

## Effekte von Phenylhydrazin Toxizität und Silymarin über die Synthese von MT-I/II bei syrischen Hamstern

Serpil DAĞ ERGİNSOY\*  
Kürşad YAPAR\*\*

Recai TUNCA\*  
Hasan ÖZEN\*

Mahmut SÖZMEN\*  
Mehmet ÇİTİL\*\*\*

\* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\*\* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2007/10-A

### Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Rolle des Silymarins bei der experimental Phenylhydrazin (PH)-Toxizität und die Unterschiede von Metallothionein (MT)-Expression mit Hilfe der immunohistochemischen Techniken zwischen den Gruppen zu untersuchen.

In dieser Untersuchung dienten insgesamt 40 syrische Hamster. Die Tiere wurden in vier Gruppen als Kontroll- und drei Untersuchungsgruppen (PH, Phenylhydrazin+Silymarin [PHS], Silymarin Gruppe) aufgeteilt. Die bei den Hamstern durchgeführten Behandlungen dauerten 10 Tagen. Die Kontrollgruppe erhielt intraperitoneale Injektionen von 0,9% NaCl. Die PH-Gruppe erhielt tägliche die intraperitonealen Injektionen von Phenylhydrazin und die PHS-Gruppe intraperitoneale Injektionen von Phenylhydrazin und orale Gabe von Silymarin. Der SilymarinGruppe (S-Gruppe) erhielt die intraperitoneale Injektionen von 0,9% NaCl und orale Gabe von Silymarin für 10 Tage. Am Ende der Durchführung wurden allen Hamster mit Zervikal dislokation getötet.

Es konnte festgestellt, dass die intraperitoneale Phenylhydrazinapplikationen die makroskopische und mikroskopische deutliche Veränderungen in der Leber und Milz sowie in den Nieren bei Hamster verursachen. Es wurde gezeigt, dass die Silymarin Gabe die durch PH-Toxizität verursachten Veränderungen in den Organen vermindert und dass PH zu einer Erhöhung der MT-Expression bei der PH-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und PHS-Gruppe.

Zusammenfassend, dass intraperitoneale Injektionen von Phenylhydrazin (PH) ausgeprägte Veränderungen bei Hamster verursachen und dass Silymarin eine Rolle in den zellulären Abwehrmechanismen spielen kann.

**Schlüssel wörter:** Phenylhydrazin, Silymarin, Metallothionein, Hamster.

### Suriye Hamsterlerinde Fenilhidrazin Toksisitesi ve Silimarinin MT-I/II Sentezi Üzerine Etkileri

#### Özet

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan Fenilhidrazin (PH) toksikasyonunda Silimarinin (S) rolü ve gruplar arasında Metallothionein (MT) sentezindeki farklılıkların immünohistokimyasal yöntemle ortaya konulması amaçlandı.

Çalışmada 40 adet Suriye Hamsteri kullanıldı ve hayvanlar 4 eşit gruba (kontrol grup, PH grup, Silimarin, Phenylhydrazin+Silymarin [PHS] grup) ayrıldı. Kontrol grubu hayvanlarına intraperitoneal yolla %0,9 NaCl, PH grubuna intraperitoneal yolla fenilhidrazin, PHS grubuna ise intraperitoneal yolla fenilhidrazin ve oral yolla silimarin 10 gün süreyle uygulandı. Silimarin grubuna oral olarak silimarin 10 gün süreyle verildi. Çalışmada uygulamaların bitimini takiben hayvanlar servikal dislokasyonla öldürüldü.

PH toksisitesine bağlı olarak karaciğer, dalak ve böbrekte makroskopik ve mikroskopik değişikliklere rastlandı. Silimarinin PH'nin neden olduğu toksisiteye bağlı olarak ortaya çıkan doku değişikliklerini azalttığı görüldü. PH'nin kontrol grubuna göre MT sentezinde bir artışa neden olduğu ortaya konuldu. PHS grubunda yalnızca PH uygulanan gruba göre daha düşük oranda MT-sentezinin gerçekleştiği gözlemlendi.

Sonuç olarak oral yolla verilen Silimarinin, PH toksisitesine karşı hücrel savunma mekanizmasında etkili olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar sözcükler:** Fenilhidrazin, Silimarin, Metallothionein, Hamster.

---

#### İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426801/1156

e-mail: serpilerginsoy@hotmail.com

## EINLEITUNG

Hydrazinverbindungen werden oft in der Industrie als Antioxidantien, Kraftstoffe, Explosivstoffe, Schädlingsbekämpfungsmittel und Färbemittel sowie in der Medizin als Medikamente gegen Depressionen, Tuberkulose und Krebs <sup>1</sup> benutzt. Hydrazinverbindungen sind auch für ihre biologische Giftigkeit bekannt. Parenterale Injektionen von Phenylhydrazin (PH) verursachen hochgradige hämolytische Anämien bei Säugetieren und bewirken eine Reticulozytose, indem sie den Hämoglobinhalt reifer Erythrozyten irreversibel verändern <sup>2</sup>. Die Reaktion von PH mit Hämoglobin erzeugt Wasserstoffperoxid und zerstört dabei Hämoglobin durch die Bildung oxidierter Verbindungen und freier Radikale des Hydrazins <sup>3</sup>. Hydrazine sind fähig die Funktion des mikrosomalen Zellfarbstoffs P-450 der Leber über die Bildung von freien Radikalen zu hemmen <sup>4</sup>. Die Bildung der freien Radikale während der mikrosomalen Oxidation der Hydrazine sind mit verantwortlich für die Hepatotoxizität der Hydrazinverbindungen <sup>5</sup>.

