

## Dimetil Benzantrazen Uygulanan Ratlarda Tunceli Dağ Sarımsağı (*Allium tuncelianum*) ve Vitamin E'nin Bağırsak Dokusundaki Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisi\*

Kasım Takım<sup>1,a,\*\*</sup>, Türkan Kutlu<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Malatya, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID:0000-0003-4631-1982, <sup>b</sup>ORCID:0000-0002-1501-9930

Geliş Tarihi: 19.07.2019

Kabul Tarihi: 03.12.2019

**Özet:** Bu çalışmada; 7,12-dimethyl benzanthracene (DMBA) ile indüklenen ratlara Tunceli Dağ Sarımsağı (*Allium tuncelianum*) ve vitamin E uygulamasının, rat bağırsak dokusundaki lipit peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, Wistar albino tipi dişi ratlar kullanıldı. Her grupta 8 adet (n=8) hayvan olmak üzere, 5 grup oluşturuldu. 1.Grup; Kontrol grubu, 2.Grup; 7,12-dimethyl benzanthracene (DMBA) verilen grup, 3.Grup; 7.12-DMBA'ya ilaveten 250 mg/kg/gün Tunceli Dağ Sarımsağı (TDS) verilen grup, 4.Grup; 7.12-DMBA'ya ilaveten 500 mg/kg/gün TDS verilen grup ve 5.Grup; 7.12-DMBA'ya ilaveten 200 mg/kg (haftada iki kez) E vitamini verilen gruptu. 30 günlük deneme sonunda; ratlara ötenazi uygulandı ve bağırsak dokusu çıkarılarak homojenize edildi. Bağırsak doku homojenatındaki lipit peroksidasyon ve antioksidan enzim düzeyi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Çalışma sonucunda DMBA uygulanan grubun (Grup 2) bağırsak dokusunda: katalaz (CAT), total glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı (P<0.05), MDA düzeyinin ise anlamlı olarak arttığı (P<0.05) belirlendi. DMBA ile birlikte TDS'nin düşük dozunun uygulandığı grupta (Grup 3) CAT ve SOD enzim düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış (P<0.05) belirlendi. Bu grup, vitamin E verilen grupla kıyaslandığında ise; CAT ve SOD düzeylerinde anlamlı artış (P<0.05), GSH ve MDA düzeylerinde ise anlamlı azalma (P<0.05) saptandı. DMBA ile birlikte TDS'nin yüksek dozunun uygulandığı grupta (Grup 4); CAT ve SOD enzim düzeylerinde, hasta grupla kıyaslandığında önemli bir artış görülmezken, GSH ve MDA düzeylerinde ise anlamlı bir azalma (P<0.05) olduğu belirlendi. Bu grup, vitamin E verilen grupla kıyaslandığında ise sadece MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma (P<0.05) olduğu belirlendi. Sonuç olarak *A. tuncelianum*'un ratların bağırsak dokusunda, antioksidan enzim aktivitelerini ve lipit peroksidasyonunu olumlu bir şekilde değiştirdiği belirlendi. Böylece oksidatif hasara karşı, enzim aktivitelerini düzenleyerek ve lipit hasarını önleyerek katkı sağlayabileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Allium tuncelianum*, Antioksidan enzim aktivitesi, DMBA, MDA.

### The Effect of Tunceli Mountain Garlic (*Allium tuncelianum*) and Vitamin E on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in the Intestinal Tissue of Dimethyl Benzanthracene-Administered Rats

**Abstract:** The aim of this study was to determine the effect of Tunceli Mountain Garlic (*Allium tuncelianum*) and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat intestinal tissue. Wistar albino type female rats were used in the study. Five groups, included 8 animals (n=8) in each, were formed. Group 1; Control group, Group 2; 7,12-dimethyl benzanthracene (DMBA) given group, Group 3; 7,12-DMBA in addition to 250 mg/kg/day Tunceli Mountain Garlic (TDS) given group, Group 4; 7,12-DMBA plus 500 mg/kg/day TDS given group and Group 5; 7,12-DMBA in addition to vitamin E 200 mg/kg (twice a week) was formed as a group. At the end of the 30-days trial rats were euthanized and intestinal tissue was removed and homogenized. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels were measured in intestinal tissue homogenate by spectrophotometric method. At the end of the study, it was determined that catalase (CAT), total glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activities in intestinal tissue of DMBA given group (Group 2) significantly decreased compared to the control group (P <0.05) while MDA level significantly increased (P <0.05). A significant increase (P <0.05) was observed in CAT and SOD levels in the group given low dose DDS and TDS (Group 3). When this group was compared with the vitamin E group, CAT and SOD levels were significantly increased (P <0.05) and GSH and MDA levels were significantly decreased (P <0.05). There was no significant increase in CAT and SOD enzyme levels in the group with high dose DDS and TDS (Group 4) compared with the patient group while there was a significant decrease in GSH and MDA levels (P <0.05). When this group is compared with the vitamin E group, only MDA levels were significantly decreased (P <0.05). In conclusion, it was determined that *A. tuncelianum* positively changed the antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the intestinal tissue of rats. Thus, it was concluded that it can contribute to oxidative damage by regulating enzyme activities and preventing lipid damage.

