

## SIÇANLARDA SODYUM VALPROAT KAYNAKLI MİDE HASARI ÜZERİNE RUTİN'İN OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE APOPTOZ ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

PROTECTIVE EFFECT OF RUTIN ON OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND APOPTOSIS IN VALPROAT-INDUCED GASTRIC TOXICITY

Sibel Çiğdem TUNCER<sup>1</sup>, Cihan GÜR<sup>2</sup>, Nurhan AKARAS<sup>3</sup>, Fatih Mehmet KANDEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aksaray Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Aksaray, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Aksaray Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Aksaray, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Tuncer SÇ, Gür C, Akaras N, Kandemir FM. Sıçanlarda Sodyum Valproat Kaynaklı Mide Hasarı Üzerine Rutin'in Oksidatif Stres, İnflamasyon ve Apoptoz Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Med J SDU 2023; 30(3): 334-342.

### Öz

#### Amaç

Sodyum valproat, antiepileptik ilaçlardan en yaygın kullanılanlardan birisi olup uzun süreli maruziyet sonucunda toksik etkilidir. Uzun süreli sodyum valproat maruziyeti dokularda özellikle oksidatif stres ve inflamasyon artışına neden olmaktadır. Rutin, birçok bitkide doğal olarak bulunan antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilere sahip bir flavanoiddir. Bu çalışmada, sodyum valproat kaynaklı mide doku hasarı üzerine doğal bir antioksidan olan rutinin kullanımı ve muhtemel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

#### Gereç ve Yöntem

35 adet Wistar albino cinsi sıçan kontrol, rutin, sodyum valproat, sodyum valproat+rutin-50mg ve sodyum valproat+rutin-100mg grupları olmak üzere 5 gruba ayrıldı. 14 gün boyunca 500 mg/kg dozda sodyum valproat uygulamasıyla birlikte 50 veya 100 mg/kg rutin uygulaması oral gavaj yolla yapıldı. 15. günde sıçanlar dekapite edilerek mide dokuları alındı. SOD, KAT, GPx aktiviteleri ile MDA, GSH seviyeleri ile oksidatif stres hasarı spektrofotometrik yöntem ile analiz

edildi. NF-κB, TNF-α, COX-2 ve MMP-9 transkripsiyon düzeyleri ile inflamasyon hasarı ve Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon düzeyleri ile apoptotik hasar analizi RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Ayrıca konjesyon, hemoraji, mukoza hasarı, hücre infiltrasyonu ve bez dilatasyonu açısından skorlama için hematoksilin-eozin boyama ile histolojik analizler yapıldı.

#### Bulgular

Mide dokularında kontrol grubuna göre sodyum valproat grubunda MDA düzeyi ile NF-κB, TNF-α, MMP-9, COX-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon düzeyleri artmış (p<0.05), KAT, SOD, GPX aktiviteleri ile GSH düzeyi ve Bcl-2 mRNA transkripsiyon düzeyi azalmıştır (p<0.05). Rutin uygulamasıyla birlikte sodyum valproata bağlı tüm bu değişikliklerde tersi yönde aktivite meydana gelmiştir (p<0.05).

#### Sonuç

Mide dokularında sodyum valproat maruziyetinin neden olduğu toksik etkiye karşı rutinin potansiyel koruyucu özelliklere sahip olduğu sonucuna varıldı.

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi / Corresponding author and contact address:** S.Ç.T. / cigdemtuncer@aksaray.edu.tr

**Müracaat tarihi/Application Date:** 14.02.2023 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 22.06.2023

**ORCID IDs of the authors:** S.Ç.T: 0000-0002-6250-5093; C.G: 0000-0001-6775-7858;

**N.A:** 0000-0002-8457-9448; **F.M. K:** 0000-0002-8490-2479

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, İnflamasyon, Mide Toksisitesi, Oksidatif stres, Rutin, Valproat

## Abstract

### Objective

Sodium valproate is one of the most commonly used antiepileptic drugs and is toxic after long-term exposure. Long-term exposure to sodium valproate causes an increase in oxidative stress and inflammation in tissues. Rutin is a flavonoid naturally found in many plants with antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic effects. This study aimed to investigate the use and possible outcomes of rutin, a natural antioxidant, on gastric tissue damage caused by sodium valproate.

### Material and Method

35 Wistar albino rats were divided into 5 groups: control, rutin, sodium valproate, sodium valproate+rutin-50mg, and sodium valproate+rutin-100mg. For 14 days, a 500 mg/kg dose of sodium valproate and 50 or 100 mg/kg of rutin were administered by oral gavage. On the 15th day, rats were decapitated and gastric tissues were removed. SOD, CAT, GPx activities, MDA, GSH levels, and oxidative stress damage were analyzed by spectrophotometric method. Inflammation damage by

NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2, and MMP-9 transcription levels and apoptotic damage by Bax, Bcl-2, and Caspase-3 mRNA transcription levels were analyzed by RT-PCR method. Histologic analysis with hematoxylin-eosin staining was also performed to score for congestion, hemorrhage, mucosal damage, cell infiltration and gland dilatation.

### Results

In gastric tissues, MDA level and NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2, MMP-9, Bax and Caspase-3 mRNA transcription levels increased ( $p<0.05$ ), CAT, SOD, GPX activities, GSH level and Bcl-2 mRNA transcription level decreased ( $p<0.05$ ) in sodium valproate group compared to control group. Rutin administration resulted in a reversal of all these changes due to sodium valproate ( $p<0.05$ ).

### Conclusion

It was concluded that rutin has potential protective properties against the toxic effect of sodium valproate exposure in gastric tissues.

