



## ELEMENTAL ANALYSIS OF BORIC ACID AND PROPOLIS INJECTED ADULT SPRAGUE DAWLEY RAT LIVERS BY WDXRF SPECTROMETER

Esra Kavaz\*<sup>1</sup>, Fatime Geyikoğlu<sup>2</sup>, Neslihan Ekinci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Atatürk University, Science Faculty, Department of Physics, 25240, Erzurum, Turkey

<sup>2</sup>Atatürk University, Science Faculty, Department of Biology, 25240, Erzurum, Turkey

(Alınış / Received: 16.05.2021, Kabul / Accepted: 14.12.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 31.12.2021)

\*Corresponding Author: esra.kavaz@atauni.edu.tr (E. Kavaz)  
(ORCID: 0000-0002-7016-2510)

### Keywords

WDXRF,  
Sprague Dawley Rat,  
Boric Acid,  
Propolis,  
Liver

**Abstract:** The production of reactive oxygen species (ROS) or free radicals arise from oxidative stress and they are formed by oxygen or other molecules. Excessive amounts of free radicals may damage lipids, proteins, and nucleic acids and may cause carcinogenesis. Boric acid and propolis are used extensively in pharmaceuticals and industrial materials, and their antioxidant roles have recently attracted attention. In this study, the effects of Boric Acid (14 mg / kg) and Propolis (100, 200 mg / kg) injected into exposed to vascular disorder by surgical procedure and healthy adult Sprague Dawley rat liver on the ion balance and elemental composition of the livers were investigated. For this purpose, elemental composition of healthy liver tissues was obtained by Wavelength Dispersion X-ray Fluorescence (WDXRF) spectrometry and its effect on ion concentrations was investigated. The presence of Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Pd and Br major and minor elements in liver samples were found with low error rates. It was found that propolis and boric acid injected into the samples alone brought the concentration of Fe, Mg, Zn, Ca and Cl elements closer to the values of healthy tissue. This result can be attributed to the ability of boric acid and propolis to reduce oxidative stress on the elements.

## BORİK ASİT VE PROPOLİS ENJEKTE EDİLEN YETİŞKİN SPRAGUE DAWLEY SIÇAN KARACİĞERLERİNİN WDXRF SPEKTROMETRESİ İLE ELEMENTAL ANALİZİ

### Anahtar kelimeler

WDXRF  
Sprague Dawley Siçan,  
Borik Asit,  
Propolis,  
Karaciğer

**Özet:** Reaktif oksijen türleri (ROT) veya serbest radikallerin üretimi oksidatif stresten kaynaklanır ve oksijen veya diğer moleküller tarafından oluşturulurlar. Aşırı miktarda serbest radikaller lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilir ve karsinogeneze neden olabilir. İlaçlarda ve endüstri malzemelerinde borik asit ve propolis yoğun bir şekilde kullanılmakta ve bunların antioksidan rolleri son zamanlarda dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, cerrahi işlemle düzensizliğe maruz kalmış ve sağlıklı yetişkin Sprague Dawley siçan karaciğerine enjekte edilen Borik Asit (14 mg / kg) ve Propolis (100, 200 mg / kg) karaciğerlerin iyon dengesine ve elemental kompozisyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla Dalgaboyu Ayrımlı X-ışını Floresans (WDXRF) spektrometresi ile sağlıklı karaciğer dokularının elemental kompozisyonu elde edildi ve iyon konsantrasyonlarına etkisi araştırıldı. Karaciğer örneklerinde Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Pd ve Br majör ve minör elementlerin varlığı düşük hata oranı ile bulundu. Numunelere tek başına enjekte edilen propolis ve borik asitin Fe, Mg, Zn, Ca ve Cl elementlerinin konsantrasyonunu sağlıklı doku değerlerine yaklaştırdığı bulundu. Bu sonuç borik asit ve propolis elementlerin üzerindeki oksidatif stresi azaltma yeteneğine atfedilebilir.

