



# *Silybum marianum*'un broyler böbreğinde methomyl hasarına karşı etkilerinin patolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması

Bahadır Kılınc<sup>1\*</sup>, Ertan Oruç<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Keçioren, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Selçuklu, Konya, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 06.10.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 26.10.2023

**Özet:** Bu çalışmada broylerlerde Methomyl toksikasyonuna bağlı oluşan böbrek hasarına karşı *Silybum marianum* tohumu tozunun koruyucu/önleyici ya da iyileştirici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 28 gün olarak planlanan çalışmada Kontrol grubu (KONT), Methomyl grubu (MET), *Silybum marianum* tohumu tozu grubu (SMT) ve Methomyl+*Silybum marianum* tohumu tozu grubu (MET+SMT) olmak üzere her birisinde 32 hayvan bulunan 4 farklı grup oluşturuldu. Methomyl 20 ppm, *Silybum marianum* tohumu tozu ise 10 gr/kg olarak yemlere ilave edildi. Deneme süresince haftalık olarak her bir gruptan 8 hayvanın nekropsileri yapılarak biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için örnekler alındı. Biyokimyasal incelemeler için alınan serum örneklerinden total protein, kreatinin ve ürik asit parametrelerin ölçümleri yapıldı. Histopatolojik incelemelerde ise böbreklerde hiperemi, tubulus epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, Bowman kapsülünde kalınlaşma, intertübuler alanda kanama ve yangısal hücre infiltrasyonu, tubulus bazal membranlarında kalınlaşma bulguları değerlendirildi. Çalışmada her hafta kan serumlarında yapılan analizlerde kreatinin, ürik asit ve total protein değerleri KONT ve SMT gruplarında benzer bulunurken, MET gruplarında, KONT ve SMT gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. MET+SMT grubunda ise ilgili parametrelerin değerleri MET grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Methomyl verilen tüm gruplarda, böbrek dokularında 14'üncü gün ölçümlerde belirginleşen, 21 ve 28'inci günlerde zamana bağlı olarak şiddeti artan hasar meydana gelmiştir. Koruyucu/iyileştirici amaçla verilen *Silybum marianum*'un ise biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde hasarları azalttığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyokimya, Böbrek, Histopatoloji, Methomyl, *Silybum marianum*

## Pathological and biochemical investigation of the effects of *Silybum marianum* against methomyl damage in broiler kidney

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the protective/preventive or ameliorative effects of *Silybum marianum* seed powder against kidney damage caused by Methomyl toxicity in broilers. In the 28-day study, 4 different groups of 32 animals each were formed as Control group (CONT), Methomyl group (MET), *Silybum marianum* seed powder group (SMT) and Methomyl+*Silybum marianum* seed powder group (MET+SMT). Methomyl 20 ppm and *Silybum marianum* seed powder 10 g/kg were added to the feed. During the experiment, 8 animals from each group were necropsied weekly and samples were taken for biochemical and histopathological examinations. Total protein, creatinine and uric acid parameters were measured from serum samples taken for biochemical examinations. In histopathological examinations, renal hyperemia, degeneration and necrosis of tubular epithelium, thickening of Bowman's capsule, hemorrhage and inflammatory cell infiltration in the intertubular area, and thickening of tubular basement membranes were evaluated. In the study, creatinine, uric acid and total protein values were found to be similar in the KONT and SMT groups, but statistically higher in the MET group compared to the KONT and SMT groups. In the MET+SMT group, the values of the related parameters were lower than in the MET group. In all methomyl-treated groups, damage to the kidney tissues became evident in the measurements on the 14th day and increased in severity on the 21st and 28th days in a time-dependent manner. *Silybum marianum* given for protective/healing purposes was observed to reduce the damage at biochemical and histopathological levels.

**Keywords:** Biochemistry, Histopathology, Kidney, Methomyl, *Silybum marianum*

## Giriş

Methomyl'in, memelilere, kuşlara ve çevreye karşı son derece yüksek kalıntı toksisitesi nedeniyle birçok Avrupa ülkesinde ve Türkiye'de Methomyl kullanımını yasaklanmıştır (Boucaud-Maitre ve ark 2019, Erişim 1).

Methomyl nefrotoksitesinde histopatolojik olarak, glomerüllerde atrofi, tübüllerde dilatasyon, epitelde vakuoler dejenerasyon ile deskuamasyon, ayrıca intertübüler alanda ödem, renal kan damarında tromboz, yangısal hücre infiltrasyonu, perivasküler ödem ve hemoraji rapor edilmiştir (Ashour

**Yazışma adresi / Correspondence:** Bahadır Kılınc, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Keçioren, Ankara, Türkiye  
e-mail: bahadir.kilinc@tarimorman.gov.tr

\*Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesindeki birinci yazarın Doktora tezinden özetlenmiştir.

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0003-3426-2116 • <sup>2</sup>0000-0003-4234-8219

ve ark 2017, Sakr ve ark 2018). Methomyl ile ilişkili dejeneratif değişiklikler ve nefritik hasar, methomyl kaynaklı oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna, sonuçta ortaya çıkan serbest radikal birikimine ve antioksidan sistemin bozulmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (El-Demerdash ve ark 2013). Hücresel vakuolasyon oluşumu hücre hasarını sınırlamaya çalışan adaptif bir fizyolojik yanıt olarak değerlendirilirken yangısal reaksiyon ise, dokuların methomyl tarafından uygulanan oksidatif stres kaynaklı yaranmaya karşı bir savunma tepkisi olarak kabul edilir (Sakr ve ark 2018). Methomyl, memelilerde asetilkolinesteraz aktivitesini önemli ölçüde inhibe eder (Lin ve ark 2020).

