Özgün Araştırma / *Original Article*

Bezmialem Science 2016; 2: 43-50
DOI: 10.14235/bs.2016.682

Farelerde Yüksek Doz İsotretinoin Uygulamasının Yol Açtığı Kalp Dokusu Hasarına Karşı Silymarinin Olası Etkilerinin Araştırılması

Protective Effects of Silymarin against Cardiac Tissue Injury Caused By a High-dose Administration of Isotretinoin in Mice

Meltem KUMAŞ[1], Mukaddes EŞREFOĞLU[2], Ömer Faruk ÖZER[3]

[1]Programme Medical Laboratory Techniques, Bezmialem University Vocational Health High School, İstanbul, Turkey
[2]Division of Basic Medical Sciences, Department of Histology and Embryology, Bezmialem Vakıf University School of Medicine, İstanbul, Turkey
[3]Division of Basic Medical Sciences, Department of Medical Biochemistry, Bezmialem Vakıf University School of Medicine, İstanbul, Turkey

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda yüksek doz isotretinoin uygulamasının neden olduğu kalp dokusu hasarına karşı silymarinin koruyucu etkisinin histopatolojik ve biyokimyasal açıdan incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda 32 adet Balb/c cinsi erkek fare kontrol, isotretinoin (ISR), silymarin (SLY) ve tedavi grubu (ISR+SLY) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Histolojik analizler için kesitler Hematoksilen-Eozin ve Masson trikrom ile boyandı. Skorlamaları ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Apopitotik hücrelerin değerlendirilmesinde TUNEL Floresan tekniğinden yararlanıldı. Oksidatif stres parametreleri olan serum katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Red), glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri ve lipit peroksidasyon göstergesi olan eritrosit malondialdehit (E-MDA) ve plazma malondialdehit (P-MDA) seviyeleri biyokimyasal olarak ölçüldü. Tüm istatistiki analizler SPSS 18.00 (IBM, New York, USA) ile yapılırken, bar grafikleri GraphPad Prism Version 6.01 (USA) programı ile hazırlandı. İstatistiki karşılaştırılmalarda parametrik testlerden t-testinden yararlanıldı. Önem seviyeleri p≤0,05 olarak alındı.

Bulgular: Isotretinoin grubunda kalp dokusunda kanama, nekroz, ödem ve konjesyon gibi şiddetli patolojik hasar görülürken, tedavi grubunda SLY uygulamasının bu hasarı önleyici bir etki göstermediği gözlendi (p>0,05). ISR grubunda oldukça yüksek olan apopitozisin SLY uygulamasından sonra önemli derecede azaldığı görüldü (p≤0,05). CAT, SOD, GSH-Px, GSH-Red, GSH, GST seviyelerinin tedavi grubunda (ISR+SLY) önemli derecede arttığı görüldü (p=0,015, p>0,05, p=0,002, p=0,002, p=0,018, p=0,002; sırasıyla). En yüksek E-MDA ve P-MDA seviyelerine ISR grubunda rastlanırken, SLY'in E-MDA (p=0,003) ve P-MDA (p=0,005) seviyelerini düşürdüğü görüldü.

Sonuç: Silymarinin isotretinoinin neden olduğu kalp dokusu hasarına karşı antioksidan enzim seviyelerini arttırıp, lipit peroksidasyonunu düşürerek antioksidan etki gösterdiği ve anti apopitotik etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Isotretinoin, silymarin, kalp, oksidatif stres, apopitoz, histopatoloji

ABSTRACT

Objective: We aimed to histopathologically and biochemically investigate the protective effects of silymarin (SLY) against cardiac injury induced by a high-dose isotretinoin (ISR) administration.

Methods: Thirty-two male Balb/c mice were divided into four groups: control, ISR, SLY, and co-treated (ISR+SLY) groups. For the histopathological analysis, all sections were stained with hematoxylin–eosin and Masson's trichrome. The TUNEL detection kit was used for the detection of cardiac apoptosis. The oxidative stress markers, which included catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), and glutathione reductase (GSH-red), and the glutathione S-transferase (GST) and lipid peroxidation markers, which included erythrocyte malondialdehyde (E-MDA) and plasma malondialdehyde (P-MDA), were biochemically determined. All statistical analyses were conducted with SPSS 18.0 (IBM, New York, USA) and GraphPad Prism Version 6.01 (USA). The Student's t-test was applied to the parametric data for comprising among groups. The P-significance degree was evaluated as 95%.

Results: Severe histopathological alterations were observed in cardiac tissue. The ISR group showed hemorrhage, necrosis, edema, and congestion in cardiac tissues. SLY did not improve ISR-induced histopathological changes (p>0.05). The highest number of apoptotic cells was detected in the ISR group. In the ISR+SLY group, SLY treatment reduced apoptosis (p≤0.05). Antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, GSH-Px, GSH-Red, GSH, GST) were induced in ISR+SLY group (p=0.015, p>0.05, p=0.002, p=0.002, p=0,018, p=0.002; respectively). E-MDA (p=0.003) and P-MDA (p=0.005) levels significantly increased in the ISR group and decreased in the SLY group.

Conclusion: SLY increased antioxidant enzyme activities, prevented lipid peroxidation, and decreased apoptosis. SLY was found to be an antioxidant against ISR-induced cardiac oxidative damage.

