

Anason (*Pimpinella anisum*) Ekstresinin Deneysel Akut Karaciğer Hasarında Karaciğer Koruyucu Etkisi Var Mı?

Ender Erdoğan*, Abdulgaffar Kaya*, Murat Çetin Rağbetli*, Hanefi Özbek**, Nureddin Cengiz*

Özet:

Ratlarda karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulan akut karaciğer hasarı modelinde anason (*Pimpinella anisum*) uçucu yağı ekstresi ve antioksidan ajanlardan Vitamin C ve E'nin hepatoprotektif aktiviteleri plasebo ile karşılaştırılmalı olarak araştırıldı. Deney süreci sonrasında saptanan postmortem histopatolojik bulgular, Vitamin C ve E'nin karaciğer hasarını önleyici etkilerinin kuvvetli olduğunu anason (*Pimpinella anisum*)'un ise hepatoprotektif bir özelliğinin olmadığı, hatta karaciğer fonksiyonlarının kısmen daha da olumsuz etkilendiğini gösterdi. Vitamin C ve E gruplarında olumlu, anason (*Pimpinella anisum*) grubunda ise olumsuz yönde değişim gösteren serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH) ve indirekt bilirubin seviyelerinde kontrol ve CCl₄ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Ratların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler de biyokimyasal sonuçları destekleyen niteliklerde idi. Sonuç olarak akut karaciğer hasarında anasonun karaciğeri koruyucu bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Anason (*Pimpinella anisum*), sıçan, vitamin C, vitamin E, hepatoprotektif etki.

Özellikle yurdumuzda yaygın olarak yetişen ve kullanılan bir bitki olan anason (*Pimpinella anisum*); Anadolu'da yaygın olarak yetişen *Apiaceae* familyasından aromatik bir bitki olup; eskiden beri yaprak ve çiçekleri ile tohumundan tonik, antispazmodik, ekspektoran, antiseptik, antifungal, sedatif, antidepresan ve galaktogog olarak yararlanılmakta; %70-90 *anaethole* içeren ekstreleri de uyarıcı, tonik, aromatik özellikleri ile bilinmektedir. Hepatoprotektif etkisi olduğu da düşünülmektedir (1).

Karaciğer anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile birçok toksik, zararlı madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan bir organdır. Karaciğerde hasar dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan 600'den fazla ilaçtan biri de karbon tetraklorür (CCl₄)'dür. (2, 3).

Bu hasarın değişik şekillerinin, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir. Toksik okside ve hidroksi radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit membranlarını hasarlayabilecekleri *in vivo/in vitro* ortamlarda deneysel olarak gösterilmiştir (4,5).

Hepatoprotektif ajanların kullanımı, doku hasarını önleme ve morbidite/mortalite oranlarını azaltmada etkili olabilmekte ve bir tedavi alternatifi oluşturabilmektedir. Bu amaçla, antioksidan ajanlardan Vitamin C (askorbik asit) ve vitamin E (alfa-tokoferol) yanı sıra birçok bitkisel farmasötik madde kullanılmaktadır. Aynı familyadan rezene uçucu yağı ile yapılan bir çalışma, bu bitkinin hepatoprotektif kapasitesini ortaya koymuştur (6). Anason ile yapılan deneysel çalışmalar ise sınırlı olup; bu tür etkisini araştıran bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Bu çalışmada; anason (*Pimpinella anisum*) uçucu yağ ekstresinin deneysel olarak karbon tetra-klorür (CCl₄) ile oluşturulmuş akut karaciğer hasarında koruyucu bir etkisinin olup olmadığını bilinen diğer koruyucu etkili ajanlarla karşılaştırmalı olarak araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışma toplam 36 adet Sprague-Dawley ratda yapılmıştır. Oda koşullarında tutulan sıçanlar,

VII.Ulusal Histoloji & Emb. Kongresi (Mersin)'nde sözlü olarak sunulmak üzere kabul edilmiştir.

