

Taksifolinin Sıçanlarda Etanolle İndüklenen Oksidatif Beyin Hasarına Etkisi

Effect of Taxifolin on Ethanol-Induced Oxidative Brain Damage in Rats

Aslı Özbek Bilgin, Renad Mammadov, Bahadır Süleyman

Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzincan

Yazışma Adresi / Correspondence:

Aslı Özbek Bilgin

Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzincan

T: +90 505 333 30 79 E-mail: asliozbekbilgin@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 06.09.2018 Kabul Tarihi / Accepted : 10.09.2018

Öz

Amaç	Araştırmalar, alkolün en şiddetli toksik etkisinin merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde olduğunu göstermiştir. Alkolün MSS üzerindeki toksik etkisinin patogenezinde serbest oksijen radikal (SOR) üretiminin artışı, endojen antioksidan üretiminin baskılanması sorumlu tutulmaktadır. Amacımız Taksifolinin sıçanlarda etanolle indüklenen oksidatif beyin hasarına etkisini biyokimyasal olarak araştırmaktır. (<i>Sakarya Tıp Dergisi</i> , 2018, 8(3):638-643)
Gereç ve Yöntem	Deney hayvanları sağlıklı (SG), tek başına etanol alan kontrol (EtOH) ve taksifolin +etanol verilen (TEtOH) gruplara ayrıldı. Etanol ve Taksifolinin belirlenen sürede verilmesi sonunda hayvanlar yüksek doz anestezi ile öldürülerek beyin dokuları çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokularında lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) ve endojen antioksidan olan total glutatyon (tGSH) ölçümleri yapıldı.
Bulgular	Etanol verilen hayvan grubunda MDA miktarı sağlıklı ve taksifolin grubuna göre anlamlı yüksek ($p<0.001$), tGSH ise anlamlı düşük ($p<0.001$) bulundu.
Sonuç	Sonuçlarımız, taksifolinin beyin dokusunu etanolün oksidatif hasarına karşı koruduğunu işaret etmektedir.
Anahtar Kelimeler	Etanol; taksifolin; beyin hasarı; rat.

Abstract

Objective	Studies have shown that alcohol exerts the most severe toxic effect on central nervous system by increasing free oxygen radical production and suppressing endogenous antioxidant production. We aim to biochemically investigate the effect of taxifolin on ethanol-induced oxidative brain damage in rats. (<i>Sakarya Med J</i> , 2018, 8(3):638-643).
Materials and Methods	Experimental animals were divided into healthy (SG), ethanol-receiving control (EtOH) and taxifolin+ethanol receiving (TEtOH) groups. At the end of the administration of ethanol and taxifolin, the animals were sacrificed by high dose anesthesia and brain tissues were removed. Malondialdehyde (MDA), lipid peroxidation product, and total glutathione (tGSH), endogenous antioxidant, levels in brain tissues were measured.
Results	MDA levels were significantly higher in the rats in the EtOH group than in those in the TEtOH group ($p<0.001$). In contrast, tGSH levels were significantly lower in the rats in the EtOH group than in those in the TEtOH group ($p<0.001$).
Conclusion	Our results suggest that taxifolin protects brain tissue from ethanol-induced oxidative damage.
Keywords	Ethanol; taxifolin; brain damage; rat