**Keywords:** *Allium tuncelianum*, Antioxidant enzyme activity, DMBA, MDA

## Giriş

Sarımsak (*Allium sativum* L.), Liliaceae familyasına ait bir bitki türüdür ve yaklaşık 3000 yıldır pek çok uygarlık tarafından hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Pinto ve Rivlin, 2018). Türkiye, pek çok bitki türünde olduğu gibi *Allium* türleri yönünden de zengin bir ülkedir. Dünyada yaklaşık 500 kadar *Allium* türü bulunmakta, bunların yaklaşık 170 tanesine Türkiye’de rastlanmaktadır. Ülkemizdeki *Allium* türlerinin yaklaşık %40’ının endemik olduğu belirtilmektedir (Takım, 2015). Tunceli sarımsağı (*A. tuncelianum*) da endemik olması ve ‘Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı’nda zarar görebilir olması nedeniyle korunması gereken bitkiler içinde değerlendirilmektedir (Ozhatay ve Mathew, 2007). Tunceli ilinde ve özellikle Munzur Dağları eteklerinde yer alan Ovacık ve Pülümür ilçelerinde yaygın olarak bulunan endemik bir bitki türüdür (Özhatay, 2007). Sarımsağın antioksidan etkisi hayvanlar ve insanlarla yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir (Banerjee ve ark., 2003). *In vitro* çalışmalar sarımsağın doza bağlı olarak serbest radikalleri yakalayabildiğini göstermektedir (Banerjee ve ark., 2003). Sarımsağın antioksidatif özellikleri kükürlü bileşiklerden ve içerdiği flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Son zamanlarda hastalıkların tedavisinde doğal bitkilerin kullanımı önem kazanmaktadır. Tıbbi bitkilerin ve bu bitkilere ait uçucu yağların saf ve özellikle ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik yönden oldukça önemlidir (Takım, 2015).

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron taşıyan ve bu yüzden de çok reaktif olan kimyasal maddeler olarak nitelendirilir. Serbest radikaller hücrede DNA, lipid, enzim ve protein gibi biyokimyasal moleküllerle reaksiyona girerek yapılarını değiştirmektedir (Takım, 2015). Dimetil benzantrasen (DMBA) metabolizması sırasında hücre içerisinde reaktif oksijen türleri (ROT) üretilir. Böylece oluşan ROT'un; lipid peroksidasyonunu başlatması sonucu zararlı etkilerin ortaya çıkmasına neden olur (Soares ve Costa, 2009). Reaktif oksijen radikallerini süpürmek için var olan vücut savunma sistemleri, başta katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir. Ayrıca diyetle alınan antioksidatif fitokimyasallarda, antioksidan savunmada önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (Boğa ve ark., 2016). Bu nedenle diyetel antioksidan bileşikler ve mikro besinlerin eklenmesi gibi uygun müdahaleler ROT’a bağlı hücresel hasara karşı korumada gereklidir (Desai ve ark., 2001).

Bu çalışmada, ülkemizde Tunceli ilinin ovacık ilçesi Munzur dağı eteklerinde doğal olarak yetişmekte olan *A. tuncelianum* bitkisinin rat bağırsağında antioksidan enzim aktiviteleri üzerine

etkisi ve lipid peroksidasyonuna karşı etkinliği yönünden araştırılması amaçlanmıştır. Oksidatif uyarıya maruz kalmayı takiben reaktif oksijen türlerinin miktarı ölçülerek, hücre içinde E vitamininin serbest radikalleri ortadan kaldırmadaki yeteneği saptanabilmektedir (Baldi, 2005). Bu yüzden çalışmamızda; DMBA verilerek oluşan oksidatif strese karşı farklı dozlarda uygulanan Tunceli Dağ Sarımsağı'nın oksidan/antioksidan sistem üzerindeki etkinliğinin Vit E ile karşılaştırılması da amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Bitkinin toplanması:** Bu çalışmada kullanılan *Allium tuncelianum* Tunceli ilinde bulunan Munzur Dağı'nın Ovacık ilçesi yönüne bakan yamaçlarından ağustos ayının ikinci haftası içerisinde toplandı. İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı tarafından tür tesbiti doğrulandı. Ekstrakte edilene kadar +4 °C de buzdolabında muhafaza edildi.