Silymarin ist ein Extrakt von *Silybum marianum* und hat vielfache Antikarzinome <sup>6</sup> und Hepatoprotektionswirkungen <sup>7</sup>. Zahlreiche Studien werden gezeigt, dass Silymarin vor der Reaktion von Lipidperoxidation schützt <sup>8,9</sup>. Es wurde gezeigt, dass Silymarin kräftig antioxidationsfähig ist und freie Radikale und die reaktive Sauerstoffe von den Zellen entfernt <sup>8</sup>. Dieses führt zu einer deutlichen Stärkung der Antioxidationsabwehrmechanismen in den Zellen durch Verringerung der schädlichen Effekte von der Reaktion der freien Radikale <sup>10</sup>.

Metallothioneine (MT) sind eine Gruppe von cysteinreichen und metall-enthaltenden (Kupfer, Zink) Proteine mit niedrigem Molekulargewicht und spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen <sup>11</sup>. MT tritt in unterschiedlichen isomeren Formen, hauptsächlich MT I und II, auf <sup>12</sup>. Sie entstehen in den meisten Geweben und ihre Synthese kann durch viele Faktoren (Schwermetalle, Hormone, chemischen und physikalischen Stress) ausgelöst werden. Dieses zeigt ihre Rolle in den zellulären Abwehrmechanismen sowie in der zellulären Proliferation und Differenzierung <sup>13</sup>. Die Hauptfunktionen von MT sind die Entgiftung von Schwermetallen und das Abfangen der freien Radikale <sup>14</sup>.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir das

Verhältnis zwischen der von PH verursachten Toxizität, der Rolle in den zellulären Abwehrmechanismen von Silymarin und der Entstehung von MT in Bezug zur Zeit, indem wir Änderungen in der Verteilung dieses Proteins in Hamstergewebe durch immunohistochemischen Techniken überprüften.

## MATERIALIEN und METHODEN

### *Tiere und Behandlung*

40 klinisch gesunde syrische Hamster, im Alter von 20-24 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von  $90 \pm 4.9$  g, wurden nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen eingeteilt (fünf männliche und fünf weibliche Hamster für jede Gruppe, in unterschiedlichen Käfigen) und gehalten in Käfigen mit Maschendraht aus Edelstahl. Die Tiere wurden in einem gut belüfteten, temperaturgeregeltem Raum ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bei 55% relativer Luftfeuchtigkeit und einem je 12 h Licht/ dunklem Zyklus untergebracht. Ihnen wurde Zugang zum Labornagetier-Futter (Korkuteli Feeds, Antalya, Türkei) und Leitungswasser ad libitum bis zur Zeit der Tötung erlaubt.

### *Protokoll des Experiments*

Die Phenylhydrazingruppe (PH-Gruppe) und Phenylhydrazinsilymarin-Gruppe (PHS-Gruppe) erhielt tägliche intraperitoneale Injektionen von 40 mg/kg Phenylhydrazin (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0.9% NaCl für 10 Tage. Zusätzlich erhielt die PHS-Gruppe orale Gabe von 100mg/kg/Tag Silymarin. Während Silymarin-Gruppe (S-Gruppe) sowohl tägliche intraperitoneale Injektionen von 0.5 ml 0.9% NaCl als auch orale Gabe von 100mg/kg/ Silymarin erhielt, erhielt die Kontrollgruppe (K-Gruppe) nur intraperitoneale Injektionen von 0.5 ml 0.9% NaCl für 10 Tage.

### *Gewebeproben-Bearbeitung*

Wie geplant, wurden die Hamster von allen Gruppen am Ende der Untersuchung mit Zervikal dislokation getötet. Sofort nach dem Töten wurden ihre inneren Organe (Leber, Herz, Milz, Lungen, Nieren, Dünn- und Dickdarm und Pankreas) entnommen. Die Leber- und Milzgewichte wurden gewogen. Die Organen wurden in dünnere Schichten geschnitten und in 10% gepuffertem Formalin eingelegt. Nach Fixierung wurden Schnitte im Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin&Eosin (H&E) für die histopathologischen Untersuchungen gefärbt.

### Immunohistochemie

Schnitte von 4µm Dicke wurden 15 Minuten mit frisch zubereiteten 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol behandelt, um die endogene Peroxidasetätigkeit zu entfernen.