## 1. Giriş

Bor ve bileşiklerinin oksidatif stresin önlenmesinde çok etkili olduğu bilinmektedir. Bor ve bor bileşikleri, antiseptik ve anti epileptik özelliklerinden dolayı medikal ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bor, çeşitli kanser tedavilerinde de kullanılır, çünkü kanser hücrelerini sağlıklı hücrelere en az zararla öldürür. Bunlara ek olarak biyolojik işlevi ve antioksidan özellikleri nedeniyle bor elementinin elit bir mikro besin maddesi olabileceği de düşünülmektedir [1]. Bor, gastrointestinal sistemden kan dolaşımına hızla emilir ve beyin fonksiyonlarını, plazma lipit profillerini ve romatizmi düzeltmede önemli bir rol oynar [2]. Ayrıca, bor bileşiklerinin, bakteriyel ve invitro hücre dizilerinde genotoksik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [3]. Lityum borat ve borik asit gibi bor bileşikleri, birçok biyolojik bileşiğin hidroksil gruplarını kabul edebilir ve bu özelliklerden dolayı antioksidan özellikler kazandıran glikolipitler, glikoproteinler ve fosfoinositler ile kompleksler oluşturabilirler [4]. Propolis, zararlı bakterilere, virüslere, mantarlara ve kovanlardaki sterilizasyona karşı koruma sağlamak amacıyla bitkilerden elde edilen mumsu bir maddedir. Propolis yüksek miktarda flavonoid ve fenolik asit içerdiğinden güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir. Polifenoller de dahil olmak üzere çok çeşitli antioksidanların renal IR hasarı için çok yararlı olduğu bilinmektedir [5]. Son kanıtlar, resveratrolün bazı koruyucu etkilerinin, eNOS ile NO üretiminin düzenlenmesini içerdiğini de göstermektedir [6].

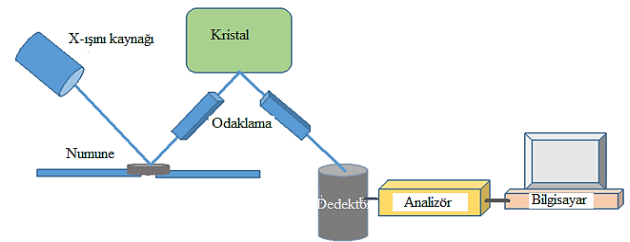
Canlı maddelerin majör ve minör elemental analizinde kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Synchrotron radyasyonu ile indüklenen X-ışını emisyonu (SRIXE), enerji ve dalga boyu ayrımlı X-ışını flüoresansı (EDXRF ve WDXRF), toplam yansıma X-ışını floresansı (TXRF) ve proton ile indüklenen X-ışını emisyonu (PIXE) kullanılarak kanserli ve sağlıklı dokuların elemental analizi gerçekleştirilmektedir [7]. XRF kalitatif analizde B'den U'ya ( $5 < Z < 92$ ) kadar olan tüm elementler için son derece iyi bir duyarlılığa sahiptir ve kantitatif analizde geniş bir konsantrasyon aralığını tespit edebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, X-ışını flüoresansının çok daha geniş bir uygulama alanı vardır. X-ışını flüoresans (XRF) ölçümleri için, ticari olarak temin edilebilen dalga boyu-ayrımlı spektrometrelerin (WDXRF) ortaya çıkışı, çevresel, klinik, kimyasal, jeolojik ve endüstriyel analiz için ekonomik ve güçlü bir araç sağlamıştır XRF [8, 9]. Özdemir et. al [10], 37-41. gebelik haftaları arasında toplam 61 sağlıklı plasenta örneğini topladı ve dalga boyu dağılımlı X-ışını flüoresans spektrometre(WDXRF) kullanarak eser elementlerin yüzde konsantrasyonlarını belirledi. Plasenta dokularındaki Fe, Cu ve Zn konsantrasyonlarının, annenin yaşına ve yenidoğanın ağırlığına göre istatistiksel olarak

değiştirdiği buldular. Silva et al.[11] hasta ve sağlıklı 106 göğüs dokusunda Ca, Fe, Cu, ve Zn eser elementlerinin tespitini EDXRF analizi kullanarak gerçekleştirdi. Hasta dokularında sağlıklı olanlara nazaran daha yüksek eser element konsantrasyonu olduğunu rapor ettiler.

Bu çalışmada, Dalga boyu-Ayrımlı X-Işını Flüoresans Spektrometresi Kullanılarak vasküler düzensizlik oluşturulmuş yetişkin Sprague Dawley Sıçanlarında Borik Asit ve Propolis verilmesinin ardından karaciğerdeki element konsantrasyonunun sağlıklı ciğerinki ile karşılaştırılması yapılmış ve dokulardaki önemli elementlerin düzeylerindeki (Ca, Mg, P vb.) değişim belirlenmiştir. Borik asit ve propolisin oksidatif stresi ve serbest radikalleri elimine etmedeki başarısı göz önüne alınarak, anestezi uygulanmış ve vasküler düzensizliğe maruz kalmış sıçanların karaciğerlerindeki Ca, Fe, Mg ve K vb. dengesinin, propolis ve borik asit enjeksiyonu ile sağlıklı karaciğerlerdeki değerlere yaklaşıp yaklaşmadığı elemental analiz ile yorumlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Karaciğer örneklerinde bulunan elementlerin analizi, WDXRF kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 1'de, WDXRF sisteminin bir şeması verilmiştir. Bu çalışmada, 250-300 gram ağırlığındaki Yetişkin Sprague Dawley sıçanları (n = 42), Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (Erzurum / Türkiye) temin edildi. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında tutulup, 12 saat / 12 saat ışık / karanlık döngüsünde sıcaklık ve nem kontrollü odalarda tutuldu ve yiyecek ve suya serbestçe erişim sağlandı. Deneyler, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'na (NIH yayın No. 85-23, revize 1996) göre gerçekleştirildi.



