T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
İkinci Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ

DENEYSEL ARTRİT MODELİNDE SILYMARIN İLE TEDAVİNİN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Özlem ÜREK

Referans no: 10170739

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
İkinci Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ

DENEYSEL ARTRİT MODELİNDE SILYMARIN İLE TEDAVİNİN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Özlem ÜREK

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2014/57

Tez No:

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'nin danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Özlem ÜREK'e ait tez başlığı "Deneysel Artrit Modelinde Silimarin ile Tedavinin Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 21/11/2017 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL
JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Aydın BARLAS
ÜYE

Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamda değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ ve Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ, Prof. Dr. Ufuk USTA, Öğr. Gör. Dr. Oktay KAYA, Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU, Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN, Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ'a, emeği geçen arkadaşlarım ve aileme, maddi desteklerinden dolayı TÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **ROMATOİD ARTRİT** 3
- **SERBEST RADİKALLER** 11
- **ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ** 15
- **SİTOKİNLER** 19
- **SİLİMARİN** 21

GEREÇ VE YÖNTEMLER 26

BULGULAR 41

TARTIŞMA 66

SONUÇLAR 73

ÖZET 75

SUMMARY 77

KAYNAKLAR 79

ŞEKİLLER LİSTESİ 88

ÖZGEÇMİŞ 90

SİMGE VE KISALTMALAR

Anti-CCP : Anti-siklik sitrülin peptid
ARA : Amerikan Romatizma Derneği
α : Alfa
β : Beta
CAT : Katalaz
DİF : Distal interfalanjial
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA : Freund's complete adjuvant
GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GPx : Glutatyon peroksidaz
GST : Glutatyon S-transferaz
HE : Hematoksilen eozin
HLA : Human lökosit antijen
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
IL : İnterlökin
MDA : Malondialdehit
MKF : Metokarpofalanjial
MTF : Metatarsofalanjial
NADPH : Nikotinamid difosfat hidrojen

NSAİİ : Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç

NO : Nitrikoksit

NO_3^- : Peroksinitrit

O_2 : Oksijen

PAM : Pressure application measurement

PİF : Proksimal interfalanjial

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA : Tiyobarbitürik asit

TMB : Tetrametilbenzidin

TNF : Tümör nekroz faktör

GİRİŞ VE AMAÇ

Adjuvant artrit, hücresel immün yanıtla oluşması ve histopatolojik görünümlerinin benzerliği nedeniyle romatoid artrit modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (1-3). Böyle bir modelin oluşturulması sadece hastalığın patogenezini araştırmak için değil, pek çok antiinflamatuvar ve/ya da immünosupresif/immünomodülatör ilaçların özelliklerini araştırmak için de faydalıdır. Artrit multisistemik bir hastalık olup, inflamasyon ve oksidatif stresin primer rol oynadığı birçok deneysel hayvan çalışmasıyla gösterilmiştir (3-7).

Tıbbi bitkilerin bazı yararlı maddeler taşıdıkları bilinmekte ve bunlar çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılabilmek amacıyla araştırılmaktadırlar. Bunlardan bir kısmının vücuttaki rolleri saptanmışken, diğerleri henüz araştırma aşamasındadır. Silimarin; *Silybum marianum* bitkisinin meyvelerinden elde edilen silibin (silibinin), silidianin ve silikristin isomerlerinden oluşmuş flavoglikanların bir karışımıdır. Silimarin 30 yılı aşkın bir süredir, Avrupa'da klinik olarak alkolik karaciğer hastalığının tedavisinde anti-hepatotoksik ajan olarak kullanılmaktadır. Hepatoprotektif etkisinin; membran stabilizasyonu ve protein sentezini artırmasının yanında, antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir (8). İlaveten, silimarinin antiinflamatuvar (9,10) ve antitümör (11) etkilerini destekleyen deneysel çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmada sıçanlarda oluşturulan artrit modelinde silimarin ile tedavinin koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık. Sıçanlarda oluşturulan deneysel adjuvant artrit, romatoid artrit modeli olarak kabul edilmektedir.

Deneysel adjuvant artrit modelini oluşturmak daha kolay ve efektiftir. Sıçanlarda adjuvant artrit modeli ile yapılmış pek çok çalışma olduğundan deneylerimizde deney hayvanı olarak sıçan kullanmaya karar verdik. Deney hayvanlarında oluşturulan osteoartrit üzerine silimarinin etkisinin incelendiği birkaç çalışma olmasına rağmen (12,13), bu çalışmamız literatürde deneysel adjuvant artrit modelinde silimarin tedavisinin etkisinin incelendiği ilk çalışma olacaktır.

GENEL BİLGİLER

ROMATOİD ARTRİT

Romatoid artrit; etyolojisi belli olmayan, özellikle periferik sinovyal eklemleri tutan, sinovyal hücre proliferasyon ve inflamasyonunun eklemde dekstrüksiyon yapması ile karakterize, sistemik, inflamatuvar ve otoimmün bir hastalıktır (14-19). Hastalık sıklıkla deri, kan damarları, kalp, akciğer ve kaslar gibi birçok eklem dışı dokuyu da etkiler (18,20,21). Hastalık görülen eklemde hasar oluşturarak sakatlığa neden olurken, klinik seyri, hastadan hastaya büyük değişiklikler gösterir. Bazı hastalarda az sayıda, hafif seyirli ve kısa süreli eklem tutulmaları görülürken, bazılarında tedavi ne kadar yoğun olursa olsun, kısa sürede sakatlıklar ve önemli organ hasarları gelişebilmektedir (20,21). Romatoid artrit dünyada tüm ırklarda %1 sıklıkla her yaşta görülebilir. En sık görüldüğü yaşlar 40-60 yaş arasıdır. Hastalık kadınlarda erkeklerden 3 kat daha fazla görülür (20).

Etimoloji

Romatoid artrit ismi romatoid ve artrit kelimelerinden oluşur. Romatoid; Yunanca *rheumatos* yani "akan" ve –oid son eki yani "–şeklinde/–şekilde", *artrit* ise "eklem" anlamına gelen Yunanca –arthr ve "inflamasyon içeren durum" anlamına gelen –itis demektir. Böylece artrit "eklem inflamasyonu", romatoid ise "romatizma şeklinde" anlamlarına gelir (21).

Etyoloji

Romatoid artritin etyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte; genetik, hormonal ve çevresel faktörler hastalık oluşumu ve prognozunda etkilidir (19,23).

Genetik Yatkınlık

Genetik yatkınlık hastalığın belirlenmesinde önemli rol oynar. Aynı aile içinde birden çok kişide görülmektedir. Örneğin, bir kişinin birinci derece akrabaları arasında romatoid artrit tanısı varsa o kişide romatoid artrit gelişme riski, genel topluma göre 16 kez artmış bulunmaktadır. Romatoid artritli bir kişinin birinci derece akrabaları arasında hastalık bulunma sıklığı ise %10 kadardır. Tek yumurta ikizleri arasında hastalığın birlikte görülme sıklığı %30, çift yumurta ikizlerinde ise %5 oranındadır. HLA DR4 ve HLA DR1, romatoid artrite yatkınlık oluşturan genlerin başında gelirken, romatoid faktörü pozitif olan hastalarda %60-70 oranında normal toplumda yaklaşık %25 oranında bulunmaktadır. Romatoid artrit ile ilişkili bulunan alellerin hepsinin yapısında, benzer amino asit dizilimi gösteren bir bölge olduğu görülmüştür. Bu bölge ortak epitop olarak adlandırılırken, romatoid artrite genetik yatkınlık yarattığı düşünülmektedir (22,24-26).

Çevresel Faktörler

Romatoid artrite neden olan çevresel faktörler arasında infeksiyonlar, sigara, bakteriler ve virüsler gösterilmiştir (19).

a) İnfeksiyöz ajanlar: *Mycobacterium tuberculosis, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Epstein-Barr virus* ve *Parvovirüs B19* gibi mikroorganizmalar ile romatoid artrit arasında güçlü ilişkiler olduğu görülmüştür. Birçok bakterinin romatoid artrit patogenezinde yeri olabileceği ileri sürülmüşse de hiçbiri yeterli kabul görmemiştir (22). İnfeksiyöz ajana maruz kalma şiddeti ve infeksiyöz ajanın oluşturduğu partiküllerin özellikleri, immün sistemde değişikliğe neden olup, romatoid artrit etyopatogenezinde önemli rol oynarlar (27).

b) Sigara: Çevresel faktörlerden sigara ile romatoid artrit arasında güçlü ilişki tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda sigara içmenin doza bağlı olarak hastalık şiddetini artırdığı saptanmıştır (27).

c) Diyet: Yapılan çalışmalar, balık ve balık ürünleri tüketiminin romatoid artritin gelişiminde önleyici ve hastalığın seyrinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. K vitamininin de hastalığın gelişiminde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (27).

d) Hamilelik: Romatoid artrit kadınlarda erkeklere oranla 3 kat fazla görülmektedir (27). Hamilelik boyunca romatoid artrit seyrinin iyi olduğu, hastalığın remisyonda olduğu veya aktive olmadığı saptanmıştır. Postmenopozal dönemde romatoid artrit şiddetlenebilmektedir (27-31).

Patogenez

Romatoid artritin etyopatogenezi henüz tam olarak bilinmemesine rağmen, immünogenetik yatkınlığı olan bireylerde bilinmeyen bir antijen (self antijen ve/veya ekzojen antijen) ile sinovyal T hücrelerinin aktivasyonunun romatoid süreci başlattığı düşünülmektedir (32). Hastalığın başlangıcındaki kritik nokta, HLA-DR pozitif antijen sunan hücrelerin (APCs) oto reaktif CD 4+ Th hücrelerine bu antijenleri sunmasıdır. Aktif Th hücreleri çoğalır ve sinovyum içerisine yayılırlar (33).

İnflamasyonda başrolü oynayan moleküller tümör nekroz faktör (TNF) alfa (α) ve (IL)'lerdir (34). Özellikle interferon-2, IL-2 ve IL-4 üretiminde artış görülür. Sitokinler sadece Th hücrelerini uyarmakla kalmaz, makrofaj, fibroblast, osteoklast ve kondrositlerin de aktif olmasını sağlar. Th hücrelerine benzer şekilde, makrofajlar da aktifleşir ve sinovyuma göç eder. Erken ve geç romatoid artritte inflamatuvar hücrelerin çoğunluğunu Th hücreler ve makrofajlar oluşturur. Uyarılmış makrofaj ve fibroblastlar TNFα, IL-1, IL-6, kemokinler, prostaglandinler, proteazlar ve büyüme faktörlerini üretirler. Bu sürecin ilerleyen döneminde B lenfositler uyarılır ve romatoid faktör gibi otoantikorlar serbest kalır (33). Tüm bu hücre aktivasyonları ve sitokin salınımları neticesinde sinovyal dokuda yeni damar oluşumu, sinovyal hücre proliferasyonu ile doku iskemisi sonucunda invazif bir doku olan "pannus formasyonu" gelişmektedir. Bu, hastalığın kronik faza geçtiğine işaret eder (32).

Klinik Bulgular

Hastaların eklem yakınmaları sorgulanmalıdır bunun dışında hafif ateş, halsizlik ve kilo kaybı görülebilir (20,35). Hastalığın seyri hastadan hastaya büyük oranda çeşitlilik gösterebilir. Bazı hastalarda orta seviyeli kısa-dönem semptomlar görülürken, çoğunda hastalık hayat boyunca gelişim gösterir (21).

1) Eklem bulguları:

Eller: En zengin ve karakteristik değişiklikler el ve el bileklerini simetrik tutması sonucu görülür. Erken dönemde, tenosinovitler, proksimal interfalanjial (PİF) eklemlerin iğ

şeklinde (fusiform) şişmeleri, ulnar stiloid çevresinin şişmesi ile bu bölgede düzleşme görülür. Bir diğer erken dönem bulgusu, parmaklarda yanma ve karıncalanma gibi bulgularla seyreden median sinir basısı nedeniyle oluşan karpal tünel sendromudur. Hastalığın ilerlemesiyle klasik geç dönem deformiteleri gelişir. Bunlar; el sırtının kas atrofisi sonucu iç bükey bir görünüm kazanması, metokarpofalanjial (MKF) eklemlerde subluksasyon, parmakların MKF eklemlerden itibaren ulnar tarafa doğru çarpılmaları (ulnar deviasyon), PİF eklemlerde hiperekstansiyon, distal interfalanjial (DİF) eklemlerde fleksiyon ile kendini belli eden kuğu boynu deformitesi veya bunun tam tersi olan düğme iliği deformitesi, başparmakta Z deformitesi olarak gözlenen şekil bozuklukları ve düşük parmak durumu gözlenir (22).

Dirsekler: Sık tutulan bu eklemlerde ağrı ve şişlik dışında ekstansiyon kusuru ilk belirtiyken, semptomlara fleksiyon kusuru eşlik etmedikçe günlük aktivitelerde bir azalma görülmez. Bu bölgenin muayenesi sırasında romatoid nodüller mutlaka kontrol edilmelidir (22).

Dizler: Hastaların %15 kadarında ilk tutulan eklemler arasındadır ve bu hastaların büyük kısmı da tanıdan önce bir menisküs operasyonu geçirmiş olurlar. Romatoid artrit, dizlerin her iki kompartımanını tutması ile sadece medial bölümü tutan osteoartrozdan ayrılır. Diz tutulmasında karşılaşılabilecek bir durum, sinovyal sıvının popliteal fossaya doğru uzanması sonucu oluşan *Baker* kistidir. Sinovyal sıvının bu şekilde açığa çıkarak bacağın aşağılarına doğru ilerlemesi ile tromboflebiti andıran bir durum ortaya çıkabilir. Eklem içine bir kortizon injeksiyonu ile kolayca tedavi edilebilecek bu komplikasyon, tromboflebit geçirdiğinden şüphe edilen artritli hastalarda düşünülmesi gerekir. Ultrasonografi, ayırıcı tanıda oldukça yararlıdır (22).

Ayaklar: Ağrı ve hareket kısıtlılığı ayak eklemlerinde de görülür. Metotarsal eklemlerin tutulması sonucu ayak ön kısmında genişleme, *halluks valgus* ve çekiç parmak şeklinde deformiteler geç dönem belirtileri olarak görülür (22). Ayak statiğinin bozulması sonucu aşırı basınca uğrayan dokularda nasırlaşmalar ve cilt ülserasyonları görülür (30).

Servikal vertebra: Romatoid artritli hastaların bir kısmında görülen servikal vertebra tutulumu korkutucu komplikasyonlara yol açtığından dolayı önemlidir. En sık atlantoaksiyel (C1-C2) eklem tutulumu görülür. Normalde aksisin odontoid çıkıntısı ile atlasın arkusu arasında 3 mm'yi geçmeyen bir boşluk vardır. Sinovit sonucu instabilite gelişmesi ile genişleyen bu alanda odontoid çıkıntının foramen magnuma doğru hareket etmesi ile servikal kordun baskı altında kalması sonucu çeşitli nörolojik semptomlar görülürken; oksipital bölgeye yayılan ağrı, boyun hareketleri ile ağrıda olan değişiklik, üst ekstremitelerde

parestezi, pozisyon hissinin kaybı, reflekslerde artış ile mesane ve barsak fonksiyon bozukluğu görülebilir. Ani hareket veya bir travmada çeşitli nörolojik komplikasyonlar veya ani ölüm görülebilir (22).

2) Eklem Dışı Bulgular:

Romatoid nodüller: Hastaların %30'unda görülür. Ön kol, yüz ve cildin basınca maruz kalan yerlerinde sıkça rastlanır. Yatağa bağımlı kişilerde, boyun ve spinöz prosesler üzerinde, dizlerde, ağır el işi yapanlarda el parmakları arasında görülürken daha çok seropozitif ve progresif hastalık aktivitesi belirgin olan hastalarda görülür. Akciğer, kalp, safra kesesi gibi iç organlarda da romatoid nodüllere rastlanabilir (19,22).

Kalp tutulumu: Romatoid artrit, kalpte vaskülit, nodül gelişimi, serozit, fibroz ve valvülit sonucu çeşitli belirti ve bulgulara yol açabilir. Kalp tutulumunun en sık görülen şekli perikarditttir. Hastalık süresi ile bir ilişkisi yoktur ve hastalığın ilk belirtisi olabilir. Seropozitif, romatoid nodüllü hastalarda daha sık rastlanır. Miyokard tutulumu daha seyrektir ve genellikle asemptomatik seyreden, sistolik fonksiyona nazaran diastolik fonksiyonu daha fazla bozan bir miyokardit şeklindedir. Ayrıca ileti sistemini etkileyebilen fibrozis ve nodül gelişimi de görülebilir. Kapak tutulumu, ekokardiografik inceleme ile hastaların %30 kadarında bildirilmişse de bu, genellikle hemodinamik bir bozukluğa yol açmaz. Koroner arterler ise romatoid vaskülite bağlı olarak tutulabilirler (19,22).

Nörolojik tutulum: Romatoid artritte karşılaşılan nörolojik belirtilerin dört ana sebebi vardır:

1) servikal vertebra tutulumu
2) tuzak nöropatisi
3) periferik nöropati
4) vaskülite bağlı gelişen mononöritis multipleks

En sık rastlanan nörolojik komplikasyon sinovyal hipertrofiye bağlı olarak gelişen tuzak nöropatilerdir. Median, ulnar, posterior tibial ve radial sinirin posterior interosseoz dalı sık olarak etkilenir. Tuzak nöropatiler içinde en sık görülen karpal tünel sendromudur ve bu hastalığın erken döneminde görülür. Atlantoaksiyal eklem tutulumuna bağlı olarak servikal vertebra tutulumu görülebilir. Santral sinir sistemi tutulumu olarak duramater ve koroid pleksusta yerleşen amiloidoz, vaskulit, romatoid nodüllere bağlı inme, hemoraji, ensefalopati, menenjit görülebilir, ekstradural yerleşimli nodüller sinir kökü kompresyonuna veya miyelopatiye neden olabilir (19,22).

Göz tutulumu: Kuru göz şeklinde kendini belli eden *keratokonjonktivitis sikka*, hastalığın geç dönemlerinde görülen göz bulgusuyken (%10-35), hastalık şiddeti ile bir ilişki göstermez. Tedavisi semptomatiktir. Oftalmik etkilenime bağlı olarak Sjögren sendromu, sklerit, gözde ani kızarma ve ağrı yapan ancak nadiren vizyonu etkileyen episklerit en sık rastlanan göz problemleridir. Hastalık şiddeti ile ilişkilidir ancak selim tablo görülür ve genellikle tedavisiz iyileşir. Daha seyrek görülen sklerit, nodüler diffüz ve nekrotizan kötü seyirlidir ve vizyonu etkiler. Zaman içerisinde skleromalasi (mavi sklera) ile sonuçlanır. Seyrek rastlanan bir göz tutulumu da Brown sendromudur. Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçların aynı akciğer tutulumunda olduğu gibi çeşitli göz komplikasyonlarına yol açabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlara örnek olarak katarakt ve glokom yapabilen steroidler, keratopati ve retinopati yapabilen antimalaryal ilaçlar ile konjonktiva ve korneada birikim gösterebilen ancak şimdilerde daha az kullanılan altın tuzları gösterilebilir (19,22).

Kas tutulumu: Romatoid artritte inflamasyona bağlı kas atrofisi görülmesi yaygın bir durumken arterite sekonder gelişen nöropatilere bağlı olarak da kas atrofisi görülebilir. En çok tip 2 ve hızlı kasılan kas lifleri etkilenir. Kas içerisinde romatoid nodüller oluşabilir. Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçlar da kas tutulumuna yol açabilir. Örneğin kronik steroid kullanımı sıklıkla romatoid artritli hastalarda kas atrofisine yol açmaktadır (19).

Kemik tutulumu: Romatoid artritli hastaların aynı zamanda osteoporoz açısından risk altında olduğu unutulmamalıdır (37). Romatoid artrit başlangıcından sonraki 6 aydan itibaren aksiyal ve apendiküler kemik kaybı, klinik inflamasyon ve kemik erozyonu ile birlikte seyreder. Sinovyal osteoklastik formasyon kemik erozyonu ile sonuçlanır (19).

Karaciğer tutulumu: Romatoid artritin aktif dönemlerinde transaminaz ve alkali fosfataz yüksek görülebilir. Metotreksat, leflunomid ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımına bağlı olarak gelişen karaciğer patolojileri daha önemlidir (22).

Akciğer tutulumu: En fazla görülen akciğer tutulumu şekli olan plörezinin, romatoid artritin süresi ve hastalığın şiddeti ile ilişkisi yoktur. Parenkimal tutulum için en klasik örnek, diffüz interstisyel fibrozdur. Hastaların %20'si yakalanabilir. Plörezinin aksine, geç ortaya çıkar ve erkek, seropozitif ve nodülü bulunan hastalarda daha sık rastlanır. Kliniği, idiopatik akciğer fibrozu ile benzerdir. Akciğer tutulumunun seyrek görülen diğer şekillerine örnek olarak, hızlı ilerleyen ve kötü seyirli obliteratif bronşiolit, kömür tozları ile çalışan işçilerde görülen pulmoner nodül ve pnömokonyoz ile karakterize Caplan sendromu ve romatoid vaskulit sonucu gelişen nadir ve ağır prognozlu izole pulmoner arterit verilebilir. Romatoid

artrit tedavisinde kullanılan metotreksat, parenteral altın ve d-penisilamin gibi ilaçların da çeşitli ağırlıkta akciğer komplikasyonlarına yol açabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (22).

Felty sendromu: Romatoid artritli hastalarda görülme sıklığı %1'in altındayken, bu hastalığın ciddi ve hayati öneme sahip komplikasyonlarından biridir. Hastalık süresi uzun, eklemlerde kalıcı şekil bozuklukları görülebilir. Bu sendromla birlikte ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, deri altı nodülleri, sekonder Sjögren sendromu, hepatomegali, lenfadenomegali, deri pigmentasyonu ve bacak ülserleri görülebilir (38).

Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular

Laboratuvar ve radyolojik incelemeler sayesinde, eklemlerdeki kalıcı şekil bozukluklarının önüne geçilerek, tedavinin daha etkili olması sağlanır. Kan tetkiklerinde; sedimantasyon yüksekliği, kansızlık, romatoid faktör ve C reaktif protein pozitifliği tanıyı destekler (39,40). Radyoloji tetkiklerinde eklemlerin röntgenleri çekilerek, kıkırdak dokudaki değişiklikler gözlenir (39,40).

Anti-siklik sitrülin peptid (anti-CCP) antikorlarının kandaki düzeyinin ölçümü son yıllarda gündeme gelmiş bir laboratuvar testidir. Yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı %50-80 arasında değişmektedir, özgüllüğü ise %90'ın üzerinde bildirilmektedir. Anti-CCP antikorlarının düzeyindeki artış klinik belirtiler başlamadan kanda tespit edilebilmektedir. Tanı ve hastalığın seyrini tahmin etmede gösterge olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir. Eroziv hastalığı göstermede romatoid faktörden daha etkili olup iki testin bir arada kullanılması önerilmektedir. Bununla birlikte seronegatif hastaların sadece üçte birinde anti-CCP antikorları saptanabilmektedir (33).

Eklem tutulumu görüntüleme yöntemleri ise sinovitin saptandığı şiş veya hassas eklemleri kapsar. Büyük eklemler omuz, dirsek, kalça, diz ve ayak bilekleridir. Küçük eklemler MKF, PİF, 2-5. metatarsofalenjial (MTF), başparmak interfalenjial eklemler ve el bileğidir (20,21).

Romatoid Artritte Tanı Kriterleri

Hastalığın erken dönemlerinde, çoğunlukla diğer hastalıkların dışlanması ile tanı konur (22). Bunlar; konnektif doku hastalıkları, seronegatif spondiloartropatiler, kristal depo hastalıkları, kronik yorgunluk sendromu, fibromiyalji, glukokortikoid kesilme sendromu,

infeksiyöz artritler (viral), intermitant artritler, osteoartroz, parkinson hastalığı, polimiyaljiya romatika ve dev hücreli arterittir (41).

Amerikan Romatizma Derneği (ARA)'nin 1987 yılında geliştirdiği tanı kriterleri günümüzde romatoid artriti en iyi tanımlayıcı araç olarak ifade edilir (22). Aşağıdaki kriterlerden 4'ünün mevcut olması gerekir, bu 4 kriterin de en az 6 hafta devam etmesi hastalığın tanısının koyulması için yardımcıdır (42).

Bu kriterler;

1) Sabah sertliği (en az 1 saat)
2) Üç veya daha fazla eklemde yumuşak doku şişliği ve sıvı ile karakterize artrit
3) El eklem artriti (el bileği, MKF veya PİF eklemlerinden en az birinde tutulum)
4) Simetrik artrit (vücudun her iki tarafında aynı anda ve eklemlerde görülen şişlik)
5) Romatoid subkutan nodüller
6) Pozitif romatoid faktör
7) Romatoid artrit için tipik radyolojik değişiklikler (22,23,43).

Tedavi

Romatoid artritin tedavisinde çeşitli yaklaşımlar kullanılır. Bunlar; hastalığın seyri sırasında, farklı zamanlarında ve hastanın bireysel durumuna göre seçilir. Doktor hastayı belirlediğinde, tedavi ne olursa olsun hedefler aynıdır; ağrıyı gidermek, inflamasyonu azaltmak, eklem hasarını durdurmak ve yavaşlatmak, kişinin yetenek kabiliyetini artırmak (20,40).

Romatoid artritin semptomlarını yönetmede NSAİİ ve steroidlerin kullanımının yanı sıra, aktif döneminde romatoid artriti kontrol altına almak için hastalığı modifiye eden antiromatizmal ve biyolojik ilaçlar uygulanır (20). NSAİİ, romatoid artrit tedavisinde en sık reçete edilen ve kullanılan ilaç grubunu oluşturmaktadır. Ağrıyı kesmeleri ve inflamasyonu azaltması bu grubun üstünlüğüdür (21,44). NSAİİ'ler romatoid artritin oluşturduğu eklem harabiyetinin seyrini tek başlarına yavaşlatamazlar. NSAİİ'lerin mide kanaması ve mide ülseri oluşturmak gibi bazı istenmeyen etkileri bulunmaktadır (44).