Deve dikenini antik çağlardan beri bilinmektedir. Anavatanı Akdeniz bölgesi olup, Avrupa ve Kuzey Amerika boyunca, ülkemizde ise en fazla Ege ve Marmara bölgelerinde yayılış göstermektedir (Eren ve Sevgi 2020). Tohumlarında çok fazla miktarda silymarin bulundurulur. İçeriğinde kimyasal bileşenleri olarak silymarin; izosilibin, silibin, silidianin silikristin ve dehidrosilibin izomerlerinden meydana gelmektedir (Ding ve ark 2001). *Silybum marianum L.*, yaklaşık % 70-80 arasında silymarin flavonolignansları, % 20-30'luk miktarı ise çoğunluğunu polimerik ve okside polifenolik içeriklerin meydana getirdiği ve kimyasal olarak belirlenememiş türevleri içermektedir (Sanchez-Sampedro ve ark 2007). *Silybum marianum* tohumları % 1-5 oranında silymarin içermektedir. Tohumlarından üretilen ekstraktlarında %70-80 oranında silymarin vardır. *Silybum marianum* bitkisinin yapraklarında, çiçeklerinde ve köklerinde silymarin etkeni bulunmaz (Çelik ve Kan 2013). Silymarinde bulunan esas etkili madde *silibindir* (Çubukçu ve ark 2002).

Silymarin, çoklu in vitro ve hayvan çalışmalarında antifibrotik, antioksidatif ve antiinflamatuvar etkiler göstermiştir (Cai ve ark 2015).

Bu çalışmada broylerlerde methomyl toksikasyonuna bağlı oluşan böbrek hasarına karşı *Silybum marianum* tohumu tozunun koruyucu/önleyici ya da iyileştirici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Methomyl ve *Silybum marianum* Tohumu Tozu

Çalışmada ticari olarak temin edilen Methomyl (®Coupon 90 SP) ve *Silybum marianum* tohumu tozu kullanılmıştır. Ticari eldede edilen *Silybum marianum* Tohumu Tozunda HPLC cihazı ile yapılan analizlerde % 1,8 silymarin içeriği belirlenmiştir. Çalışmada MET gruplarına verilen standart broiler yemlerine 20 ppm methomyl, SMT gruplarına ise kg

başına 10 gr. *Silybum marianum* tohumu tozu katılmıştır. Her grup için ayrı ayrı olmak üzere Methomyl ve *Silybum marianum* tohumu tozu içeren broiler yemleri, özel bir yem fabrikasında mikser ile homojenize edilerek hazırlanmış ve hazırlanan homojenize yemler sızdırmaz özellikteki kraft torbalara konularak muhafaza edilmiştir.

### Deney Hayvanları ve Gruplar

Çalışma, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurul (Karar No:2021/07) izni ile gerçekleştirildi.

Çalışmada özel bir damızlık işletmesinden temin edilen 128 adet 7 günlük broiler civciv (Ross 308) kullanıldı. Deneme ortamına alınan civcivler adaptasyon amacıyla 7 gün kontrollü bakım ve beslenmeye alındı. Böylelikle civcivler 14 günlük yaştan itibaren denemeye hazır hale getirildi. Deneme amacıyla aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

**1. Kontrol Grubu** (KONT, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca standart broiler besleme yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

**2. Methomyl Grubu** (MET, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca her gün 20 ppm Methomyl içeren standart broiler yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

**3. SMT Grubu** (SMT, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca her gün 10 g/kg *Silybum marianum* Tohumu Tozu içeren standart broiler yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

**4. MET+SMT Grubu** (MET+SMT, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca her gün 20 ppm Methomyl + 10 gr/kg *Silybum marianum* tohumu tozu içeren standart broiler yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

Deneme süresince tüm broilerler için bir saat karanlık ve 23 saat aydınlık olacak şekilde aydınlatma programı uygulandı. Çalışmada KONT grubunda 6'nci, SMT grubunda 4'ncü ve MET+SMT grubunda 5'nci günlerde birer, MET grubunda ise 10, 16 ve 25'inci günlerde olmak üzere üç deney hayvanı ölü bulunduğu için istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir.

### Biyokimya ve histopatoloji örneklerinin hazırlanması

Deneme süresince her bir gruba ait broilerlerden 7 gün arayla 7, 14 ve 21'inci günlerde 8'er broiler rastgele seçilerek dekapitasyon yöntemiyle ötenazi uygulandı. 28'inci günde ise gruplarda kalan diğer hayvanlara (KONT, SMT ve MET+SMT gruplarından 7, MET grubundan 5 hayvan) sistemik nekropsi yapıldı. Biyokimyasal analiz amacıyla deney hayvanlarından

intrakardiyak yolla alınan kan örnekleri 4000 devirde 25 dakika santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri ependorf tüplere alınarak -80°C'de saklandı.