**Bitki ekstraktının hazırlanması:** Ekstraksiyon işlemi hayvan çalışması için; %50 su, %50 etanol çözgeni kullanıldı. Sarımsak/çözgen oranı 1/10 olacak şekilde havanda iyice ezilen sarımsak üzerine konup ağzı kapalı olarak 24 saat çalkalayıcıda karıştırıldı. Sarı-yeşil renkte bir ekstrakt elde edilmiştir. Ekstrakt süzme işlemine tabi tutulmuştur. Biyokimyasal aktivite çalışması için rotary evaporatörde çözgen uzaklaştırılmıştır. 10.35 g yaş sarımsaktan 2.14 g kuru ekstrakt elde edilmiştir. Kuruyan madde hava ile fazla temasına izin verilmeden +4 °C de buzdolabında muhafaza edildi. Daha sonra elde edilen bu kuru ekstraktlar istenilen derişime getirilmek üzere gerekli olan çözgen miktarları ile çözülüp kullanıldı. Nüve marka etüv fırınında 103 °C’ de 3 saat bekletmek suretiyle sabit tartıma getirildikten sonra belirlenen miktarda sarımsak örnekleri alüminyum folyo ile birlikte tartılıp kurutma işlemi öncesi ve sonrasında tartımlar alınarak kuru madde miktarları belirlendi. Yapılan analizde %61.92 oranında nem ve %38.08 oranında kuru madde tespit edilip antioksidan kapasite sonuçları bu oranlar dikkate alınarak hesaplandı.

### Hayvan Deneyleeri

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Etik Kurulu'nun 2014/A-35 Protokol No'lu etik kurulu raporunda belirtilen izinle gerçekleştirildi.

**Hayvanların temini ve grupların oluşturulması:** Bu çalışmada kullanılan *Wistar albino* tipi dişi ratlar İnönü Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı, Deneysel Hayvanları Üretim Merkezi'nden (İNÜDEHÜM)

alındı. Deney boyunca, havalandırması ve güneş ışığı olan odalarda her gün altları temizlenen deney kafesleri içerisinde tutuldu. Yeterli miktarda standart pelet yem ile 30 gün boyunca beslendi. Her grupta 8 adet (n=8) hayvan olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Ratlara verilen DMBA dozlarında ve uygulama sürelerinde Banerjee ve ark. (2003) referans alındı. Ratlara verilen *A. tuncelianum* ve vitamin E dozlarında ise Fırat'ın (2005) çalışması esas alındı.

**Hayvanların beslenmesi ve ekstraktların uygulanması:** 1. Grup: K Grubu; kontrol grubudur. Deney hayvanları çalışma süresince standart rat yemi ile beslendi. 2. Grup: D Grubu; standart diyetle beslenip oksidatif stres oluşturması için 7.12-DMBA, 20 mg/kg vücut ağırlığı dozunda tek seferde intraperitoneal olarak 0.5 mL enjekte edildi. 3. Grup: DA-1 Grubu; 20 mg/kg vücut ağırlığı dozunda tek seferde intraperitoneal olarak 0,5 mL enjekte edilen 7.12-DMBA'ya ilaveten, uygulama dozu 250 mg/kg vücut ağırlığı dozunda olacak şekilde *A. tuncelianum* süpernatantından 1 mL ratlara ağızdan orogastrik yöntemiyle bir ay boyunca her gün verildi. 4. Grup: DA-2 Grubu; 20 mg/kg vücut ağırlığı dozunda tek seferde intraperitoneal olarak 0,5 mL enjekte edilen 7.12-DMBA'ya ilaveten uygulama dozu 500 mg/kg vücut ağırlığı dozunda olacak şekilde *A. tuncelianum* süpernatantından 1 mL ratlara ağızdan orogastrik yöntemiyle bir ay boyunca her gün verildi. 5. Grup: DE Grubu; 20 mg/kg vücut ağırlığı dozunda tek seferde intraperitoneal olarak 0,5 mL enjekte edilen 7,12-DMBA'ya ilaveten standart bir antioksidan olan E vitamini, uygulama dozu 200 mg/kg vücut ağırlığı dozunda olacak şekilde bir ay boyunca haftada iki kez ağızdan orogastrik yöntemiyle verildi (Fırat, 2005; Solmaz, 2011). Yemler, özel çelik kaplarda ve su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu ad libitum olarak tüketmesi sağlandı.

**Dokuların homojenizasyonu:** Doku homojenizasyonu Ateş ve ark. (2006) bildirdiği yöntemine göre yapıldı. Enzim aktivitesi yapılacak dokunun homojenizasyonunda, öncelikle doku tartıldı ve 1/20 (w/v) oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek buz izolasyonu altında IKA-Werke T25 homojenizatörü ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, sonifikatörde (VWR Branson scientific) 30 saniyelik aralıklarla 4 defa 30 saniye sonifiye edildi ve 10,000 g'de +4 °C'de 10 dakika Nüve NF 800R mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi yapıldı ve böylece enzim aktiviteleri ve protein tayininin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri ölçüm işlemleri yapıncaya kadar -70°C'de derin dondurucuda saklandı. Lipit peroksidasyonunu belirleyeceğimiz dokunun homojenizasyonu ise PBS tamponu (pH 7.4) ile 1/10 (w/v) oranında eklenerek hazırlandı ve hemen deneyler yapıldı.

