

# Kafeik Asid Fenetil Ester'in İnsizyonel Yara Modelinde Plazma Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Durum ve Nitrik Oksit Seviyesi Üzerine Etkisi

## *Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Plasma Lipid Peroxidation, Antioxidant Status and Nitric Oxide Levels in Incisional Wound Model*

Gamze Serarşlan, Muhammed Enes Altuğ\*, Tünay Kontaş\*\*

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Antakya, Türkiye  
Mustafa Kemal Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi \*Cerrahi ve \*\*Biyokimya Anabilim Dalı, Antakya, Türkiye

### Özet

**Amaç:** Yara iyileşmesi, çeşitli hücrel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşim içinde olduğu karmaşık patofizyolojik bir süreçtir. Yapılan çalışmalarda çeşitli doğal ürünlerin iyileşme sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, balırsı propolisinin bir ekstresi olan kafeik asid fenetil esterinin (KAFE) ratlarda yara iyileşmesi üzerine olan etkisini tespit etmeyi amaçladık. **Gereç ve Yöntem:** Kırk adet erkek "Wistar" albino rat tedavi (n=20) ve kontrol (n=20) grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her bir ratın sırtına tam kalınlıkta lineer insizyon oluşturularak suture edildi. İnsizyon sonrası, çalışma süresi boyunca tedavi grubuna KAFE, kontrol grubuna serum fizyolojik her gün verildi. Biyokimyasal analiz için çalışmanın 1., 3., 7. ve 14. günlerinde her gruptan 5'er hayvanın kanları alındı.

**Bulgular:** KAFE uygulanan grupta glutatyon ve nitrik oksid düzeylerinde anlamlı bir artış, malondialdehid düzeyi ve süperoksid dismutaz aktivitesinde ise kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edildi.

**Yorum:** Çalışmada, KAFE'nin yara iyileşmesi üzerine antioksidan etki gösterdiği ve lipid peroksidasyonunu baskıladığı saptandı. Sonuç olarak, KAFE, bu özellikleri nedeni ile yara iyileşmesinde faydalı olabilir. (*Turkderm 2007; 41: 11-4*)

**Anahtar Kelimeler:** Kafeik asid fenetil ester, yara iyileşmesi, antioksidan durum, lipid peroksidasyonu

### Summary

**Background and Design:** Wound healing is a complex pathophysiologic process involving interplay of several cellular and biochemical processes. Several natural products have been shown to accelerate the healing process in studies. In this study we aimed to determine the efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), which is an extract of honeybee propolis on wound healing in rats.

**Materials and Methods:** Forty male Wistar albino rats were divided into two groups as treatment (n=20) and control (n=20) group. A linear full thickness incision was performed on the back of each rat and sutured. After incision, during the study period CAPE was administered to the treatment group and saline was administered to the control group every day. Bloods of 5 animals from each group were collected on the experiment days of 1st, 3rd, 7th and 14th for biochemical analysis.

**Results:** A significant increase in glutathione and nitric oxide levels and a significant decrease in malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in CAPE group were detected when compared to the control group.

**Conclusion:** In the study it determined that CAPE showed an antioxidant effect on wound healing and suppressed lipid peroxidation. In conclusion, because of these properties, CAPE may be useful in wound healing. (*Turkderm 2007; 41: 11-4*)

**Key Words:** Caffeic acid phenethyl ester, wound healing, antioxidant status, lipid peroxidation

### Giriş

Yara iyileşmesi, hücrel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşimini içeren patofizyolojik bir süreçtir. Hücrelerde reaktif oksijen ürünleri normal metabolizma sırasında devamlı üretilir ve hücreler, oluşan bu ürünlerin hasarından antioksidan mekanizmaları yolu ile kendilerini korurlar. Ancak bu denge bozulduğunda dokular oksidatif hasar ile karşı karşıya kalır<sup>1</sup>.