**Keywords:** Apoptosis, Gastric Toxicity, Inflammation, Rutin, Oxidative stress, Valproate

## Giriş

Valproat (2-propilpentanoik asit - SVP), bazı epilepsi türlerinin ve bipolar bozukluk, nöropatik ağrı ve migren gibi birçok nörolojik durumun tedavisinde kullanılan sentetik bir ilaçtır (1). SVP etkisini  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA) metabolizmasının inhibisyonu ve sinir uçlarına GABA geri alımının durdurulması ile göstermektedir (2). SVP'in kullanımı genel olarak güvenli bir ilaç kategorisinde sınıflandırılmasına rağmen bazı durumlarda kullanımı ciddi toksik etkilere neden olmaktadır (3). Toksikite, terapötik düzeye ulaşmak için doz ayarlamaları ile, metabolik bozukluğu olan hastalarda, ilaç-ilaç etkileşimlerinde veya kendine zarar verme girişimlerinde ortaya çıkabilmektedir (4). Toksik etkileri, hematolojik sistem, sinir sistemi ve sindirim sistemi gibi çoklu organ sistemlerinde görülmektedir (5). SVP'in uzun süreli kullanımı mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, sedasyon, kilo alımı, saç dökülmesi, hepatotoksosite, ensefalopati ve miyopatiye neden olabilir (6). Tüm bu nedenlerden dolayı nörolojik hastalıklara karşı kullanılan ilaçlardan SVP'in hedef dışı toksisitesi, tedavi gören bazı hastalar için büyük bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir (1). SVP'in

toksik etkisinin altında yatan çeşitli mekanizmalardan oksidatif stres ve inflamasyonun indüklenmesi en fazla bilinenler arasındadır. SVP, muhtemelen ROS üretimini artırarak lipid peroksidasyonuna neden olarak malondialdehit (MDA) düzeyini arttırmaktadır. Aynı zamanda katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ve glutatyon (GSH) düzeyini azaltarak antioksidan kapasiteyi düşürmektedir (3). Oksidatif stres artışı, bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa$ B) yolunu tetikleyerek inflamatuvar süreci de beraberinde getirir. Bu nedenle, SVP toksisitesine karşı özellikle bu mekanizmaları düzenleyici doğal etken maddeler üzerinde yapılan araştırmalar, yoğun bir şekilde devam etmektedir (3).

Flavonoidler, bitkilerde doğal olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (7). Flavonoidler, antioksidan, anti-inflamasyon, antialerjik, antiviral, antibakteriyel ve antitümör özellikleri nedeniyle popüler araştırma alanıdır (8). Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozit), karabuğday, ıspanak, domates yaprağı, elma, soğan ve çayda doğal olarak bulunan flavonoid glikozittir (9). Araştırmalarda rutin antiinflamatuvar,

antioksidan, antihipertansif, antiapoptotik, antiotofajik ve nöroprotektif özellikleri nedeniyle, başta oksidatif stresin neden olduğu hastalıklara ve lipid peroksidasyonuna karşı olmak üzere birçok hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (10).

Çalışmadaki amaç, sıçanlarda SVP ile oluşturulan mide hasarında doğal bir flavanoid olan rutin oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz hasarında kilit parametreler üzerine etkilerinin biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik yöntemler ile araştırılmasıdır.

## Gereç ve Yöntem

### Deney Hayvanları ve Deneysel Prosedür

Deneyde 220-250 gr, 9-10 haftalık, 35 adet Sprague dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 24-25°C sabit sıcaklık ve 12 saatlik karanlık-aydınlık siklusu sağlanarak standart kafeslerde barındırıldı. Normal içme suyu ve standart sıçan yemi ile ad libitum olarak beslendi. Etik kurul izni Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alındı (11.11.2022 - 2022/12-265). Tüm hayvan deneyleri Atatürk üniversitesi hayvan deneyleri merkezinde yapıldı. Deney hayvanları her grupta rastgele 7 sıçan olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Dozlar literatürden faydalanılarak belirlenmiştir (3).

1. Kontrol Grubu: 14 gün oral gavaj yolla serum fizyolojik verildi.
2. Rutin Grubu: 100 mg/kg rutin oral gavaj yolla olarak 14 gün verildi.
3. Sodyum Valproat Grubu (SVP): 14 gün 500 mg/kg sodyum valproat oral gavaj yolla verildi.
4. Sodyum Valproat+Rutin 50 Grubu (SVP+RU-TİN50): 14 gün 500 mg/kg sodyum valproat oral gavaj yolla verildi ve 30 dakika sonra 50 mg/kg oral gavaj yolla rutin 14 gün verildi.
5. Sodyum Valproat+Rutin 100 Grubu (SVP+RU-TİN100): 14 gün 500 mg/kg sodyum valproat oral gavaj yolla verildi ve 30 dakika sonra 100 mg/kg oral gavaj yolla rutin 14 gün verildi.

### Doku Alımı

Rutin son uygulamasından 24 saat sonra (15.gün) sıçanlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek mide dokuları alındı. Alınan mide dokularının bir kısmı histopatolojik analizler için %10'luk formalin solüsyonuna alınırken diğer kısmı biyokimyasal analizler yapılmıyaca kadar -20 °C'de saklandı.

### Lipit Peroksidasyon Analizi

Lipit peroksidasyon analizi için MDA düzeyi belirlendi. Analiz için sıçanların mide dokuları %1,15 potasyum klorür (KCl) solüsyonu içerisinde homojenize edildikten sonra homojenizatlar 15 dk. boyunca 3,500 RPM'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısmı analizlerde kullanıldı. MDA seviyeleri, Placer et al. tarafından geliştirilen metot kullanılarak spektrofotometrik (Bio-Tek, A.B.D.) yöntem ile belirlendi (11).