### Antioksidan enzim aktivitesi analizleri

#### Katalaz enzim aktivitesi analiz yöntemi:

Katalaz enziminin aktivite tayini Lück (1965) yöntemine göre yapıldı. Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere spektrofotometrede 240 nm'de absorbans 0.7-0.9 oluncaya kadar Na-K-fosfat tampon çözeltisine derişik (%35'lik) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µL alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağlı olarak 30 µL başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatant eklendi ve bir kez karıştırılıp Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm'de, 30 sn. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ( $\epsilon = 0.0396 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) absorbans değişimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından mL'deki enzim ünite sayısı hesaplandı.

#### Süper oksit dismutaz enzim aktivitesi analiz yöntemi:

SOD enziminin aktivite tayini McCord ve Fridovich (1969) yöntemine göre yapıldı. SOD enzim aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen O<sub>2</sub>' radikallerinin sitokrom C'yi okside etmesi sonucu oluşan renk değişiminin inhibisyonu 550 nm'de takip edilerek belirlendi. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi. Bu reaksiyonu %50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Ünite (U) olarak kabul edildi ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi. % inhibisyon =  $(\text{OD}_{\text{kör}} - \text{OD}_{\text{örnek}}) / \text{OD}_{\text{kör}} \times 100$

**Total glutatyon (GSH) ölçümü:** Akerboom ve Sies (1981) ve Ateş ve ark. (2006)'nın yöntemleri modifiye edilerek bu çalışmaya uyarlanmıştır. 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) oluşumu, 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ekstrakt içindeki GSH miktarı, ticari bir GSH standart olarak kullanılarak, nmol/mg protein cinsinden belirlendi. Yöntem: 1) Spektrofotometre küvetine 1 mL tampon çözeltisi eklendi. 2) 30 µL örnek ilave edildi. 3) 50 µL NADPH 4) 20 µL DTNB 5) 20 µL GSH-Redüktaz 6) Daha sonra Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 412 nm deki absorbans değişimi (5. dk.) okundu. 7) Enzim aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

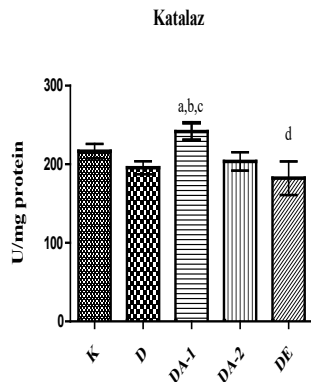
**Protein tayini:** Protein tayini Bradford (1976) yöntemine göre yapıldı. Standart protein olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. BSA'dan 1 mg tartıp 1 mL' de çözülmüş ve bu çözelti de 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 75, 50, 25 ve 10 mg/mL olacak şekilde çeşitli derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Yirmi kat seyreltilmiş örnek ve standarttan 25 µL (üçer tekrarlı olacak şekilde) mikroplyet yerleştirildi. Üzerine 200 µL Bradford çözeltisi eklendi. 595 nm'de okuma yapıldı. Standartlardan elde edilen verilerle standart grafiği çizilmiş ve bu grafikten elde edilen formülden örnekteki protein değeri hesaplandı.

**Lipit peroksidasyon ölçümü:** Malondialdehit düzeyi Beuge ve ark. (1994)'nin yöntemi modifiye edilerek tespit edildi. Yöntem; 10 mL'lik santrifüj tüpleri alınmış ve bütün tüplere 1.5 mL TCA çözeltisi konuldu. Kör tüpleri hariç tutularak örnek tüplerine 0.5 mL homojenat konuldu. Kaynar suda (95-100 °C de) 60 dk. bekletildi. Üzerindeki süpernatant alınıp üzerine 1 mL TBA eklenmiştir. Kaynar suda (95-100 °C "de) 60 dk bekletildi. Daha sonra tüpler soğutuldu ve 3500 rpm' de 10 dk. santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatant alınıp üzerine 1 mL n-Bütanol eklenip vortekslenildi. Otuz dakika sonra üzerindeki organik faz alınıp Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresinde 550 nm'deki MDA-TBA kompleksinin ( $\epsilon: 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) absorbanası okunarak malondialdehit miktarı hesaplandı.