Deride oluşan hasar, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna, enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli serbest radikal süpürücülerde azalmaya, lipid peroksidasyonuna neden olur ve iyileşme sürecini etkiler<sup>2,3</sup>. Yara iyileşmesinde, serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkisini ortadan kaldırmak için E vitamini, askorbik asid, bazı bitki ekstraktları, seruloplazmin gibi antioksidanlar kullanılmıştır<sup>3-5</sup>. Kafeik asid fenetil ester (KA-FE), balırsı propolisinin aktif bir bileşenidir. Yapılan

çalışmalarda KAFE'nin antiinflamatuvar, immünomodülatör ve antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir<sup>6-8</sup>.

Bu çalışmada, deride insizyonel olarak yara oluşturulan ratlarda KAFE'nin antioksidan durum üzerine olan etkisini göstermek için süperoksit dismutaz (SOD) ve redükte glutatyon (GSH), lipid peroksidasyonunu saptamak için malondialdehid (MDA) ve yara iyileşmesinde rolü olan nitrik oksit (NO) seviyesi üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma, MKÜ Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınarak gerçekleştirildi. Ağırlıkları 200-250 g arasında değişen toplam 40 adet sağlıklı erişkin erkek albino Wistar rat kullanıldı. Ratların her biri ayrı kafase konularak standart bir diyet ile beslendi.

Ratlara "xylazine hydrochloride" (2-5mg/kg) ve "ketamine hydrochloride" (40-50mg/kg) ile anestezi uygulandı. Sırtları tıraşlanarak "polyvidon-iodine" ile temizlendi. Her bir ratın sırt bölgesinde, 8 cm. uzunluğunda lineer tam kalınlıkta insizyon oluşturularak 4/0 atravmatik ipek ile sütüre edildi. Ratlar tedavi (n=20) ve kontrol (n=20) grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. On adet ratın ise, insizyon ve tedavisi uygulanmadan 10 gün önce venöz kanları alındı ve bu değerler tedavi öncesi grubu oluşturdu.

İnsizyon sonrası, tedavi grubuna 10µmol/kg KAFE (Sigma, USA), kontrol grubuna ise aynı miktarda serum fizyolojik günde bir defa çalışma süresi boyunca intraperitoneal yoldan verildi. Çalışmanın 1., 3., 7. ve 14. günlerinde her gruptan 5'er hayvanın venöz kanları alındı. Sütürler 7. günde alındı.

Biyokimyasal analiz için lityum heparin içeren tüplere konulan örnekler, 10 dakika 3.000 rpm'de santrifüj edilerek plazma elde edildi. Analiz yapılabildiği kadar tüm örnekler -20°C'de saklandı. Plazma örneklerinden MDA, NO, GSH ve SOD çalışıldı. MDA seviyesi "Yoshoiko" ve ark. tarafından tanımlanmış olan metoda göre saptandı<sup>9</sup>. Nitrik oksit seviyesi, "Griess" reaksiyonu esas alınarak tespit edildi<sup>10</sup>. GSH seviyesi Beutler ve ark.'nın, total (Cu-Zn and Mn) SOD (EC 1.15.1.1.) aktivitesi ise Sun ve ark.'nın metoduna göre saptandı<sup>11,12</sup>.

İstatistiksel analiz hesaplanmasında "SPSS" ("SPSS for Windows version" 13.0) kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için "Independent Samples" Testi kullanıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Plazma GSH seviyesi kontrol grubunda 3. günde artış gösterdi, 14. günde ise tedavi öncesi seviyeye yakındı. KAFE grubunda ise GSH seviyesindeki artış kontrole göre yüksekti ve bu durum 7. ve 14. günlerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.01) (Tablo 1).

Plazma SOD aktivitesi, KAFE grubunda çalışma süresi boyunca kontrole göre düşüktü ve bu durum 14. günde istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.01). Kontrol grubunda SOD aktivitesinde çalışma süresi boyunca artış saptandı (Tablo 2).