Steroidler; birçok bireyde hızlı ve etkin ağrı kontrolü sağlayan ilaç grubudur. En sık kullanılan formları ise düşük doz steroid içeren ilaç formudur, eklemlerdeki yangıları gidermek için eklem içine lokal injeksiyonlar şeklinde kullanılabilirler. Yan etkileri de doz ve kullanım süresi uzadıkça artabildiğinden mümkün olan en düşük dozda ve en kısa sürede kullanılmaları gerekmektedir. Steroid tedavisinin birdenbire kesilmesi tehlikeli olduğundan

dozun azaltılarak kesilmesi gerekmektedir. Steroidler kan şekerinde yükselme, katarakt, hipertansiyon, çocuklarda büyüme geriliği, infeksiyonlara artmış yatkınlık, osteoporoz ve tedavi süresinin uzunluğuna ve kullanılan doza bağlı olarak kilo artışına yol açabilmektedirler (44).

Hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar; iltihabı azaltmak için ve hastalığın ilerlemesini önleyerek yavaşlatmada kullanılırlar. Semptom giderici etkilerinin ortaya çıkması uzun sürebileceğinden genellikle NSAİİ'lerle birlikte kullanılırlar. Genel olarak diyare, göz hasarı, bulantı ve kusma gibi istenmeyen etkilere yol açabilir. Bu grupta en bilinen antiromatizmal ilaç metotreksattır. Diğer ilaçların belirtileri geçirmeye yeterli olmadığı romatoid artritli bazı çocuklarda metotreksat güvenilir ve etkin bir tedavi seçeneğidir. Artrit semptomlarının tedavisi için çok küçük dozlar gerektiğinden dolayı, olası zararlı etkiler nadiren ortaya çıkmaktadır. En ciddi istenmeyen etki karaciğer hasarıdır (22,44).

Biyolojik ilaçlar romatizma tedavisinde yeni bir çağı başlattığı düşünülen en yeni ilaç grubudur. Doğrudan eklemlere zarar veren immün sistem hücrelerini hedef alırlar. Sağlıklı bireylerde TNF seviyesi dengede tutulurken, romatoid artritli hastalarda ileri derecede artabilir. Bazı ilaçlar, doğrudan, inflamasyonda rol oynayan birçok hücrenin fonksiyonunu düzenleyen TNF adlı proteinin etkilerini bloke ederek etki gösterir. Biyolojik ajanları kullanan hastalarda nadiren tüberküloz görülebilir. Tüberküloz riski koruyucu tedavi ile az görülebilir. Bu nedenle koruyucu tüberküloz tedavisinin mutlaka düzenli kullanılması gereklidir. Klasik tedavilere rağmen hastalığı aktif olan romatoid artritli hastalarda biyolojik ajanlar kullanılabilir (44).

Hastalıkta tam anlamıyla iyileşme sağlayan bir tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır. Kullanılan ilaçlara bağlı gelişen en önemli ve yaygın yan etkiler; karaciğer ve kan iliği toksisitesi, renal toksisite, iştahsızlık, bulantı, kusma, anemi, alerji, pnömonit, otoimmünite ve infeksiyonlardır. Ayrıca hidroksiklorokin oküler toksisiteye neden olabilir (21).

Güncel tedavi yaklaşımları;

1) Yaşam tarzının değişikliği
2) Farmakolojik tedavi
3) Cerrahi yöntemlerin uygulanması
4) Hastanın tıbbi bakımının düzenli olarak yapılmasıdır (40).

SERBEST RADİKALLER

Atomlarda elektronlar "orbital" adı verilen uzaysal bölgede ve çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki moleküller ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir elektron ile iletişime girerek, bu molekülden ya bir elektron alır, ya da ona bir elektron verirler. Fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük bu moleküllere "serbest radikaller", "oksidant moleküller'' denilir, bunların en önemlileri süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleridir (45,46). Bu eşleşmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verir. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu görülmüştür (46,47).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir (48);

1) Kovalent olarak bağlı bir molekülün ayrılan her bir parçasında ortak elektronlarının birisi kalacak şekilde homolitik bölünmesi

   $X : Y \rightarrow X \cdot + Y \cdot$

2) Bir molekülden tek bir elektronun kaybı. Kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.

   $X : Y \rightarrow X :^{-} + Y^{+}$

3) Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi

   $X + e^{-} \rightarrow X \cdot^{-}$

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. İki serbest radikalin birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturabilmelerini sağlar (48).

Süperoksit Radikali

Oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi, nikotinamid difosfat hidrojen (NADPH)'e bağlı olarak dehidrojenazdan elektron sızmasına ve süperoksit radikali oluşumuna yol açar (49).

$O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$

Diğer radikallere oranla reaktivitesi çok azdır. Oluşumuna neden olduğu radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. H_2O_2'in kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından bu radikal önemlidir (48).

Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

$O_2^{\cdot -} + NO \rightarrow ONOO^-$

Süperoksit, Cu^{2+} gibi geçiş metalleri ve radikal türleriyle kolay reaksiyona girer ve H_2O_2 ile "Haber-Weis" tepkimesini vererek oldukça toksik hidroksil radikalini oluşturur (49).

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \xrightarrow{Cu^{2+}} \cdot OH + OH^- + O_2$$

Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmamasına rağmen, reaktif oksijen türleri içine girerek serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Bir geçiş metali ile tepkimeye girerek serbest radikal üretmekte ve hücre zarları üzerinden hücreye girebilmektedir (48,50,51).

Hidrojen peroksit, süperoksidin ($O_2^{\cdot -}$) çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.

$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (48).

Hidrojen peroksitin biyolojik sistemlerdeki asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile gerçekleşir. Yağda çözünen bu radikal, oluştuğu yerden uzakta olan fakat Fe^{+2} içeren membranlarda bile hasar oluşturabilir (51).

$2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (48).

Hidroksil Radikali

Oksijen radikalleri içinde reaktivitesi ve toksik etkisi en yüksek olan hidroksil radikalidir (48). Bu radikal, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu (Fe^{2+} ve Cu^{+} varlığında) sonucu H_2O_2'den sentezlenirken, suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur (51). Bu moleküller tiyol oksidasyonu, karbon merkezli serbest organik radikaller, lipid peroksitlerin üretimi gibi yeni radikalleri oluşturarak büyük hasara neden olurlar (51,52).

Singlet Oksijen

Singlet oksijen eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür (48,53). Serbest radikal reaksiyonları sonucu oluşmasına rağmen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur (48).

Malondialdehit

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bileşiklerden aldehitler en toksik olanlarıdır ve diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olurlar. Malondialdehit (MDA), protein amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak membran yapısında mutajenik, karsinojenik, genotoksik etki gösterir. MDA miktarı tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile ölçülebilir (54).

Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrede ve çevrede sürekli olarak; hem eksojen (ilaçlar, metal iyonları, kirleticiler, radyasyon) hem de endojen (oksijenden oluşan radikaller) kaynaklar tarafından üretilirler (50). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki gösterirler (53). Oksidatif stres vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanırken bu durum serbest radikallerin toksikolojik açıdan da önemli olduğunu göstermektedir. Serbest oksijen radikallerinin, romatoid artrit dahil birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı öne sürülmektedir (45).

Serbest radikallerin lipidlere etkileri: Membran yapısında bulunan lipitler, serbest radikal hasarına karşı son derece hassastır (32). Bu oksidatif hasar 'lipid peroksidasyonu' olarak adlandırılır (31). Lipid peroksidasyonu kendi kendini katalizleyerek zincir reaksiyonu

şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır (55). Radikallerin reaksiyonu sonucu lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler meydana gelirken; üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşur (32).

Serbest radikallerin proteinlere etkileri: Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini engelleyerek birçok proteinin hasarına yol açabilir ki bu hasar proteinin aminoasit içeriğiyle ilgilidir (31). Kükürt içeren aminoasitler ve doymamış aminoasitlerin (triptofan, tirozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin) serbest radikallerle reaksiyonları sonucu kimyasal değişiklikler görülür (32). Bu değişiklikler; sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikallerin meydana gelmesidir (31).

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri: Serbest radikaller karbonhidratlar üzerinde; polisakkarit depolimerizasyonu ve monosakkarit otooksidasyonu gibi etkiler gösterir ki bunun sonucu oluşan ürünler patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (53).

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri: Her türlü radyasyon hücrelerde iyonların, serbest radikallerin ve enerji kazanmış moleküllerin oluşumuna yol açar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve tetrasiklik bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA'nın parçalanmasına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne yol açabilir (31,32).

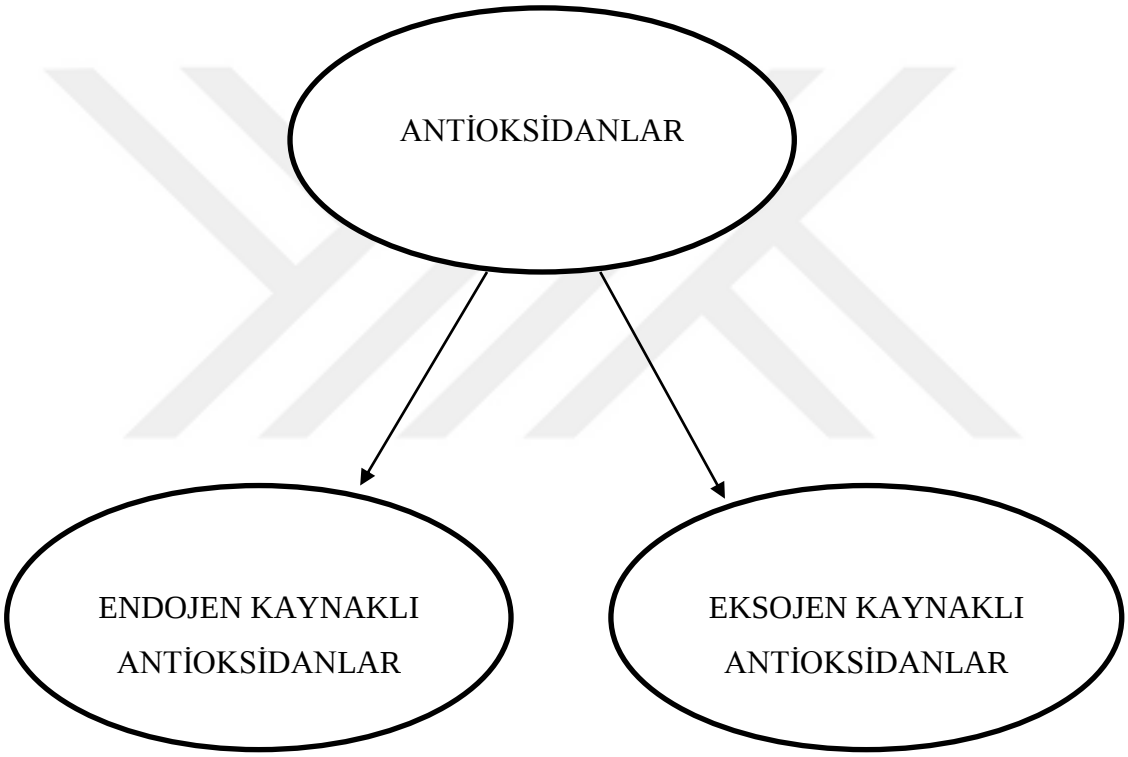
ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Serbest radikallerin ve bunların meydana getirdiği zararları önlemek için canlı organizmalarda çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" olarak adlandırılır (Şekil 1-3) (56-59).

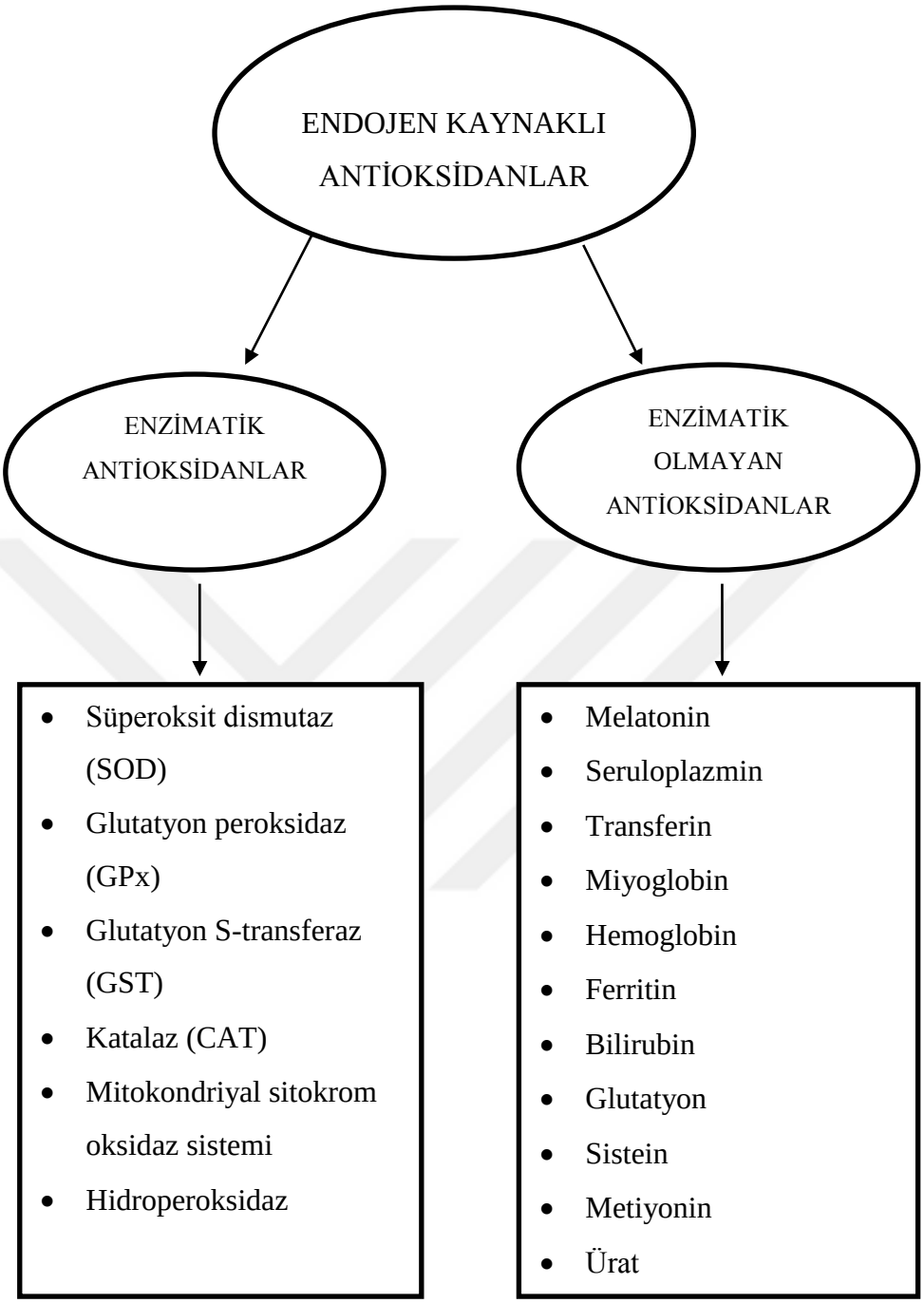
Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler;

1) Toplayıcı etkisi: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları enzimler tarafından zayıf bir moleküle çevirmek.
2) Baskılama etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktif hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler aracılığıyla sağlanır.
3) Onarma etkisi: Serbest radikaller tarafından hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

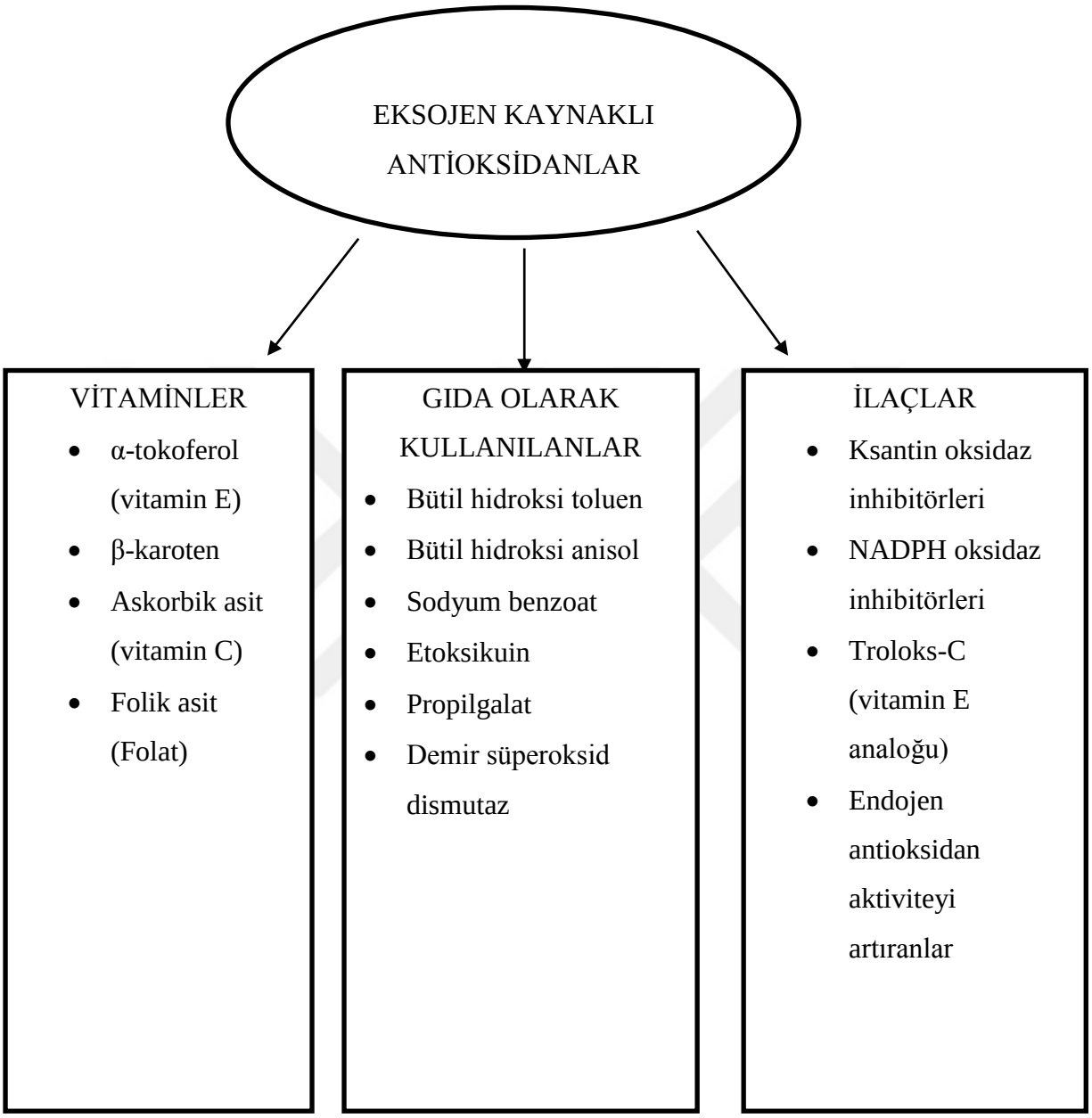
4) Zincir koparma etkisi: Serbest radikalleri bağlayarak fonksiyonlarını engelleme şeklinde olan etki (53,56,57).



Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması (53 nolu yayından uyarlanmıştır)



Şekil 2. Endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması (53 nolu yayından uyarlanmıştır)



Şekil 3. Eksojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması (53 nolu yayından uyarlanmıştır)

Tablo1. Bazı antioksidanların etki mekanizmaları (56)

Süperoksit dismutaz	Süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.
Katalaz	Hidrojen peroksidi, moleküler oksijen ve suya parçalar.
Glutatyon peroksidaz	Hücre içi indirgeyici ajandır, hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.
α-tokoferol (Vitamin E)	Süperoksit anyonunu doğrudan süpürür, antioksidan enzimlerinin aktivitesini artırır, lipit peroksidasyonunu inhibe eder.
β-karoten	Peroksi radikalleri ile süperoksit ve hidroksil radikallerini temizler. Vitamin A'nın oksidasyonunu önler. Geçiş metallerini bağlar.
Askorbik asit (Vitamin C)	Daha sonradan glutatyon tarafından indirgenen semi dehidroaskorbat radikalini oluşturarak, süperoksit anyonunu süpürür.

SİTOKİNLER

Sitokinler T hücrelerinin, B hücrelerinin ve hematopoetik hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmasında, inflamasyonun uyarılması veya baskılanmasında önemli rol oynayan haberci protein moleküllerdir. Sitokinler hormona benzetilse de tam hormon değildirler (60).

Sitokinler immün sistem hücrelerinden makrofaj, B ve T lenfositleri ve bunlara ilaveten pek çok hücre tipi tarafından üretilip, salgılanmaktadır (61). Sitokinlerin esas görevi allerjen, virüs ve çevresel kirleticilere karşı oluşan inflamatuvar, immün ve rejeneratif yanıtın kontrolünü sağlamaktır (60,61). Hücreler arası etkileşimlerde kritik rol oynayan sitokinlerin salınımları geçicidir (62).

Sitokinler etki ettikleri bölgelere göre;

1. Sitokin, onu salgılayan hücre üzerinde etkiliyse ⟶ otokrin
2. Sitokin, yakınındaki hücrelere etki ederse ⟶ parakrin
3. Sitokin, vücudun uzak bölgelerine yayılıyorsa ⟶ endokrin etkili sitokinler olarak isimlendirilir (31,62,63).

Romatizmal hastalıklar içerisinde sitokinler, romatoid artritte büyük rol oynarlar. T hücreleri sinovyum içerisinde antijeni ile etkileşir. Bu etkileşimi sağlayan en önemli sitokin IL-2'dir. IL-1, IL-6, TNFα, IL-10 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) patogenezde önemli roller oynayan kritik sitokinlerdir. IL-1 daha çok hastalığın yıkıcı etkilerinden sorumludur ve proteoglikan ve kıkırdak yıkımını gerçekleştirir. TNFα ise daha çok proliferatif ve inflamatuvar olaylardan sorumludur. Patogenezdeki önemli sitokinlerden biri de IL-6'dır. IL-6; romatoid artritteki akut faz reaktanlarındaki artış ve inflamasyondan sorumludur (31).

İnterlökin-1

İnterlökin-1, aktive makrofajlar tarafından üretilen bir inflamatuvar sitokindir. Etkileri, TNFα'ya benzer ve aynı zamanda T hücrelerinin aktive edilmesinde rol oynar (63). IL-1, mononükleer fagositlerden salgılanan 2 temel polipeptidden oluşur. Bunlar IL-1α ve IL-1β'dır. Bu ikisi, iki farklı genin ürünü olmasına rağmen her ikisi de aynı hücre yüzey reseptörlerine (IL-1R1) bağlanırlar ve biyolojik etkileri temelde benzerdir (60,64). IL-1, IL-6'nın sentezini tetikler (60). Vücudun infeksiyonlara karşı cevabında önemli bir parçasını oluşturur. Bu sitokinler immünokompotent hücrelerin infeksiyon bölgelerine göçünü *(diapedesis)* sağlamak için, endotel hücrelerin üzerindeki adezyon faktörlerinin ekspresyonunu artırırlar. Bu immünokompotent hücrelere örnek olarak fagositler, lenfositler verilir (62). IL-1 aynı zamanda TNFα'nın birçok inflamatuvar özelliğini paylaşır. Vücut ısısında artışa neden olan termoregülasyon merkezi olan hipotalamustaki aktiviteyi etkiler. Bu yüzden endojen pirojen olarak da adlandırılır (60,62). Ateşin yanı sıra, hiperaljezi, vazodilatasyon ve hipotansiyona da neden olur (62). IL-1, romatoid atritli hastaların hem inflamatuvar eklem sıvılarında hem de aktif hastaların periferik kanlarında yüksek miktarda bulunur (65).

İnterlökin-2

İnterlökin-2 insanların 4. kromozomunda bulunan tek genle kodlanan 14-17 kD'luk Th hücreleri tarafından üretilen bir glikoproteindir (60,62). IL-2'nin temel etkisi lenfositler üzerinedir. IL-2, kendisini üreten hücrelere etki edip kendi oluşumunu sağlar, bu onun otokrin büyüme faktörü işlevini gösterirken, parakrin büyüme faktörü olarak da etkisi mevcuttur (60). T hücrelerinin aktivasyonu; IL-2R ekspresyonu ve IL-2 üretimi ile sonuçlanır. IL-2, IL-2R'ye bağlanır ve hücre bölünmesini sağlar. T hücrelerinin antijen tarafından uyarılması bittiğinde, IL-2R sonunda azalır ve çoğalma fazı sonlandırılır (58).

İnterlökin-6

İnterlökin-6 yaklaşık 26 kD'luk sitokin olup, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitelyum hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından üretilir (60). Hücre zarına bağlı IL-6 reseptörü (IL-6R) veya çözünür şekildeki IL-6R'ye bağlanarak etki gösterir (66). IL-6, diğer sitokinlerle birlikte kemik iliği hemopoetik ana hücreleri için erken dönemde büyüme kofaktörü olarak etki göstermiştir. Bunlara ilaveten kostimülatör

olarak görev yaptığı gösterilmiştir. IL-6, akut faz yanıtına katkıda bulunan birçok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine yol açar (60).

İnterlökin-10

İnterlökin-10, aktive edilmiş makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilen antiinflamatuvar ve inhibitör bir sitokindir (62,63). Fonksiyonları olarak; makrofaj ve aktive Th1 hücrelerinden sitokin sentezi ve nitrik oksit inhibisyonu gösterilmiştir (67). Böylece T hücreleri aracılığıyla immün yanıtta azalma gözlenmiştir (60,63). Makrofajlar üzerinde inhibitör etkilerine ek olarak, IL-10'nun B lenfositleri üzerine uyarıcı etkileri gösterilmiştir (60).

