



Silimarin Endoplazmik Retikulum Stresi Oluşturulmuş Farelerde Böbrek Hacimlerini Koruyucu Bir Etkiye Sahiptir Silymarin Has a Protective Effect on Kidney Volumes in Mice with Endoplasmic Reticulum Stress

¹Hakan Ay, ²Hikmet Çağan Şahintürk, ²Emre Kadir Simin, ²Moudjibou Boukari

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 1. Sınıf Öğrencileri, Eskişehir, Türkiye

Özet: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığının bireylerde görülme oranı %11-46 arasındadır. Silimarin; Silybum marianum adlı bitkinin tohumundan elde edilen bir flavanoid kompleksidir. Karaciğeri akut ve kronik toksite ve zedelenmeye karşı koruduğu düşünülen güçlü antioksidan etkisi olan bir maddedir. Biz de çalışmamızda farelere fruktozlu su vererek ER (endoplazmik retikulum) stresi oluşturup silimarinin ER stresine etkisini böbrekler üzerinde Cavalieri hacim ölçme metodu ile incelemeyi amaçladık. 42 adet swiss albino cinsi 6-8 haftalık fareler 6 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna 70 gün boyunca standart yem ve içme suyu verilmiştir. Fruktoz grubunun içme suyu 70 gün boyunca %30' luk fruktoz çözeltisi konmuştur. Silimarin 100 Grubu standart yem ve içme suyu ile beslendikten sonra 70. günün sonunda 100 mg/kg silimarin, 10 gün boyunca her gün gavaj yoluyla verilmiştir. Silimarin 100 + fruktoz grubu 70 gün boyunca standart yem ve %30' luk fruktozlu su ile beslenip 70. günün sonunda 100 mg/kg silimarin, 10 gün boyunca her gün gavaj yoluyla verilmiştir. Silimarin 200 grubu standart yem ve içme suyu ile beslendikten sonra 70. günün sonunda 200 mg/kg silimarin, 10 gün boyunca her gün gavaj yoluyla verilmiştir. Silimarin 200 + fruktoz grubu 70 gün boyunca standart yem ve %30' luk fruktozlu su ile beslenip 70. günün sonunda 200 mg/kg silimarin, 10 gün boyunca her gün gavaj yoluyla verilmiştir. Deney süresi sonunda fareler anestezisi ile uyutulmuş ve sakri fiye edilmiştir. Farelerden alınan böbrekler hematoxylin-eozin ile boyandıktan sonra, hacimleri Cavalieri yöntemi ile hesaplanmıştır. Bulgularımız böbrek hacminin fruktoz grubunda en düşük, silimarin 100 grubunda ise en yüksek olduğunu gösterdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fruktoz verilen tüm grupların kontrolden daha düşük böbrek hacimlerine sahip oldukları görüldü. Silimarin 100 grubu kontrole göre böbrek hacmini önemli derecede arttıran iken silimarin 200 grubu ise kontrolden farksızdı. Fruktoz grubu ile kıyaslandığında fruktoz + silimarin 100 grubu böbrek hacmini önemli derecede arttırdı, ancak fruktoz + silimarin 200 önemli artış sağlamadı. Fruktoz + silimarin 100 grubu silimarin 100 grubu ile kıyaslandığında ise böbrek hacmi oldukça düşüktü. Benzer durum fruktoz + silimarin 200 ile silimarin 200 arasında da saptandı. Sonuçlarımız özellikle 100 mg/kg silimarinin alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı oluşturulmuş farelerde oluşan böbrek hasarını azalttığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: ER stresi, silimarin, böbrek, stereoloji.

