlarda silimarinin yüksek doz kısa veya uzun süreli kullanımında herhangi bir yan etki gözlenmediği bildirilmektedir. İnsan çalışmalarında da genelde yan etki saptanmamıştır. Erişkinler için önerilen silimarin dozu iki veya üç bölünmüş doz halinde 240-900 mg/kg/gündür. Daha

yüksek dozlarda (>1500 mg/gün) uygulanan silimarinin laksatif etkisi ve safra sekresyonunu ve akımını arttırıcı etkisi oluşmaktadır. Hafif alerjik reaksiyonlar bildirilmiştir, fakat bunlardan hiçbiri tedavi kesilmesini gerektirecek düzeyde olmamıştır (35).

Silimarinin renal etkilerine dair veriler hepatik etkileri kadar henüz iyi bilinmemektedir. Ratlarda iskemi reperfüzyon ve ilaç nefrotoksitesi modellerinde silimarinin olumlu etkilerini bildiren az sayıda çalışma olmakla birlikte hiç etkisi olmadığını gösteren veriler de mevcuttur. Silimarinin renal fonksiyonlar üzerine olan etkilerine dair veriler hepatik etkilerini değerlendiren çalışmalardan elde edilmektedir. Renal fonksiyonlarda bir bozulma yapmadığı bildirilmiş olmakla birlikte renal histolojiyi değerlendiren çalışma verisi azdır. Hepatoloji pratiğinde bu kadar yaygın kullanım alanı bulmuş, kuvvetli antioksidan özelliklere sahip olduğu kabul edilen bu ürünün böbrek fonksiyonları ve böbrek histopatolojisi üzerine etkileri değerlendirilebilir görülmektedir.

2 AMAÇLAR VE RAT ÇALIŞMA MODELİ

Bu çalışmada; rat modelinde,hepatoprotektif etkisi gösterilmiş silimarinin renal toksisitesi olup olmadığı ve olası nefroprotektif etkinin serum ve histopatolojik değerlendirme ile araştırılması amaçlanmıştır.

Karaciğer hasarının azaltılması veya yavaşlatılmasına yönelik yapılan insan çalışmalarında silimarinin 1500 mg/gün'e kadar kullanılabileceği belirtilmekle birlikte hepatoprotektif olarak genellikle erişkinlerde 240-800 mg/gün, iki ya da üçe bölünmüş dozlarda kullanılması önermektedir(27). Silimarinin, hepatoprotektif olduğu ve bu etkisini antioksidan özelliği, membran stabilizasyonunu arttırıcı özelliği ve lipid peroksidasyonunu azaltıcı özelliği sayesinde yaptığı düşünülmektedir(36)(37). Karaciğer üzerindeki etkilerinin öğrenilmesinden sonra son zamanlarda renoprotektif özelliklerinin de olabileceğine dair umutların doğmasına neden olmuş ve bu konuda araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Silimarinin antioksidan özelliklerinin gösterilmesi ve klinikte kullanılıyor olması renal toksisiteyi önlemek için de kullanılabileceği ümidini doğurmuştur(37).

Bu çalışmada rat çalışmalarında karaciğer hastalıklarının tedavisinde önerilen dozlamalarda kullanılan silimarinin bir yandan hem serum örneklerinde böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi yoluyla hem de histopatolojik olarak hasarın gösterilmesi yoluyla nefrotoksik olup olmadığını kanıtlamak; diğer yandan oksidan ve antioksidan sistemler üzerinde oluşturabileceği etkileri ortaya koyarak nefroproteksiyon amaçlı yapılabilecek toksik nefropati çalışmalarına yol gösterici olmak amaçlanmıştır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Laboratuvar Koşulları, Çalışma Planı ve Materyalin Toplanması

12 haftalık, 210-350 gr ağırlığında Sprague Dawley Erkek ratlar çalışmada kullanıldı. Ratlar Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'ndan sağlandı. Ratlar randomize olarak 2 Gruba ayrıldı ve her grupta 6 rat kullanıldı. Gruplara ayrılan ratlar standart sıcaklıklarda ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), nem oranları ve ışık oranları kontrol edilmiş ve eşitlenmiş şartlarda, eşit sıvı ve besin alacak şekilde muhafaza edildi.

Çalışmada silimarin olarak 'GNC marka Milk Thistle 200 mg kapsül' kullanıldı. Kullanılan ürünün her bir kapsülü 160 mg aktif silimarin içermektedir. Her bir kapsül 5 cc musluk suyu ile kırmızı biyokimya tüpünde süspansiyon haline getirilerek gavaj yoluyla ratlara verilmiştir.

Grup I'deki (kontrol grubu) ratların, her gün hassas terazi ile tartılıp aldıkları sıvı miktarları ölçüldü. Tüm ratlar tek tek kafeslere konuldu. Bu gruptaki ratlara günde iki kere 0,4 cc musluk suyu gavajla yedi gün uygulandı.

Grup II'deki (silimarin grubu) ratlarda her gün hassas terazi ile tartılıp aldıkları sıvı miktarları ölçüldü. Tüm ratlar tek tek kafeslere konuldu. Bu gruptaki ratlara günlük tartılarına göre 100 mg/kg/gün dozunda silimarin gavajla iki bölünmüş dozda ve toplamda yedi gün boyunca uygulandı.

Kontrol ve ilaç grubundaki tüm ratlara yedi günlük ve toplamda 14 doz ilaç ya da musluk suyu uygulamasını takiben uzman veteriner hekim eşliğinde ketamin ve ksilazin ile tam anestezi yapıldı. Anestezi uygulanan ratlardan intrakardiyak kan örnekleme yapıldı. Kan örnekleri kırmızı kapaklı serum tüplerine konuldu ve yaklaşık 15 dakika kadar pıhtılaşması beklendi.

Ardından 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Serumlar ayrılarak çalışmaya kadar -80°C’de saklandı.

3.2 Böbrek Prepatlarının Hazırlanması ve Histopatolojik İnceleme

Ötenazi sonrası histopatolojik inceleme yapmak için deney hayvanlarının sağ böbrekleri çıkarıldı. Sol böbrekleri doku ekstraktından ileride yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere azot tankına alındı. Sağ böbrekleri formalinde 48 saat süre ile tespit edildi. Doku takibi sonrası örnekler parafine gömüldü. 3 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinize edildi. Hematoksilen eozin boyama uygulandı. Tübüler dejenerasyon daha önce Keirstead ve arkadaşlarının nefrotoksisiteyi araştıran rat çalışmasında önerdikleri skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (38).

Tablo 3.1: Tübüler dejenerasyon skollama sistemi (38).

Skor	Tübüler dejenerasyon derecesi	Histolojik bulgular
0	Normal	Normal yapıda böbrek túbül epiteli
1	Minimal	Parlak eozinofilik sitoplazma, piknotik nukleus içeren hücreler
2	Hafif	Túbül lümenine dökülmüş hücreler ve protein silendirler, piknotik nukleus içeren hücreler
3	Orta	Piknotik nukleusu olan,2-3 dejenere hücreden oluşan kümeler ve protein silendirler
4	İlmli	Dejenere hücrelerin oluşturduğu hücre kordonları kromatinin tamamen kaybı, birçok túbülün etkilendiğı hasar.
5	Belirgin - Ağır	Tübüllerin çoğı dejenere hücre kordonları tarafından etkilenmiş ya da bütün túbüllerde dejenerasyon.

3.3. Serum Örneklerinin Çalışılması

Ratlardan elde edilen serum örneklerinden üre ve kreatinin değeri Ankara Delta analiz ve laboratuvar hizmetleri'nde çalışıldı.