### Antioksidan Analizi

Antioksidan durum analizi için KAT, SOD, GPx aktiviteleri ve GSH seviyeleri sıçan mide dokularından ölçüldü. SOD ve KAT düzeylerinin ölçümü için süpernatantlar, lipit peroksidasyondaki gibi elde edildi. GPx aktivitesinin ve GSH seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan süpernatantlar ise 10,000 RPM'de 20dk. santrifüj sonucu elde edildi. SOD aktivitesi Sun et al. yöntemine göre (12); KAT aktivitesi, Aebi yöntemine göre (13); GPx aktivitesi, Lawrence ve Burk tarafından geliştirilen yöntemine göre (14); GSH seviyeleri ise Sedlak ve Lindsay'ın belirlediği yöntemine göre ölçüldü (15). Enzim aktivitelerini hesaplamak için mide dokularının toplam protein içeriği gerekiyordu. Bunu belirlemek için Lowry et al. yöntemi kullanıldı (16). Analizlerde spektrofotometrik (Bio-Tek, A.B.D.) yöntem kullanıldı.

### RT-PCR Analizi

Sodyum valproat ve rutin uygulamaları sonrası ratlardan alınan mide dokuları öncelikle homojenize (TissueLyser II, Qiagen) edildi. Daha sonra RT-PCR analizleri için dokulardan total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için hibrizol reagent (Lot no: 0920-CC-945, HibriGen, Türkiye) kullanıldı ve tüm işlemler üreticinin talimatlarına uyularak gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop (BioTek Epoch) cihazında belirlendi. Sonraki aşamada total RNA'lar çift zincirli cDNA'lara dönüştürüldü. cDNA'lar oluşturulurken iScript cDNA Synthesis Kit'i (Bio-Rad, A.B.D.) kullanıldı ve işlemler üreticinin talimatlarına birebir uyularak gerçekleştirildi. cDNA oluşumunun doğrulanması için yine NanoDrop cihazında ölçüm alındı ve 260/280 oranları kontrol edildi. Sonrasında elde edilen cDNA'lar NF-κB, Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) ve Siklooksijenaz (COX-2), Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) genlerinin görel mRNA transkript seviyelerinin belirlenmesinde kullanıldı. mRNA transkript seviyeleri QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Kat no:204143; Qiagen, Almanya) ile Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında üreticinin talimatları doğrultusunda oluşturulan reaksiyon ile belirlendi. Reaksiyon karışımında kullanılan ve Tablo 1'de dizilimleri sunulan primerler Oligo 6.0 primer design programında tasarlandı. β-aktin internal kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 1 Primerlerin dizilimleri

Gene	Sequences (5'-3')	Length (bp)	Accession no
<b>NF-κB</b>	F: AGTCCCGCCCTTCTAAAAC R: CAATGGCCTCTGTGTAGCCC	106	NM_001276711.1
<b>TNF-α</b>	F: CTCGAGTGACAAGCCCCTAG R: ATCTGCTGGTACCACCAGTT	139	NM_012675.3
<b>COX-2</b>	F: AGGTTCTTCTGAGGAGAGAG R: CTCCACCGATGACCTGATAT	240	NM_017232.3
<b>Bax</b>	F: TTTCATCCAGGATCGAGCAG R: AATCATCCTCTGCAGCTCCA	154	NM_017059.2
<b>Bcl-2</b>	F: GACTTTGCAGAGATGTCCAG R: TCAGGTA CTAGTCATCCAC	214	NM_016993.2
<b>Kaspaz-3</b>	F: ACTGGAATGTCAGCTCGCAA R: GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA	270	NM_012922.2
<b>MMP9</b>	F: AGCTGGCAGAGGATTACCTG R: ATGATGGTGCCACTTGAGGT	230	NM_031055.2
<b>b-Actin</b>	F: CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG R: AGCTCAGTAACAGTCCGCCT	360	NM_031144.3

Cihazın verdiği CT değerleri ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduna göre genlerin normalizasyonları gerçekleştirildi (17).

### Histopatolojik Analiz

Deney sonunda sıçan mide dokuları %10'luk formalin solüsyonu içinde tespit amacıyla 48 saat tutuldu. Rutin histolojik takip prosedürlerine uyarak dokulardan parafin bloklar elde edildi. Ardında mikrotom aracılığıyla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı. Bütün gruplar X10 ve X20' lik büyütmede incelenerek konjesyon, hemoraji, mukoza hasarı, hücre infiltrasyonu ve bez dilatasyonu açısından skorlandı. Skorlama her bir parametre için (0 =Değişiklik yok, 1 =Hafif, 2 =Orta, 3 =Ağır) şeklinde puanlandı. Toplam maksimum skor 15 olacak şekilde hesaplandı. Histopatolojik analizler; bilgisayar destekli mikroskopla (Olympus CX 43, Japonya) fotoğraflandı ve başka bir histolog tarafından kör incelemeye tabi tutuldu incelendi.

### İstatistiksel Analiz

Tüm analizlerden elde edilen veriler, GraphPad Prism 5.0 yazılımından yararlanılarak ortalama±standart sapma olarak verildi. Veriler, çoklu karşılaştırmalar için Tukey'nin post hoc testleri ile tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  değeri kabul edildi.

## Bulgular

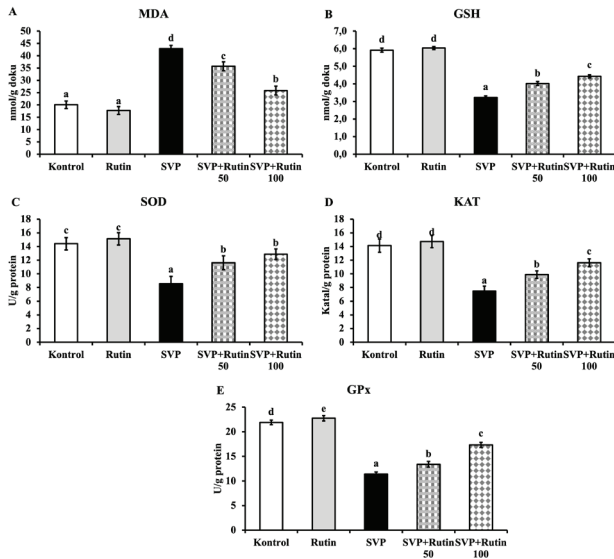
### Oksidatif Stres Bulguları

Mide dokularında antioksidan düzeyi için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ile GSH düzeyleri ve oksidan düzeyi için ise MDA seviyesi ölçülmüştür.

