



**EJBACS**

**Eurasian Journal of  
Biological and Chemical Sciences  
(Eurasian J. Bio. Chem. Sci.)**

*Cilt:2    Volume: Suppl. 1    Year: 2019*

*e-ISSN 2651-5237*



# EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

**Cilt: 2      Volume: Suppl. 1      Year: 2019**

**Published Biannually**

### **Corresponding Address**

Gaziantep University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Gaziantep, Turkey

E-mail: [eurasianbiochemjournal@gmail.com](mailto:eurasianbiochemjournal@gmail.com) / [mtdogan1@gmail.com](mailto:mtdogan1@gmail.com)

Web: <http://dergipark.org.tr/ejbc>

### **Editor in Chief**

Assoc. Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

### **Editor (Associate)**

Dr. Muhammet DOĞAN

### **Editorial Board**

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ

Prof. Dr. Anna PEKSA

Prof. Dr. Elif LOLOĞLU

Prof. Dr. Elif ÖZTETİK

Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

Prof. Dr. Issa SHARİFPOUR

Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Prof. Dr. Osman GÜLNAZ

Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

Prof. Dr. Vladimer TSITSISHVILI

Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Erol ATAY

Assoc. Prof. Dr. Gökhan NUR

Assoc. Prof. Dr. H. Ahmet DEVECİ

Assoc. Prof. Dr. Şenay UĞUR

Assoc. Prof. Dr. Utku AVCI

Dr. Ardalan PASDARAN

Dr. Eva URGEOVÁ

Dr. Mustafa PEHLİVAN

Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Wrocław University, Poland

Gazi University, Turkey

Eskisehir Technical University, Turkey

İnönü University, Turkey

Iranian Fisheries Research Organization, Iran

İnönü University, Turkey

Cukurova University, Turkey

Adnan Menderes University, Turkey

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia

Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey

Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey

Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey

Shiraz University, Iran.

The University of St. Cyril and Methodius of Trnava, Slovakia

Gaziantep University, Turkey

### **Language Editor**

Gaziantep University, Turkey

### **Technical Editor**

Dr. Mustafa SEVİNDİK

Owner / Publisher

Dr. Muhammet DOĞAN

This journal is peer-reviewed and published twice (June, December) a year.

All responsibility of the articles belongs to the authors.

***e-ISSN 2651-5237***



# EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

**Cilt: 2**

**Volume: Suppl. 1**

**Year: 2019**

## Contents / İçindekiler

---

**A3 Karesi İçin Yeni Kayıt Olan Amelanchier ovalis Medik.' in Tohum ve Meyve Morfolojisinin İncelenmesi ..... 92-96**

*Derviş Öztürk, Sevda Türkş*

**The usage of discarded battery coals as electrodes and improving their hydrogen gas production performances by impregnation with Zr and Ce metals ..... 97-101**

*Sema Aslan*

**The Effect of Repeated Doses of Ketamine on Hematological Parameters in Rats ..... 102-106**

*Ufuk Mercan Yücel, Leyla Mis*

**Maternal Folik Asit Suplementasyonunun Gebe Ratlarda Bozulmuş Glukoz Toleransına Etkisinin Değerlendirilmesi ..... 107-110**

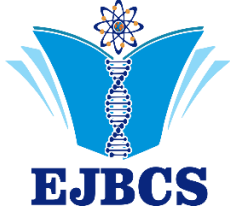
*Merve Şeyda Karaçil Ermumcu*

**LPS'nin böbrek DNA'sı üzerine akut toksik etkisi ve apilarnilin koruyucu rolü ..... 111-114**

*Züleyha Doğanyiğit, Sibel Silici, Emin Kaymak, Aslı Okan, Dilek Pandır*

**The effect of neopterin alone or in combination with doxorubicin, cisplatin and vitamin C on the viability of different hepatocellular carcinoma cell lines ..... 115-119**

*Imge Kunter, Niloufar Zabib, Marianna Najjar, Yelin Subası, Gonul Sahin*



## A3 karesi için yeni kayıt olan *Amelanchier ovalis* Medik.'in tohum ve meyve morfolojisinin incelenmesi

Derviş Öztürk<sup>1</sup>, Sevda Türkiş<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mahmutiye Atıcılık Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Eskişehir, Türkiye

<sup>2\*</sup> Ordu Üniversitesi Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Ordu, Türkiye

\*Corresponding author : dozturk@ogu.edu.tr

Orcid No: <http://orcid.org/0000-0001-7189-7407>

Received : 29/08/2019

Accepted : 30/10/2019

**Özet:** 2017-2018 yılları arasında Sırçalı Kanyonu-KARABÜK'te yürütülen floristik araştırmalar sırasında toplanmış olan bitkinin adlandırılması sonucunda *Amelanchier ovalis* Medik. türünün Türkiye Florası'ndaki A3 karesi için yeni kayıt olduğu belirlenmiştir. Araştırma alanı; Davis'in kareleme sistemine göre A3 karesin içerisinde yer almaktadır. Araştırma alanı Karabük İl merkezine 11 km, Safranbolu İlçesine 8 km uzaklıktadır. Kuzeyinde Eflani İlçesi, güneyinde Eskipazar İlçesi, doğusunda Araç İlçesi ve batısında Yenice İlçesi yer almaktadır. Safranbolu ilçesinde Düzce ve Konarı Köyleri arasında bulunmaktadır. Avrupa-Sibirya Floristik Bölgeleri'nin etkilerinin görüldüğü bir noktada yer almaktadır. Taze bitki örneklerinden bazıları morfolojik ölçümler için kullanılmış ve CANON EOS fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilerek detaylı açıklamaları hazırlanmıştır. *Amelanchier ovalis* Medik.'in arazideki genel görüntüsü ve tohum-meyvenin görüntüsü Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezindeki numunelerin fotoğrafları Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) Hitachi Regulus 8230 ile çekimleri yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Amelanchier ovalis* Medik., Morfoloji, Sırçalı Kanyonu, Karabük

### The new record for the A3 frame investigation of seed and fruit morphology of *Amelanchier ovalis* Medik.

**Abstract:** As a result of the nomenclature of the plant collected during the floristic researches conducted in Sırçalı Canyon-KARABÜK between 2017-2018, *Amelanchier ovalis* Medik. Flora of Turkey type 'n' was determined to be a new record for the A3 frame. Research area; According to Davis's square system, it is located in the A3 frame. The research area is 11 km to Karabük Province center and 8 km to Safranbolu District. Eflani District to the north, Eskipazar District to the south, Araç District to the east and Yenice District to the west. Safranbolu district is located between Duzce and Konari Villages. It is located at a point where the effects of the Euro-Siberian Floristic Regions are seen. Some of the fresh plant specimens were used for morphological measurements and detailed explanations were prepared by taking photographs with CANON EOS camera. General view of *Amelanchier ovalis* Medik. And seed-fruit image of the field Photographs of samples in Central Research Laboratory Application and Research Center of Eskişehir Osmangazi University were taken with Scanning Electron Microscope (FE-SEM) Hitachi Regulus 8230.

**Keywords:** *Amelanchier ovalis* Medik., Morphology, Sırçalı Canyon, Karabük

© EJBACS. All rights reserved.

## 1. Giriş

Türkiye'de yayılış gösteren bitki türlerinin sayısı Avrupa kıtasının tümünde yayılış gösteren bitki türlerinin sayısına yakındır. Türkiye florası 154 familyaya ait 1.220 cins ve 11.707 tür ve tür altı takson ile temsil edilmektedir (Tablo 1). Türkiye florasının bu denli zengin oluşunun nedenleri baktığımızda bunlar; Türkiye'nin hem iklim hem de bitki örtüsü yönünden, dolayısıyla floristik yapı bakımından 3 farklı bitki coğrafyası bölgesinin karşılaştığı bir konumda olması, Anadolu'nun Avrupa ve Asya kıtaları arasında köprü konumunda olması ve buna bağlı olarak iki kıta arasında karşılıklı bitki göçleri ile çeşitliliğin artması, edafik (topraksal) faktörlerin çeşitlilik göstermesi,

topografik yapının çeşitlilik göstermesidir (Akıncı ve Özhatay, 2000; Akaydın ve Erik, 1996).

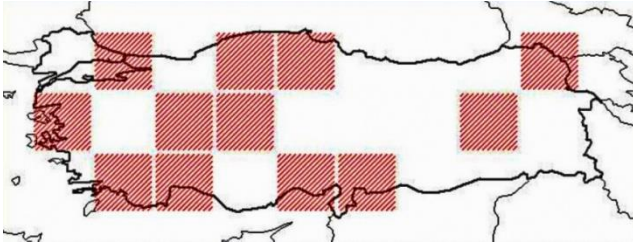
**Tablo 1.** Ülkemizin floristik özeti

	Doğal	End.	%	Toplam
<b>Kibritotları</b>	13	1	8,00	13
<b>Eğreltiler</b>	73	2	2,74	73
<b>Kapalı tohumlular</b>	11343	3640	32,09	11579
<b>Toplam</b>	11466	3649	31,82	11707



Şekil 1. *Amelanchier ovalis* Medik. Türkiye’de yayılış alanları

Araştırma alanı Karabük İl merkezine 11 km, Safranbolu İlçesine 8 km uzaklıktadır. Kuzeyinde Eflani İlçesi, güneyinde Eskipazar İlçesi, doğusunda Araç İlçesi ve batısında Yenice İlçesi yer almaktadır. Safranbolu ilçesinde Düzce ve Konarı Köyleri arasında bulunmaktadır. Kanyon 2001 yılında Yaban Hayatı Koruma Alanı olarak ilan edilmiştir. Sırçalı Kanyon’u Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgesinin Öksin Provensi içinde yer almaktadır.



Şekil 2. *Amelanchier ovalis* Medik. Türkiye’de Yayılış kareleri

Meteoroloji müdürlüğünden alınan uzun yıllara ait verilere göre, Safranbolu ilinde yıllık yağış miktarı 440,3 en düşük aylık ortalama yağış miktarı 21,5 mm ile ağustos ayına aittir. En yüksek aylık ortalama yağış miktarı ise 49,3 mm ile aralık ayına aittir. Yıllık yağış rejimi kış, ilkbahar, sonbahar, yaz (KİSY) şeklinde olup, buna göre Safranbolu ilçesinde Doğu Akdeniz Yağış Rejimi görülmektedir. Araştırma alanının ve yakın çevresinin toprak gruplarının genelini kahverengi orman toprakları oluştururken (Şekil 3), Karabük ve çevresinde küçük akarsu vadilerinde kolüvyal topraklar görünür (Işık ve ark., 2006). Jeolojik bakımdan; Sırçalı (Safranbolu, KB Türkiye) yörelerinde yaygın olarak yüzeyleyen Alt-Orta Eosen yaşlı Safranbolu Formasyonu (Saner ve diğ., 1980) düşey ve yanal yönde farklı fasiyes özellikleri gösterir. Formasyon çalışma alanında başlıca üç ana litofasiyes ile temsil edilmektedir. Bu litofasiyesler;

- Konglomera litofasiyesi
- Kumlu kireçtaşı litofasiyesi
- İskeletsel taneli tanetaşı-istiftaşı litofasiyesidir.

#### AMELANCHIER Medik.

*Amelanchier* cinsi dünya genelinde Kuzey Amerika, Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya kıtalarında yaklaşık 30

türle yayılış yapmaktadır. Ülkemizde ise iki türe ait dört taksonla temsil edilmekte ve endemizm oranı % 50’dir. Türkiye Florası’nın dördüncü cildinde *Amelanchier* cinsi, *Amelanchier rotundifolia*, *Amelanchier parviflora* ve bu türlere ait taksonlar ile yer almıştır (Davis, 1975). Fakat ülkemiz için hazırlanan Damarlı Bitkiler listesinde *A. Ovalis* Medik. ve *A. Parviflora* Boiss. türlerine ait toplam 4 adet tür altı takson kaydı verilmektedir .



Şekil 3. Araştırma alanı olan Sıçalı Kanyonu’nda görünüm.

*Amelanchier* cinsine ait taksonlar Türkiye haritası üzerinde yayılış alanları ve kareleri Şekil 1 ve 2 de verilmiş olup; kolaylıkla hibritleşme yeteneğine sahip olmaları, poliploidi özellik göstermeleri ve apomiktik olmaları nedenleri ile teşhislerinde önemli güçlükler yaşanmaktadır. Yaprak şekli ve büyüklüğü, yetiştiği habitat ve gelişim çağına bağlı olarak büyük farklılıklar göstermesi ile morfolojik olarak da tanımlamada büyük sıkıntılar oluşturmaktadır. Morfolojik açıdan tanımlamada kabul edilen karakterler ise çiçek ve meyve özellikleridir. Dökülücü yapraklara sahip, çalı veya küçük ağaç formundadır. Yapraklar basit yada petiolattır. Çiçekler beyaz, uçta salkım, nadiren tektir. Petaller lanceolattan ovata doğrudur. APG ye göre (Angiosperm filogeny Group) *Amelanchier rotundifolia* (Lam.) Dum.Cours., *Amelanchier ovalis* Medik.’e sinonim olmuştur (APG, 2011).

Yapraklar 2 cm veya daha fazla, yetişkin iken tüysüz; petaller kaliks uzunluğunun 3-4 katı kadar

1. rotundifolia

Yapraklar 2 cm ye kadar, kalıcı beyaz yünsü tüylü; petaller kaliks uzunluğunun yaklaşık 2 katı kadar

2. parviflora

Bu çalışmanın amacı, Eskişehir’de yayılış gösteren *Amelanchier* L. cinsine ait *Amelanchier ovalis* Medik. taksonunun A3 karesi kaydı için yeni bir tür oluşu ve türe ait morfolojik çalışmanın yanı sıra tohum yapısının belirlenmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) çekim yapılması ile taksonomik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

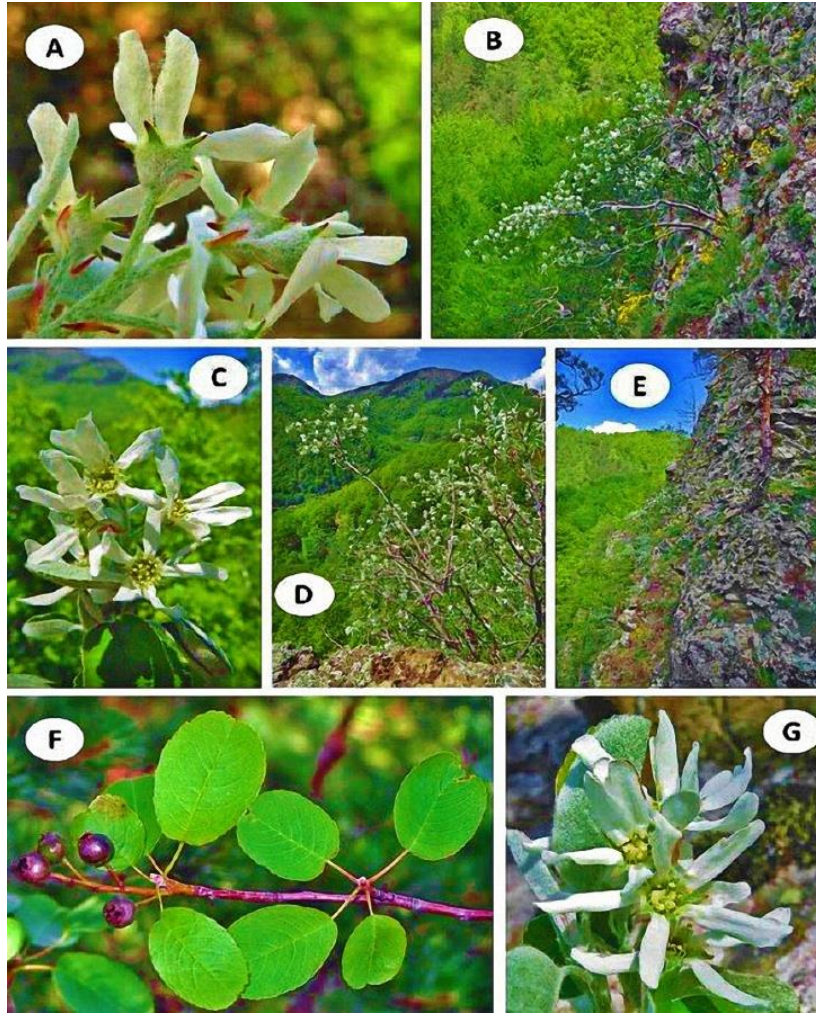
#### 2. Materyal ve Metot

Araştırma alanından toplanan *Amelanchier ovalis* Medik. çiçeklenme ayları olan Nisan ve Mayıs aylarında 2016’ da Sırçalı Kanyonu-KARABÜK’te ve çevresinden toplandı. Örnekler toplanırken her bir bitki örneğinin yumrulu kök,

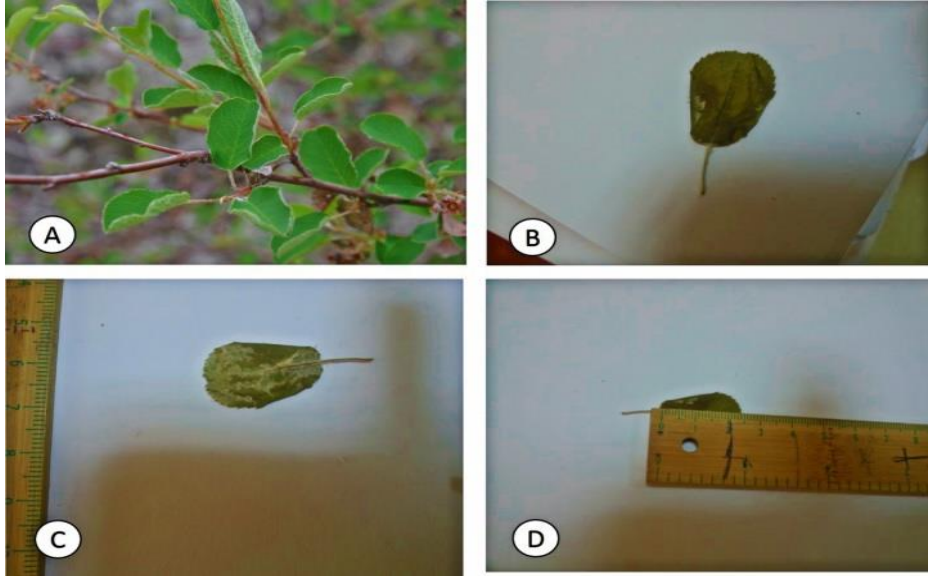
gövde, yaprak, ve çiçeğe sahip olmasına dikkat edildi. Toplanan örneklerin ölçümleri yapıldıktan sonra bir kısmı herbaryum kurallarına göre kurutularak herbaryum materyali haline getirildi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi herbaryumunda (OUEF) saklanmaktadır. *Amelanchier ovalis* Medik. tanımlanması için Türkiye Florası kullanılmıştır. Morfolojik incelemeler, arazi çalışması sırasında yapılan gözlemler, toplanan canlı örnekler, herbaryum örnekleri üzerinde yapıldı. Taze bitki örneklerinden bazıları morfolojik ölçümler için kullanılmış ve detaylı açıklamaları hazırlanmıştır. Türün koruma statüleri IUCN tehdit kategorilerine göre değerlendirildi (Ekim ve ark. 2000: IUCN 2001). Olympus CX31 ışık mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) Hitachi Regulus 8230 ile fotoğraflarla desteklenen türler için anatomik açıklamalar hazırlandı.