Rat serumlarında sistatin-C (Cys-C), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Süperoksit dismutaz (SOD) düzey ölçümleri, ticari olarak temin edilen Shanghai Sunred Biological Technology marka ELISA kitleriyle, üretici firmanın öngördüğü prosedüre uygun bir şekilde yapıldı. Kitlerin çalışma prosedürü çift-antikor sandwich ELISA yöntemine dayanmaktadır. Mikro plakalar ölçülecek parametreye karşı monoklonal antikorlarla kaplıdır. Numunelerde bulunan Cys-

C, GPx veya SOD mikropalakada kaplı bulunan antikorlarla birleşir. Sonrasında, oluşan bu kompleks, eklenen biyotinle işaretlenmiş antikorlar vestreptavidin-HRP birleşerek bir immün kompleks oluşturur. İnkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen yıkama işlemi ortamda fazla bulunan bağlanmamış molekülleri uzaklaştırır. Ardından eklenen renk oluşumunu sağlayacak olan kromojen solüsyonlarla yapılan inkübasyon sonrasında kuyucuklara eklenen asit solüsyonla reaksiyon durdurulur. ELISA plaka okuyucu ile 450 nm’de absorbanslar okunur. Konsantrasyonları bilinen standartlardan yola çıkarak numunelerde bulunan madde miktarları hesaplanır.

Total antioksidan durum (total antioxidant status, TAS) ve total oksidan durum (total oxidant status, TOS) kolorimetrik kitlerle (Rel Assay Diagnostics) ölçüldü. TAS ölçümünün esası numunede bulunana antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli olan ABTS (2,2’-azino-bis(3-etilenbenzotiazolin- 6-sülfonik asit) radikalini, renksiz olan indirgenmiş ABTS formuna dönüştürmesi esasına dayanır. Okuma spektrofotometrik olarak 660 nm’de yapılır. Bir vitamin E analogu olan ve Trolox ekivalanı olarak da adlandırılan stabil antioksidan standart solüsyonundan yola çıkarak numunelerdeki TAS, mmol Trolox Ekivalanı/L (mmol/L) olarak hesaplanır. TOS ölçümünün temeli ise numunelerde bulunan oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla okside etmesine dayanmaktadır. Ferrik iyon, kromojenlerle asit ortamda renkli bir kompleks verir. Renk değişimi 530 nm okunur ve stabil standart solüsyondan (H_2O_2 solüsyonu) yola çıkılarak sonuçlar $\mu mol H_2O_2$ ekivalanı/L ($\mu mol/L$) olarak hesaplanır. Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA), tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) olarak ölçüldü.

Peroksidemembranlar, tiyobarbitürük asit (TBA) ile renk reaksiyonu veren fragmentler üretir. Bu oluşum TBARS testinin temelidir.(39). Konsantrasyonu bilinen standartlardan yola çıkarak numunelerdeki madde miktarı hesaplanır.

3.4 İstatistiksel Analiz

Çalışmanın sayısal verileri ortalama ve standart sapma, kategorik veriler ise yüzde ile gösterildi. Çalışma grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada, gruplar arası ortalamanın karşılaştırıldığı bağımsız örneklem T testi (independent T test) kullanıldı.

3.5 Etik Kurul Onayı

Çalışmaya ait etik kurul onayı; 03/03/2016 tarihli Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul toplantısından E.28528 evrak numarası ile alınmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Günlük Ağırlık Takibi

Çalışma sırasında tüm ratlar her sabah hassas terazi ile tartıldı.

Günlük tartılarının ortalamaları tablo 4.1.1’de görülmektedir. Grupların ağırlık ortalamaları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Her iki grupta çalışmanın son gününe gelindiğinde kilo kayıpları saptandı. Ortalama kilo kayıpları tablo 4.1.2’de görülmektedir. Kilo kayıpları gavaj uygulamasına ikincil olabileceği düşünüldü. Kilo kayıplarında iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 4.1.1 Günlük ağırlık ortalamaları (mg)

	Grup 1		Grup 2	
	Ort.	SS	Ort.	SS
Ağırlık1.gün	288,1	42,7	287,5	46,5
Ağırlık2.gün	287,4	42,0	283,9	46,3
Ağırlık3.gün	279,9	42,6	284,6	44,8
Ağırlık4.gün	280,3	39,5	279	44,2
Ağırlık5.gün	280	37,5	279,6	44,6
Ağırlık6.gün	280,6	37,9	281,1	45,5
Ağırlık7.gün	280,9	38,7	278,9	43,5
Ağırlık8.gün	282,1	34,0	279,6	42,4

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

Tablo 4.1.2 Ortalama kilo kaybı

	Ağırlık farkı	Standart Sapma (SS)
Grup 1	-6,03	9,68
Grup 2	-7,90	6,76

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.2 Günlük Sıvı Alımları

Tüm ratlar her gün ayrı ayrı kafeslere konularak ayrı suluklarla sıvı alımları sağlandı. Aldıkları sıvı miktarı her gün ölçüldü. Çalışma süresince ratların aldıkları ortalama sıvılar tablo 4.2.1’de görülmektedir. Aldıkları sıvı ortalaması ise 4.2.2’de görülmektedir. Ratların aldığı sıvılar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4.2.1 Günlük alınan sıvı ortalamaları (ml)

	Grup 1		Grup 2	
	Ort.	SS	Ort.	SS
Aldığı sıvı 1.gün	51,6	10,3	50,0	10,0
Aldığı sıvı 2.gün	46,6	7,5	49,1	11,1
Aldığı sıvı 3.gün	43,3	7,5	44,1	10,6
Aldığı sıvı 4.gün	45,8	8,0	39,1	10,6
Aldığı sıvı 5.gün	45,0	5,4	45,8	8,6
Aldığı sıvı 6.gün	46,6	10,8	44,1	8,6
Aldığı sıvı 7.gün	42,5	4,1	43,3	7,5

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

Tablo 4.2.2 Alınan sıvı ortalamaları

	Aldığı sıvı ortalaması	Standart Sapma (SS)
Grup 1	45,9	5,3
Grup 2	45,1	6,9

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.3 Serum Üre ve Kreatinin Değerleri

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden üre ve kreatinin değerleri çalışıldı. Kreatinin (mg/dl) ortalamaları her iki grupta eşit olarak saptandı (tablo 4.3.1). Üre değerleri ise tablo 4.3.2’de gösterilmiş olup hem üre hem de kreatinin değerleri arasında iki grupta istatistiksel farklılık saptanmadı.

Tablo 4.3.1 Grup 1 ve 2 arasında kreatinin ortalamalarının karşılaştırması

		n	Ort	SS	p
Kreatinin(mg/dl)	Grup 1	6	,29	,066	1
	Grup 2	6	,29	,038	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

Tablo 4.3.2 Grup 1 ve 2 arasında üre ortalamalarının karşılaştırması

		n	Ort	SS	p
Üre (mg/dl)	Grup 1	6	39,6	3,5	0,715
	Grup 2	6	38,5	6,7	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.4 Serum Sistatin C Değerleri

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden Sistatin C çalışıldı. Sistatin C çalışmalarda renal hasarın erken belirteci olabileceği belirtilmiştir. Serum üre ve kreatinin değerlerinde önce serumda yükselebileceği gösterilmiştir. Ratlardan alınan örneklerde sistatin c ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ölçümlere ait değerlendirmeler tablo 4.4.1’de özetlenmiştir.

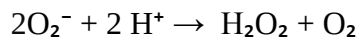
Tablo 4.4.1 Sistatin C ortalamaları

		n	Ort	SS	p
Sistatin C	Grup 1	6	1,8	,26	0,59
	Grup 2	6	1,9	,28	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.5 Serum Süper Oksit Dismutaz (SOD) Değerleri

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden Süper Oksit Dismutaz (SOD) çalışıldı. Süperoksit dismutaz süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının (O₂ ·-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine

karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışıyla artar. Dokulara toksik etkisi olan ajanlar SOD aktivitesini inhibe edebilir ya da SOD aktivitesinin üzerinde serbest oksijen radikali oluşmasına neden olabilir. Antioksidan etkisi olan ajanlar ise SOD aktivitesini arttırıyor olabilir. Ratlardan alınan örneklerden elde edilen SOD ortalamaları tablo 4.5.1’de özetlenmiştir. SOD ortalamaları iki grup arasında benzer olarak saptanmış ve istatistiksel fark saptanmamıştır. Bu sonuç silimarinin SOD dışı bir mekanizma ile antioksidan etkisini gösterebileceğini düşündürmüştür.