Keywords: Isotretinoin, silymarin, heart, oxidative stress, apoptosis, histopathology

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Meltem KUMAŞ; Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul, Türkiye E-mail: mkumas@bezmialem.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 03.09.2015
Kabul Tarihi / Accepted: 19.10.2015

©Telif Hakkı 2016 Bezmialem Vakif Üniversitesi - Makale metnine www.bezmialemscience.org web sayfasından ulaşılabilir.
©Copyright 2016 by Bezmialem Vakif University - Available online at www.bezmialemscience.org

Giriş

13 cis-retinoik asit olarak da bilinen isotretinoin (ISR) yağ bezlerinin proliferasyonunu, kıl foliküllerininin keratinizasyonunu ve inflamatuar sitokinlerin aktivitesini baskılayan bir A vitamini türevidir (1-4). Bu madde günümüzde akne vulgaris hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak uzun süre kullanımı sıklıkla karaciğer ve böbrek dokusunda bozukluklara neden olmaktadır. Toksik etkilerinin yanı sıra güçlü bir teratojenik ajandır (5). Ayrıca hastalarda orbitofrontal korteks aktivitesini düşürerek depresyona neden olduğu gösterilmiştir (3).

Embriyonik gelişim sırasında epikardiyumdan sentezlenen retinoik asit kardiyak miyositlerin gelişimi için gereklidir (6). Retinoik asidin bu dönemde normalden az veya fazla salınmasının kalbin anormal gelişimine ve kalp defektlerine neden olduğu gösterilmiştir (7). Ancak yüksek doz retinoik asit alımının kalp dokusu üzerinde patolojik ya da toksik bir etki oluşturduğunu gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Silymarin (SLY) deve dikeni (*Silybum marianum*) bitkisinin tohum ekstraktlarında yoğunlaşan flavonolignanlardandır (8). Güçlü bir antioksidan olan SLY'in lipit peroksidasyonunu önlediği, başlıca glutatyon olmak üzere antioksidan enzim seviyelerini veya aktivitelerini arttırarak oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir (9-13). Çeşitli çalışmalarda özellikle kalp, böbrek ve sinir sistemine ait organları koruyucu etkisinin bulunduğu gösterilen SLY'in kanserojenlerin aktivitesini azalttığı ve immün fonksiyonları düzenlediği rapor edilmiştir (14, 15).

Çalışmamızda, Balb-c farelere uygulanan yüksek doz ISR'nin kalp dokusunda oluşturacağı histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri ve bu değişiklikler üzerine SLY'in olası antioksidatif etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bildiğimiz kadarı ile çalışmamız bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışmadır.

Yöntemler

Deney planı

Çalışmamızda 32 adet Balb/c cinsi genç (3 aylık) erkek fare kullanıldı. 6 haftalık deney süresince tüm fareler normal pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Rastgele seçilen fareler her bir grupta 8'er adet olmak üzere kontrol, ISR, SLY, ISR+SLY gruplarına ayrıldı. ISR Alfa Aeser (J61666, Massachusetts, USA) firmasından, SLY ise (S0292) Sigma Aldrich, (Almanya) firmasından ticari olarak satın alındı.

Kontrol gruplarına deney süresince ISR ve SLY'nin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO)+serum fizyolojik (SF) 1:1 oranında uygulandı. ISR 0,1 ml DMSO+SF içerisinde çözdürülerek 40 mg/kg/gün dozunda, SLY ise 0,2 mL DMS+SF içerisinde çözdürülerek 200 mg/kg/gün olarak 6 hafta süresince oral gavaj yoluyla verildi. Silymarinin olası iyileştirici etkisinin belirlenmesi için ISR+SLY grubuna önce ISR, 4 saat sonra ise SLY belirtilen dozlarda uygulandı. Deneyin bitiminde 5 mg/kg ksilazin ve 80 mg/kg ketamin ile intraperitonal olarak uygulanan anestezi altında biyokimyasal analizler için kalpten kan örnekleri alındı. Bu işlemi takiben kalpleri çıkarılarak histopatolojik değerlendirme için işlemlere başlandı.

Çalışma yöntemleri Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 2013-237 no'lu kararıyla onaylanmıştır.

Histolojik işlemler

Çıkartılan kalp dokuları ikiye bölünerek %10'luk nötral tamponlanmış formaldehit içerisinde 1 hafta fikse edildi. Daha sonra yoğunlukları giderek artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Parafine gömülerek elde edilen bloklardan 4mm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-eozin ve Masson trikrom ile boyandı. Örnekler ışık mikroskobu (Nikon Eclipse i5 ışık mikroskobu; Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan) ile incelenerek değişiklikler skorlandı (Nikon NIS Elements version 4.0 görüntüleme analiz sistemi; Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan).

Histopatolojik olarak skorlama nekroz, kanama ve interselüler ödem dikkate alınarak yapıldı. Her bir veri için 0: Değişiklik yok; 1: Hafif değişiklik; 2: Orta derecede değişiklik; 3: Şiddetli değişiklik şeklinde değerlendirme yapıldı. Her bir örnek için toplam maksimum ortalama histopatolojik skor (OHS) değerleri 9 olarak değerlendirildi.

Apopitotik hücrelerin belirlenmesinde TUNEL (terminal deoxynnucleotidyl transferase-mediated dUTP-X nick end labelling assay, Roche- 11 684 795 910-kit) floresan boyama tekniği kullanıldı. Boyama yöntemi üretici firma tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Apopitotik hücre sayısı floresan mikroskop altında her bir kesitte X20 büyütmede rastgele seçilen 20 alanda TUNEL pozitif hücreler sayılıp grup ortalamaları hesaplanarak elde edildi.

Biyokimyasal işlemler

Örnek toplama ve hazırlama

Kan örnekleri heparinli tüplere kardiyak ponksiyon ile toplandı. Örneklerin plazma kısımları 1500 x g 'de 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan eritrosit süspansiyonu eşit hacimde %0,9 soğuk sodium klorür (NaCl) ile üç kez yıkandı. Örnekler, parametreler çalışılana kadar -20 C° de saklandı.

Hemoglobin (Hb) Ölçümü

Hemolizatlardaki eritrosit konsantrasyonu siyanomethemoglobin metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (16). Kan örnekleri (20 mL), hemoglobinin saptanması için 5 mL Drabkin solusyonu (%1 sodyum bikarbonat, %0,005 potasyum siyanid ve %0,02 potasyum ferrisiyanid) ile karıştırıldı. Hb standardı Sigma (St. Louis, MO, USA)'dan tedarik edildi.