**İstatiksel Değerlendirme:** Çalışma bulgularının istatistiksel analizinde *GraphPad Prism 5.01* programı kullanıldı. Verilerin kıyaslaması One Way ANOVA Tukey testi kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar; grup ortalamaları  $\pm$  standart sapma olarak grupların birbirleri ile karşılaştırılmaları ise  $\pm$  standart hata olarak verildi. Grafiklerde gruplar birbirleri ile karşılaştırılırken istatistiksel anlamlılık ( $P < 0.05$ ) olarak kabul edildi.  $P < 0.05$ ; "Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark var" olarak ifade edildi. Eğer gruplar kendi aralarında karşılaştırılıyor ise istatistiksel anlamlılık ( $P < 0.05$ ); a, b, c, vb. harfleri ile gösterildi.

## Bulgular

**Katalaz enzim aktivitesi sonuçları:** Ratların bağırsak katalaz enzim aktivitesi Şekil 1'de verildi.



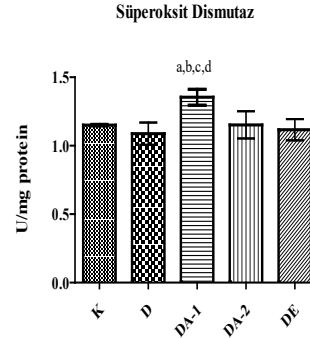
Şekil 1. Rat bağırsak dokusunda katalaz enzim aktivitesi grafiği.

Şekil 1'e göre katalaz enzim aktivitesi; D grubunda, K grubuna göre azalma olduğu ama bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi ( $P > 0.005$ ). DA-1 grubunda, D grubuna göre artma olduğu bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $P < 0.01$ ). DA-1 grubu; DA-2 grubuyla kıyaslandığında artış ( $P < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. DA-1 grubu; DE grubuyla

kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0.001$ ) bir artış olduğu DE grubunda ise; K grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ( $P < 0.05$ ).

[a= D vs DA-1 ( $P < 0.01$ ), b= DA-1 vs DA-2 ( $P < 0.01$ ), c= DA-1 vs DE ( $P < 0.001$ ), d= K vs DE ( $P < 0.05$ )]

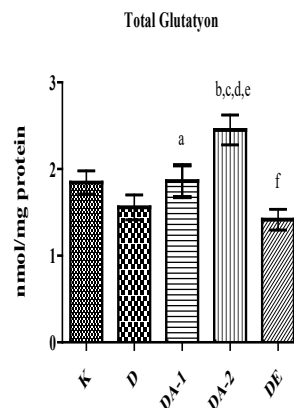
**Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi sonuçları:** Ratların bağırsak SOD enzim aktivitesi Şekil 2'de verildi.



Şekil 2. Rat bağırsak dokusunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesi grafiği.

Şekil 2'ye göre süperoksit dismutaz enzim aktivitesi DA-1 grubunda, K grubu ve D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış ( $P < 0.01$ ) olduğu gözlemlendi. Ayrıca TDS yüksek dozu verilen grup; E vitamini verilen grupla kıyaslandığında da, istatistiksel olarak anlamlı artışın ( $P < 0.05$ ) var olduğu görüldü. [a= K vs DA-1 ( $P < 0.05$ ), b= D vs DA-1 ( $P < 0.01$ ), c= DA-1 vs DA-2 ( $P < 0.05$ ), d= DA-1 vs DE ( $P < 0.01$ )]

**Total glutatyon düzeyi sonuçları:** Ratların bağırsak total glutatyon düzeyleri Şekil 3'te verildi.



Şekil 3. Rat bağırsak dokusunda glutatyon düzeyleri grafiği.

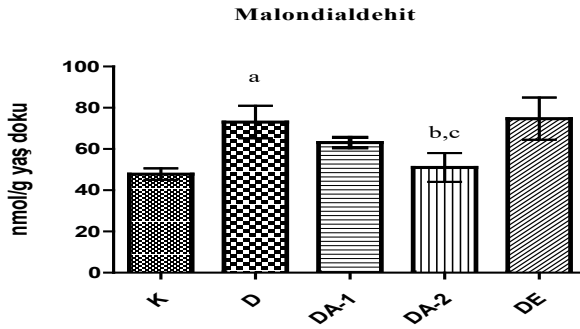
Şekil 3'e göre bağırsak GSH düzeylerinde; D grubunda, K grubuna göre azalma anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ). DA-1 grubunda, DE grubuna göre anlamlı artış ( $P < 0.01$ ) gözlemlendi. DA-2 grubunda, K, D, DA-1 ve DE grubuyla kıyaslanınca anlamlı artış ( $P < 0.001$ ) tespit edildi.

[a= DA-1 vs DE ( $P<0.01$ ), b= K vs DA-2 ( $P<0.001$ ), c= D vs DA-2 ( $P<0.001$ ), d= DA-1 vs DA-2 ( $P<0.001$ ), e= DA-2 vs DE ( $P<0.01$ ), f= K vs DE ( $P<0.01$ )]

**Malondialdehit düzey testleri:** Ratların bağırsak malondialdehit düzeyleri Şekil 4'te verildi.

Şekil 4'e göre; D grubunda K grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı bir artma ( $P<0.001$ ) gözlemlendi. DA-2 grubunda, D grubu ve DE gruplarına göre; istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $P<0.01$ ) tespit edildi.