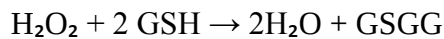
Tablo 4.5.1 Grupların SOD ortalamaları

		n	Ort	SS	p
SOD	Grup 1	6	14,1	2,1	0,61
	Grup 2	6	13,6	0,37	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.6 Serum Glutasyon Peroksidaz (GPX) Değerleri

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden Glutasyon Peroksidaz (GPX) çalışıldı. Glutasyon peroksidaz sitozolde bulunur ve hidroperoksitlerin indirgenmiş glutasyon (GSH)) aracılığı ile indirgenmesinden sorumlu enzimdir.



Ratlardan alınan örneklerden elde edilen GPX ortalamaları tablo 4.6.1’de özetlenmiştir. Ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamasına rağmen silimarin grubunda kontrol grubuna göre GPX düzeyleri

daha yüksek saptanmıştır. Bu da silimarinin antioksidan etkisine GPX'in katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Ratların ayrı ayrı GPX değerleri tablo 4.6.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.6.1 GPX ortalama değerleri

		n	Ort	SS	p
GPX	Grup 1	6	29,2	3,7	0,23
	Grup 2	6	32,0	3,9	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

Tablo 4.6.2 Grup 1 ve Grup 2'nin GPX değerleri

	Grup 1	Grup 2
Rat 1	33,4	36,3
Rat 2	26,7	34,1
Rat 3	28,4	27,0
Rat 4	29,6	34,2
Rat 5	23,7	27,2
Rat 6	33,2	33,0

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.7 Serum Malondialdehit (MDA) Değerleri

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden Malondialdehit (MDA) çalışıldı. MDA vücutta lipit peroksidasyonu sonucu oluşur ve vücuttaki lipit peroksidasyonu ile korelasyon gösterir. Ratlardan çalışma sonrası elde edilen örneklerden elde edilen sonuçlarda MDA ortalamaları arasında gruplar arasında istatistiksel fark olmasa da silimarin grubundan MDA düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük saptanmıştır. Bu da silimarinin lipit peroksidasyonunu azalttığını düşündürmüştür (Ratlara hergün gavaj yolu ile iki kere uygulama yapılması ratlarda stres yolaklarını aktive etmiş olabilir). Grupların MDA ortalamaları tablo 4.7.1’de özetlenmiştir.

Tablo 4.7.1 Grupların MDA ortalamaları

		n	Ort	SS	p
MDA	Grup 1	6	31,2	11,2	0,48
	Grup 2	6	26,8	9,3	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.8 Serum Total Anti Oksidan Kapasitesi (TAS)

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden TAS düzeyi çalışıldı. Vücutta oksidatif stres sonucu bir çok bilinen antioksidan sistemlerin dışında henüz tanımlanmamış mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden SOD, GPX gibi antioksidan sistemlerin yanında diğer sistemlerin olası aktivitelerini göz ardı etmemek için TAS düzeyleri de

değerlendirildi. Silimarin grubunda TAS ortalaması kontrol grubuna göre daha yüksek saptandı ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı (Tablo 4.8.1) Her bir deneğin TAS değeri tablo 4.8.2’de özetlenmiştir.

Tablo 4.8.1 TAS ortalaması

		n	Ort	SS	p
TAS	Grup 1	6	0,86	0,17	0,48
	Grup 2	6	0,92	0,11	

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

Tablo 4.8.2 Grup 1 ve Grup 2’nin TAS değerleri

	Grup 1	Grup 2
Rat 1	0,92	1,07
Rat 2	0,73	1,05
Rat 3	0,66	0,87
Rat 4	1,17	0,85
Rat 5	0,88	0,95
Rat 6	0,82	0,77

Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.9 Serum Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Yedi günlük çalışma sonrası kardiyak ponksiyon ile elde edilen kan örneklerinden TOS düzeyi çalışıldı. Vücutta oksidan stres bilinen birçok mekanizma yanında bilinmeyen birçok mekanizmayla da oluşmaktadır. Bu yüzden Total oksidan kapasitesi stres durumunda oluşabilecek tüm mekanizmalar hakkında fikir verebilir. Deneklerden alınan örneklerde silimarin grubunda TOS

değeri kontrol grubuna göre daha düşük saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (tablo 4.9.1).