Antioksidan Enzim Ölçümleri

Eritrosit hemolizatlarındaki Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi, 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolum klorür (INT)'nin indirgenme inhibisyon hızı (Ransod SD 125, Randox Lab.) aracılığıyla ölçüldü ve hemoglobin (Hb) U/g olarak belirtildi.

Tam kandaki Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi Paglia ve Valentine (17) tarafından belirtilmiş metodun modifiye hali ile ölçüldü. GSH-Px, hidroperoksit kümeni ile glutatyonun oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG) hızlı bir şekilde NADPH'ın NADP' ye oksidasyonu sonucunda indirgenmiş forma çevrilir. Absorbansdaki azalma 340 nm dalga boyunda ölçüldü (Ransel RS 505, Randox Lab.). GSH Redüktaz'ın aktivitesi spektrofotometrik yöntem ile 340 nm dalga boyunda ölçüldü (18). GSH Peroksidaz, GSH'ın GSSG' ye oksidasyonunu hidrojen peroksit vasıtasıyla katalizler. GSSG'nin dönüşüm hızı, GSH Redüktaz reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür (19). GSH Transferaz (GST) aktivitesi Habig ve ark. (20) tarafından belirtilen metod ile saptandı. Eritrosit hemolizatlarındaki indirgenmiş Glutatyon (GSH) seviyesi Beutler'in metodu (21) ile saptandı.

Katalaz (CAT), hidrojen peroksitin ayrışmasıyla meydana gelen oksijen hacminin ölçülmesi esasına dayanan prosedür ile 230 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri Hb U/g olarak ifade edildi. Tüm antioksidan enzim aktiviteleri multiplak okuyucuda (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo, USA) ölçüldü.

Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, kırmızı kan hücrelerinde Stocks ve ark. (22) ve plazma örneklerinde Ohkawa ve ark. (23) belirttiği metod ile ölçüldü. MDA ile tiobarbütirik asidin reaksiyonu sonucu pembe renk elde edilerek diğer aldehitler hesaplandı.

İstatistiksel analiz

Histopatolojik değişikliklerin ve apopitotik hücre sayılarının gruplar arasında karşılaştırılmasında parametrik testlerden t-testinden yararlanıldı. Önem seviyeleri p≤0,05 olarak alındı. Tüm istatistiki analizler SPSS 18.00 (IBM, New York, USA) programı ile yapılırken, bar grafikleri GraphPad Prism Version 6.01 (USA) programı ile hazırlandı.

Bulgular

Biyokimyasal analizler

Isotretioin grubunda GSH (p=0,013), GSH-Red (p=0,002), GST (p=0,002) seviyeleri ve GSH-Px (p=0,002), CAT (p=0,002) ve SOD (p=0,003) aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu görüldü. En yüksek antioksidan enzim seviyeleri SLY grubunda tespit edildi. ISR uygulamasının ardından SLY uygulamasının antioksidan enzim seviyesini önemli oranda arttırdığı belirlendi [GSH (p=0,018), GSH-Px (p=0,002), GSH-Red (p=0,002), GST (p=0,002), CAT (p=0.015), SOD (p>0,05)].

Isotretinoin grubunun ortalama E-MDA (p=0,004) ve P-MDA (p=0,004) değerleri kontrol grubuna göre yüksekti. SLY uygulamasının E-MDA (p=0,003) ve P-MDA (p=0,005) değerlerini dolayısı ile lipit peroksidasyonunu önemli derecede azalttığı görüldü.

Tüm biyokimyasal sonuçlar Tablo 1, Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

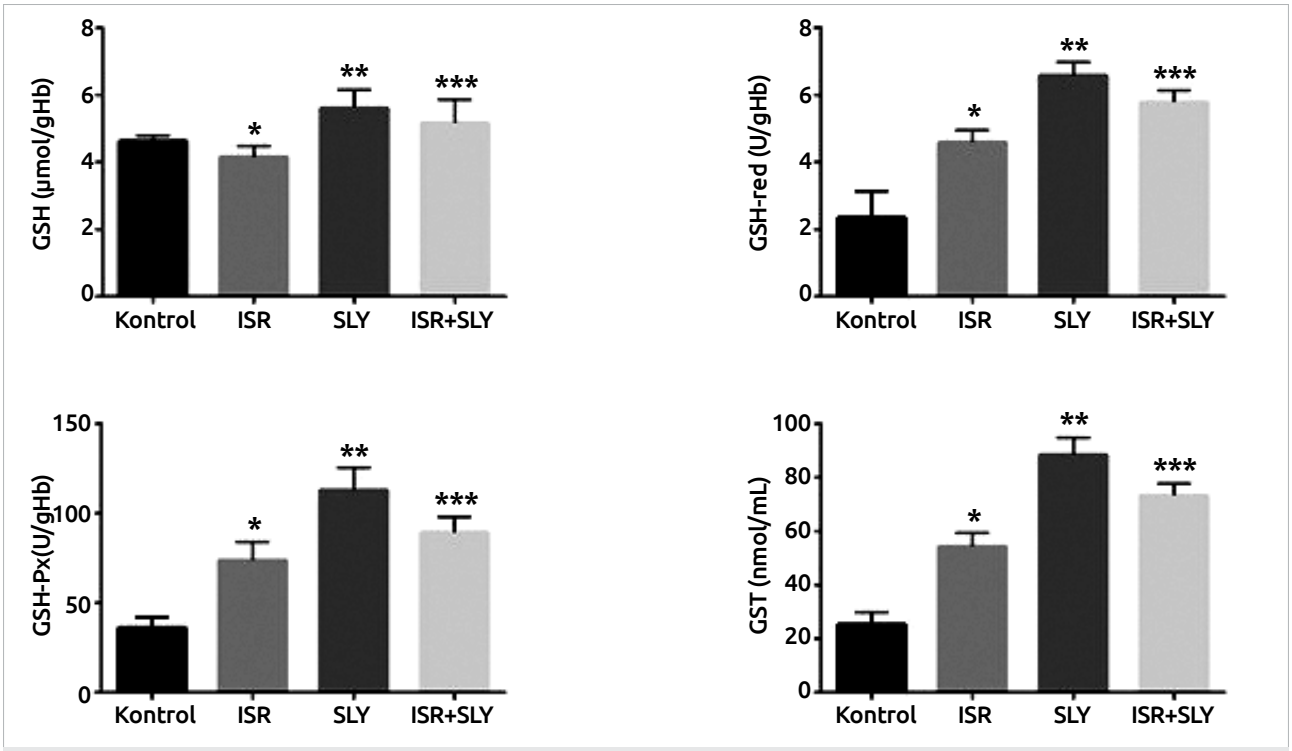
Tablo 1. Biyokimyasal analizlere ilişkin özet istatistik verileri