Tümör Nekroz Faktör

Tümör nekroz faktör, birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımına yol açan 185 aminoasitlik güçlü bir sitokindir (62). İnsanlarda 7. kromozomda kodlanır. İki formu bulunmaktadır:

1. TNFα/kaşektin/kaşeksin
2. TNFβ/lenfotoksin

İki tipi kodlayan genlerde "temel doku uygunluğu bileşeninde" bulunmaktadır. TNFα mikroplara, özellikle Gram negatif bakterilere karşı yanıtta aktifleşmiş makrofajlar ve bazı diğer hücreler tarafından üretilir (60,62). TNFβ ise T hücre lenfositleri tarafından üretilir (62). TNFα'nın akut inflamasyonda önemli yeri vardır. TNF, lökositlere karşı endotel hücre yüzeyini adezyon molekülleri aracılığıyla daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerini ekspresse etmelerine neden olur. TNF aynı zamanda nötrofillere de etki ederek endotel hücrelerinin yapışkan özelliklerini artırır. TNF, IL-1 ile birlikte, ateş oluşumu için hipotalamusa etki ederek akut faz protein üretimini kolaylaştırır (60,62). TNF, mononükleer fagositler ve vasküler endotel hücrelere etki ederek IL-1 ve IL-6'nın dolaşıma salınmasını uyarır (60). Romatoid artrit patogenezinde önemli bir rolü olan TNFα'nın sadece inflamasyonla ilişkisi yoktur, aynı zamanda osteoklast gelişimini ve aktivitesini stimüle eder bu da kemik kaybına yol açar (68).

SİLİMARİN

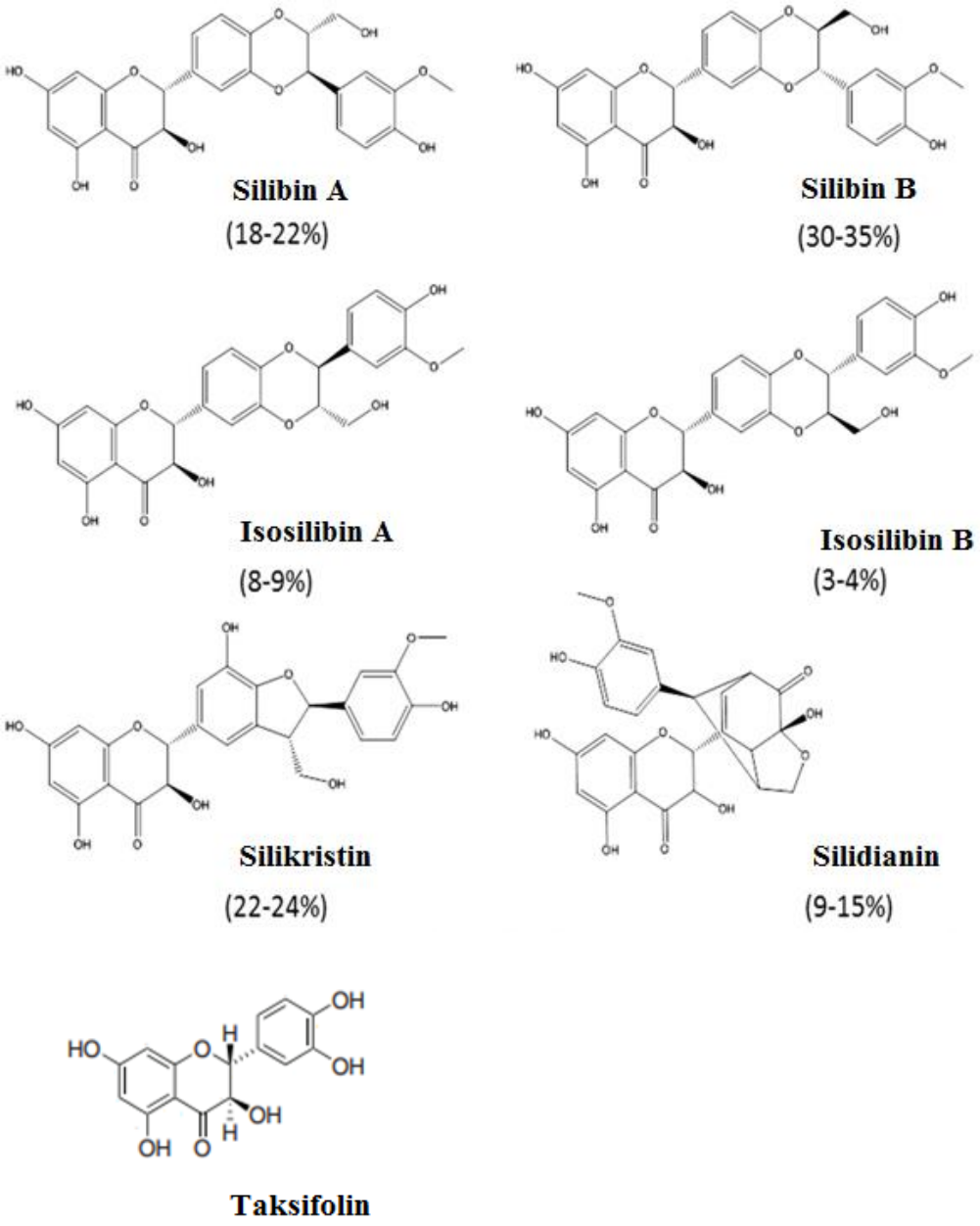
Silibum marianum L.Gaertn (Devedikeni), Asteracea'a familyasına ait olup; tohumları karaciğer ve safra kesesi hastalıkları, toksin ve mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıklarının tedavisinde yaklaşık 2000 yıldan beri kullanılan tek yıllık otsu tıbbi bir bitkidir

(Şekil 4-5) (36,69-75). Ülkemizde iki alt türü *(S.marianum ssp.marianum* ve *S.marianum ssp.anatolicum)* Akdeniz, Karadeniz ve Ege Bölgelerinde yol kenarlarında yetişmektedir (36,72). Bitki; Afrika, Güney Avrupa, Ön Asya'da doğal olarak yetişmektedir (36,70). Devedikeni tohumları eski zamanlardan beri safra kesesi ve karaciğer rahatsızlıklarında koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu bitkiden üretilen ilaçlar Avrupa'da değişik isimlerle eczanelerde satılmaktadır (36). Uygun farmakokinetik özellikleri, önleyici, koruyucu ve rejeneratif etkileri, detoksifiye edici ve güçlü antioksidan olması, plaseboya benzer yan etkileri terapötik kullanım için silimarini son derece çekici ve güvenli hale getirmiştir. Son yıllarda kozmetik endüstrisi silimarinin antioksidan ve ultraviyole koruyucu etkilerini incelemektedir (76-78).

Şekil 4. Silimarin bitkisi

Şekil 5. Silimarin tohumları

Silybum marianum veya devedikeni özü olan silimarin, 7 flavonoglignandan oluşmaktadır: silibinin, izosilibinin, silikristin, izosilikristin ve silidianin ve bir flavonoid olan taksifolin. Bu maddeler arasında silibin (silibinin) çok önemli etkiye sahiptir. Silibin A ve Silibin B silimarinin toplam karışımının %70'ini oluşturmaktadır (Şekil 6) (55).



Şekil 6. Silimarin flavonolignanının bileşenleri

Silimarinin Farmakolojisi

Silimarinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte;

1) Hücre içi glutatyon mekanizmasını düzenleyerek lipid peroksidasyonuna karşı etki gösterir.
2) Hücre membranı stabilizatörü ve permeabilite düzenleyicisi olarak davranarak, hepatotoksik ajanların hepatositlere girmesini önler.
3) Karaciğer rejenerasyonunu artırıp RNA polimerazın aktivitesini uyarır ve siroz inhibitörü olarak davranır.

4) Glukuronidasyonu artırır ve glutatyonun tükenmesini engeller (75,79,80).

Silimarinin suda çözünürlüğü düşüktür, oral yoldan alınan kapsüller şeklindedir (70,71,75).

Silimarinin Absorbsiyonu

Ağız yoluyla emilim azdır. Hayvanlarda ve insanlarda oral alımdan sonra maksimum plazma konsantrasyonuna 4-6 saat sonra ulaştığı görülmüştür (75).

Silimarinin Eliminasyonu

Silimarin hayvan modellerinde oral olarak alındığında gastrointestinal sistem üzerinden emilim %35 civarındadır (75). Ortalama yarılanma ömrü 6-8 saat arasındadır, büyük bir kısmı safra, az bir kısmı böbrekler yoluyla atılır (71,75). Yetişkinlerde günde 2-3 doz 100-300 mg/kg dozunda tavsiye edilir (75,81).

Silimarinin yapılan farmakolojik araştırmalardan akut toksisite çalışmalarında çok iyi tolere edildiği gösterilmiştir (34,70,75,82). Yüksek doz kullanımında ishal ve hafif alerjik reaksiyonlar gibi sadece birkaç yan etki gözlenmiştir (81).

Silimarinin Etkileri

Silimarinin; antioksidan, lipid peroksidasyonuna karşıt etkisi, immünomodülasyon ve antiinflamatuvar etkileri mevcuttur (69,70,81). Antioksidan özelliğine bağlı olarak; viral hepatit, toksik hepatit, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar ve radyasyon toksisitesinde güçlü olduğu kanıtlanmıştır. GPx, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin yapımını uyarması da antioksidan özelliği arasındadır. Silimarinin bazı kimyasallara karşı antikarsinojenik etkisi olduğu gösterilmiştir (75). Silimarin, ultraviyolenin tetiklediği oksidatif stres, inflamasyon, immün cevap ve DNA hasarı gibi etkileri azalttığı görülmüştür (69,75).

Silimarinin güçlü antifibrotik, antioksidan, antiviral ve antiinflamatuvar etkileri alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığının tedavisinde etkili bir ilaç haline getirmiştir (82). Silimarin, karaciğer hücre zarını kuvvetlendirerek antidot olarak *Amanita falloides*, etanol ve psikotrop ilaçların hasarına karşı etkilidir (34,74,79).

Silimarin karaciğeri tehdit eden hepatit virüslerinin de çoğalmasını engelleyerek hepatitli hastaların iyileşmesini hızlandırıp, karaciğerin işlevlerini yerine getirememesiyle sonuçlanan siroz hastalığını önlemektedir veya siroz olmuşsa hastalığın ilerlemesini engellemektedir (34). Silimarin karaciğerin kendini yenilemesini hızlandırmaktadır (34). Son

yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda; antikanser, antidiyabetik ve kalbi koruyucu etkileri desteklenmektedir (75,82).

Silimarin ayrıca, 5-Lipoksijenaz inhibisyonu yönünden antiinflamatuvar ve antiartritik özelliğe sahiptir (75). Silibin, antiinflamatuvar etkisini TNFα, IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin sentezinin indüksiyonunda yer alan proinflamatuvar sinyallerin kapatılması yoluyla gösterir. Silimarin romatoid artritte, nötrofil aktivasyonu ve migrasyonunu inhibe ederek bir antiinflamatuvar işlevi görür (55).

Sonuç olarak silimarin antiinflamatuvar, antiapoptopik, antikarsinojenik, antiviral, antifibrotik ve antianjiojenik özellikleri ile güvenilir kullanımı olan ve farklı hastalıklarda tedavi yöntemleri araştırılan tıbbi bir bitkidir (75,79,83-85).

GEREÇ VE YÖNTEM

Yaptığımız çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınmıştır (Ek-1) ve çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2014/57) (Ek 2) tarafından desteklenmiştir.

DENEKLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilmiş olan, ortalama 260-300 gram ağırlığında 64 adet Sprague Dawley erkek sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler standart laboratuvar koşullarında (22±1 °C, %55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) barındırılmıştır. Beslenmeleri için standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanılmıştır.

İLAÇLAR

Freund's Complete Adjuvant (FCA), (Sigma-Aldrich, USA)

Silimarin (Sigma-Aldrich, USA)

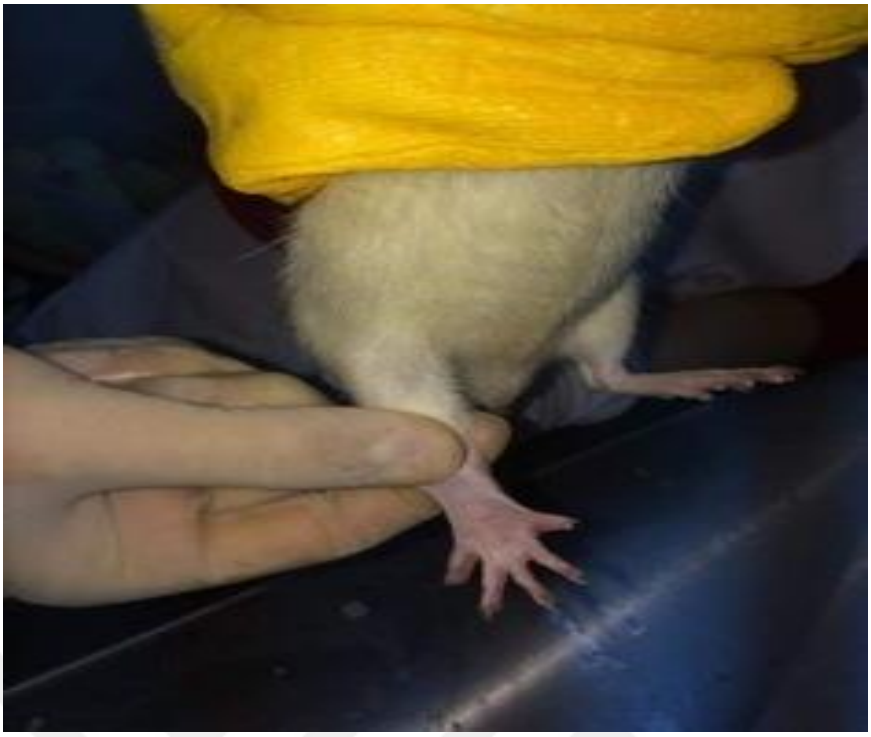
İbuprofen (Sigma-Aldrich, USA)

Rompun (Xylazin, Bayer, USA)

Ketamin (Ketalar, Pfizer, USA)

DENEY DÜZENİ

Çalışmamızda adjuvant artrit önceden romatoid artrit değerlendirilmesi için tarif edilen metodlara göre, ısıda öldürülmüş ve kurutulmuş *Mycobacterium tuberculosis* içeren sıvı parafin emülsiyonunun (FCA, 10 mg/ml) hayvanların sağ arka ayak pençelerine



Şekil 7. Adjuvant artrit oluşmuş sağ pençe

22 numaralı iğne ile 0,1 ml'lik tek doz intradermal olarak injeksiyonu ile oluşturuldu (Şekil 7). Çalışmamızda 8 grup oluşturuldu ve her grupta 8 hayvan kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve pençe takibi sonrası 27. gün kalpten kan alındı. Diğer gruplara ise 0. gün intradermal olarak 0,1 ml FCA injeksiyonu yapıldı. 2. grup artrit kontrol grubu olarak ayrıldı. 17-27. günler arası 10 gün boyunca günde tek doz olarak üçüncü gruba salin (1 ml/kg), dördüncü gruba silimarinin çözücüsü dimetil sülfoksit (DMSO), beşinci gruba silimarin (50 mg/kg), altıncı gruba silimarin (100 mg/kg), yedinci gruba silimarin (200 mg/kg) ve pozitif kontrol olan sekizinci gruba ibuprofen (100 mg/kg) uygulandı. Silimarin ve diğer ilaçlar sıçanlara gavaj yoluyla verildi (Şekil 8). Sıçanların ekleminde oluşan artritin, mekanik uyarılmasıyla bacak çekme reaksiyonunu değerlendiren, *Pressure Application Measurement* (PAM) cihazıyla eklemlerdeki mekanik ağrı eşiği ve hipersensivite değerlendirildi (Şekil 9). İnflamatuvar reaksiyon inokülasyon günü 0. gün kabul edilerek; 0, 17 ve 27. günlerde pençelerde oluşan inflamatuvar ödemi ölçmek için kullanılan *Plethysmometre* cihazı ile ölçülerek değerlendirildi (Şekil 10). 0, 17 ve 27. günlerde pençelerde oluşan ödemi ve pençe çapını değerlendirmek için kumpas cihazı kullanıldı. 0, 17 ve 27. günlerde sıçanların sağ arka pençelerinin ağrı eşik tepkisini değerlendirmek için kullandığımız Randall-Selitto cihazıyla ölçüm yapıldı (Şekil 11). Hayvanlar deney sonunda ksilazin/ketamin (10/50 mg/kg, i.p.) anestezisi altındayken kalpten ponksiyon ile kan alındı ve

ötenazi uygulandı. Kuru biyokimya tüpüne alınan kanlar santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve -80 ºC'da çeşitli sitokinler ve MDA düzeyleri ölçülene kadar saklandılar. Lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA Fakültemizin Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan spektrofotometre cihazıyla ve inflamatuvar yanıtın göstergeleri olan sitokinler (TNFα, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10) Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi'nin Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan *Enzyme-linked İmmunosorbent Assay* (ELISA) cihazıyla ölçüldü. Tüm veriler araştırmanın sonunda Fakültemiz Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda istatistiksel olarak değerlendirildi. Sıçanların eklemleri çıkarılarak formole konuldu ve Fakültemiz Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik olarak incelendi.

Şekil 8. Sıçanlara gavaj yöntemiyle ilaç verilmesi

Tablo 2. Gruplar ve ilaç isimleri

Gruplar	İlaç ismi	Günler
1. grup	-	17-27. gün
2. grup	FCA (0,1 ml-tek doz)	17-27. gün
3. grup	Salin (1 ml/kg)	17-27. gün
4. grup	DMSO (1 ml/100g)	17-27. gün
5. grup	Silimarin (50 mg/kg)	17-27. gün
6. grup	Silimarin (100 mg/kg)	17-27. gün
7. grup	Silimarin (200 mg/kg)	17-27. gün
8. grup	İbuprofen (100 mg/kg)	17-27. gün

KULLANILAN CİHAZLAR

Spektrofotometre : (Spectronic Biotek Elx 800, ABD)
Elektronik Tartı : (Denver Instrument APX-200, ABD)
Soğutmalı santrifüj : (MPW 350R, Polonya)
Soğutmalı santrifüj : (Hettich Micro 220r, Almanya)
Su banyosu : (Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere)
Vorteks : (Nüve NM110, Türkiye)
Derin dondurucu : (Thermo Elektron Corporation, USA)
Ph Metre : (Inolab, Level I, Almanya)
Manyetik karıştırıcı : (Heidolph MR 3001, Almanya)
Distile su cihazı : (Millipore, Fransa)
PAM : (Ugo Basile, İtalya)
Pletismometre : (Ugo Basile, İtalya)
Randall-Selitto: : (Ugo Basile, İtalya)

BASINÇ UYGULAMA ÖLÇÜMÜ CİHAZI

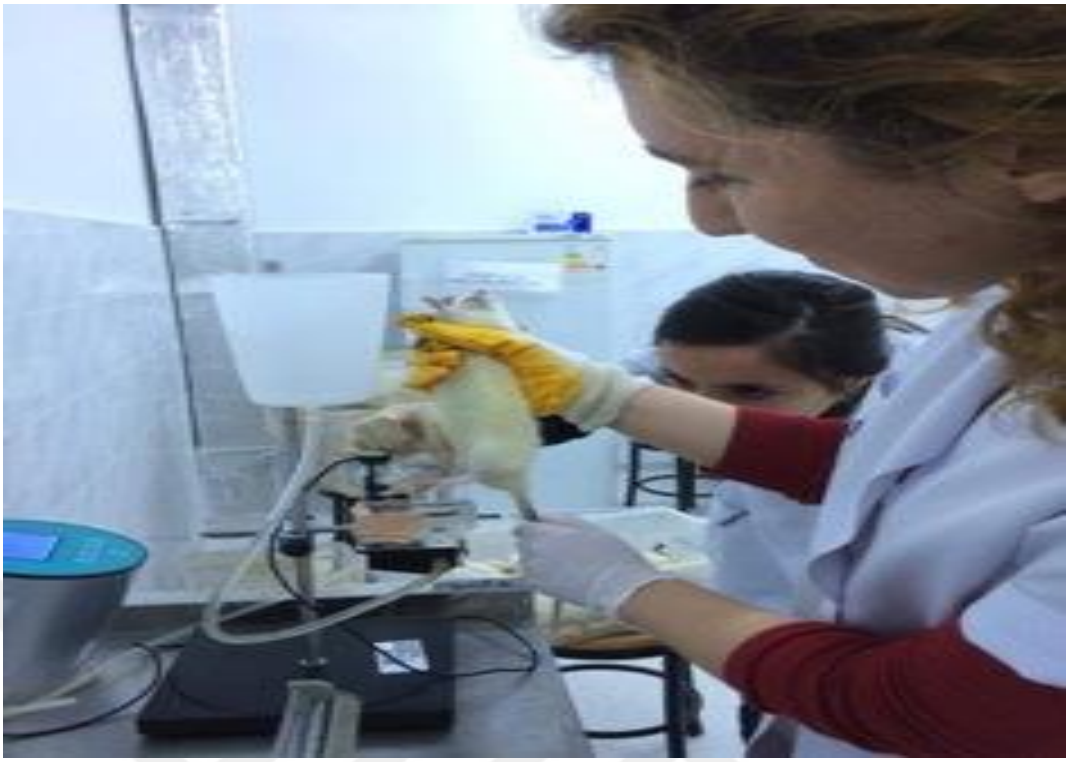
Basınç uygulama ölçümü (*Pressure Application Measurement*-PAM) cihazı yeni ve kullanımı kolay bir alettir. Kemirgenlerde, eklem hipersensivite deney modellerinde mekanik ağrı eşiğinin ölçülmesinde kullanılır. PAM cihazı, özellikle artrit çalışmalarında eklem

ağrısının değerlendirilmesinde mekanik uyarı verici olarak dizayn edilmiş bir cihazdır. PAM cihazı eklemin doğrudan uyarılması için ölçülebilir bir kuvvet uygulayan sensör içerir, uygulayıcı el başparmağına özel bu kuvvet sensörünü giyer ve yanıt hayvanın ayak ya da bacağını geri çekmesi ile ortaya çıkar. Cihaz elektrikle ya da pille çalışır ve bilgisayara bağlanır (Şekil 9).

Şekil 9. Basınç uygulama ölçümü cihazı

PLETİSMOMETRE

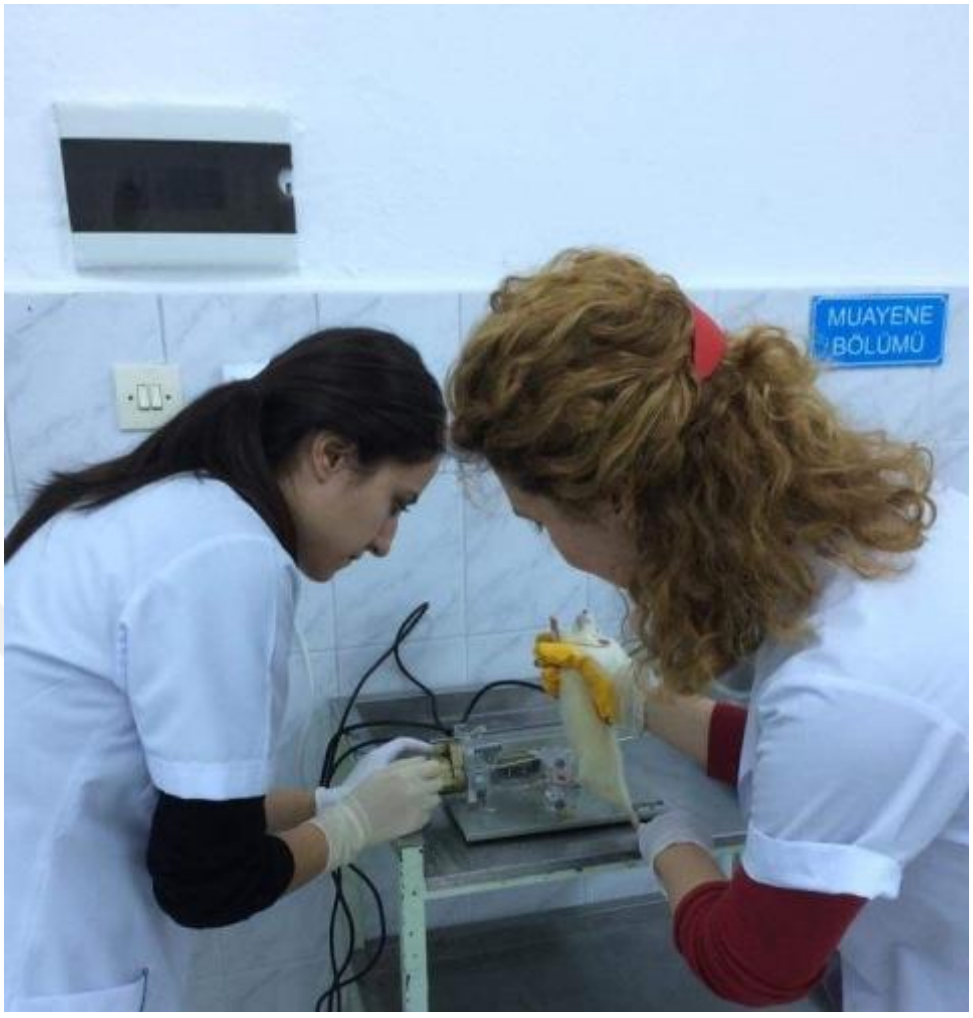
Pletismometre, günümüzde özellikle pençe volümünü ölçmek amacıyla kullanılan en modern cihazdır. *Ugo Basile* markalı pletismometre oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu cihazlarla yapılan ölçümlerde % 4'lük hata olasılığı ihmal edilebilir olarak değerlendirilmektedir. Farmakolojik deney düzeneklerinden birisi olan deney hayvanlarından kayıt almaya yarayan kaydedici ile beraber kullanılabilir. Deney hayvanlarının araştırıcı tarafından uygun şekilde tutulması ile hayvandan alınabilen pençe hacim özelliklerini elektriksel sinyallere dönüştürür. Sinyalleri, kaydedici üzerindeki özel bağlantı ve giriş soketleri aracılığı ile aktarabilir. Cihaz her seferinde 1 adet deney hayvanı ile çalışmaya uygundur (Şekil 10).