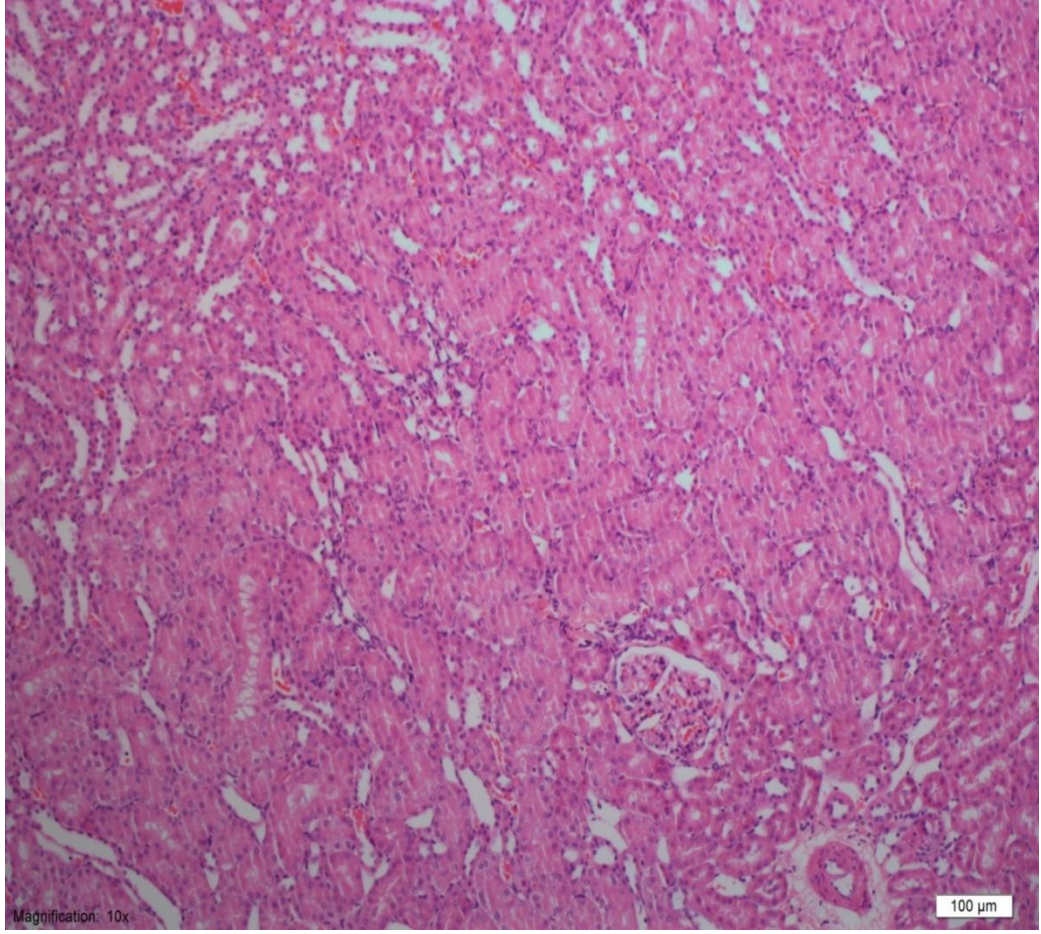
Tablo 4.9.1 TOS değer ortalaması

		n	Ort	SS	p
TOS	Grup 1	6	5,2	1,2	0,01
	Grup 2	6	2,4	1,7	

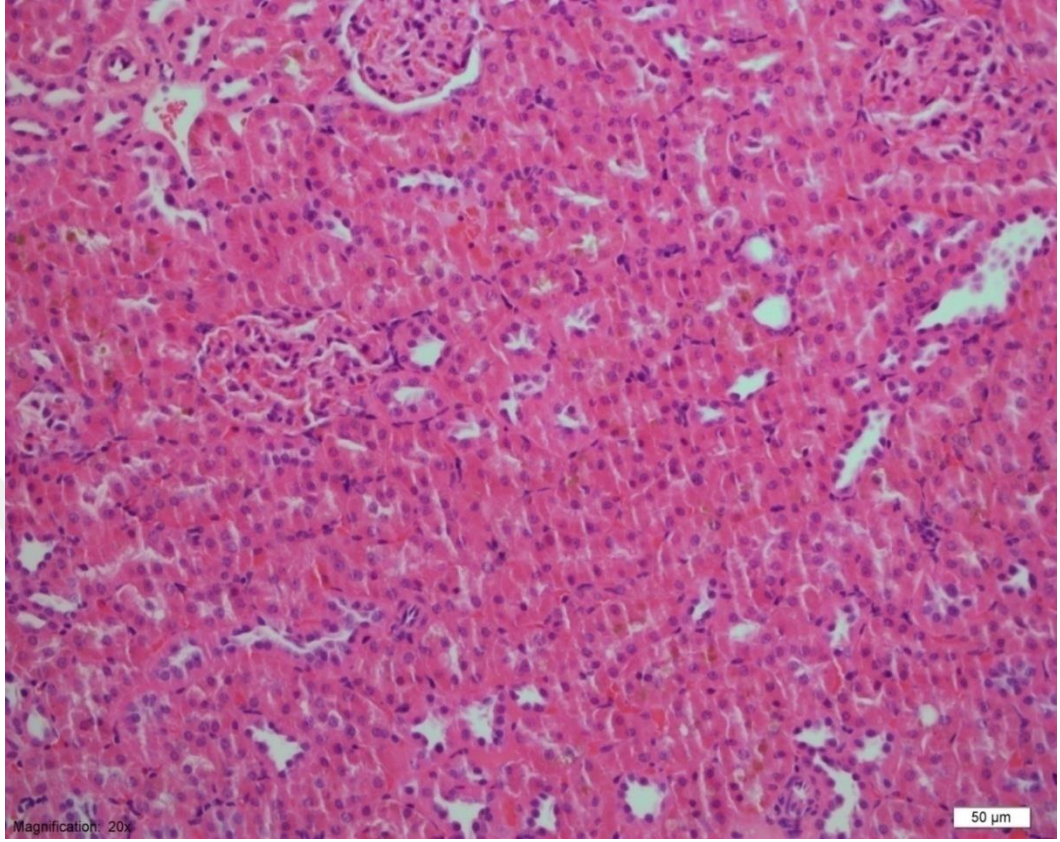
Grup 1; kontrol grubu, Grup 2; silimarin grubu

4.10 Histopatolojik Değerlendirme

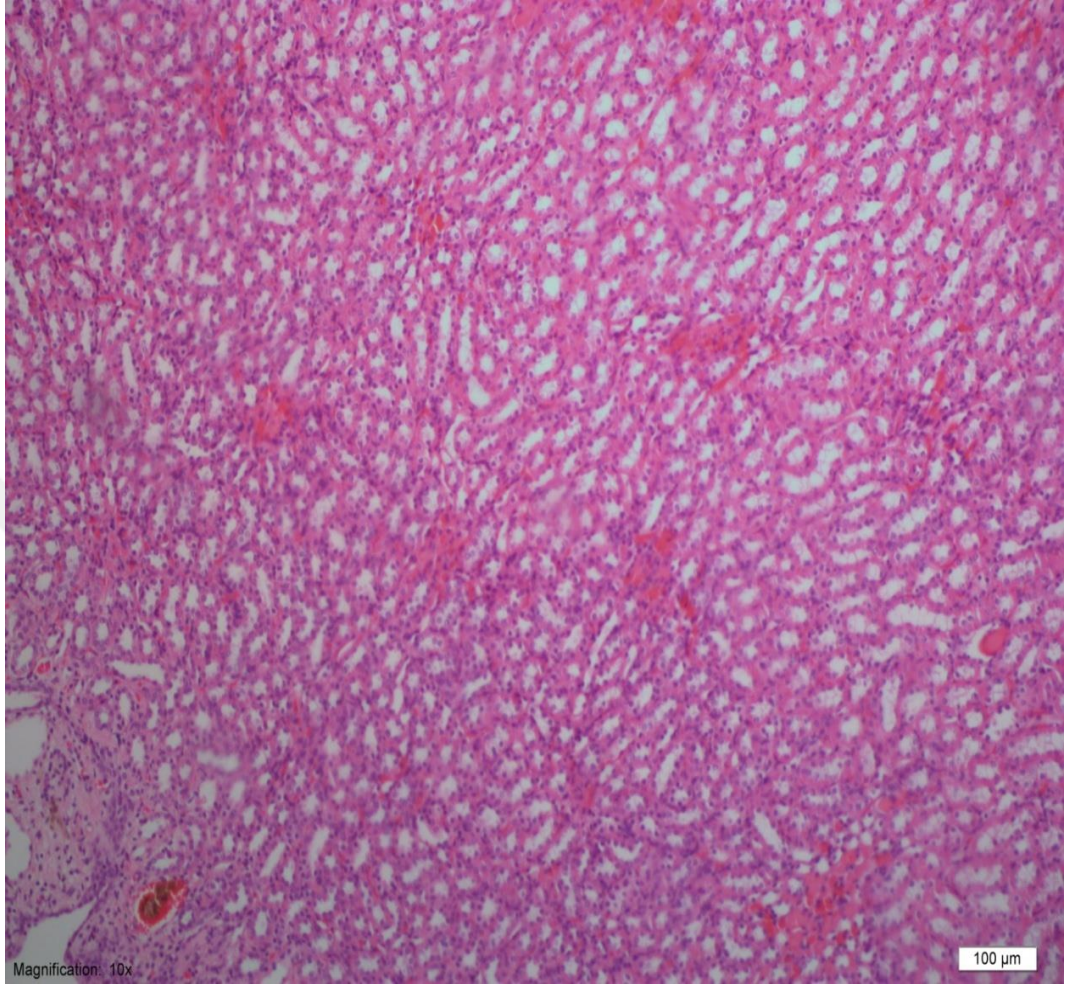
Ötenazi sonrası ratlardan alınan sağ böbrekler histopatolojik inceleme için hazırlandı. Değerlendirme sonucundan hem kontrol grubundaki hem de silimarin alan gruptaki ratların hepsinin tübüler dejenerasyon skorlarının '0' olduğu görüldü. Aynı şekilde her iki grupta da hem glomerüler, hem de interstisyel hasara dair bir bulguya rastlanmadı. Resim 4.10.1 ve resim 4.10.2 random olarak grup 1'den resim 4.10.3 ve 4.10.4 grup 2'den seçildi.