Not: YYÜ SBE (2003) Lisansüstü tezinden özetlenmiştir.

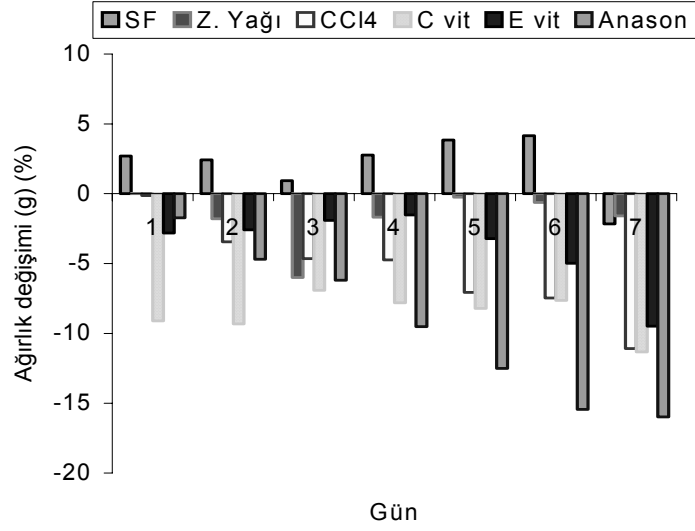
* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,

**Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı,

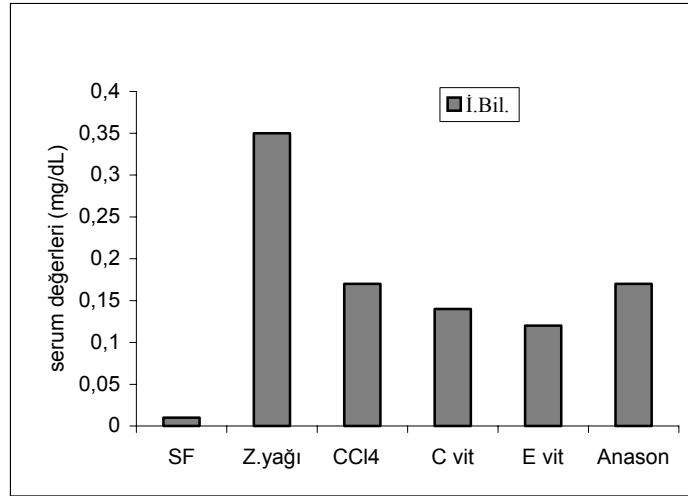
Yazışma Adresi: Yrd.Doç.Dr.Ender ERDOĞAN

YYÜ Tıp Fakültesi,Araştırma Hastanesi, Temel Bilimler Binası

65020 Van / Türkiye



Şekil 1. Çalışma gruplarındaki ratların günlük vücut ağırlığı değişimleri (%).



Şekil 2. Kontrol ve çalışma gruplarındaki ratlarda serum, indirekt bilirubin düzeyleri.

şehir şebeke suyu ve standart pellet sanayi tipi rat yemi ile beslenmiştir.

Anason (*Pimpinella anisum*) tohumlarından buhar distilasyonu ile (verim ~%1) çıkarılan uçucu yağ ekstresi kullanılmıştır. Çalışmada altışar adet rattan oluşan 6 grup oluşturulmuştur.

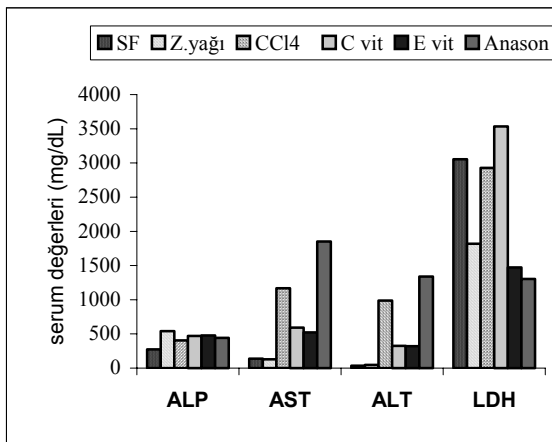
Kontrol Grupları: Ratlara çalışma boyunca 1. gruba: 0,2 ml ip yolla SF (Serum fizyolojik) ve 2. Kontrol grubuna 8 ml/kg ip yolla zeytin yağı uygulandı.