Şekil 10. Pletismometre cihazının uygulanışı

RANDALL-SELİTTO (PENÇE BASINÇ TESTİ)

Randall-Selitto testi ya da pençe basınç testi hayvanlarda ağrı yanıtının ölçülmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu testte; ağrı eşik tepkisini değerlendirmek için pençeye eşit olarak artan bir basınç uygulanır. Bir kaçış reaksiyonuna neden olan basınç şiddeti çekilme eşiği olarak tanımlanır. Bu test antiinflamatuvar ve analjezik ilacın hassasiyet taramasında kullanılır. Araştırmacı gücü uygulamak için bir pedala basar, sıçan çırpınmaya başladığında pedalı bırakır ve hayvanın ağrı hissettiği kuvveti okur. Kuvveti artırmak için ek ağırlıklar mevcuttur (Şekil 11).



Şekil 11. Randall-Selitto cihazının uygulanışı

İNTERLÖKİN-1β ÖLÇÜMÜ

Plazma IL-1β düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-1β ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

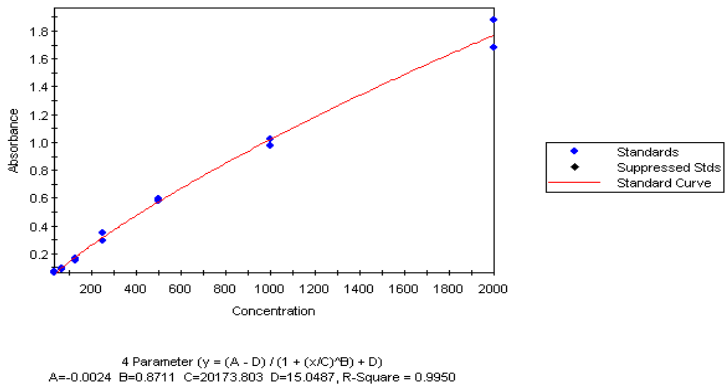
Anti-sıçan IL-1β kaplanmış mikrokuyucuklara örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-1β mikrokuyucuklarda absorbe olmuş anti-sıçan IL-1β antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-1β'ya biyotin ile bağlı ikinci (sekonder) antikor (anti-sıçan IL-1β-biyotin-bağlı) bağlanır. İnkübasyonu takiben, bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan IL-1β yıkama aşamasında ortamdan uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan IL-1β antikoruna bağlanması sağlanır. İnkübasyonu takiben, bağlanmayan streptavidin-HRP yıkama aşamasında uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu tetrametil-benzidin (TMB) kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası reaksiyon durdurma solüsyonu

(asit) eklenerek sonlandırılır ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA IL-1β test kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı mikrokuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan önce tüm mikrokuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albumini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart mikrokuyucuklara eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 2000-1000-500-250-125-62,5-31,3 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için ardından tüm kuyucuklara, 50 µl biyotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-1β-biyotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 3 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm mikrokuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp, oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm mikrokuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün mikrokuyucuklara HRP ile reaksiyon veren TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir mikrokuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 12).

Hesaplama



Şekil 12. İnterlökin-1β kalibrasyon eğrisi

İNTERLÖKİN-2 ÖLÇÜMÜ

Plazma IL-2 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-2 ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

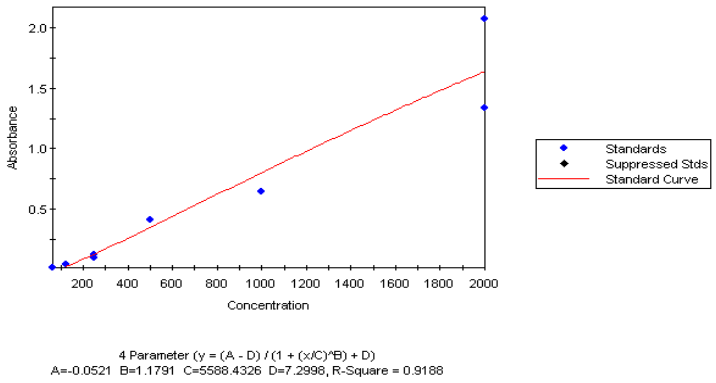
Anti-sıçan IL-2 kaplanmış ELISA mikrokuyucuklarına örnek veya standart konulur. Örnek veya standartta bulunan IL-2 mikrokuyucuklarda bulunan anti-sıçan IL-2 antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-2'ye biyotin ile konjuge edilmiş ikinci (sekonder) antikor (anti-sıçan IL-2-biyotin-bağlı) bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış biyotin bağlı anti-sıçan IL-2 yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenerek biyotinle konjuge olmuş anti-sıçan IL-2 antikoruna bağlanması sağlanır. İnkübasyonu takiben, bağlanmamış streptavidin-HRP ortamdan yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyonu sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon durdurma solüsyonu (asit) ilavesi ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de ölçülür.

Deney

ELISA IL-2 test kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı mikrokuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan tüm mikrokuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart mikrokuyucuklara eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 2000-1000-500-250-125-62,5 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için ardından tüm kuyucuklara 50 µl biyotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-2-biotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında 3 saat boyunca çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 4 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm mikrokuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm mikrokuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün mikrokuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon

sonlandırıldı ve kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 13).

Hesaplama



Şekil 13. İnterlökin-2 kalibrasyon eğrisi

İNTERLÖKİN-6 ÖLÇÜMÜ

Plazma IL-6 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-6 ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

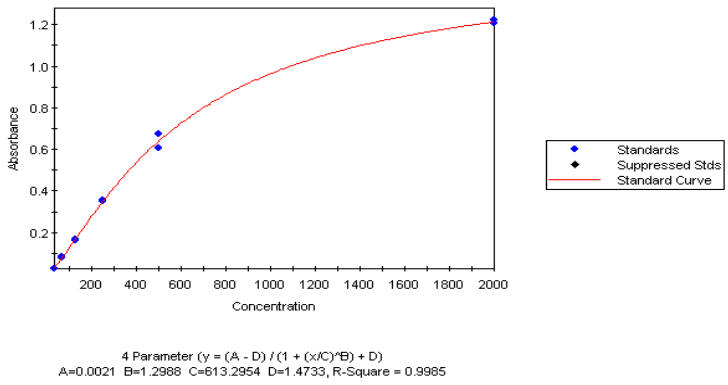
Anti-sıçan IL-6 kaplanmış ELISA mikrokuyucuklarına örnek veya standart konulur. Örnek veya standartta bulunan IL-6 mikrokuyucuklarda bulunan anti-sıçan IL-6 antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan sıçan IL-6'ya biyotinle konjuge edilmiş ikinci (sekonder) antikor (anti-sıçan IL-6-biyotin-bağlı) bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış biyotin bağlı anti-sıçan IL-6 yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenerek biyotinle konjuge olmuş anti-sıçan IL-6 antikoruna bağlanması sağlanır. İnkübasyonu takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyonu sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon durdurma solüsyonu (asit) ilavesi ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de ölçülür.

Deney

ELISA IL-6 test kitinde bulunan tabakada standartların ve örneklerin koyulacağı mikrokuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan önce tüm çukurlar 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albumini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart mikrokuyucuklara 100 µl eksternal olarak dilüsyon yapılan (2000-1000-

500-250-125-62,5-31,3 pg/ml) standartlar konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için ardından tüm kuyucuklara 50 µl biyotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-6-biyotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklar boşaltıldı ve 6 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm mikrokuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm mikrokuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün mikrokuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 14).

Hesaplama



Şekil 14. İnterlökin-6 kalibrasyon eğrisi

İNTERLÖKİN-10 ÖLÇÜMÜ

Plazma IL-10 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-10 ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

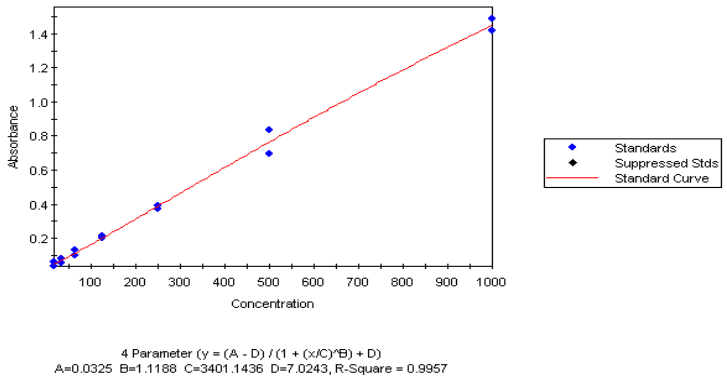
Anti-sıçan IL-10 kaplanmış ELISA mikrokuyucuklarına örnek veya standart konulur. Örnek veya standartta bulunan IL-10 kuyucukları kaplayan anti-sıçan IL-10 antikoru

tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-10'a biyotin ile bağlı ikinci (sekonder) antikor (anti-sıçan IL-10-biyotin-bağlı) bağlanır. Bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan IL-10 yıkanarak uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan IL-10 antikoruna bağlanması sağlanır. İnkübasyonu takiben bağlanmamış streptavidin-HRP yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası reaksiyon durdurma solüsyonu (asit) ilavesiyle sonlandırılır ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA IL-10 kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı mikrokuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan tüm mikrokuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart kuyucuklarına eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 1000-500-250-125-62,5-31,3-15,6 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için ardından tüm kuyucuklara 50 µl biyotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-10-biotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 3 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm mikrokuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm mikrokuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün mikrokuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 15).

Hesaplama



Şekil 15. İnterlökin-10 kalibrasyon eğrisi

TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Plazma TNFα düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA TNFα ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

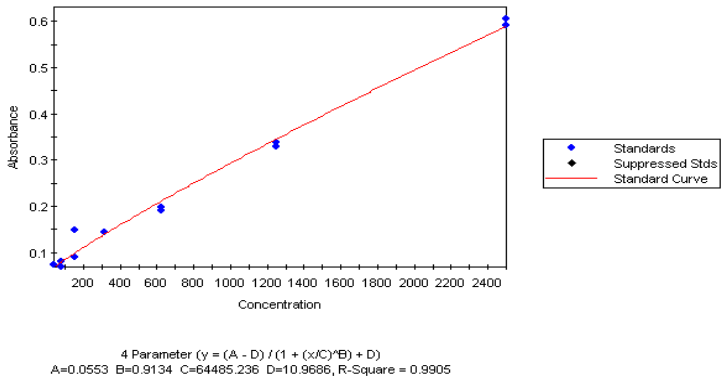
Anti-sıçan TNFα kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart konulur. Örnek veya standartta bulunan TNFα kuyucukları kaplayan anti-sıçan TNFα antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan TNFα'ya biyotin ile bağlı ikinci (sekonder) antikor (anti-sıçan TNFα-biyotin-bağlı) bağlanır. Bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan TNFα yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan TNFα antikoruna bağlanması sağlanır. İnkübasyonu takiben bağlanmamış streptavidin-HRP yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası reaksiyon durdurma solüsyonu (asit) ilavesiyle sonlandırılır ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA TNFα kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı mikrokuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan önce tüm mikrokuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart kuyucuklarına eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 2500-1250-625-312,5-156,3-78,1-39,1 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için ardından tüm

kuyucuklara 50 µl biyotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan TNFα-biyotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıya yerleştirilerek 2 saat boyunca 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 4 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm mikrokuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm mikrokuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün kuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 16).

Hesaplama



Şekil 16. Tümör nekroz faktör-α kalibrasyon eğrisi

MALONDİALDEHİT DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Prensip

Lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın TBA ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi ile oluşan renk spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda ölçülür.

Deney

0,2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0,2 ml %8,1'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 ml %20'lik asetik asit, 1,5 ml %0,8'lik TBA ve 0,6 ml distile su ile karıştırıldı. Bu karışım 95°C'deki sıcak su banyosunda su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek vortekste 1 dakika

karıştırıldı. Organik faz 4000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Histopatolojik incelemelerin yapılması için sağ ayak bileği eklemlerini içeren sıçan ayakları Fakültemiz Tıbbi Patoloji Laboratuvarına gönderildi. Sakrifiye edilen sıçan ayakları 24 saat boyunca %10'luk tamponlu nötral formaldehit tespitine bırakıldılar. Daha sonra dekalsifikasyon işlemi için dokular %20'lik formik asit içinde 24 saat bekletildi. 24 saat sonunda dekalsifiye olan örnekler 30 dakika boyunca akan suyun altında yıkanarak gece boyunca alkol takibine alınmıştır. Daha sonra dokular parafine gömülerek 5 mikron kalınlığındaki kesitler lamların üzerine alındı ve rutin hematoksilen eozin (HE) boyası ile boyanarak ışık mikroskobu (Olympus BX51) altında değerlendirildi. Bulgular; inflamasyon, vasküler proliferasyon ve ödem semikantitatif olarak 0-3 arasında değerlendirildi. Sinovyal proliferasyon varlığı veya yokluğu not edildi: 0-lezyon yok, 1-zayıf şiddetli lezyon, 2-orta şiddetli lezyon, 3-şiddetli lezyon olarak kabul edildi. Vasküler proliferasyonun tespiti için 5 büyük büyütme alanındaki (BBA=x40) damarlar sayıldı ve ortalamaları alınarak büyük büyütme alanı başına düşen damar sayısı hesaplandı.

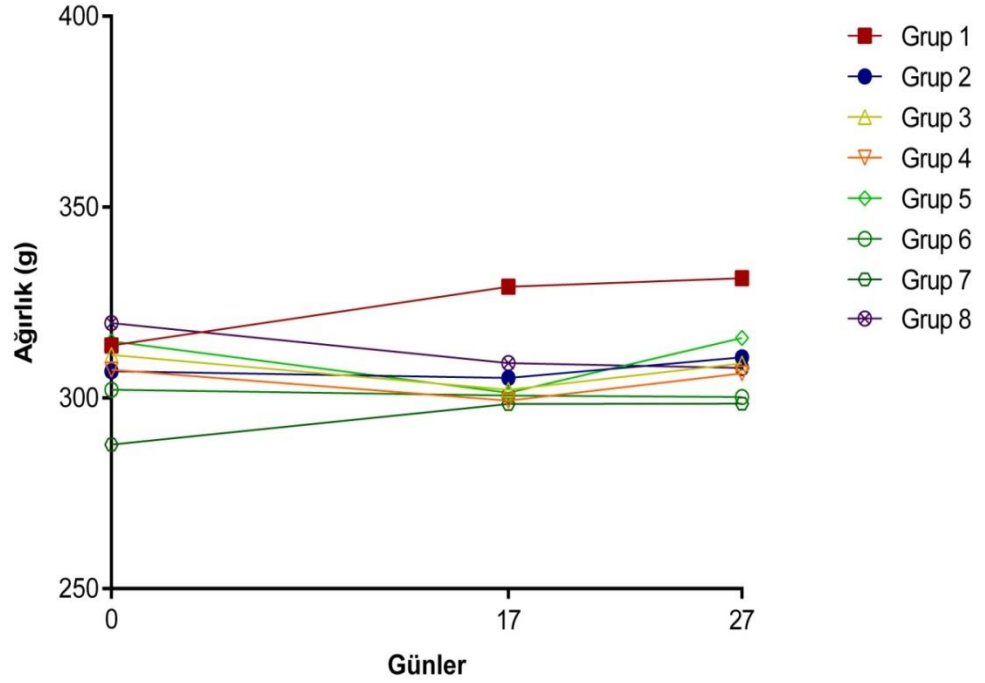
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme, IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp. kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldıktan sonra normal dağılıma uymadığı için gruplar arasında karşılaştırmalarda Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Her bir grup için incelenen değişkenlerin zamana bağlı değişiminin kyaslanmasında Friedman ve Wilcoxon eşleştirilmiş dizilerde T testi kullanıldı. Niteliksel verilerde Kolmogorov Smirnov iki örnek testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak Median (Min-Max) değerleri ve aritmetik ortalama±standart sapma, sayı ve yüzdeler verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak seçildi. Grafikler ise Graphpad Prism for Windows Version 6.05 programı kullanılarak çizilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızın ilk gününde (0. gün) tüm sıçanların ağırlıkları tartıldı. Kumpas ile sağ arka ayak pençe çapları ölçüldü. Makroskopik skorlama ile pençeleri derecelendirildi. Pletismometre cihazı ile pençe ödemleri ölçüldü. Mekanik uyarılma ile bacak çekme reaksiyonunu değerlendiren PAM cihazı ile bazal ağrı eşikleri ölçüldü. Basınca dayalı ölçme yöntemi olan Randall-Selitto cihazı ile pençelerindeki ağrı eşik şiddetleri ölçüldü. 1. grup hiçbir işlem yapmadan kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğer gruplardaki (2-3-4-5-6-7 ve 8) sıçanların sağ arka ayak pençelerine intradermal injeksiyonla 0,1 ml FCA uygulandı. İnflamatuvar reaksiyon 0. gün kabul edilerek, sıçanların ağırlık takipleri ile kumpas, PAM, Pletismometre, Randall-Selitto cihazı ile pençe ölçümleri ve makroskopik skorlama 17. ve 27. günlerde tekrarlandı. İlaçların adjuvant artrit üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla grup 2 (FCA grubu) artrit kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra, 17. ve 27. günler arası, üçüncü gruba salin (1 ml/kg), dördüncü gruba silimarinin çözücüsü DMSO (1 ml/100 g), beşinci gruba silimarin (50 mg/kg), altıncı gruba silimarin (100 mg/kg), yedinci gruba silimarin (200 mg/kg) ve sekizinci gruba (pozitif kontrol) ibuprofen (100 mg/kg) verildi. Silimarin ve diğer ilaçlar sıçanlara gavaj yolu ile uygulandı. 27. günde deneylerin tamamlanmasının ardından hayvanların kalplerinden ksilazin/ketamin (10/50 mg/kg, i.p.) anestezisi altındayken kan alındı. Elde edilen serumda, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α ve MDA düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sıçanların sağ arka ayak eklemleri çıkarılarak histopatolojik olarak incelendi. Tüm veriler kendi içinde ve gruplar arasında karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Yapılan ölçümlerde sıçanların ağırlık takibinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 17) (Tablo 3).



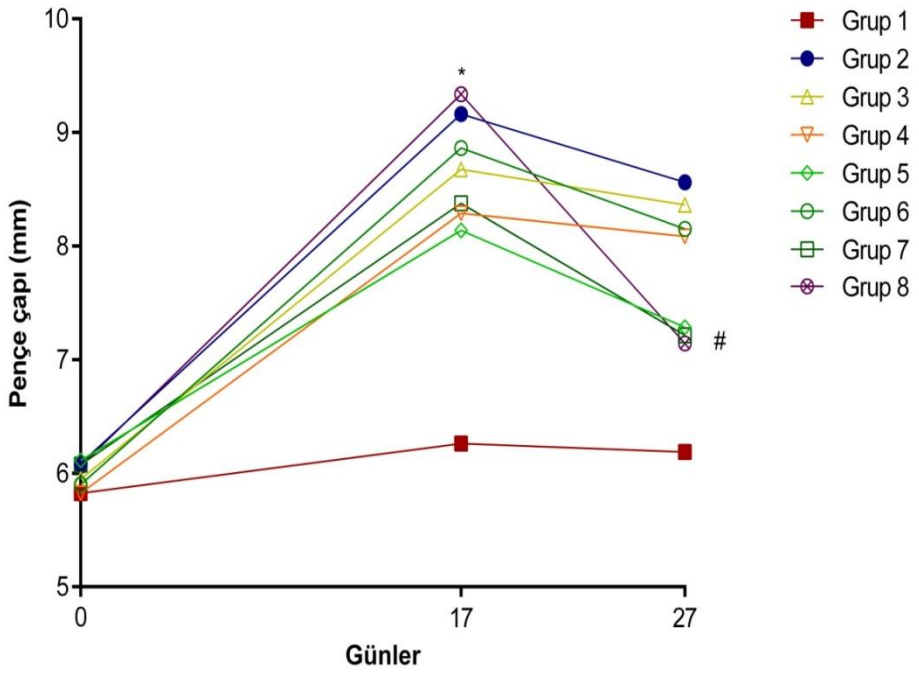
Şekil 17. Ağırlık takibi (g)

Tablo 3. Tüm gruplarda ağırlık ortalamaları (g) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	27. gün
Grup 1	313,750±25,059	329,125±29,123	331,375±27,360
Grup 2	307,000±20,227	305,250±17,011	310,625±16,291
Grup 3	311,250±42,389	302,125±39,084	309,000±39,115
Grup 4	307,375±29,947	299,250±31,208	306,429±18,500
Grup 5	314,875±20,863	301,375±14,101	315,714±16,875
Grup 6	302,125±16,409	300,625±16,326	300,250±16,723
Grup 7	287,750±25,167	298,375±28,142	298,500±19,009
Grup 8	319,625±40,164	309,125±36,412	307,856±34,762

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma.

17. günde *Freund's Complete Adjuvant* uygulanan grupların (grup 2-3-4-5-6-7 ve 8) kumpas cihazı ile ölçülen pençe çapı değerleri, kontrol grubuna göre (grup 1) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde arttı. Bu da bize *Freund's Complete Adjuvant* uygulanan grupların hepsinde adjuvant artritin başarıyla oluştuğunu göstermektedir. 27. günde yapılan ölçümlerde ise grup 2 (FCA grubu)'ye göre 3-4-6. grupların pençe çapı değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azaldı. Grup 5-7-8'in pençe çapı değerlerinin ise grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde azaldığı tespit edildi. Bu durum ibuprofene benzer şekilde silimarinin 50 ve 200 mg/kg dozunun adjuvant artrit bulgularından olan pençe çapı artışını, ödem ve inflamasyonu tedavi ettiğini göstermektedir (Şekil 18) (Tablo 4).



Şekil 18. Sağ pençe takibi (kumpas)

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

Tablo 4. Tüm gruplarda kumpas ortalamaları (mm) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	27. gün
Grup 1	5,825±0,373	6,263±0,338	6,188±0,236
Grup 2	6,088±0,309	9,163±0,672*	8,563±0,472
Grup 3	5,952±0,342	8,675±0,607*	8,363±0,169
Grup 4	5,825±0,306	8,288±0,815*	8,086±1,066
Grup 5	6,113±0,476	8,138±0,389*	7,285±0,253#
Grup 6	5,900±0,267	8,863±0,927*	8,150±1,035
Grup 7	6,075±8,231	8,375±0,744*	7,214±0,482#
Grup 8	6,063±0,437	9,338±0,661*	7,143±0,306#

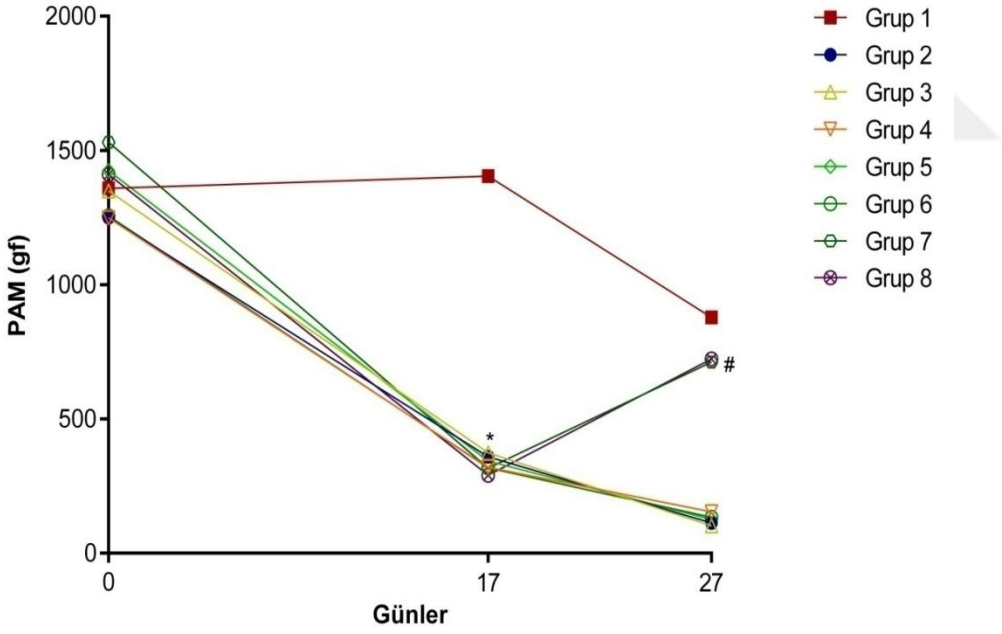
Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma.

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

0. günde, FCA injeksiyonu yapılmadan önce tüm gruplarda PAM cihazıyla eklemlere uygulanan basınca karşı sıçanın bazal ağrı eşiği ve gösterdiği hipersensivite ölçüldü. FCA uygulanan grupların PAM ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 1. grup (kontrol grubu) hariç diğer gruplarda basınca karşı duyarlılığın arttığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin kısaldığı ve bunların da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Şekil 19) (Tablo 5). Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu ve ağrılı uyarana karşı pençelerinin duyarlılığının arttığını göstermektedir. 27. günde yapılan ölçümlerde ise grup 2 ile yapılan karşılaştırmalarda 7 ve 8. grupların basınca karşı duyarlılığın azaldığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır. Bu da silimarinin 50 ve 100 mg/kg dozlarında analjezik etkisinin bulunmadığını fakat grup 7 (silimarin 200 mg/kg)'nin ibuprofene benzer şekilde analjezik etkisinin olduğunu göstermiştir.

1. grubun 17. günden sonra değerlerindeki azalmanın sebebinin; basınç uygulamasına bağlı pençe hassasiyetinin artması ve sıçanların daha kısa sürede yanıt vermelerini öğrenmeye bağlı geri çekme olarak değerlendirebiliriz. (Şekil 19) (Tablo 5).