Giriş

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), etil alkol ya da kısaca alkol olarak adlandırılmaktadır.^{1,2} Etil alkol, sanayide kullanılmasına rağmen en çok içki olarak tüketilmektedir. Günlük hayatın getirdiği problemler strese sebep olmakta ve pek çok insan bundan kurtulmak için alkol almayı tercih etmektedir.³ Alkollu kişiler normal kişilere göre daha sık oranda travmalara maruz kalmakta ve ölmektedirler.⁴ Araştırmalar, alkolün en büyük etkisinin merkezi sinir sistemi üzerinde olduğunu göstermiştir. Merkezi sinir sistemi (MSS), alkol ve alkolün indüklediği oksidatif strese karşı en hassas ve savunmasız yapılardan biridir.⁵ Bunun nedeni olarak, yüksek oksijen tüketimi ve sınırlı antioksidan üretimi gösterilmektedir.^{6,7} Alkolün MSS de yol açtığı oksidatif stres patogenezinde serbest oksijen radikal (SOR) üretiminin artışı, endojen antioksidan üretiminin baskılanması sorumlu tutulmaktadır.⁸ Literatür bilgileri, antioksidanların beyin dokusunu alkolün oksidatif hasarından koruyabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmamızda etanol beyin toksitesine karşı koruyucu etkisini deneyeceğimiz taksifolin (3,5,7,3,4-pentahydroxy flavanone veya dihydroquercetin), turuncgiller ve soğanda bol miktarda bulunan güçlü antioksidan birflavonoiddir.⁹ Flavonoidler, antioksidan aktivitelerini lipid peroksidasyonunu ve serbest radikallerin oluşumundan sorumlu enzimatik reaksiyonları inhibe ederek oluşturdukları belgelenmiştir.¹⁰ Çeşitli klinik ve in vitro çalışmalar, bu bileşiklerin antioksidan özelliklerinden dolayı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yararlı olduğunu göstermiştir.¹¹ Bu bilgiler, taksifolinin beyin dokusunu, etanol ilişkili oksidatif hasara karşı koruyabileceğini işaret etmektedir. Literatürlerde, taksifolinin etanolla indüklenen beyin hasarına etkisini araştıran bilimsel çalışmalara rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızın amacı, taksifolinin sıçanlarda etanolla indüklenen oksidatif beyin hasarına etkisini biyokimyasal olarak araştırmaktır.

Gereç Ve Yöntemler

Hayvanlar

Çalışmamızda kullanılacak olan 240-255 gram ağırlığındaki 18 adet albino wistar türü erkek sıçanlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Hayvanlar ortama adapte olabilmeleri için deneyin yapıldığı ortamda bir hafta boyunca normal oda sıcaklığında (22°C) barındırıldı ve beslendi. Çalışmamız randomize kontrollü deneysel bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Çalışmanın bütün aşamalarının etik kurallara uygunluğu, "Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu" tarafından verilen 03.04.2018 tarihli ve 75296309-050.01.04-E.1800107389 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

Kimyasal maddeler

Deneyde kullanılan thiopental sodium IE Ulagay-Türkiye, Etanol kendi kliğimizden, Taksifolin ise Evalar-Rusyadan temin edildi.

Deney grupları

Deney hayvanları sağlıklı (SG), tek başına etanol alan kontrol (EtOH) ve taksifolin +etanol verilen (TtEtOH) gruplara ayrıldı.

Deneyin yapılması

Hayvanların TtEtOH grubuna (n-6) taksifolin 50 mg/kg dozda oral yoldan gavajla mideye verildi. EtOH (n-6) ve SG (n-6) grubuna ise aynı hacimde çözücü olarak distile su oral uygulandı. Taksifolin ve distile su verildikten 30 dakika sonra TtEtOH ve EtOH gruplarına %50 lik etanol 5 g/kg dozda haftada üç defa toplam 9 doz (21 gün) uygulandı. Taksifolin günde bir defa 21 gün boyunca verildi.

Bu süre sonunda hayvanlar yüksek doz anestezi ile öldürülerek beyin dokuları çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokularında lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) ve endojen antioksidan olan total glutatyon (tGSH) ölçümleri yapıldı. TEtOH ve SG gruplardan elde edilen biyokimyasal sonuçlar EtOH grubundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Biyokimyasal analizler

Malondialdehid (MDA) ölçümü

MDA ölçümü MDA'nın sıcak asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı. 12 25 µL örnek üzerine, 25 µL sodyum dodesil sülfat (80 g/L), 1 mL mix karışım (200 g/L asetik asit + 1.5 mL 8 g/L 2-tiyobarbitürik asit) eklenerek 95 °C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden numunedeki MDA miktarı hesaplandı.