Biyokimyasal ölçümlerde serum numunelerinde total protein, kreatinin, ürik asit (Triolab - Ankara) kolorometrik metotla Beckman Coulter marka AU640 model otoanalizörde Imrogen marka sıvı reaktif ticari kit kullanılarak (Tablo 1) yapılmıştır.

**Tablo 1.** Biyokimyasal analizler için kullanılan ticari kit listesi.

Reaktif	Lot No	Marka
Ürik Asit	25042	Imrogen, (Türkiye)
Total Protein	21528	Imrogen, (Türkiye)
Kreatinin	21422	Imrogen, (Türkiye)

Sistemik nekropsi sırasında ise böbrek dokusuna ait makroskopik bulgular kaydedilerek fikzasyon amacıyla %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde muhafaza edildi. Histopatolojik inceleme amacıyla alınan böbrek dokusu örneklerinden rutin histopatoloji preparatı hazırlama prosedürünü takiben parafin blokler hazırlandı ve mikrotom (Leica RM 2125 RT) ile 5µm kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitler HE boyama protokolüne uygun şekilde boyandı (Luna, 1968). Histopatolojik bulguları değerlendirmek amacıyla Meyerholz ve ark (2019) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek skorlama yapıldı. Bu amaçla X20 objektif altında 9 alan incelendi ve Tablo 2'e göre skorlandı.

**Tablo 2.** Histopatolojik skorlama tablosu.

Skor	Tanımlama
0	Histopatolojik bulguya rastlanmadı
1	Histopatolojik bulgu kesitin 1/3'ünde (1-3 mikroskopik alanda) görüldü.
2	Histopatolojik bulgu kesitin 2/3'ünde (4-6 mikroskopik alanda) görüldü.
3	Histopatolojik bulgu kesitin 3/3'ünde (7-9 mikroskopik alanda) görüldü.

Histopatolojik olarak böbreklerde hiperemi, kanama, dejenerasyon, nekroz, proteinöz sıvı birikimi, bazal membranlarda kalınlaşma, yangısal hücre infiltrasyonu değerlendirildi. Her bir deneme grubundan 7, 14, 21'inci günlerde rastgele alınan sekizer ve 28'inci günde geride kalan KONT, SMT ve MET-SMT grubundan 7, MET grubundan ise 5 hayvana ait böbrek örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi. Histopatolojik skorların karşılaştırılması toplam skorlar üzerinden yapıldı. Bu amaçla böbrek kesitlerinde hiperemi, tubulus epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, Bowman kapsülünde kalınlaşma, intertubuler alanda kanama ve yangısal hücre infiltrasyonu,

tubulus bazal membranlarında kalınlaşma bulguları değerlendirildi.

### İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS (25.0) bilgisayar yazılımı kullanıldı. Verilerin dağılımları Brown-Forsythe ve Bartlett's test kullanılarak test edilmiştir. Grup kıyaslamaları için veriler için One-Way ANOVA Post Hoc Tukey testi uygulanarak harflendirilmiştir. Histopatolojik skor verileri Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Test sonuçları  $P < 0.05$ 'e göre anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar  $Mean \pm SE$  olarak verilmiştir.

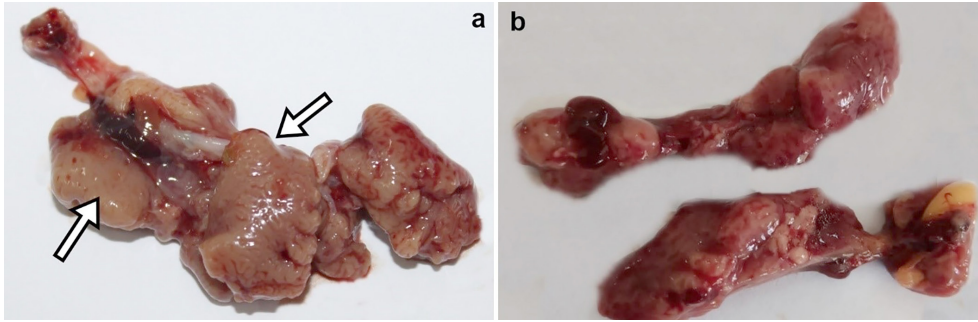
## Bulgular

### Makroskopik Bulgular

Çalışmanın 7 ve 14'üncü günlerinde nekropsileri yapılan MET, KONT, SMT ve MET+SMT grubu broilerlerin böbrek dokularında makroskopik bulguya rastlanmadı (Şekil 1b). Çalışmanın 21'inci gününde nekropsi yapılan MET grubuna ait böbreklerde dört, MET+SMT grubuna ait böbreklerde ise bir solgunluk ve şişkinlik olduğu görüldü (Şekil 1a). Yirmi sekizinci günde yapılan incelemede ise MET grubuna ait böbreklerde üç solgunluk ve iki şişkinlik gözlemlendi. Yirmi sekizinci günde ayrıca MET+SMT grubuna ait böbreklerde bir solgunluk ve bir şişkinlik tespit edildi. Makroskopik bulgular ve deneme hayvanlarında görülme sayıları Tablo 3'te sunulmuştur.