Elde edilen bulgulara göre, oksidan olan MDA düzeyi kontrol grubuna göre SVP grubunda artmıştır ( $p < 0.05$ ). SVP grubuna göre SVP+Rutin50 ve SVP+Rutin100 gruplarında ise MDA düzeyinde azalma meydana gelmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 1). Antioksidan düzeylerine göre, kontrol grubuna göre SVP grubunda SOD, KAT ve GPx aktivitelerinde ve GSH düzeyinde azalma ( $p < 0.05$ ), SVP grubuna göre SVP+Rutin50 ve SVP+Rutin100 gruplarında artış meydana gelmiştir ( $p < 0.05$ ). Rutinin farklı dozları kıyaslandığında 100 mg/kg daha fazla etki olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Rutin grubunda ise kontrol grubuna göre sadece GPx aktivitesinde anlamlı bir artış ( $p < 0.05$ ) varken diğer parametrelerde herhangi bir anlamlı değişiklik yoktur (Şekil 1).

### İnflamasyon Bulguları

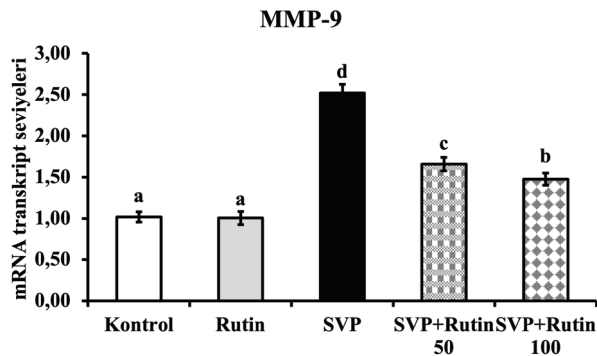
Mide dokularında inflamasyon ile ilişkili NF-κB, TNF-α ve COX-2 transkript düzeyleri RT-PCR metoduyla incelenmiştir. Kontrol grubuna göre SVP grubunda NF-



Şekil 1

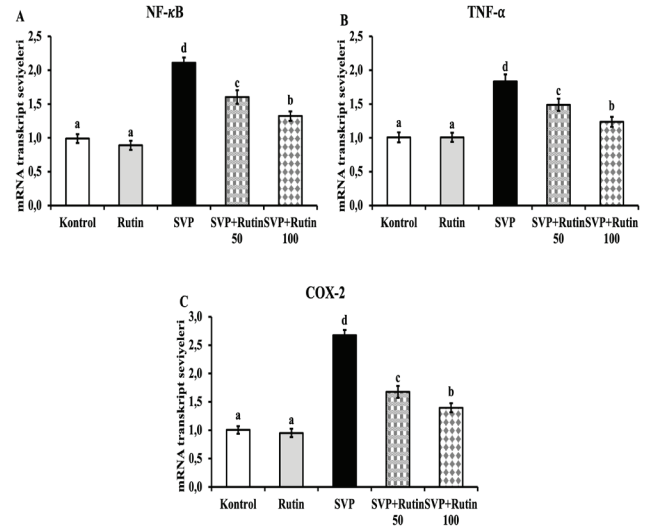
Grupların mide dokularında oksidan ve antioksidan bulguları. Sütunlar üzerindeki harfler grupların birbirleriyle arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.  $p < 0,05$ .

kB, TNF- $\alpha$  ve COX-2 mRNA transkript düzeylerinde anlamlı artış olmuştur ( $p < 0,05$ ). SVP grubuna göre SVP+Rutin50 ve SVP+Rutin100 gruplarında ise bu parametrelerde anlamlı azalma olmuştur ( $p < 0,05$ ). Rutinin farklı dozları kıyaslandığında 100 mg/kg daha fazla azalma olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Rutin grubunda ise kontrol grubuna göre tüm bu parametrelerde herhangi bir anlamlı değişiklik yoktur (Şekil 2). İnflamasyonda kilit ve son noktalardan olan MMP-9 düzeylerinde de benzer bulgular tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3

Grupların mide dokularında MMP-9 parametresi üzerine SVP ve Rutin etkileri. Sütunlar üzerindeki harfler grupların birbirleriyle arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.  $p < 0,05$ .

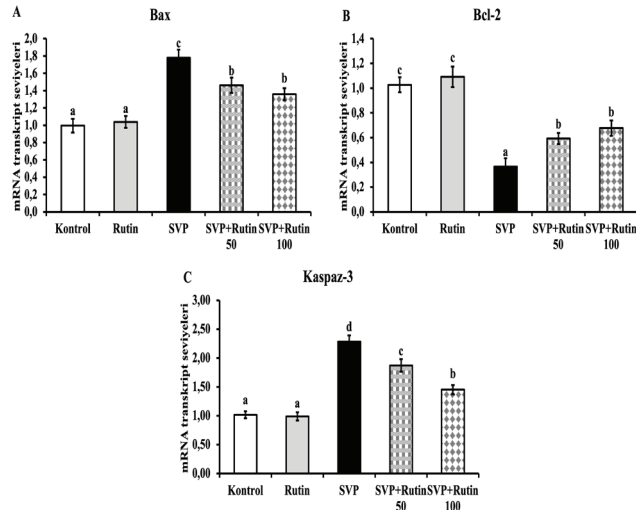


Şekil 2

Grupların mide dokularında inflamasyon parametreleri üzerine SVP ve Rutin etkileri. Sütunlar üzerindeki harfler grupların birbirleriyle arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.  $p < 0,05$ .