Total glutatyon (tGSH) ölçümü

tGSH analizi için Sedlak ve ark. göre yapıldı.¹³ Renkli bir bileşik olan 5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid] disülfür sülfidril grupları indirgenince sarı renkli bir bileşik oluşur ve bu 412 nm dalga boyunda ölçülür. Ölçüm için öncelikle deproteinizasyon için tüm örnekler 1:1 oranında meta fosforik asitle muamele edilip santrifüj edildi. Üst fazdan alınan alınan 50 µL süpernatantın üzerine 150 µL ölçüm karışımı (5.85 mL 100 mM Na-fosfat tamponu, 2.8 mL 1 mM DTNB 3.75 mL 1 mM NADPH, ve 80 µL 625 U/L Glutathione reductase) eklendi. Glutatyon disülfid ile hazırlanan standart grafiğe göre ölçümler 412 nm'de yapıldı.

İstatistiksel Analizler

Deney sonuçları "ortalama değer ± standart hata" ($\bar{x} \pm SEM$) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Takibinde Fisher's post-hoc Bonferroni yapıldı. Tüm istatistiksel işlemler "IBM SPSS Statistics Version 20" istatistik programında yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

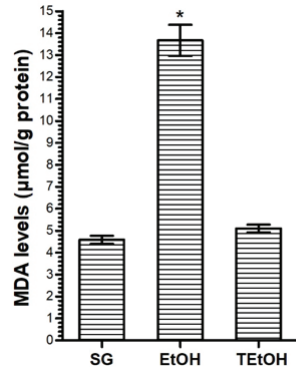
MDA Analiz Sonuçları

Sadece distile su verilen sağlıklı hayvan grubunun beyin dokusunda MDA miktarı $4,58 \pm 0,18$ µmol/gr protein olarak ölçüldü. Ancak, etanol uygulanan hayvanların beyin dokusunda MDA miktarının $13,66 \pm 0,71$ µmol/gr proteine yükseldiği saptandı. Taksifolin ise etanolle artan MDA miktarını $5,10 \pm 0,18$ µmol/gr protein düzeyine düşürdü. Deney sonuçları, etanol grubundaki MDA miktarının sağlıklı ve taksifolin grubuna göre anlamlı ($p < 0.001$), sağlıklı ve taksifolin grubundaki MDA miktarı arasındaki farkın ise anlamsız ($p > 0,05$) olduğunu göstermiştir (Şekil 1, Tablo 1).

Tablo 1. MDA düzeyinin ortalama değerleri ve gruplar arası karşılaştırılması

Deney Grupları n=6	Ortalama	Standard Sapma	Ortanca	Min-Max Değer	p değeri (gruplar arası anlamlılık karşılaştırmaları)
SG	4.583	0.444	4.700	4.000-5.100	0.000 (SG-EtOH) 1.000 (SG- TEtOH)
EtOH	13.666	1.751	13.500	11.000-16.000	0.000 (EtOH- SG) 0.000 (EtOH-TEtOH)
TEtOH	5.100	0.438	5.100	4.400-5.600	1.000 (TEtOH-SG) 0.000 (TEtOH- EtOH)

MDA (Malondialdehid), SG (sağlıklı grup), EtOH(tek başına etanol alan kontrol grubu) ve TEtOH (taksifolin +etanol verilen)



Şekil 1: Taksifolinin beyin dokusu MDA düzeyleri üzerine etkisi *p<0.001 TEtOH ve SG gruplarına göre MDA (Malondialdehid), SG (sağlıklı grup), EtOH(tek başına etanol alan kontrol grubu) ve TEtOH (taksifolin +etanol verilen)