**Tablo 3.** Makroskopik bulgular ve deneme hayvanlarında görülme sayıları.

Nekropsi günü	Gruplar	Böbrek	
		Solgunluk	Şişkinlik
7	KONT	-	-
	MET	-	-
	SMT	-	-
	MET+SMT	-	-
14	KONT	-	-
	MET	-	-
	SMT	-	-
	MET+SMT	-	-
21	KONT	-	-
	MET	4	4
	SMT	-	-
	MET+SMT	1	1
28	KONT	-	-
	MET	3	2
	SMT	-	-
	MET+SMT	1	1



**Şekil 1. a)** MET grubuna ait bir böbrekte 21'inci günde solgun ve şişkin görünüm (oklar). **b)** MET-SMT grubuna ait bir böbrekte 7'nci günde normal görünüm.

### Mikroskopik Bulgular

Çalışmada histopatolojik olarak böbreklerde hiperemi, kanama, dejenerasyon, nekroz, proteinöz sıvı birikimi, bazal membranlarda kalınlaşma, yangısal hücre infiltrasyonu değerlendirildi (Şekil 2). Böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklik skorlarının toplamlarına bakıldığında KONT, SMT ve MET+SMT kendi grupları arasında istatistiki olarak değişiklik ( $P > 0,05$ ) bulunmamıştır. MET grubunda 21'inci günde en şiddetli hasar olduğu, 28'inci günde şiddetli ( $P < 0,001$ ), 14'üncü günde daha hafif şiddette hasarlı olduğu ( $P < 0,05$ ) ve 7'inci günde ise anlam-

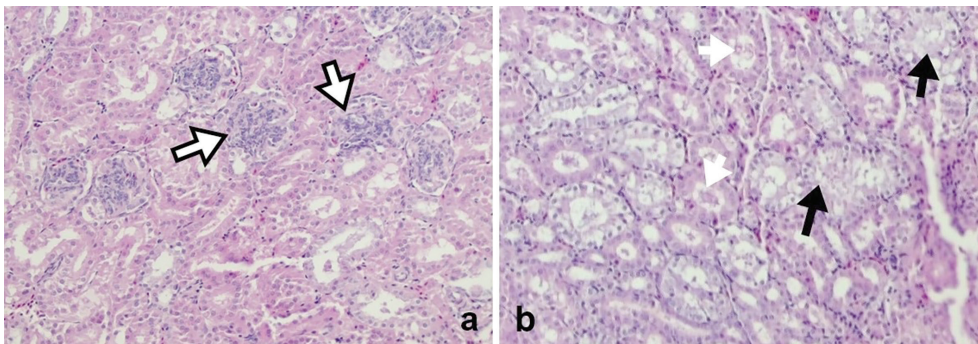
sız ( $P > 0,05$ ) olarak bulunmuştur. MET+SMT grubunda 28'inci gündeki sonuçları MET grubundan düşük, KONT ve SMT gruplarından yüksek olduğu ( $P < 0,001$ ), 21'inci gün sonuçlarına bakıldığında ise MET+SMT grubunun MET grubundan düşük, KONT ve SMT grupları ile istatistiki olarak aynı olduğu görüldü. 14'üncü gün sonuçlarına bakıldığında MET+SMT grubunun MET grubundan düşük, KONT ve SMT gruplarından yüksek olduğu ( $P < 0,05$ ) tespit edilmiştir.

Böbreklerde görülen histopatolojik bulgulara ait istatistiki karşılaştırma Tablo 4'de sunulmuştur.

**Tablo 4.** Böbreklerde görülen histopatolojik bulguların istatistiki karşılaştırılması

Günler	Gruplar				P DEĞERİ
	KONT	SMT	MET	MET-SMT	
7	0,37±0,26	0,25±0,25	1,87±0,74c	0,87±0,64	$P > 0,05$
14	0,00±0,00B	0,37±0,37B	4,00±1,40cA	2,62±1,52AB	$P < 0,05$
21	0,50±0,37B	0,37±0,26B	8,75±2,24aA	3,37±1,52B	$P < 0,001$
28	0,71±0,35C	0,28±0,28C	14,00±1,22bA	6,57±2,08B	$P < 0,001$
P Değeri	$P > 0,05$	$P > 0,05$	a,b,c: $P < 0,001$	$P > 0,05$	

a,b,c: sütündeki farklılıkları, A,B,C: Satırdaki farklılıkları ifade etmektedir.



**Şekil 2. a)** MET grubuna ait bir böbrekte glomerulonefritis. Hücre proliferasyonu ve kalınlaşmaya bağlı Bowman boşlukları daralmış veya kapanmış (oklar). **b)** Tubulus epitelinde dejenerasyon (siyah oklar) ve tubulus lümenlerinde proteinöz sıvı birikimleri (beyaz oklar). H-E. Orijinal Büyütme 200X

**Biyokimyasal analizler**

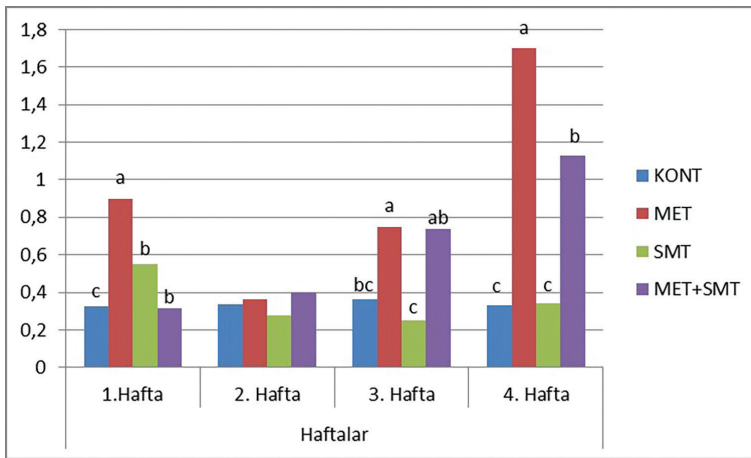
Tüm gruplardan elde edilen serum total protein, ürik asit ve kreatinin düzeyleri istatistiki karşılaştırılması

yapılmış olup tablo 4, 5 ve 6'da sunulmuştur. Grupların haftalık değişimleri ve ait olduğu parametrenin açıklamaları ayrıca şekil 3, 4 ve 5'te verilmiştir.