Kontrol grubunda ilk günden itibaren plazma MDA seviyesinde artış tespit edildi ve bu durum tedavi sonuna kadar sürdü. KAFE grubunda ise, MDA seviyesi tedavi süresi boyunca kontrole göre daha düşüktü ve bu durum 1., 7. ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.01). Ondördüncü günde ise tedavi öncesi düzeydeydi (Tablo 3).

KAFE verilen grupta, NO seviyesi 1. günden itibaren artış eğilimindeydi. Yedinci günde en yüksek seviyeye ulaşarak, ardından azalma tespit edildi. Çalışma süresi boyunca kontrole göre yüksek seyretti ve 3. (p<0.05), 7. (p<0.01) ve 14. (p<0.01) günlerde istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 4).

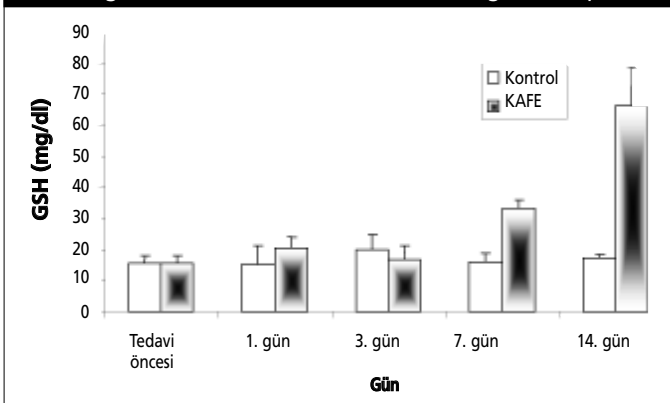
Klinik olarak ise, ratlarda oluşturulan yara dokusundaki kapanmanın KAFE grubunda, kontrol grubuna göre daha hızlı olduğu gözlemlendi.

## Tartışma

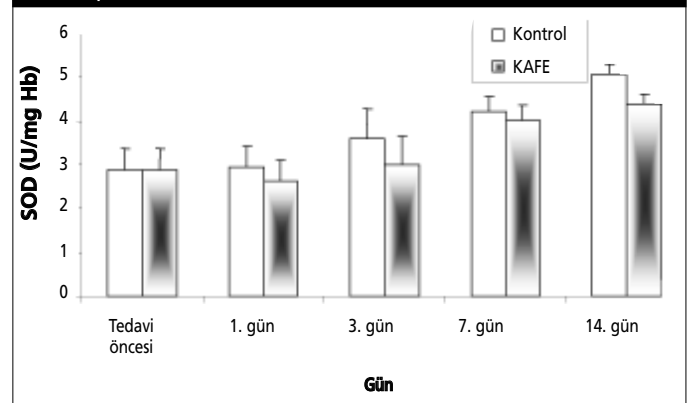
Propolis, balasının yaptığı ve binlerce yıl boyunca ilaç olarak kullanılmış olan doğal bir üründür. Propolis ekstresi aminoasitler, fenolik asitler, fenolik asid esterler, flavanoidler, sinamik asid ve kafeik asid içerir. Propolisin ve aktif bileşiklerinin antilipoperoksidatif, serbest radikal süpürücü etkileri vardır. Propolisin antioksidan etkisinde özellikle KAFE'nin önemli rolü olduğu bildirilmiştir<sup>13</sup>.