Deney Grupları: ratlara 7 gün boyunca 3. gruba CCl₄ (0,8 ml/kg ip olive oil 1/1 karışım), 4.,5.,6. gruplara ise; aynı doz CCl₄'e ilaveten, sırasıyla,

Vitamin C (Redoxon® amp. 140 mg/kg ip) Vitamin E (Evigen® amp. 60 mg/kg im) ile anason (*Pimpinella anisum*) uçucu yağı ekstresi (0.3 ml/kg/gün ip LD₁₀ dozu) uygulandı. Hayvanlar çalışma boyunca günlük olarak tartıldı. Yüzde ağırlık değişimleri hesaplanıp; gruplar kendi içinde ve birbiriyle karşılaştırıldı. Ratlar 8. gün sakrifiye edildikten sonra kardiyak ponksiyonla 2 cc kan örneği alındı, karaciğer metabolizması ile ilgili biyokimyasal parametreler (serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase

(LDH) ve bilirubin) ölçülerek karşılaştırıldı.

Tüm deneklere uygulanan postmortem karaciğer ekzisyonu ile alınan doku örnekleri tamponlu %10'luk formalinde tespit edilip parafin bloklara alındı. Bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere HE, PAS ve gümüşleme (retikülin) boyaları uygulandı. Preparatlar Zeiss Axioskop 2 mikroskopta histopatolojik olarak değerlendirildi ve dijital olarak görüntülendi. İstatistik analiz için elde edilen verilere "ANOVA" veya "Kruskall-Wallis" varyans analizi istatistik yöntemi ile "Mann-Whitney-U testi" uygulandı



Şekil 3. Kontrol ve çalışma gruplarındaki ratların serum, karaciğer enzim düzeyleri.

Bulgular

Ağırlık Takibi Sonuçları:

Günlük ağırlık değişimlerine bakıldığında (Şekil 1) tüm gruplarda son günlerde değişimin hızlandığı, istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) olan bu genel düşüşün anason grubundaki düşüşten kaynaklandığı ($p<0.05$) diğer gruplarda anlamlı olmadığını gördü ($p>0.05$). Tüm gruplarda operasyon öncesi günde (7. gün) hızlı bir ağırlık düşüşü görülmekle birlikte bunun da anason grubu hariç istatistiksel bir önemi yoktur ($p>0.05$).

Biyokimya Sonuçları:

Çalışma ve kontrol gruplarından sekizinci gün alınan kan örneklerinde ölçülen bazı biyokimyasal parametrelerden karaciğer fonksiyonlarını ortaya koyan: AST, ALP, ALT, LDH gibi işlevsel enzimlere ait veriler Şekil 2'de indirekt bilirubine ait veriler Şekil 3'de gösterilmiştir. CCl₄ grubunda kontrol gruplarına göre; indirekt bilirubin ($p<0.001$), SF grubuna göre ise AST düzeyinde ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlemlendi. Vitamin C ve E grubunda ise kontrol gruplarına göre;

indirekt bilirubinde artış ($p<0.05$), ayrıca Vitamin E grubunda ALP düzeylerinde artış ve LDH düzeylerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p<0.05$) varsa da bu sonuçlar da CCl₄ grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemekteydi ($p>0.05$).