**Tablo 4.** Kreatinin düzeyinin haftalara göre değişiminin istatistik sonuçları.

Gruplar	KREATİNİN (mg/dL)				P Değeri
	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	
KONT	0,325±0,12	0,337±0,20	0,362±0,10	0,328±0,21	P>0,05
MET	0,900±0,27	0,362±0,09 <sup>\$\$</sup>	0,750±0,50	1,700±0,20 <sup>\$\$</sup>	P<0,01
SMT	0,550±0,14	0,275±0,16 <sup>\$</sup>	0,250±0,16	0,342±0,11 <sup>\$</sup>	P<0,05
MET+SMT	0,312±0,13	0,400±0,16	0,737±0,16 <sup>\$\$\$</sup>	1,128±0,18 <sup>\$\$\$</sup>	P<0,001

\$ = P<0,05, \$\$ = P<0,01, \$\$\$ = P<0,001 değerlerini ifade etmektedir.



**Şekil 3.** Kreatinin düzeyinin haftalara göre değişimi. İstatistiksel farklılıklar anlamlılık derecesine göre a, b, c olarak harflendirilmiştir.

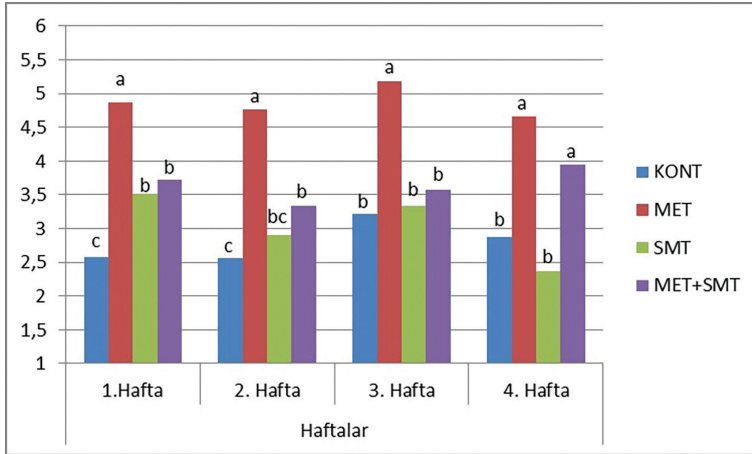
Kreatinin düzeyinin 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftalardaki KONT grubu ile SMT grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken (P>0,05), 1'inci haftada fark anlamlı bulunmuştur (P<0,05). KONT grupları ile MET grupları karşılaştırıldığında 1'inci ve 3. haftada (P<0,05) anlamlı düzeyde, 4'üncü haftada

ise (P<0,001) düzeyinde çok önemli fark görülürken, 2'nci haftada fark bulunamamıştır (P>0,05). MET grubu ile MET+SMT grubunun, 2'nci ve 3'üncü haftalardaki istatistiksel olarak karşılaştırıldığında fark bulunamazken, 1'inci haftada (P<0,01), 4'üncü haftada ise (P<0,05) düzeyinde anlamlı olarak fark bulundu.

**Tablo 5.** Ürik asit düzeyinin haftalara göre değişiminin istatistiki olarak sonuçları.

Gruplar	ÜRİK ASİT (mg/mL)				P Değeri
	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	
KONT	2,58±0,70	2,56±0,53	3,21±0,65	2,87±0,50	P>0,05
MET	4,87±0,44	4,76±0,50	5,18±1,23	4,66±0,87	P>0,05
SMT	3,52±0,35	2,9±0,47 <sup>\$</sup>	3,33±0,36	2,37±0,52 <sup>\$</sup>	P<0,05
MET+SMT	3,72±0,20	3,33±0,50	3,58±0,56	3,94±0,59	P>0,05

\$ = P<0,05 değerini ifade etmektedir.



**Şekil 4.** Ürik asit düzeyinin haftalara göre değişiminin grafik olarak sonuçları. İstatistiksel farklılıklar anlamlılık derecesine göre a, b, c olarak harflendirilmiştir.