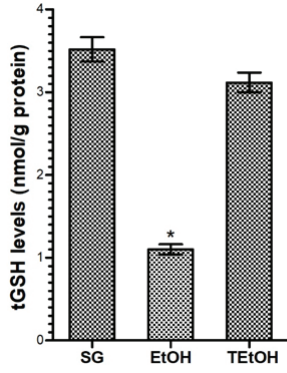
tGSHanaliz sonuçları

Sağlıklı hayvanların beyin dokusunda tGSH miktarı $3,52 \pm 0,15$ nmol/gr protein olarak bulundu. Etanol alan hayvanların beyin dokusunda ise tGSH miktarı azaldı ve $1,10 \pm 0,06$ nmol/gr protein olarak belirlendi. Taksifolinin ise tGSH düzeyini $3,12 \pm 0,12$ nmol/gr protein seviyelerinde tutarak etanolla oluşan düşüşü önlediği görüldü. Anlamlılık derecesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde etanolün tGSH miktarını sağlıklı ve taksifolin grubuna göre anlamlı ($p<0.001$) artırdığı görülmektedir. Taksifolin ve sağlıklı grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$) (Şekil 2, Tablo 2).

Tablo 2. tGSH düzeyinin ortalama değerleri ve gruplar arası karşılaştırılması

Deney Grupları n=6	Ortalama	Standard Sapma	Ortanca	Min-Max Değer	p değeri (gruplar arası anlamlılık karşılaştırmaları)
SG	3,516	0,360	3,500	3,00-4,00	0.000 (SG-EtOH) 0.081 (SG- TEtOH)
EtOH	1,100	0,154	1,100	0,90-1,30	0.000 (EtOH- SG) 0.000 (EtOH-TEtOH)
TEtOH	3,116	0,292	3,050	2,70-3,50	0.081 (TEtOH-SG) 0.000 (TEtOH- EtOH)

MDA (Malondialdehid), SG (sağlıklı grup), EtOH(tek başına etanol alan kontrol grubu) ve TEtOH (taksifolin +etanol verilen)



Şekil 2: Taksifolinin beyin dokusu tGSH düzeyleri üzerine etkisi *p<0.001 TtEtOH ve SG gruplarına göre tGSH (Total glutatyon), SG (sağlıklı grup), EtOH (tek başına etanol alan kontrol grubu) ve TtEtOH (taksifolin + etanol verilen)

Tartışma

Bu çalışmada, taksifolinin sıçanlarda etanolla indüklenen oksidatif beyin hasarına etkisi biyokimyasal olarak araştırıldı. Beyin gibi birçok organ ve dokularda oksidatif hasarı değerlendirilmede MDA, tGSH ve diğer oksidan antioksidan biyokimyasal parametreler kullanılmaktadır.¹⁴ Beyin, kalp, akciğer, karaciğer ve barsaklar gibi pek çok organ oksidatif hasarında serbest oksijen radikalleri (SOR) major komponentlerinden biri olduğu gösterilmiştir.¹⁵ Çok öncelere dayanan araştırmalarda da alkolün beyinde oksidatif stres oluşturduğu bildirilmiştir.¹⁶ Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarda etanolün, potansiyel nörotoksititeye sahip olduğu ve MSS de oksidatif hasara yol açtığı belgelenmiştir.¹⁷ Alkolün oksidatif nörodejeneratif hasarından SOR ların sorumlu olduğu bir başka çalışmada da

doğrulanmıştır.¹⁸ SOR lar arasında en çok bilinenler süperoksit, hidroksil radikali, organik hipoklorit ve nitrik oksit radikalleridir.¹⁹ Çalışmamızda etanol uygulanan grubun beyin dokusunda MDA miktarının sağlıklı ve taksifolin grubuna göre çok daha anlamlı arttığı görülmüştür. Bilindiği gibi, MDA bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Lipid peroksidasyonu hücre sel zedelenmenin en önemli nedenlerinden birini oluşturur.²⁰ Lipid peroksidasyonu, hücre membranında doymamış yağ asitlerinin SOR'lar tarafından MDA ve çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur.²¹ MDA'nın, hücre zarındaki komponentlerin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmasına neden olarak iyon transportu, enzimatik aktivite ve intrinsik membran özelliklerini değiştirerek hasarın ilerlemesini sağladığı Cross CE ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir.²² Taksifolinin etanolla artan MDA düzeyini azaltması, onun lipid peroksidasyonunu ve serbest radikallerin oluşumundan sorumlu reaksiyonları inhibe ettiğini gösteren çalışmalarla uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.¹⁰