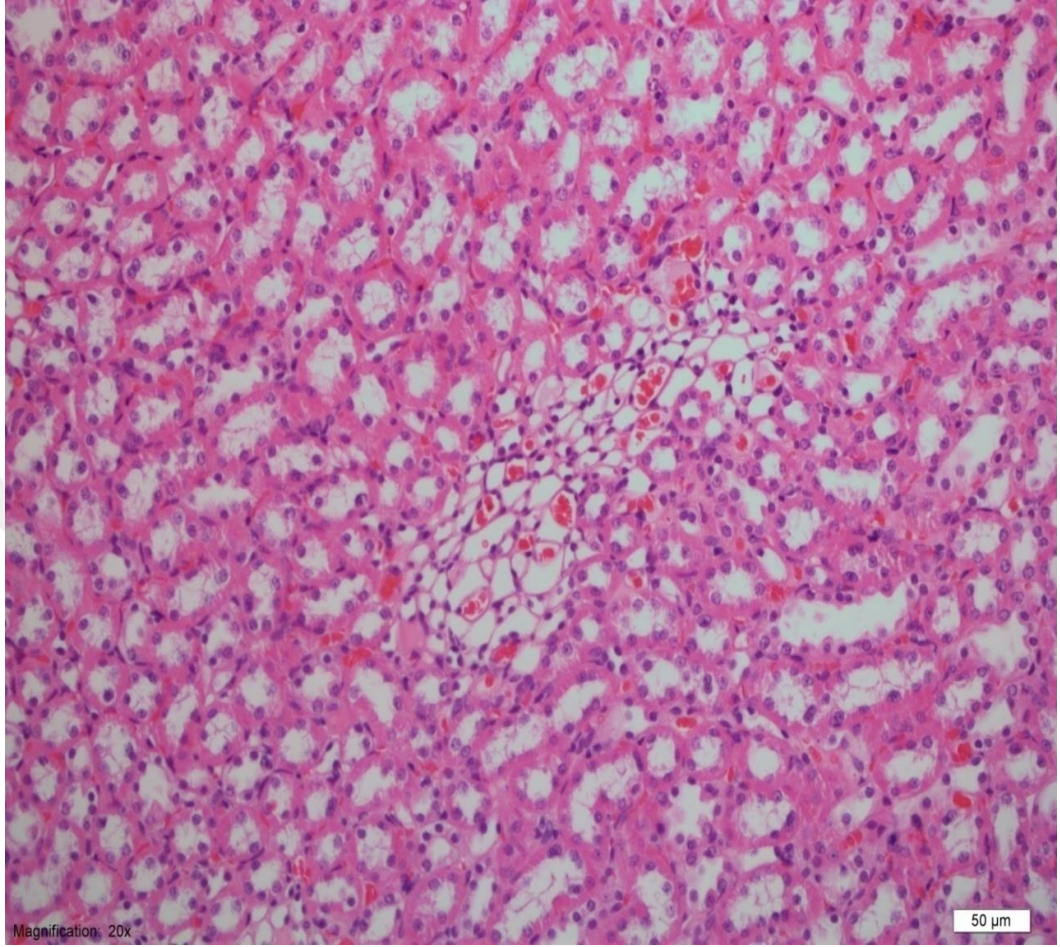
Resim 4.10.1 Normal proksimal tübül



Resim 4.10. 2 Normal proksimal tübül



Resim 4.10.3 Normal distal tübül



Resim 4.10.4 Normal distal tübül

5. TARTIŞMA

Akut böbrek hasarı, böbrek fonksiyonlarının saatler ya da günler içinde bozulması sonucu ortaya çıkan üre ve kreatinin gibi nitrojen artık ürünlerinin birikmesi, sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesinin bozulması ile seyreden klinik bir sendromdur. Böbrek fonksiyonlarındaki azalma sonucu ortaya çıkan oliguri, kan biyokimyasındaki değişimler ile tanı ve sınıflaması yapılarak prognostik veriler elde edilmeye çalışılmaktadır. ABH insidansı son yıllarda hem toplum hem de hastanede yatan hastalarda giderek artmaktadır(1)(2). Hesaplanan insidansı 2-3/1000'dir (3). Hastanede yatan hastaların %7'sinde ve yoğun bakımda yatan hastaların üçte ikisinde ABH gelişir (2). Özellikle hastaneye yatıştan sonra gelişen akut böbrek hasarından sorumlu tutulabilecek en önemli sebep toksik ürünlerin kullanılmasıdır (örn; antibiyotikler, analjezikler, kontrast maddeler). Yaşlı hastalar, ek hastalığı olanlar, kronik böbrek hastalığı olan bireyler, volüm dengesi iyi sağlanamamış hastalar ve birden fazla nefrotoksik ajanı bir arada kullanmak zorunda olan hastalar toksik nefropati oluşumu için riski yüksek olan bireylerdir. Yatan hastalarda ve ayaktan hastalarda toksik hasar sonucu oluşan ABH yatış süresini uzatmakta, maliyeti arttırmakta, morbidite ve mortalite oranlarını arttırmaktadır. Bu yüzden renal hasarı önleyici ajanların bulunması ve klinikte kullanılması zorunlu bir ihtiyaç olarak doğmuştur.

Son dönemlerde deve dikeninden elde edilen silimarin adlı maddenin antioksidan özellikleri hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Fakat bu çalışmalar baskın olarak karaciğer üzerinedir. Silimarinin esas eliminasyon yeri karaciğer olması nedeniyle esas antioksidan özelliklerini karaciğer üzerinde

göstereceği düşünülmektedir. Ancak diğer organları oksidatif stresin zararlı etkilerinden koruyup korumadığı hakkında net bir fikir birliği yoktur. İlaçların ve toksinlerin esas elimine edildiği iki organın karaciğer ve böbrek olması nedeniyle ilaçların, bitkisel ürünlerin en fazla toksisitesi bu iki organ üzerinde olmaktadır. Silimarinin hepatoprotektif etkisinin kanıtlanmasıyla birlikte bu ajanın renoprotektif özellikleri olabileceği de düşünülmektedir. Ancak karaciğer hastalıklarında kullanımı ile ortaya çıkan antioksidan koruyucu etkilerinin böbrek hastalıklarında da gerçekleşip gerçekleşmeyeceği tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada silimarinin nefrotoksik olup olmadığının serum ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve eğer nefrotoksik etkisi yoksa olası böbrek koruyucu etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Yedi günlük silimarin uygulamasını takiben ratlardan alınan serum örneklerinden Üre, Kreatinin, Sistatin C, SOD, GPX, MDA, TAS ve TOS çalışılmış, histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Üre ve kreatin değerleri arasında iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu da silimarinin nefrotoksik olmadığını desteklemektedir. Üre ve kreatinin değerlerinin, glomerüler filtrasyon hızındaki bozulmayı çok iyi gösteren parametreler olamaması; GFH'da %50 gibi ciddi bir azalma olduktan sonra ancak bu değerlerde yükselme olarak renal hasarın ancak belirginleşebileceği endişesiyle serum sistatin C düzeylerinin ölçümü de bu çalışmada yapılmıştır (40). Ghilisi Z. ve arkadaşlarının 2013 yılında yayımlanan bir yayınlarında kolistin nefrotoksitesite değişik dozlarda ratlar üzerinde oluşturulmaya çalışılmış. 450.000 IU/kg verilen ratlarda üre ve kreatinin değerleri kontrol grubuyla

karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükselmemiş olmasına rağmen sistatin C değeri kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (41). Bununla birlikte Lameire ve ark. 2010 ve 2015 yılları arasında yoğun bakımlardaki kanser hastalarında ABH ile ilgili çalışmaları derledikleri literatür çalışmasında sistatin C'nin ABH'nın erken prediktörü olabileceğini vurgulanmışlardır(42). Bu sebeple bu çalışmada da serum sistatin C düzeyleri serum kreatinin ve üre değerlerine ilave olarak ölçülmüş ve her iki grup arasında sistatin C düzeyleri arasında da fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar silimarinin nefrotoksik olabileceği kaygılarını belirgin olarak azaltmıştır.