Şekil 19. Sağ pençe takibi (PAM)

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

Tablo 5. Tüm gruplarda sağ pençe PAM ortalamaları (gf) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	27. gün
Grup 1	1359,225±248,782	1404,500±180,011	878,150±277,391
Grup 2	1249,550±286,579	359,625±80,261*	112,888±38,929
Grup 3	1349,750±119,763	374,288±129,119*	102,563±18,963
Grup 4	1248,388±219,042	320,800±102,067*	154,518±71,554
Grup 5	1425,075±236,308	343,563±136,224*	125,243±48,900
Grup 6	1256,100±341,545	317,638±102,855*	134,338±58,840
Grup 7	1530,725±139,899	317,375±125,738*	712,100±248,852#
Grup 8	1411,113±212,749	290,338±107,252*	731,871±172,269#

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma.

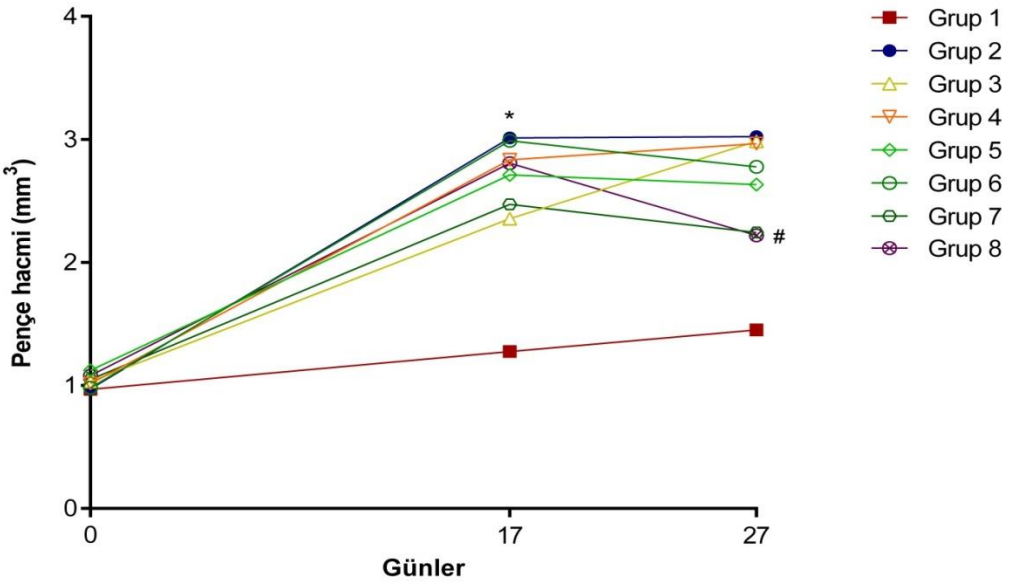
*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

Freund's Complete Adjuvant uygulanan grupların 0, 17 ve 27. günlerde pletismometre cihazı ile sağ arka pençelerinin hacimleri ölçüldü. FCA uygulanan grupların 17. gündeki pençe hacim değerleri kontrol grubu ile (grup 1) ve 0. gündeki değerleri ile karşılaştırıldığında tüm sıçanlarda sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) olduğu saptandı (Şekil 20) (Tablo 6). Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu göstermektedir.

27. günde grup 2'ye göre yapılan karşılaştırmalarda pençe hacmindeki inflamasyon ve ödemi çözerek pençe hacmini azaltması açısından en etkili ve istatistiksel olarak anlamlı

(p<0,05) tedavi grubunun grup 7 (silimarin 200 mg/kg) ve grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg) olduğu görülmüştür (Şekil 20) (Tablo 6).



Şekil 20. Sağ pençe takibi (pletismometre)

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

Tablo 6. Tüm gruplarda sağ pençe pletismometre ortalamaları (mm^3) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	27. gün
Grup 1	0,969±0,119	1,275±0,167	1,453±0,168
Grup 2	0,974±0,108	3,013±0,138*	3,023±0,155
Grup 3	1,033±0,218	2,355±0,267*	2,984±0,195
Grup 4	1,016±0,059	2,834±0,281*	2,966±0,140
Grup 5	1,124±0,131	2,711±0,203*	2,634±0,327
Grup 6	0,983±0,131	2,989±0,448*	2,778±0,413
Grup 7	1,050±0,113	2,471±0,362*	2,243±0,178#
Grup 8	1,080±0,141	2,806±0,411*	2,220±0,281#

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma.

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

Freund's Complete Adjuvant uygulanan gruplar 0, 17 ve 27. günlerde Randall-Selitto cihazı ile ağrı yanıtının ölçüldüğü pençe basınç testi uygulandı. 17. gün verilerinde kontrol grubuyla (grup 1) yapılan karşılaştırmalarda grup 4 (DMSO grubu) hariç bütün grupların verileri istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0,05$) bulunmuştur. 27. günde yapılan ölçümlerde ise grup 2 ile yapılan karşılaştırmalarda grup 5 (silimarin 50 mg/kg), grup 7 (silimarin 200 mg/kg) ve grup 8'de (ibuprofen 100 mg/kg) Randall-Selitto cihazında ağrılı uyarana karşı verdikleri yanıtın azaldığı gözlenmiştir. Ancak bu verilerden grup 2 ve grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanmıştır (Şekil 21) (Tablo 7).

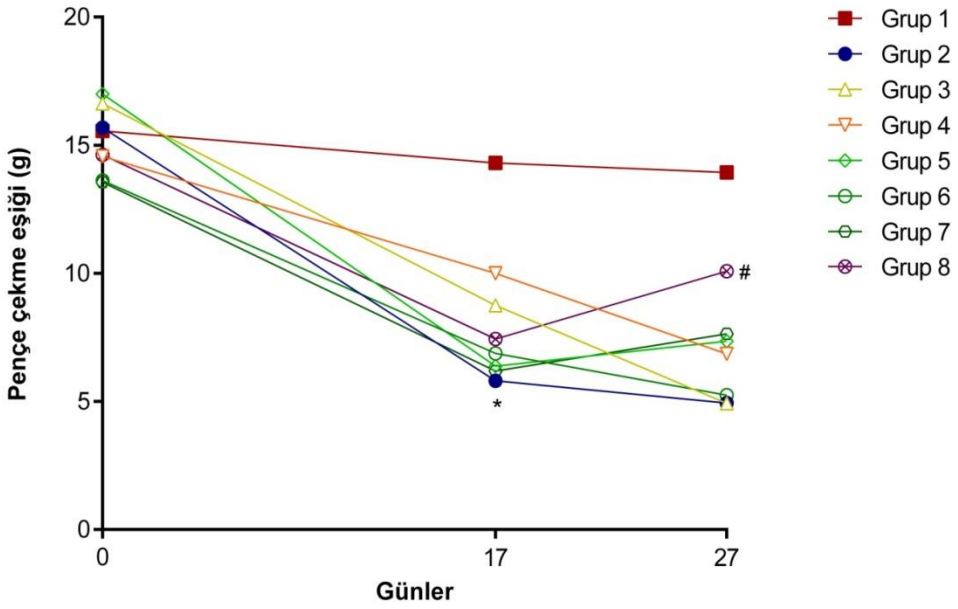
Tablo 7. Tüm gruplarda sağ pençe Randall-Selitto ortalamaları (g) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	27. gün
Grup 1	15,563±4,909	14,313±4,629	13,938±2,528
Grup 2	15,688±4,621	5,813±2,052*	4,938±1,741
Grup 3	16,625±4,772	8,750±2,188*	4,928±0,979
Grup 4	14,563±5,653	10,000±2,000	6,856±1,059
Grup 5	17,000±4,000	6,375±1,959*	7,356±2,655
Grup 6	13,625±3,420	6,875±2,100*	5,250±3,024
Grup 7	13,563±3,717	6,188±1,308*	7,643±2,183
Grup 8	14,625±4,077	7,438±1,700*	10,089±2,633#

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma.

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma



Şekil 21. Sağ pençe takibi (Randall-Selitto)

*p<0,05; 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırma

#p<0,05; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

İNTERLÖKİN 1-BETA DÜZEYİ

Serum IL-1β düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle nM düzeyinde ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Normal dağılıma uygunluk gösterdiği belirlendi. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi testi uygulandı. Gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 22) (Tablo 8).

Şekil 22. Gruplara göre interlökin-1β düzeylerinin dağılımı

Tablo 8. İnterlökin-1β düzeyi ortalama ve standart sapmaları (nM)

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
Ort ± SD	50,567±22,680	73,003±31,624	64,148±31,900	80,789±21,146	66,251±27,177	43,475±18,209	48,094±27,645	88,368±7,679

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

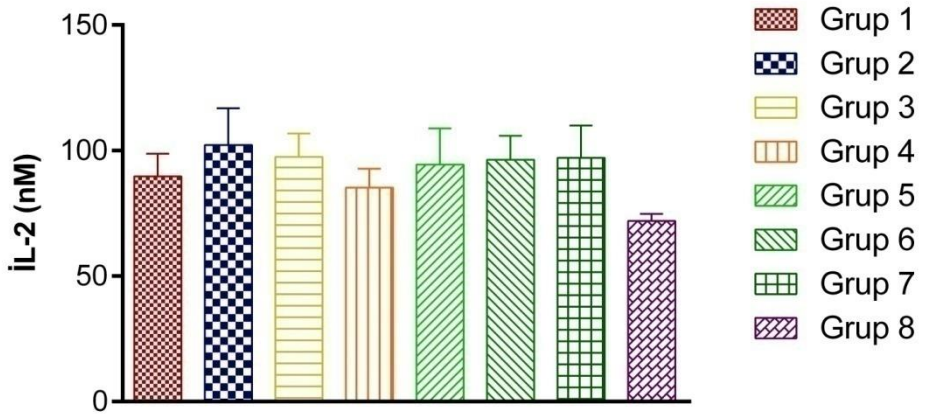
Tablo 9. İnterlökin-2 düzeyi ortalama ve standart sapmaları (nM)

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
Ort ± SD	89,754±16,031	102,247±24,058	97,522±23,525	85,295±48,366	94,513±42,581	96,352±14,465	97,164±16,158	72,015±14,006

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

SERUM İNTERLÖKİN-2 DÜZEYİ

Serum IL-2 düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle nM düzeyinde ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Normal dağılıma uygunluk gösterdiği belirlendi. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi testi uygulandı. 27. günde gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 23) (Tablo 9).



Şekil 23. Gruplara göre interlökin-2 düzeylerinin dağılımı

SERUM İNTERLÖKİN-6 DÜZEYİ

Serum IL-6 düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle nM düzeyinde ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Normal dağılıma uygunluk gösterdiği belirlendi. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi testi uygulandı 27. günde gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 24) (Tablo 10).

Tablo 10. İnterlökin-6 düzeyi ortalama ve standart sapmaları (nM)

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
Ort ± SD	42,149±5,973	38,352±6,051	40,535±6,610	40,621±10,844	42,239±4,655	36,560±5,513	40,170±2,208	39,201±4,274

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

Tablo 11. İnterlökin-10 düzeyi ortalama ve standart sapmaları (nM)

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
Ort ± SD	22,351±11,002	37,313±6,124	27,126±21,124	33,437±15,765	26,419±18,359	29,293±6,918	46,600±31,434	40,319±10,867

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

Şekil 24. Gruplara göre interlökin-6 düzeylerinin dağılımı

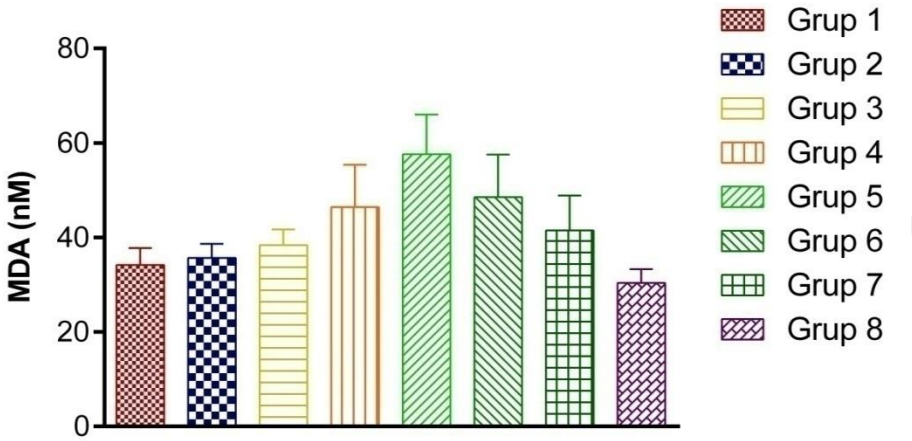
SERUM İNTERLÖKİN-10 DÜZEYİ

Serum IL-10 düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle nM düzeyinde ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Normal dağılıma uygunluk gösterdiği belirlendi. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi testi uygulandı. 27. günde gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 25) (Tablo 11).

Şekil 25. Gruplara göre interlökin-10 düzeylerinin dağılımı

SERUM MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ

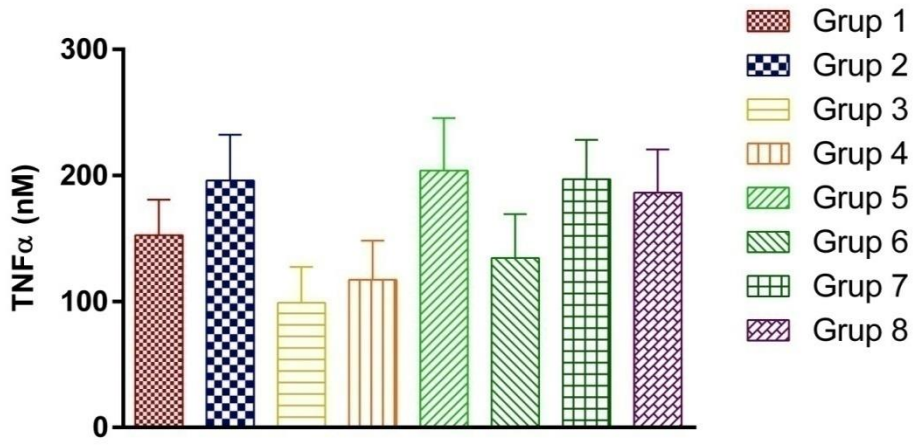
Serum MDA düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle nM düzeyinde ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Normal dağılıma uygunluk göstermediği tespit edildi. Gruplar arası karşılaştırma için Nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. Gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 26) (Tablo 12).



Şekil 26. Gruplara göre MDA düzeylerinin dağılımı

SERUM TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA DÜZEYLERİ

Serum TNFα düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle nM düzeyinde ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Normal dağılıma uygunluk gösterdiği belirlendi. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi testi uygulandı. Gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 27) (Tablo 13).



Şekil 27. Gruplara göre TNFα düzeylerinin dağılımı

Tablo 12. MDA ortalama ve standart sapmaları (nM)

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
Ort ± SD	34,160±10,341	35,640±23,922	38,400±18,489	46,445±8,499	57,645±23,388	48,560±26,274	41,462±15,536	30,354±11,857

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

Tablo 13. TNFα ortalama ve standart sapmaları (nM)

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
Ort ± SD	152,529±95,763	196,017±98,579	98,987±77,068	117,273±42,296	203,782±95,900	134,565±112,396	197,120±67,545	186,372±7,400

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

0. günde FCA injeksiyonu yapılmadan önce tüm gruplarda sağ arka ayak pençelerini makroskopik skorlama yöntemiyle 0-4 arasında derecelendirdik. 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2-3-4-5-6-7 ve 8) grup içi karşılaştırmalarda tüm sıçanlarda sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu göstermektedir (Tablo 14). 27. günde grup 2'ye göre yapılan karşılaştırmalarda ise grup 4-5-6-7 ve 8'in pençe hacminde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) azalma olduğu görülmüştür (Tablo 14).

Tablo 14. Tüm gruplarda sağ pençelerde makroskopik skor ortalamaları (Ort ± SD)

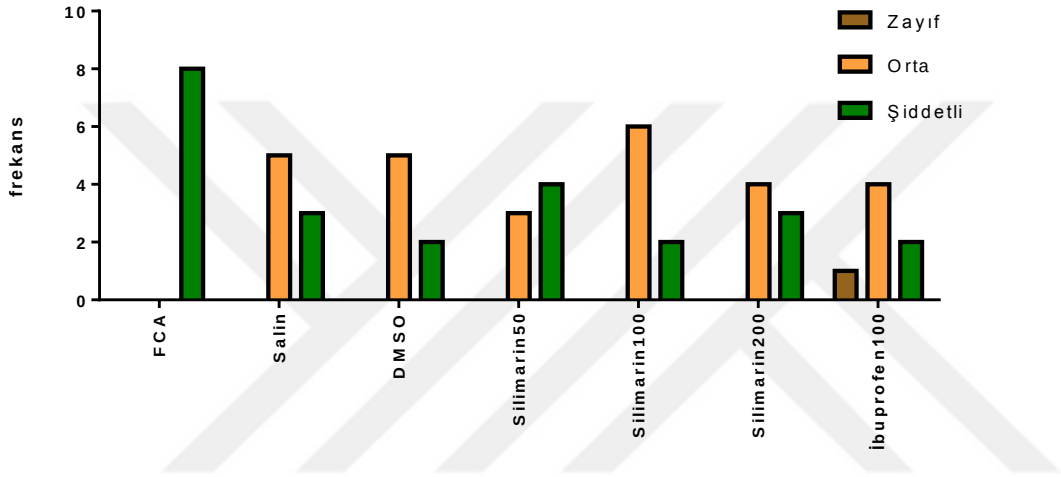
	0. gün	**17. gün**	**27. gün**
Grup 1	0	0	0
Grup 2	0	4,00±0,00$^{*\#}$	3,88±0,354
Grup 3	0	3,75±0,463$^{*\#}$	3,75±0,463
Grup 4	0	3,86±0,378$^{*\#}$	3,29±0,488$^{¥}$
Grup 5	0	3,86±0,378$^{*\#}$	2,71±0,488$^{¥}$
Grup 6	0	3,75±0,463$^{*\#}$	2,75±0,886$^{¥}$
Grup 7	0	4,00±0,00$^{*\#}$	2,14±0,690$^{¥}$
Grup 8	0	3,86±0,378$^{*\#}$	1,57±0,535$^{¥}$

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

*$p<0,05$; 0-17. gün grup içi karşılaştırma
$^{\#}p<0,05$; 17. günde grup 1 (kontrol grubu)'e göre gruplar arası karşılaştırma
$^{¥}p<0,05$; 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşılaştırma

İnflamasyon

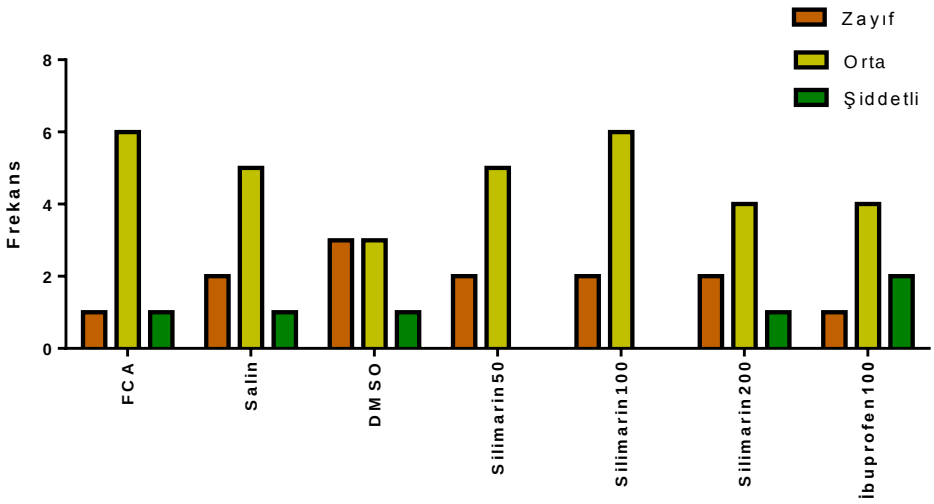
Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1 (kontrol grubu)'deki hayvanlarda inflamasyona rastlanmadı. 2. grupta (FCA grubu) %100 şiddetli görülürken; 3. grubun %62,5'inde orta %37,5'inde şiddetli; 4. grubun %71,4'ünde orta, %28,6'sında şiddetli; 5. grubun %42,9'unda orta, %57,1'inde şiddetli; 6. grubun %75,0'inde orta, %25,0'inde şiddetli; 7. grubun %14,3'ünde zayıf, %57,1'inde orta, %28,6'sında şiddetli; 8. grubun %14,3'ünde zayıf, %57,1'inde orta, %28,6'sında şiddetli inflamasyon görüldü (Şekil 28).



Şekil 28. Gruplara göre inflamasyonun zayıf-orta-şiddetli olarak % değerleri

Vasküler Proliferasyon

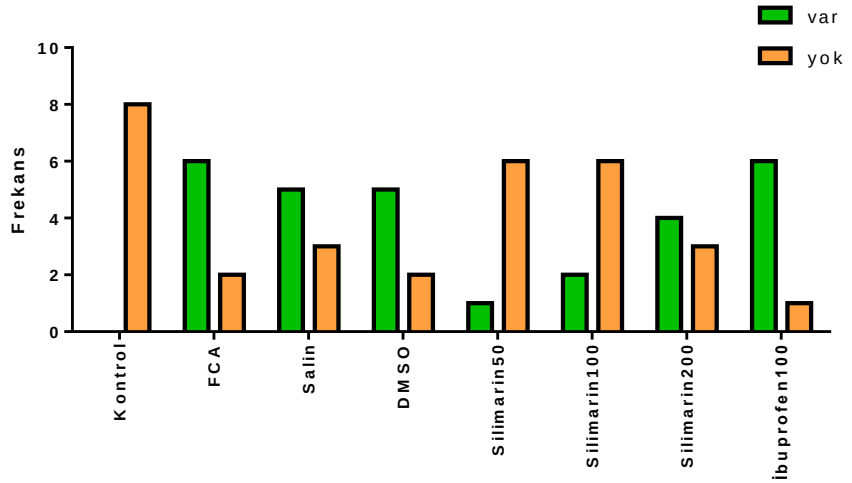
Sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde 40'lık büyütmede 5 alan incelendi. Vasküler yapılar sayıldı ve ortalamaları alındı. 27. günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1 (kontrol grubu)'deki hayvanlarda vasküler proliferasyona rastlanmadı. 2. grupta %12,5 zayıf, %75,0 orta, %12,5 şiddetli görülürken; 3. grubun %25,0'inde zayıf, %62,5'inde orta, %12,5'inde şiddetli; 4. grubun %42,9'unda zayıf, %42,9'unda orta, %14,3'ünde şiddetli; 5. grubun %28,6'sında zayıf, %71,4'ünde orta; 6. grubun %25,0'inde zayıf, %75,0'inde orta; 7. grubun %28,6'sında zayıf, %57,1'inde orta, %14,3'ünde şiddetli; 8. grubun %14,3'ünde zayıf, %57,1'inde orta, %28,6'sında şiddetli vasküler proliferasyon görüldü (Şekil 29).



Şekil 29. Gruplara göre vasküler proliferasyon % değerleri

Sinovyal Proliferasyon

Sıçanların sağ arka ayak histopatolojik incelemelerinde 27. günde grup 1 (kontrol grubu)'de sinovyal proliferasyona rastlanmadı. 2. grupta %75; 3. grupta %62,5; 4. grupta %71,4; 5. grupta %14,3; 6. grupta %25,0; 7. grupta %57,1; 8. grupta %85,7 oranında sinovyal proliferasyon görüldü (Şekil 30).

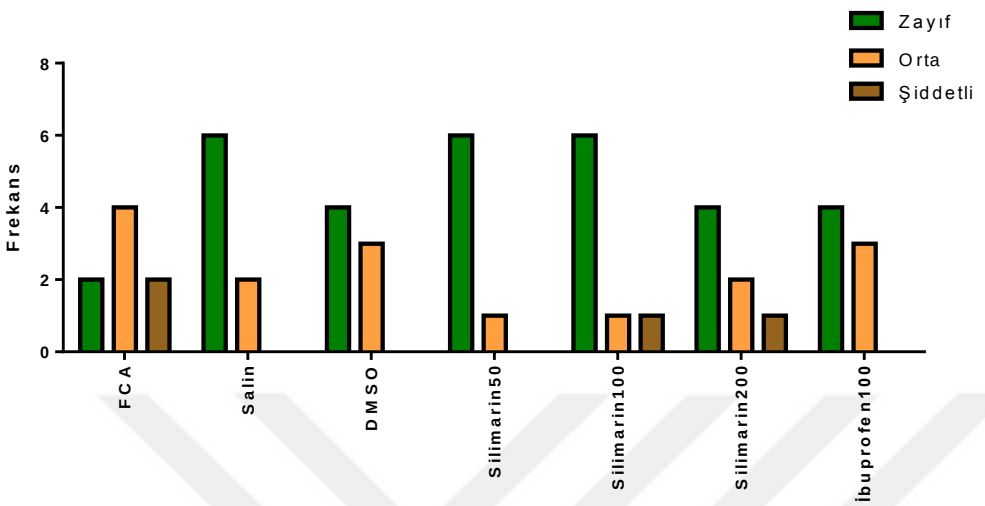


Şekil 30. Gruplara göre sinovyal proliferasyon % değerleri

Ödem

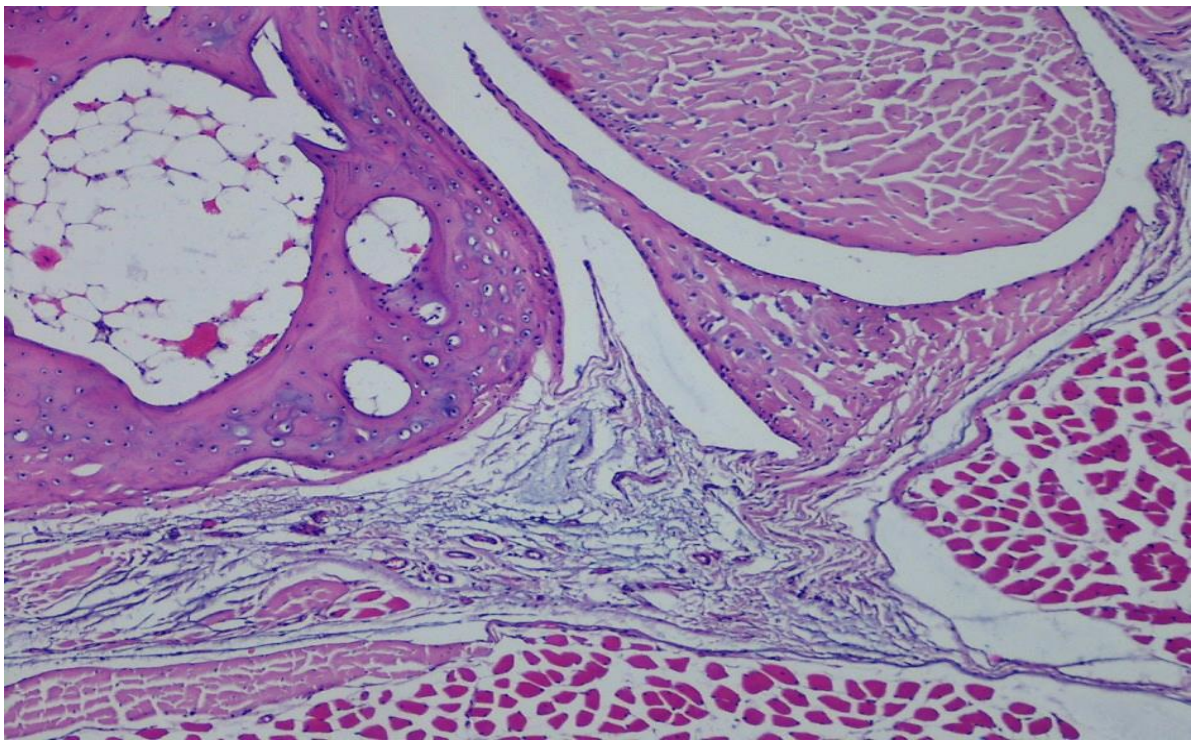
Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1 (kontrol grubu)'deki sıçanlarda ödeme rastlanmadı. 2. grupta %25,0 zayıf, %50,0 orta, %25,0 şiddetli; 3. grupta %75,0 zayıf, %25,0 orta; 4. grupta %57,1 zayıf, % 42,9 orta; 5. grupta

%85,7 zayıf, %14,3 orta; 6. grupta %75,0 zayıf, %12,5 orta, %12,5 şiddetli; 7. grupta %57,1 zayıf, %28,6 orta, %14,3 şiddetli; 8. grupta %57,1 zayıf, %42,9 oranında orta seviyede ödem görüldü (Şekil 31).