Ürik asit düzeyinin 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftadaki KONT grubu ile SMT grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken 1'inci haftada anlamlı fark bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). KONT grubu ile MET grubu karşılaştırıldığında 1'inci, 2'inci ve 3'üncü haftada ( $P < 0,01$ ) düzeyinde önemli, 2'inci haftadaki ( $P < 0,001$ ) düzeyinde çok önemli fark bulunurken, 3'üncü ve 4'üncü haftada ise fark bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ). MET grubu ile MET+SMT grubunun 1'inci, 2'inci ve 3'üncü haftalar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında  $P < 0,05$  düzeyinde anlamlı olarak fark bul-

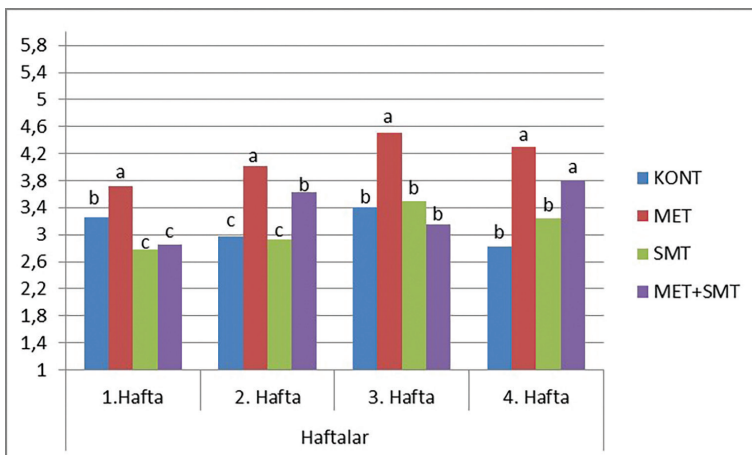
nurken, 4'üncü haftada anlamlı olarak fark bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ).

Haftalara göre serum ürik asit düzeyi değişimleri KONT, MET ve MET+SMT gruplarının aynı grup içerisindeki 1'inci hafta sonuçları ile karşılaştırıldığında 2'inci, 3'üncü ve 4'üncü haftalarda istatistiksel olarak fark ( $P > 0,05$ ) bulunmamıştır. SMT grubunda ise 1'inci haftaya göre 2'inci haftada anlamlı ( $P < 0,05$ ) ve 4'üncü haftada da istatistiksel olarak önemli ( $P < 0,01$ ) farklılık bulunmuştur.

**Tablo 6.** Total Protein düzeyinin haftalara göre değişiminin istatistiki olarak sonuçları.

Gruplar	TOTAL PROTEİN (mg/mL)				P Değeri
	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	
KONT	3,25±0,22	2,98±0,28	3,4±0,37	2,82±0,39 <sup>s</sup>	$P < 0,05$
MET	3,72±0,37	4,01±0,22	4,51±0,27 <sup>ss</sup>	4,30±0,45	$P < 0,01$
SMT	2,78±0,22	2,93±0,27	3,5±0,52 <sup>s</sup>	3,24±0,35	$P < 0,05$
MET+SMT	2,85±0,26	3,63±0,22 <sup>ss</sup>	3,15±0,27	3,80±0,16 <sup>sss</sup>	$P < 0,01$

\$ =  $P < 0,05$ , \$\$ =  $P < 0,01$ , \$\$\$ =  $P < 0,001$  değerlerini ifade etmektedir.



**Şekil 5.** Total Protein düzeyinin haftalara göre değişiminin grafik olarak sonuçları. İstatistiksel farklılıklar anlamlılık derecesine göre a, b, c olarak harflendirilmiştir.

Total Protein düzeyinin 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftalardaki KONT grupları ile SMT grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken ( $P>0,05$ ), 1'inci haftada anlamlı fark bulunmuştur ( $P<0,05$ ). KONT grupları ile MET grupları karşılaştırıldığında 1'inci, 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftalarda istatistiksel olarak ( $P<0,01$ ) değerinde önemli derecede fark bulunmuştur. MET grupları ile MET+SMT gruplarının 4'üncü haftada istatistiksel fark bulunamazken ( $P>0,05$ ), 1'inci ve 2'nci haftadaki total protein düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ( $P<0,05$ ) değerinde anlamlı, 3'üncü haftadaki düzeylerinin ise ( $P<0,01$ ) değerinde önemli olduğu bulunmuştur.

Haftalara göre serum total protein düzeyi değişimleri KONT grubunda 1'inci diğer haftalar karşılaştırıldığında 4'üncü haftada istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0,05$ ) düşüş bulunmuştur. MET grubunda 1'inci haftaya göre yapılan kıyaslamada istatistiksel olarak 3'üncü haftada ( $P<0,01$ ) çok önemli düzeyde fark bulunmuştur. SMT grubunda 1'inci haftaya göre yapılan kıyaslamada istatistiksel olarak 3'üncü haftada ( $P<0,05$ ) anlamlı düzeyde farklılık tespit edilmiştir. MET+SMT grubunda 1'inci haftaya göre kıyaslandıklarında istatistiksel olarak 2'nci haftada ( $P<0,01$ ) düzeyinde önemli, 4'üncü haftada ise ( $P<0,001$ ) değerinde çok önemli olarak sonuç bulunmuştur.

## Tartışma

Karbamatlar karbamik asit türevleri olup pestisit, herbisit ve fungusit olarak kullanılırlar (Shalaby ve ark 2010). Methomyl [IUPAC: S- Metil N-( Metilkarbamoiloksi) tiyoasetimidat], bir mono-metil-karbamat olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Methomyl ayrıca gıda maddelerinde kirletici olarak bulunabilen kalıntılardan birisidir (Makrides ve ark 2005). Pestisitler serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olarak ya da serbest radikalleri süpüren antioksidan sistemlerde değişiklikler yaparak oksidatif stresi indükleyebilir (Banerjee ve ark 2001). Devedikenini olarak da bilinen Silybum marianum bitkisinin tohumlarında bol miktarda bir flavonoid bileşiği olan silymarin etken maddesi mevcuttur (Kocaman ve Dabak 2015). Yapılan araştırmalarda Silymarinin antioksidan, antiviral, antiapoptotik, antienflamatuvar, antikarsinojenik, antianjiyojenik ve antifibrotik etkileri ortaya konulmuştur (Gür ve Aktaş 2022).