### 3. Bulgular ve Tartışma

*Amelanchier ovalis* Medik., K 41° 16' 41.6'', D 32° 46' 85.5'', 658 m yükseklikte, 06.05.2017 tarihinde toplanmıştır. *A. Ovalis* Medik., dik veya 3 m ye kadar boylanabilen çalimsı küçük ağaçlardır (Şekil 4). Yapraklar obovate tan oblong a doğrudur, 2-5 x 1.5-3 cm, genellikle uçları küt ya da sivridir (Şekil 5). Yapraklar ilk olarak lanat tüylü, daha sonra her iki yüzeyide tüysüzleşir. Çiçek sapı 1-2 cm dir. Çiçek salkımları dik, 2-8 çiçekli ve lanattır. Çiçekler 25-30 mm çapındadır. Kaliks ilk olarak lanat tüylü sonra tüysüzleşmektedir. Sepaller mızraksıdır. Petaller 10-16 mm dir. Altaki çiçeklerde çiçek sapı 2 cm ye kadardır (Şekil 4). Meyveleri 4-10 hücreli, olgunlaşmadan önce yeşil renkte, olgunlaşmaya doğru ise mavimsi veya siyahımsı renkte olmaktadır (Şekil 6). Tohum yapısı; globose, 6-8 mm çapında, genç iken kırmızı, olgunlaştığında ise mavimsi-siyah renkte olmaktadır (Şekil 7) (Ganeva ve Uzunova, 2010: Davis, 1975).



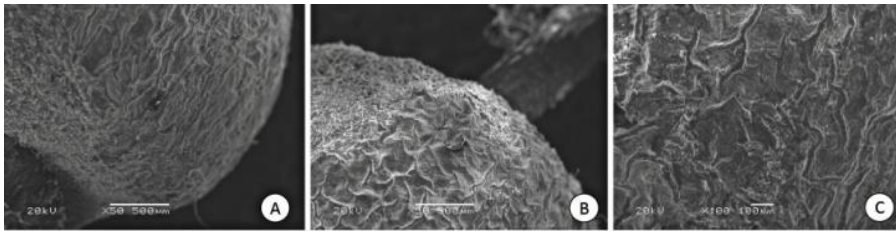
**Şekil 4.** *Amelanchier ovalis* Medik. : A, C, G – Çiçekler, B, D, E – Habitat , F – Meyveler (A. Bartók and A. Indreica tarafından orijinal fotoğraf çekilmiştir ).



**Şekil 5:** *Amelanchier ovalis* Medik. : A-Yaprak genel görünüşü, B, C, D- Yaprak herbarium görüntüsü (Sevda Türkş tarafından orjinal fotoğraf çekilmiştir).



**Şekil 6:** *Amelanchier ovalis* Medik. meyve görünümü



**Şekil 7:** *Amelanchier ovalis* Medik. tohum yapısı SEM görüntüsü

#### 4. Sonuç

Bu çalışma sonucunda Türkiye Florasındaki kareleme sistemine göre araştırma alanının yer aldığı A3 karesi için yeni bitki türü bulunmuştur (MLF, 1946: Koca ve Yıldırım, 2004: Mutlu ve Erik, 1999: Özen, 2016, Tunçkol ve Akkemik 2013: Moraldi ve Falcinelli, 2000). Böylece bu türün şu ana kadar bilinen yayılış alanı dışında yeni yayılış alanı belirlenmiş olmaktadır. A3 karesi için yeni kayıt durumunda olan bu tür endemik olmayıp, Doğu Akdeniz elementidir. Morfolojik açıdan yaprak şekli,

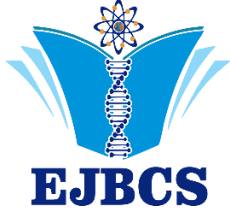
meyve ve tohum yapısı benzerlik göstermektedir. *Amelanchier ovalis* Medik. tohum yapısını incelemek için SEM görüntüsü ilk kez çekilmiş olup Türkiye florasında belirtilen özellikler haricinde yüzeyi girinti ve çıkıntılı ağsı bir yapıda olduğu bulunmuştur. *Amelanchier ovalis* Medik.'in verilmiş olan morfolojik bilgileri sistematığe katkısı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Teşekkür** Bu çalışmada Elektron Mikroskop görüntüleri ESOGÜ-ARUM da çekilmiştir.

#### KAYNAKLAR

- Akaydın G, Erik S 1996. A4 karesi (Ankara) için yeni floristik kayıtlar. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 12(12).
- Akıncı Ş, Özhatay E 2000. New Floristic Records for the Grid Square A3 (Kocaeli/Turkey). Turk J Bot, 24: 303-305,
- APG 2011. The Plant List, Available at: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/rjp-3425>.
- Davis PH 1975. Flora of Turkey and The East Aegean Islands 4, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z and Adıgüzel N 2000. Red Data of Turkish Plants. The Council of Protecting the Turkish Nature Press 18: 96.
- Ganeva T, Uzunova K 2010. Leaf epidermis structure in *Amelanchier ovalis* Medik. (Rosaceae). Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24(sup1): 36-38.
- IUCN 2001. IUCN Red List Categories: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Koca A, Yıldırım Ş 2004. New Floristic Records For A3 Square. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 33: 55-64.
- Moraldi M, Falcinelli F 2000. European amelanchier (*Amelanchier ovalis*). Sherwood-Foreste ed Alberi Oggi, 6(2): 33-38.
- MLF 1946. A Monograph of Amelanchier.





## The usage of discarded battery coals as electrodes and improving their hydrogen gas production performances by impregnation with Zr and Ce metal oxides

Sema Aslan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Muğla Sıtkı Koçman University, Science and Arts Faculty, Department of Chemistry, Muğla, Turkey

\*Corresponding author : semaaslan@mu.edu.tr  
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-9796-7311>

Received : 26/07/2019  
Accepted : 18/11/2019

**Abstract:** Hydrogen gas (H<sub>2(g)</sub>) production is one of the major topic of the industry and energy production fields, for the last decades. Especially it is popular with showing high energy density. Among the other industrial methods electrolysis is the cleanest one without any by product emissions. It has been very popular to recovery of the discarded materials (such as batteries) as an environmentally friendly equipments. Here the coal of a used up battery is utilized as an electrode in the electrolysis system in order to produce (H<sub>2(g)</sub>). Then these electrodes were modified with impregnation of Zr and Ce metal oxides. At first, HNO<sub>3(aq)</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> solutions were compared as electrolytes with plain electrodes and H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> is defined as the optimum electrolyte medium (maximum H<sub>2(g)</sub> production densities as 24.10x10<sup>-5</sup> mL sec<sup>-1</sup> and 87.22x10<sup>-5</sup> mL sec<sup>-1</sup>, charge densities as 1137.40x10<sup>-4</sup> C mm<sup>-2</sup> and 2976.19x10<sup>-4</sup> C mm<sup>-2</sup> and current densities as 45.68x10<sup>-7</sup> A mm<sup>-2</sup> and 165.34x10<sup>-7</sup> A mm<sup>-2</sup> for 0.10 M HNO<sub>3(aq)</sub> (pH 1.10) and H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> (pH 1.70) solutions respectively). Then all of these modified electrodes were utilized to the electrolysis system and compared in the case of H<sub>2(g)</sub> production yield, charge and current density values. The best performances were obtained from CeO<sub>2</sub> modified electrode (maximum H<sub>2(g)</sub> production density as 125.00x10<sup>-5</sup> mL sec<sup>-1</sup>, charge density as 4265.24x10<sup>-4</sup> C mm<sup>-2</sup> and current density as 236.96x10<sup>-7</sup> A mm<sup>-2</sup> in 0.10 M of H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> electrolyte). All of the experiments were duplicated. Hydrogen is one of the most promising, clean and sustainable energy carrier, that can be produced effectively by the usage of CeO<sub>2</sub> modified battery coal.

**Keywords:** Energy, Battery coal, Hydrogen gas production, Electrolysis, Cerium.

### *Atık pil kömürlerinin elektrot olarak kullanılması ve daha sonra Zr ve Ce metal oksitleriyle emprenye edilerek hidrojen gazı üretim performanslarının iyileştirilmesi*

**Özet:** Son yıllarda sektörün ve enerji üretim alanlarının ana konularından biri hidrojen gazı üretimidir. Özellikle yüksek miktarda enerji üretilebilmesi açısından hidrojen, yakıt olarak popülerleşmiştir. Elektroliz, zararlı gaz emisyonu oluşturmadığı için diğer endüstriyel yöntemler arasında en temiz olanıdır. Atılan malzemelerin (pil gibi) çevre dostu bir ekipman olarak geri kazanılması da oldukça rağbet gören başka bir alandır. Burada, kullanılmış bir pilin kömürü çıkartılarak, hidrojen gazı (H<sub>2(g)</sub>) üretmek için elektroliz sisteminde bir elektrot olarak kullanılmıştır. Daha sonra bu elektrotlar, Zr ve Ce metal oksitleri ile modifiye edilerek elektroliz performansları karşılaştırılmıştır. İlk başta yalın karbon elektrotlar kullanılarak, 0.10 M HNO<sub>3(aq)</sub> (pH 1.10) ve 0.10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> (pH 1.70) çözeltilerinin elektrolit olarak performansları karşılaştırılmıştır. Sonuçta 0.10 M HNO<sub>3(aq)</sub> ve 0.10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> çözeltilerinin sırasıyla elde edilen maksimum H<sub>2(g)</sub> üretim yoğunlukları 24.10x10<sup>-5</sup> mL s<sup>-1</sup> ve 87.22x10<sup>-5</sup> mL s<sup>-1</sup>, yük yoğunlukları 1137.40x10<sup>-4</sup> C mm<sup>-2</sup> ve 2976.19x10<sup>-4</sup> C mm<sup>-2</sup> ve akım yoğunlukları 45.68x10<sup>-7</sup> A mm<sup>-2</sup> ve 165.34 x10<sup>-7</sup> A mm<sup>-2</sup> olarak ölçülmüştür. Bu nedenle optimum elektrolit, olarak 0.10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> belirlenmiştir. Karbon elektrotlar Zr ve Ce metal oksitleriyle modifiye edilerek elektroliz sisteminde katot olarak kullanılmıştır. Tüm sonuçlar karşılaştırılarak en iyi performansların CeO<sub>2</sub> modifiye edilmiş elektrottan elde edildiği görülmüştür (maksimum H<sub>2(g)</sub> üretim yoğunluğu 125.00x10<sup>-5</sup> mL s<sup>-1</sup>, yük yoğunluğu 4265.24x10<sup>-4</sup> C mm<sup>-2</sup> ve akım yoğunluğu 236.96x10<sup>-7</sup> A mm<sup>-2</sup> 0.10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> elektrolit ortamında). Tüm ölçümler tekrarlanmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki CeO<sub>2</sub> modifiye pil kömürünün elektrot olarak kullanıldığı elektroliz sisteminde hidrojen gazı üretimi verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Elde edilen veriler sürdürülebilir ve temiz enerji eldesi üzerine yapılabilecek çalışmalar için ileri modifikasyonlar yapılarak geliştirilmeye açıktır.

**Anahtar Kelimeler:** Enerji, Atık pil kömürü, Hidrojen gazı üretimi, Elektroliz, Seryum

## 1. Introduction

Sustainable energy development requires innovative affords bearing clean energy solutions in it. An energy production method fails from the protocols that needs to explain itself in terms of biocompatibility and low cost demands. So the priority to achieve an acceptable clean energy production procedure has to include at least no hazardous gas emission. There has been many aspects to produce hydrogen gas ( $H_2$  (g)) such as coal gasification, oil/naphta reforming, electrolysis (Uğurlu et al. 2006, Sen et al. 2016) methane steam reforming, biomass, biological sources (Sivagurunathan et al. 2016; Mujeebu et al. 2016; Seyitoglu et al 2017).  $H_2$  (g) consumption performance of the industries are scened as fertilizers (Eren et al. 2010), petroleum refining processes (Erkarlsan et al. 2018), petrochemical (Karaoğlu et al. 2010), fuel cells (Karaoglu and Uğurlu 2011), and chemical industries (Züttel et al. 2004; Lim et al. 2015; Lee et al. 2017, Aslan et al. 2018). In electrolysis process, water molecule is the reactant and it is dissociated into hydrogen ( $H_2$ ) and oxygen ( $O_2$ ) by the help of external electricity (Kumar and Humabindu, 2019).

Billions of electrodes and fuel cell types were designed to produce energy from electrolysis and the main point of these studies point to the efficient yield achievement. The presented study stands on the efficient electrode development from discarded alkaline battery coals. Zr and Ce were used as the triggering catalyst metals. Previously they have been used on the electrode modifications as highly active hydrogen evolving catalysts by Demir et al. (2018), and in recent years, efforts to develop heterogeneous catalysts (Karaoğlu et al., 2012; Dinçer et al., 2016) have been accelerated and there are different types of catalyst utilizations (Karahana et al., 2016; Donmez et al., 2018; Gungor et al., 2018; Kara et al., 2018), photocatalysts (Uğurlu et al., 2006; Karaoğlu et al., 2010; Karaoğlu and Uğurlu, 2010). Finally, Zr and Ce used together to improve the catalytic performance reported by Polliotto et al. (2018).

The electrolyte type is also discussed. A suitable electrolyte is expected to be a tramendous charge carrier and nonpoisonous for the electrodes. Up to now several water electrolysis methods are developed and they can be classified in four types based on their electrolyte, operating conditions, and ionic agents ( $OH^-$ ,  $H^+$ ,  $O^{2-}$ ). Queved as (i) alkaline water electrolysis (Zeng and Zhang, 2010), (ii) solid oxide electrolysis (Ni et al. 2009), (iii) microbial electrolysis cells (Kadier et al. 2016) and (iv) proton exchange membrane using water electrolysis (Foteini et al. 2017). Alkaline electrolysis operates with aqueous solution (KOH/NaOH) as the electrolyte but asbestos diaphragm and nickel electrodes should be used (Kumar et al. 2017). Other types of electrolysis cells based on the transfer of electrons through the external circuit to cathode while the protons are passed through to cathode from the pores of proton conducting membrane (as electrolyte) (Rathinam et al. 2018) Acidic electrolytes have been used as being very conventional electrolytes. The most convinient one is the  $H_2SO_4$ (aq) (pH 1.70) but also  $HNO_3$ (aq) (pH 1.10) is used as an alternative solution (Lei et al. 2019).

$H_2$  (g) generation experiments were performed in a lab scale basic electrolysis equipment and  $H_2$  (g) charge and current generation densities of each system yields were evaluated. The results indicated that  $H_2SO_4$ (aq) (pH 1.70) is a better electrolyte than  $HNO_3$ (aq) (pH 1.10) and  $CeO_2$  modified discarded battery coal electrode ( $CeO_2/C$ ) showed the best fuel cell performances among plain coal electrode (C) and  $ZrO_2$  modified coal electrode ( $ZrO_2/C$ ). This study, offers a new sight into “environment for environmet” motto. Every single researcher can produce his own hydrogen gas with low voltage inputs and any harmful chemical release.

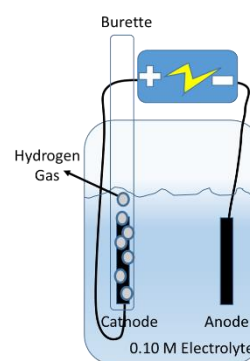
## 2. Materials and Method

### 2.1. Materials and chemicals

$H_2SO_4$ (aq) (99.80 % pure) (pH 1.70),  $HNO_3$  (aq) (99.80 % pure) (pH 1.10), ammonium cerium (IV) nitrate (99.00 % pure), zirconium IV butoxide (99.00 % pure), ethanol (99.00 % pure), from Sigma-Aldrich. Dicarded batteries were obtained from a recovery bin in the building.

### 2.2. Preperation of the solutions and impregnation processes of the electrodes

In order to prepare 0.10 M  $H_2SO_4$ (aq) (pH 1.70) and  $HNO_3$ (aq) (pH 1.10) solutions commercially available stock solutions were used. Required amounts of acids were diluted with deionized water and filled into the electrolysis cell. This solution is sucked into the burette that contains cathode electrode and the volume of hydrogen collected at the top of the burette was measured during the electrolysis was in progress. Scheme is shown below. The coal (C) inside of a discarded AA battery was used as anode or cathode electrode. Modification of the electrodes were achieved by the method as reported by Ghodsi et al. (2011). As it is reported (Ghodsi et al. 2011) the final products are the oxides of these metals. Since the same anions of the metals were achieved on the electrodes synergistic anion effect was prevented for the comparison of the electrode performances.  $CeO_2/C$  electrode was prepared as follows: precursor solution was prepared by dissolving  $Ce(NO_3)_6(NH_4)_2$  in 10 mL of ethanol and 5 mL of distilled water mixture. Bare C was sucked into this solution completely then stirred for 30 min. Subsequently calcinated for 5 hours at 500 C. Similarly  $ZrO_2/C$  was prepared by using zirconium IV butoxide precursor. Obtained electrodes utilized as cathode and C was used as anode for all experiments.



**Scheme 1.** Electrolysis set up. Anode is C electrode, cathode is adjusted according to the experiment as C,  $CeO_2/C$  or  $ZrO_2/C$ .