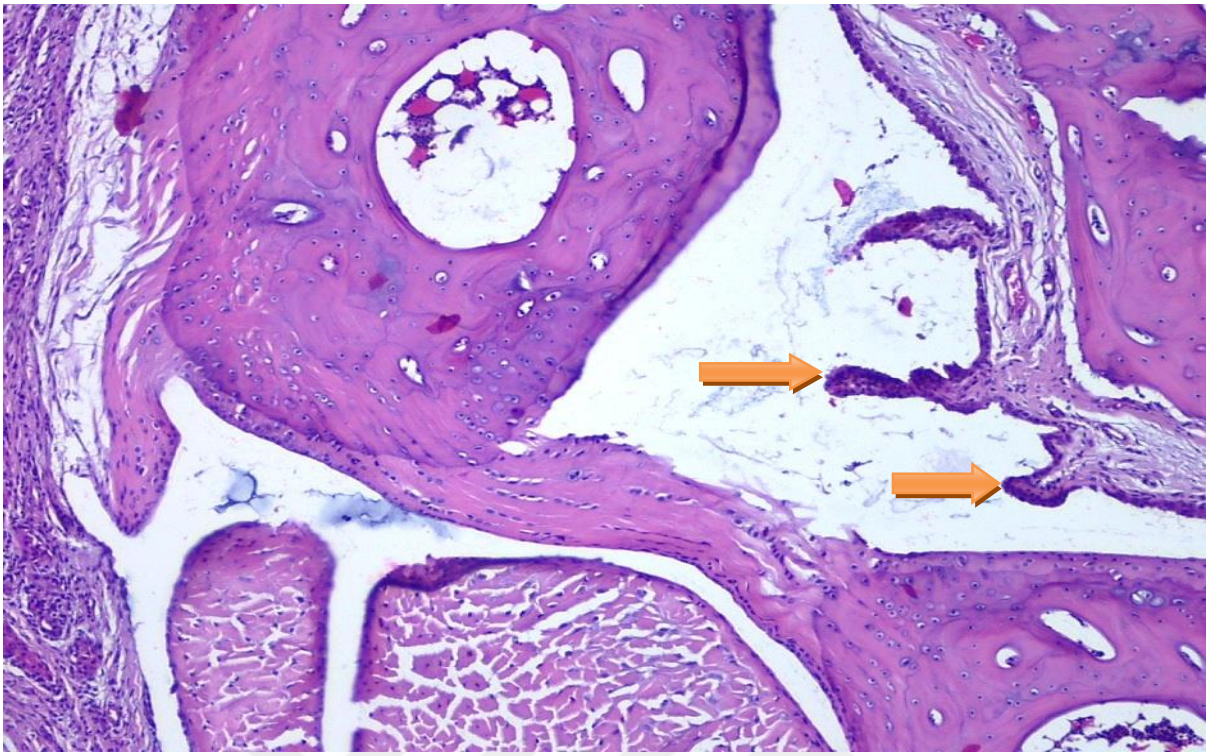


Şekil 31. Gruplara göre ödem % değerleri

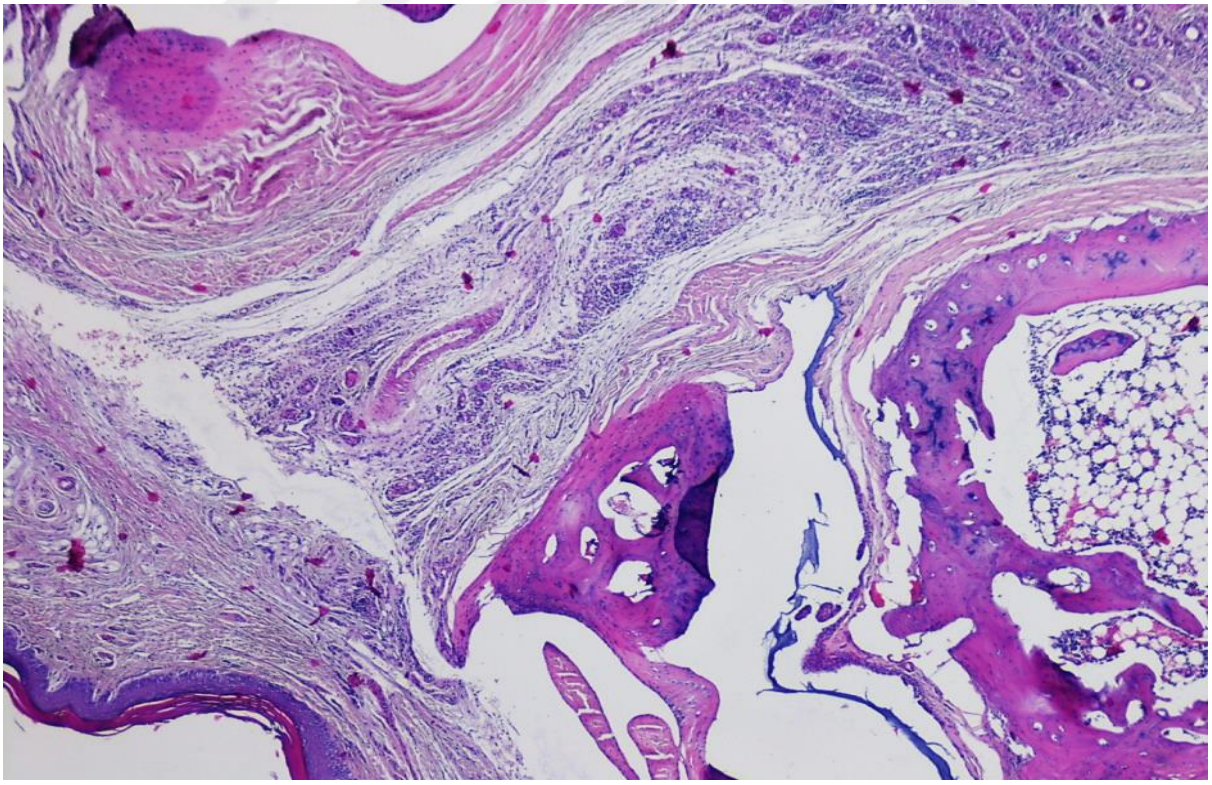
Histopatolojik olarak sıçanların sağ arka ayak pençeleri değerlendirildiğinde görülen normal sıçan pençesi (grup 1) (Şekil 32) ve 1, 2, 3. derece inflamasyon, ödem, vasküler ve sinovyal proliferasyon örneklerini gösteren şekiller (Şekil 33-41) aşağıda gösterilmiştir.



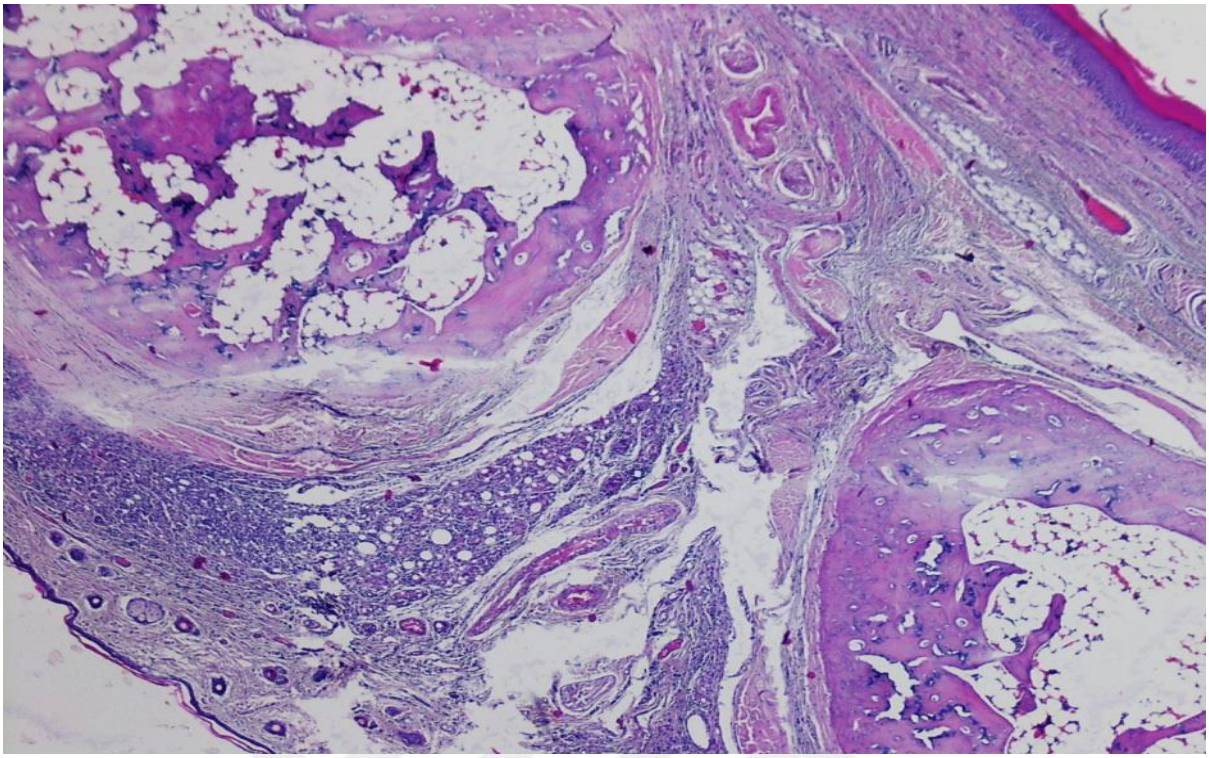
Şekil 32. Normal kemik, eklem aralığı, çizgili kas ve tendon yapıları



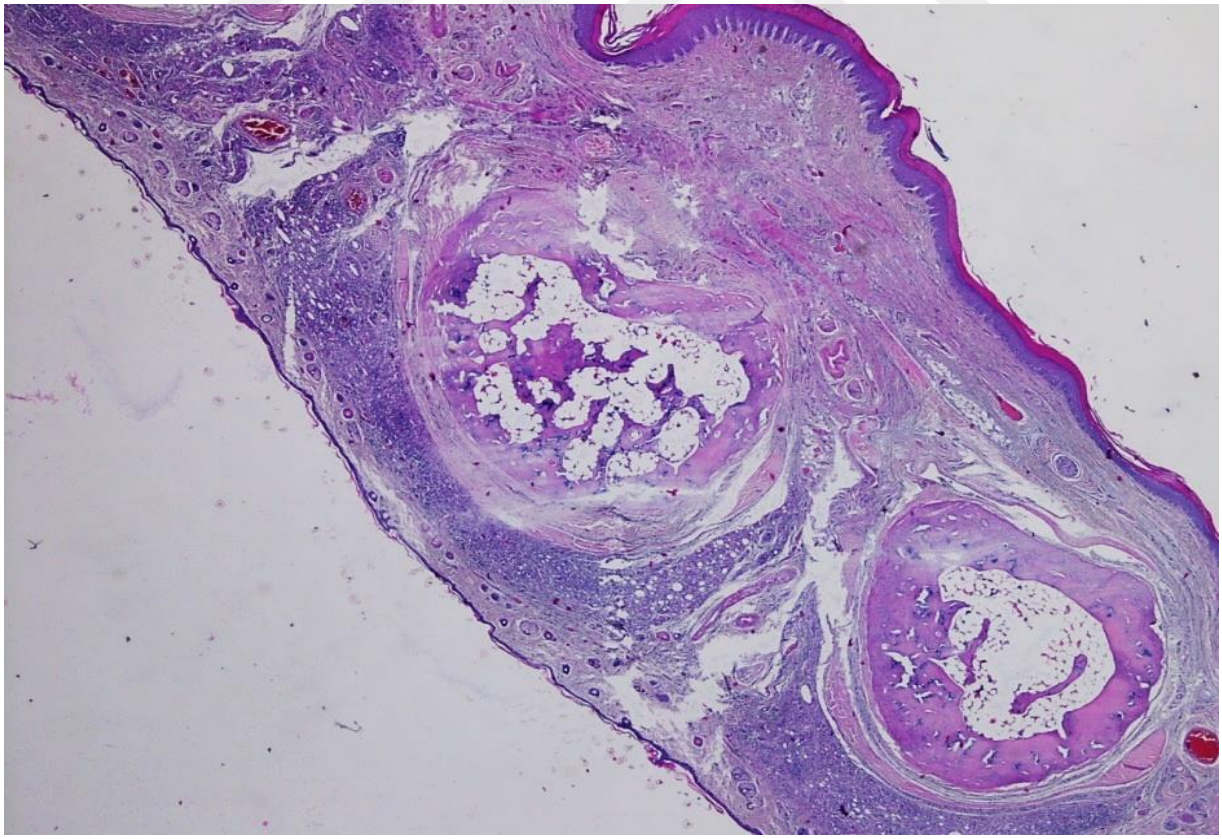
Şekil 33. Eklem boşluğuna doğru papiller uzanımlar yapan prolifere sinovya (HEx40)



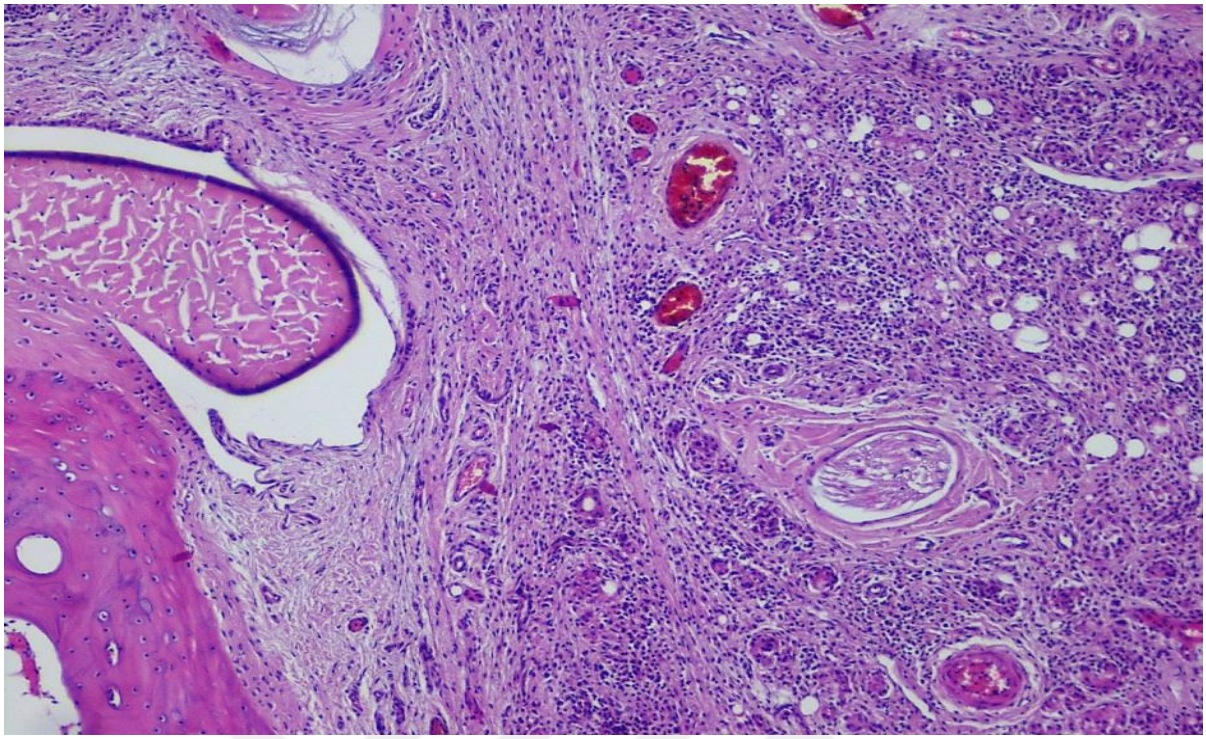
Şekil 34. Eklem çevresi yumuşak dokuda 1. derece kronik inflamasyon (HEx40)



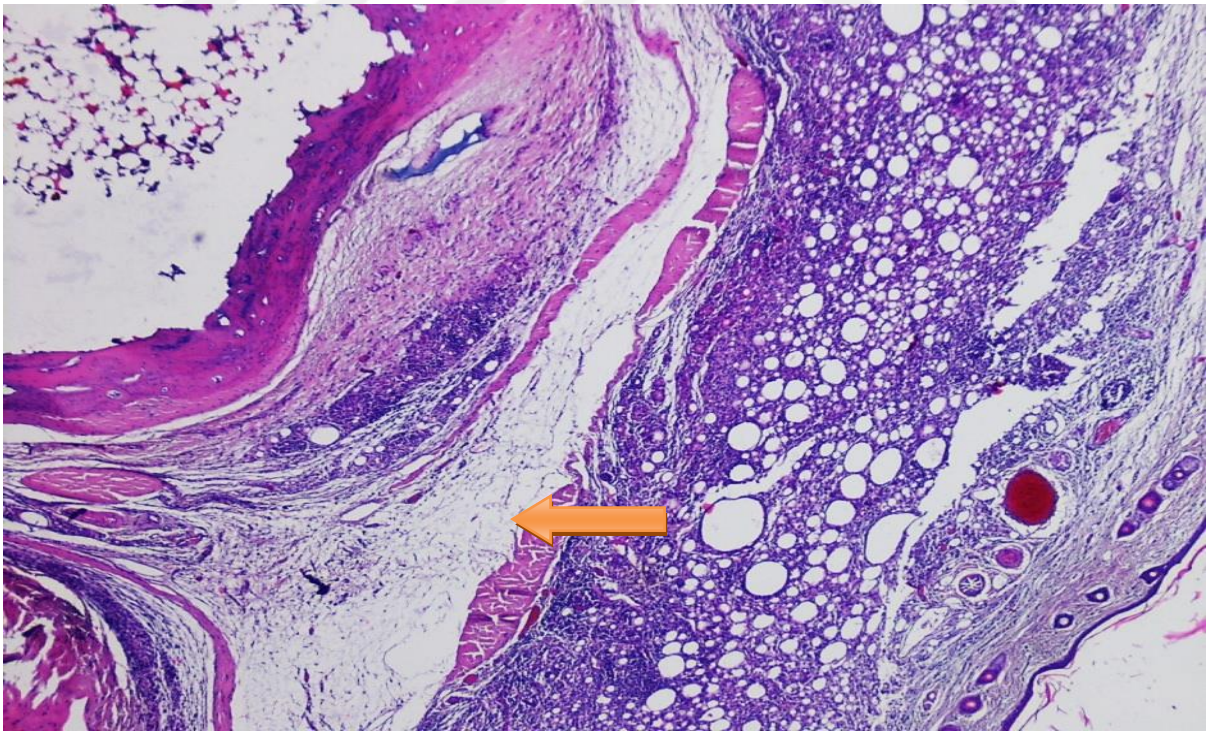
Şekil 35. Eklem çevresi yumuşak dokuda 2. derece kronik inflamasyon (HEx40)



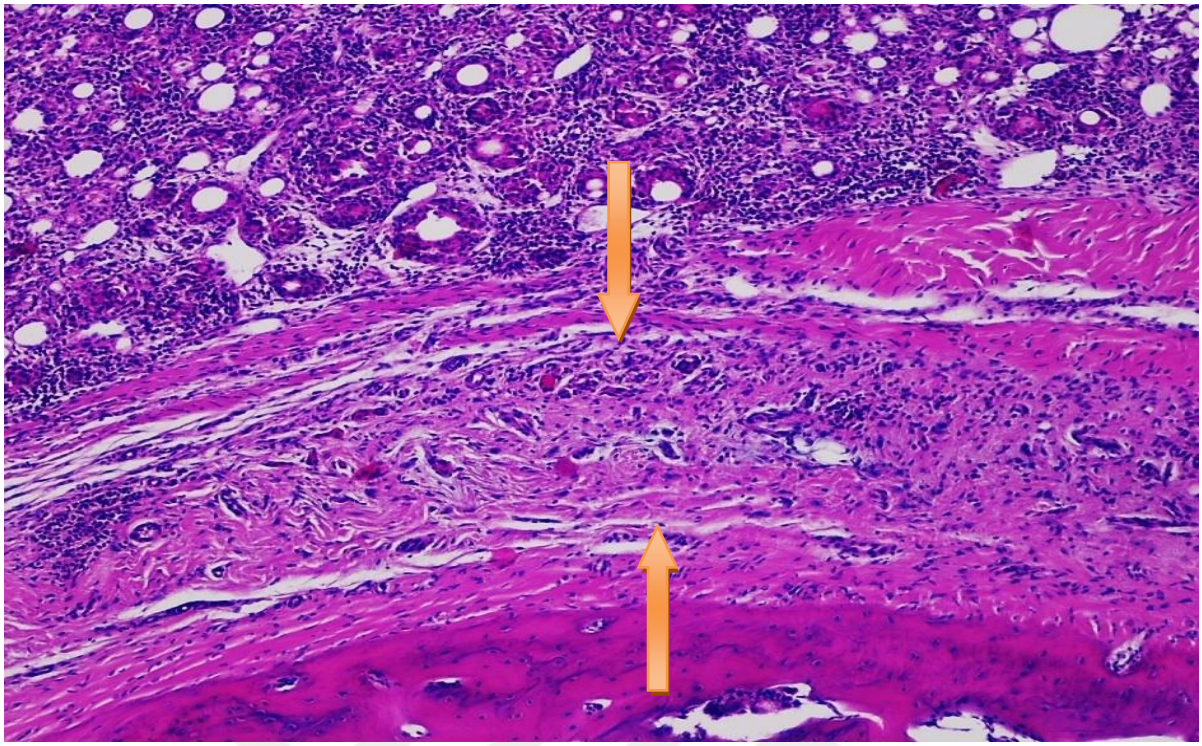
Şekil 36. 2. derece kronik inflamasyon (HEx20)



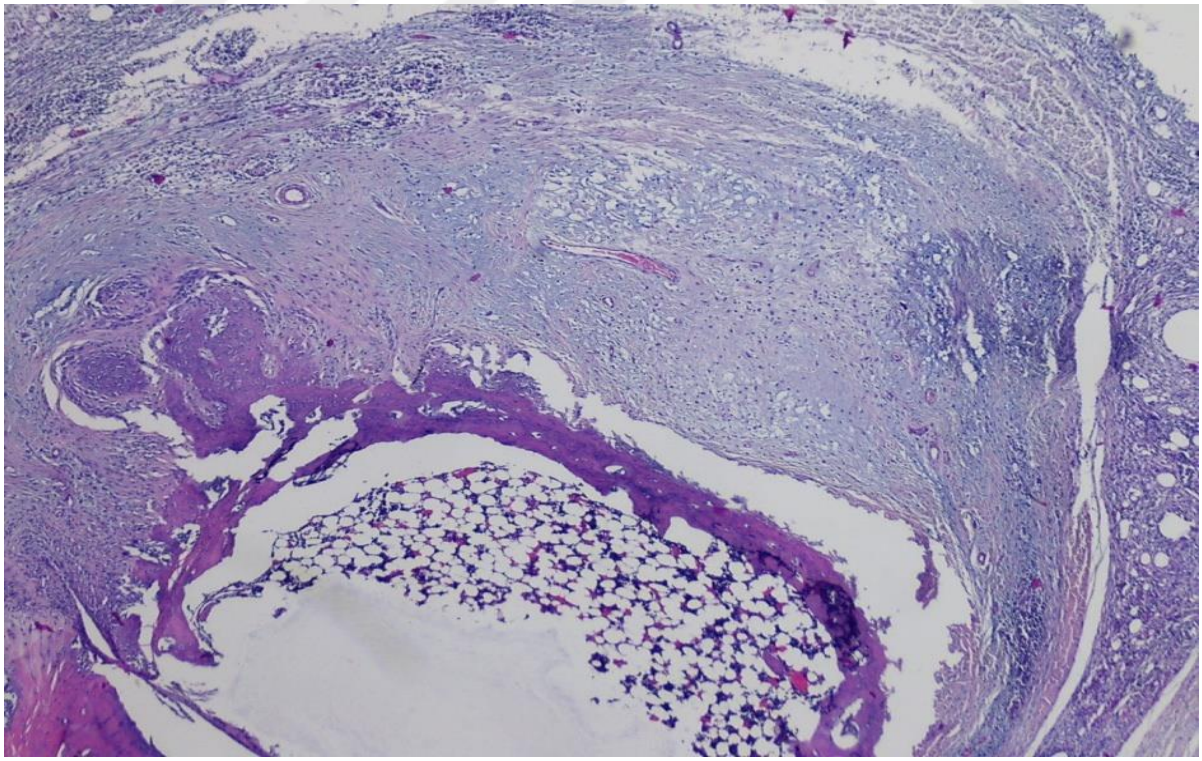
Şekil 37. Orta dereceli kronik inflamasyon (2. derece) ve bir kısmı dilate olan, eritrositle dolu olan artmış sayıda damar yapıları (HEx40)



Şekil 38. Eklem çevresi yumuşak dokuda 3. derece kronik inflamasyon ve 3. derece ödem (ok) (HEx40)



Şekil 39. Şiddetli kronik inflamasyon ve okların arasında kalan bölümde yoğun proliferasyon gösteren (3. derece) damar yapıları (HEx40)



Şekil 40. Eklem aralığında ve çevre yumuşak dokuda şiddetli ödem (HEx20)

TARTIŞMA

Romatoid artrit; etyolojisi belli olmayan, özellikle periferik sinovyal eklemleri tutan, sinovyal hücre proliferasyon ve inflamasyonunun eklemde dekstrüksiyon yapması ile karakterize, multisistemik bir hastalıktır (14). İnflamatuvar artritler arasında en sık görülen romatoid artrit; sıklıkla deri, kan damarları, kalp, akciğer ve kaslar gibi birçok eklem dışı dokuyu da etkiler (18).