[a= K vs D ( $P<0.001$ ), b= D vs DA-2 ( $P<0.01$ ), c= DA-2 vs DE ( $P<0.01$ )]<sup>1</sup> a= D vs DA-1 ( $P<0.01$ ), b=DA-1 vs DA-2 ( $P<0.01$ ), c=DA-1 vs DE ( $P<0.001$ ), d= K vs DE ( $P<0.05$ )<sup>2</sup> a= K vs DA-1 ( $P<0.05$ ), b= D vs DA-1 ( $P<0.01$ ), c=DA-1 vs DA-2 ( $P<0.05$ ), d= DA-1 vs DE ( $P<0.01$ )<sup>3</sup> a= DA-1 vs DE ( $P<0.01$ ), b= K vs DA-2 ( $P<0.001$ ), c=D vs DA-2 ( $P<0.001$ ), d=DA-1 vs DA-2 ( $P<0.001$ ), e=DA-2 vs DE ( $P<0.01$ ), f=K vs DE ( $P<0.01$ )<sup>4</sup> a=K vs D ( $P<0.001$ ), b=D vs DA-2 ( $P<0.01$ ), c=DA-2 vs DE ( $P<0.01$ )  
vs=versus (karşı kıyaslama)



Şekil 4. Bağırsak dokusunda malondialdehit düzeyleri üzerine etkilerinin grafiği.

Tablo 1. Rat bağırsak doku homojenatları istatistiksel analiz parametreleri ve grup ortalamaları

Parametreler	K	D	DA-1	DA-2	DE
CAT <sup>1</sup>	216.73±9.13	195.71±8.24	241.69±11.18 <sup>a,b,c</sup>	203.68±11.77	182.39±21.31 <sup>d</sup>
SOD <sup>3</sup>	1.19±0.08	1.08±0.08 <sup>a,b,c,d</sup>	1.33±0.06 <sup>ab</sup>	1.13±0.09	1.11±0.07
GSH <sup>2</sup>	1.84±0.13	1.55±0.14	1.86±0.18 <sup>a</sup>	2.45±0.17 <sup>b,c,d,e</sup>	1.41±0.11 <sup>f</sup>
MDA <sup>4</sup>	47.81±2.78	73.05±7.86 <sup>a</sup>	63.11±2.51	51.06±6.91 <sup>b,c</sup>	74.69±10.23

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada DMBA ile indüklenmiş rat bağırsak dokusunda, *Allium tuncelianum*'un antioksidan enzim aktivite ve MDA düzeyleri üzerine etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca DMBA verilerek oluşan oksidatif strese karşı; farklı dozlarda uygulanan Tunceli Dağ Sarımsağı'nın Vitamin E ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu dokunun tercih edilmesinin nedeni; 7.12-DMBA'nın karın bölgesine enjekte edilmesi, bu dokunun da karın bölgesinde olmasıdır. Ayrıca bu dokunun canlı vücudunda metabolik faaliyetlerin en çok gerçekleştiği, dolayısıyla da oksidatif hasara en çok maruz kalan dokulardan birisi olması da tercih nedenlerinden birisidir. Sarımsağın düşük dozdaki yararlı etkileri yüksek dozda kaybolduğu tam tersine prooksidan etki yaptığı hatta çiğ sarımsak ekstraktının 5 mL/kg'lık dozu sıçanlarda mide hasarına bağlı ölüme neden olduğu, aşırı sarımsak kullanımının anemi ve gastrointestinal sistem problemleri gibi toksik etkilere neden olduğu yapılan literatür taramalarında (Banerjee ve ark., 2002; Banerjee ve

ark., 2003; Solmaz, 2011) belirlenmiştir. Bu yüzden çalışmamızda ratların vücut ağırlıkları (kg) başına 250 ve 500 mg'lık derişimlerinin verilmesi uygun görülmüştür.