Çalışmada, broiler civcilerde Methomyl'in böbrek dokusundaki toksik sonuçları ile Silybum marianum tohumu tozunun nefroprotektif etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Methomyl ile ilişkili dejeneratif değişiklikler ve nefritik hasar, Methomyl kaynaklı oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna ve sonuçta ortaya çıkan serbest radikal birikimine ve antioksidan sistemin bozulmasıyla ilişkilidir (El-Demerdash ve ark 2013). Çalışmamızda KONT ve SMT gruplarının böbrek histopatolojik skorları karşılaştırıldığında tüm haftalarda benzer sonuçlar olmakla birlikte MET grubunda yüksek skorlar alınmış MET+SMT grubunda ise yüksek düzeydeki hasarların azalmış olduğu dikkati çekmiştir. Şentürk ve ark (2010) tarafından yapılan bir çalışmada silymarinin böbrek dokuda oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğunu belirtmektedir. Bu sonuç SMT'nin oksidatif stresi düşürerek nefritik hasarı azalttığı yorumlanabilir.

Djefal ve ark (2015) Methomyl ile muamele edilen sıçanlarda, KONT grubu sıçanlarına göre önemli ölçüde daha yüksek üre ve kreatinin seviyeleri tespit etmişlerdir. Yine yapılan diğer bir çalışmada Sakr ve ark (2018), Methomyl uygulaması sonucu, kreatinin seviyesinde anlamlı ( $P<0,001$ ) artış belirlemiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da kreatinin seviyesinin KONT grubuna göre MET grubunda uygulamaya bağlı olarak yaklaşık 5 kat artmış olması Djefal ve ark (2015)'nin çalışması ile uyumlu bulunmuştur. MET+SMT grubunda ise kreatinin seviyesinde azalma olması silymarinin böbreklerdeki hasarın azalmasına katkı sağlamış olabileceğini düşündürmüş, teyit amacıyla buna özel bir çalışma yapılmasının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Böbrekler, yüksek kan hacmi ve çözünen maddelerin konsantrasyonu edilmesiyile birlikte çevresel kirleticiler tarafından toksik saldırıya karşı duyarlıdır. Deneysel olarak rasyona thiram ve klorpirifos ilave edilen deneysel çalışmalarda böbrek tubüler epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz görülmüştür (Subapriya ve ark 2007, Krishnakumar ve Visvanathan 2014). MET ile deney hayvanlarında yapılan diğer çalışmalarda, böbreğin tubulus epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklik, intertubuler alanda fokal yangısal hücre infiltrasyonu ve konjesyon belirlenmiştir (El-Demerdash ve ark 2013, Mansour ve ark 2015, Aslanturk ve Kalender 2021). Çalışmamızda Methomyl toksikasyonuna maruz kalan broilerlerin böbrek dokusunda tubul epitelinde dejenerasyon ve nekroz, Bowman bazal membranında kalınlaşma, intertubuler alanda kanama ve yangısal hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. Bu histopatolojik bulgular Methomyl'in broilerlerin böbrek dokusunda nefrotoksik etki gösterdiği bilgisini desteklemektedir. Cecen ve ark (2011)'nin Doksorubisin ile toksikasyon yapılan hayvanlarda böbrek dokusunun histopatolojik incelemesinde belirgin tübüler dejenerasyon

ve nekroz dahil önemli renal lezyonlar gözlenmiş ve Silymarin tedavisinin bu histopatolojik bulguları azalttığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmamızda da, MET grubunda, KONT grubuna göre tubulus epitellerinde nekroz ve Bowman bazal membranında kalınlaşma artarken, MET+SMT grubunda ise SMT ve KONT grubuna benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca MET grubunda intertubuler yangısal hücre infiltrasyonu ve kanamanın MET-SMT grubuna göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde Methomyl'in nefrotoksik etkisine karşı, Silymarin böbrek dokusunda iyileştirici etki göstermiştir.

## Sonuç

Sonuç olarak Methomyl verilen grupta böbreklerde oluşan histopatolojik değişikliklerinin şiddetinin zamana bağlı olarak da artış gösterdiği, Methomyl özellikle 4'üncü haftada böbrek dokularında önemli düzeyde hasar meydana getirdiği görülmüş, koruyucu/iyileştirici amaçla verilen Silybum marianum'un tüm haftalarda biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde hasarları azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışmada biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde; Kreatinin, Ürik asit ve Total protein değerleri de MET+SMT grubunda MET grubuna oranla daha düşük seviyede gözlenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, broylerlerde Methomyl maruziyetine bağlı böbreklerde oluşabilecek toksik hasarın, hasarın yeni yapılacak rasyon çalışmaları doğrultusunda Silybum marianum Tohumu Tozu ilave edilerek azaltılabileceği önerilmiştir.

