

Karbontetraklorür ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda *Rosa canina*'nın (Kuşburnu) In Vivo Antioksidan Etkisi

Hasan Kılıçgün¹, Dehen Altın²

1. Erzincan Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, .24100, Erzincan,
 2. Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 81010 , Kadıköy, İstanbul
1. hkiligun@hotmail.com

Received: 13.04.2009, Accepted: 10.07.2009

Özet Bu çalışmada *Rosa canina*'nın (*Rosa canina* L.) karbontetraklorür (CCl₄) ile uyarılmış lipid peroksidasyonu, alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) aktiviteleri, protein oksidasyonunu inhibe edici etkisi ve glutatyon düzeyine etkisi çalışıldı. Çalışmada Wistar albino sıçanlardan Kontrol I, Kontrol II ve *Rosa canina* grupları oluşturuldu. Kontrol grupları standart pellet diyetle, *Rosa canina* grubu ise yemlerine %6 oranında *Rosa canina* katılmış diyetle 3 ay beslendi. Kontrol I grubuna zeytinyağı (1ml/kg, i.p.), diğer gruplara tek doz CCl₄ (1 ml/kg vücut ağırlığı), zeytinyağındaki %20'lik çözeltisi şeklinde peritoniçi (i.p.) uygulandı. Uygulamadan 2 saat sonra sıçanlar öldürüldü. Sıçanların plazma ALT ve AST aktiviteleri, karaciğer lipid peroksid düzeyleri, karaciğer protein oksidasyonu ve glutatyon düzeyleri ölçüldü. CCl₄ uygulanan sıçan grubu Kontrol II ile *Rosa canina* grubundaki sıçanlar karşılaştırıldığında *Rosa canina*'nın plazma ALT ve AST aktiviteleri, karaciğer lipid peroksid, karaciğer protein oksidasyonu ve glutatyon düzeylerini anlamlı bir şekilde düşürdüğü görüldü. Bu bulgular *Rosa canina*'nın antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler *Rosa canina*, protein oksidasyon, ALT, AST, lipid peroksidasyon

In Vivo Antioxidant Effect of *Rosa canina* in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury

Abstract In this study we examined the effects of *Rosa canina* (*Rosa canina* L.) on lipid peroxidation, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), glutathione and protein oxidation levels in carbon tetrachloride (CCl₄) treated male Wistar rats. Two control groups and one treatment group of rats were formed. The control groups were nourished with a standard diet, while the *Rosa canina* group was nourished with standard diet which was enriched with % 6 by weight dried *Rosa rugosa* fruits' powder. After three months, a single dose of CCl₄ was performed in Control II and *Rosa canina* groups (1ml/kg, as 20% in olive oil) intraperitoneally and single dose of olive oil was administered (1ml/kg,i.p.) in the same way to rats in Control I group. They were sacrificed two hours later. Lipid peroxide levels in liver, protein oxidation in liver, glutathione (GSH) levels in liver, ALT and AST in plasma were measured. The rats in the *Rosa canina* group were found to have significantly lessened liver peroxide, protein oxidation, glutathione levels and plasma ALT and AST activities compared with the rats in CCl₄ treated control group. These findings suggest that *Rosa canina* possesses antioxidant activity.

Key words *Rosa canina*, protein oxidation, ALT, AST, lipid peroxidation,

1. Giriş

Sağlıklı yiyecekler ve sağlıklı yaşam arasındaki ilişki her geçen gün önem kazanmaktadır. Buna bağlı olarak tüketicilerin sağlıklı bir beslenme ve diyet için doğal çevrelerde yetiştirilmiş, ilaç veya kimyasallarla kontamine olmamış, sağlıklı, doğal ve lezzetli ürünlere olan yönelimi de artmaktadır. Rosaceae ailesinin üyeleri içerdikleri fenolik bileşikler, vitaminler, anyon ve katyonlardan dolayı tüm dünyada eski çağlardan beri hem gıda maddesi olarak hem de tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır [1-3]. Rosaceae familyasının Rosidea alt familyası kapsamına giren kuşburnu çok yıllık bir bitkidir. Anadolu'da doğal olarak yetişen 27 Rosa türü vardır ve bunun 17'si Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunmaktadır [4]. Bu türler arasında en yaygın olanı ise *Rosa canina*'dır (*Rosa canina* L.). Mineral madde, C vitamini ve flavonoidler yönünden de zengin olan *Rosa canina*, Orta Çağ'da ve daha sonraki dönemlerde kan tükürmelere, dişeti kanamalarına, böbrek, mesane, safra taşları, tenya, yılançık, şeker hastalığı ve ishale karşı kullanılmıştır. Ülkemizde de basur, romatizma ve skorbüt hastalığına karşı kullanılmaktadır. Etkin bir kan temizleyici, bağırsak yumuşatıcı, kurt düşürücü özelliğe sahip kuşburnu, C vitamini içeriğinden dolayı vücudun gelişimini düzenlemede, ateşli hastalıklar ve soğuk algınlığına karşı da kullanılmaktadır [5-10].