Oksidatif stresi yenebilmek için çeşitli antioksidan mekanizmalar devreye girmektedir. Bunlardan birisi de SOD'dur. Ghaznavi ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımlanan bir makalesinde gentamisin ilişkili nefrotoksisiteye karşı melatonin ve silimarin karşılaştırılmıştır. Hem silimarin hem de melatoninin SOD seviyesini arttırdığı gösterilmiştir(43). Mansour HH ve ark. 2006 yılında yaptıkları sisplatin ilişkili nefrotoksisitede silimarinin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında silimarin-sisplatin verilen grupta SOD düzeylerinin sadece sisplatin verilen grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişler ve bunun da sisplatinin yarattığı tübüler hasardan koruyucu bir özellik olabileceği sonucuna varmışlardır (34). Bizim çalışmamızda silimarin grubuyla kontrol grubu SOD ortalamaları arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Silimarin verilen ratlarda SOD düzeyinin arttırmadığı gözlemlendi; ancak çalışma gruplarında sadece gavaj uygulaması ile hafif düzeyde bir stres

oluşturulmuş olması, ciddi stres oluşturabilecek bir durumun olmaması SOD aktivitesinde değişiklik olmamasının bir sebebi olmuş görünmektedir.

Antioksidan mekanizmalardan bir diğeri ise GPX'dir. Mansour HH ve ark. yukarıda bahsedilen çalışmalarında, benzer şekilde silimarin verilen grupta GPX düzeylerini sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptamışlardır (34). Bizim çalışmamızda silimarin grubunun ortalama GPX düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ratların maruz kaldıkları stres düzeyinin düşüklüğü sebebiyle anlamlılık düzeyine ulaşmamış olduğu; ancak eğer ratlarda GPX aktivitesini düşürecek bir durumla karşılaşıldığı takdirde bu düzey artışlarının daha anlamlı boyuta ulaşabileceği düşünülebilir. Silimarin alan grupta SOD'dan ziyade GPX seviyelerinde artış saptanmış olması silimarinin daha çok GPX üzerinden antioksidan etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Antioksidan mekanizmaların artışı ile birlikte oksidan mekanizmaların azalışı da organ koruyucu özellik sergiler. Oksidan mekanizmaların bir göstergesi olan MDA çalışmalarda değerlendirilmiştir. İftikhar ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada albino tavşanlar üzerinde aloe veranın diklofenak sodyum nefrotoksisitesini önlemedeki etkisini araştırmışlardır. Aloe vera'nın diklofenak tarafından oluşturulan oksidatif stresi kaspaz'ı arttırarak MDA'yı azaltarak düşürdüğü saptanmış ve MDA seviyesini azaltan ajanların oksidatif stresi azaltabileceği belirtilmiştir (44). Ghaznavi ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımlanan bir makalelerinde gentamisin ilişkili nefrotoksisiteye karşı melatonin

ve silimarin karşılaştırılmış. Hem silimarin hem de melatonin ile gentamisin öncesi tedavinin MDA seviyesini azalttığı gösterilmiştir(43). Bizim çalışmamızda MDA ortalaması silimarin grubunda kontrol grubuna göre daha düşük saptanmıştır; ancak istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır. Çalışma grubu ratlarda oksidatif stresi arttıracak bir tetikleyici ajan ya da ortamın olmaması ya da ilacın kısa süreli verilmiş olması bu durumun olası sebepleri olarak sıralanabilir.

Yukarda bahsedilen SOD, GPX, MDA gibi oksidan-antioksidan mekanizmalar dışında tanımlanmış ve tanımlanmamış birçok mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden Total antioksidan kapasite(TAS) ve total oksidan kapasite(TOS) ölçümleri önem kazanmaktadır. Sancak EB ve ark. yaptıkları bir çalışmada renal iskemi reperfüzyon hasarında siringiç asitin protektif etkisini araştırmışlardır. GPX ve katalaz düzeyleri siringiç asit verilen grupta iskemi reperfüzyon süreci sonrasında artmış; ancak SOD düzeyleri değişmemiş saptanmıştır. Bunun yanı sıra TAS tedavi grubunda belirgin olarak yüksek düzeylerde bulunmuştur. Bu yüzden bilinen ve değerlendirilen antioksidan mekanizmalar dışında da mekanizmalar olabileceği ve bunların da belirlenebilmesi için TAS değerinin ve hatta oksidatif stres indeksi ölçümünün, antioksidan ve oksidan kapasiteyi değerlendirmekte daha değerli olabileceği belirtilmiştir (45). Kelle I ve ark. sisplatin nefrotoksitesini önlemede etil pirüvatın etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında sisplatin verilen grupta TAS düzeyi düşmüş olarak bulunurken, TOS ve oksidatif stres indeksi düzeyleri ise belirgin yüksek bulunmuştur. Etil pirüvat verilen grupta ise TOS ve oksidatif stres indeksinin azalırken TAS'ın artmış olduğunu ve bu artışın da hem renal

fonksiyonlardaki daha iyi sonuçlarla hem de renal histolojideki düzelme ile birliktelik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. TAS artışı önemli bir koruyucu mekanizma olarak yorumlanmıştır (46). Bizim çalışmamızda silimarin grubunda istatistiksel anlamı olmamakla birlikte ortalama TAS düzeylerinde artış saptandı. Yine artışın anlamlı olmamasında ilacın kısa süreli verilmiş olması ya da ortamda ciddi oksidatif stres durumunun bulunmaması sorumlu tutulmuştur.

Oksidatif yolakların total değerlendirmesinde TOS ölçümü birçok çalışmanın ilgi odağı olmaktadır. Ergin M. ve ark. ratlar üzerinde yapılan alfa amanita zehirlenmesinde nefrotoksisitenin değerlendirilmesini amaçlayan çalışmalarında alfa amanita verilen ratlarda TOS seviyesi anlamlı oranda yüksek bulunmuş ve nefrotoksisiteden sorumlu faktör olarak değerlendirilmiştir (47).. Bizim çalışmamızda da silimarin verilen grupta TOS seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük saptandı ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu çalışmada oksidatif stresi oluşturan sebep ratlara gavaj uygulaması olabilir ya da vücutta bazal seviyede var olan oksidatif durumu silimarin daha da düşürmüş olabilir. Antioksidan kapasitelerde istatistiksel anlamlı farkın olmayıp oksidan kapasitede anlamlı fark olması silimarinin oksidatif stres üzerine etkisinin daha baskın olabileceğini düşündürmektedir.

Renal dokuların histopatolojik olarak incelenmesi renal toksisitenin var olup olmadığının en değerli göstergesidir. İlaçların özellikle tübüllere toksik etki oluşturmaları nedeniyle histopatolojik değerlendirmede tübüler hasar değerlendirmesi ön planda olmakla birlikte glomerüler, interstisyel hasar da bu

Çalışmada değerlendirildi. İki grupta da renal hasara rastlanmadı. Bu bulgu silimarin renal etkileri üzerine yapılmış daha önceki çalışmaları destekler niteliktedir (21) (48).

Sonuç olarak; nefrotoksisitenin klinikte önemli bir problem olması, bu yan etkinin önlenmesi için çeşitli ajanların denenmesi ve bir sonraki nesillere hem ufuk açması hem de koruyucu tedavilerin oluşturulması açısından son derece önemlidir. Hepatoprotektif etkisi olan silimarinin nefrotoksik etkisi bu çalışmada saptanmamıştır. Bununla birlikte vücutta oluşabilecek oksidan radikallerin düzeyini azaltarak olası nefroprotektif ve diğer organ koruyucu etkileri olabileceğine dair veriler elde edilmiştir. Bu yüzden silimarin ile nefrotoksik ajanların (örn. kolistin, sisplatin..gb) değerlendirildiği çok sayıda hayvan ve insan çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu alışma yapılabilecek çalışmalara ön hazırlık gibi değerlendirilebilir.