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitlerine atağı sonucu başlar. MDA ise, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür<sup>14</sup>. Serbest radikallerin artması veya azalmış antioksidan savunma mekanizması serum MDA seviyesinde artışa neden olur. Çalışmamızda KAFE'nin MDA seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu da KAFE'nin lipid peroksidasyon ürünlerini azaltarak baskıladığını ve kuvvetli bir antioksidan rolü olduğunu doğrulamaktadır. Ratlarda, yanık oluşturularak KAFE verilen bir çalışmada da benzer olarak li-

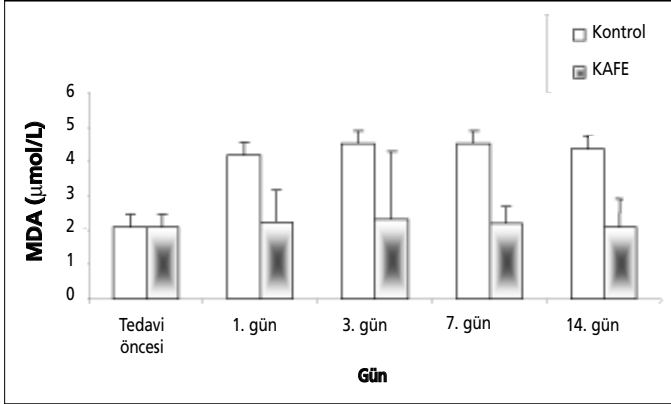
**Tablo 1.** Plazma GSH seviyesinde KAFE ve kontrol grubu arasında 7. ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0.01)



**Tablo 2.** Plazma SOD aktivitesinde 14. günde anlamlı fark tespit edildi (p<0.01)



**Tablo 3.** MDA seviyesinde 1., 7., 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p<0.01$ )



pid peroksidasyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bildirilmiştir<sup>15</sup>.

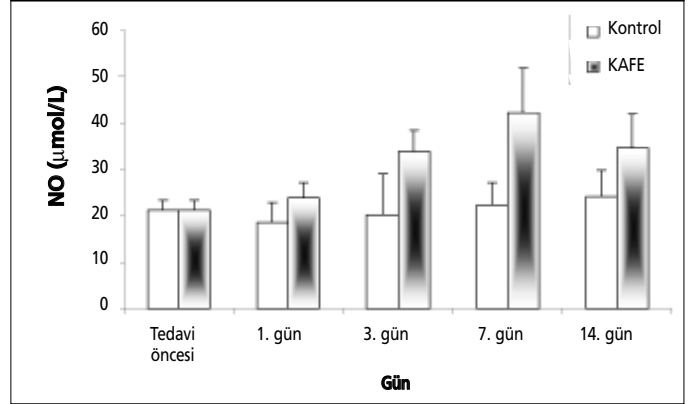
Reaktif oksijen ürünlerinin zararlı etkilerine karşı dokuları korumak için tüm hücrelerde çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar bulunur. Endojen bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikal ve superoksit radikal hasarı ile reaksiyon gösterir ve oksidatif strese karşı hücre savunmada önemli bir rol oynar<sup>16,17</sup>. Çalışmamızda, KAFE grubunda glutasyon seviyesindeki artış, oksidatif stres sırasında açığa çıkan reaktif oksijen ürünlerinin KAFE tarafından süpürülmesi sonucu olabilir.

SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren oksidatif strese karşı koruyucu enzimdir. Çalışmamızda, kontrol grubunda SOD aktivitesindeki artış, serbest radikallerdeki artışı göstermektedir. KAFE grubunda ise, kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Bu durum, KAFE'nin serbest oksijen radikalleri üzerine süpürücü etki göstererek enzimin artışı önlemesi yolu ile olabilir.

NO üretimi, normal yara iyileşmesi için gereklidir. Nitrik oksit sentaz inhibitörleri yara iyileşmesini geciktirirken, nitrik oksitin uygulanması ise, yara iyileşmesini hızlandırmaktadır<sup>18,19</sup>. "Yamasaki" ve ark. indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) yara oluşumundan 4-6 gün sonra pik seviyeye ulaştığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını bildirmişlerdir<sup>19</sup>. Yapılan çalışmalarda nitrik oksitin yara iyileşmesinde trofik etkisi olduğu, kollajen birikiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir<sup>20,21</sup>. Çalışmamızda KAFE grubunda, serum NO seviyesinin, kontrole göre çalışma süresi boyunca arttığı ve 7. günde ise en yüksek seviyeye ulaştığı saptandı. KAFE'nin NO seviyesini artırması dokuyu hasardan koruyarak, yara iyileşmesini hızlandırır. KAFE, bu etkisini nitrik oksit sentaz aktivitesini artırarak gerçekleştiriyor olabilir<sup>22</sup>. NO seviyesindeki artış anjiyogenez, endotelial ve epitelyal hücre proliferasyon ve migrasyonunu artırarak yara iyileşmesini hızlandırıyor olabilir<sup>19</sup>.