### Apoptoz Bulguları

Mide dokularında apoptoz düzeyini belirlemek amacıyla, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 mRNA transkript düzeyleri RT-PCR metoduyla ölçülmüştür.



Şekil 4

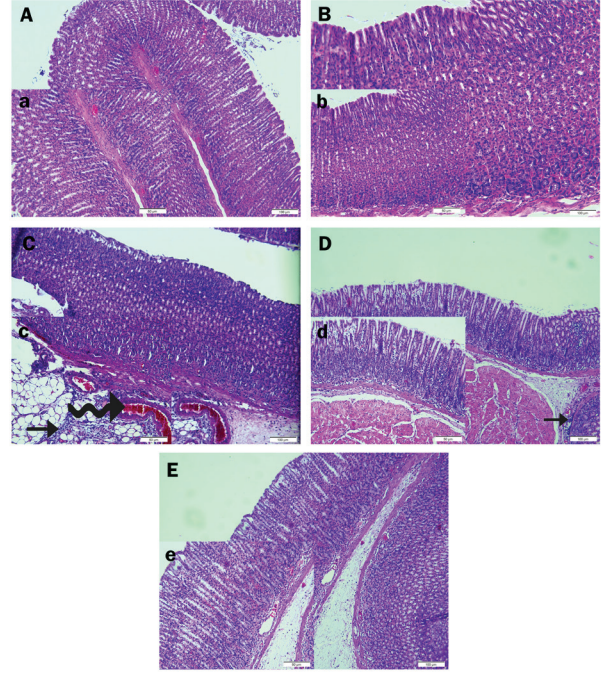
Grupların mide dokularında Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon düzeyi üzerine SVP ve rutin etkileri. Sütunlar üzerindeki harfler grupların birbirleriyle arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.  $p < 0,05$ .

mRNA transkript bulgularına göre, SVP grubunda kontrol grubuna apoptotik faktörler olan Bax ve Kaspaz-3 düzeylerinde artış ( $p<0.05$ ), antiapoptotik faktör olan Bcl-2 düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. SVP grubuna göre SVP+Rutin50 ve SVP+Rutin100 gruplarında ise bu durum tersine dönmüş, Bax ve Kaspaz-3 düzeylerinde azalma ( $p<0.05$ ), Bcl-2 düzeylerinde artış olmuştur ( $p<0.05$ ). Rutinin farklı dozları kıyaslandığında 100 mg/kg daha fazla etki olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Rutin grubunda ise kontrol grubuna göre tüm bu parametrelerde herhangi bir anlamlı değişiklik yoktur (Şekil 4).

### Histolojik Bulgular

Kontrol ve Rutin grubu mide ışık mikroskopik görüntüler incelendiğinde epitel düzgün dizilişli tek katlı prizmatik hücreler şeklinde görüldü. Gastrik mukozaya normal ve gastrik bezler bol, sıkı ve iyi düzenlenmiş yapı görüldü (Şekil 5A, 5B). SVP grubu incelendiğinde ise lamina propriasında ve submukozasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Özellikle bu gruptaki mukozalarda deskuamasyon gözlemlendi. Ayrıca vasküler konjesyon diğer gruplara göre daha fazla göze çarptı. Bu grupta lamina propriada bulunan gastrik bezlerin yer yer dilatasyona uğradığı tespit edildi (Şekil 5C). Sodyum valproat ile birlikte rutin uygulanan grupların mide histopatolojik görüntülerine bakıldığında, SVP grubuna göre patolojik değişikliklerin azaldığı gözlemlendi. Özellikle epitel ve mukozadaki hasarda azalma vardı. Bu gruplarda, dilatasyonun ve inflamatuvar hücrelerin yoğunluğunun hafiflediği saptandı. Özellikle 100 mg/kg rutin dozunun sodyum valproat ile birlikte verilmesi sonucu görüntüler kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 5D, 5E). Gruplara ait histopatolojik hasar skoru incelendiğinde ise SVP grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skorun istatistiksel olarak arttığı görülürken, rutin ile

birlikte verilen tedavi gruplarında ise histopatolojik hasar skorunda anlamlı bir azalma tespit edildi ( $p<0.05$ ). Özellikle yüksek doz olan 100mg/kg dozunun daha etkili olduğu gözlemlendi (Tablo 2).



Şekil 5

Mide dokusunun ışık mikrografları (H&E boyama; bar: küçük harfler 50  $\mu$ m – büyük harfler 100 $\mu$ m). (A,a): Kontrol grubu, (B,b): Rutin grubu, (C,c): SVP grubu; kıvrık ok: vasküler konjesyon, ok: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, (D,d): SVP+Rutin 50 grubu, (E,e): SVP+Rutin 100 grubu. (F): Histopatolojik hasar skoru (\* $p<0.05$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $p<0.05$  SVP ile karşılaştırıldığında, + $p<0.05$  SVP+Rutin 50 ve SVP+Rutin 100 karşılaştırıldığında. Veriler, ANOVA ve ardından Tukey testi kullanılarak analiz edildi.