6. SONUÇ

ABH'nın giderek artan sıklıkta görülmesi ve morbidite, mortalite ve maliyete artan oranda neden olması nedeniyle üzerinde durulması gereken önemli bir konu haline gelmiştir. Hem mevcut ilaçlar, görüntüleme ajanları ve bitkisel ürünlerin olası nefrotoksik etkileri hem de ilerleyen yıllarda sağlıkta kaydedilecek gelişmeler sonucu yeni keşfedilecek ajanlar nedeniyle oluşabilecek renal toksisite, ajanların gönül rahatlığıyla kullanılmasının önüne geçmektedir. Bu nedenle antioksidan özellikleri olan ajanların keşfedilmesi gerekmektedir. Son dönemlerde karaciğer koruyucu etkisi gösterilmiş olan silimarin bu konuda önemli bir umut ışığı olmuş gibi görünmektedir. Antioksidan özelliği bir çok çalışmada kanıtlanmış olan silimarinin bu çalışmada nefrotoksik etkisinin bulunup bulunmadığının ratlar üzerinde yapılan serum ve histopatolojik örnek incelemeleriyle ortaya konması amaçlanmıştır. Bu sayede ileride yapılabilecek silimarin çalışmalarına yol gösterici olunması planlanmıştır.

Çalışmada 6'şar rattan oluşan iki grup oluşturulmuş ve grup 1 kontrol grubu, grup 2 silimarin grubu olarak belirlenmiştir. Grup 1'e yedi gün boyunca sabah akşam musluk suyu gavaj ile verilmiş, grup 2'ye ise yedi gün boyunca sabah akşam silimarin gavaj yoluyla verilmiştir. Sekizinci gün anestezi sonrası intrakardiyak kan alımı ile gerçekleştirilen ötenazi sonrası nefrektomi yapılmıştır. Serum örneklerinden Üre, kreatinin, Sistatin C, SOD, GPX, MDA, TAS ve TOS değerleri çalışılmış ve renal histopatolojik inceleme yapılmıştır.

Bakılan serum üre ve kreatinin değerleri arasında gruplar arası fark saptanmamıştır. Renal hasarın erken belirteci olarak bilinen Sistatin C değerlerinde de her iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Oksidatif hasarı önleyici etkileri gösterilmiş olan SOD ve GPX değerleri arasında iki grup arasında fark saptanmamıştır; ancak GPX düzeyi silimarin grubunda kontrol grubuna göre biraz daha yüksek bulunmuştur. Antioksidan kapasiteyi gösteren TAS değerleri arasında da gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Oksidatif stresi gösterdiği düşünülen MDA değerleri açısından anlamlı fark olmamasına rağmen silimarin grubunda MDA değeri daha düşük tespit edilmiştir. Oksidatif stresi yansıttığı düşünülen TOS değeri silimarin grubunda anlamlı olarak daha düşük ölçülmüş ve silimarinin esas olarak oksidan stresi azaltıcı yönde etkili olabileceği kanaatine varılmıştır. Diğer antioksidan ve oksidan parametre düzeylerinin anlamlı olmayışı ortamda yeteri kadar stres yaratacak durumun olmamasına bağlı olabilir. Silimarinin nefrotoksik olmadığı patoloji preparatlarında da gösterilmiştir. Bu bağlamda bu çalışma ilerde nefrotoksik etki oluşturacak ajanlarla beraber silimarin uygulamasının faydalı olabileceğini ve nefroproteksiyonda oksidan statusu azaltıcı özellikleri sebebiyle tedavi amaçlı olarak da kullanılabilecek bir ajan olarak akılda tutulması gerektiğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Hsu CY, McCulloch CE, Fan D, Ordone JD, Chertow GW et al. Community based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* 2007;72(2):208-212.
2. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(5):930-936.
3. Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med.* 2008;36(4 suppl):S146-S151.
4. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care.* 2006;10(3):R73.
5. Lopes JA and Jorge S. The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review *Clin Kidney J* (2013) 6: 8–14 doi: 10.1093/ckj/sfs160.
6. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl* 2012;2:8.
7. Rahman M, Shad F, Smith MC, Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2012 Oct 1;86(7):631-639.
8. Christensen PK, Hansen HP, Parving HH. Impaired autoregulation of GFR in hypertensive. *Kidney Int.* 1997 Nov;52(5):1369-74.
9. Clarkson MR, Giblin L, O'Connell FP, et al. Acute interstitial nephritis: clinical features and response to corticosteroid therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(11):2778-2783.
10. Bellomo R. The epidemiology of acute renal failure. 1975 versus 2005. *Curr Opin Crit Care.* 2006;12(6):557-560.
11. Kohli HS, Bhaskaran MC, Muthukumar T, et al. Treatment related acute renal failure in the elderly. A hospital based prospective study. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(2):212-217.
12. Schetz M, Dasta J, Goldstein S, Golper T. Drug induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2005;11(6). 555-565.
13. Zenger RA. Pathogenic mechanisms in nephrotoxic acute renal failure. *Semin Nephrol.* 1997;17(1):3-14.
14. Palmer BF. Renal Dysfunction complicating the treatment of hypertension. *N Engl J Med.* 2002;347(16):1256-1261.

15. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Immunosuppressant- induced nephropathy; pathophysiology, incidence and management. *Drug Saf.* 1999;21(6):471-478.
16. Perazella MA. Drug Induced nephropathy an update. *Expert Opin Drug Saf.* 2005;4(4):689-706.
17. Markowitz GS, Perazella MA. Drug Induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. *Clin Chim Acta.* 2005;351(1-2):31-47.
18. Coco TJ, Klasner AE. Drug Induced rhabdomyolysis. *Curr Opin Pediatr.* 2004;16(2):206-210.
19. Pisoni R, Ruggerenti P, Remuzzi G. Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management. *Drug Saf.* 2001;24(7):491-501.
20. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1993 Jul-Sep;18(3):289-97
21. Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin. s.l. *Altern Med Rev*, 2011 Sep, Cilt 16(3). 239-49.
22. Vogel G, et al., Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984. 73(3): p. 355-62.
23. Desplaces, A., et al., The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittelforschung*, 1975. 25(1): p. 89-96.
24. Hruby, K., et al., Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Hum Toxicol*, 1983. 2(2): p. 183-95.
25. Salmi H.A. and S. Sarna, Effect of silymarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver. A double-blind controlled study. *Scand J Gastroenterol*, 1982. 17(4): p. 517-21.
26. Ferenci, P., et al., Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol*, 1989. 9(1): p. 105-13.
27. Halim, A.B., et al., Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann Clin Biochem*, 1997. 34 (Pt 6): p. 656-63.
28. Sonnenbichler, J., et al., Stimulatory effect of Silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: non-response in hepatoma and other malign cell lines. *Biochem Pharmacol*, 1986. 35(3): p. 538-41.
29. Boigk, G., et al., Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology*, 1997. 26(3): p. 643-9

- 30 . Baer-Dubowska, W., H. Szafer, and V. Krajka-Kuzniak, Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 1998. 28(8): p. 735-43.
- 31 . Feher J., et al., [Liver-protective action of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases]. *Orv Hetil*, 1989. 130(51): p. 2723-7.
- 32 . Lang I., et al., Hepatoprotective and immunological effects of antioxidant drugs. *Tokai J Exp Clin Med*, 1990. 15(2-3): p. 123-7.
- 33 . Raschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest* 2002; 22: 51-65.
- 34 . Mansour H.H., Hafez H.F., Fahmy N. M.Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. s.l. : *J Biochem Mol Biol.* , 2006 Nov 30;. 39(6):656-61
- 35 . Wu JW, Lin LC, Hung SC, et al. Hepatobiliary excretion of silibinin in normal and liver cirrhotic rats. *Drug Metab Dispos* 2008;36:589-596.
- 36 . Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA. Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 51-63.
- 37 . Pepping J. Milk thistle: *Silybum marianum*. *Am. J. Health Syst Pharm* 1999; 56: 1195-7.
- 38 . Keirstead ND, Wagoner MP, Bentley P, Blais M, et al. Early Prediction of Polymyxin-Induced Nephrotoxicity With Next-Generation Urinary Kidney Injury Biomarkers *toxicological sciences* November 4, 2013 doi:10.1093/toxsci/kft247
39. Kunter MIS, Niemadim BC, Davidson DLW. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins plasma and cerebrospinal fluids from multiple sclerosis patients. *Neurochem Res.* 1985; 10 (12): 1645-52.
40. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):1115-22.
41. Ghilissi Z, Hakim A, Mnif H, Ayadi FM, Zeghal K, et al. Evaluation of colistin nephrotoxicity administered at different doses in the rat model. *Ren Fail.* 2013 Sep;35(8):1130-5. doi: 10.3109/0886022X.2013.815091. Epub 2013 Jul 23
42. Lameire N, Vanholder R, Van Biesen W, Benoit D. Acute kidney injury in critically ill cancer patients: an update. s.l. : *crit care*, 2016 Aug 2. 20(1):209. doi: 10.1186/s13054-016-1382-6..
43. Ghaznavi H, Mehrzadi S, Dormanesh B, Hosseini TSM, Vahedi Het all. Comparison of the Protective Effects of Melatonin and Silymarin Against

Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. s.l. J Evid Based Complementary Altern Med., 2015 Dec 23. pii: 2156587215621672. [Epub ahead of print].