### 2.3. Electrolysis experiments

Electrolysis experiments were conducted with a beaker and burette at room conditions. Cathode electrode was stucked into the mouth of a 25 mL burette and electrolyte solution was sucked with a bulb into the burette. Anode was maintained as C for all experiments. Firstly dissociation potential measurements were recorded for all electrolysis experiments. After the minimum current was observed  $H_2$  (g) volume was recorded by running chronometer. Firstly  $H_2SO_{4(aq)}$  (pH 1.70) and  $HNO_{3(aq)}$  (pH 1.10) electrolytes were compared to each others with C electrodes, then modified electrodes were conducted as cathodes to the 0.10 M  $H_2SO_{4(aq)}$  (pH 1.70) filled cell. All of the results are given in the following section.

## 3. Results

### 3.1. Calculation of the total $H_2$ (g) produced by the systems, charge and current density values

In a typical electrolysis system the volume of the gases have to be determined in order to calculate the amount of charge, current and flow density values. Here the amount of the  $H_2$  (g) was measured as mL for each experiment set up individually. Then these values were used to calculate  $H_2$  (g) volume density by dividing into the cathode surface area ( $439.60 \text{ mm}^2$ ). Then readed volume of the  $H_2$  (g) was divided into the theoretical charge of the  $H_2$  (g) mL 0.12 then charge of the system was obtained. This data was used to calculate current of the system by dividing charge value into the time (second). Current and charge densities were calculated by division of these charge and current values into electrode surface area.

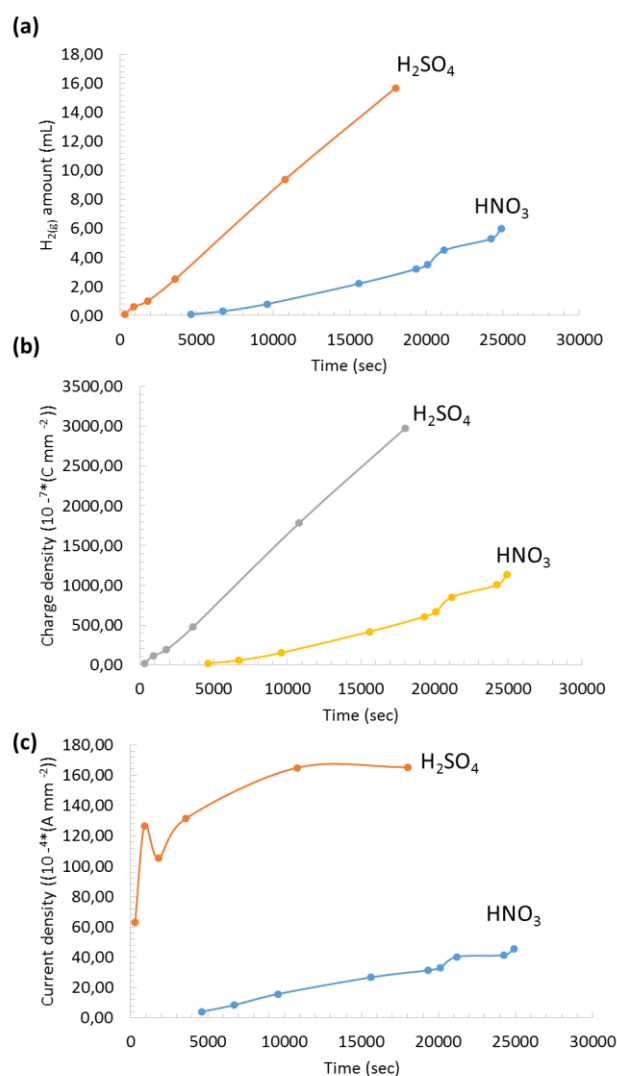
### 3.2. Comparison of the cell performances of $HNO_{3(aq)}$ and $H_2SO_{4(aq)}$ as electrolytes

At the beginning of the experiments two types of electrolytes were determined as model. Cell performances of the chosen electrolytes were examined with C cathode and anode electrodes.  $HNO_{3(aq)}$  (pH 1.10) and  $H_2SO_{4(aq)}$  (pH 1.70) were compared to each other in terms of dissociation potential,  $H_2$  (g) production (Fig. 1a), current density (Fig. 1b) and charge density (Fig. 1c) performances. An ideal electrolyte is expected to be an excellent charge carrier and has to lead the charge transfer duty well.  $H_2SO_{4(aq)}$  is very commonly used electrolyte but  $HNO_{3(aq)}$  is also a promising candidate with the high acidic constant near to the  $H_2SO_{4(aq)}$ . Results of the experiments showed that the dissociation potential value of the  $HNO_{3(aq)}$  was measured as 3.60 V whereas  $H_2SO_{4(aq)}$  has 3.20 V. This shows that cell potential of the  $H_2SO_{4(aq)}$  used electrolysis system is able to run easier than  $HNO_{3(aq)}$  in the presence of C electrodes. Additionally  $H_2$  (g) production, current and charge density values of  $H_2SO_{4(aq)}$  are higher than  $HNO_{3(aq)}$ . As result  $H_2SO_{4(aq)}$  was chosen as the electrolyte for subsequent experiments. Table 1 shows the comparison of the cell performance values including modified electrodes at the upcoming sections. This graphs also show that the measured cell performances of the  $H_2SO_{4(aq)}$  electrolyte is better than  $HNO_{3(aq)}$ .

**Table 1.** Comparison of the dissociation potential,  $H_2$  (g) production, current and charge density values of the different electrolysis cells.

Cell type	DP*	$H_2$ (g) PD**	CD§	CD£
C cathode/C anode in 0.10 M of $H_2SO_{4(aq)}$	3.2	87.22 $\times E^{-5}$	2976.19 $\times E^{-4}$	165.34 $\times E^{-7}$
C cathode/C anode in 0.10 M of $HNO_{3(aq)}$	3.6	24.10 $\times E^{-5}$	1137.40 $\times E^{-4}$	45.68x $E^{-7}$
ZrO <sub>2</sub> /C cathode/C anode in 0.10 M of $H_2SO_{4(aq)}$	2.8	94.44 $\times E^{-5}$	3222.63 $\times E^{-4}$	179.03 $\times E^{-7}$
CeO <sub>2</sub> /C cathode/C anode in 0.10M of $H_2SO_{4(aq)}$	2.3	125.0 $\times E^{-5}$	4265.24 $\times E^{-4}$	236.96 $\times E^{-7}$

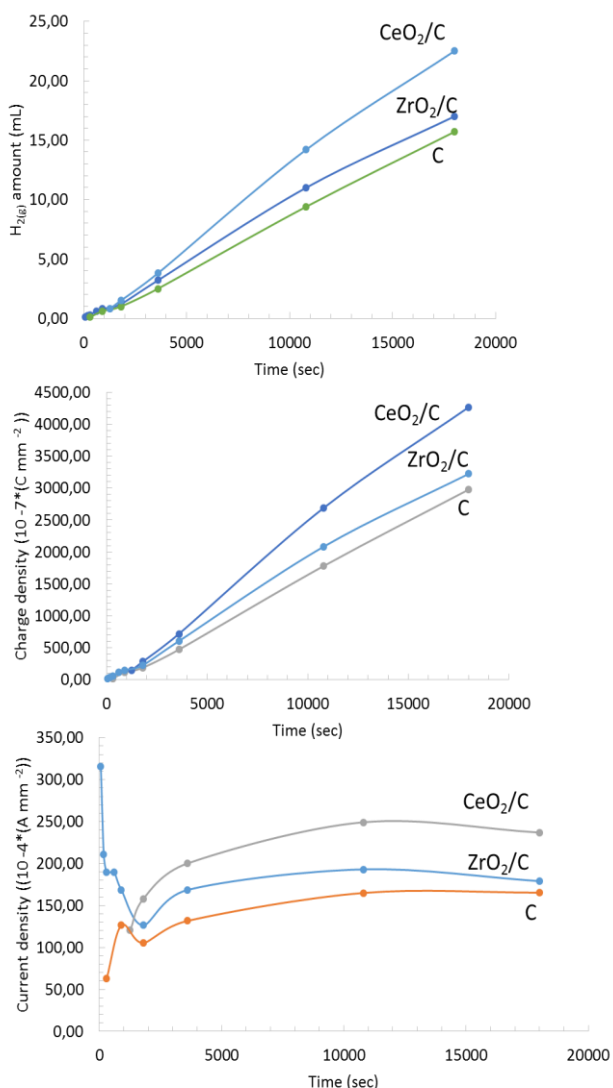
\* Dissociation potential (V); \*\*  $H_2$  (g) production density (mL sec<sup>-1</sup>); § Charge density (C mm<sup>-2</sup>); £ Current density (A mm<sup>-2</sup>)



**Figure 1.** Comparison of the cell performances of two different electrolytes. **a)**  $H_2$  (g) production performances, **b)** current density curves, **c)** charge density graphics of the 0.10 M  $H_2SO_{4(aq)}$  (pH 1.70) and  $HNO_{3(aq)}$  (pH 1.10) electrolytes respectively. All of the measurements were recorded with plain carbon electrodes as anode and cathode, at 21 °C, atmospheric pressure and electrolyte solutions were prepared with distilled water.

### 3.3. Comparison of the cell performances of C, ZrO<sub>2</sub>/C and CeO<sub>2</sub>/C cathodes

All of the electrolysis experiments were carried out in 0.10 M of H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> (pH 1.70) electrolyte at room conditions. After the modification of electrodes they were utilized as cathodes where C electrode was anode. First of all dissociation voltages of the electrodes were compared. As the data revealed that CeO<sub>2</sub> modified electrode showed the lowest dissociation voltage that means the electrolysis process initiates the easiest by using CeO<sub>2</sub>/C electrode among all. That explains the charge transfer efficiency is triggered by the Ce ions on C electrode. Also the other parameters are supporting this idea as being at maximum levels for CeO<sub>2</sub>/C electrode. All of the maximum density values presented after 300 sec. measurement for all of the cathode types. Figure 2 shows the comparison of the H<sub>2(g)</sub> production, current and charge density value plots of the C, ZrO<sub>2</sub>/C and CeO<sub>2</sub>/C cathodes vs. C anodes 0.10 M of H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> (pH 1.70) electrolyte containing electrolysis cells.



**Figure 2.** H<sub>2(g)</sub> production, current and charge density value plots of the C, ZrO<sub>2</sub>/C and CeO<sub>2</sub>/C cathodes vs. C anodes 0.10 M of H<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub> (pH 1.70) electrolyte containing electrolysis cells.

### 3.4. Evaluation of the electrolysis performance of electrodes

This results exhibits the higher H<sub>2(g)</sub> production volumes and cell performances can be achieved by the electrode modification such as CeO<sub>2</sub> and the group elements. Priority of the fuel cells generation of the high energy outputs but if the point is generation and the storage of the H<sub>2(g)</sub> production performance of the cathode comes forward. It pushes the researcher to find new ways to modify electrode so with these current and charge density values system exhibits promising power outputs. Until now different types of the cells were reported in their specialized measurement parameters but it is clear that solid oxide cells are gaining huge attention (Ni et al. 2009). Proton exchange membrane (PEM) of an electrolysis cell is our next step and these electrodes will be adapted to the PEM body and measurements will be conducted as well.

## 4. Conclusions

Waste management of the batteries “in terms of coals” recovery and development of these wastes are discussed here successfully. This is a good attempt to obtain energy from wastes in a lab scale set up. Production yields of the electrodes can be improved by the choice of the suitable electrolyte, may the alkaline medium can be preferred also more useful cell type can be selected as solid or PEM electrodes can be used in the future experiments. Hydrogen storage experiments are also upcoming subject of this research.

## Acknowledgements

Prof.Dr. M. Hamdi KARAOGLU is greatly acknowledged for their very valuable scientific mentorship.

“This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors”

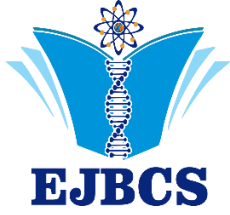
## Conflict of interest disclosure:

There is no conflict of interest.

## References

- Demir E, Akbayrak S, Önal AM, Özkar S 2018. Titania, zirconia and hafnia supported ruthenium(0) nanoparticles: Highly active hydrogen evolution catalysts. *J Colloid Interf Sci* 531: 570-577.
- Ghods FE, Tepehan FZ, Tepehan GG 2011. Derivation of the optical constants of spin coated CeO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> thin films prepared by sol-gel route. *J Phys Chem Solids* 72: 761-767.
- Kadier A, Simayi Y, Abdeshahian P, Azman NF, Chandrasekhar K, Kalil S 2016. A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Eng J* 55: 427-443.
- Kaseem M, Ko YG 2018. A novel composite system composed of zirconia and LDHs film grown on plasma electrolysis coating: Toward a stable smart coating. *Ultrason Sonochem* 49: 316-324.
- Kumar SS, Ramakrishna SUB, Reddy DS, Bhagawan D, Himabindu V 2017. Synthesis of Polysulfone and zirconium

- oxide coated asbestos composite separators for alkaline water electrolysis. *Int J Chemical Eng & Process Tech* 3: 1035/1-6.
- Lee B, Chae H, Choi NH, Moon C, Moon S, Lim H 2017. Economic evaluation with sensitivity and profitability analysis for hydrogen production from water electrolysis in Korea. *Int J Hydrogen Energy* 42: 6462–6471.
- Lei Q, Wang B, Wang P, Liu S 2019. Hydrogen generation with acid/alkaline amphoteric water electrolysis. *J Energy Chem* 38: 162-169.
- Lim H 2015. Hydrogen selectivity and permeance effect on the water gas shift reaction (WGS) in a membrane reactor. *Korean J Chem Eng* 32: 1522–1527.
- Mujeebu MA 2016. Hydrogen and syngas production by superadiabatic combustion-A review. *Appl Energy* 173: 210-224.
- Ni M, Leung MKH, Leung DYC 2008. Technological development of hydrogen production by solid oxide electrolyzer cell (SOEC). *Int J Hydrogen Energy* 33: 2337–2354.
- Polliotto V, Albanese E, Livraghi S, Agnoli S, Pacchioni G, Giamello E 2018. Structural, electronic and photochemical properties of cerium-doped zirconium titanate. *Catal Today* (In press, corrected proof, Available online 14 October 2018)
- Rathinam NK, Sani RK, Salem D, Rewiring Extremophilic Electrocatalytic Processes for Production of Biofuels and Value-Added Compounds from Lignocellulosic Biomass. In: R. Sani, N. Krishnaraj Rathinam (eds), *Extremophilic Microbial Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Biofuels, Value-Added Products, and Usable Power*. Springer, Cham. 2018, pp. 229-245.
- Sapountzi MF, Gracia MJ, Weststrate CJKJ, Hans OA, Niemantsverdriet, JWH 2017. Electrocatalysts for the generation of hydrogen, oxygen and synthesis gas. *Prog Energy Combust Sci* 58: 1–35.
- Seyitoglu SS, Dincer I, Kilicarslan A 2017. Energy and exergy analyses of hydrogen production by coal gasification. *Int J Hydrogen Energy* 42: 2592–600.
- Sivagurunathan P, Kumar G, Kim SH, Kobayashi T, Xu KQ, Guo W 2016. Enhancement strategies for hydrogen production from wastewater: a review. *Curr Org Chem* 20: 2744-2752.
- Wang J, Wang T, Yu L, Wei T, Hu X, Ye Z, Wang Z, Buckley CE, Yao J, Marnellos GE, Dong D 2019. Catalytic CeO<sub>2</sub> washcoat over microchanneled supporting cathodes of solid oxide electrolysis cells for efficient and stable CO<sub>2</sub> reduction. *J Power Sources* 412: 344-349.
- Zeng K, Zhang D 2010. Recent progress in alkaline water electrolysis for hydrogen production and applications. *Prog Energy Combust Sci* 36: 307–26.
- Züttel A 2004. Hydrogen storage methods. *Naturwissenschaften* 91: 157–172.
- Aslan S, Aka N, Karaoğlu MH 2019. NaOH impregnated sepiolite based heterogeneous catalyst and its utilization for the production of biodiesel from canola oil. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, And Environmental Effects* 41:290–297.
- Dinçer F, Karaoğlu MH, Uğurlu M, Vaizoğullar A 2016. Ozonation of Reactive Orange 122 Using La<sup>3+</sup>-Doped WO<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>/Sep Photocatalyst. *Ozone: Science and Engineering* 38 (4):291-301.
- Donmez A, Coban MB, Kara H 2018. Cyan-Blue Luminescence and Antiferromagnetic Coupling of CN-Bridged Tetranuclear Complex Based on Manganese(III) Schiff Base and Hexacyanoferrate(III). *Journal of Cluster Science* 29 (6):951-958.
- Eren E, Cubuk O, Ciftci H, Eren B, Caglar B 2010. Adsorption of basic dye from aqueous solutions by modified sepiolite: Equilibrium, kinetics and thermodynamics study. *Desalination* 252:88–96.
- Erkarlan U, Donmez A, Kara H, Aygun M, Coban MB 2018. Synthesis, Structure and Photoluminescence Performance of a New Er<sup>3+</sup>-Cluster-Based 2D Coordination Polymer. *Journal of Cluster Science* 29 (6): 1177-1183.
- Gungor E, Coban MB, Kara H 2018. Photoluminescence and Magnetism Study of Blue Light Emitting the Oxygen-Bridged Open-Cubane Cobalt(II) Cluster. *Journal of Cluster Science* 29 (6): 967-974.
- Kara DA, Donmez A, Kara H, Burak Coban M 2018. Structural and spectroscopic characterization of a new luminescent NiII complex: Bis{2,4-dichloro-6-[(2-hydroxypropyl)iminomethyl]phenolato-κ<sup>3</sup>O,N,O'}nickel(II). *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry* 74 (8): 901-906.
- Karahan A, Kurtaran R, Yahsi Y, Gungor E, Kara H 2016. A dinuclear oxygen-bridged Schiff base iron(III) complex derived from N,N'-bis(4-methoxy-2-hydroxybenzylidene)-2,2-dimethylpropane-1,3-diamine. *Journal of Structural Chemistry* 57 (4): 731-736.
- Karaoğlu MH, Doğan M, Alkan M 2010. Removal of reactive blue 221 by kaolinite from aqueous solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 49 (4): 1534-1540.
- Karaoğlu MH, Doğan M, Alkan M, Uğurlu M 2012. Photooxidative degradation of cationic dyes using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> process. *Fresenius Environmental Bulletin* 21 (7): 1758-1763.
- Karaoğlu MH, Uğurlu M 2010. Kinetic and equilibrium studies of methylene blue biosorption by vineyard pruning waste. *Fresenius Environmental Bulletin* 19 (12): 3199-3208.
- Karaoglu MH, Ugurlu M, 2011. Adsorption and recovery of methylene blue from aqueous solution by NaOH-treated of prina. *Asian Journal of Chemistry* 23 (6): 2577-2583.
- Sen I, Kara H, Azizoglu A 2016. Substituent effects on hydrogen bonding of aromatic amide-carboxylate. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 167 (5): 50-58.
- Uğurlu M, Karaoğlu MH, Kula I 2006. Experimental investigation of chemical oxygen demand, lignin and phenol removal from paper mill effluents using three-phase three-dimensional electrode reactor. *Polish Journal of Environmental Studies* 15 (4): 647-654.



## Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: [www.dergipark.org.tr/ejbcsc](http://www.dergipark.org.tr/ejbcsc)



### The Effect of Repeated Doses of Ketamine on Hematological Parameters in Rats

Ufuk MERCAN YÜCEL<sup>1\*</sup>, Leyla MİS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Van Yüzüncü Yıl, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Van, TURKEY  
<sup>2</sup>University of Van Yüzüncü Yıl, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Van, TURKEY

\*Corresponding author : [umercan@yyu.edu.tr](mailto:umercan@yyu.edu.tr)  
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-8256-7868>

Received : 01/08/2019  
Accepted : 18/11/2019

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of repeated doses of ketamine on hematological parameters in rats. Ketamine, general and rapid-acting phencyclidine derivative, is a dissociative anesthetic. Ketamine, which is usually used in laboratory animals in combination with xylazine, can be used alone for short-term anesthesia in rats. General anesthesia applications repeated several times a day or on different days in animal experiments are used in pharmacokinetic studies where blood or other samples are required, in surgical procedures or drug applications on different days under anesthesia, in treatment applications such as painful wound care, regular dental care. In this study, 20 adult male Wistar albino rats, weighing between 180-230 g were used. Rats were divided into two groups as 10 rats in each group. The rats in the ketamine group received intraperitoneal injection of 10% Ketamine HCl at a dose of 50 mg/kg every other day for 12 days. The control group received 0.2 ml saline intraperitoneally at the same time. At the end of the study, 2 ml blood obtained by intracardiac route was placed in K<sub>3</sub>EDTA tubes. Hematological parameters include total leukocyte (WBC), erythrocyte (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH), erythrocyte distribution width (RDW), lymphocyte (LYM), monocyte (MON), neutrophil (NEU), lymphocyte%, monocyte%, neutrophil% levels were measured with autoanalyzer device. According to the results, ketamine has statistically decreased only lymphocyte count (p <0.05). In conclusion, ketamine caused changes in the lymphocyte values according to the control group; however, since these changes were within the range of reference values reported for rats, it was concluded that ketamine can be used safely in laboratory animals. Investigation of the effect of the anesthetic agents on blood parameters in laboratory animals is important in terms of the reliability of experimental studies.

**Keywords:** Ketamine, Rat, Hematological parameters

#### *Tekrarlanarak Uygulanan Ketaminin Sıçanlarda Hematolojik Parametreleri Üzerine Etkisi*

**Özet:** Bu çalışmanın amacı tekrarlanan dozlarda uygulanan ketaminin sıçanlarda hematolojik parametreler üzerine etkisini incelemektir. Ketamin, genel ve çabuk etkili fensiklidin türevi dissosiyatif bir anesteziktir. Genellikle laboratuvar hayvanlarında ksilazin ile birlikte kullanılan ketamin, sıçanlarda kısa süreli anestezi için tek başına kullanılabilir. Hayvan deneylerinde günde birkaç kez veya farklı günlerde tekrarlanan genel anestezi uygulamaları; kanın veya başka numunelerin gerekli olduğu farmakokinetik çalışmalarda, anestezi altında farklı günlerde cerrahi prosedürlerin veya ilaç uygulamalarının yapıldığı çalışmalarda, ağrılı yara bakımı, düzenli diş bakımı gibi tedavi uygulamalarında başvurulan bir yöntemdir. Bu çalışmada Wistar-Albino ırkı 180-230 gram ağırlığında, aynı yaş grubu, 20 adet ergin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar her grupta 10 adet sıçan olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Ketamin grubundaki sıçanlara 12 gün boyunca gün aşırı 50 mg/kg dozunda %10 Ketamin HCl intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise eş zamanlı olarak intraperitoneal yolla 0,2 ml serum fizyolojik uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda intrakardiyak yolla elde edilen kanlar EDTA'lı tüplere konulmuştur. Hematolojik parametrelerden Tam kanda total lökosit (WBC), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), ortalama Alyuvar Hacmi (MCV), ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), ortalama alyuvar hemoglobini (MCH), eritrosit dağılım genişliği (RDW) ve lenfosit (LYM), monosit (MON), nötrofil (NEU), lenfosit %, monosit %, nötrofil % düzeyleri otoanalizör cihazında belirlenmiştir. Hematolojik olarak sadece LYM değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05). Elde edilen bulgulara göre ketamin istatistiksel olarak sadece lenfosit sayısında düşüşe neden olmuştur. Ancak bütün ölçüm değerlerinin referans aralıklar içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, ketamin anestezi protokolünün lenfosit değerlerinde kontrol grubuna göre değişikliklere yol açtığı; ancak, bu değişikliklerin sıçanlar için bildirilen referans değerler aralığında olması nedeniyle, ketaminin laboratuvar hayvanlarında güvenle kullanılacağı sonucuna ulaşılmıştır. Laboratuvar hayvanlarında anestezi maddenin kan parametrelerine etkisinin araştırılması, yapılacak deneysel çalışmaların güvenilirliği açısından önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Ketamin, Sıçan, Hematolojik parametreler

## 1. Introduction

Anesthesia is a reversible and controllable condition where the perception of pain and other stimulants in the central nervous system is prevented. Anesthesia is used for anatomy-physiology demonstrations, experimental injection, rectal drug/substance applications and surgical interventions. The aim of anesthesia is to reduce the fear of the experimental animal, to prevent pain related to the interference, to provide safe and comfortable interventions to the experiment, to protect the researcher (Flecknell, 1996; Tremoleda et al., 2012). Interventions in laboratory animals used in experimental studies should not affect the result of the experiment due to pain or anxiety, and for the scientific and ethical reasons, the use of appropriate anesthetics, analgesics or tranquilizing agents should be used (Carbone and Austin, 2016).

Rats are the most preferred animals for experimental use among all laboratory animals. All physiological events in humans and other vertebrate animals can be easily studied in rats that provide excellent experimental working conditions in laboratory conditions (Flecknell, 1996). Rodents can be anesthetized with either inhalant gas or injectable drugs. Criteria of choice are the ethical use of animals, safety for the animals and personnel, cost and equipment available in the laboratory setting as well as the impact of these compounds or techniques on blood parameters (Tremoleda et al., 2012)

Ketamine, general and rapid-acting phencyclidine derivative, is a dissociative anesthetic. It was synthesized in 1962 by Calvin Stevens. It was first used in the clinic in 1965. It was released in 1970 for clinical use (Liu et al., 2016). Ketamine is the only anesthetic with analgesic, hypnotic and amnesic effects and, unlike other intravenous anesthetics, has no depressant effect. The analgesic effect of ketamine is strong and the narcotic effect is mild. It has the lowest hallucinogen potential in phencyclidine derivatives (Gao et al., 2016). Ketamine crosses the blood-brain barrier quickly because it has low molecular weight and high lipid solubility. The maximum effect occurs in about 1 min. Ketamine does not cause respiratory and cardiovascular depression complications that occur frequently during the use of other anesthetic agents and provides good anesthesia. The duration of action is dose-dependent, but its effect is short-time due to its rapid dissipation from brain tissue to other tissues. Ketamine causes a cataleptic condition called central dissociative anesthesia in the central nervous system, in which communication with the patient cannot be established but the patient can be seen as awake, there are skeletal muscle movements and tonus independent of the painful stimulus, and the patient is under amnesic and deep analgesic effects. Patients have deep analgesia, eyes are open, protective reflexes (cornea, coughing, swallowing, retching) are active in ketamine anesthesia. Also, blood pressure and heart rate increase in this anesthesia (Lodge and Mercier, 2015; Gao et al., 2016; Jonkman et al., 2017).

Although its mechanism of action is not well understood, ketamine appears exerts complex pharmacological actions including inhibition of biogenic amine uptake, binding to

opioid receptors, and inhibition of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptors. Because of the involvement of spinal NMDA receptors in the process of central sensitization, this agent may reduce pain perception and induce sedation (Kohrs and Durieux, 1998).

Ketamine is used as a general anesthetic in all kinds of large and small operations in animals. It can be safely used alone in inspections for diagnosis, in the capture of wild animals and in situations requiring anesthesia. It is also used to create short-term anesthesia to facilitate intubation before anesthesia by inhalation. Ketamine, which is usually used in laboratory animals in combination with xylazine, can be used alone for short-term anesthesia in rats (Hall and Clarke, 1991; Stoelting, 1999).

General anesthesia applications repeated several times a day or on different days in animal experiments are used in pharmacokinetic studies where blood or other samples are required, in surgical procedures or drug applications on different days under anesthesia, in treatment applications such as painful wound care, regular dental care (Albrecht, 2014). Specifically, during experimental wound studies, experimental animals are exposed to anesthetics such as ketamine 3-5 times before biopsy from the wound to examine the wound healing stages. It is not clear how and in what time hematological functions are affected by anesthesia which is thought to temporarily suppress cognitive functions. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of repeated doses of ketamine on hematological parameters in rats.

## 2. Materials and Method

### 2.1. Drugs

Ketamine was obtained from Richter pharma ag, Austria (Ketasol® %10 flacon).

### 2.2. Animals

In this study, 20 adult male Wistar albino rats, weighing between 180-230 g were used. After the necessary permission was received (Protocol No: 2013/294) from Y.Y.Ü Animal Experiments Local Ethics Committee, animals obtained from Y.Y.Ü Experimental Medicine Research and Application Center were housed in rooms with 12 hours light - 12 hours dark lighting up, automatically adjusted temperature ( $22 \pm 2$  °C) and humidity (%45-50) again in the same place during experiment, and they were fed with city water supply and standard pellet diet (Van Feed Factory), food and water intake were made free.

### 2.3. Experimental design

20 male rats were divided into two groups, as 10 rats in each group. These groups were made up as follows, including one of them with the application of ketamine, and one of them as the control group. The rats in the ketamine group received an intraperitoneal injection of 10% Ketamine HCl at a dose of 50 mg/kg every other day for 12 days. The control group received 0.2 ml saline intraperitoneally at the same time. At the end of the study, rats were sacrificed under ketamine anesthesia. Blood samples obtained by intracardiac route were placed into EDTA capped bottles.

## 2.4. Hematological analysis

Hematological parameters include Total leukocyte (WBC), Erythrocyte (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Erythrocyte Distribution Width (RDW), lymphocyte (LYM), monocyte (MON), neutrophil (NEU), lymphocyte%, monocyte%, neutrophil%, levels were measured with autoanalyzer device (Abacus Junior Vet 5, Diatron, Hungary).

## 2.5. Statistical analysis

The statistical analysis of the data was carried out with the SPSS software 10.0 ( SPSS Inc., Chicago, IL, U SA). Paired t test were used to compare the hematologic parameters. Values obtained were expressed as mean  $\pm$  S.D. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

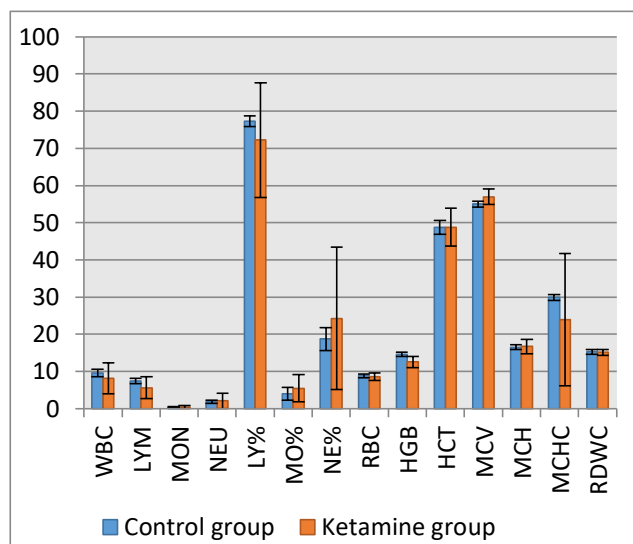
The results of hematological parameters obtained from the blood taken at the end of the study in the experimental groups are given in Table 1.

**Table 1.** Mean ( $\pm$ SEM) values of hematological parameters

Parameters	Control	Ketamine	P	Reference
WBC	9.58 $\pm$ 1.05	8.18 $\pm$ 4.11	0.187	2.1-19.5
LYM	7.40 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	5.59 $\pm$ 2.93 <sup>a</sup>	0.021	2-14.1
MON	0.37 $\pm$ 0.16	0.48 $\pm$ 0.43	0.402	0-0.98
NEU	1.81 $\pm$ 0.43	2.11 $\pm$ 2.07	0.543	0.1-5.4
LY%	77.30 $\pm$ 1.45	72.22 $\pm$ 15.40	0.206	55-97
MO%	3.95 $\pm$ 1.73	5.48 $\pm$ 3.65	0.221	0-5
NE%	18.72 $\pm$ 3.04	24.29 $\pm$ 19.11	0.105	2-31
RBC	8.84 $\pm$ 0.47	8.59 $\pm$ 1.04	0.461	5.3-10
HGB	14.60 $\pm$ 0.62	12.54 $\pm$ 1.47	0.218	14-18
HCT	48.80 $\pm$ 1.85	48.79 $\pm$ 5.07	0.993	35-52
MCV	55.00 $\pm$ 0.81	56.95 $\pm$ 2.05	0.077	50-62
MCH	16.52 $\pm$ 0.65	16.72 $\pm$ 1.95	0.714	16-23
MCHC	29.92 $\pm$ 0.76	23.92 $\pm$ 17.76	0.129	31-40
RDWC	15.27 $\pm$ 0.68	15.14 $\pm$ 0.82	0.741	-

Different letters in the same column indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

In this study, there were no significant differences between groups for hematological parameters. Only, ketamine statistically decreased lymphocyte count ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Hematological parameters

## 4. Discussion

Nowadays, it is required that anesthesia or analgesia be used during surgery in experimental animals because of the concerns regarding animal welfare. Therefore, it is important to understand how anesthesia affects the health conditions of experimental animals. Hematological parameters are important indices of the physiological and pathological status for both humans and animals (Adeneye et al., 2006).

We determined that there are no hematological changes in rats after ketamine administration in this study. But only, there is a decrease in lymphocyte counts according to the control group; however, this decrease was within the range of reference values for rats according to the autoanalyzer device. Çamkerten et al. (2013) reported that there were not significant differences between baseline and during anesthesia values of WBC, RBC, PLT, HCT and HGB of xylazine-ketamine anesthesia on Bozova greyhounds. Alsobayıl et al. (2018) evaluated the anesthetic effects on young hamadryas baboons (*Papio hamadryas*) of xylazine-ketamine compared to diazepam-ketamine. They observed no significant difference in complete blood count. Chauhan and Pandey (2006), determined that PCV, HGB, RBC and WBC count did not show any significant change in fentanyl-ketamine combinations in dogs. However, lymphocytosis with neutropenia was noticed. Some authors (Tobias and Schertel, 1992; Gülanber et al., 2001; Atalan et al., 2002) emphasised that there are no significant alterations in venous RBC, WBC, HCT and HGB values for the combination of ketamin and xylazine and this indicated good tissue perfusion during the anesthesia in dogs. Our finding is in agreement with the findings of these studies.



In another study with results contradictory to ours, Hashemnia et al. (2018) evaluated the effects of long-term administration of ketamine on some hematological in Sprague-Dawley rats. Ketamine caused an increase in the number of WBC as compared to the control group at the days of 0, 20, 40, and 60 post-injection. These differences between our study and this study may be due to the time of application and the breed of animal. Also, Lelovas et al. (2017) examined the effect of three different anaesthetic protocols (dexmedetomidine/ketamine intramuscularly (0.25 mg/kg and 50 mg/kg respectively), or isoflurane 0.2 ml on cotton inside a syringe case, or isoflurane administered by vaporiser (5% induction and 2-3% maintenance of anaesthesia, delivered in oxygen flow 1 L/min) on hematological and biochemical parameters of Wistar Albino rats. They stated that the different anesthetic protocols had no statistically significant effect on WBC, NEU, MON, EU, BA, and platelets, while their impact on RBC, HCT and HGB values was statistically significant ( $p < 0.05$ ). Demirkan et al. (2002) were reported that a decrease PCV count and an increase of WBC count in ketamine- xylazine anesthesia in the dog. Yohannes (2018) stated that after the administration of ketamine alone, and xylazine-ketamine combinations, HGB, WBC, RBC, LYM, MON were decreased non-significantly, but NEU was increased non-significantly in dogs.

## 5. Conclusions

In conclusion, ketamine caused changes in the lymphocyte values according to the control group; however, since these changes were within the range of reference values according to the autoanalyzer device, it was concluded that ketamine can be used safely in laboratory animals. Hematological indexes are very important parameters used in the evaluation of physiological conditions. Lymphocytes are involved in a variety of immunological functions, such as immuno-globulin production and modulation of immune defense (Campbell, 1996). There are many different reasons for the decrease in the number of lymphocytes in the blood. Nutritional deficiencies, stress, and prolonged fasting can lead to a decrease in lymphocyte count. Investigation of the effect of the anesthetic agent on blood parameters in laboratory animals is important in terms of the reliability of experimental studies.

## Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Authors' contributions:** UMY conceived of the study and contributed in design and organization of the manuscript. UMY and LM carried out experiments. UMY performed the data analysis. UMY did the manuscript writing and execute the data interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

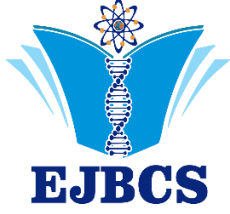
## Conflict of interest disclosure:

We have no conflict of interest with any people or organization.