Eine Antigenwiederherstellungstechnik wurde eingesetzt, um die Immunfärbung von MT zu erhöhen. Dieses Protokoll verwendete eine Natriumzitat-Wiederherstellungslösung (0.1 M, pH 6.0) und einen Mikrowellenherd. In dieser Studie wurde verwendet ein monoklonaler Mäuseantikörper, der mit menschlicher und Kaninchen-MT reagiert (Klon: E9, Dako, Carpinteria, USA, Code M0639). Dieser Antikörper reagiert mit MT-1 und MT-2. Die Schnitte wurden für 60 Minuten inkubiert mit primär Antikörper verdünnter (1:600) im normalen Kaninchenserum NRS/PBS. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 1:300 in PBS verdünnte biotinyliertem Anti-Maus-Immunglobulin-G (Dako) des Kaninchens inkubiert und nach der Inkubation noch drei Male mit PBS ausgespült.

Die Schnitte wurden dann für 30 Minuten mit einem Streptavidin-Peroxidasekomplex inkubiert (ABC; Dako, Carpinteria, USA) und drei weitere Male mit PBS ausgespült. Schließlich wurden die Schnitte für 3 Minuten mit 0.035% von 3.3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (KLEKS, Sigma, St. Louis, MO., USA), gelöst in PBS, pH 7.6, enthaltend 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit destillierten Wasser gespült und mit Harris Hämatoxylin gefärbt und gelagert. Negative Kontroll-Gewebeschnitte wurden mit normalem Kaninchenserum inkubiert. Die Spezifität der monoklonalen Antikörper der MT wurde durch Vorabsorptionstechniken geprüft, in denen der Antikörper vorher durch einen Überfluß (100 µmol) des Ausgangsantigen (Pferde-MT) absorbiert wurde (Sigma, St. Louis, USA).

### Analyse der Ergebnisse von Immunfärbung

Der Prozentsatz des ganzen Bereichs der positiven Zellen von MT wurde semiquantitativ unter einem hellen Mikroskop mit einem 10x Okular mit Rasterfeld und einem 40x Objektiv gemessen. Die markierte Intensität in einem gegebenen zellulären Kompartiment wurde auf einer semiquantitativen Grundlage festgesetzt. Die Ergebnisse der der Immunoreaktivität wurden wie folgt kategorisiert: (-) negative, (+; schwach), 1-25%; (++; mittel), 26-50% (+++; intensiv), >50% der Zellen positiv.

## ERGEBNISSE

### Klinische Befunde

Bei den mit PH-behandelten Hamstern konnten die klinische Befunde, wie eine Lustlosigkeit, Appetitlosigkeit und Verminderung der Bewegung und von Futtermittelverbrauch beobachten. Die Konjunktiva war bleich und anämisch. Die klinischen Erscheinungen der mit PH und Silymarin behandelten Tiere (PHS-Gruppe) waren geringer als die klinischen Veränderungen der PH-Gruppe. Die Tiere der Kontroll- und Silymarin-Gruppe zeigten keine klinischen Befunde.

### Pathologische Befunde

In der Obduktion war ein Ikterus bei den PH-behandelten Tieren zu beobachten. Das Blut war spät geronnen und hämolytisch. Das Gewicht der Organen (Leber, Niere, Herz, Milz; Lunge) im Vergleich zu den Kontrolltieren war zugenommen (Tab. 1). In der PH-Gruppe gab es eine deutliche Splenomegalie mit einer Größe von mehr als das 2-7-fache im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 1). Die Leber war geschwollen und in der Konsistenz brüchig bei der PH-Gruppe. Die Splenomegalie wurde auch bei der PHS-Gruppe festgestellt, aber die Stärke war geringer als bei der PH-Gruppe (Abb. 1). Die Kontroll- und Silymarin-Gruppe wiesen keine makroskopischen Befunde auf.

**Tablo 1** Hamsterlerin ortalama vücut ve organ ağırlıkları  
**Tabella 1** Durchschnittliches Körper- und Organgewicht der Hamster (g)

Organ	Gruppe			
	PH	PHS	S	K
Körpergewicht	97.96 ±11.98	96.74 ±12.08	97.31 ±16.97	97.56 ±17.85
Leber	6.25 ±0.90	4.8 ±0.66	4.99 ±1.11	4.58 ±0.97
Niere	1.62 ±0.32	1.28 ±30.30	0.96 ±0.17	1.07 ±0.27
Herz	0.67 ±0.15	0.59 ±0.20	0.50 ±0.15	0.47 ±0.09
Lunge	1.02 ±0.22	1.00 ±0.10	0.86 ±0.28	0.85 ±0.20
Milz	1.14 ±0.39	0.83 ±0.35	0.23 ±0.09	0.22 ±0.08