Tablo 2

Histopatolojik hasar skoru

	Konjesyon	Hemoraji	Mukozal hasar	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	Dilatasyon	Toplam Skor
<b>Kontrol</b>	0,78±0,22	0,33±0,00	0,44±0,22	0,33±0,19	0,66±0,19	2,54±0,22 <sup>a</sup>
<b>Rutin</b>	0,55±0,11	0,22±0,11	0,11±0,11	0,77±0,11	0,66±0,19	2,32±0,19 <sup>a</sup>
<b>SVP</b>	2,44±0,22	1,89±0,11	2,11±0,22	2,11±0,11	2,11±0,11	10,65±0,38 <sup>d</sup>
<b>SVP+Rutin50</b>	1,66±0,19	1,00±0,00	1,22±0,11	1,55±0,11	1,33±0,19	6,76±0,44 <sup>c</sup>
<b>SVP+Rutin100</b>	1,22±0,11	0,89±0,11	0,44±0,22	1,00±0,00	0,78±0,22	3,91±0,31 <sup>b</sup>

Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı ifade eder \* $p<0,05$ . Veriler, ANOVA ve ardından Tukey testi kullanılarak analiz edildi.

## Tartışma

Epilepsi, kronik nörolojik bir hastalık olup tüm dünyada yaklaşık 50 milyon insanı etkileyen en ciddi hastalıklarından birisi olarak kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health) raporlarına göre, epilepsi çocukları etkileyen en yaygın dördüncü nörolojik hastalıktır (18). SVP, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı anti-epileptik ilaçlardan birisidir (19). Gastrointestinal rahatsızlıklar, SVP uygulamasının yaygın yan etkileri arasındadır (20). Rutin birçok bitkide doğal olarak bulunan, özellikle antioksidan özelliği nedeniyle farklı dokularda toksik ajanlara karşı koruyucu etkili bir flavanoiddir (21). Literatür taramasında Rutinin SVP kaynaklı mide toksisitesine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığına dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, SVP kaynaklı mide dokusu hasarında rutin oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır.

Hücre zarında lipitler en önemli bileşenlerden birisi olduğundan dolayı reaktif oksijen türevleri (ROS) düzeyindeki artış lipid peroksidasyonunu tetiklemektedir. MDA, çoklu yağ asitlerinin metabolizması sonucu açığa çıkan son ürünlerdendir (22). MDA, oksidatif stres düzeyinin önemli bir göstergesiyken, KAT, SOD ve GPx gibi enzimler, oksidatif stresi azaltarak antioksidan özellik göstermektedir (23). Oksidatif strese karşı koruyucu diğer faktörlerden birisi de ROS ürünlerini bağlayan GSH'tır (24). Oksidatif stresin SVP toksisitesindeki ana faktörlerden biri olduğu öngörülmektedir (3). Mevcut çalışmada, oksidatif stres bulgularına göre, SVP maruziyetine bağlı olarak mide dokularında MDA düzeylerinde artış ve antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeyinde azalma meydana gelmiştir. Diğer taraftan rutin uygulamasıyla birlikte artış gösteren MDA düzeylerinde azalma görülürken, azalan antioksidan enzimler KAT, SOD ve GPx ile GSH düzeylerinde artışlar meydana gelmiştir. Özellikle rutin 100mg/kg dozunda bu aktivitesi daha ön plandadır. Nitekim mevcut çalışmaya benzer olarak Tüzüner ve ark. tarafından sunulan çalışmada, SVP'nin mide dokusunda dengesiz bir oksidan/antioksidan hücresel süreç oluşturduğu, MDA'nın arttığı ve SOD aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (25). Kandemir ve ark. ise çalışmalarında, rutin antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve GSH seviyelerini artırarak oksidatif strese karşı önemli bir koruma sağladığını rapor etmişlerdir (3). Oksidatif stres bulguları bir arada değerlendirildiğinde, mide dokusunda SVP maruziyetinin oksidatif stresi arttırarak dokuda hasara neden olduğu, rutin tedavisinin ise bu etkiyi azaltarak mide dokularında oksidatif strese karşı antioksidan özelliğiyle iyileştirici etki göstermiştir.

İnflamasyon, dokularda oksidatif stresin uzamasına bağlı oluşan olaylardan birisidir ve NF- $\kappa$ B'nin ekspresyonu ile tetiklenir (3). NF- $\kappa$ B'nin aktive olmasıyla TNF- $\alpha$  ve COX-2 gibi proinflamatuvar sitokin genlerinde aktivasyon başlayarak inflamatuvar yanıt meydana gelir (26). TNF- $\alpha$ , inflamasyonun oluşmasında aktif rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerin bir tanesidir (27). COX-2, NF- $\kappa$ B geni tarafından eksprese edilerek normal dokularda ROS üretimi ile ilişkili inflamatuvar bir etkidir (28). MMP-9, doku gelişimi ve homeostazı sırasında, proliferasyonu, hücresel göçü ve hücresel farklılaşmayı düzenleyebilen adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve sitokinler dahil olmak üzere hücre dışı moleküller üzerinde kontrol sağlayarak önemli bir rol oynamaktadır. İnflamatuvar sitokinlerin MMP-9'un ekspresyonunu indükleyebildiği iyi bilinmektedir (29). Sunulan çalışmada, inflamasyon bulgularına göre, SVP maruziyetinin NF- $\kappa$ B'yi ve NF- $\kappa$ B'nin uyardığı TNF- $\alpha$  ve COX-2 mRNA transkript düzeylerinde artışa neden olduğu ve mide dokularında inflamasyonu tetiklediği tespit edilmiştir. SVP ile birlikte rutin uygulandığında bu durum rutine bağlı olarak tersi etki göstermiştir. Rutin uygulamasıyla birlikte tüm bu inflamasyon parametrelerinde azalma meydana gelmiştir. Rutinin 100mg/kg dozunda antiinflamatuvar aktivitesi daha fazladır. Mevcut çalışmaya benzer şekilde, Çağlayan ve ark. rutin uygulamasının NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  seviyelerini azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (7). İnflamasyon bulguları bir arada değerlendirildiğinde, SVP kaynaklı inflamasyonun neden olduğu mide doku hasarında rutin etkili bir iyileştirici ajan olarak ön plana çıkabilir.