**Etik kurul kararı:** Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulunun 05.05.2021 tarih ve 2021/7 sayılı kararı ile çalışmanın yapılması uygun görülmüştür.

## Kaynaklar

- Ashour MB, Ahmed OM, Asran A, Ali MA, 2017. Assessment of the preventive effects of *Salvia officinalis* and *Ruta graveolens* ethanolic leaf extracts on chlorpyrifos-and Methomyl-induced renal toxicity and oxidative stress in albino rats. *International journal of prevention and treatment*, 6(2), 34-44. DOI: 10.5923/j.ijpt.20170602.03
- Aslanturk A, Kalender Y, 2021. Methomyl-induced nephrotoxicity and protective effect of curcumin in male rats. *Toxicology research*, 10, 1003-1012. doi.org/10.1093/toxres/tfab080
- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS, 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspective and trends. *Reviews on environmental health*, 16(1), 1-40. doi.org/10.1515/REVEH.2001.16.1.1
- Boucaud-Maitre D, Rambourg MO, Sinno-Tellier S, Puskarczyk E, Pineau X, Kammerer M, Bloch J, Langrand J, 2019. Human exposure to banned pesticides reported to the French Poison Control Centers: 2012-2016. *Environmental toxicology and pharmacology*, 69, 51-56. doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.017
- Cecen E, Dost T, Culhaci N, Karul A, Ergur B, Birincioglu M, 2011. Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced

- toxicity. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 12(10), 2697-2704.
- Çelik AS, Kan Y, 2013. Konya ekolojik şartlarında yetiştirilen meryemana dikenli bitkisinin (*Silybum marianum*) tohum verimi, Silymarin ve sabit yağ bileşenlerinin belirlenmesi. *selcuk journal of agriculture and food sciences*, 27(1), 24-31.
- Çubukçu B, Meriçli AH, Mat A, Sarıyar G, Sütlüpinar N, Meriçli F, 2002. İ.Ü. eczacılık fakültesi farmakognozi anabilim dalı, fitoterapi yardımcı ders kitabı.
- Ding TM, Tian SJ, Zhang ZX, Gu DZ, Chen Y, Shi YH, Sun ZP, 2001. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26(1), 155-61. doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00364-8
- Djeffal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, Feki AE, 2015. Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on Methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and industrial health*, 31(1), 31-43. doi.org/10.1177/0748233712468020
- El-Demerdash F, Dewar Y, ElMazoudy RH, Attia AA, 2013. Kidney antioxidant status, biochemical para MET ers and histopathological changes induced by Methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 897-01. doi.org/10.1016/j.etp.2013.01.002
- Erişim 1: <https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitki-Sagligi-Hizmetleri/Bitki-Koruma-Urunleri-Ve-Makinalari/Bitki-Koruma-Urunleri> Erişim tarihi:24.07.2023
- Gür FM, Aktaş İ, 2022. Silymarin protects kidneys from paclitaxel-induced nephrotoxicity. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(3), 452-58. doi.org/10.24925/turjaf.v10i3.452-458.5119
- Kocaman N, Dabak Ö, 2015. Hepatoprotektif bir ajan: silymarin. *Firat tıp dergisi*, 20(3), 128-32.
- Krishnakumar T, Visvanathan R, 2014. Acrylamide in food products: a review. *Journal of Food Processing and Technology*, 5(7). DOI: 10.4172/2157-7110.1000344
- Lin Z, Zhang W, Pang S, Huang Y, Mishra S, Bhatt P, Chen S, 2020. Current approaches to and future perspectives on Methomyl degradation in contaminated soil/water environments. *Molecules*, 25(3), 738. doi.org/10.3390/molecules25030738
- Luna LG (1968): *Manual of histologic staining Methods of the armed forces institute of pathology*, 3rd edn. McGraw- Hill, New York.
- Makrides C, Koukouvas M, Achillews G, Tsikkos S, Vounou E, Symeonides M, Christodoulides P, Ioannides M, 2005. Methomyl-induced severe acute pancreatitis: possible etiological association. *JOP*, 6(2), 166-71.
- Mansour SA, Mohamed RI, Ali AR, 2015. Which exposure period to selenium is more protective against hepato-renal toxicity of Methomyl in male rats. *J Biochem Int*, 2, 105-18.
- Meyerholz DK, Tintle NL, Beck AP, 2019. Common pitfalls in analysis of tissue scores. *Veterinary pathology*, 56(1), 39-42. doi.org/10.1177/0300985818794250
- Sakr S, Hassanien H, Bester MJ, Arbi S, Sobhy A, El Negris H, Steenkamp V, 2018. Beneficial effects of folic acid on the kidneys and testes of adult albino rats after exposure to Methomyl. *Toxicology research*, 7(3), 480-91. doi.org/10.1039/c7tx00309a
- Shalaby MA, El Zorba HY, Ziada RM, 2010. Reproductive toxicity of Methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. *Food and chemical toxicology*, 48(11), 3221-3226. doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.027
- Subapriya S, Vairamuthu S, Manohar BM, Balachandran C, 2007. Pathomorphological changes in thiram toxicosis in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*, 6(4), 251-54.
- Şentürk H, Kolankaya D, Şahin Y, 2010. Renal İskemi-Reperfüzyonu Sırasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi. *Cankaya University Journal of Science and Engineering*, 7 (1).