### *Histopathologische Befunde*

Die mit PH behandelten Hamster zeigten die folgenden histopathologischen Eigenschaften im Vergleich zu der normalen Kontrollgruppe. Die tägliche Verabreichung von Phenylhydrazin bei erwachsenen männlichen und weiblichen Hamstern erzeugte eine akute hämolytische Anämie, die schnell von einer starken hämatopoetischen Reaktion begleitet wurde, welche die Milz und die Leber mit einbezieht. Es gab eine deutliche Splenomegalie mit dem 2-7-fachen der normalen Größe in der PH-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Das war histologisch auf eine Hyperplasie der phagozytotisch aktiven reticuloendothelialen Zellen und der stromalen Bindegewebezellen zurückzuführen. Eine beträchtliche Anzahl von Hämosiderin granula war in den reticuloendothelialen Zellen, die vergrößerte Sinusoide zeigten, in den Makrophagen und in den intersinusoidalen Räumen der Milz zu finden. Erythrozyten, die vergrößerten Sinusoide anfüllend, waren zu finden. Mehr Lymphozyten als normalerweise waren in den Milzbändern zu finden. Alle Entwicklungsstadien der Erythropoese waren in der roten Pulpa anwesend und einige Entwicklungsstadien waren in den venösen Sinusoiden sowie viele Megakaryozyten waren in der roten Pulpa zu sehen.

Die Leber der PH-Gruppe waren leicht vergrößert. Unter dem Lichtmikroskop waren die Lebervenen und Gefäße dilatiert und mit Blut angefüllt. Beobachtet wurde eine deutliche hepatozelluläre Megalositose, Megakaryositose und gelegentlich zweikernige Hepatozyten. Die Lebersinusoide waren wegen erhöhter zellulärer Infiltration vergrößert. Diese Zellen waren hämatopoetisch und formten kleine fokale Aggregate, die nicht mit Portal- und Zentralvenen verbunden waren, und das sinusoidale Lumen anfüllten. Eine leichte sinusoidale Infiltration mit Neutrophilen und eine Hepatozytendegeneration wurde auch festgestellt.

In den Lumen der proximalen Tubuli wurde eine hochgradige Kongestion und in den Gewebewischenräumen des kortikalen Bereichs der Nieren von PH-Gruppe dokumentiert. Beobachtet wurden auch regenerative Veränderungen, die durch junge Epithelzellen mit hyperchromatischem Kern und vielen Mitosen gekennzeichnet wurden,.

Im Vergleich zu der PH-Gruppe wurden bei der PHS-Gruppe die gleichen histopathologischen Er-

scheinungen in der Leber, in den Nieren und in der Milz festgestellt. Aber die Stärke der histopathologischen Veränderungen bei der PHS-Gruppe waren geringer als die PH-Gruppe. Bei der Kontroll- und Silymaringruppe konnten keine besonderen histopathologischen Veränderungen beobachten.

### *Ergebnisse von MT-Immunfärbung*

PH-Applikationen änderten den immunohistochemischen Status in der Leber, in den Nieren, in der Milz, im Magen und in den Därmen der Hamster. Die semiquantitative Analyse der MT-Immunfärbung von allen Gruppen wurde in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei den Hamstern, denen PH verabreicht wurde, erhöhte sich deutlich die MT-Immunmarkierung in der Leber, in den Nieren, in der Milz. Intensive MT positive Befunde wurden in den Hepatozyten bei der PH-Gruppe ermittelt (Abb. 2a). Die zellplasmatische Färbung für MT war in Hepatozyten zu finden, während im Kern MT-Färbung selten war. Auffallende MT-Immunfärbung in den Zytoplasmen und Kernen von zweikernigen Hepatozyten und Megalozysten wurden beobachtet. Bei den Hamster der PHS-Gruppe erhöhte sich eine mittlere MT-Immunmarkierung in den Leberzellen (Abb. 2b). Die Intensivität der MT-Immunfärbung war bei der PHS-Gruppe geringer als die PH-Gruppe. Die Verteilung der MT-Färbung in den Zellen war bei der PHS-Gruppe ähnlich im Vergleich zu der PH-Gruppe. Bei der Kontroll- und Silymaringruppe war die MT-Färbung auf einige parenchymale Zellen der Leber begrenzt (Abb. 2c).

In der PH-Gruppe zeigte das immunohistochemische Färben mit diesem Antikörper Reaktivität mit einigen epithelialen Bestandteilen des Nephrons. Während sich die zellplasmatische MT-Immunreaktivität stark in den proximalen Tubuli von PH-Gruppe (Abb. 2d) zeigte, färbten sich die Zellen der distalen Tubuli schwach. Eine MT positive Markierung wurde in den Lumina der Nierentubuli gezeigt. In den Nieren war eine mittlere MT-Immunreaktivität in der PHS-Gruppe (Abb. 2e) und eine schwache MT-Immunreaktivität in den Kontroll- und Silymarin-Gruppen zu beobachten (Abb. 2f). Immunreaktivität im Zytoplasma des Tubuliepithels der Nierenrinde beobachtet. Glomeruli wurden in allen Gruppen nicht gefärbt.