## References

- Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, Bello SO 2006. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *J Ethnopharmacol* 105:374–379.
- Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B 2014. Influence of repeated anesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam, and fentanyl. *BMC Vet Res* 10: 310.
- Alsobayıl F, Sadan M, Al-Shoshan AA 2018. Comparison between the anesthetic effects of xylazine–ketamine and diazepam–ketamine: physiological and blood parameters in young hamadryas baboons (*Papio hamadryas*). *Turk J Vet Anim Sci* 42: 40-48.
- Atalan G, Demirkan İ, Güneş V, Cihan M, Celebi F, Cıtil M 2002. Comparison of Xylazine + Ketamine-HCl Anaesthetic Agents With Acepromazine + Butorphanol + Ketamine Combinations for Their Clinical and Cardiorespiratory Effects in Dogs. *J Vet Surg* 8 (3-4): 35-40.
- Carbone L, Austin J 2016. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PLoS One* 11(5): e0155001.
- Chauhan A and Pandey SK 2006. Haemato-Biochemical effects of epidural fentanyl-ketamine combinations in dogs. *J Bombay Vet Coll* 14(1-2): 96-99.
- Çamkerten İ, Şındak N, Özkurt G, İpek H, Biricik HS, Şahin T 2013. Effect of Ketamine-Xylazine Anesthesia on Some Hematological and Serum Biochemical Values of Bozova Greyhounds. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Harran* 2(1): 27-31.
- Demirkan İ, Atalan G, Gökçe Hİ, Ozaydın İ, Celebi F 2002. Comparative Study of Butorphanol-Ketamin HCl and Xylazine-Ketamin HCl Combinations for Their Clinical and Cardiovascular/Respiratory Effects in Healthy Dogs. *Turk J Vet Anim Sci* 26: 1073-1079.
- Flecknell P (1996). *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edn. London: Academic Press.
- Gao M, Rejaei D, Liu H 2016. Ketamine use in current clinical practice. *Acta Pharmacol Sin* 37: 865–872.
- Gülanber EG, Baştan A, Tasal I, Aktas M, Arıkan N 2001. General Anesthesia in dogs with midazolam and ketamine. *Acta Vet Eurasia* 27(2): 401-409.
- Hall LW, Clarke K 1991. Opioid analgesics. In: *Veterinary Anaesthesia*. Philadelphia, USA. Bailliere Tindall, 64-72, ISBN 0-70-20-1421-4.
- Hashemnia M, Javedani M, Nikoosafat Z, Abdoli Jamoor S 2018. Study of Hematological, Biochemical and Histopathological Changes Due to Long-Term Administration of Ketamine in Rat. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 17 (7): 639-56.
- Jonkman K, Dahan A, Donk TV, Aarts L, Niesters M, Velzen MV 2017. Ketamine for pain. F1000 Research, F1000 Faculty Rev-1711.
- Kohrs R, Durieux ME 1998. Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks. *Anesth Analg* 87(5):1186-1193.

- Lelovas P, Stasinopoulou M, Balafas E, Nikita M, Siskos N, Kostomitsopoulos N 2017. Valuation of three different anesthetic protocols on complete blood count and biochemical parameters on Wistar rats. *J Hell Vet Med Soc* 68(4):587-598.
- Liu Y, Lin D, Wu B, Zhou W 2016. Ketamine abuse potential and use disorder. *Brain Res Bul* 126:68-73.
- Lodge D, Mercier MS 2015. Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. *Br J Pharmacol* 172(17): 4254-4276.
- Stoelting RK 1999. Nonbarbiturate induction drugs. In: *Pharmacology and Physiology in Anaesthetic Practice*. Philadelphia, Lippencott, Raven, pp. 140-157.
- Tobias TA, Schertel ER 1992. Shock: concepts and managements. In: *Fluid Therapy in Small Animal Practice*. Ed. S.P. DiBartola. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 436-470.
- Tremoleda JL, Kerton A, Gsell W 2012. Anesthesia and physiological monitoring during *in vivo* imaging of laboratory rodents: considerations on experimental outcomes and animal welfare. *EJNMMI Res* 2: 44.
- Yohannes G 2018. Hematological and Physiological Effects of Ketamine with and without Xylazine in Dogs. *Int J cell Sci & mol biol* 5:555-654.



## Maternal Folik Asit Suplemantasyonunun Gebe Ratlarda Bozulmuş Glukoz Toleransına Etkisinin Değerlendirilmesi

Merve Şeyda Karaçil Ermumcu<sup>1\*</sup>, Nilüfer Acar Tek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gazi University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Ankara, Turkey

\*Corresponding author : merveseyda@gmail.com  
Orcid No: https://orcid.org/0000-0002-2023-8433

Received : 30/07/2019  
Accepted : 07/12/2019

**Özet:** Maternal dönemde folik asit suplemantasyonunun gebe ratlarda bozulmuş glukoz toleransına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışmada daha önce çiftleşmemiş 8-10 haftalık 12 wistar dişi rat çiftleştirilmiştir. Gebe kalan ratlar randomize bir şekilde kontrol (n:6) ve deney grubu (n:6) olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Ratlara folik asit içerikleri farklı olacak şekilde 2 ayrı beslenme protokolü uygulanmıştır. Gebelik boyunca kontrol grubuna insan gebelerde 400 mcg/gün değerine eşdeğer olan ve Amerikan Beslenme Enstitüsü'nün Kemirgen Diyetleri kapsamında gebelik süresince ratlara yönelik belirlenmiş olan AIN-93G formülasyonlu diyetteki folik asit miktarı referans alınarak 2 mg/kg folik asit içeren standart yem, deney grubu için insan gebelerde upper level (1000 mcg/gün) alım düzeyine denk gelen normal rat gereksinmesinin 2.5 katı olan 5 mg/kg folik asit içeren yemle gebelik boyunca ad libitum beslenmeleri sağlanmış ve su verilmiştir. Gebelik dönemi boyunca annelerin yem tüketimi ve vücut ağırlıkları takibi yapılmıştır. Gebeliğin 16. gününde ratlara oral glukoz tolerans testi uygulanmıştır. Gebelik süresince günlük ortalama besin tüketim miktarı kontrol grubunda 19,2±1,11 g iken deney grubunda 17,6±0.42 g olarak bulunmuştur (p<0.05). Deney grubunun folik asit alımları dışında enerji, makro ve mikro besin ögesi alımlarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır (p<0.05). Deney grubunun başlangıç, 15., 30., 60., 90. ve 120. dakikadaki kan glukoz değerleri kontrol grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır (p>0.05). Annelerin gebelik döneminde maruz kaldığı folik asit miktarı arttıkça glikoz intoleransı riski arttırmaktadır. Bu durum gebelerde gestasyonel diyabeti ve gebelik sonrasında ise tip 2 DM gelişme riskini arttırabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** gebe, folik asit, glukoz intoleransı

### *Evaluation of The Effect of Maternal Folic Acid Supplementation on Impaired Glucose Tolerance in Pregnant Rats*

**Abstract:** This study was planned to evaluate effect of folic acid supplementation on impaired glucose tolerance in pregnant rats. Wistar 8-10 weeks old female rats (n:12) were mated and were randomly divided into two groups: control (n:6) and experimental (n:6) group. Two different feeding protocols were administered during pregnancy. Control group were fed with standard diet containing 2 mg/kg folic acid in reference to the amount of folic acid in the diet of AIN-93G formulation, which is determined for rats by the Rodent Diets of American Nutrition Institute and which is equivalent to 400 mcg/day in pregnant women and experimental group were fed with containing 5 mg/kg folic acid which is 2.5 times the normal rats requirement corresponding to the upper level (1000 mcg/day) intake in pregnant womens during pregnancy. Body weight and food intake of mother rats were monitored during the gestation period. Oral glucose tolerance test was performed on the 16<sup>th</sup> day of pregnancy. The mean daily food consumption was 19.2±1.11 g in the control and 17.6±0.42 g in the experimental group during pregnancy (p<0.05). Apart from the folic acid intake of the experimental group, energy, macro and micro nutrients intakes were significantly lower than the control group (p<0.05). Blood glucose values of the experimental group at the beginning, 0<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup>, and 120<sup>th</sup> minutes were higher than the control group (p>0.05). As the amount of folic acid exposed to mothers during pregnancy increases, the risk of glucose intolerance increases. This may increase gestational diabetes during pregnancy and increase the risk of type 2 DM after pregnancy.

**Keywords:** pregnancy, folic acid, glucose intolerance

## 1. Giriş

Gebelik süresi boyunca fetüsün büyüme ve gelişmesi için gerekli olan besin ögesi gereksinimleri anneden sağlanmakta olup maternal beslenme fetal sağlığı etkilemektedir (Mahan ve Raymond 2016). Konsepsiyon dönemden doğuma kadar maternal fizyolojide belirgin değişiklikler görülmektedir. Gebelik boyunca fetüsün büyüme ve gelişiminin hızlı olmasından dolayı gebenin artan enerji, mikro ve makro besin ögesi gereksinimlerinin karşılanması önem kazanmaktadır (Kaiser ve Campbell 2014). Gebelik döneminde günlük enerji gereksinimindeki artışla beraber B grubu vitaminleri ve özellikle folata olan gereksinim artmaktadır (Samur 2015).

Optimal maternal serum folat düzeyinin, fetüs sağlığı ve nöral tüp defektinden (NTD) koruyucu rolünden dolayı, prekonsepsiyonel ve gebelik döneminde folik asit desteği önerileri önem kazanmıştır (Krishnaveni et al. 2014). Gebelik döneminde artan folat gereksiniminin besinlerle karşılanması mümkün olmadığından, gebelerde folik asit desteği tüm dünyada önerilmektedir (Rabiu et al. 2012, Al-Darzi et al. 2014, Alebous et al. 2014). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization: WHO) 1968 yılında profilaktik olarak gebelik boyunca folik asit alımını önermekte olup 1998 yılından bu yana önerilen ek folik asit desteğinin miktarı 400 mcg/gün olarak belirlemiştir (Procter and Campbell 2014). Ülkemizde de WHO önerileri doğrultusunda doğurganlık çağındaki tüm kadınların prekonsepsiyonel dönemden başlayarak gebeliğin ilk üç ayı boyunca besin kaynaklarına ek olarak 400 mcg folik asit desteği verilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Mahan and Raymond 2016). Ancak profilaktik olarak verilen bu miktar bazı durumlarda artırılmalıdır. Özellikle geçmişinde NTD öyküsü olanlarda 5 mg kadar folik asit verilmektedir (Czeizel et al. 2013). Fakat bazı ülkelerde bu riskin olup olmadığına bakılmaksızın yüksek miktarlarda folik asit desteği uygulanabilmektedir. Örneğin; Hindistan'da tüm gebelere 500 mcg folik asit desteği uygulanmakta iken pek çok hekim tarafından NTD'yi önlemek amacıyla rutin olarak gebeliğin erken döneminde yüksek dozda (5 mg/gün) folik asit desteğinin uygulandığı belirtilmektedir. Ayrıca gebe kadınların çoğunun gebeliğinin on ikinci haftasından sonrada; yani nöral tüp defekti riskinin ortadan kalkmış olmasına rağmen folik asit kullanmaya devam ettiği bildirilmiştir (Yajnik et al. 2008).

Düşük maternal folat düzeyinin fetal sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin yanında yüksek maternal folat seviyelerinin ve artmış folik asit alımının olumsuz sağlık sonuçlarıyla ilgili endişeler dikkat çekmektedir. Son dönemde araştırmalar, maternal dönemde maruz kalınan yüksek miktarlardaki folik asitin gebe için olası olumsuz sağlık etkilerini araştırmaya odaklanmaktadır (Morakinyo et al. 2019, Yang et al. 2017, Huang et al. 2014). İnsan ve hayvan çalışmalarının bazılarında yüksek maternal folat düzeyleri ve maternal dönemde artmış folik asit desteğinin gebelerde gestasyonel diyabetle ilişkisi gösterilmiş olmakla beraber henüz bu ilişkinin mekanizması belirlenebilmiş değildir. Ancak olası mekanizmalar üzerinde çalışılmaktadır (Hu et al. 2019, Lai et al. 2018, Yang et al. 2017, Keating et al. 2015, Huang et al. 2014, Krishnaveni et

al. 2014, Yajnik et al. 2008). Bu çalışma maternal dönemde folik asit suplementasyonunun gebe ratlarda bozulmuş glukoz toleransına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan Wistar türü dişi ratlar, Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmaya 8-10 haftalık daha önce çiftleşmemiş aynı soydan gelen dişi ratlar dahil edilmiştir. Teslim alınan ratlar 0.1 grama duyarlı hassas terazi ile ölçülerek kafeslerine yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığı 21±2 C, bağıl nemi % 35-40, kafes içi ışık şiddeti 40 lüks, ışık periyodu 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık, gürültü düzeyi 85 dB'in altında kalacak şekilde kontrollü ve hava değişimini 10-16/saat olacak şekilde sağlayabilen havalandırma sisteminin mevcut olduğu bir ortamda barındırılmıştır. Dişi ratlar (12 rat) iki haftalık alışma sürecinden sonra çiftleştirilmiştir. Çiftleştirme işlemi için 10 adet Wistar türü erkek rat kullanılmıştır. Vajinal plak gözlenen dişi ratlarda çiftleşmenin gerçekleştiği kabul edilmiş ve gebeliğin sıfırıncı günü olarak alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen ratlara diyet müdahalesinin öncesinde, iki hafta boyunca aynı içme suyu ve standart laboratuvar yemi ad libitum olarak verilmiştir. Gebe kalan ratlar randomize bir şekilde kontrol ve deney grubu olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Kontrol ve deney grubundaki tüm gebe ratların diyet müdahalesinin yapıldığı süre boyunca ad libitum beslenmeleri sağlanmıştır. Ratlara folik asit içerikleri farklı olacak şekilde iki ayrı beslenme protokolü uygulanmıştır. Gebelik boyunca kontrol grubuna insan gebelerde 400 mcg/gün değerine eşdeğer olan ve Amerikan Beslenme Enstitüsü'nün Kemirgen Diyetleri kapsamında gebelik ve laktasyon süresince ratlara yönelik belirlenmiş olan AIN-93G formülasyonlu diyetteki folik asit miktarı referans alınarak 2 mg/kg folik asit içeren standart yem, deney grubuna ise insan gebelerde (tolere edilebilir üst düzey) upper level (1000 mcg/gün) alım düzeyine denk gelen normal rat gereksiniminin 2.5 katı olan 5 mg/kg folik asit içeren yemle gebelik boyunca ad libitum beslenmeleri sağlanmış ve su verilmiştir. Gebelik dönemi boyunca anne ratların hafta içi her gün aynı saatte (16.00-17:30) yem tüketimi ve vücut ağırlıkları 0,1 grama duyarlı mutfak terazisiyle ölçülmüştür. Gebeliğin 16. gününde (Bonaventura et al. 2017) ratlara 16 saatlik açlık sonrasında gavaj yoluyla 2 g glukoz/kg vücut ağırlığı verilmiş oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulanmıştır (Ghezzi et al. 2012). 0, 15, 30, 60, 90, ve 120. dakikalarda kuyruk venden kan alınarak glukometre aracılığıyla kan glukoz düzeylerine bakılmıştır.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulu tarafından 15.01.2018 tarihinde G.Ü.ET-18002 kayıt numaralı araştırma projesi olarak onaylanmıştır. Çalışmanın tüm aşamalarında Gazi Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulu esaslarına uygun çalışılmıştır. Araştırmanın bütçesi Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'nden karşılanmıştır (Proje Kod No: 47/2018-02).

### 3. Bulgular

Araştırmada kullanılan maternal ratlara ilişkin ortalama gebeliğe başlangıç ağırlığı, gebelik süresince toplam ağırlık kazanımı ve batın sayısı Tablo 1’de gösterilmiştir. Gebeliğe başlangıç ağırlıkları açısından kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Gebelik süresince toplam ağırlık kazanımı deney grubunda daha düşük bulunmuştur ( $p>0.05$ ) ancak bu fark istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Batın sayısı ortalaması kontrol grubunda  $10,5\pm 1,64$  ve deney grubunda ise  $9,0\pm 3,74$  olup, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 1.** Maternal özelliklerin değerlendirilmesi

Maternal özellikler	Kontrol	Deney	p
	$\bar{x}\pm SS$	$\bar{x}\pm SS$	
Gebeliğe başlangıç ağırlığı (g)	209,1 $\pm$ 5,41	207,2 $\pm$ 4,87	0,336
Gebelik süresince toplam ağırlık kazanımı (g)	99,5 $\pm$ 4,76	89,8 $\pm$ 4,62	0,064
Batın sayısı	10,5 $\pm$ 1,64	9,0 $\pm$ 3,74	0,229

Gebelik dönemi boyunca günlük ortalama besin tüketimi açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunun günlük ortalama besin tüketiminin deney grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (K:  $19,2\pm 1,11$  g ve D:  $17,6\pm 0,42$  g, D2:  $18,0\pm 1,37$  g,  $p<0.05$ ). Gebelik döneminde anne ratların maternal diyet özelliklerine göre günlük ortalama enerji, makro ve mikro besin ögesi alım miktarları Tablo 2’de gösterilmiştir. Kontrol grubunun ortalama folik asit, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ve B<sub>6</sub> vitamin alımları dışında enerji, makro ve mikro besin ögesi alımları deney grubundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Deney grubunun günlük ortalama folik asit alımı ve vücut ağırlığı başına düşen folik asit miktarı ( $p<0,05$ ) kontrol grubundan daha yüksek ve gruplar arasında önemli fark olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ).

**Tablo 2.** Gebelik döneminde anne ratların maternal diyet özelliklerine göre günlük ortalama enerji, makro ve mikro besin ögesi alım miktarları

Enerji ve Besin Ögeleri	Kontrol	Deney
	$\bar{x}\pm SS$	$\bar{x}\pm SS$
Enerji (kkal/gün)*	73,6 $\pm$ 4,28	67,5 $\pm$ 1,63
Yağ (g/gün)*	1,0 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,02
Protein (g/gün)*	3,3 $\pm$ 0,18	3,0 $\pm$ 0,07
Karbonhidrat (g/gün)*	12,9 $\pm$ 0,75	11,8 $\pm$ 0,28
Folik asit (mcg/gün)*	38,4 $\pm$ 2,23	88,0 $\pm$ 2,12
Folik asit (mcg/kg/gün)*	48,0 $\pm$ 2,86	111,7 $\pm$ 2,92
B <sub>1</sub> vitamini (mg/gün)*	0,4 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01
B <sub>2</sub> vitamini (mg/gün)*	0,4 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01
B <sub>6</sub> vitamini (mg/gün)*	0,3 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01
B <sub>12</sub> vitamini (mcg/gün)*	7,9 $\pm$ 0,45	7,2 $\pm$ 0,17
C vitamini (mg/gün)*	0,4 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01
Kalsiyum (mg/gün)*	177,7 $\pm$ 10,34	163,0 $\pm$ 3,93
Fosfor (mg/gün)*	144,5 $\pm$ 8,40	132,5 $\pm$ 3,19
Demir (mg/gün)*	3,4 $\pm$ 0,19	3,1 $\pm$ 0,07

\*  $p<0,05$

Anne ratların oral glikoz tolerans test sonuçlarına göre kan glukoz değerleri Tablo 3’de gösterilmiştir. Deney grubunun başlangıç, 60. dakika, 90. dakika ve 120. dakikadaki kan glukoz değerleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur fakat gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ( $p<0,05$ ).