Katalaz enzim aktivitesi farklı dokularda değişkenlik gösterir. Katalaz enzimi, karaciğer, böbrek ve kırmızı kan hücrelerinde daha yüksek miktarda bulunur. DMBA ile indüklenmiş rat dokularında katalaz enzim aktivitesinin düşmesi anlamlı azalma olarak kabul edilmiştir. DMBA ile indüklenmiş ratlara verilen antioksidatif maddelerin ise, azalan katalaz enzim aktivitesini yükseltmeleri anlamlı artma olarak rapor edilmiştir (Solmaz, 2011; Takım, 2015). Bizim sonuçlarımıza göre; katalaz enzim aktivitesi, D grubunda, K grubuna göre azalma anlamlı değildir. DMBA ile birlikte *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grupta; sadece DMBA verilen hasta gruba göre, istatistiksel olarak anlamlı bir artma ( $P<0.01$ ) belirlenmiştir. DMBA ile birlikte *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grup, DMBA ile birlikte *Allium tuncelianum*'un yüksek dozu verilen grupla kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0.01$ ) bir

artış bulunmuştur. Yine DMBA ile birlikte *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grup; DMBA ile birlikte E vitamini verilen grupla kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0.001$ ) bir artış söz konusudur. E vitamini grubunda ise; kontrol grubuna göre azalma anlamlı ( $P<0.05$ ) olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre; *Allium tuncelianum*'un düşük dozu antioksidan, yüksek dozu ise prooksidan aktivite göstermiştir denilebilir. *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grup, E vitamini verilen grupla kıyaslandığında ise; *Allium tuncelianum*'un, standart bir antioksidan olan E vitamininden daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir.

DMBA ile indüklenmiş rat dokularında SOD enzim aktivitesinin düşmesi anlamlı azalma olarak kabul edilmiştir. DMBA ile indüklenmiş ratlara verilen antioksidatif maddelerin SOD enzim düzeylerini artırmaları da anlamlı bir artış olarak ifade edilmiştir (Kutlu ve ark., 2018; Singh ve Shukla, 1998). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre; tıpkı katalaz aktivitesinde olduğu gibi, *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grupta, kontrol grubu ve sadece DMBA verilen hasta gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış ( $P<0.01$ ) olduğu gözlemlendi. Ayrıca TDS yüksek dozu verilen grup; E vitamini verilen grupla kıyaslandığında ise, istatistiksel olarak anlamlı artışın ( $P<0.05$ ) var olduğu görüldü. Bu sonuca göre; *Allium tuncelianum*'un düşük dozu iyi bir antioksidan özellik gösterirken, yüksek dozu ise prooksidan aktivite gösterdiği görülmektedir. *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grup, E vitamini verilen grupla kıyaslandığında; *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun, standart bir antioksidan olan E vitamininden daha yüksek SOD aktivitesi gösterdiği anlaşılmaktadır.

Total glutatyon, glutatyon peroksidaz enzimi tarafından, peroksit radikallerini temizlemek için kullanılan bir bileşiktir. DMBA ile indüklenmiş rat dokularında GSH düzeylerinin düşmesi anlamlı azalma olarak kabul edilmektedir. DMBA ile indüklenmiş ratlara verilen antioksidatif maddelerin ise oksidatif hasar sonucu düşmüş GSH düzeylerini yükseltmeleri anlamlı bir artış olarak rapor edilmiştir (Dinis ve ark., 1994; Kutlu ve ark., 2018). Çalışma sonuçlarımıza göre; sadece DMBA verilen hasta gruptaki azalma, kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $P>0.05$ ). *Allium tuncelianum*'un düşük dozunun verildiği grupta, E vitamini verilen gruba göre; anlamlı artış ( $P<0.01$ ) gözlemlendi. *Allium tuncelianum*'un yüksek dozunun verildiği grupta, kontrol grubu, sadece DMBA'nın verildiği hasta grup, DMBA ile birlikte *A. tuncelianum*'un düşük dozu verilen grup ve DMBA ile birlikte E vitamini verilen gruba kıyaslanınca anlamlı artış ( $P<0.001$ ) tespit edildi. Bu sonuca göre *Allium tuncelianum*'un

yüksek dozu, iyi bir glutatyon uyarıcısı olduğu söylenebilir.

Malondialdehit (MDA) serbest radikal saldırıları sonucu hücre membranında bulunan lipitlerin peroksidasyonunun son ürünüdür. DMBA ile indüklenmiş ratlarda MDA miktarının artması ve hayvanlara verilen antioksidatif maddeler ile miktarının azalması genel olarak olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Kutlu ve ark., 2018). Çalışma sonuçlarımıza göre; sadece DMBA verilen hasta grupta, kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı bir artma ( $P<0.001$ ) gözlemlendi. Bu ise oksidatif stresin başarılı bir şekilde oluşturulduğuna işaret etmektedir. DMBA ile birlikte *A. tuncelianum*'un yüksek dozu verilen grupta ise, sadece DMBA verilen hasta grup ve DMBA ile birlikte E vitamini verilen gruplarına göre; istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $P<0.01$ ) tespit edildi.