Eine mittlere zellplasmatische Färbung in den lymphoiden Zellen in der weißen Pulpa und den

**Tablo 2.** MT sentezinin semikuantitatif analizinin gruplara göre dağılımı**Tabella 2.** Die Verteilung der semikuantitativen Analyse von MT-Synthese in den Gruppen

Gruppe	Gruppe							
	Leber	Niere	Milz	Magen	Intestines	Herz	Lunge	Pancreas
PH	+++	+++	++	++	++	-	+	+++
PHS	++	++	+	++	+ / ++	-	+	+++
S	+	+	-	+	+	-	+	+++
K	+	+	-	+	+	-	+	+++

Die Ergebnisse wurden wie folgt kategorisiert: (-) keine positiv gefärbten Zellen; (+; schwach), 1-25%; (++; mittel), 26-50% (+++; intensiv), >50% der Zellen positiv

Keimzellen und auch den Makrophagen war bei den PH-Gruppe zu sehen, während eine schwache MT-Färbung bei der PHS-Gruppe zu beobachten war. Keine MT-Immunreaktivität wurde in der Kontrollmilz und in der Milz der S-Gruppe ermittelt.

Bei allen Gruppen wurde MT sowohl im Magen- als auch im intestinalen Drüsenepithel gezeigt. In der PH- und PHS-Gruppe zeigte sich MT deutlicher als in der Kontroll- und in der Silymarin-Gruppe. Keine MT-Aktivität war im Herz der allen Gruppen festzustellen. MT-Aktivität war in der Lunge und in der Pancreas der allen Gruppen ähnlich.

## DISKUSSION

Hydrazinverbindungen werden viel in der Industrie benutzt. Sie werden verwendet als Kraftstoffe, Pestizide und Explosivstoffe. In der Medizin werden sie zur Behandlung der Tuberkulose und des Bluthochdrucks eingesetzt<sup>1</sup>. Trotz sind ihrer industriellen und therapeutischen Verwendung giftige Effekte der Hydrazine beschrieben worden, einschließlich irreversibler Zellschäden.

PH verursacht eine Freigabe von freiem Eisen und führt zu Lipidperoxidation und Hämolyse<sup>2</sup>. Es ist bekannt dafür, die Lebensdauer der zirkulierenden Erythrozyten zu verkürzen, was zur hämolytischen Anämie und Reticulozytose führt<sup>2</sup>. Es verursacht durch Oxidation Schäden bei den Erythrozyten und umfangreiche Aggregation und Verminderung der Hauptmembran-Proteine. Da freigesetztes freies Eisen Redox-aktiv ist, kann es die Bildung von schädlichen Sauerstoffspezies, wie Hydroxylradikale, fördern<sup>15</sup>. Die erhöhte Sauerstoffspezies sind sich von den Schäden der Zelle verantwortlich. Hydrazine können Veränderungen in der Leber verursachen<sup>16</sup>.

Die Verteilung und die Art der klinischen und makroskopischen Läsionen waren in der vorliegenden Studie der von früheren Studien ähnlich<sup>2,17</sup>. Wie eine andere Untersuchung<sup>2</sup> wurde hämolytische Anämien bei PH behandelten Hamstern beobachtet. Wie bei mit PH behandelten Kaninchen<sup>17</sup> berichtet worden ist, wurde es eine deutliche Splenomegalie im Vergleich zu den Kontrollhamstern festgestellt.

Silymarin ist ein Extrakt von *Silybum marianum*. Silymarin hat vielfache Hepatoschutzeffekte<sup>7</sup> und die Antikarzinomewirkungen<sup>6</sup>. Dabei handelt es sich um ihre Antioxidationsfähigkeit<sup>8</sup>. Im Rahmen von verschiedenen Arbeiten werden die Schutzeffekte von Silymarin gegen Leberschädigung festgestellt<sup>7,8</sup>. Wie oben genannten Untersuchungsergebnissen wurde in dieser vorliegenden Studie die Schutzwirkungen von Silymarin gegen Leberschädigung, die sich durch PH Toxizität entwickelt ist, auch festgestellt. Unsere Untersuchung fanden wir eine Verminderung der Leberänderungen, die PH verursacht waren, bei den mit Silymarin behandelten Tieren. Dieses konnte mit der Rolle in den zellulären Abwehrmechanismen von Silymarin erklärbar. Es konnte vermuten, dass Silymarin eine Erhöhung der Kapazität Antioxidantien in den Zellen verursacht. Diese führt zu einer Stärkung der Abwehrmechanismen der Zellen gegen toxische Schäden. In unserer Studie stellen wir eine Verminderung der von PH bedingten histopathologische Veränderungen der Organen bei den PHS-Gruppe fest. Nach unseren Beobachtungen konnte bestimmt werden, dass Silymarin vor der toxischen Schäden der Zelle schützt.

Die Synthese der MT ist durch ein breites Band von chemischen und physikalischem Stress induzierbar. Es wurde vermutet, MT ist beteiligt an der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress, indem es



als ein Fänger der freien Radikale dient<sup>18</sup>. Die Funktion der MT beinhaltet Metalltransport, die Entgiftung der Schwermetallen und anderer Chemikalien und das Abfangen freier Radikale<sup>19</sup>. Es ist bekannt, daß MT-Zellen vor durch freie Radikale verursachten Zelltod schützt<sup>20</sup>.