44. Iftkhar A, Hasan IJ, Sarfraz M, Jafri L, Ashraf MA. Nephroprotective Effect of the Leaves of Aloe barbadensis (Aloe Vera) against Toxicity Induced by Diclofenac Sodium in Albino Rabbits. s.l. : West Indian Med J., 2016 Apr 18. pii: wimj.2016.052. doi: 10.7727/wimj.2016.052.

45. Sancak EB, Akbas A, Silan C, Cakir DU, Turkon H, Ozkanli SS. Protective effect of syringic acid on kidney ischemia-reperfusion injury. s.l. : Ren Fail. 2016;38(4):629-35, 2016 Feb 26. 38(4):629-35.

46 . Kelle I, Akkoc H, Tunik S, ergiz Y, Erdinc M, et all. Protective effects of ethyl pyruvate in cisplatin-induced nephrotoxicity.. s.l. : Biotechnol Biotechnol Equip, 2014 Jul 4, Cilt 28(4):674-680.

47. Ergin M, Dundar ZD, Kilinc I, Colak T, Oltulu P, et all. Alpha-Amanitin Poisoning, Nephrotoxicity and Oxidative Stress: An Experimental Mouse Model. s.l. : Iran Red Crescent Med J, 2015 Aug 25, Cilt 17(8):. e28068

48. Tan J, Hu J, He Y, Cui F, Protective role of silymarin in a mouse model of renal Ischemia-Reperfusion injury, 2015 Oct 31;10:198.

8. ÖZET

Akut böbrek hasarı, böbrek fonksiyonlarının saatler ya da günler içinde bozulması sonucu ortaya çıkan üre ve kreatinin gibi nitrojen artı ürünlerinin birikmesi, sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesinin bozulması ile seyreden klinik bir sendromdur. ABH prerenal, renal ve postrenal olarak üç gruba ayrılır. Renal ABH'nın yaklaşık %85'lik kısmını akut tübüler nekroz (ATN) oluşturur. ATN iskemi ya da nefrotoksin maruziyeti sonucu oluşur. Nefrotoksisite şu an klinikte kullanılan ve geliştirilmekte olan ilaçların kullanımını sınırlamaktadır. Bu yüzden nefrotoksisiteyi önleyici ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Silimarin deve dikeninden elde edilen antioksidan özellikleri olan bir üründür. Hepatoprotektif etkileri bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu rat çalışmasında silimarinin renal toksisitesinin olmadığını renal fonksiyonlar ve histopatoloji ile gösterilmesi hedeflendi. Sprague dawley ratlar altışar rattan oluşan iki gruba ayrıldı. Ratlar çevresel olarak kontrollü ortamda barındırıldı. Grup I'e (kontrol) günde iki kere 0,4 cc musluk suyu gavajla verildi. Grup II'e (silimarin) günlük tartılarına göre 100 mg/kg iki bölünmüş dozda silimarin yedi gün verildi. Sekizinci gün anestezi sonrası intrakardiyak kan alımı ve nefrektomi yapıldı. Serum örneklerinde üre, kreatinin, , Sistatin C, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), malondialdehit(MDA), total antioksidan kapasitesi(TAS) ve total oksidan kapasitesi (TOS) çalışıldı ve histopatolojik inceleme yapıldı. İki grup arasında üre, kreatinin, sistatin C, GPX, MDA, SOD ve TAS değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) fakat TOS değeri silimarin grubunda anlamlı olarak düşük saptandı ($p=0,01$). Histopatolojik olarak gruplarda glomerül ya da tübül hasarı izlenmedi. Bu bulgular silimarinin nefrotoksisitesinin olmadığını bilakis oksidan status üzerine olumlu etkileriyle renoprotektif olabileceğini düşündürdü.

Anahtar kelimeler: silimarin, akut böbrek hasarı, nefrotoksisite

9. SUMMARY

Acute kidney injury (AKI) is a clinical syndrome which is defined as a sudden decrease in kidney function, resulting in an inability to maintain acid base, fluid and electrolyte balance and to excrete nitrogenous wastes. AKI is divided into three groups; prerenal, renal and postrenal causes. Acute tubular necrosis (ATN) accounts approximately 85% of renal causes. ATN results from ischemia and nephrotoxin exposure. Nephrotoxicity limits the use of the drugs which are currently being used and which are developing. Due to we need some agents to prevent nephrotoxicity. Silymarin is a product obtained from milk thistle has antioxidant properties. Hepatoprotective effect has been shown in many studies. In this study, it is aimed to evaluate silymarin effects on kidney function and the findings of kidney histology. Sprague Dawley rats were divided into two groups consisting of six rats. Rats were kept in controlled environment. Group I (control) were given 0,4 cc oral water, group II (silymarin) were given 100 mg/kg silymarin orally in two divided doses. Silymarin were given seven days according to daily weights. On the eighth day after anesthesia, intracardiac blood collection and nephrectomy was performed. In serum samples urea, creatinine, Cystatin C, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), malondialdehyde (MDA), total antioxidant status (TAS) and total oxidant capacity (TOS) were studied and histopathologic examinations were performed. There was no significant difference between two groups in terms of urea, creatinine, Cystatin C, SOD, GPX, MDA and TAS ($p > 0,05$) but TOS values were significantly lower in silymarin group ($p = 0.01$). There were no tubular and glomerular damage in all two groups. These findings demonstrate that silymarin is not a nephrotoxic drug and also has potential renoprotective effect related to possible effect on oxidant status.

Key words: silymarin, acute kidney injury, nephrotoxicity.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: BURAK

Soyadı: DUMLUDAĞ

Doğum Yeri ve Tarihi: ERZURUM 26/03/1985

Eğitimi: GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ERZURUM ANADOLU LİSESİ

ERZURUM ŞAİR NEFİ ORTA OKULU

ERZURUM CEMAL GÜRSEL İLK OKULU

Yabancı Dili: İNGİLİZCE

Üye Oldugu Bilimsel Kuruluşlar: TİHUDUM (TÜRK İÇ HASTALIKLARI
UZMANLIK DERNEĞİ)

Bilimsel Etkinlikleri:

Posterler;

“Ollier hastalığı olan bir olguda pituiter kondrosarkom olgusu”, 16.ulusal iç
hastalıkları kongresi, antalya, 2014

mehmet muhittin yalçın, burcu bilaloğlu, emre arslan, burak dumludağ, alev altınova, müjde aktürk, füsün baloş toruner, metin arslan

“Graves hastalığına eşlik eden , plazmaferez tedavisi sonrası opere edilen metastatik papiller kanser vakası”

mehmet muhittin yalçın, burak dumludağ, ıslay kalan, emre arslan, alev altınova, murat akın, müjde aktürk, füsün baloş toruner, nuri çakır

Bilimsel toplantılar:

9. Gazi İç Hastalıkları Günleri, “Vaka Sunumları ile Güncelleme” 2013
10. Gazi İç Hastalıkları Günleri “Klinik Güncelleme” 2014
17. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Antalya 2015
11. Hipofiz Sempozyumu ve Hipofiz Görüntüleme Kursu Ankara 2015