Oksidatif stres durumunun uzaması diğer taraftan dokuda apoptozu da başlatmaktadır (30). Açığa çıkan ROS ürünleri büyük oranda mitokondride üretilir ve programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz gelişiminde önemli etkiye sahiptir (7). Aşırı ROS üretimi, gastrik mukozal epitel hücrelerinde apoptozu neden olarak gastrik mukozal hasara ve mukozal bariyer yıkımına aracılık etmektedir (31). Apoptoz, temel olarak hasarlanmış veya tehlikeli hale gelen hücreleri ortadan kaldırarak vücuttan uzaklaştıran koruyucu mekanizmadır. Ancak sağlıklı hücrelerde, hücresel stres veya hasar oluşturmaktadır (32). Apoptozda kilit faktörlerden birisi Kaspaz-3 olup (33) aktivasyonu sonrasında çoğu hücresel hedefin proteolitik bozulmasına ve sonunda hücre ölümüne neden olmaktadır. Bax, apoptotik faktör olup mitokondride membran gözeneklerini açarken, Bcl-2 ise tersi etki göstererek mitokondriyal membran gözeneklerinin açılmasını önleyerek antiapoptotik etki göstermektedir (34). Mevcut çalışmanın apoptoz bulgularına göre, mide dokularında SVP maruziyetine bağlı olarak apoptotik faktörlerden Bax ve Kaspaz-3 mRNA transkript düzey-

leri artmış, antiapoptotik faktör Bcl-2 mRNA transkript düzeyinde azalma meydana gelmiştir. SVP ile birlikte rutin uygulandığında bu durum tersi etki göstermiştir. Bax ve Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon düzeyinde azalma, Bcl-2 mRNA transkripsiyon düzeyinde artış meydana gelmiştir. Özellikle rutin 100mg/kg dozunda antiapoptotik aktivitesi daha ön plandadır. Dolayısıyla, SVP toksisitesinin mide dokusunda apoptozu tetiklediği ve rutin uygulamasının meydana gelen apoptozu karşı koruyucu etkili olduğu söylenebilir. Daha önceki bir çalışmada, rutin apoptozise karşı farklı dokularda koruyucu etki gösterdiği ve kaspaz-3, Bax ve sitokrom c ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (35).

Histolojik bulgulara göre, SVP kaynaklı tüm oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik hasar aynı zamanda doku düzeyinde de tespit edilmiştir. SVP kaynaklı mide dokusu histopatoloji bulgularına göre, epitellerde erozyon, deskuamasyon ve inflamasyona bağlı hücrel infiltrasyon sonucunda hücrel yapılarda bozulmalar tespit edilmiştir. Özellikle lipid peroksidasyonun artışı ile bu hasar düzeylerinin arttığını öngörmekteyiz. SVP ile birlikte rutin uygulandığında ise meydana gelen tüm hasar düzeylerinde azalmalar tespit edilmiştir.

Sunulan çalışmada, SVP'nin mide dokularında lipid peroksidasyonunu artırarak ve antioksidanların düzeyini azaltarak oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir. Oksidatif stresteki artışın, NF-κB yolağını tetikleyerek inflamasyona yol açtığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, oksidatif stresin ayrıca apoptozu da neden olduğu belirtilebilir. Sonuç olarak, temelde oksidatif stres ile tetiklenen bu yolların SVP tarafından tetiklenerek mide dokusunda toksik etki oluşturduğu ve rutin ile antioksidan özelliği sayesinde mide dokusunu bu toksik etkilere karşı koruduğu düşünülmektedir.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

#### Etik Kurul Onayı

Etik kurul izni Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alındı (11.11.2022 - 2022/12-265).

#### Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

#### Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler yazarlardan talep edilebilir.

#### Yazar Katkıları

SÇT: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Kaynakların Sağlanması; Makalenin Yazımı.

CG: Biyokimyasal ve moleküler Analizler; Proje Yönetimi; Denetim; Validasyon; Görselleştirme.

NA: Histolojik analizler ve yorumlanması; Validasyon; Makalenin Yazımı; Makalenin düzenlenmesi.

FMK: Çalışmanın planlanması; Finansman Eldesi; Kaynakların Sağlanması; İstatistiksel Analizler; Araştırma; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

#### Kaynaklar

- Ola OS, Adewole KE. Anticlastogenic and Hepatoprotective Effects of Kolaviron on Sodium Valproate-Induced Oxidative Toxicity in Wistar Rats. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 2021;8(1):167-179
- Adewole KE, Attah AF, Osawe SO. Exploring phytotherapeutic approach in the management of valproic acid-induced toxicity. *Advances in Traditional Medicine*. 2021;1-21. Doi: 10.1007/s13596-021-00575-6
- Kandemir FM, İleriturk M, Gur C. Rutin Protects Rat Liver and Kidney From Sodium Valproate-Induce Damage by Attenuating Oxidative Stress, ER Stress, Inflammation, Apoptosis And Autophagy. *Mol Biol Rep* 2022;49(7):6063-6074
- Patel AR, Nagalli S. Valproate Toxicity. [Updated 2022 Nov 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560898/>
- Mei X, Wu HC, Ruan M, Cai LR. Acute Liver Failure With Thrombotic Microangiopathy Due To Sodium Valproate Toxicity: A Case Report. *World J Clin Cases* 2021;9(17):4310-4317
- Sharma A, Sinha S, Narang A, Chouhan DK, Gupta S. Waddling Gait: A Complication of Valproate Therapy and a Thought Beyond Vitamin D Deficiency. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2020;20(1):e104-e108
- Çaglayan C, Kandemir FM, Darendelioğlu E, Yıldırım S, Kucukler S, Dortbudak MB. Rutin Ameliorates Mercuric Chloride-Induced Hepatotoxicity in Rats via Interfering with Oxidative Stress, Inflammation And Apoptosis. *J Trace Elem Med Biol* 2019;56:60-68
- Kandemir FM, Çaglayan C, Aksu EH, et al. Protective Effect of Rutin on Mercuric Chloride-Induced Reproductive Damage in Male Rats. *Andrologia* 2020;52(3):e13524
- Çaglayan C, Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Eser G. Rutin Protects Mercuric Chloride-Induced Nephrotoxicity via Targeting of Aquaporin 1 Level, Oxidative Stress, Apoptosis and Inflammation in Rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;54:69-78
- Çelik H, Kandemir FM, Çaglayan C, et al. Neuroprotective Effect Of Rutin Against Colistin-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rat Brain Associated with the CREB/BDNF Expressions. *Mol Biol Rep* 2020;47(3):2023-2034
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of Product of Lipid Peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in Biochemical Systems. *Anal Biochem* 1966;16(2):359-364
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 1988;34(3):497-500
- Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-958