Abstract: The incidence of non-alcoholic fatty liver disease in individuals is between 11-46%. Silymarin; is a flavonoid complex obtained from the seed of the plant named Silybum marianum. It is a substance with a strong antioxidant effect, which is thought to protect the liver against acute and chronic toxicity and injury. In our study, we aimed to investigate the effect of silymarin on ER stress by giving fructose water to mice and to examine the effect of silymarin on the kidneys by the Cavalieri volume measurement method. 42 swiss albino genus 6-8-week-old mice were divided into 6 groups. The control group was given standard feed and drinking water for 70 days. A 30% fructose solution was added to the drinking water of the fructose group for 70 days. After feeding the silymarin 100 group with standard feed and drinking water, at the end of the 70th day, 100 mg/kg silymarin was given by gavage every day for 10 days. Silymarin 100 + fructose group was fed with standard feed and 30% fructose water for 70 days and at the end of the 70th day, 100 mg/kg silymarin was given by gavage every day for 10 days. After feeding the silymarin 200 group with standard feed and drinking water, 200 mg/kg silymarin was given by gavage every day for 10 days at the end of the 70th day. Silymarin 200 + fructose group was fed with standard feed and 30% fructose water for 70 days and at the end of the 70th day, 200 mg/kg silymarin was given by gavage every day for 10 days. At the end of the experimental period, the mice will be anesthetized and sacrificed. After the kidneys of mice were stained with hematoxylin-eosin, their volumes were calculated by the Cavalieri method. Our findings showed that kidney volume was the lowest in the fructose group and the highest in the silymarin 100 group. Compared with the control group, all groups that received fructose were found to have lower kidney volumes than the controls. While the silymarin 100 group significantly increased kidney volume compared to the controls, the silymarin 200 group was no different from the control group. Compared to the fructose group, the fructose + silymarin 100 groups significantly increased kidney volume, but fructose + silymarin 200 did not achieve a significant increase. The fructose + silymarin 100 group compared with the silymarin 100 groups had a very low kidney volume. A similar situation was found between fructose + silymarin 200 and silymarin 200. Our results have shown that 100 mg/kg silymarin reduces kidney damage in mice with non-alcoholic fatty liver disease.

Keywords: ER stress, silymarin, kidney, stereology.

Received 16.10.2019

Accepted 11.06.2020

Online published 10.07.2020

ORCID ID of the authors: H.A0000-0003-4638-0750, H.ÇŞ0000-0002-8095-1994, E.K.S, M.B

Ay H, Şahintürk HÇ, Simin EK, Boukari M, Silimarin Endoplazmik Retikulum Stresi Oluşturulmuş Farelerde Böbrek Hacimlerini Koruyucu Bir Etkiye Sahiptir. *Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi*, 2020;2(2):97-100

Yazışma Adresi: Hakan AY Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
mail: hakanay73@gmail.com

1. Giriş

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (AOYKH), bireylerde belirgin alkol tüketimi olmaksızın (<20 g/gün) basit yağlanmadan ileri evre fibrozis ve siroza kadar olan karaciğer hasarının histolojik spektrumunu ifade eder (1). AOYKH görülme oranı %11-46 arasındadır.

Silimarin; *Silybum marianum* adlı deve diken bitkisinin tohumundan elde edilen flavanoid kompleksidir. Karaciğeri akut ve kronik toksite ve zedelenmeye karşı koruyan ve güçlü antioksidan etkisi olan bir maddedir. Aynı zamanda diyetle indüklenmiş karaciğer hasarını azalttığı da gösterilmiştir (2).

Yüksek karbonhidratlı (fruktoz ağırlıklı) beslenme, lipit birikimi ve endoplazmik retikulum (ER) stresi için majör beslenme türüdür (3). Biz de çalışmamızda farelere fruktozlu su vererek ER stres oluşturup silimarinin ER stresine etkisini böbrekler üzerinde Cavalieri hacim ölçme metodu ile incelemeyi amaçladık.

2. Gereç ve Yöntem

1. Deney protokolü

Bu çalışmada 42 adet Swiss albino cinsi (6-8 haftalık) erkek fare kullanılmıştır. Hayvanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda anabilim dalımız hayvan laboratuvarında uygun kafesler içinde barındırılmıştır. Tüm gruplarda yem olarak standart kemirgen yemi kullanılmıştır.

Deney hayvanları aşağıda gösterildiği üzere 6 gruba ayrılacaktır.

Kontrol grubu (n=7) (K)

70 gün boyunca fareler standart yem ve içme suyu ile beslenmişlerdir.

Fruktoz grubu (n=7) (F)

Bu gruptaki fareler, %30'luk fruktoz çözeltisini 70 gün boyunca içme suyunda serbestçe tüketmişlerdir.