Hastalık görülen eklemde hasar oluşturarak sakatlığa neden olurken, klinik seyri, hastadan hastaya büyük değişiklikler gösterir. Bazı hastalarda az sayıda, hafif seyirli ve kısa süreli eklem tutulmaları görülürken, bazılarında tedavi ne kadar yoğun olursa olsun, kısa sürede sakatlıklara ve önemli organ hasarlarına yol açabilmektedir (20,22). Romatoid artrit dünyada tüm ırklarda %1 sıklıkla her yaşta görülebilir. En sık görüldüğü yaşlar 40-60 yaş arasıdır. Hastalık kadınlarda erkeklerden 3 kat daha fazla görülür (20).

Romatoid artrit tedavisini araştırmak için birçok deneysel artrit modeli geliştirilmiştir. Bu modellerden biri de FCA'nın sıçan pençesine injeksiyonu ile oluşturulan adjuvant artrit modelidir ve bu model sıklıkla kullanılmaktadır (86). Bir adjuvant (parafin yağı) ile güçlendirilmiş bir antijene (mikobakteri kapsülündeki) karşı immünolojik yanıt olarak gelişir. Hücresel immün yanıt olarak oluşur ve histopatolojik görünümü romatoid artrit ile çok benzerdir.

Yaptığımız çalışmada, FCA uygulanan grupların kumpas cihazı ile ölçülen pençe ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2-3-4-5-6-7 ve 8) grup içi karşılaştırmalarda tüm

sıçanlarda, sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu göstermektedir. Bu bulgumuz adjuvant artrit modelini başarı ile gerçekleştirdiğimizin göstergesidir.

Çalışmamız; silimarin tedavisinin sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan artrit modelinde etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır ve literatürde deneysel adjuvant artrit modelinde silimarin tedavisinin etkisinin incelendiği ilk çalışma olacaktır. NSAİİ'ler romatoid artrit, osteoartrit ve diğer artritlerin tedavisinde ağrıyı azaltmak, hastalığın şiddetini hafifletmek için kullanılan antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik ajanlardır (87-88). Çalışmamızda ibuprofen; adjuvant artritte görülen inflamasyon ve ağrı üzerindeki bilinen etkisini silimarin ile karşılaştırmak için pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmamızda oluşturduğumuz adjuvant artrit modeline uyguladığımız silimarin tedavisine 17. gün başlandı ve 27.güne kadar devam edildi. Sıçanların ağırlık takibinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. 17. günde grup 1 (kontrol grubu)'e göre tüm tedavi grupları karşılaştırıldığında yapılan ölçümlerde ve 27. günde grup 2 (FCA grubu)'ye göre yapılan gruplar arası karşılaştırmalarda da istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Kumpas cihazı ile ölçülen pençe çapı değerleri 17. günde FCA uygulanan gruplarda (grup 2-3-4-5-6-7 ve 8), kontrol grubuna göre (grup 1) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde arttı. Bu da bize FCA uygulanan grupların tümünde adjuvant artriti başarıyla oluşturduğumuzu göstermiştir. 27. günde yapılan ölçümlerde ise grup 2 (FCA grubu)'ye göre yapılan karşılaştırmalarda grup 3 (salin grubu), grup 4 (DMSO grubu) ve grup 6 (silimarin 100 mg/kg)'nın pençe çapı değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azaldığı görülmüştür. Grup 5 (silimarin 50 mg/kg), grup 7 (silimarin 200 mg/kg) ve grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg)'in pençe çapı değerlerinin ise grup 2 (FCA grubu)'ye göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde azaldığı tespit edildi. Bu bulgularla biz ibuprofene benzer şekilde silimarinin 50 ve 200 mg/kg dozunun adjuvant artrit bulgularından olan pençe çapı artışını, ödem ve inflamasyonu tedavi ettiğini söyleyebiliriz. Pletismometre ile yapılan ölçümde, 17. günde tedavi grupları grup 1 (kontrol grubu)'e göre karşılaştırıldığında tüm sıçanlarda sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. 27. gün verilerinde grup 2 (artrit grubu)'ye göre pençe hacmindeki inflamasyon ve ödemi çözerek pençe hacmini azaltması açısından en etkili tedavinin grup 7 (silimarin 200 mg/kg) ve grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg)

olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Literatürde daha önceden silimarin tedavisinin adjuvant artritteki etkisinin incelendiği çalışma bulunmazken, osteoartritle ilgili çalışmalar yapılmıştır (12,15).

Al-Rasheed ve ark. (89), silimarinin sıçanlarda hepatotoksisiteye karşı etkisini değerlendiren çalışmalarında serum alanin aminotransferaz, inflamatuvar sitokinleri ve vasküler endotelyal büyüme faktörünü önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda; FCA injeksiyonu yapılmadan önce (0. günde) tüm gruplarda PAM cihazıyla eklemlere uygulanan basınca karşı sıçanın bazal ağrı eşiği ve Randall-Selitto cihazıyla sıçanın gösterdiği hipersensivite ölçüldü. FCA uygulanan grupların PAM ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2-3-4-5-6-7 ve 8) grup içi karşılaştırmalarda basınca karşı duyarlılığın arttığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin kısaldığı istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Bu bulgumuz bize FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu ve ağrılı uyarana karşı pençelerinin duyarlılığının arttığını göstermektedir. Tedavi gruplarının 27. gün verilerini; 2. grupla (artrit grubu) karşılaştırdığımızda; grup 7 (silimarin 200 mg/kg) ve grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg)'de istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,05$) bulunmuştur. Bu da çalıştığımız gruplardan, 200 mg/kg silimarin grubunun ve ibuprofen grubunun (grup 8) analjezik etkisinin olduğunu göstermektedir. Randall-Selitto cihazı ile yapılan pençe hassasiyetinin ölçümünde; 17. gün verilerinde grup 1 (kontrol grubu) ile yapılan karşılaştırmalarda grup 4 (DMSO 1 ml/100g) hariç bütün gruplar istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. 27. gün verilerinde tedavi gruplarından grup 2 ile yapılan karşılaştırmalarda grup 5-7-8'in ağrılı uyarana karşı verdiği yanıtın azaldığı gözlenirken, ancak sadece grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg)'in istatistiksel olarak anlamlı olduğunu söyleyebiliriz. Literatürde silimarinin analjezik etkisini karşılaştırabileceğimiz bir çalışma yoktur.

Histopatolojik olarak çalışmamızın sonunda romatoid artrit bulgularını (inflamasyon, ödem, vasküler ve sinovyal proliferasyon) değerlendirmek amacıyla sıçanların pençelerini inceledik. 27. günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin inflamasyon bulgularında grup 1 (kontrol grubu)'de inflamasyona rastlanmadı. 2. grupta %100 şiddetli görülürken; 3. grubun %62,5'inde orta, %37,5'inde şiddetli; 4. grubun %71,4'ünde orta, %28,6'sında şiddetli; 5. grubun %42,9'unda orta, %57,1'inde şiddetli; 6. grubun %75,0'inde orta, %25,0'inde şiddetli; 7. grubun %14,3'ünde zayıf, %57,1'inde orta, %28,6'sında şiddetli; 8. grubun %14,3'ünde zayıf, %57,1'inde orta, %28,6'sında şiddetli inflamasyon görüldü. Bu bulgular 6, 7 ve 8.

grupların düşük inflamasyon oranı olduğunu göstermiştir. 27. günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1 (kontrol grubu)'deki sıçanlarda ödeme rastlanmadı. 2. grupta %25,0 zayıf, %50,0 orta, %25,0 şiddetli; 3. grupta %75,0 zayıf, %25,0 orta; 4. grupta %57,1 zayıf, % 42,9 orta; 5. grupta %85,7 zayıf, %14,3 orta; 6. grupta %75,0 zayıf, %12,5 orta, %12,5 şiddetli; 7. grupta %57,1 zayıf, %28,6 orta, %14,3 şiddetli; 8. grupta %57,1 zayıf, %42,9 oranında orta seviyede ödem görüldü. Tedavi grupları içerisinde 5. ve 6. gruplarda zayıf ödem oranının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Diğer artrit bulgularına baktığımızda grup 1 (kontrol grubu)'deki hayvanlarda sinovyal proliferasyona rastlanmadı. 2. grupta %75; 3. grupta %62,5; 4. grupta %71,4; 5. grupta %14,3; 6. grupta %25,0; 7. grupta %57,1; 8. grupta %85,7 oranında sinovyal proliferasyon görüldü. Gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark yoktur. 27. günde grup 1'deki (kontrol grubu) hayvanlarda vasküler proliferasyona rastlanmadı. 2. grupta %12,5 zayıf, %75,0 orta, %12,5 şiddetli görülürken; 3. grubun %25,0'inde zayıf, %62,5'inde orta, %12,5'inde şiddetli; 4. grubun %42,9'unda zayıf, %42,9'unda orta %14,3'ünde şiddetli; 5. grubun %28,6'sında zayıf, %71,4'ünde orta; 6. grubun %25,0'inde zayıf, %75,0'inde orta; 7. grubun %28,6'sında zayıf, %57,1'inde orta, %14,3'ünde şiddetli; 8. grubun %14,3'ünde zayıf, %57,1'inde orta, %28,6'sında şiddetli vasküler proliferasyon görüldü.

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan moleküllerdir (45). Oksijen ve nitrojen kaynaklı meydana gelen bu radikaller; patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar tarafından üretilerek, canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarını meydana getirirler. Hem eksojen hem de endojen kaynaklar tarafından üretilen serbest radikaller; hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etkisini gösterirler (50,53).

Hücrede reaktif serbest radikallerin artmasıyla önemli hasarlar görülebilir (53). Serbest oksijen radikallerinin, romatoid artrit dahil birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı öne sürülmektedir (45). Biyolojik serbest radikallerin hasarına karşı membran yapısında bulunan lipitler, son derece hassastır (31,32). Bu oksidatif hasar 'lipid peroksidasyonu' olarak kendi kendini katalizleyerek zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır (31,90). Radikallerin reaksiyonu sonucu lipid peroksitler, lipid alkoller ve aldehid yapısında yan ürünler meydana gelirken; üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, en çok bilinen ürün MDA oluşur (32). Yapılan birçok çalışmada plazmadaki MDA

düzeyi romatoid artritli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (91-92). Taştekin ve ark. (86) yaptığı çalışmada adjuvant artritli sıçanlarda plazma MDA düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0,05$) arttığını görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda MDA değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Romatizmal hastalıklar içerisinde romatoid artritte sitokinlerin büyük rol oynadığı görülmüştür. Romatoid artrit patogenezinde eklem bölgelerine T ve monosit/makrofaj hücre göçü gerçekleşmektedir (93). T hücreleri sinovyum içerisinde antijeni ile etkileşir. Bu etkileşimi sağlayan en önemli sitokin IL-2'dir. IL-1, IL-6, TNFα ve IL-10 romatoid artrit patogenezinde önemli roller oynayan kritik sitokinlerdir (31). Hastalığın devamlılığından sorumlu olarak bilinen iki sitokin ise IL-1 ve TNFα'dır (93).

Tümör nekroz faktör (α), romatoid artritin oluşumunda ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynamaktadır. TNFα, romatoid artritte iltihaplanmanın ana medyatörüdür. Makrofajlar romatoid artritte iltihaplanmış sinovyal membranlarda yüksek düzeyde aktive olmuş hücrelerdir (94). TNFα, IL-1 gibi insan sinovyal hücreleri ile kollajenaz ve prostaglandin E2 üretimini artırır (62). Mbiantcha ve ark. (95)'nın yaptığı çalışmada *P. africanum*'un metanol özütü sırasıyla TNFα ve IL-1β düzeylerini sırasıyla % 36,4 ve % 28,7 oranında düşürürken ($p<0,01$), kontrol numuneleri ve sulu ekstre ile muamele edilen numunelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Oliver ve ark. (96), talidomidin analoğu olan CC1069'un adjuvant artritli sıçanlardaki etkisini inceledikleri çalışmada ise hem TNFα hem IL-2 ölçümlerinde verimli bir düşüş yakalamışlardır. Bizim çalışmamızın 27. gününde TNFα ölçümlerinde, grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

İnterlökin-6, IL-6 geni tarafından kodlanan doğal ve adaptif immünitede yer alan proinflamatuvar bir sitokindir. İnflamasyon, vücut savunması, doku onarımı, glukoz ve yağ metabolizmasında yer alır. IL-6, mononükleer fagositler, adipositler, immün hücreler, miyositler ve fibroblastlardan salgılanan, IL-1 tarafından ortaya çıkarılabilen çok yönlü bir proteindir. B hücre uyarıcı özellikleri vardır. B hücrelerinden immünoglobulin sentezine neden olduğundan dolayı sitotoksik T lenfositlerinin farklılaşmasına yol açarlar (62,93). IL-6, IL-1 ve TNFα'nın aktive olmasında önemli rol oynamaktadır. IL-6 immün cevap ve inflamasyonu tetikleyen sitokindir. İnanç ve ark. (97), kronik hepatit B'li hastalarda IL-6, IL-10 ve IL-18 düzeyini araştırmışlardır. Yaşları 18 ve 80 arasında kontrol grubu (bilinen sistemik kronik hastalığı olmayan) dahil 4 farklı grupla çalışılmıştır. Yapılan çalışmada

hastalık progresyonu ile birlikte IL-6 düzeylerinde artış olduğu ve en düşük değerin kontrol grubunda, en yüksek değerin hepatosellüler karsinom grubunda ölçüldüğünü görmüşlerdir. Romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda IL-6 serum seviyesinin yükseldiği gözlenmiştir. Ayrıca IL-6 romatoid artritli hastaların serum ve sinovyal sıvısında çok yüksek oranda bulunmaktadır (93). Bizim çalışmamızın 27. gününde gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

İnterlökin-1 romatoid artritli hastaların hem inflamatuvar eklem sıvılarında hem de aktif hastaların periferik kanlarında yüksek oranda bulunmaktadır (98). İnsanda IL-1α ve IL-1β olmak üzere iki farklı formda bulunan bu sitokin, farklı genler tarafından kodlanan 159 ve 153 aminoasitlik peptidlerdir (99). IL-1, fibroblastlar, kondrositler ve sinovyal hücrelerden aralarında kollajenaz, plasminojen aktivatör ve prostoglandinlerin de bulunduğu birçok inflamatuvar faktörün salınımına neden olarak kemikte yıkıma yol açmaktadır (98). Aksungur ve ark. (99)'nın yaptığı araştırma akut kolestitli 45 hasta ve 45 kontrolden oluşmaktadır. IL-1β düzeylerinin hasta grubunda, kontrol grubundan düşük çıktığını görmüşler, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Demeyere ve ark. (100) yaptığı hayvan çalışmasında bakteriyel invazyonun olduğu endometrit durumunda serbest oksijen radikallerinin IL-1β düzeylerini artırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 27. günde gruplar arasında IL-1β düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

İnterlökin-2, temel etkisi T lenfositler üzerine olan otokrin ve parakrin büyüme faktörü olarak görev alan immün sistem hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasını kontrol eden önemli bir sitokindir (60,101). IL-2'nin çeşitli ve bazen birbiriyle çelişen görevlerine, inflamatuvar immün yanıtlarının hem indüksiyonuna hem de sonlandırılmasına katılması gösterilir (101). Gül ve ark. (101), tavşanlarda akut apandisit modeli oluşturarak IL-2 seviyesinin grup 3 (laparotomi ile apendiks ligate edilerek 12. saatte IL-2 ve IL-6, prokalsitonin ve D-dimer düzeylerini incelemek amacıyla kulak veninden kan alınan grup), grup 4 (laparotomi ile apendiks ligate edilerek 24. saatte IL-2 ve IL-6, prokalsitonin ve D-dimer düzeylerini incelemek amacıyla kulak veninden kan alınan grup) ve grup 5 (laparotomi ile apendiks ligate edilerek 48. saatte IL-2 ve IL-6 prokalsitonin ve D-dimer düzeylerini incelemek amacıyla kulak veninden kan alınan grup) arası yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulmasalar da histopatolojik olarak apandisit tanısı konulan gruplarda anlamlı derecede yüksek bulmuştur. Bizim çalışmamızın 27. gününde gruplar arasında IL-2 düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

İnterlökin 10, 4α heliks sitokin ailesine ait üç boyutlu yapısı halen bilinmeyen homodimer yapıda bir sitokindir. Moleküler ağırlığı 17-40 kDa arasında değişebilen IL-10'un üretiminden sorumlu olan IL-10 geni, 1. kromozom üzerinde yer alır. IL-10 T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar, keratinositler gibi birçok hücre tarafından üretilen antiinflamatuvar bir sitokindir (62,102). Pleiotropik bir etkiye sahip olan IL-10 bazı özel immün reaksiyonların etkisiyle hücre aracılı immün cevabın inhibisyonunda rol oynamaktadır. İnflamatuvar bir sitokin olan TNFα'nın üretimi ile antiinflamatuvar etkiye sahip olan IL-10 salınımı gerçekleşir. Bununla birlikte IL-10; TNFα, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin üretimini transkripsiyonel (TNFα ve IL-1) ve posttranskripsiyonel (IL-1 ve IL-6) düzeyde yavaşlatmaktadır. Bazı durumlarda IL-1, IL-6 ve TNFα, IL-10 üretimini ve salınımını inhibe ederler (102). İnanç ve ark. (97), kronik hepatit B'li hastalarda yaptıkları çalışmada; kontrol ve hepatosellüler karsinoma grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olduğunu görmüşler ve IL-10 düzeyinin hepatosellüler karsinoma grubunda diğer gruplara göre daha fazla artış göstermesinin hepatosellüler karsinoma patogenezinde rolü olabileceğini düşünmüşlerdir. Sharifi ve ark. (103) silimarinin topikal uygulanışının yara iyileşmesi üzerine etkisini gösteren bir çalışma yapmışlardır. Böylece; silimarinin epitelizasyonu artırdığını ve inflamasyonu düşürdüğünü bulmuşlardır. Ayrıca antiinflamatuvar sitokin IL-10 seviyesinin arttığını görmüşlerdir. Bizim çalışmamızın 27. gününde gruplar arasında IL-10 düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak, FCA'nın sıçanların sağ arka ayak pençelerine uygulanması ile oluşturulan adjuvant artrit modelinde, silimarinin deneysel çalışmalar ile kanıtlanmış olan bir antiartritik çalışması bulunmazken, bizim çalışmamızda 50 ve 200 mg/kg dozunda antiinflamatuvar etki nedeniyle pençe hacminde azalma görüldüğünü, 200 mg/kg dozunda ise analjezik etkinin olduğunu söyleyebiliriz. Antiinflamatuvar ve analjezik etkilerinin değerlendirilmesi için daha kapsamlı çalışmaların yapılması, silimarinin romatoid artritteki etki mekanizmalarının açıklanabilmesi yönünde faydalı olabileceğine inanmaktayız.

SONUÇLAR

Çalışmamızda sıçanların sağ arka ayak pençelerine ısıda öldürülmüş ve kurutulmuş *Mycobacterium tuberculosis* içeren sıvı parafin emülsiyonunun (FCA, 10 mg/ml) 0,1 ml'lik tek doz intradermal olarak uygulanmasıyla olşturulan adjuvant artritte silimarin tedavisinin etkilerini inceledik. İncelemeler sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki gibidir;

1. Sıçanların ağırlık takibinde gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.

2. *Freund's Complete Adjuvant* uygulanan grupların (2-3-4-5-6-7 ve 8) 17. günde kumpas cihazı ile ölçülen pençe çapı değerleri, kontrol grubuna göre (grup 1) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. Bu bulgumuz *Freund's Complete Adjuvant* uygulanan grupların hepsinde adjuvant artritin başarıyla oluştuğunun göstergesidir.

3. Kumpas cihazı ile 27. günde yapılan ölçümlerde ise grup 2 (FCA grubu)'ye göre 3, 4 ve 6. grupların pençe çapı değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azaldığı saptanmıştır. Grup 5, 7 ve 8'in pençe çapı değerlerinin ise grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde azaldığı tespit edildi. Bu durum ibuprofene benzer şekilde silimarinin 50 ve 200 mg/kg dozunun adjuvant artrit bulgularından olan pençe çapı artışını, ödem ve inflamasyonu tedavi ettiğini göstermektedir.

4. *Pressure application measurement* cihazı ile yapılan ağrı eşiği ölçümlerinde, 17. güne gelindiğinde 1. grup (kontrol grubu) hariç diğer gruplarda basınca karşı duyarlılığın arttığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin kısaldığı ve bunların da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır.

5. 27. günde PAM ile yapılan ağrı eşiği ölçümlerinde, grup 2 ile yapılan karşılaştırmalarda silimarinin 50 ve 100 mg/kg dozunda analjezik etkisinin bulunmadığı fakat

grup 7 (silimarin 200 mg/kg)'nin ibuprofene benzer şekilde analjezik etkisinin olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$).

6. Pletismometre cihazı ile sağ arka pençelerinin hacimlerinin ölçüm değerleri 17. günde kontrol grubu (grup 1) ile karşılaştırıldığında tüm sıçanlarda sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır.

7. 27. günde grup 2'ye göre yapılan karşılaştırmalarda ise inflamasyon ve ödemi çözerek pençe hacmini azaltması alçısından grup 7 (silimarin 200 mg/kg) ve grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.

8. Randall-Selitto cihazı ile ağrı yanıtının ölçüldüğü pençe basınç testi uygulamasında 17. gün verilerinde kontrol grubuyla (grup 1) yapılan karşılaştırmalarda grup 4 (DMSO grubu) hariç bütün gruplarda basınca karşı yanıtın süresinin azaldığı ve verilerin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur.

9. 27. günde yapılan ölçümlerde ise grup 2 (FCA grubu) ile yapılan karşılaştırmalarda sadece grup 8 (ibuprofen 100 mg/kg)'de istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanmıştır.

10. 27. günde yapılan sitokinler ve MDA düzeyleri ölçümünde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Sonuçlar; deneysel adjuvant artrit modelinde silimarin tedavisinin pençe hacmi ölçümleri ve histopatolojik veriler doğrultusunda antiinflamatuvar etkisinin olabileceği yönündedir. Yapılan ağrı düzeyi ölçümleri, 200 mg/kg dozunda ibuprofene benzer şekilde analjezik etkisinin olabileceğini göstermektedir. Sitokinler ve MDA üzerindeki etkinliklerinde ise anlamlı sonuçlar bulunamadığından bu konuda daha kapsamlı ve ayrıntılı araştırmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Adjuvant artrit, hücresel immün yanıtla oluşması ve histopatolojik görünümlerinin benzerliği nedeniyle romatoid artrit modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda silimarin tedavisinin sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan adjuvant artrit modelindeki etkisini inceledik. Toplam 8 grup oluşturuldu ve her grupta 8 hayvan kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve pençe takibi sonrası 27. gün kalpten kan alındı. Diğer gruplara ise 0. gün intradermal olarak 0,1 ml FCA injeksiyonu yapıldı. 2. grup artrit kontrol grubu olarak ayrıldı. 17-27. günler arası 10 gün boyunca günde tek doz olarak üçüncü gruba salin (1 ml/kg), dördüncü gruba silimarinin çözücüsü dimetil sülfoksit (DMSO), beşinci gruba silimarin (50 mg/kg), altıncı gruba silimarin (100 mg/kg), yedinci gruba silimarin (200 mg/kg) ve pozitif kontrol olan sekizinci gruba ibuprofen (100 mg/kg) uygulandı. Silimarin ve diğer ilaçlar sıçanlara gavaj yoluyla verildi. Sıçanların ekleminde oluşan artritin *Pressure Application Measurement* (PAM) cihazıyla mekanik ağrı eşiği ve hipersensivite düzeyi ölçüldü. İnflamatuvar reaksiyon inokülasyon günü 0. gün kabul edilerek; 0, 17 ve 27. günlerde pençelerde oluşan inflamatuvar ödem *Plethysmometre* cihazı ile ölçülerek değerlendirildi. Aynı günlerde pençelerde oluşan ödemi ve pençe çapını değerlendirmek için kumpas cihazı kullanıldı. 0, 17 ve 27. günlerde sıçanların sağ arka pençelerinin ağrı eşik tepkisini değerlendirmek için Randall-Selitto cihazıyla ölçüm yapıldı. Hayvanlar anestezi altındayken 27. günde kalpten ponksiyon ile kan alındı ve hayvanlara ötenazi uygulandı.