Anason grubunda ise, kontrol grubuna göre; indirekt bilirubinde ($p<0.001$), ayrıca; AST ve ALT düzeylerinde tüm diğer gruplara göre bir artış ($p<0.01$) ve LDH düzeylerinde ise Vitamin C grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p<0.05$) görüldü. ALP yönünden CCl₄ grubuna göre istatistiksel öneme sahip bir farklılığa rastlanmadı ($p>0.05$).

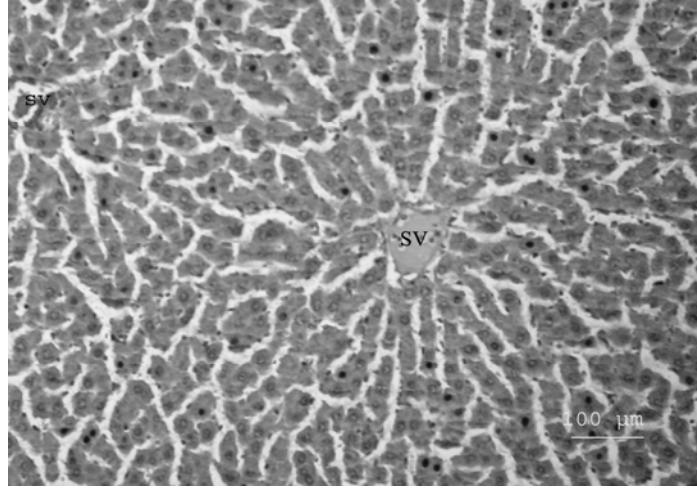
Histopatolojik Değerlendirme:

Kontrol gruplarına ait kesitlerin incelemesinde sıçan karaciğer dokularının normal sınırlarda oldukları görüldü (Resim1). CCl₄ grubunda: hepatik asinus Zon I'in özellikle portal triad bölgesinde belirgin, Zon II ve III'e doğru azalan, balon dejenerasyonunun ön planda olduğu bir histopatoloji görüldü (Resim2). Dejenere hücrelerin granüllü bir sitoplazma ve sentrik fakat piknotik çekirdekli olduğu, retiküler yapıda da yer yer kollapsa varan bir bozulma geliştiği dikkati çekmekteydi.

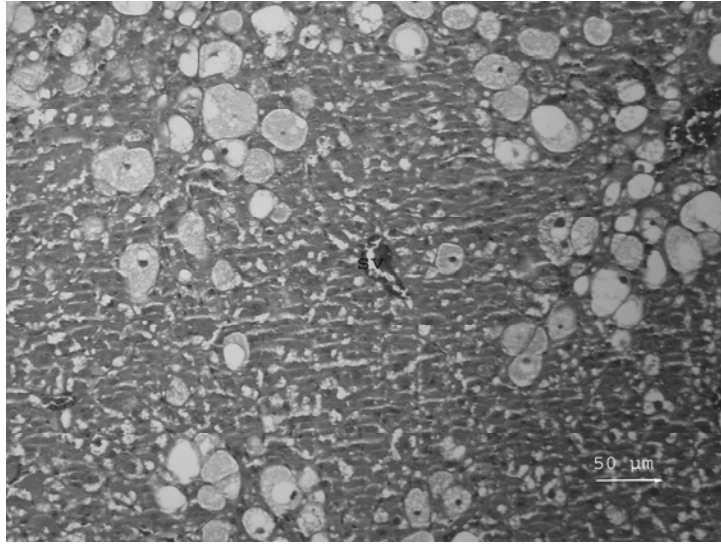
Vitamin C grubunda, önemli bir dejenerasyon ve yağlanma (steatosiz) bulgusu olmamakla birlikte; Zon I'de nadiren vakuollü hücrelere rastlanmaktaydı. Vitamin E grubundaydı; hemen tamamen normal karaciğer histolojisine ait bir görünüm vardı. Glikojen, retiküler lif dağılımı da kontrol gruplarına yakındı. Anason grubunda; CCl₄ grubu ile benzer olarak; klasik lobül yapısı devam etse de; zon I ve yine özellikle portal triad bölgesinde belirgin balon dejenerasyonunun yer yer zon II'ye doğru ilerlediği ve hücreler kordonlar arasında mikroveziküler tarzda bir yağlanmanın da başladığı gözlemlendi (Resim 3). Hepatosit konturlarında düzensizlik, glikojen birikiminde azalma, retiküler ağ yapısında bozulmayla birlikte santral ven ve sinüsoid yapılarında da hafif genişlemeler saptandı. Mononükleer hücre ve nötrofil infiltrasyonuna ait bir bulguya rastlanmadı.