Studien der MT haben sich auf ihre Entwicklung<sup>21</sup>, Schäden<sup>22-24</sup> oder mit tumorösen Veränderungen in den Geweben mit MT-Lokalisation<sup>25</sup> konzentriert. Es ist eine Erhöhung der MT-Expression in Kadmiumausgesetzten Rattenleber berichtet worden<sup>22</sup>. MT-Expression zeigte sich auch bei Kaninchen, denen man Cadmium (Cd) verabreicht hatte, mit erhöhter MT-Expression im Leberparenchym und in den Epithelzellen der Nieren<sup>23</sup>. Es ist berichtet worden, dass chronischer Gehalt von Cd im Wasser bei Mäusen Nieren-MT erhöhte, wie durch Immunfärbung gezeigt. Cadmium führt zur MT-Expression in den proximalen Nierentubuli sowie in der Nierenmedulla, wie zu sehen war. MT wurde nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Kern entdeckt<sup>24</sup>. Die parenchymalen Zellen spielen eine entscheidende Rolle im Metabolismus und in der Entgiftung der Medikamente. Die Markierung war in den parenchymalen Zellen am größten. Die Kupffer-Zellen zeigten eine niedrige Intensität für MT-Markierung. Es wurde gezeigt, dass MT-Färbung im Zytoplasma und in den Kernen des gewundenen und geraden Teils der proximalen Tubuli bei PH-ausgesetzter Hamsternieren deutlich war. MT-Expression war auch in den piknotischen Tubuliepithelien der Niere deutlich.

MT-Expression zeigte sich in einigen bösartigen Tumoren<sup>25</sup>, in der perinatalen Rattenleber und -nieren<sup>21</sup>, was darauf hindeutet, dass MT mit der Zellproliferation zusammenhängt. In dieser Studie war die MT-Immunreaktivität, besonders bei metabolisch aktiven Hepatozyten und reaktivem Tubuliepithel sowie bei retikuloendothelialen Zellen am auffälligsten. Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs lassen vermuten, dass die MT-Immunreaktivität möglicherweise mit der metabolischen Aktivität der Zellen auf die PH-Toxizität zusammenhängt.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass erhöhte MT-Immunreaktivität in der Leber und Milz und Nieren bei PH-behandelten Hamstern zu sehen war. Diese konnte von einer Erhöhung vom oxidativen Stress in den Zellen abhängig sein. Im Vergleich zu der PH-Gruppe war die Intensität von MT-Färbung bei der

PHS-Gruppe gering. Das konnte sich vermuten lassen, dass orale Gaben von Silymarin die pathologische Veränderungen, die PH bedingt ist, vermindern

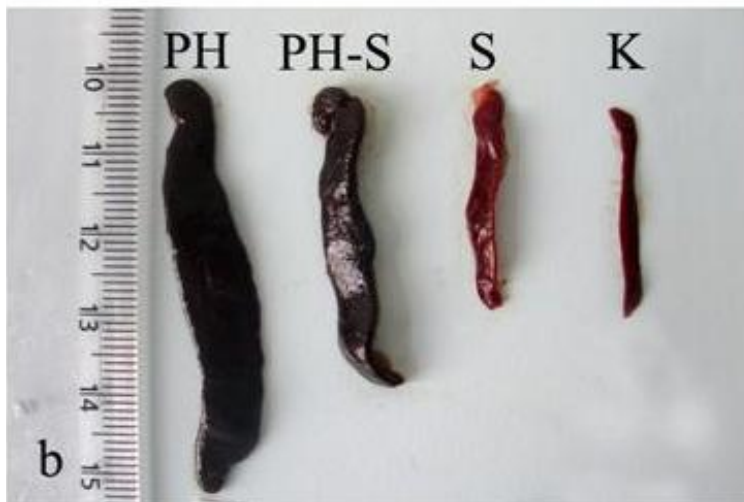
In der Leber zeigt die schwache MT-Markierung in den Hepatozyten der Kontrolle- und Silymarin-Gruppe, wie ein niedriges basales Niveau der MT in der Erwachsenenleber<sup>26</sup> und ist mit anderen immunohistochemischen Studien<sup>21,26</sup>. Keine MT-Immunreaktivität war in Kontrollmilzen und in Milzen der S-Gruppe festzustellen.

Schlußfolgernd zeigten die gefundenen Ergebnisse, dass intraperitoneale Gaben von PH die Leber-, Nieren- und Milzschäden verursachen und dass orale Gaben von Silymarin die PH verursachten Schäden in den verschiedenen Organen vermindern könnten, sowie auch MT eine wichtige Rolle in der PH-Toxizität spielt.