**Şekil 1.** WDXRF deney geometrisi (Rodyum X-ışını tüpü, Rigaku1 ZSX-100e, ZSX yazılımlı bilgisayar)

Bu çalışmada tüm deneysel prosedürler Atatürk Üniversitesi Yerel Etik Kurulu (No. 66, 22.03.2018) tarafından onaylanmıştır. Propolis ve Borik asit 100 ml damıtılmış su içinde çözüldü. Belirlenen konsantrasyonlardaki maddeler, böbreklere giden damarları bir klemp yardımı ile sıkıştırılarak vasküler düzensizlik oluşturulan sıçanlara (VDS) ayrı ayrı ve kombine olarak gavaj yardımıyla oral yoldan verildi. Karaciğer numunelerinin özellikleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Gavaj uygulamasından 6 saat sonra hayvanlar sevofluranla anestezi yapılarak disekte edildi. Deneklerin karaciğerleri alınıp daha sonraki analizler için -20 °C'ye bırakıldı. Sıvı azot altında her gruba ait olan karaciğer örnekleri öğütülerek toz haline getirildi ve liyofilizatörde kurutuldu. Toz haline getirilen örnekler 5 ton basınç altında 13 mm çaplı tabletler haline getirildi ve WDXRF spektrometresiyle elemental analiz işlemi gerçekleştirildi.

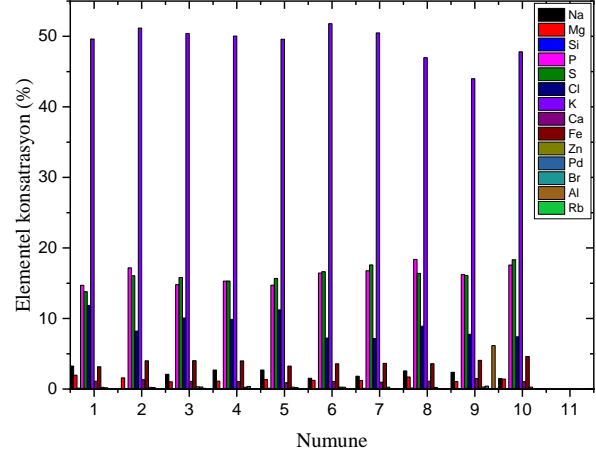
**Tablo 1.** Numune grupları

1. Kontrol (C)
2. VDS
3. Propolis 100 mg/kg
4. Propolis 200 mg/kg
5. Borik asit 14
6. VDS+ Propolis 100
7. VDS +Propolis 200 mg/kg
8. VDS+ Borik asit 14
9. VDS+Propolis100 mg/kg +Borik asit 14
10. VDS+Propolis 200 mg/kg + Borik asit 14

### 3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, propolis ve borik asidin ayrı ayrı ve kombine olarak sağlıklı ve vasküler düzensizlik oluşturulmuş sıçan karaciğerinin elemental kompozisyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Dalgaboyu ayrımlı X-ışını flüoresans spektrometresi kullanılarak yapılan elemental analiz sonuçları Tablo 2 ve Şekil 2'de sunulmuştur. Karaciğer numunelerinin tamamında K, Cl, S, P, elementleri majör miktarlarda elde edilirken, Fe, Mg, Na, Zn, Pd, Br, Al, Rb ve Si elementleri eser miktarlarda bulunmuştur. Bu elementler organlar için önemlidir ve hem eksiklikleri hem de aşırılıkları insan vücudunda birtakım bozukluklarla sonuçlanabilir. Öte yandan toksik elementlerin son derece düşük konsantrasyonlarda bile çok zararlı oldukları bilinmektedir. Üzerinde çalışılan deneklerde vasküler düzensizliğin ortadan kaldırılmasıyla tüm organlarda olduğu gibi karaciğerde de ani kan akışı serbest radikallere ve oksidatif strese sebep olabilmektedir. Karaciğerde büyük önemi olan Fe, Mg, Ca, P gibi elementlerin oksidatif stresten etkilenmesi beklenmektedir. Bu olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için propolis ve borik asit ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmıştır. Önceden yapılan bir çalışmada sıçan karaciğerinde alüminyumla teşvik edilmiş mikronukleus oluşumu ve oksidatif stres üzerine propolis ile yapılan tedavinin etkilerini değerlendirilmiştir [12]. Başka bir çalışmada ise erkek albino farelerde sisplatin ile teşvik edilmiş hepatik, renal, testiküler genotoksisiteye karşı propolis ile muamelenin etkilerini kemik iliği kromozomal aberasyonları denemesiyle araştırılmıştır [13]. Bu çalışmalarda propolis sadece iyi bir antioksidan olarak etki