Tartışma

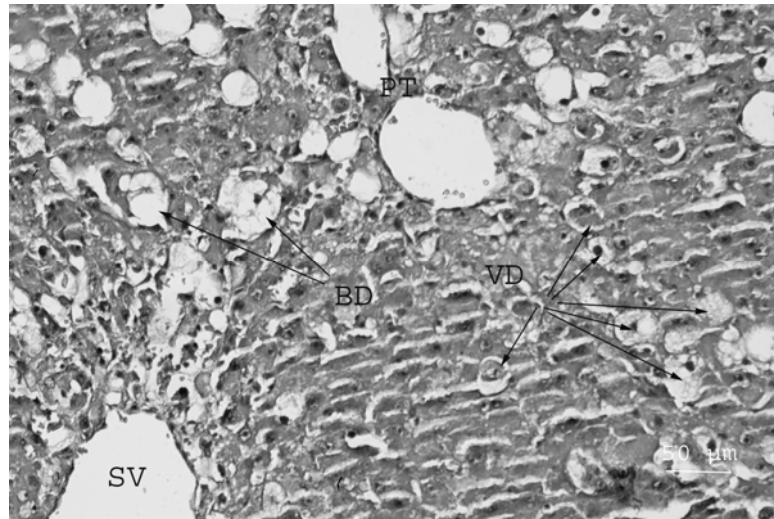
Karaciğer hasarının değişik formları, oksidatif stres ve bunu takiben oluşan toksik serbest radikallerle oluşmaktadır (7,8). Bunların, lipit peroksidasyonu ve diğer yollarla hepatositlerin hücre membranlarını hasarlayabileceği bilinmektedir (9). Serbest radikal miktarı, endojen sellüler fagosit sistemin kapasitesini aştığında, önemli hücresel hasar meydana gelmektedir (10). Karaciğer hasarı modeli için sık kullanılan bir madde olan CCl₄'ün hepatotoksik



Resim 1: Kontrol (zeytinyağı) grubuna ait ratlara ait normal karaciğer histolojisi (H&E-X25).



Resim 2: CCl₄ grubuna ait sentrizonal karaciğer histolojisi (H&E-X25)



Resim 3: Anason deney grubuna ait histoloji (BD: Balon dejenerasyonu VD: vakuloer dejenerasyon sahaları) (H&E-X25).

etkisi, reaktif ara ürünlerinin metabolik aktivasyonuna ve lipit peroksidasyonundaki artışa bağlı olup; parçalanma ürünleri de (en çok reaktif aldehitler) hücrede birikerek hasarın daha ağırlaşmasına sebep olurlar (7). Çalışmamızda yedi günlük CCl₄ uygulaması sonrası akut karaciğer toksisitesine ait literatürde bildirilen bulguların çoğu izlendi. Sürenin sınırlı tutulması daha ileri tabloların görülmesini önlemekle birlikte; sağ kalım oranlarını artırarak deneyin izlenebilir ve tamamlanabilmesine de olanak sağlamaktadır.