## LITERATURVERZEICHNIS

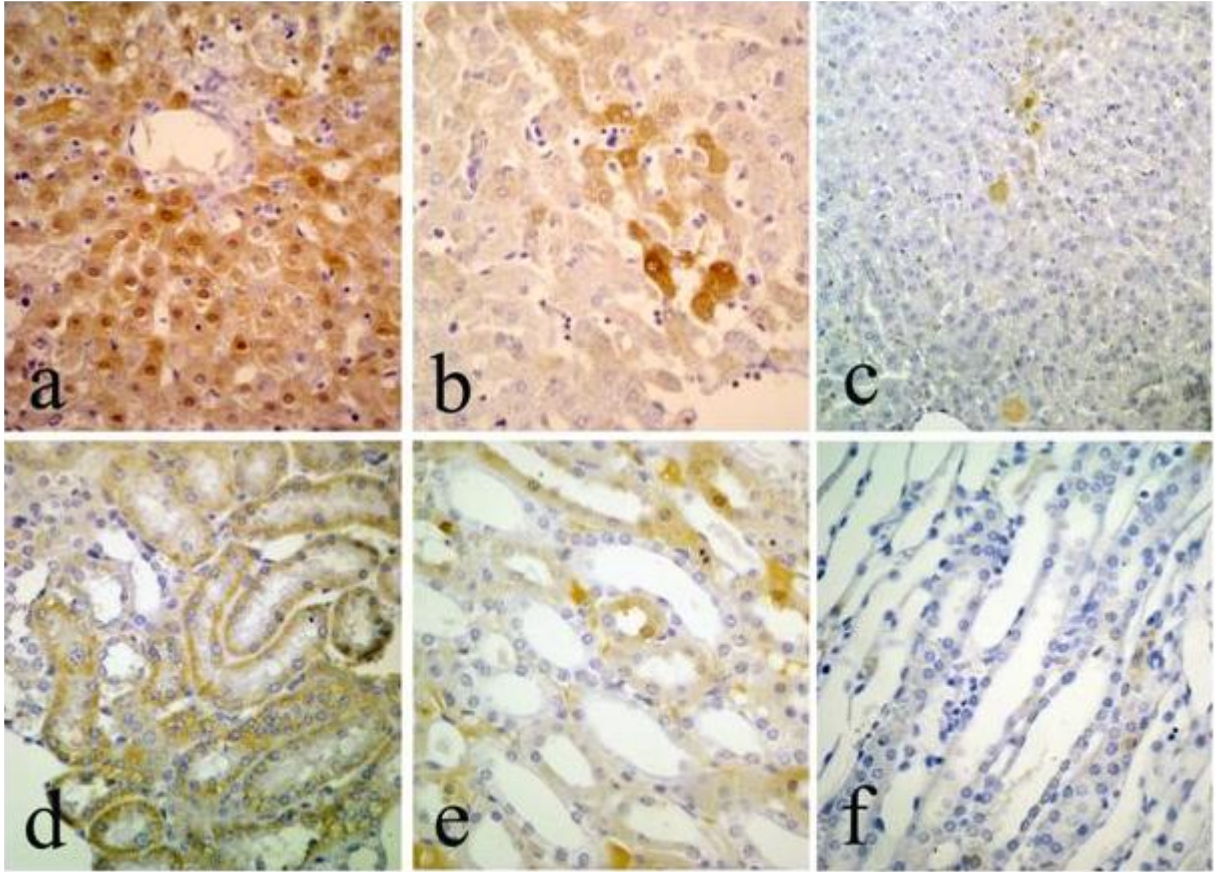
1. **Colvin LB:** Metabolic fate of hydrazines and hydrazides. *J Pharm Sci*, 58 (12): 1433-1443, 1969.
2. **Jandl JH, Engle LK, Allen DW:** Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging. *J Clin Invest*, 39, 1818-1836, 1960.
3. **Huang PK, Kosower EM:** Complexes of phenyldiazene (phenyldiimide) with deoxyhemoglobin and ferroheme. *Biochim Biophys Acta*, 165 (3): 483-489, 1968.
4. **Kato R, Takanaka A, Shoji H:** Inhibition of drug-metabolizing enzymes of liver microsomes by hydrazine derivatives in relation to their lipid solubility. *Jpn J Pharmacol*, 19 (2): 315-22, 1969.
5. **Valenzuela A, Guerra R:** Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. *FEBS 2281*, 181 (2): 291-294, 1985.
6. **Jiang C, Agarwal R, Lu J:** Anti-Angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant silymarin. Inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem Biophys Res Com*, 276, 371-378, 2000.
7. **Salmi HA, Sarna S:** Effect of silymarin on chemical, functional and morphological alteration of the liver. *Scand J Gastroenterol*, 17, 517-521, 1982.
8. **Bosisio E, Benellic E, Pirola O:** Effect of the flavonolignans of Silybum marianum. On Lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol Res*, 25, 147-154, 1992.
9. **Carini R, Comoglio A, Albano E, Poli G:** Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. *Biochem Pharmacol*, 43, 2111-2115, 1992.
10. **Valenzuela A, Guerra R, Videla LA:** Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: Comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med*, 5, 438-440, 1986.
11. **Hamer D:** Metallothionein. *Annu Rev Biochem*, 55, 913-951, 1986.