Silimarin 100 grubu (n=7) (S100)

Bu gruptaki fareler 70 gün boyunca standart yem ve içme suyu (fruktoz içermeyen) ile beslenmişlerdir. 70 günün sonunda 100 mg/kg (serum fizyolojik içerisinde çözündürülen) silimarin 10 gün boyunca her gün, günde bir kez olmak üzere gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Silimarin 100 + fruktoz grubu (n=7) (FS100)

Bu gruptaki fareler 70 gün boyunca standart yem ve %30'luk fruktoz çözeltisi içeren içme suyu ile beslenmişlerdir. 70 günün sonunda 100 mg/kg silimarin 10 gün boyunca her gün, günde bir kez olmak üzere gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Silimarin 200 grubu (n=7) (S200)

Bu gruptaki fareler 70 gün boyunca standart yem ve %30'luk fruktoz çözeltisi içeren içme suyu ile beslenmişlerdir. 70 günün sonunda 200 mg/kg silimarin 10 gün boyunca her gün, günde bir kez olmak üzere gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Silimarin 200 + fruktoz grubu (n=7) (FS200)

Bu gruptaki fareler 70 gün boyunca standart yem ve içme suyu (fruktoz içermeyen) ile beslenmişlerdir. 70 günün sonunda 200 mg/kg (serum fizyolojik içerisinde çözündürülen) silimarin 10 gün boyunca her gün, günde bir kez olmak üzere gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Ticari olarak satın alınan toz fruktoz çeşme suyunda %30'luk çözeltisi hazırlanarak (100 ml çeşme suyunda 30 g fruktoz çözündürülerek) suluklara konulmuştur. 2., 4. ve 6. grupta bulunan fareler serbestçe ve 70 gün boyunca bu solüsyondan içebilmişlerdir.

Deney süresi sonunda fareler ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (6 mg/kg) anestezisi altında uyutulacak ve sakrifiye edilmiştir. Farelerden alınan böbrekler parafin bloklar içerisinde gömülerek, hematoksilen-eozin ile boyandıktan sonra, hacimleri Cavalieri yöntemi ile hesaplanmıştır (4).

Bu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (25.01.2018/646).

2. İstatistik

Gruplar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel fark olarak kabul edilmiştir.

Tablo 1. Fare grupları ve yapılan uygulamalar.

GRUPLAR (n=7)	1-70. GÜNLER	71-80. GÜNLER
Kontrol (K)	standart yem ve içme suyu	
Fruktoz (F)	%30'luk fruktoz çözeltisi	
Silimarin 100 (S100)	standart yem ve içme suyu	100 mg/kg/gün silimarin gavaj yoluyla
Fruktoz + Silimarin 100 (FS100)	standart yem ve %30'luk fruktoz çözeltisi	100 mg/kg/gün silimarin gavaj yoluyla
Silimarin 200 (S200)	standart yem ve içme suyu	200 mg/kg/gün silimarin gavaj yoluyla
Fruktoz + Silimarin 200 (FS200)	standart yem ve %30'luk fruktoz çözeltisi	200 mg/kg/gün silimarin gavaj yoluyla

3. Bulgular

Böbrek hacimlerinin gruplara göre karşılaştırması şekil 1'de görülmektedir. Buna göre, böbrek hacminin F grubunda en düşük, S100 grubunda ise en yüksek olduğu gözlemlendi. K grubu ile karşılaştırıldığında fruktoz verilen tüm grupların (F, FS100 ve FS200) kontrolden daha düşük böbrek hacimlerine sahip oldukları görüldü (hepsi $p < 0.001$). S100 grubu kontrole göre böbrek

hacmini önemli derecede arttırdı (ken $p < 0.01$) S200 grubu ise kontrolden farksızdı. Fruktoz grubu ile kıyaslandığında FS100 grubu böbrek hacmini önemli derecede arttırdı ($p < 0.001$), ancak FS200 önemli bir artış sağlayamadı. FS100 grubu S100 grubu ile kıyaslandığında ise böbrek hacmi oldukça düşüktü ($p < 0.001$). Benzer durum FS200 ile S200 arasında da saptandı ($p < 0.001$).

Şekil 1. Fare gruplarına göre böbrek hacimlerinin karşılaştırılması (ortalama \pm standart hata).