Literatürde *in vitro* olarak ölçülen parametrelerden *Rosa canina*'nın lipit oksidasyonu üzerine etkisi, radikal temizleme aktivitesi ve antioksidan aktivitesi ile ilgili çalışmalar rapor edilmiştir [11-16]. Literatürde tek doz *Rosa canina*'nın CCl₄ ile indüklenmiş karaciğer hasarına karşı; protein oksidasyonu, ALT ve AST aktiviteleri ve glutasyon düzeylerine olan *in vivo* antioksidan etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda *Rosa canina*'nın ALT, AST aktiviteleri, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve glutasyon düzeylerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

2. Deneysel Yöntem

Kimyasal maddeler; Merck, Fluka Chemika ve Sigma firmalarından sağlandı. *Rosa canina* meyveleri (Yabani kuşburnu), Erzincan İli, Çayırılı İlçesi, Mirzeoğlu Köyü'nden Ağustos ayında toplandı. Tür tayini; İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kerim Alpınar tarafından yapıldı. Çalışmada 24-25 haftalık 250-300g ağırlığında erkek Wistar türü sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'nda belli koşullar altında(12 saat karanlık / ışık) tutuldu. Çalışmada herbiri 8 hayvandan oluşan 3 grup oluşturuldu (Kontrol I, Kontrol II ve *Rosa canina*). Kontrol I ve Kontrol II grupları standart diyet ile beslenirken, *Rosa canina* grubu diyetine %6 oranında öğütülmüş kuşburnu meyvesi karıştırılarak beslendi. %6'lık oran bir diğer kuşburnu türü olan *Rosa rugosa* ile yaptığımız çalışmamızdaki en uygun doz olarak bulunduğu için kullanılmıştır [17]. Sıçan grupları, 3 aylık deneysel süreç sonunda 16 saat aç tutuldu. Bu sürenin sonunda Kontrol II ve *Rosa canina* gruplarındaki sıçanlara tek doz CCl₄ (1 ml/kg vücut ağırlığı) zeytinyağındaki %20'lik çözeltisi şeklinde peritonici (i.p.) uygulandı. Kontrol I grubundaki sıçanlara ise aynı hacimde zeytinyağı verildi. Bu uygulamalardan 2 saat sonra 1/3 oranında largaktil + ketalar karışımı hazırlandı. Bu karışım hayvanlara enjekte edilerek (i.p.) hayvanlar anestezi altına alındı. Daha sonra kalplerinden heparinlenmiş enjektörle kan alındı ve sıçanlar öldürüldü. Karaciğerler çıkartılıp serum fizyolojik ile yıkandı, filtre kağıdı ile kurulandı ve -70°C'de saklandı. Karaciğerler parçalara ayrıldı ve %10'luk 0.15 M KCl ile homojenize edildi [18]. Plazma AST ve ALT aktiviteleri oto analizörde kit kullanılarak (Transaminaz C II-Test,