	Grup	Mean±SD	Minimum	Maksimum
CAT	Kontrol	289,14±63,11	212,00	374,00
	ISR	644,14±128,06	420,00	780,00
	SLY	1234,71±171,09	985,00	1462,00
	ISR+SLY	821,14±90,77	708,00	956,00
SOD	Kontrol	1229,00±166,03	1004,00	1535,00
	ISR	1693,29±148,02	1480,00	1909,00
	SLY	2073,00±173,82	1854,00	2401,00
	ISR+SLY	1761,57±183,63	1449,00	2017,00
E-MDA	Kontrol	305,87±54,17	208,40	381,20
	ISR	424,90±42,47	384,79	485,69
	SLY	235,40±27,88	196,00	272,70
	ISR+SLY	314,95±20,10	285,63	345,62
P-MDA	Kontrol	0,66±0,12	0,56	0,84
	ISR	0,97±0,11	0,78	1,10
	SLY	0,24±0,04	0,17	0,30
	ISR+SLY	0,69±0,10	0,58	0,84
GSH	Kontrol	4,62±0,17	4,34	4,88
	ISR	4,16±0,33	3,74	4,78
	SLY	5,78±0,33	5,33	6,12
	ISR+SLY	5,18±0,6	4,10	6,01
GSH-Red	Kontrol	2,35±0,79	1,70	4,08
	ISR	4,60±0,35	4,09	5,04
	SLY	6,59±0,40	5,92	7,03
	ISR+SLY	5,79±0,36	5,13	6,27
GSH-PX	Kontrol	36,18±6,01	30,01	44,65
	ISR	73,79±10,23	58,65	89,65
	SLY	113,02±12,49	99,77	135,77
	ISR+SLY	89,43±8,73	74,63	98,74
GST	Kontrol	25,36±4,53	18,96	31,47
	ISR	54,40±5,10	47,44	60,12
	SLY	88,43±6,46	82,11	99,16
	ISR+SLY	73,36±4,31	66,66	79,53

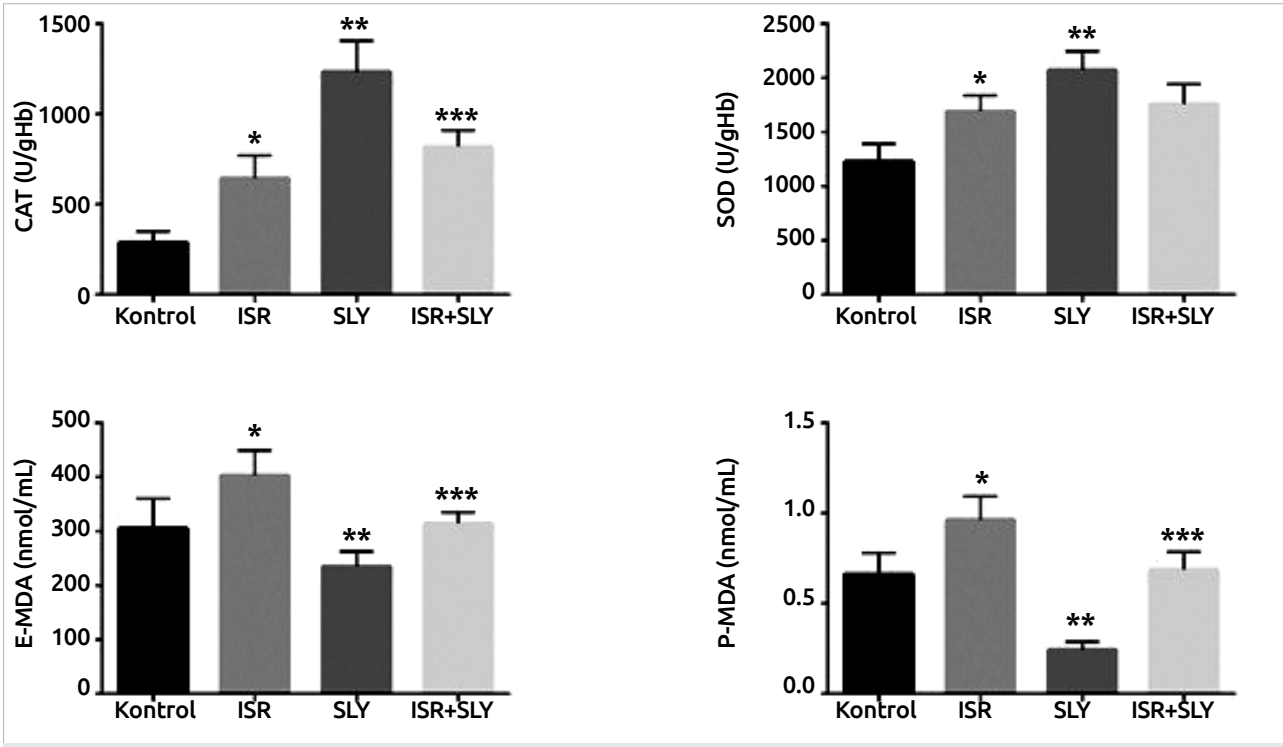
CAT: katalaz; SOD: superoksit dismutaz; E-MDA: eritroit malondialdehit; P-MDA: plazma malondialdehit; GSH: glutatyon; GSH-red: glutatyon redüktaz; GSH-Px: glutatyon peroksidaz; GST: glutatyon-S-transferaz; SD: standart sapma; ISR: isotretinoin grubu; SLY: silymarin grubu; ISR+SLY: isotretinoin ve silymarin grubu