Yine bu çalışmamızda, etanol grubu düşük tGSH düzeyi ile sağlıklı ve taksifolin uygulanan gruplardan farklı olmuştur. GSH, birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir.²³ GSH ayrıca, aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen (O₂), süperoksit anyonu (-O₂-), hidroksi (-OH) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir.²⁴ Deney sonuçlarımızla uyum içerisinde olan bir başka çalışmada, etanol verilen hayvanların beyin dokusunda GSH düzeyinin düştüğü ifade edilmiştir.²⁵ Taksifolinin, tGSH miktarının etanolla düşmesini önlemesi onun SOR oluşumu üzerindeki inhibitör etkiden kaynaklanmış olabilir.¹⁰ Ayrıca taksifolinin, GSH ile sinerjik etki oluşturduğu belgelenmiştir.²⁶ Sonuç olarak, etanol hayvanların beyin dokusunda oksidan antioksidan dengesi oksidanların lehine değiştirmiştir. Taksifolin oksidan antioksidan dengenin etanolla oksidanların lehine değişmesini önlemiştir. Bu deney sonuçları taksifolinin etanolla indüklenen oksidatif beyin hasarını önlemede yararlı olabileceğini göstermektedir.

- Stein E. Textbook of clinical chemistry. WB Saunders (eds). Philadelphia, NW, USA, 1986. pp: 879-886.
- Vural N. Alifatik Alkoller. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; Toksikoloji. Ankara; 2005. s: 293-305.
- Palmisano M, Pandey SC. Epigenetic mechanisms of alcoholism and stress-related disorders. *Alcohol*, 2017, 60: 7-18.
- Soysal Z, Çakalır C, Gürsel Ç. Adli Tıp. 1. baskı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 1999. s: 29-44.
- Gonthier B, Signorini Allibe N, Soubeyran A, Eysseric H, Lamarche F, Barret L. Ethanol Can Modify the Effects of Certain Free Radical Generating Systems on Astrocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004; 28: 526-534.
- Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2010; 2: 12.
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol* 2015; 24: 325-340.
- Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1542-1550.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-956.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 569-590.
- Bimpilas A, Tsimogiannis D, Balta-Brouma K, Lymperopoulou T, Oreopoulou V. Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chem* 2015; 178: 164-171.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
- Kunak CS, Kukula O, Mutlu E, Genç F, Güleç Peker G, Kuyrukçuyıldız U, et al. The effect of etoricoxib on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 2015.
- Kisaoglu A, Borekci B, Yapca OE, Bilen H, Suleyman H. Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. *Eurasian J Med* 2013; 45: 47.
- Nordmann R. Oxidative stress from alcohol in the brain. *Alcohol and Alcoholism* 1987;1: 75-82.
- Wu Y, Li S, Liu J, Liu X, Ruan W, Lu J-W, Liu Y, Lawson T, Shimon O, Lovejoy D. Stilbenes from *Veratrum maackii* Regel. Protect against Ethanol-Induced DNA Damage in Mouse Cerebellum and Cerebral Cortex. *ACS Chem Neurosci* 2018.
- Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol & Alcoholism* 2008; 44: 115-127.
- Büyüksulu N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2015;5:197-203.
- Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. İçinde: Lipid peroxidation, InTech, 2012.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 1: 31.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCORD JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-545.
- Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 194S-200S.
- Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 1988; 27: 969-978.
- Hamid A, Ibrahim FW, Ming TH, Nasrom MN, Eusoff N, Husain K, Latif MA. Zingiber zerumbet L.(Smith) extract alleviates the ethanol-induced brain damage via its antioxidant activity. *BMC Complement Altern Med* 2018; 18: 101.
- Pereira RB, Sousa C, Costa A, Andrade PB, Valentão P. Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: synergisms and antagonisms. *Molecules* 2013; 18: 8858-8872.