12. **Blaaugeers HG, Smitt SPA, De Jong JM, Troost D:** Localization of metallothionein in the mammalian central nervous system. *Biol Signals*, 3, 181-187, 1994.
13. **Davis SR, Cousins RJ:** Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr*, 130, 1085-1088, 2000.
14. **Kagi JHR, Schaffer A:** Biochemistry of metallothionein. *Biochem*, 27, 8509-8514, 1988.
15. **Ryan TP, Aust SD:** The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol*, 22, 119-141, 1992.
16. **Moloney SJ, Prough RA:** Biochemical toxicology of hydrazines, In, E Hodgesson, Bent JR, Philpot RM (Eds): Reviews Biochemical Toxicology, Elsevier, New York 5, 313-346, 1983.
17. **Shimizu Y, Andrew W:** Studies on the rabbit appendix. I. Lymphocyte-epithelial cell relation and the transport of bacteria from lumen to lymphoid nodule. *J Morphol*, 123, 231-249, 1968.
18. **Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S:** Metallothionein an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 267-294, 1999.
19. **Sawaki M, Enomoto K, Hattari A, Tsuzuki N, Sawada N, Mori M:** Elevation of metallothionein level in preneoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis of the Fischer 344 rat. *Toxicol Letters*, 108, 55-61, 1999.
20. **Lazo JS, Pitt BR:** Metallothionein and cell death by anticancer drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 635-653, 1995.
21. **Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C:** Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rats tissues. *J Histochem Cytochem*, 37, 7115-722, 1989.
22. **Leyshon-Sorland K, Stang E:** The ultrastructural localization of metallothionein in cadmium exposed rat liver. *Histochem J*, 25, 857-864, 1993.
23. **Ozcan K, Sozmen M, Erginsoy SD, Beytut E, Dogan A:** Metallothionein expression in rabbits following cadmium exposure. *Indian Vet J*, 81, 499-505, 2004.
24. **Liu Y, Liu J, Habeebu SM, Waalkes MP, Klaassen CD:** Metallothionein-I/II null mice are sensitive to chronic oral cadmium-induced nephrotoxicity. *Toxicol Sci*, 57, 167-176, 2000.
25. **Tüzel E, Kirkali Z, Yörükoglu K, Mungan MU, Sade M:** Metallothionein expression in renal cellcarcinoma: sub-cellular localization and prognostic significance. *J Urol*, 165, 1710-1713, 2001.
26. **Nartey NO, Banarjee D, Cherian MG:** Immunohistochemical localization metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of fetal human liver and kidney and it is changes during development. *Pathol*, 19, 233-238, 1987.



**Abb. 1** Die makroskopische Befunde der Leber und der Milz bei der PH- PHS und Kontroll-Gruppe (a) leichte Vergrößerung der Leber bei PH- und PHS-Gruppe im Vergleich zu der Silymarin- und Kontrollgruppe. (b) Splenomegalie bei der PH- und PHS-Gruppe

**Şekil 1.** PH, PHS ve Kontrol gruplarında karaciğer ve dalak'ta makroskopik bulgular (a) Kontrol ve Silimarin gruplarına kıyasla PH ve PHS gruplarında karaciğerde hafif büyüme (b) PH ve PHS gruplarında Splenomegali



**Abb. 2** Immunoreaktivität in der Leber (a, b, c) und in den Nieren (d, e, f) bei den Hamster. (a) Intensive MT-Färbung im Zytoplasma der Hepatozyten bei der PH-Gruppe. ABC-Färbung, x220. (b) Überwiegend im Zytoplasma und selten im Kern mittlere MT-Immunreaktivität in den Hepatozyten bei der PHS-Gruppe. ABC x220. (c) Schwache MT-Immunreaktivität in den in den Hepatozyten bei der S-Gruppe. ABC x110. (d) Intensive MT-Färbung im Zytoplasma in der Tubuliepitelien bei der PHS-Gruppe. ABC x220. (e) Mittlere Immunoreaktivität im Zytoplasma und in den Kernen vom Tubuliepithel bei der PHS-Gruppe. ABC x220. (f) Schwache zytoplasmatisch MT- Färbung im I Tubuliepithel. ABC x220

**Şekil 2.** Hamster karaciğeri (a,b,c) ve böbreklerinde (d,e,f) immunoreaktivite (a) PH grubunda hepatositlerin sitoplazmasında yoğun MT boyanması. ABC x 220. (b) PHS grubunda karaciğerde çoğunlukla sitoplazmik nadiren de çekirdekte gözlenen MT boyanması. ABC x 220. (c) S grubunda hepatositlerde zayıf MT boyanması. ABC x 110. (d) PHS grubunda tubulus epitellerinde yoğun immunoreaktivite. ABC x 220. (e) PHS grubunda tubulus epitel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde orta şiddetli immunoreaktivite. ABC x 220. (f) Kontrol grubunda tubulus epitellerinin sitoplazmalarında zayıf MT boyanması. ABC x 220