Gruplar	K	F	FS100	FS200	S100	S200
Ort \pm Std hata (mm ³)	10,80 \pm 1,21	4,95 \pm 1,57	6,95 \pm 1,42	5,74 \pm 2,52	12,60 \pm 1,76	9,95 \pm 1,12

4. Tartışma

Çalışmamızda fruktozlu su vererek ER stres oluşturulmuştur ve bunun böbrek hacmini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. ER stres üzerine yapılan çalışmalar, ER stresin pankreastaki β - hücrelerinin fonksiyonlarının bozulmasına ve apoptosis'ine neden olduğunu dolayısıyla diabetes mellitus oluşumu ile ilgili olduğunu göstermiştir (6). Rafieian-Kopae ve Nasri yapmış oldukları çalışmada Metformin, silimarin ve renin-anjiyotensin sistem inhibitörleri veya anjiyotensin reseptör blokerlerinin kombinasyonunun, diyabetik nefropatinin ilerlemesini önlemek veya yavaşlatmak için katkı maddesi olduğunu ve böbrek koruyucu özelliğine sahip olduğunu

bildirmişlerdir (7). Çalışmamızın bulguları yukarıdaki makaleler ile uyumaktadır. ER stres böbrek hacmini artırırken. FS100 grubundaki silimarin katkısının böbrek hacmini ER strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmalar silimarinin böbrek üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. Dashti-Khavidaki ve arkadaşları silimarin'in ilaca bağlı böbrek hastalığına karşı önemli koruyucu veya iyileştirici etkiler gösterebileceği sonucuna varılmıştır (8). Yine diğer bir çalışma silimarin'in artan glutathion seviyelerine karşı koruyucu etki gösterdiği

sonucuna varmıştır (9). Bu konuda yapılmış bir derleme de ise yapılan in vitro çalışmalarda silimarinin böbreği parasetamol, sispilin, CCl₄ ve aflatoksin B1 den kaynaklanan oksidatif strese karşı koruduğundan bahsedilmiştir (10). Bu makaleler sonuçlarımızla paraleldir ve bulgularımız için olası açıklamalardır.

Silimarinin koruyucu etkisiyle beraber 200 mg/kg'ın ise koruyucu bir etkisi olmadığı görülmüştür. S200 ve FS200 grubu sonuçlarını bunu açıkça göstermektedir. Bu bulgular bize silimarinin terapötik dozunun 100 mg/kg'dan fazla olmadığını düşündürmektedir.

5. Sonuç

ER stres oluşturulan farelerde böbrek hacminin önemli derecede azaldığı, ER stres oluşumunu takip eden 10 günlük dönemde silimarinin 100 mg/kg/gün dozlarında verilmesinin ER stresin neden olduğu böbrek hacim küçülmesini engellediği ve silimarin 100 mg/kg dozunun böbrekler için terapötik bir doz olduğu görülmektedir. Silimarinin ER stresinin böbrek üzerindeki olumsuz etkilerini gidermeye yönelik etkilerini ortaya koymak için daha kapsamlı bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Almeda-Valdés, P., Cuevas-Ramos, D., & Aguilar-Salinas, C. A. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 2009;8:18-24.
2. Salvado, L., Palomer, X., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015;26:438-48.
3. Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S., Bergheim, I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 2009;50:1094-104.
4. Habib Khoshvakhti, K. Kübra Yurt, B. Zuhul Altunkaynak, Aysin P. Türkmen, Ebru Elibol, Işimsu Aydın, Elfide G. Kıvrak, M. Emin Önger & Süleyman Kaplan Effects of melatonin on diclofenac sodium treated rat kidney: a stereological and histopathological study, *Renal Failure*, 2015;37:8,1379-83.
5. Zaulet, M., Kevorkian, S. E. M., Dinescu S., Cotoraci C., Suci M., Herman H., Buburuzan L., Badulescu L., Ardelean A., Hermenean A. Protective effects of silimarin against bisphenol A-induced hepatotoxicity in mouse liver. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017;13:821-8.
6. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:399-425.
7. Rafieian-Kopaie M, Nasri H. Silymarin and diabetic nephropathy. *J Renal Inj Prev*. 2012; 1:3-5.
8. Dashti-Khavidaki S, Shahbazi F, Khalili H, Lessan-Pezeshki M. Potential renoprotective effects of silymarin against nephrotoxic drugs: a review of literature. *J Pharm Pharm Sci*. 2012;15:112-23.
9. Ahmed MA, Tayawi HM, Ibrahim MK. Protective effect of Silymarin against kidney injury induced by carbon tetrachloride in male rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 33: 127-30.
10. Nasri H. Silymarin and its properties; a nephrology viewpoint. *J Renal Endocrinol*. 2015;1: e09