15. Sedlak J, & Lindsay RH. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192–205
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265–275
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25(4):402-8
18. Soliman SS, Sedik GA, Elghobashy MR, Zaazaa HE, Saad AS. Greenness Assessment Profile of a Qbd Screen-Printed Sensor for Real-Time Monitoring of Sodium Valproate. *Microchem J* 2022;182:107859
19. Khani S, Hejazi SA, Yaghoubi M, Sharifipour E. Comparative Study of Magnesium, Sodium Valproate, and Concurrent Magnesium-Sodium Valproate Therapy in the Prevention of Migraine Headaches: A Randomized Controlled Double-Blind Trial. *J Headache Pain* 2021;22(1):21
20. Badria FA, Fayed HA, Ibraheem AK, State AF, Mazyed EA. Formulation of Sodium Valproate Nanospanlastics as a Promising Approach for Drug Repurposing in the Treatment of Androgenic Alopecia. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):866. doi:10.3390/pharmaceutics12090866
21. Gur C, Kandemir FM. Molecular and Biochemical Investigation of the Protective Effects of Rutin Against Liver and Kidney Toxicity Caused by Malathion Administration in a Rat Model. *Environ Toxicol* 2022;10.1002/tox.23700
22. Aksu EH, Kandemir FM, Özkara M, et al. Rutin Ameliorates Cisplatin-Induced Reproductive Damage via Suppression of Oxidative Stress and Apoptosis in Adult Male Rats. *Andrologia* 2017;49(1),10.1111/and.12593
23. Çelik H, Kucukler S, Çomaklı S, et al. Morin Attenuates Ifosfamide-Induced Neurotoxicity in Rats via Suppression of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neuronal Apoptosis. *Neurotoxicology* 2020;76:126-137
24. Gur C, Kandemir O, Kandemir FM. Investigation of the Effects of Hesperidin Administration on Abamectin-Induced Testicular Toxicity in Rats Through Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, Apoptosis, Autophagy, and JAK2/STAT3 Pathways. *Environ Toxicol* 2022;37(3):401-412
25. Alev-Tüzüner, B., Tunalı, S., Üstündağ, Ü.V., İpekçi, H., Emekli-Alturfan, E., Tunalı-Akbay, T., Yanardağ, R., Yarat, A. (2023). Chard extract increased gastric sialic acid and ameliorated oxidative stress in valproic acid-administered rats. *Food and Health*, 9(2), 139-147. <https://doi.org/10.3153/FH23013>
26. Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, et al. Protective Effects of Morin Against Acrylamide-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity: a Multi-Biomarker Approach. *Food Chem Toxicol* 2020;138:111190
27. Öz M, Şimşek H. The Antinociceptive Effect Of Adalimumab, a TNF-Alpha Inhibitor, in a Mice Model of Inflammatory Pain. *Türk Doğa ve Fen Dergisi* 2020;11(3):89-93
28. Elshawi OE, Nabeel AI. Modulatory Effect of a New Benzopyran Derivative via COX-2 Blocking and Down Regulation of NF-Kb Against T-Radiation Induced-Intestinal Inflammation. *J Photochem Photobiol B* 2019;192:90-96
29. Silva NJ, Nagashima M, Li J, et al. Inflammation and Matrix Metalloproteinase 9 (Mmp-9) Regulate Photoreceptor Regeneration in Adult Zebrafish. *Glia* 2020;68(7):1445-1465
30. Ekinçi-Akdemir FN, Bingöl Ç, Yıldırım S, et al. The Investigation of the Effect of Fraxin on Hepatotoxicity Induced by Cisplatin in Rats. *Iran J Basic Med Sci* 2020;23(11):1382
31. Şimşek H, Akaras N. Acacetin ameliorates acetylsalicylic acid-induced gastric ulcer in rats by interfering with oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *International Journal of Medical Biochemistry*, 2023;6(2), 96-103.
32. Akcılar R, Akcılar A, Koçak C, et al. Effects of Ukrain on Intestinal Apoptosis Caused by Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(12):22158–22166
33. Şimşek H, Demiryürek Ş, Demir T, et al. Assessment of Expressions of Bcl-XI, B-FGF, Bmp-2, Caspase-3, PDGFR-A, Smad1 and TGF-B1 Genes in a Rat Model of Lung Ischemia/Reperfusion. *Iran J Basic Med Sci* 2016;19(2):209
34. Kuzu M, Kandemir FM, Yıldırım S, et al. Morin Attenuates Doxorubicin-Induced Heart and Brain Damage by Reducing Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;106:443-453
35. Çelik H, Kandemir FM, Çağlayan C, et al. Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions. *Molecular biology reports*, 2020;47:2023-2034