Histopatolojik analizler

Kontrol grubunda kalbin tüm tabakalarının normal histolojik görünümde olduğu, kalp kası hücrelerinin de normal hücresel özelliklerini korudukları görüldü. Bu grupta herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Şekil 3a, b). SLY grubunda da genel olarak tüm tabakalar normal görünümdeydi. Kalp kası hücrelerinin mikroskobik özellikleri kontrol grubunda olduğu gibiydi (Şekil 4). Tek bir farede kas lifleri arasında çok az miktarda kanamaya rastlandı.

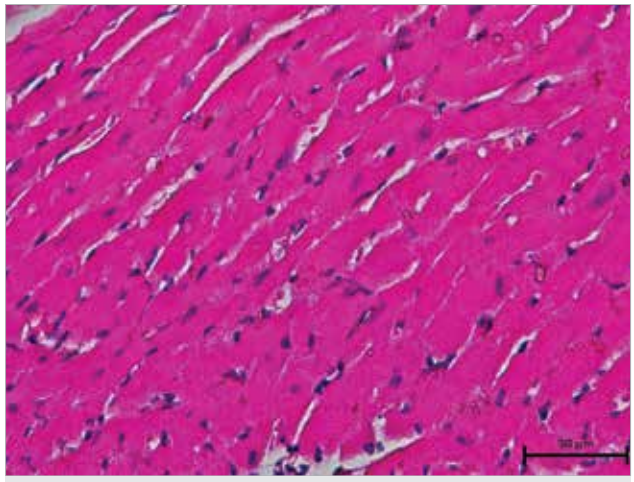


Resim 1. Ortalama GSH, GSH-Px, GSH-red ve GST seviyelerine ait bar grafikleri
***: ISR ile SLY grupları**
****: ISR ile ISR+SLY grupları arasındaki farklılığın önemli olduğunu göstermektedir, p≤0,05 için**

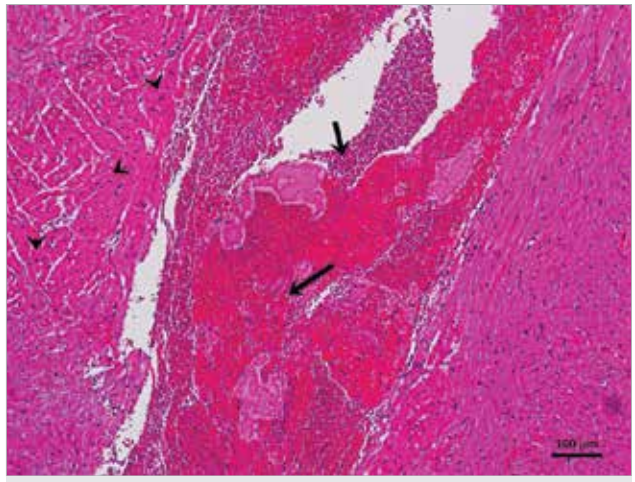


Resim 2. Ortalama CAT, SOD, E-MDA ve P-MDA seviyelerine ait bar grafikleri
***: ISR ile SLY grupları;**
****: ISR ile ISR+SLY grupları arasındaki farklılığın önemli olduğunu göstermektedir, p≤0,05 için**

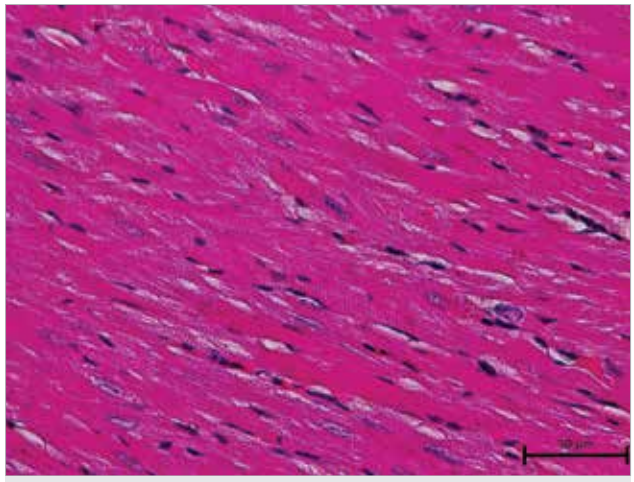
Isotretinoin gruplarının kalp dokularında nekroz, kanama ve intersellüler ödem oldukça belirgindi. Şiddetli ödem ve kanama nedeni ile kas liflerinin birbirlerinden oldukça uzaklaştığı izlendi (Şekil 5a, b, Şekil 6). Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile nekrotik hücrelerin sitoplazmalarının sağlıklı kalp kası hücrelerine oranla daha koyu asidofilik olduğu, nükleus-