Histopatolojik değişiklikler klasik karaciğer lobüllerinin periferinde ve sentrizonal (zon I) bölgede daha belirgindi ve balonlaşma ön plandaydı. CCl₄'den en az etkilenen bölge, santral vene yakın, zon III'e ait kısımlardı. CCl₄ ile daha önce ve daha yüksek dozda karşılaşan zon I hücreleri, inlet damarları ile gelen kanla da ilk karşılaşanlardır (11). Bu histopatolojik tablonun klinik ve biyokimyasal bulgulara aynı oranda yansımaması, karaciğerin tolerans özelliğine bağlıdır. Sıçan karaciğeri %75'ine kadar olan patolojileri yenebilmekte ve hatta hücrel hasar arttıkça azalan chalon'ların etkisinin kalkmasıyla da rejenerasyon kapasitesi artmaktadır. Fakat, patoloji belirli eşik değeri aştığında ağır bir morbidite ve hatta mortaliteye neden olmaktadır (12).

Çalışma gruplarının ağırlık değişimi oranlarında son günlere doğru artan bir kilo kaybı dikkati çekmekte ise de istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı, bu durumun toksisitenin ilerlemesi ile karaciğer harabiyetinin de giderek artmasına bağlı olduğu düşünüldü. Biyokimyasal parametrelerden karaciğer işlevleriyle direkt ilişkili enzimler yanı sıra indirekt bilirubin fazla yükselmemesi de yine bu toleransa bağlı olabilir. Doğaldır ki; bu parankimatöz patolojik değişimden en hızlı etkilenecek biyokimyasal parametreler karaciğer enzimleriyken; indirekt bilirubin daha geç yükselir. Akut CCl₄ uygulanmasıyla oluşturulan hepatosit nekrozunda, Vitamin E ve Vitamin C başarılı sonuçlar elde edildi. Vitamin C, organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar (13). Suda çözünen zincir kırıcı antioksidan olan Vitamin C, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları temizler ve Fe⁺³, Cu⁺² gibi geçiş metallerinin bulunduğu ortamlarda da prooksidan ve lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterir (14,15). Çalışmamızda vitamin C grubundaki histolojik değişikliklerin -CCl₄ grubuna göre-minimal (kontrol grubuna çok yakın) olmasına

rağmen biyokimyasal verilerin belirgin düzelmemesi, tablonun kliniğe geç yansımaya bağlı olabilir.

Vitamin E lipofilik özelliği ile membran moleküllerine bağlanıp yüzeyine yerleşir (16). Memeli hücrelerinde, lipit peroksidasyonunu inhibe eden oksidatif stresin başlıca inhibitörü olduğu düşünülmektedir. Profilaktik olarak besinlerle verilmesinin, kronik CCl₄ uygulanmasıyla oluşan karaciğer hasarından ratları koruyacağı öngörülmektedir (17,18). Bu çalışmada histopatolojik tabloyu düzeltmedeki etkisi daha belirgin olup; antioksidan kapasitesinin daha güçlü olduğunu düşündürmektedir. Literatürde anason ile yapılan deneysel araştırmalar sınırlı olup; karaciğer koruyucu etkisini araştıran karşılaştırmalı bir çalışmaya da rastlanılmamıştır.

Çalışmada anason ile tedavi edilen grupta ağırlık değişimi bakımından olumsuz yönde bir etkisinin olduğu, biyokimyasal parametrelerdeki kötüye gidişin de buna paralellik gösterdiği ortaya konmaktadır. Bu tablo ile uyumlu olarak; CCl₄ grubundakine benzer bir histopatolojik görünüme yer yer mikroveziküler tip yağlanmanın da eklendiği izlenmiş; vitamin gruplarındaki düzleme yönünde herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bu da anasonun antioksidan kapasitesinin olmadığını, hatta CCl₄'ün oluşturduğu akut karaciğer toksisitesi tablosunda görülen hücrel hasarı karaciğere fazladan bir yük yükleyerek daha da artırabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; anason (*Pimpinella anisum*) bitkisinden elde edilecek uçucu yağ ekstresinin 7 günlük deneysel akut karaciğer toksitesini modelinde hepatoprotektif bir ajan olarak klinik, biyokimyasal ve histopatolojik bir olumlu etkiye rastlanılmamıştır.