**Tablo 3.** Anne ratların oral glukoz tolerans test sonuçlarına göre kan glukoz değerlerinin değerlendirilmesi (mg/dL)

Kan glukoz değerleri (mg/dL)	Kontrol	Deney
	$\bar{x}\pm SS$	$\bar{x}\pm SS$
OGTT-0. dakika (mg/dL)	80,8 $\pm$ 6,67	88,6 $\pm$ 11,25
OGTT-15. dakika (mg/dL)	112,8 $\pm$ 17,45	117,5 $\pm$ 23,56
OGTT-30. dakika (mg/dL)	112,6 $\pm$ 10,87	117,6 $\pm$ 12,09
OGTT-60. dakika (mg/dL)	89,6 $\pm$ 9,66	106,5 $\pm$ 13,54
OGTT-90. dakika (mg/dL)	84,1 $\pm$ 12,35	99,8 $\pm$ 10,75
OGTT-120. Dakika(mg/dL)	83,6 $\pm$ 9,75	97,0 $\pm$ 7,66

### 4. Tartışma

Folik asit desteği alan ve almayan aynı yaş grubu gebelerde gestasyonel diabetes mellitus (GDM) riskinin incelendiği bir çalışmada, desteği alan gebelerde GDM riskinin azaldığı ileri sürülmüştür. Folik asit desteği kullanan gebelerde, uygulanan folik asit desteğinin 800 mcg’ı aşmadığı belirtilmektedir. Çalışmada uygulanan folik asit desteğinin miktarı, önerilen folik asit desteğinden miktar olarak (400 mcg) fazla olmasına rağmen tolere edilebilir üst düzey miktarından (1000 mcg) düşüktür ve çalışmada verilen miktarın gebe sağlığını teşvik ettiği gösterilmiştir. (Li et al. 2015). Yapılan bir başka çalışmada ise gebelik öncesi dönemden başlayarak yeterli (>400 mcg) miktarda folik asit alan gebelerin, yetersiz düzeyde folik asit alan gebelere göre (<400 mcg) daha düşük GDM riski taşıdığı belirtilmiştir (Li et al. 2019). Fakat yakın zamanda Çin’de gebe kadınlarda yürütülen kohort bir çalışma sonucunda, gebeliğin ilk trimesterinde uygulanan günlük folik asit desteğinin GDM riskini iki katından fazla arttırdığı gösterilmiştir. Hatta ilk trimesterde folik asit desteği alan ve gebelik öncesi fazla kilolu kadınların (BKİ >25 kg/m<sup>2</sup>) folik asit desteği almayan normal ağırlıktaki kadınlara göre 5.63 kat daha fazla GDM riskine sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın en önemli sınırlılığı ise, GDM riskinin değerlendirilmesinde folik asit desteği alan ve almayan gebeler arasında karşılaştırma yapmış olmasına rağmen, destek alan gebelerin maruz kaldığı folik asit miktarı belirtilmemiştir (Zhu et al. 2016). Bu çalışmada ise tüm ratlara folik asit desteği sağlanmıştır ve en yüksek miktarda folik asite maruz kalan annelerin glukoz intolerans testi sonuçlarına göre, başlangıç, 60. dakika, 90. dakika ve 120. dakikadaki kan glukoz değerleri tolere edilebilir üst düzeyde folik asit desteği uygulanan anne ratlarda daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm gruplardaki anne ratların OGTT değerleri normal aralıkta olsada önerilen miktarın üzerinde folik asite maruz kalan annelerin kan glukoz değerleri artma eğilimi göstermektedir. Maruz kalman folik asit miktarı

tolere edilebilir üst düzeylerine ulaştığında annelerde bozulmuş glukoz toleransı gelişimi risk oluşturmaktadır ve artmış folik asit alımının bozulmuş glukoz toleransı riskini arttırabileceği söylenebilir.

## 5. Sonuç ve Öneriler

Gebelik döneminde uygulanan folik asit desteğinin önerilen miktarların üzerine çıkması gebelik döneminde bozulmuş glukoz toleransına olan yatkınlığı arttırabilir. Bu nedenle gebelerin; folik asit suplementasyonu uygulamasında doza dikkat edilmelidir. Gebelere folik asit önerisinde bulunurken miktar konusunda dikkatli olunmalıdır. Risk taşımayan gebelerde WHO önerisi doğrultusunda suplementasyon (400 mcg/gün) uygulanmalı ve tolere edilebilir üst alım düzeyini (1000 mcg) aşmayacak şekilde uygun sürelerde yapılmasına dikkat edilmelidir.

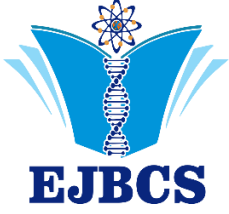
## Teşekkür

Bu çalışmanın yürütülmesinde maddi destek destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Al-Darzi, W., F. Al-Mudares, A. Farah, A. Ali, and D. Marzouk. 2014. Knowledge of periconceptional folic acid use among pregnant women at Ain Shams University Hospital, Cairo, Egypt. *East Mediterr Health J* 20 (9):561-8.
- Alebous, H. D., M. E. Ma'aita, and F. A. Alkhazaleh. 2014. Folic acid and neural tube defects: are Jordanian pregnant women aware? *Clin Exp Obstet Gynecol* 41 (6):647-53.
- Bonaventura, María Marta, Nadia Soledad Bourguignon, Marianne Bizzozzero, Diego Rodriguez, Clara Ventura, Claudia Cocca, Carlos Libertun, and Victoria Adela Lux-Lantos. 2017. Arsenite in drinking water produces glucose intolerance in pregnant rats and their female offspring. *Food and chemical toxicology* 100:207-216.
- Czeizel, A. E., I. Dudas, A. Vereczkey, and F. Banhidy. 2013. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients* 5 (11):4760-75. doi: 10.3390/nu5114760.
- Ghezzi, Ana Carolina, Lucieli Teresa Cambri, José Diego Botezelli, Carla Ribeiro, Rodrigo Augusto Dalia, and Maria Alice Rostom de Mello. 2012. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetology & metabolic syndrome* 4 (1):16.
- Hu, J., E. Oken, I. M. Aris, P. D. Lin, Y. Ma, N. Ding, M. Gao, X. Wei, and D. Wen. 2019. Dietary Patterns during Pregnancy Are Associated with the Risk of Gestational Diabetes Mellitus: Evidence from a Chinese Prospective Birth Cohort Study. *Nutrients* 11 (2). doi: 10.3390/nu11020405.
- Huang, Y., Y. He, X. Sun, Y. He, Y. Li, and C. Sun. 2014. Maternal high folic acid supplement promotes glucose intolerance and insulin resistance in male mouse offspring fed a high-fat diet. *Int J Mol Sci* 15 (4):6298-313. doi: 10.3390/ijms15046298.
- Kaiser, L. L., and C. G. Campbell. 2014. Practice paper of the Academy of Nutrition and Dietetics abstract: nutrition and lifestyle for a healthy pregnancy outcome. *J Acad Nutr Diet* 114 (9):1447.
- Keating, E., A. Correia-Branco, J. R. Araujo, M. Meireles, R. Fernandes, L. Guardao, J. T. Guimaraes, F. Martel, and C. Calhau. 2015. Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life." *J Endocrinol* 224 (3):245-59. doi: 10.1530/joe-14-0448.

- Krishnaveni, G. V., S. R. Veena, S. C. Karat, C. S. Yajnik, and C. H. Fall. 2014. Association between maternal folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in Indian children. *Diabetologia* 57 (1):110-21. doi: 10.1007/s00125-013-3086-7.
- Lai, J. S., W. W. Pang, S. Cai, Y. S. Lee, J. K. Y. Chan, L. P. C. Shek, F. K. P. Yap, K. H. Tan, K. M. Godfrey, R. M. van Dam, Y. S. Chong, and M. F. F. Chong. 2018. "High folate and low vitamin B12 status during pregnancy is associated with gestational diabetes mellitus. *Clin Nutr* 37 (3):940-947. doi: 10.1016/j.clnu.2017.03.022.
- Mahan, L Kathleen, and Janice L Raymond. 2016. *Krause's food & the nutrition care process: Elsevier Health Sciences. Appendix, 20, 1065.*
- Morakinyo, A. O., T. A. Samuel, F. O. Awobajo, G. O. Oludare, and A. Mofolorunso. 2019. High-Dose Perinatal Folic-Acid Supplementation Alters Insulin Sensitivity in Sprague-Dawley Rats and Diminishes the Expression of Adiponectin. *J Diet Suppl* 16 (1):14-26. doi: 10.1080/19390211.2018.1426076.
- Procter, Sandra B, and Christina G Campbell. 2014. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutrition and lifestyle for a healthy pregnancy outcome. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 114 (7):1099-1103.
- Rabiu, T. B., L. O. Tihamiyu, and B. S. Awoyinka. 2012. Awareness of spina bifida and periconceptional use of folic acid among pregnant women in a developing economy. *Childs Nerv Syst* 28 (12):2115-9. doi: 10.1007/s00381-012-1879-5.
- Samur, 2015. Gebelik ve Laktasyon Döneminde Beslenme. *Türkiye Klinikleri Journal of Nutrition and Dietetics-Special Topics* 1 (1):20-25.
- Yajnik, C. S., S. S. Deshpande, A. A. Jackson, H. Refsum, S. Rao, D. J. Fisher, D. S. Bhat, S. S. Naik, K. J. Coyaji, C. V. Joglekar, N. Joshi, H. G. Lubree, V. U. Deshpande, S. S. Rege, and C. H. Fall. 2008. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 51 (1):29-38. doi: 10.1007/s00125-007-0793-y.
- Yajnik, CS, SS Deshpande, AA Jackson, H Refsum, S Rao, DJ Fisher, DS Bhat, SS Naik, KJ Coyaji, and CV Joglekar. 2008. Vitamin B 12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 51 (1):29-38.
- Yang, T., Y. Gu, X. Wei, X. Liang, J. Chen, Y. Liu, T. Zhang, and T. Li. 2017. Periconceptional folic acid supplementation and vitamin B12 status in a cohort of Chinese early pregnancy women with the risk of adverse pregnancy outcomes. *J Clin Biochem Nutr* 60 (2):136-142. doi: 10.3164/jcbn.16-45.



## LPS'nin böbrek DNA'sı üzerine akut toksik etkisi ve apilarnilin koruyucu rolü

Züleyha Doğanıyıt<sup>1\*</sup>, Sibel Silici<sup>2</sup>, Emin Kaymak<sup>1</sup>, Aşlı Okan<sup>1</sup>, Dilek Pandır<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Yozgat, Türkiye  
<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü,, Kayseri, Türkiye  
<sup>3</sup>Bozok Üniversitesi,, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Yozgat, Türkiye

\*Corresponding author : zuleyha.doganyigit@gmail.com  
Orcid No: https://orcid.org/0000-0002-6980-3384

Received : 01/08/2019  
Accepted : 21/12/2019

**Özet:** Bir endotoksin olarak lipopolisakarit (LPS), gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir parçasını oluşturur ve canlı dokuya girdikten sonra akut bir iltihabın başlatılmasından sorumludur. Bu çalışmada erkek sıçanlar kontrol ve uygulama grupları olmak üzere toplam sekiz gruba ayrılmıştır. Uygulama grupları: Apilarnil'in 0,2, 0,4 ve 0,8 g/kg vücut ağırlığı (va) artan doz grupları, LPS-uygulanan grup (30 mg/kg va intraperitoneal yoldan LPS verildi), LPS+ Apilarnil'in 0,2, 0,4 ve 0,8 g/kg va artan doz grupları. Apilarnil'in 0,2, 0,4 ve 0,8 g/kg artan dozları sıçanlara 1 ml oral gavaj olarak verildi. Komet yöntemi ile böbrek hücrelerinin DNA yapısındaki değişiklikler 6 saat sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldı. LPS-uygulanan gruba LPS+Apilarnil uygulanan grup karşılaştırıldığında, DNA hasarı 6 saatin sonunda önemli ölçüde artmıştır. LPS+Apilarnil uygulanan grupta, uygulama süresi sonunda kuyruk yüzde DNA'sı, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti önemli ölçüde azalmıştır. Sonuç olarak, LPS'ye karşı farklı dozlarda Apilarnil'in kullanılan gruplar karşılaştırıldığında yüksek dozda Apilarnil'in kullanılmasının daha koruyucu olduğu tespit edilmiştir.

**Keywords:** LPS, Apilarnil, Toksikite, DNA, Böbrek

### Protective role of apilarnil and acute toxic effect of LPS on kidney DNA

**Abstract:** Lipopolysaccharide as an endotoxin forms part of the cell wall of gram-negative bacteria and is responsible for initiating an acute inflammation after entering live tissue. In this study, male rats were divided into eight groups as control and treatment groups. Treatment groups are Apilarnil 0,2, 0,4 and 0,8 g/kg body weight (bw) increasing dose groups, LPS-treated group (LPS, 30 mg/kg bw was given to the LPS group intraperitoneally), LPS+Apilarnil increased dose groups of 0,2, 0,4 and 0,8 g/kg bw. Apilarnil increased doses of 0,2, 0,4 and 0,8 g/kg were used, and 1 ml oral gavage was administered to the rats. LPS was given to the LPS group (30 mg/kg bw) intraperitoneally. Changes in DNA structure of kidney cells by comet assay were compared with control group after 6 hours. When LPS-treated group and LPS+Apilarnil applied group were compared, DNA damage increased significantly after 6 hours. In the LPS+Apilarnil treated group, the tail percentage DNA, tail length and tail moment were significantly reduced at the end of the application period. In conclusion, the use of high doses of Apilarnil with different doses against LPS.

**Anahtar Kelimeler:** LPS, Apilarnil, Toxicity, DNA, Kidney

© EJBCS. All rights reserved.

## 1. Giriş

Endotoksin, gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının bir parçasıdır ve canlı dokuya girdikten sonra akut bir enflamasyonun başlamasından sorumludur (Lohuis ve ark., 1988). Endotoksin molekülü, lipopolisakarit (LPS) tabakasında bulunmaktadır (Fısgın, 2004). Hücre yıkımının hızlı büyümesi sırasında gelişen endotoksemi, bir dizi olayların sırasını tetikleyen anahtar bir moleküldür. Sepsis, bakterilerin parçalanmasıyla salınır ve endotoksemiye neden olur (Tizard, 1992).

Deneysel çalışmalar, hayvanlarda sepsis/endotoksemiye indüklemek için LPS uygulamalarının yapılabileceğini göstermiştir. LPS, birçok araştırmacı tarafından tavşan, sıçan, fare, köpek, keçi, at, bufalo veya sığır gibi hayvanlarda deneysel endotoksemi üretmek için kullanılmıştır (Elmas ve ark., 2006; Turgut ve ark., 2006; Yazar ve ark., 2004; Bieniek ve ark., 1998; Jacobsen ve ark., 2005). LPS kullanılarak metabolik, immünolojik, fizyolojik, toksikolojik ve farmakolojik çalışmalar septik şok ile gerçekleştirilmektedir (Hardaway, 2000).

Septisemi sırasında, sitokinler, kemokinler, trombosit aktivasyon faktörü, interferon-gama, prostaglandinler, lökotrienler ve proteazlar gibi bir dizi uyarıcı faktörlerle makrofajlar, nötrofiller, endotel ve epitel hücreleri gibi farklı hücreler aktive edilebilir. Bu olaylar, ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROT) ile birlikte immün hücre aktivasyonunu da beraberinde getirir (Xu ve ark., 2014). Hücreler fizyolojik koşullar altında antioksidan savunma sistemi sayesinde hafif oksidatif stresi tolere edebilir. Diğer bir deyişle, tüm biyolojik hücreler tolere edilebilir seviyede oksidatif stres altında normal koşullara sahiptir. Bununla birlikte, savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, ROT ile antioksidanlar arasındaki denge tehlikeye girer ve böylece hücrelerde makromoleküller zarar görür (Lee ve ark., 2018; Nur ve ark. 2016a; Nur ve ark. 2018b). Serbest radikaller oksidatif strese neden olur ve oksidatif stres ile endotoksik şok yüksek mortalite gösterir (Lee ve ark., 2018).

Son yıllarda alternatif tedavi seçeneklerinin, tıbbi tedaviye ilave olarak özellikle beşerî hekimlik alanında, giderek artan bir şekilde önem kazanmıştır. Apilarnil'in (erkek larva özütü) Güney Afrika'da (Burkina Faso) gastrointestinal hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, vertigo, oftalmik hastalıklar, diş ağrısı, kas yorgunluğu, yara, yanık ve sırt ağrıları ve cilt temizleyici bir ajan olarak kullanımının yanında özellikle erkek kısırlığında başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir (Altan ve ark., 2013). Yapılan çalışmada, erkek ve dişi bireylere (28-55 günlük) prepubertal periyot boyunca düşük ve yüksek dozda (2,5 mg/kg, 7,5 mg/ kg) apilarnil verilmiş gelişme performansı, testiküler ağırlık, sekonder eşey karakterleri, kan lipidleri ve testosteron seviyesi analiz edilmiştir (Altan ve ark., 2013). Apilarnil, bireylerde gelişme performansı üzerine pozitif bir etki göstermemiştir. Biyokimyasal açıdan, kan glikozu ve kolesterolü düşürmüştür. Testiküler ağırlık, testosteron seviyesindeki artış, erken aşamalarda eşeysele olgunlaşmayı stimüle ettiği sonucuna varılmıştır. İkincil eşeysele karakterlerdeki stimülasyon dişilerde gözlenmemiştir. Benzer şekilde Yücel ve ark. (2011)'nin 21 günlük erkek bireylerde yaptığı çalışmada da erkek arı larvasının androjenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmalara benzer olarak farelerde tetramethrine ile indüklenen toksisiteye karşı bir arı ürünü olan propolisin aktif komponentlerinden biri olan caffeic acid phenethyl esterin karaciğerdeki koruyucu rolü gösterilmiştir (Nur ve ark., 2016). Ancak önemli bir arı ürünü olan Apilarnil ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar sınırlı olup halen başlangıç aşamasındadır.