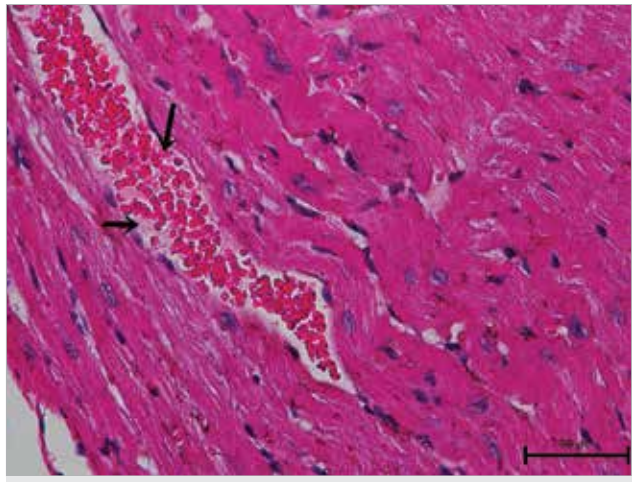
Resim 3. Kontrol grubunda kalp dokusunun normal histolojik görünümde olduğu görülmektedir (Hematoksilen-eozin boyama, X 40)



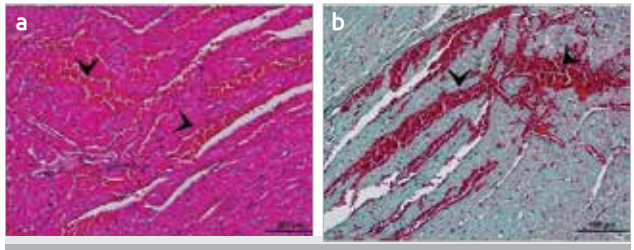
Resim 6. ISR grubunda kanama ve ödem alanları (oklar) ile nekrotik alanlar (ok başları) görülmektedir (Hematoksilen-eozin boyama, 10 X)



Resim 4. SLY grubunda kalp dokusunun histolojik yapısının normal görünüme sahip olduğu görülmektedir



Resim 7. ISR grubunda konjesyon (oklar) görülmektedir (Hematoksilen-eozin boyama, 40 X)



Resim 5. ISR grubunda yoğun kanama alanları ok başları ile gösterilmiştir. (a) Hematoksilen-eozin boyama (b) (Masson trikrom boyama, 20 X)

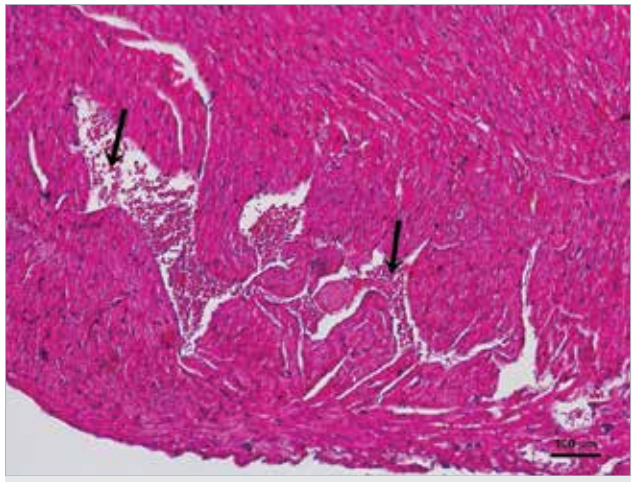
ların piknotik veya soluk boyandığı görüldü (Şekil 6). Ayrıca kesitlerde yaygın olmamakla birlikte yer yer konjesyona rastlandı (Şekil 7). Bu grubun OHS değeri kontrol grubuna oranla yüksekti (p=0,001).

Tedavi grubu olarak tasarlanan ISR+SLY grubunda ise elde edilen bulguların ISR grubundan farklılık göstermediği, bu grupla benzer olarak kanama ve nekroz alanlarının oldukça geniş alan kapladığı ve kas liflerinin birbirinden ayrıldığı görüldü (Şekil 8). Ortalama histopatolojik skorların her iki grupta da hemen hemen aynı olduğu belirlendi (Tablo 2). Yapılan genel skorlama sonuçları açısından ISR ve ISR+SLY grubunda fark görülmemesine rağmen, nekroz yoğunluğu açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p≤0,001) (Tablo 3).

TUNEL yöntemi ile saptanan ortalama apopitotik hücre sayısı kontrol grubunda 14,25±6,36, SLY grubunda 13,00±5,37, ISR grubunda 57,88±38,26, ISR+SLY grubunda ise 20,75±7,15 idi (Tablo 4). ISR'nin apopitozu indüklediği, SLY'nin ise tek başına veya ISR uygulamasından sonra apopitozu baskıladığı görüldü (p=0,017) (Şekil 9, 10).

Tartışma

Normal fizyolojik dozda (0,5 mg/kg) ISR uygulanmış sıçanlarda ISR'nin kalbin yeniden modellenmesini indüklediği (24), akne vulgaris tedavisi gören hastalarda ise kalbin fibrozi-



Resim 8. ISR+SLY grubunda kanama ve ödem alanları (oklar) görülmektedir (Hematoksilen-eozin boyama, 10 X)

Tablo 2. Histopatolojik skorlama verilerine ait özet istatistik verileri

Grup	Mean±SD	Minimum	Maksimum
Kontrol	1,25±0,46	1,00	2,00
ISR	5,25±1,28	3,00	7,00
SLY	2,13±1,13	1,00	4,00
ISR+SLY	5,63±1,60	3,00	7,00

SD: standart sapma; ISR: isotretinoin grubu; SLY: silymarin grubu; ISR+SLY: isotretinoin ve silymarin grubu

Tablo 3. Nekroz alanına ait özet istatistik verileri

Grup	Mean±SD	Minimum	Maksimum
Kontrol	0	0	0
ISR	983,4±421,9	375,2	2489,5
SLY	0	0	0
ISR+SLY	370,9±145,7	326,9	768,9

SD: standart sapma; ISR: isotretinoin grubu; SLY: silymarin grubu; ISR+SLY: isotretinoin ve silymarin grubu