Wako) ölçüldü. Karaciğer lipit peroksit düzeyleri tiyobarbiturik asit testi (TBA) ile ölçüldü [19]. 0.2 ml %10'luk karaciğer homojenatına 0.2 ml %8'lik sodyum dodesil sülfat'ın üstüne (SDS), NaOH ile pH'sı 3.5 olarak ayarlanmış 1.5 ml %20 lik asetik asit solüsyonu eklendi. Karışımın üzerine 1.5 ml %0.8' lik TBA eklendi. Karışıma distile su eklenerek 4 ml ye tamamlandı ve karışım 95°C' lik su banyosunda 60 dakika bekletildi. Karışım soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml n-butanol pridin (15:1) oranında eklendi. Bunu takiben karışım 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi, üst fazın absorbansı 532 nm'de okundu. 1,1,3,3-tetraetoksi-propan (TEP) eksternal standart olarak kullanıldı. Karaciğer glutatyon düzeyleri Ellman metoduna göre ölçüldü [20]. 0.5 ml %10'luk karaciğer homojenatına 1.5 ml 150 mM KCl ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Santrifüjlemeden sonra, 0.5 ml üst faz alındı, bunun üzerine 2 ml 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.5 ml Ellman ayırıcı eklendi. Karışımın absorbansı 412 nm'de ölçüldü. GSH eksternal standart olarak kullanıldı. Karaciğer protein oksidasyon düzeyleri Levine ve arkadaşları [21] ve Lowry [22] metodlarına göre belirlendi. Plazma ALT, AST aktivitelerinin istatistiksel analizi ANOVA ve Duncan testine göre belirlenirken, karaciğer lipit peroksit, protein oksidasyon ve glutatyon düzeylerinin istatistiksel analizi Kruskal Wallis ANOVA ve Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

3. Bulgular

Rosa canina katılmış diyetle beslemenin, ALT ve AST aktivitelerine, lipit peroksit, glutatyon ve karaciğer protein karbonil içeriğine etkisi değerlendirildiğinde, *Rosa canina*'nın Kontrol II grubuna göre karaciğer protein karbonil içeriğinde düşümlere neden olduğu, plazma ALT ve AST aktiviteleri, lipit peroksit ve glutatyon düzeylerinde ise anlamlı düşümler gösterdiği ve bu düşümlün Kontrol I değerlerine kadar indiği belirlendi (Tablo 1).

4. Tartışma

Yabani kuşburnu türü olan *Rosa canina* ile yaptığımız çalışmada plazma ALT ve AST aktivitelerinin Kontrol II grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olması ve bu düşümlün Kontrol I değerlerine kadar inmesi, *Rosa canina*'nın CCl₄ kaynaklı karaciğer hasarını engelleyici etkisi olduğunu göstermektedir (Tablo 1). *Rosa canina*'nın tohum ve meyvelerinin antioksidan aktivitesinin bildirildiği çalışmalar mevcuttur [20-22].

Ancak *in vivo* plazma ALT ve AST aktiviteleri üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yaptığımız alışmada *Rosa canina*'nın Kontrol II grubuna göre karaciğer lipit peroksit düzeyinin anlamlı olarak düşük olması ve elde ettiğimiz değerin Kontrol I grubundaki değere kadar düşmesi (Tablo 1), *Rosa canina*'nın güçlü antioksidan aktivite göstererek karaciğer lipit peroksidasyonunu engellediğini göstermektedir. *Rosa canina*'nın antioksidan etkisi ile ilgili olarak yaptığımız literatür taramasında *Rosa canina*'nın *in vitro* olarak lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [12].

Rosa canina'nın karaciğer protein karbonil içeriğine etkisi incelendiğinde, *Rosa canina* grubundaki sıçanların protein karbonil içeriğinin Kontrol II grubuna göre anlamlı düzeyde düşmesi (Tablo 1), *Rosa canina*'nın antioksidan etkisinden dolayı karbonil içeriğini düşürdüğünü düşündürmektedir. Yapılan *Rosa canina*'nın karbonil içeriği üzerine etkisinin araştırıldığı *in vivo* bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda *Rosa canina*'nın Kontrol II grubuna göre GSH düzeyinde anlamlı düşüş görülmesi ve bu düşüşün Kontrol I değerlerine inmesi (Tablo 1), *Rosa canina*'nın antioksidan etkisinden dolayı organizmayı CCl₄'e karşı koruduğunu ve buna bağlı olarak da organizmada doğal olarak bulunan GSH'ın normal düzeyin üzerindeki miktarlarda üretilmesine ihtiyaç olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak % 6'lık dozda, *Rosa canina*'nın karaciğer protein karbonil içeriğinde anlamlı düşüşlere neden olması, plazma ALT ve AST aktiviteleri, lipit peroksit ve glutatyon düzeylerinde ise anlamlı düşüşler göstermesi ve bu düşüşün Kontrol I değerlerine kadar inmesi (Tablo 1), *Rosa canina*'nın güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. %6'lık dozdaki *Rosa canina*'nın güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olması, *Rosa canina*'yı besin amaçlı kullanmanın yanı sıra, tedavi açısından ilginç olabilecek biyoaktif moleküllerin potansiyel bir kaynağı olarak ta cazip kılmaktadır. Öte yandan *Rosa canina*'nın farklı dozlarda ve farklı antioksidan sistemler kullanılarak antioksidan aktivitesinin çalışılması, bu alandaki literatüre katkı sağlayacaktır.