göstermeyip aynı zamanda serbest radikalleri etkisiz hale getirebilecek ve DNA'nın dayanıklılığını sağlayabilecek doğal bir bileşik olduğu anlaşılmıştır. Yine benzer olarak borik asidin antioksidan rol oynadığı, mineral ve steroid hormon metabolizmasını düzenlediği, kalsiyum ve magnezyum tükenmesini önlediği, kemik yapısını koruduğu, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, enerji metabolizmasını düzenlediği, mental performansını artırdığı, kanser riskini azalttığı bildirilmiştir. Bir çalışmada borik asidin Çin hamster akciğer fibroblast V79 hücre hatlarında H2O2 ile indüklenen oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir [14].



**Şekil 2.** Elemental konsantrasyonun numunelerdeki dağılımı.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, vasküler düzensizliğe maruz kalan grupta oksidatif stresin artması nedeniyle bazı element konsantrasyonlarında, Mg, P, S, Cl, Fe, Zn ve Pd, artış ve azalmalar dikkat çekmektedir. Propolis ve borik asit enjekte edilen gruplarda, karaciğer örneklerinin elemental konsantrasyonları kontrol grubuna yakındır. Çünkü yapılan enjeksiyon sayesinde reaktif oksijen türleri ve radikaller elimine edilmiş ve insan vücudu için önemli olan elementlerin konsantrasyonları belli bir seviyede tutulmuştur. Propolis ve borik asit birlikte uygulandığı 9 ve 10. numunelerde hem majör hem de eser elementlerde artış olduğu görülmektedir. Borik asit ve propolisin tek başına daha etkili olduğu Mg, Ca, Na, P, S, Cl, K ve Pd elementlerinin konsantrasyonlarını sağlıklı deneğin karaciğer element konsantrasyonuna yaklaştırdığı görülmektedir. Borik asidin genellikle iyon dengesini sağladığı bilinir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da borik asidin Mg ve Ca dengesini korumada başarılı olduğunu göstermektedir. Vasküler bozulmaya maruz kalan dokudaki iyon dengesizliği propolis ve borik asit tarafından elimine edilmiştir ve iyon dengesi kontrol grubununkine yaklaşmıştır.

### 4. Sonuç

Bu araştırmada, cerrahi müdahale ile vasküler düzensizliğe maruz bırakılmış sıçan karaciğerinin

Propolis ve Borik asit enjekte edilmesiyle elemental konsantrasyonundaki değişimi ve karaciğer için önemli olan Mg, Fe, K, P ve diğer eser elementlerdeki

**Tablo 2.** Numuneler için elde edilen elemental konsantrasyonlar (yaklaşık %7 bağıl hata ile)

Numune	Na	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Zn	Pd	Br	Al	Rb
1	3,2605	1,9643	0,1219	14,7005	13,7979	11,8444	49,6275	1,1113	3,1562	0,2362	0,1793	-	-	-
2	-	1,5782	-	17,1862	16,0564	8,2219	51,1728	1,3235	4,0023	0,2452	0,2135	-	-	-
3	2,0879	1,0193	-	14,8052	15,8102	10,0606	50,4121	1,0833	4,0172	0,3221	0,284	0,0982	-	-
4	2,7013	1,1102	-	15,2977	15,3082	9,875	50,0449	1,0511	3,9937	0,2474	0,3705	-	-	-
5	2,6937	1,3340	0,1121	14,7242	15,6805	11,2211	49,5852	0,8982	3,2619	0,2759	0,2131	-	-	-
6	1,528	1,2226	-	16,4419	16,6401	7,2237	51,795	1,0672	3,5653	0,265	0,2513	-	-	-
7	1,813	1,2153	0,0928	16,7714	17,5951	7,167	50,4807	0,9677	3,6363	0,2608	-	-	-	-
8	2,5638	1,7096	0,1372	18,3814	16,3942	8,9008	46,9832	1,1156	3,5912	0,223	-	-	-	-
9	2,376	1,0492	-	16,2248	16,0992	7,7576	43,9898	1,4936	4,0646	0,2793	0,416	-	6,1503	0,0996
10	1,4781	1,3982	-	17,5809	18,3269	7,4073	47,7983	1,0588	4,6176	0,2639	-	-	-	0,0701