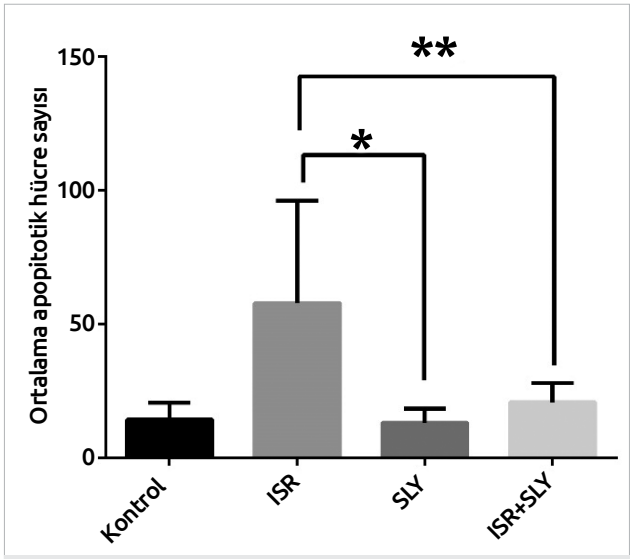
sini ve hipertrofisini önlediği gösterilmiştir (25). Çalışmamızda uzun süreli yüksek doz ISR uygulamasının kalp dokusunda oldukça şiddetli nekroz, intersellüler ödem konjesyon ve kanamaya neden olduğu görüldü. Nitekim bu grubun OHS, e-MDA ve p-MDA değerleri kontrol grubundan yüksekti (p=0,001, p=0,004, p=0,004; sırası ile). MDA, lipit peroksidayonun son ürünü olup, hücre membranlarının dolayısı ile hücre hasarının en önemli göstergelerinden biridir. Nitekim ISR uygulamasının ayrıca karaciğer ve böbrek dokularında da apopitotik ve nekrotik hücre ölümüne yol açtığını gösterdik (yayınlanmamış bulgu).

Silymarinin hücre membran direncini arttırarak toksik ajanların hücre içerisine girişini engellediği gösterilmiştir. Çalışma-

Tablo 4. Apopitotik hücre sayılarına ait özet istatistik verileri

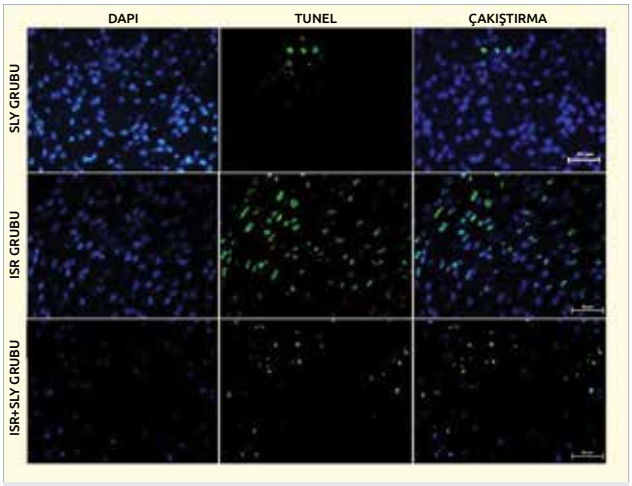
Grup	Mean±SD	Minimum	Maksimum
Kontrol	14,25±6,36	5,00	24,00
ISR	57,88±38,26	26,00	148,00
SLY	13,00±5,37	7,00	21,00
ISR+SLY	20,75±7,15	11,00	35,00

SD: standart sapma; ISR: isotretinoin grubu; SLY: silymarin grubu; ISR+SLY: isotretinoin ve silymarin grubu



Resim 9. Ortalama apopitotik hücre sayısını gösteren bar grafiği
***: ISR ile SLY grupları**
****: ISR ile ISR+SLY grupları arasındaki farklılığın önemli olduğunu göstermektedir, p≤0,05 için**

mızda SLY'nin ISR ile aşağı yukarı eş zamanlı verilmesi toksik etkinin engellenmesi açısından önemliydi. Yapılan birçok çalışmada SLY'in lipit peroksidasyonunu önlediği, glutatyon seviyelerini ve katalaz enzim aktivitelerini arttırarak antioksidan etki gösterdiği ortaya konmuştur (9-13, 15). Çalışmamızda önceki çalışmalara benzer şekilde SLY'nin antioksidan enzim seviyelerini arttırdığı, lipit peroksidasyonunu ise önlediği görüldü. Nitekim ISR+SLY grubunun tüm antioksidan seviyeleri ISR grubundan anlamlı derecelerde yüksekti. Aksine nekroz oranları ve e-MDA ve p-MDA seviyeleri ise anlamı derecelerde düşüktü (p≤0,001, p=0,003, p=0,005, sırasıyla). Ayrıca ISR grubunda oldukça yüksek olan apopitoz oranının SLY uygulaması ile önemli derecede düştüğü gözlendi (p=0,017). SLY'nin antioksidan etkilerinin yanı sıra anti apoptotik özelliği ile hücreleri DNA hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir (26). Bu veriler SLY'nin hücresel hasarı antioksidan enzim sistemini destekleyerek baskıladığını göstermektedir. Benzer bir çalışmada doxorubucin ile oluşturulmuş hafif derecelerdeki kalp dokusu hasarına karşı SLY'in koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (15). Çalışmamızın dikkati çeken bir sonucu ise SLY'nin intersellüler ödem, konjesyon ve kanamayı baskıla-



Resim 10. Apopitotik hücrelerin TUNEL boyama ile floresan mikroskobunda görünümü (Tüm nukleuslar DAPI ile mavi, pozitif apoptotik hücre nukleusları TUNEL boyası ile yeşil renkte boyanmıştır, 40 X)

madığı yönündeydi. Zaten günümüze kadar SLY'nin ödeme, kanamaya, konjesyona karşı etkili olduğu konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hücresel hasarı önlemesi, rejenerasyon gücü zayıf olan kalp dokusunun zarar gördüğü çeşitli durumların tedavisi için oldukça ümit vaat eden bir bulgudur. Yine de sonuçların daha da anlam kazanması açısından çalışmanın kalp dokusu lipit peroksidasyon ve antioksidan ajan ölçümleri yapılarak yenilenmesi önerilebilir.