Çalışmamızda, lipid peroksidasyonundaki artışın işaret ettiği gibi, doku hasarının serbest radikallerde artışa neden olduğu gösterildi. KAFE'nin ise antioksidan etki gösterdiği, lipid peroksidasyonunu baskıladığı saptandı. Ayrıca yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinen NO seviyesinde artışa neden oldu. Sonuç olarak KAFE'nin bu özellikleri nedeni ile yara iyileşmesinde faydalı bir ajan olarak kullanılabileceği inandırıcıdır.

**Tablo 4.** NO seviyesinde 3., 7., 14. günlerde anlamlı fark bulunuyordu ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ )



## Kaynaklar

1. Hoşnüter M, Gürel A, Babuçcu O, Armutçu F, Kargı E, Işıkdemir A: The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 2004;30:121-5.
2. Gupta A, Singh RL, Roghubir R: Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Mol Cell Biochem* 2002;241:1-7.
3. Musalmah M, Fairuz AH, Gapor MT, Ndah WZW: Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nurt* 2002;11(Suppl): S448-51.
4. Suguna L, Singh S, Sivakumar P, Sampath P, Chandrakasan G: Influence of Terminalia chebula on dermal wound healing in rats. *Phytother Res* 2002;16:227-31.
5. Shirwaikar A, Somashekar AP, Udupa AL, Udupa SL, Somashekar S: Wound healing studies of Aristolochia bracteolata Lam with supportive action of antioxidant enzymes. *Phytomedicine* 2003;10:558-62.
6. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS: Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res* 1993;19:197-203.
7. Natarajan K, Gingh S, Burke TR, Grunberger D, Aggrawal BB: Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription NF- $\kappa$  B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9090-5.
8. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG: Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994;41:9-13.
9. Yoshiko T, Kawada K, Shimada T: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:372-6.
10. Cortas K, Wakid NW: Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36: 440-3.
11. Beutler E, Olga D, Barbara MR: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882-8.
12. Sun Y, Oberley LW, Ying LA: Simple method for clinical assay of SOD. *Clin Chem* 1988;34: 497-500.
13. Russo A, Longo R, Vanella A: Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002;73(Suppl 1):S21-9.
14. Özyurt H, Irmak MK, Akyol Ö, Söğüt S: Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct* 2001;19:259-63.
15. Armutçu F, Gürel A, Hoşnüter M, Pabuçcu, Altınyazar C: Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative erythrocyte damage in a rat model of thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 2004;25:171-8.

16. Griffith OW: Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:922-35.
17. Scuito AM: Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection. Baskin SI, Salem H, editör. *Oxidants, antioxidants, and free radicals*. Washington DC: Taylor and Francis Publishers, 1997,171-91.
18. Bulgrin JP, Shabani M, Chakravarthy D, Smith DJ: Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds. *Wounds* 1995;7:48-57.
19. Yamasaki K, Edington HDJ, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovsdi I, Steed DL, Billiar TR: Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998;101:967-71.
20. Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F: Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. *Neurosci Lett* 1995;200:17-20.
21. Schaffer MR, Tantry M, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A: Diabetes impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery* 1997;121:513-9.
22. Koltuksuz U, Mutuş HM, Kutlu R Özyurt H, Çetin S, Karaman A, Gürbüz N, Akyol Ö, Aydın NE: Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. *J Pediatr Surg* 2001;36:1504-9.