oksidatif stresin etkisi incelendi. Bu amaçla, antioksidan özelliği rapor edilmiş Propolis ve Borik asidin tek ve kombinasyonlarının 10 farklı sıçan ciğeri üzerinde koruyucu bir etkinlik gösterip göstermediği araştırıldı. Bu amaçla WDXRF analizi ile dokuların elemental analizi yapılmış ve dokudaki önemli eser elementlerin değişimi tespit edildi. Sadece Propolis veya sadece Borik asit enjekte edilen sıçanlarda, Fe, Mg, Zn, Ca ve Cl gibi elementlerin konsantrasyonunun sağlıklı sıçan ciğerininkine yakın olduğu gözlemlendi. Buna karşın propolis+borik asit enjekte edilen gruplarda eser elementlerde artış olduğu fark edildi. Elde edilen sonuçlardan, vücut için önemli olan Ca, Mg, Cl, P, S ve K gibi elementlerin üzerindeki oksidatif stresin azaltılması ve konsantrasyonlarının istenen düzeyde kalması tek başına propolis ve borik asit enjekteleri ile sağlandığı söylenebilir

### Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalede rapor edilen çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarları veya kişisel ilişkileri olmadığını beyan ederler.

### Kaynaklar

[1] Çelikezen, F. Ç., Toğar, B., Özgeriş, F. B., İzgi, M. S., Türkez, H. Cytogenetic and oxidative alterations after exposure of cultured human whole blood cells to lithium metaborate dehydrate. *Cytotechnology*, 68(4), 2016, 821-827.

[2] Devirian, T. A., & Volpe, S. L., The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 2, . 2003, 219-231.

[3] Türkez, H., Geyikoğlu, F., Tatar, A., Keleş, S., Özkan, A. Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62 (11-12), 2007, 889-896.

[4] Nielsen, F. H. Is boron nutritionally relevant?. *Nutrition reviews*, 66(4), 2008, 183-191.

[5] Singh D, Chopra K. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats. *Pharmacol Res* 50, 2004, 187-193.

[6] Turkez, H., and Geyikoglu, F. Boric acid: a potential chemoprotective agent against aflatoxin b 1 toxicity in human blood. *Cytotechnology*, 62(2), 2010, 157-165.

[7] Carvalho, M. L., Magalhães, T., Becker, M., & Von Bohlen, A. Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(9), 2007, 1004-1011.

[8] Shaltout, A. A., Welz, B., Ibrahim, M. A. Influence of the grain size on the quality of standardless WDXRF analysis of river Nile sediments. *Microchemical journal*, 99(2), 2011, 356-363.

[9] Niknami, K. A., Amirkhiz, A. C., & Glascock, M. D. Provenance studies of Chalcolithic obsidian artefacts from near Lake Urmia, northwestern Iran using WDXRF analysis. *Archaeometry*, 52(1), 2010, 19-30.

[10] Özdemir, Y., Börekci, B., Levet, A., & Kurudirek, M. Assessment of trace element concentration distribution in human placenta by wavelength dispersive X-ray fluorescence: effect of neonate weight and maternal age. *Applied Radiation and Isotopes*, 67(10), 2010, 1790-1795.

[11] Silva, M.P., Soave, D.F., Ribeiro-Silva, A. et al. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC Res Notes* 5, 2012, 194.

[12] Türkez, H., Yousef, M. I., and Geyikoglu, F. Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10), 2010, 2741-2746.

[13] Tohamy, A. A., Abdella, E. M., Ahmed, R. R., and Ahmed, Y. K. Assessment of Anti-Mutagenic, Anti-Histopathologic and Antioxidant Capacities of Egyptian Bee Pollen and Propolis Extracts. *Cytotechnology*, 66 (2), 2014, 283-297.

[14] Yılmaz, S., Ustundag, A., Ulker, O. C., and Duydu, Y., Protective effect of boric acid on oxidative DNA damage in Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17 (4), 2016, 748.