Sepsisin yüksek mortalitesi, her yıl vaka sayısındaki artış ve prelinik/klinik araştırma sonuçlarına göre modern tıbbın dikkatini çekti. Apilarnil, son yıllarda üzerinde araştırmalar yapılan yeni bir arı ürünü olmakla birlikte bu önemli doğal bileşimin etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar yetersizdir. Bu çalışmanın amacı, LPS'nin sıçan böbrek hücreleri üzerindeki akut toksisitesini DNA yapısında değerlendirmek ve Apilarnil dozunun LPS'nin neden olduğu böbrek hasarı üzerine koruyucu etkisini araştırmaktır.

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1. Kimyasallar

Lipopolisakarit (*Escherichia coli* LPS, serotip 0127: B8) Sigma Aldrich'ten alındı, Apilarnil Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesinde üretilmiştir. Bu çalışma için kullanılan dozlar daha önceki çalışmalara göre belirlenmiştir (Doganyigit ve ark, 2013; Altan ve ark., 2013).

### 2.2. Hayvan Gruplandırma ve Uygulama

Bu çalışma için etik kurul onayı Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde alınmıştır. Araştırmada erkek Sprague-Dawley sıçanları kullanıldı (yaklaşık 300-320 gr ağırlık). Sıçanlar, uygulamadan 10 gün önce karantina altına alınmıştı. Sıçanlar özel kafeslerde, standart laboratuvar diyetlerinde tutuldu ve su ile beslendi. Kontrol ve uygulama grubu olarak 8 grup oluşturuldu: Kontrol grubu herhangi bir kimyasal madde verilmedi. Sıçanlar oda sıcaklığında 22±30 °C'de, 12 saat ışık, 12 saat karanlık fotoperiyodu altında tutuldu. Deneysel gruba tek doz LPS intraperitoneal (ip) 30 mg/kg vücut ağırlığı verildi. Artan apilarnil dozları oral olarak 0,2 g/kg, 0,4 g/kg ve 0,8 g/ kg olarak verildi. Altı saatlik uygulamadan sonra sıçanlar sakrifiye edildi ve deneysel çalışmalar için sıçanların böbrekleri alındı.

### 2.3. Komet Testi ile DNA Yapısının Değerlendirilmesi

Dokular neşter ile 1 gr ince dilimlerle ayrıldı. 5 ml soğuk fosfat tamponu behere aktarıldı ve 500 rpm'de 1 dakika karıştırıldı. Slaytlar, ince bir agaroz jeli (%0,5) ile kaplandı ve hücrelerin daha iyi tutulması için gece boyunca donduruldu (+4 °C). Süpernatant, hücre süspansiyonu olarak kullanıldı. Hücre süspansiyonu, 100 ml düşük erime noktalı agaroz (FTT'de %0,8) ile karıştırıldı. Bu karışımın 100 ul'si, slaytlara kaplandı, böylece kaplanmış slaytlar üzerine hava kabarcığı olmadan yayılım sağlandı. Hücre süspansiyonu, donması için 20 dakika boyunca buzdolabında saklandı. Lamel daha sonra slaytlardan dikkatlice kaldırıldı. Kaplanmış slaytlar, 2-9 dakika boyunca lizis tamponuna yerleştirildi (0.045M TBE, pH: 8.4, %2,5 SDS). Buradan çıkan slaytlar 2 dakikalık bir elektroforez çözeltisine yerleştirildi. Elektroforezden sonra slaytlar 60 µl (20 µg/ml) etidyum bromür çözeltisi ile boyandı (Pandir, 2019).

### 2.4. Veri Analizi

Bu çalışmada kullanılan istatistiksel veriler, Windows SPSS 11.0 bilgisayar programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi ile değerlendirildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 3. Bulgular

### 3.1. DNA yapısındaki değişiklikler

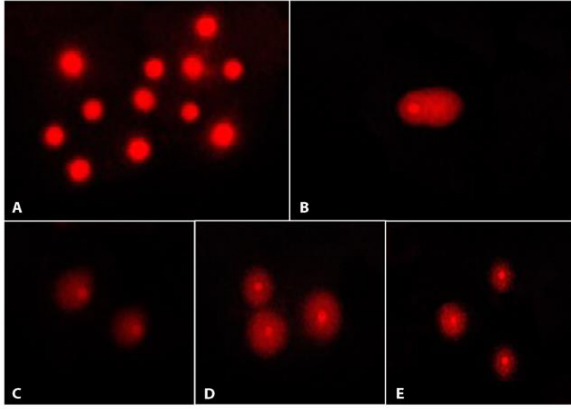
DNA hasarı, kuyruk yüzde DNA'sı, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment ile belirlendi. Komet testinde, kontrol grubu ile artan apilarnil uygulama grupları karşılaştırıldığında DNA hasarı olmadığı tespit edildi (Tablo 1) (Şekil 1).

LPS uygulamasının sonucu olarak, birincil DNA hasarı olduğu Komet testi ile tespit edilmiştir. DNA hasarı,



kontrole kıyasla tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlıdır. LPS uygulaması, böbrek hücrelerinde kuyruk DNA yüzdesini ve kuyruk uzunluğunu önemli ölçüde arttırdı. Özellikle 30 mg/kg'lık dozda kontrole kıyasla 2 katlık bir artış gözlenmiştir (Tablo 1).

Artan apilarnil uygulamasının böbrek dokusunda DNA hasarını azaltmıştır. Böbrek dokusunda LPS + 0,2 g/kg apilarnil-, LPS + 0,4 g/kg apilarnil-, LPS + 0,8 g/kg apilarnil-uygulanan gruplarda, DNA hasarını gösteren kuyruk yüzde DNA'sı, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment değerleri 6 saat sonunda istatistiksel olarak önemli bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 1).



**Şekil 1.** LPS ve artan dozlarda apilarnil uygulanan sıçanların böbrek hücrelerinde DNA hasarı. (A) Kontrol ve artan dozlarda apilarnil uygulanan grup, (B) LPS uygulanan grup, (C) LPS+0,2 g/kg apilarnil uygulanan grup, (D) LPS+ 0,4 g/kg apilarnil uygulanan grup, (E) LPS+ 0,8 g/kg apilarnil uygulanan grup.

**Tablo 1.** Komet analizi ile kuyruk yüzde DNA'sı, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti ortalama değerleri

	Kuyruk % DNA±SD ortalaması	Kuyruk uzunluğu±SD ortalaması	Kuyruk anı±SD ortalaması
Kontrol	55.75±2.65 <sup>a</sup>	35.25±8.22 <sup>a</sup>	19.65±0.21 <sup>a</sup>
0,2g/kg apilarnil	55.24±3.45 <sup>a</sup>	33.20±2.65 <sup>a</sup>	18.33±0.09 <sup>a</sup>
0,4g/kg apilarnil	57.23±6.24 <sup>a</sup>	30.12±3.02 <sup>a</sup>	17.23±0.18 <sup>a</sup>
0,8g/kg apilarnil	56.11±2.02 <sup>a</sup>	31.22±3.42 <sup>a</sup>	17.51 ±0.06 <sup>a</sup>
LPS	102.1±11.23 <sup>b</sup>	65.05±11.35 <sup>b</sup>	66.46±1.27 <sup>b</sup>
LPS+0,2g/kg apilarnil	85.12±3.22 <sup>c</sup>	49.12±5.22 <sup>c</sup>	41.81±0.16 <sup>c</sup>
LPS+0,4g/kg apilarnil	86.2±22.01 <sup>c</sup>	49.13±3.20 <sup>c</sup>	42.35±0.7 <sup>c</sup>
LPS+0,8g/kg apilarnil	69.22±3.25 <sup>d</sup>	39.11±3.42 <sup>d</sup>	27.07±0.11 <sup>d</sup>

a, b, c, d  $P<0.05$  istatistiksel olarak grupların kendi içinde anlamlı farklılık gösterdiğini belirtmektedir.

#### 4. Tartışma

Gram (-) bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan LPS, laboratuvar hayvanlarında deneysel endotoksemi üretmek için yaygın olarak kullanılır. LPS, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok gram-negatif bakteriden elde edilmesine rağmen, en çok *E. coli*'nin O26: B6, O55: B5, O111: B4 farklı serotiplerinden LPS elde edilmektedir. LPS ile septik şok yapılarak metabolik, immünojenik, fizyolojik, toksikolojik ve farmakolojik çalışmalar yürütülmektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, uygulanan dozun 1 ila 100 mg/ kg arasında geniş bir doz aralığına sahip olduğu gözlemlenir (Kalaz ve ark., 2016; Blaszczyk ve ark., 2015). Bu çalışmada, *E. coli*'nin O55:B5 serotipi LPS için kullanıldı ve 30 mg/kg vücut ağırlığı LPS ve artan dozlarda apilarnil antioksidan olarak kullanılarak, sıçan böbreklerinde altı saat sonunda DNA yapısı değerlendirildi.

Genel olarak, serbest radikaller, elektron kaybeden bir oksijen atomu içeren moleküllerdir. Bu durum moleküllerin dengesiz ve reaktif hale gelmesine neden olur. Yani, bu moleküller etraflarındaki diğer moleküllerin elektronlarına yüksek bir afinite gösterirler. Örneğin, bu moleküller DNA ile etkileşime girerek fonksiyon bozukluğuna, mutasyona ve kansere yol açar (Yerer ve Aydoğan, 2000). Serbest oksijen grupları, nükleik asitlerde yapısal değişikliklere ve kromozomlarda mutasyonlara neden olur. (Kaneko, 1980; Comporti, 1993). ROS kaynaklı DNA hasarı, tek veya çift sarmallı DNA hasarına, pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonlarına ve DNA'nın çapraz bağlanmasına neden olur (Valko ve ark., 2006). Ayrıca, DNA hasarı, transkripsiyonun durdurulmasına veya indüklenmesine, sinyal iletim yollarının indüksiyonuna, replikasyon kusurlarına ve karsinojeniz ile bağlantılı genomik dengesizliğe neden olabilir (Dizdoroglu ve ark., 2002; Marnett, 2000). Bu çalışmada, LPS grubu ve kontrol grubu 6 saatin sonunda karşılaştırıldığında, LPS ile muamele edilen gruptaki sıçanların böbrek dokularında kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinde önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir. Artan dozlarda LPS+Apilarnil uygulanan gruptaki koruyuculuk LPS uygulanan gruba göre böbrek dokusunda daha fazla olduğu görülmüştür.

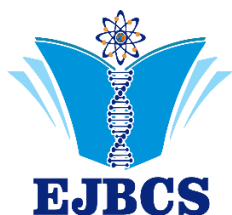
#### 5. Sonuç

Yüksek sepsis mortalitesi, her yıl vaka sayısındaki artış ve prelinik/klinik araştırmaların başarısızlık sonuçları modern tıbbi sorgulamaya devam etmektedir. Sepsiste antimikrobiyal ve destekleyici tedavilere ek olarak kanıtlanmış çok az ajan vardır. Mevcut sınırların üzerindeki mortalite oranlarını azaltmak için sistemik bir enflamatuvar yanıt sendromu olan sepsis ile ilgili araştırmalara acil ihtiyaç vardır. Sepsis fizyopatolojisi oldukça karmaşık olduğu için, moleküler biyolojideki olağanüstü gelişmeler de sepsis alanına yansımıştır ve bu karmaşık işlemdeki birçok nokta daha anlaşılır hale gelmiştir. Bu çalışmada, artan apilarnil dozları, sıçanlarda LPS kaynaklı nefrotoksisite ile önemli ölçüde azaltılmıştır, fakat tamamen korunmamıştır. Buna rağmen, antioksidanların veya

bunların septik enfeksiyonlara yönelik kombinasyonlarının ve bunların zararlarının önleyici etkisini bulmak için daha fazla çalışma yapılmalı ve böylece ölümler azaltılmalıdır.

### Kaynaklar

- Altan O, Yücel B, Açıkgöz Z, Seremet C, Kösođlu M, Ozgönül AM 2013. Apilarnil reduces fear and advances sexual development in broilers but has no effect on growth. *British Poultry Sci* 54(3): 355-361.
- Bieniek K, Szuster-Ciesielka A, Kaminska T, Konracki M, Witek M, Kandefer-Szerszen M 1998. Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after reated injection low doses of lipopolisaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 62: 297-307.
- Blaszcyk K, Wilczak J, Harasym J, Gudej S, Suchecka D, Krolkowski T, Lange E, Gromadzka-Ostrowska J 2015. Impact of low and high molecular weight oat beta-glucan on oxidative stres and antioxidant defense in spleen of rats with LPS induced enteristis. *Food Hydrocoll* 51: 272-280.
- Comporti M 1993. Lipid peroxidation. *Biopathological significance*. *Mol Aspects Med* 14: 199-207.
- Dizarođlu M 1998. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Res* 29: 551-563.
- Doganyigit Z, Kup FO, Silici S, Deniz K, Yakan B and Atayoglu T 2013. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine* 20(7): 632-639.
- Elmas M, Yazar E, Uney K, Karabacak A 2006. Influence of *Escherichia coli* endotoxin-induced endotoxaemia on the pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous administration in rabbits. *J Vet Med A* 53: 410-414.
- Fisgin NT 2004. Sepsis, *OMÜ Tıp Der* 21(2): 100-109.
- Hardaway RM 2000. Rewiew of septic shock. *Am Surg* 66(1): 22-29.
- Jacopsen S, Toelboell T, Andersen PH 2005. Dose dependency and individual variability in salacted clinical response after systemic lipopolysaccharide challenge in cattle. *Vet Res* 36: 167-178.
- Kalaz EB, Aydın AF, Doğan-Ekici I, Çoban J, Doğru-Abbasođlu S, Uysal M 2016. Protective effects of carnosine alone and together with alpha-tocopherol on lipopolysaccharide (LPS) plus ethanol-induced liver injury. *Environ Toxicol Pharmacol* 42: 23-29.
- Kaneko JJ 1980. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (3<sup>rd</sup> Edition) Academic Press Inc (London) Ltd.
- Lohuis JACM, Verheijden YHM, Burvenich C, Van Miert ASJPAM 1988. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. Changes in body temparature and reticulo-rumen motility and the effect of repeated administration. *Vet Q* 10(2): 109-116.
- Lee G, Park JS, Lee EJ, Ahn JH, Kim HS 2019. Anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of urolithin B in activated microglia. *Phytomedicine* 1(55): 50-57.
- Marnett LJ 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370.
- Nur G, Deveci HA, Ersan Y, Merhan O, Nazlı M, Nur Ö 2016a. Protective role of caffeic acid phenethyl ester against tetramethrine-induced toxicity in mice. *Med Sci* 5(4): 972-978.
- Nur G, Deveci HA 2018b. Histopathological and biochemical responses to the oxidative stress induced by glyphosate-based herbicides in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Cell Neurosci Oxid Stress* 10(1): 656-665.
- Pandır D, Bekdemir FO, Dođanyigit Z, Per S 2017. Protective effects of Sodium Selenite and Vitamin E on LPS induced endotoxemia of rats. *ARC J Nutr Growth* 3(1): 19-25.
- Tizard I 1992. *Veterinary Immunology An Introduction* (4<sup>th</sup> Edition) W.B Saunders Co, Philadelphia, USA.
- Turgut B, Vural Ö, Demir M, Kutlu K, Kayapınar R 2006. Effect of pentoxifylline and indomethacin on rabbits with endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC) and comparison with heparin. *Turk J Hematol* 23: 37-46.
- Xu D, Chen M, Ren X, Ren X, Wu Y 2014. Leonurine ameliorates LPS-induced acute kidney injury via suppressing ROS-mediated NF-κB signaling pathway. *Fitoterapia* 97: 148-155.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
- Yazar E, Çöl R, Uney K, Atalay B, Elmas M, Tras B 2004. Effect of pentoxifyline on biochemical parameters in endotoxaemic New Zealand White rabbits. *Bull Vet Ins Pulawy* 48: 297-299.
- Yerer B, Aydoğan S 2000. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üni Sađ Bil Der* 9(1): 49-53.
- Yücel B, Açıkgöz Z, Bayraktar H, Seremet Ç 2011. The effects of apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *J Anim Vet Adv* 10(17): 2263-2266.



## The effect of neopterin alone or in combination with doxorubicin, cisplatin and vitamin C on the viability of different hepatocellular carcinoma cell lines

Imge Kunter<sup>1\*</sup>, Niloufar Zabib<sup>1</sup>, Marianna Najjar<sup>1</sup>, Yelin Subasi<sup>2</sup>, Gonul Sahin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eastern Mediterranean University, Faculty of Pharmacy, Famagusta, North Cyprus via Mersin 10, Turkey.

<sup>2</sup>Uppsala University, Faculty of Medicine, Biomedicine-Neuroscience Department, Uppsala, Sweden.

\*Corresponding author : [imge.kunter@emu.edu.tr](mailto:imge.kunter@emu.edu.tr)  
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-5706-306X>

Received : 06/08/2019  
Accepted : 21/12/2019

**Abstract:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is inflammation-related cancer, and the 4<sup>th</sup> leading cause of death globally. Neopterin is an instant biomarker of the cellular immune response and belongs to the pteridine class. The levels of neopterin are believed to be very closely linked with the tumor size in patients with HCC. Various studies have proven that neopterin can modulate the cellular oxidant-antioxidant balance, thus causing cell toxicity. In this study, we investigated the cytotoxic effects of neopterin alone and in combination with two of the known cytotoxic agents of doxorubicin and cisplatin together with vitamin C, a well-known antioxidant agent. SNU-449, Hep3B, Mahlavu, and PLC/PRF/5 HCC cell lines were used in this study. Our results showed that increasing concentrations of neopterin does not have any significant effects on the cytotoxicity while as expected the three other agents decrease the viability of all subjected cell lines. SNU-449 is the most resistant HCC cell line among others. Considering the effectivity of combinational therapy in cancer patients, the effect of various combinations of neopterin with doxorubicin, cisplatin and vitamin C on the viability of the most resistant cell line of SNU-449 has been investigated. We found that the addition of cisplatin to the combination of neopterin and vitamin C, causes a greater decrease in cell viability of SNU-449 cells compared to the dual therapy with neopterin and vitamin C, while the addition of doxorubicin to the same dual therapy, leads to a decrease in the effectivity of it.