Sonuç

Yapılan değerlendirmeler neticesinde yüksek doz isotretinoinin neden olduğu kalp dokusu hasarına karşı silymarinin plazma glutatyon enzim seviyeleri başta olmak üzere antioksidan etkiye sahip enzimlerin aktivitelerini arttırdığı, E-MDA ve P-MDA seviyelerini düşürerek lipit peroksidasyonunu azalttığı görüldü. Ayrıca isotretinoin neden olduğu apopitotik hücre ölümünü kısmen baskılayarak apopitozu düşürücü etki gösterdiği belirlendi. Sonuç olarak, silymarinin kalp dokusu üzerinde antioksidan ve anti apopitotik etkiye sahip olduğu kanaatine varıldı.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Hasta Onamı: N/A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.K., M.E.; Tasarım - M.K., M.E.; Denetleme - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Kaynaklar - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Malzemeler - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.K., M.E.; Analiz ve/veya Yorum - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Literatür Taraması - M.K.; Yazıyı Yazan - M.K., M.E.; Eleştirel İnceleme - M.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma 12.2013/9 nolu proje kapsamında Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from Bezmiâlem Vakıf University Ethics Committee of Experimantal Animal.

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.K., M.E.; Design - M.K., M.E.; Supervision - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Funding - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Materials - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Data Collection and/or Processing - M.K., M.E.; Analysis and/or Interpretation - M.K., M.E., Ö.F.Ö.; Literature Review - M.K.; Writing - M.K., M.E.; Critical Review - M.E.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This was supported by the Research Fund Accountancy of Bezmialem Vakif University, Istanbul/Turkey (Project number:12.2013/9).

Kaynaklar

1. Cunliffe WJ, van der Kerkhof PCM, Caputo R, Caicchini S, Cooper A, Fyrand OL, Gollnick H, et al. Roaccutane treatment guidelines: results of an international survey. Dermatology 1997; 194: 351-7. [CrossRef]
2. Goulden V, Layton AM, Cunliffe WJ. Current indications for isotretinoin as a treatment for acne vulgaris. Dermatology 1995; 190: 284-7. [CrossRef]
3. Bremner JD, Fani N, Ashraf A, Votaw JR, Brummer ME, Cummins T, et al. Functional brain imaging alterations in acne patients treated with isotretinoin. Am J Psychiatry 2005; 162: 983-91. [CrossRef]
4. Dispenza MC, Wolpert EB, Gilliland KL, Dai JP, Cong Z, Nelson AM, et al. Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients. J Invest Dermatol 2012; 132: 2198-205. [CrossRef]
5. Blommhorf, R. 1994. Vitamin A in health and disease, p.344.
6. Stuckmann I, Evans S, Lassr AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. Developmental Biology 2003; 255: 334-349. [CrossRef]
7. Sinning AR. Role of vitamin A in the formation of congenital heart defects. Anat Rec 1998; 253: 147-53. [CrossRef]
8. Tedesco D, Tava A, Galletti S, Tameni M, Varisco G, Costa A, et al. Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science 2004; 87: 2239-47. [CrossRef]
9. Mira L, Silva M, Manso CF. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. Biochemical Pharmacology 1994; 48: 753-9 [CrossRef]
10. Lettéron P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromenty B, Delaforge M, et al. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Biochemical Pharmacology 1990; 39: 2027-34. [CrossRef]
11. Wellington, K. and Harvis, B. Silymarin. A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. Biodrugs 2001; 15: 465-89. [CrossRef]
12. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favori L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan induced diabetes in rat pancreas. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology and Pharmacology 2003; 136: 205-12. [CrossRef]
13. Soto C, Perez J, Garcia V, Uria E., Vadillo, M., Raya L. 2010. Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan induced diabetes mellitus. Phytomedicine 17: 1090-4. [CrossRef]
14. Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin. In human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and assosiated cyclins. Clinical Cancer Research 1998; 4: 1055-64.
15. Raskovic A, Stilinovic N, Kolarovic J, Vasovic V, Vukmirovic S, Mikov M. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced car-

diotoxicity and hepatotoxicity in rats. Molecules 2011; 16: 8601-13. [CrossRef]
16. Drabkin DL. The standardization of hemoglobin measurement. American Journal of Medical Science 1949; 217: 710.
17. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-69.
18. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity in vivo and in vitro studies. Journal of Clinical Investigation 1969; 48: 1957-1966. [CrossRef]
19. Beutler E, (editor). Glutathione peroxidase, Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd ed. New York: Grune and Stratton, 1975; 71-3.
20. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 1974; 249: 7130-9.
21. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 1963; 61: 882-8.
22. Stocks J, Offerman EL, Modell CB, Dormandy TL. The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. British Journal of Hematology 1972; 23: 713-24. [CrossRef]
23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351-8. [CrossRef]
24. Lu L, Yao T, Zhu YZ, Huang GY, Cao YX, Zhu YC. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramiyocardial and intrarenal arteries in spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 2003; 285: 1370-7. [CrossRef]
25. Soriano EA, Azevedo PS, Miot HA, Minicucci MF, Pansani MC, Matsubara LS, et al. Cardiac remodeling induced by 13-cis retinoic acid treatment in acne patients. Int J Cardiol 2013; 163: 68-71. [CrossRef]
26. Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Faddah LM, Mohamed AM, Mohammad RA, Al-Amin M. Potantial impact of silymarin in combination with chlorogenic acid and/or melatonin in combating cardiomyopathy induced by carbon tetrachloride. Saudi J Biol Sci 2014; 21: 265-74. [CrossRef]