TABLO 1

CCl₄ uygulanmış Wistar türü sıçanlarda *Rosa canina*'nın ALT, AST aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve glutatyon düzeylerine etkisi

| Parametreler | Kontrol I (n=8) | Kontrol II (n=8) | <i>Rosa canina</i> (n=8) |
|---|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| Plazma ALT (U/L) | 23.1 ± 5.9 | 44.7 ± 4.6* | 24.6 ± 5.2 ^a |
| Plazma AST (U/L) | 124.8 ± 9.6 | 162.2 ± 8.4* | 123.9 ± 5.1 ^a |
| Karaciğer Lipid Peroksit (nmol MDA/ g Karaciğer) | 121.8 ± 16.2 | 384.3 ± 70.1* | 116.5 ± 11 ^a |
| Karaciğer Protein Karbonil içeriği (nmol karbonil/ mg protein) | 4.8 ± 0.6 | 11.0 ± 2.6* | 7.7 ± 1.6 ^{*a} |
| Karaciğer Glutatyon (µmol GSH/ g karaciğer) | 5.1 ± 1.0 | 6.5 ± 1.0* | 4.9 ± 0.8 ^a |

Değerler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir, n=8.

*p<0.05, “Kontrol I” grubuna göre karşılaştırma

^ap<0,05, “Kontrol II” grubuna göre karşılaştırma

Kaynaklar

- [1] Y. Nakamura, S. Watanabe, N. Miyake, H. Kohno, & T. Osawa, *Journal Agric Food Chem.* 2003, 51, 3309–3312.
- [2] H. Tapiero, K. D. Tew, G. N. Ba, & G. Mathe, *Biomed and Pharmacotherapy.* 2002, 56, 200–207.
- [3] S. Ercisli, *Food Chem.* 2007, 104, 1379–1384.
- [4] R. Anşın, *Kuşburnu Sempozyumu Bildiriler Kitabı*, 5-6 Eylül Gümüşhane, 1996.
- [5] J.K. Willcox, G.L. Catignani, L.J. Roberts 2nd, *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 34, 795-799.
- [6] H. Yıldız, C. Nergiz, *Kuşburnu Sempozyumu Bildiriler Kitabı*, 5-6 Eylül Gümüşhane, 1996.
- [7] Ö.M. Musa, Ü. Ahmet, U. Tolga, D. Arslan, *Food Chem.* 2007, 106, 1120–1127.

- [8] M. Özcan, *Food Chem.* 2004, 84, 437–440.
- [9] G. Gattuso, D. Barreca, C.Gargiulli, O.U. Leuzzi & C. Caristi, *Molecules.* 2007, 12, 1641-1673.
- [10] F. Demir, M Özcan, *J Food Eng.* 2001, 47, 333-336.
- [11] D.A. Daels-Rakotoarison, Gressier. B, Troitin. F, Brunet. C, Luyckx. M, Dine. T, Bailleul. F, Cazin. M, Cazin. J.C, *Phytother Res.* 2002, 16, 157-161.
- [12] K. Rossnagel, S.N. Willich, *Gesundheitswesen.* 2001, 63, 412-416.
- [13] G. Xiangqun, B. Lars, T. Viktor, & M. Uggla, *J Sci Food Agric.* 2000, 80, 2021-2027.
- [14] I. Koca, N.S. Ustun and T. Koyuncu, *Asian Journal of Chemistry.* 2009, 21(2), 1061-1068.
- [15] M. Özcan, *Journal of Medicinal Food.* 2002, 5(3), 137-140.
- [16] A. Serteser. M. Kargioğlu, V. Gök, Y. Bağcı, M. M. Özcan & D. Arslan, *Int. J Food Sci. Nutr.* 2008, 59(7-8), 643-651.
- [17] D. Sur-Altiner, H. Kılıçgün, *Drug Metabol. Drug Interact.* 2008, 23(3-4), 323-328.
- [18] N. Uzel, G. Özdemirler, A. Sivas, M. Uysal, *Biochem. Arch.* 1989, 5, 353-358.
- [19] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi *Anal. Biochem.* 1979, 95, 351-358.
- [20] G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 82, 70-77.
- [21] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, *Methods Enzymol.* 1990, 186, 464-478.
- [22] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.