**Keywords:** HCC, neopterin, doxorubicin, cisplatin, vitamin C, combinational therapy

© EJBCS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is inflammation-related liver cancer, with a high recurrence rate and poor long-term survival. HCC is considered as the 4<sup>th</sup> most common cancer, and the 2<sup>nd</sup> leading cause of death amongst cancer cases, globally. (Mazzanti et al., 2016) Conventional cytotoxic chemotherapies such as the use of sorafenib, cisplatin, and doxorubicin have not provided clinical benefits or prolonged survival for patients with advanced HCC. Beside its complications; surgery, including transplantation and resection, remains the most effective treatment for HCC. (Daher et al., 2018) In a recent study, it has been suggested that vitamin C preferentially kills HCC cancer stem cells. (Lv et al., 2018) Current advances have shown that combinational therapy may be more effective than using just a single chemotherapeutic approach in cancer management. But even these combination therapies are effective only on a small number of tumors, and the responses are not promising. (Jindal et al., 2019) Therefore, scientific researches are now focusing on discovering novel

chemotherapeutics with molecular targets for the management of HCC.

It is very well known that inflammation plays an important role in pathogenesis and progression of HCC by mediating cellular survival and metastasis. Studies have revealed that the inflammation status and relevant molecules are becoming popular targets of drug discovery. (Capece et al., 2013) (Lewis and Merched, 2014) Recently, attention has been drawn to the role of neopterin in the already established relation between inflammation and HCC. It is believed that, the levels of neopterin are very closely linked with the tumor size in these patients. (Antoniello et al., 1992) (Godai et al., 1994)

Neopterin and its derivatives are metabolites of guanosine triphosphate and are produced by the human monocyte-derived macrophages upon stimulation with  $\gamma$ -interferon. Various studies have suggested that neopterin derivatives belonging to pteridine family can modulate the redox balance of the biological systems. (Huber et al., 1984) Generally, the reduced pteridine species are scavengers of

free radicals while the oxidized forms act as weak to strong enhancers of oxidative stress. For instance, neopterin derivatives can play a substituent role as an immune modulator in nitric oxide generation and other oxygen radical-mediated processes. 7,8-Dihydroneopterin has shown to be a potential free-radical scavenger both in-vivo and in-vitro studies. (Hoffmann et al., 2003) However, besides the redox state of neopterin derivatives other factors such as the composition of the culturing medium, can change the type of biochemical role played by neopterin derivatives in biological systems. Some studies showed that neopterin activates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis through oxygen radical-mediated processes. (Hoffmann et al., 1998) However, the effects of neopterin on the HCC cells are not yet understood. Given that combinational therapies may have higher effectivity in cancer management, in this study; four different HCC cell lines of SNU-449, Hep3B, Mahlavau and PLC/PRF/5 have been subjected to cellular cytotoxicity test (MTT analysis) after being treated with neopterin and its various combination with chemotherapeutics such as doxorubicin, cisplatin and a well known antioxidant, vitamin C.

## 2. Materials and Method

### 2.1. Cell Culture and chemicals

HCC cell lines (SNU-449, Hep-3B, Mahlavau and PLC/PRF/5) were kindly provided by Prof. Dr. Mehmet Öztürk (Izmir Biomedicine and Genome Centre). All cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 2 mM L-glutamine, 100 mg/mL streptomycin and 1X NEAA, at 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Neopterin (25  $\mu$ M-500  $\mu$ M), doxorubicin (2  $\mu$ M and 60  $\mu$ M), cisplatin (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) and vitamin C (1mM) treatments were carried out along 48-h for all the viability experiments.

### 2.2. MTT assay

Cells were seeded in a 96 well plate. After overnight incubation, they were treated with different concentrations of neopterin, doxorubicin, cisplatin and vitamin C containing medium. For MTT, following 48-h treatment, 0.5 mg/mL MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) was added to the medium. After the formation of formazan crystals, medium was removed, and formazan crystals were dissolved with 100  $\mu$ L DMSO. Absorption of solution was measured at 570 nm. The cell viability was calculated as viable cell percentage.

### 2.3. Statistical analysis

Experiments have been carried out three times, independently. The results were reported as mean  $\pm$  SE for

three repetitive analysis. One-way ANOVA test was used for data analysis.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. All the analyses were performed using GraphPad Prism 5 software.

## 3. Results

### 3.1. The effect of different concentration of neopterin on the viability of different HCC cell lines

All the HCC cell lines, SNU-449, Hep3B, Mahlavau and PLC/PRF/5, have all been mixed with neopterin in a concentration range of 25  $\mu$ M-500  $\mu$ M. As shown in Figure 1, within the chosen range, none of the neopterin concentrations had any statistically significant effects on the proliferation and viability of any of the subjected cell lines.

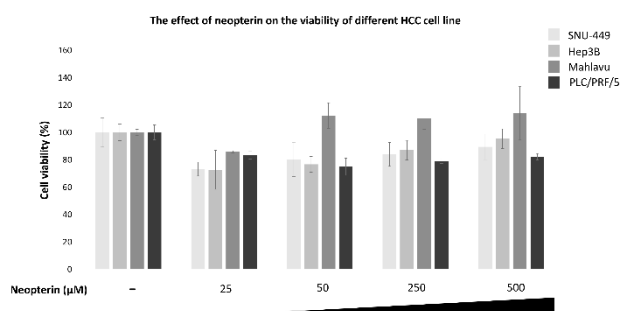


Figure 1. The effect of increasing neopterin concentrations (25 $\mu$ M-500  $\mu$ M) on the viability of different HCC cell lines.

### 3.2. The effect of different concentrations of cisplatin, doxorubicin and vitamin C on the viability of HCC cell lines

Based on the American Cancer Society, cisplatin and doxorubicin are among the most commonly used chemotherapeutics in the treatment of liver cancer. Scientists have recently reported the possible cytotoxic effect of vitamin C on HCC cancer stem cells (Lv et al. 2018). In this study the effect of different concentrations of cisplatin (10 $\mu$ M and 50 $\mu$ M), doxorubicin (2 $\mu$ M and 60 $\mu$ M), and vitamin C (1mM) treatment on the viability of SNU-449, Hep-3B, Mahlavau and PLC/PRF/5, has been investigated. A drastic decrease in the viability of all the cell lines has been noticed with 50  $\mu$ M cisplatin ( $***p < 0.0001$ ,  $**p < 0.001$ ). On a sensitivity scale, SNU-449 was the least and PLC/PRF/5 was the most sensitive cell line to doxorubicin treatment ( $***p < 0.0001$ ,  $*p < 0.01$ , respectively). As expected, vitamin C caused a decrease in cell viability of SNU-449, Mahlavau and PLC/PRF/5 ( $***p < 0.0001$ ) (Fig. 2a, 2b, 2c).

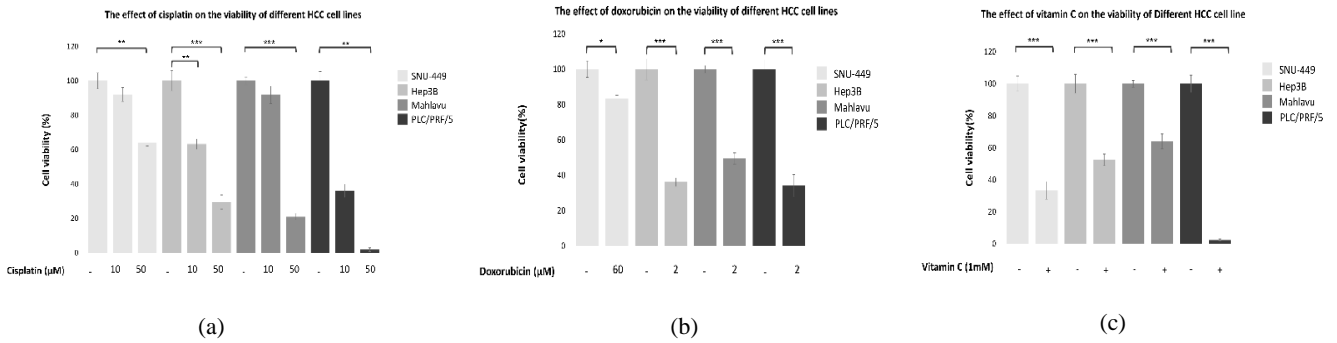


Figure 2. The effect of (a) cisplatin (b) doxorubicin\* (c) vitamin C on the viability of different HCC cell lines. \*(because of its resistance only SNU-449 was treated with 60 μM doxorubicin, while other cell lines were treated with 2 μM doxorubicin).

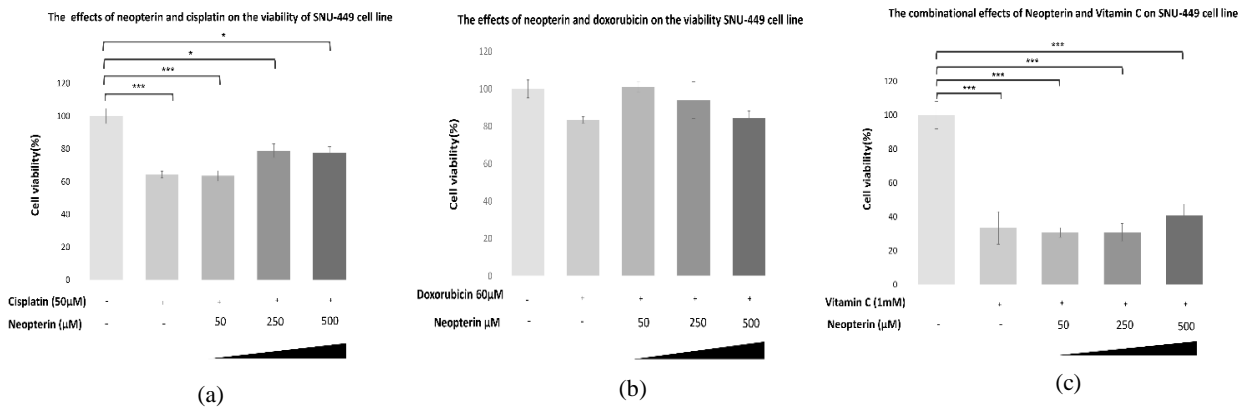


Figure 3. The combinational effect of neopterin with (a) cisplatin, (b) doxorubicin, (c) vitamin C. on the viability of SNU-449 cell lines

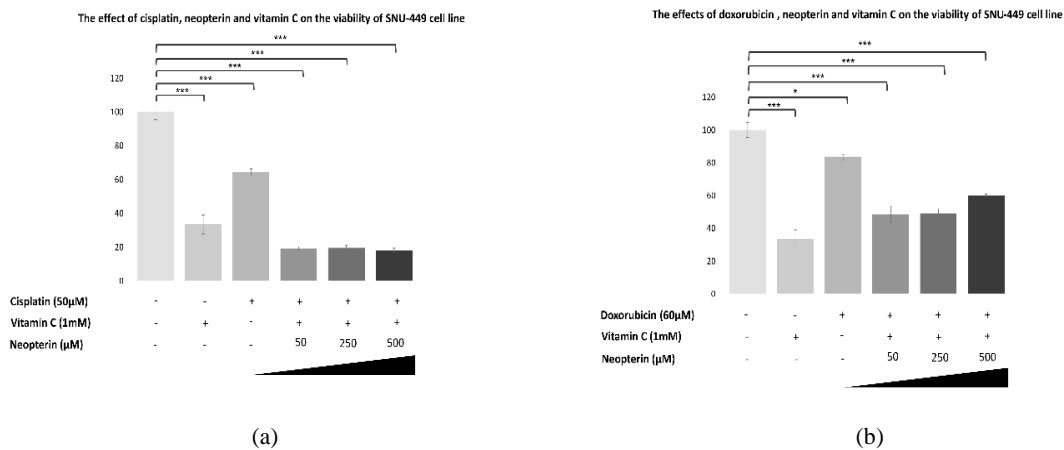


Figure 4. The combination of vitamin C and neopterin with (a) cisplatin and (b) doxorubicin. on the viability of SNU-449 cell line

### 3.3. The effect of combinational exposure of neopterin with doxorubicin, cisplatin and vitamin C on SNU-449 cell line.

Even though the SNU-449 cells have sensitivity to vitamin C, it is still resistant to doxorubicin and cisplatin. In search of new therapeutic approaches, the effect of neopterin on the viability of SNU-449 as in combination with doxorubicin, cisplatin and vitamin C has been investigated. Our results revealed that neopterin significantly protects the cells from the cytotoxicity of cisplatin treatment especially at higher concentration (\*\* $p < 0.0002$ , \* $p < 0.01$ ) (Fig. 3a). However, neopterin did not potentiate the cytotoxic effects of neither vitamin C nor doxorubicin (Fig. 3b, 3c)

### 3.4. The effect of cisplatin and doxorubicin in combination with vitamin C and neopterin on SNU-449 cell line.

Eventually, the effect of cisplatin in combination with vitamin C and neopterin on the viability of SNU-449 was analyzed. The results revealed that the addition of cisplatin enhances the cytotoxic potency compared to double combinational therapy with vitamin C and neopterin (\*\* $p < 0.001$ ) (Fig. 3c and Fig. 4a). With the same logic the effect of doxorubicin in combination with vitamin C and neopterin on SNU-449 has been investigated. When doxorubicin was added to the combination of vitamin C and neopterin, a decrease in cytotoxic potency compared to double combinational therapy has been found (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.01$ ) (Fig. 4b and 3b).

## 4. Discussion

Although previous studies have reported neopterin to be an inducer of programmed cell death via the mediation of oxidative stress, to the best of our knowledge this is the only study analyzing the effect of neopterin and its combinations on the viability of different HCC cell lines. (Hoffmann et al., 2003) (Baier-bitterlich et al., 1995) Based on the American cancer society, cisplatin and doxorubicin are two of the main chemotherapeutics used in the management of liver cancer. Moreover, some studies have also shown that vitamin C has the ability to induce anticancer activity in various cell lines. (Alexander et al., 2013)(Yiang et al., 2014) Our results showed that neopterin alone has no significant effect on the viability but vitamin C significantly decreases the viability of all the analyzed HCC cell lines. Besides its sensitivity to vitamin C treatment, SNU-449 still remained the most resistant analyzed cell line of this study. Due to the growing focus on the combinational therapy of cancer the effect of neopterin in various combination with cisplatin, doxorubicin and vitamin C on the viability of the resistant SNU-449 cell lines have been then investigated. In double combinational therapy with neopterin and cisplatin, it has been noticed that at high concentrations neopterin protects the SNU-449 cells against the cytotoxic effects of cisplatin. Interestingly, the double combinational therapy of neopterin and vitamin C still, lead to the maximum amount of decrease in cell viability of SNU-449. However, this decreased in cell viability did not have any significant

difference compared to the single therapy with vitamin C. For this reason, the triple combinational therapy of doxorubicin and cisplatin in combination with neopterin and vitamin C has been analyzed, independently. The addition of cisplatin lead to an increased cytotoxic potency, while the addition of doxorubicin caused a decrease in the cytotoxic potency of vitamin C and neopterin combinational therapy. Based on our results, neopterin can show a dual activity both as inducer and inhibitor of apoptosis depending on the cell line and the cytotoxic agents that it is used in combination with. In further studies, we are planning to analyze the underlying molecular mechanism of the effects of neopterin with a focus on the signaling pathways.

## 5. Conclusions

The results of this study, highlights the dual activity of neopterin both as hepatoprotective and hepatotoxic agent dependent on the type of cell line and the combinational therapy. However, further in detailed studies are required to fully clarify this dual biological activity of neopterin, and its potential future use in HCC management.

## Acknowledgments

This research received no external funding.

## Authors' contributions:

I.K and G.S conceived and designed the experiment; I.K, N.Z, M.N, Y.S and G.S performed the experiment, I.K and N.Z analyzed the data, I.K and N.Z wrote the manuscript.

## Conflict of interest disclosure:

There was no conflict of interest.

## Reference

- Alexander B, Fishman A I, Eshghi M, Choudhury M, and Konno S 2013. Induction of cell death in renal cell carcinoma with combination of D-fraction and vitamin C. Integrative Cancer Therapies 12(5): 442-8.
- Antoniello S, Auletta M, Magri P, and Russo N 1992. Serum Neopterin Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Biological Chemistry Hoppe-Seyler 373(11): 1165-68.
- Baier-bitterlich G, Fuchs D, Murr C, Reibnegger G, Werner-felmayer G, Sgonc R, Dierich M P 1995. Effect of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on tumor necrosis factor- induced programmed cell death. FEBS Letter 8:364(2):234-8.
- Capece D , Fischietti M, Verzella D , Gaggiano , Ciccirelli G, Tessitore A, Zazzeroni F, Alesse E 2013. The Inflammatory Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: A Pivotal Role for Tumor-Associated Macrophages. BioMed research international 2013: 187204.
- Daher S, Massarwa M, Benson AA, Khoury T 2018. Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review. Journal of clinical and translational hepatology 6(1): 69-78.

- Godai K, Daito K, Yamada S, Uemasu J, Horie Y, Suou T, Kawasaki H 1994. Clinical Significance of Serum and Urinary Neopterin after Transcatheter Arterial Embolization for Hepatocellular Carcinoma. *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastro-enterology* 91(6): 1097–1103.
- Hoffmann G, Kenn S, Wirleitner B, Deetjen C, Frede S, Smolny M, Rieder J, Fuchs D, Baier-Bitterlich G, Schobersberger W 1998. Neopterin Induces Nitric Oxide-Dependent Apoptosis in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Immunobiology* 199(1): 63–73.
- Lv H, Wang C, Fang T, Li T, Lv G, Han Q, Yang W, Wang H 2018. Vitamin C Preferentially Kills Cancer Stem Cells in Hepatocellular Carcinoma via SVCT-2.npj. *Precision Oncology* 2(1): 1.
- Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D 2003. Potential Role of Immune System Activation-Associated Production of Neopterin Derivatives in Humans. *Inflammation Research* 52(8): 313–21.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H 1984. Immune Response-Associated Production of Neopterin. Release from Macrophages Primarily under Control of Interferon-Gamma. *Journal of Experimental Medicine* 160(1): 310–16.
- Jindal A, Thadi A, Shailubhai K 2019. Hepatocellular Carcinoma: Etiology and Current and Future Drugs. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 9(2): 221–32.
- Lewis M, Merched AJ 2014. Tumor-Associated Macrophages, Inflammation and Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 08(03).
- Mazzanti R, Umberto A, and Renato T 2016. Hepatocellular Carcinoma: Where Are We?. *World Journal of Experimental Medicine* 6(1): 21–36.
- Yiang GT, Chou PL, Hung YT, Chen JN, Chang WJ, Yu YL, and Wei CW 2014. Vitamin C enhances anticancer activity in methotrexate-treated Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports* 32(3) 1057-1063



**EJBCS**