Sonuç olarak; *A. tuncelianum*'un düşük dozunun, bağırsak dokusunda, antioksidan enzim aktivitelerini olumlu bir şekilde etkilediğini ve yüksek dozunun ise; bağırsak dokusunu lipit peroksidasyonuna karşı koruyabileceğini söyleyebiliriz. Bununla birlikte *A. tuncelianum*'un içerisinde bulunan sülfürlü bileşikler, özellikle di allil sülfid, diallil disülfid ve diallil trisülfid sayesinde gerçekleştirilebileceğini literatür bilgilerine (Wu ve ark., 2001; Manivasagam ve ark., 2019; Uchiyama ve Mihara, 1978) dayanarak söyleyebiliriz.

## Teşekkür

Bu çalışmanın deney hayvanları kısmında teknik desteklerinden dolayı tüm İNÜDEHÜM çalışanlarına, özellikle de Veteriner Teknikeri Onur Özkaya Beyefendi'ye teşekkür ederim.

## Kaynaklar

- Akerboom TPM, Helmut S, 1981: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method Enzymol*, 77(C): 373-82.
- Ates B, Dogru IM, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, Esrefoglu M, 2006: Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundam Clin Pharmacol*, 20(3), 283-289.
- Banerjee SK, Maulik K, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK, Maulik SK, 2002: Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sciences*, 70(13), 1509-1518.
- Banerjee SK, Pulok K, Mukherjee Maulik SK, 2003: Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*, 17(2), 97-106.
- Baldi A, 2005: Vitamin E in dairy cows. *Livest Prod Sci*, 98:117-122.
- Bisgin A, Boga I, Yilmaz MA, Bingol G, Altintas D, 2018:

- The utility of next-generation sequencing for primary immunodeficiency disorders: experience from a clinical diagnostic laboratory. –*Biomed Res Int*, ID 9647253.
- Bradford MM, 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2), 248-54.
- Desai VG, Casciano D, Feuers RJ, Aidoo A, 2001: Activity profile of glutathione-dependent enzymes and respiratory chain complexes in rats supplemented with antioxidants and treated with carcinogens. *Arch of Biochem and Biophys*, 394(2), 255-264.
- Dinis TCP, Maderia VMC, Almeida LM, 1994: Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315(1), 161–69.
- Takım K, 2015: Tunceli dağ sarımsağı'nın (allium tuncelianum) in vitro antioksidan kapasitesinin ölçülmesi, ratlarda antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi ve antikanser özelliğinin belirlenmesi. Doktora Tezi, İÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Kutlu T, Takım K, Karaaslan MG, Yılmaz MA, 2018: Effect of tunceli mountain garlic (allium tuncelianum) on rat heart tissue antioxidant enzyme levels and characterization of phenolic components. *KSU J. Agric Nat*, 21(4), 632–43.
- Lück H, 1965: Catalase, in "Methods of enzymatic analysis (second printing, revised)." Ed; Bergmeyer HU, Elsevier Inc. Academic Press. Verlag Chemie GmbH.
- Manivasagam T, Subramanian P, Suthakar G, Essa MM, 2005: The chemopreventive effect of diallyl disulphide on n-nitrosodiethylamine induced heptocarcinogenesis. *J App Biomed*, 3, 187-191
- McCord JM, Fridovich I, 1969: Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244(22), 6049–55.
- Ozhatay N, Mathew B, 2007: New taxa and notes on the genus allium (alliaceae) in turkey and arabia. *Kew Bulletin*, 166(4), 723-731
- Özhatay, Neriman. 2002: Diversity of bulbous monocots in turkey with special reference. chromosome numbers. *Pure and Appl Chem*, 74(4), 547-555.
- Pinto JT, Rivlin RS, 2001: Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *The Jf Nut*, 131(3), 1058S-1060S.
- Fırat S, 2005: Alkole bağlı karaciğer hasarının önlenmesinde sarımsak, vitamin E ve melatonin etkilerinin kıyaslanması. İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bitirme Tezi, Malatya.
- Singh A, Shukla Y, 1998: Antitumour activity of diallyl sulfide on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 131(2), 209-14.
- Soares R, Costa C. 2009: Oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metabolic syndrome. Springer, Netherlands.
- Solmaz FÖK, 2011: 7.12-DMBA ile indüklenen rat karaciğer dokusunda çeşitli sarımsak ekstraktlarının koruyucu etkilerinin incelenmesi. İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Malatya
- Takım K, Yıldırım I, Kutlu T, 2015: Comparison of antioxidant activity of rheum ribes fruits and seed methanolic extracts against protein oxidation and lipid peroxidation. *Pakistan J Biol Sci*, 18(5), 232-39.
- Uchiyama M, Mihara M, 1978: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86(1), 271-278.
- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK, 2001: Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem Toxicol*, 39(6), 563-69.
- \*Bu makale Kasım Takım'ın doktora tez çalışmasından hazırlanmış ve kısa bir özeti uluslararası bir kongrede (1st International Congress On Medicinal And Aromatic Plants) poster olarak sunulmuştur.
- \*\*Yazışma Adresi:** Kasım Takım  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
**e-mail:** kasimtakim@harran.edu.tr