Serumda malondialdehit ve inflamatuvar yanıtın göstergeleri olan sitokinlerin düzeyleri ölçülerek, sıçanların eklemleri histopatolojik olarak incelendi. Tüm veriler araştırmanın sonunda istatistiksel olarak değerlendirildi.

Çalışmamız, deneysel adjuvant artrit modelinde silimarin tedavisinin pençe hacmi ölçümleri ve histopatolojik veriler doğrultusunda antiinflamatuvar etkisinin ve ağrı düzeyleri ölçümleri ile de ancak yüksek dozlarda (200 mg/kg) uygulandığında ibuprofene benzer şekilde analjezik etkisinin olabileceğini göstermektedir. Sitokinler ve MDA üzerindeki etkinliklerinde ise anlamlı sonuçlar bulunamadığından bu konuda daha kapsamlı ve ayrıntılı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Adjuvant artrit, ibuprofen, silimarin, romatoid artrit, sitokin.

THE EFFECT OF SILYMARIN TREATMENT IN THE EXPERIMENTAL ARTHRITIS MODEL

SUMMARY

Adjuvant arthritis is frequently used as rheumatoid arthritis model due to occurring by cellular immune response and similarities in histopathologic appearance. In our research, we investigated the effect of silymarin cure against adjuvant arthritis model created experimentally in rats. A total of 8 groups were formed and 8 animals were used in each group. The first group was kept as control group and blood was taken from heart on 27^{th} day after paw follow. On 0^{th} day, 0,1 ml FCA injection was applied to the other groups intradermally. The second group was kept as arthritis control group. Saline (1 ml/kg) was applied to the third group, dimethyl sulfoxide which is the solvent of silymarin was applied to the fourth group, silymarin (50 mg/kg) was applied to the fifth group, silymarin (100 mg/kg) was applied to the sixth group, silymarin (200 mg/kg) was applied to the seventh group and ibuprofen (100 mg/kg) was applied to the eight group which was the positive control group between 17^{th} and 27^{th} days for 10 days as one dose daily. Silymarin and other drugs were given to the rats by gavage way. Mechanic pain threshold in the joints and hypersensitivity were evaluated with the device of pressure application measurement which evaluates the arthritis in rats joints by leg pulling reaction of rats stimulated mechanically. Inflammatory reaction was evaluated by measuring with the device of plethysmometer which is used to measure inflammatory edema formed in the joints on the days of 0, 17 and 27 by accepting the inflammatory reaction inoculation day as 0^{th} day. The device of caliper was utilized to

measure the edema formed in the joints and to evaluate the diameter of joints on 0^{th}, 17^{th} and 27^{th} days. On the 0^{th}, 17^{th} and 27^{th} days, measures were conducted with the device of Randall-Selitto to evaluate pain threshold reaction of right back paw of the rats. Blood was taken from their hearts by puncture while the animals were under anesthesia and euthanasia was applied. The levels of malondialdehyde which is the final product of lipid peroxidation and cytokines were measured. The joints of rats were placed on formaldehyde by removing them and examined as histopathologically in our Faculty of Medical Pathology Department.

Our study indicates the effect occurred by silymarin treatment in experimental adjuvant arthritis model paw volume measurement and antiinflammatory effect via histapathologic data. It also shows a similar effect to ibuprofen when applied in high dosages (200 mg/kg) via pain level measurements. Since no significant results were gained from cytokines and their effect on MDA, it is required to conduct more detailed researches at this respect.

Key Words: Adjuvant arthritis, ibuprofen, silymarin, rheumatoid arthritis, cytokine.

KAYNAKLAR

1. Cenesiz ve ark. Investigation of the effects of n-acetyl cysteine and resveratrol to acute phase response in ratswith experimentally induced arthritis. Kafkas Uni Vet Fak Derg 2012;18(6):991-996.

2. Saratha V, Subramanian SP. Lupeol A triterpenoid isolated from calotropis gigantea latex ameliorates the primary and secondary complications of FCA induced adjuvant disease in experimental rats.Inflammopharmacology 2012;20(1):27-37.

3. Sabudak T, Dokmeci D, Ozyigit F, Isık E, Aydogdu N. Antiinflammatory and antioxidant activities of Trifolium resupinatum var. Microcephalum extracts in arthritic rats. Asian J Chem 20(2):1491-1496, 2008.

4. Gündüz S. Adjuvant Artritli Sıçanlarda Pelargonium Sidoidesin Etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2011.

5. Arab HH, El-Sawalhi MM. Carvedilol alleviates adjuvant-induced arthritis and subcutaneous air pouch edema: Modulation of oxidative stress and inflammatory mediators. Egypt:Cairo University;2013.

6. Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Semecarpus anacardium Linn. nut milk extract, an indigenous drug preparation, modulates reactive oxygen/nitrogen species levels and antioxidative system in adjuvant arthritic rats. 2005;276(1-2):97-104.

7. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. Clinica Chimica Acta. 2003;338(1-2):123-9.

8. Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. Switzerland:University Hospital Zurich;2008;15(1):9-20.

9. Souza CO, Peraçoli MT, Weel IC, Bannwart CF, Romão M, Nakaira-Takahagi E et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of silibinin on experimental preeclampsia induced by L-NAME in rats. Life Sci 2012;91(5-6):159-65.

10. Sharifi R, Pasalar P, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M et al. The effect of silymarin (Silybum marianum) on human skin fibroblasts in an in vitro wound healing model. Pharm Biol 2013;51(3):298-303.

11. Li W, Mu D, Song L, Zhang J, Liang J, Wang C et al. Molecular mechanism of silymarin-induced apoptosis in a highly metastatic lung cancer cell line anip973.Cancer Biother Radiopharm 2011;26(3):317-24.

12. Ashkavand Z, Malekinejad H, Amniattalab A, Rezaei-Golmisheh A, Vishwanath BS. Silymarin potentiates the anti-inflammatory effects of Celecoxib on chemically induced osteoarthritis in rats. Phytomedicine 2012;19(13):1200-5.

13. Gupta OP, Sing S, Bani S, Sharma N, Malhotra S, Gupta BD et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase. Phytomedicine 2000;7(1):21-4.

14. Zhanq J, Song X, Cao W, Lu J, Wang X, Wang G et al. Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol.2016;6:32928.

15. Watanabe T, Takahashi N, Hirabara S, Ishiquro N, Kojima T Hyaluronan inhibits Tlr-4-dependent RANKL expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 2016;11(4):e0153142.

16. Wang WJ, Yin SJ, Rong RQ. PKR and HMGB1 expression and function in rheumatoid arthritis. China:The People's Hospital of Shouguang, Shouguang, Shandong Province 2015;14(4):17864-70.

17. Taşcı Bozbaş G, Kilimci FS, Yılmaz M, Gurer G, Demirci B.Ozonun romatoid artrit hayvan modelinde kemik dayanıklılığı üzerine olan etkisi. Osteoporoz 2016;22(2):0-0.

18. Uzun S, Yıldırım A, Doğan S, Sürücü G, Karabiber M, Sarıkaya Y.Romatoid artritli hastalarda işitme fonksiyonlarının odyolojik testlerle değerlendirilmesi.

Adıyaman:Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı 2016; 7(1):63-68.

19. Altınkesen E. Erken ve geç dönem romatoid artritli hastalarda semptomlar, fonksiyonel durum ve yaşam kalitesi arasındaki ilişkinin incelenmesi (tez). İzmir: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2006.

20. www.romatizmahastaliklari.com/tr/icerik/5/romatoid-artrit. Erişim tarihi: 29.12.2016.

21. tr.wikipedia.org/wiki/Romatoid_artrit. Erişim tarihi: 10.12.2016.

22. Hamuryudan V. Romatoid artrit İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:34 2003; s. 19-29.

23. www.medikalakademi.com.tr/romatoid-artrit/ Erişim tarihi: 18.01.2017.

24. Yazgan S, Güler M. Yerleşmiş romatoid hastalarında kardiyovasküler risk ile fonksiyonel yetersizlik ve hastalık aktivitesi arasındaki ilişki (tez). İstanbul: Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2011.

25. Aslanalp Z, Tıkız C. Romatoid artrit hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde dinamik MRG, serum anjiogenik faktör düzeyleri ve VEGF gen ekspresyonun araştırılması Manisa: Celal Bayar ÜniversitesiFizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2011.

26. Çalgüneri M, Karadağ Ö. Romatoid artritte karpal tünel sendromunun yüksek frekanslı ultrasonografi ile değerlendirilmesi ve hastalık aktivitesi ile ilişkisinin araştırılması (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi;2008.

27. www.dicle.edu.tr/Contents/7fdfff14-2834-4489-b059-ff61bd4b1dee.pdf. Erişim tarihi: 11.09.2016.

28. Taş N, Kamanlı A. Romatoid artrit ve ankilozan spondilitli hastalarda servikal tutulum özelliklerinin hastalık parametreleri ve yaşam kalitesi ile ilişkileri (tez). Diyarbakır: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2010.

29. Sayarlıoğlu M, Uçar MA. Anti-TNFα tedavisinin ankilozan spondilit ve romatoid artrit hastalarında üriner enfeksiyon gelişimine olan etkisi (tez). Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2010.

30. Duruöz MT, Dal N. Romatoid artrit ve ankilozan spondilitte servikal tutulum ve bunun üst ekstremite tutulumları ile ilişkisi (tez). Manisa: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2010.

31. Çetinkaya B. Romatoid artrit ve kronik periodontitis hastalarında proinflamatuvar (TNFα, IL-1β) ve antiinflamatuvar (IL-10, IL-4) sitokin düzeylerinin incelenmesi (tez). Ankara: Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim Dalı;2009.

32. dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/36/866/11000.pdf. Erişim tarihi: 24.01.2016.

33. Hürsoy N, Şahin G. Romatoid artrit tanısında el MR görüntülemenin katkısı ve laboratuar bulgularla korelasyonu (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı;2016.

34. bmcdermatol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-5945-12-18. Erişim tarihi: 20.08.2016.

35. ichastaliklariromatoloji.medicine.ankara.edu.tr/files/2014/02/Romatolojiye-Giri%C5%9F.pdf. Erişim tarihi: 08.11.2016.

36. Katar D, Yaman H, Subaşı İ, Arslan Y. Meryemana Dikeni (Silybum marianum (L.) Gaertn.) bitkisi tohumlarına farklı dozlarda gama ışını uygulamasıyla elde edilen M1 bitkilerinin fidelerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üni Ziraat Fak Derg 2013;8(1):78-83.

37. Kalkan AT, Akar S. Romatoid artrit hastalarında miyokinlerin değerlendirilmesi (tez). İzmir: İzmir Katip Çelebi Üniversitesi İç Hastalıkları Kliniği;2016.

38. Kamalı S, Aras Ş, Kasapoğlu E, Çağatay Y, Gül A, İnanç M. ve ark. Felty Sendromu: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör tedavisiyle başarılı remisyon indüksiyonu ve sürdürme tedavisi. İstanbul Tıp Fak Derg 2002. s.279-282.

39. www.sanofi.com.tr/l/tr/tr/layout.jsp?scat=8728D88F-0CDB-482E-B0BC-94B59CD66D24. Erişim tarihi: 05.12.2016.

40. www.niams.nih.gov/Health_Info/Rheumatic_Disease/default.asp. Erişim tarihi: 04.03.2017.

41. Karakoç M. Romatoid artrit: (sunu) Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2003.

42. Özsoy MH, Altınel L, Başarır K, Çavuşoğlu AT, Dinçel VE. Romatoid artritte eklem hastalığının patogenezi.Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Derg, cilt:5, sayı:3-4;2006.

43. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-24.

44. www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/per/belge/romatoid.pdf. Erişim tarihi: 03.01.2017

45. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi Van: Yüzüncü yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı;2004 15(1-2):91-96.

46. Durmuş AS, Ünsaldı E. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi, Elazığ:Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı;2005.

47. www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723_ek.pdf?dergi=16. Erişim tarihi: 15.05.2016.

48. Çiçek E, Bahçeli S, Yıldız M. Nükleer tıp uygulamalarının hastalardaki serbest radikaller üzerine etkileri Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fizik Anabilim Dalı;2005.

49. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon:Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları;2000.

50. Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest radikaller Burdur: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağ Bil Enst Derg 2016,4(1):50-59.

51. Sezer K, Keskin M. Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü Fırat Üni Sağ Bil Vet Derg 2014;28(1):49-56.

52. Öğüt S, Atay E. Yaşlılık ve oksidatif stres Isparta: Süleyman Demirel Üni Tıp Fak Derg 2012,19(2):68-74.

53. www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf. Erişim tarihi: 26.09.2016.

54. Gümüştaş K, Atukeren P. Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklarla ilişkisi İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2008;S:329-340.

55. www.mdpi.com/1420-3049/22/2/191/htm. Erişim tarihi: 24.05.2017.

56. Altan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Derg2006;31(2);51-56.

57. Delibaş N, Özcankaya R. Serbest radikaller. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg 1995; Eylül 2(3).

58. Alper G, Girgin F, Ozgönül M, Menteş G, Ersöz B. MAO inhibitors and oxidant stress in aging brain tissue.European Neuropsychopharmacology1999; s. 247-252.

59. Ermis B, Ors R, Yıldırım A, Tastekin A, Kardas F, Akcay F. Influence of smoking on maternal and neonatal serum malondialdehyde, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels 2004;34(4):405-9.

60. Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler İzmir:Ege Üniversitesi Klinik Biyokimya BD Turkiye Klinikleri J Med Sci 1997;17(2):65-74.

61. Cevhertaş L, Erten G. Alerjik astımda T hücrelerde kemokin ekspresyonu ve sitokinler (tez) İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstititüsü;2016.

62. tr.wikipedia.org/wiki/Sitokin. Erişim tarihi: 10.12.2016.

63. www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter13turk.htm. Erişim tarihi: 07.05.2017.

64. Cecilia G, Charles D, Alberto M. The interleukin family-1: back to future Italy: Immunity 2013,39(6);1003-1018.

65. Sürer S, Dokmeci D. Deneysel artrit modelinde irbesartan, karvedilol ve kombine tedavinin etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı;2014.

66. Dalkılıç E, Gül CB, Alkış N. İnterlökin-6 inflamasyonda başrol oyuncularından Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg 2012;38(2)157-160.

67. web.deu.edu.tr/noroloji/tnd1995(4)sitokintammetin.htm. Erişim tarihi: 06.062017.

68. Turgut S, Yumuşakhuylu Y, Selimoğlu E, Atlığ RŞ, Oğuz F, İçağasıoğlu A. Romatoid artritli hastalarda TNF alfa blokörleri tedavisinin kemik mineral yoğunluğu üzerine etkisinin retrospektif değerlendirilmesi Göztepe Tıp Derg 2011;26(2):58-62.

69. Gu M, Zhao P, Huanq J, Zhao Y, Wanq Y, Li Y et al. Silymarin ameliorates metabolic dysfunction associated with diet-induced obesity via activation of farnesyl X receptor.Front Pharmacol 2016;7-345.

70. Razavi BM, Karimi G. Protective effect of silymarin against chemical-induced cardiotoxicity. 2016;19(9):916-923.

71. Gholami M, Moallem SA, Afshar M, Amoueian S, Etemad L, Karimi G. Teratogenic effects of silymarin on Mouse fetuses. 2016;6(5):542-549.

72. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK82221/ Erişim tarihi: 11.04.2017.

73. Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. Advances in the use of milk thistle (silybum marianum). Integrative Cancer Therapies 2007;6(2) pp. 104-109.

74. Momeni A, Hajiqholami A, Geshnizjani S, Kheiri S. Effect of silymarin in the prevention of Cisplatin nephrotoxicity, a clinical trial study. 2015;9(4):OC11-3.

75. Kocaman N, Dabak DÖ. Hepatoprotektif bir ajan: silimarin Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı;2015 s. 128-132.

76. Perez HJ, Carrillo-SC, Garcia E, Ruiz Mar G, Perez-Tamayo R, Chavarria A. Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease 2014;319:38-43.

77. Milic N, Milosevic N, Suvajdzic J, Zarkov M, Abenavoli L. New Therapeutic potentials of milk thistle (Silybum marianum);2013.

78. Kumar J, Park KC, Awasthi A, Prasad B. Silymarin extends lifespan and reduces proteotoxicity in C. elegans Alzheimer's model.2015;14(2):295-302.

79. F. Fraschini, G. Demartini, D. Esposti. Pharmacology of silymarin. Clin Drug Invest. 2002;22(1).

80. Valenzuela A, Guerra R. Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver 1985;181(2):291-4.

81. Momeni A, Hajigholami A, Geshnizjani S, Kheiri S. Effect of silymarin in the prevention of Cisplatin nephrotoxicity, a clinical trial study Journal of Clinical and Diagnostic Research;2015.

82. silymarin.net/silymarin. Erişim tarihi: 04.09.2016.

83. Ahmed G, Hassan G, Haatem S, Iryna S, SA Bekheet. Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of Milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 2016;14,327–333.

84. Adıgüzel Ş, Pirat A, Türkoğlu S, Bayraktar R, Özen Ö, Kaya M. Bir sıçan akut respiratuvar distres modeli'nde silimarin'in antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi 2016;14(1):0-0.

85. Kumaş M, Eşrefoğlu M, Özer ÖF. Farelerde yüksek doz isotretinoin uygulamasının yol açtığı kalp dokusu hasarına karşı silimarinin olası etkilerinin araştırılması, Bezmialem Science 2016;2:43-50.

86. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H et al.Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis.Pharmacol Res. 2007;56(4):303-10.

87. Naqai N, Tanino T, Ito Y. Pharmacokinetic studies of gel system containing ibuprofen solid nanoparticles 2016;65(12):1045-1053.

88. Simon LS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their risk: a story still in development Simon Arthritis Research & Therapy 2013,15(3):S1.

89. Al-Rasheed N, Faddah L, Bassiouni YA, Hasan IH, Mahmoud AM, Mohamad RA. Protective Effects of Silymarin, Alone or in Combination with Chlorogenic Acid and/or Melatonin, Against Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity 2016;12(Suppl 3):S337-45.

90. Chen Y, Wanq QW, Zuo J, Chen JV, Li X. Anti-arthritic activity of ethanol extract of Claoxylon indicum on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in mice 2017;5;17(1):11.

91. Ulugol A, Unalan H, Dökmeci İ, Kokino S. Comparison of the effects of tenoxicam and mid-laser irradiation on chronic adjuvant arthritis in rats. Clin Exp Rheumatol 1997;15:83-6.

92. Kocabaş H, Kocabaş V, Büyükbaş S, Sallı A, Uğurlu H. Romatoid artrit hastalarında hücresel oksidan ve antioksidan statü ve hastalık aktivitesi ile ilişkisi. Turk J Rheumatol 2010,25:141-6.

93. Sarıöz Ö, Arman A. Türk romatoid artrit hastalarında IL-6 gen polimorfizmlerinin moleküler düzeyde incelenmesi İstanbul: Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2009.

94. Song J, Chen Y, Jianq S, Yanq K, Li X, Zhao X et al. Efficient and non-toxic biological response carrier delivering TNF-α shRNA for gene silencing in a murine model of rheumatoid arthritis 2016;7:305.

95. Mbiantcha M, Almas J, Shabana SU, Nida D, Aisha F. Anti-arthritic property of crude extracts of Piptadeniastrum africanum (Mimosaceae) in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats 2017;17(1):111.

96. Oliver SJ, Freeman SM, Corral LG, Ocampo CJ, Kaplan G. Thalidomide analogue CC1069 inhibits development of rat adjuvant arthritis 1999;118(2):315-21.

97. İnanç N, Yalnız M. Kronik hepatit B'li hastalarda interlökin-6, interlökin-10 ve interlökin-18 düzeylerinin tayini (tez). Elazığ: İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2014.

98. dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/36/857/10879.pdf. Erişim tarihi: 29.12.2016.

99. Aksungur N, Özoğul B. Akut kolesitte pentraxin 3 ve interlökin 1 beta değerlerinin tanısal ve prognostik önemleri (tez). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı;2014.

100. Demeyere K, Remijsen Q, Demon D, Breyne K, Notebaert S, Boyen F et al. Escherichia coli induces bovine neutrophil cell death independent from caspase-3/-7/-1, but with phosphatidylserine exposure prior to membrane rupture. 2013;153(1-2):45-56.

101. Gül VO, Kozak O, Menteş Ö. Tavşanlarda oluşturulan akut apandisit modelinde serum prokalsitonin, D-dimer, IL-2, IL-6 seviyelerinin tanısal önemi Ankara: GATA Genel Cerrahi Anabilim Dalı;2009.

102. Değirmencioğlu S, Vural P. Polikistik over sendromunda tnfα (-308), interlökin-6 (-174) ve interlökin-10 (-1082) gen polimorfizmi (tez). İstanbul:İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı;2007.

103. Sharifi R, Rasteqar H, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavanqar SM, Paknejad M et al. Effect of topical application of silymarin (Silybum marianum) on excision wound healing in albino rats2012;50(9):583-8.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller **Sayfa no.**

Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması 16
Şekil 2. Endojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması 17
Şekil 3. Eksojen kaynaklı antioksidanların sınıflandırılması 18
Şekil 4. Silimarin bitkisi resmi 22
Şekil 5. Silimarin tohumları resmi 22
Şekil 6. Silimarin flavonolignanının bileşenleri 23
Şekil 7. Adjuvant artrit oluşmuş sağ pençe 27
Şekil 8. Sıçanlara gavaj yöntemiyle ilaç verilmesi 28
Şekil 9. Basınç uygulama ölçüm cihazı 30
Şekil 10. Pletismometre cihazının uygulanışı 31
Şekil 11. Randall-Selitto cihazının uygulanışı 32
Şekil 12. İnterlökin-1β kalibrasyon eğrisi 33
Şekil 13. İnterlökin-2 kalibrasyon eğrisi 35
Şekil 14. İnterlökin-6 kalibrasyon eğrisi 36
Şekil 15. İnterlökin-10 kalibrasyon eğrisi 38
Şekil 16. Tümör nekroz faktörα kalibrasyon eğrisi 39
Şekil 17. Ağırlık takibi 42
Şekil 18. Sağ pençe takibi (kumpas) 44
Şekil 19. Sağ pençe takibi (PAM) 46
Şekil 20. Sağ pençe takibi (pletismometre) 48

Şekil 21. Sağ pençe takibi (Randall-Selitto) 51
Şekil 22. Gruplara göre interlökin-1β düzeylerinin dağılımı 51
Şekil 23. Gruplara göre interlökin-2 düzeylerinin dağılımı 53
Şekil 24. Gruplara göre interlökin-6 düzeylerinin dağılımı 55
Şekil 25. Gruplara göre interlökin-10 düzeylerinin dağılımı 55
Şekil 26. Gruplara göre MDA düzeylerinin dağılımı 56
Şekil 27. Gruplara göre TNFα düzeylerinin dağılım 56
Şekil 28. Gruplara göre inflamasyonun zayıf-orta-şiddetli olarak % değerleri 59
Şekil 29. Gruplara göre vasküler proliferasyon % değerleri 60
Şekil 30. Gruplara göre sinovyal proliferasyon % değerleri 60
Şekil 31. Gruplara göre ödem % değerleri 61
Şekil 32. Normal kemik, eklem aralığı, çizgili kas ve tendon yapıları 61
Şekil 33. Eklem boşluğuna doğru papiller uzanım yapan prolifere sinovya (HEx40) 62
Şekil 34. Eklem çevresi yumuşak dokuda 1. derece kronik inflamasyon (HEx40) 62
Şekil 35. Eklem çevresi yumuşak dokuda 2. derece kronik inflamasyon (HEx40) 63
Şekil 36. 2. Derece kronik inflamasyon (HEx20) 63
Şekil 37. Orta dereceli kronik inflamasyon (2. derece) ve bir kısmı dilate olan, eritrositle dolu olan artmış sayıda damar yapıları (HEx40) 64
Şekil 38. Eklem çevresi yumuşak dokuda 3. derece kronik inflamasyon ve 3. derece ödem (HEx40) 64
Şekil 39. Şiddetli kronik inflamasyon ve okların arasında kalan bölümde yoğun proliferasyon gösteren (3. derece) damar yapıları (HEx40) 65
Şekil 40. Eklem aralığında ve çevre yumuşak dokuda şiddetli ödem (HEx20) 65

ÖZGEÇMİŞ

29.12.1988 tarihinde Kırklareli'nde doğdum. İlk ve orta eğitimimi Lüleburgaz'da tamamladım. 2007 yılında girdiğim Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2011 yılında mezun oldum. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2012 yılından bu yana yüksek lisans eğitimim devam etmektedir.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 06 **Karar Tarihi: 27.09.2013**

KARAR NO: 2013.06.03

Yürütücülüğünü, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'nin yaptığı, yaptığı Özlem ÜREK'in Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2013/57 protokol nolu "Deneysel artrit modelinde silymarin ile tedavinin etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

SAYI : 59803669/604-01-01/ 4312 10962
KONU :

EDİRNE
22-05-2014

Sayın Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve yüksek lisans öğrencisi Özlem ÜREK'in "Deneysel Artrit Modelinde Silymarin ile tedavinin etkisi'' başlıklı düzenlenmiş yüksek lisans projesinin 18 (on sekiz) ay süre ve 12.422,00 TL ile desteklenmesine Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 15.05.2014 tarih ve 2014/08 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 7. maddesinin c bendi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Süleyman PİŞKİN
Rektör Yardımcısı ve
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

Posta Adresi
Trakya Üniversitesi Rektörlüğü
Balkan Yerleşkesi/ EDİRNE

Tel : 0284 223 87 45 Faks : 0284 223 08 48
e-mail : tubap@trakya.edu.tr