A Morphological Study of the Hepatoprotective Effects of Anise (*Pimpinella anisum*) Extract in Experimentally Induced Acute Liver Degeneration in Rats

Abstract:

*Hepatoprotective activity of anise (*Pimpinella anisum*) and anti-oxydant agent Vitamin C, E was studied in carbon tetrachloride (CCl₄) induced acute liver injury model in rats. The findings were suggested that Vitamin C and E have strongly hepatoprotective effects of anise oil has a negative effect in liver functions. Whereas the changes in body weights of the rats in each study group were in accord with the biochemical and post-mortem histopathological findings. Vitamin C and E resulted*

in decreased levels of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). AST, ALT, alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), and indirect bilirubin levels were changed positively in Vitamin C and E group and negatively in anise group and there are statistical differences between study and both placebo and CCl₄ groups. The results of the study clearly indicate that anise, has not a potent hepatoprotective effect against carbon tetrachloride (CCl₄) induced hepatic damage in rats.

Key words: *Anise (Pimpinella anisum) rat, vitamin C, vitamin E, hepatoprotective effect.*

Kaynaklar

1. Launert E: Edible and medicinal plants, Covers plants in Europe, a drawing of each plant, quite a bit of interesting information. Hamlyn, 1981.
2. Robbins SL, Cotran RS, Kumar: V Basic Pathology. 6th Ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 2000, pp: 516-519,
3. Zimmerman HJ: The adverse effects of drugs and other chemicals in the liver Hepatotoxicity. New York, Appleton Century Crofts, 1978.
4. Sherlock S: The spectrum of hepatotoxicity due to drugs. Lancet 2: 440-444, 1986.
5. Foulis PR, Sandford BH, Gottfried M: Drug induced morphologic changes in the liver. Ann Clin Lab Sci 18: 215-228, 1988.
6. Özbek H, Uğraş S, Dülger H, Bayram İ, Tuncer İ, Öztürk G, Öztürk A: Hepatoprotective effect of fennel (Foeniculum vulgare) essential oil. Fitoterapia, 74(3): 317-9. 2003.
7. Brattin WJ, Glende EA and Recknagel RO: Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Free Radic Biol Med, 1: 27-28, 1985.
8. Comporti M: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab Invest, 53: 599-623, 1985.
9. Halliwell B and Gutteridge J: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitions metals and disease. Biochem J, 219: 1-14, 1984.
10. Slater TF: Free radicals mechanisms in tissue injury. Biochem J, 222: 1-15, 1984.
11. Bruckner JV, Mackenize WF, Muralidhara S, Luthra R, Kyle M, Costa DA: Oral toxicity of carbon tetrachloride; acute, subacute, and subchronic studies in rats. Fundam Appl Toxicol, 6: 16-34, 1986.
12. Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. Pennsylvania, WB Saunders Co, 1997. pp: 346-355
13. Menteş G: Harper'in Biyokimyası. İstanbul, Barış kitapevi, 1993 pp: 703-713.
14. Yu PB: Cellular defenses against damage form reactive species. Physiol Rev, 74(1): 139-162, 1994.
15. İnal M, Akyüz F, Kanbak G, Ersöz N, Uzuner K: Antioxidant enzyme activities in type II diabetes mellitus and protective role of ascorbic acid and alpha-tocopherol. Ann Med Sci, 10 (1): 12-15, 2001.
16. Gomez Fernandez JC, Villalain J, Aranda FJ, Ortiz A, Micol V, Cautinho A, Berberan Santos MN and Preto MJE: Localization of alpha-tocopherol in membranes. Ann NY Acad Sci, 570: 109-120, 1989.
17. Yao T, Esposti SD, Huang L, Amon R, Spangenberg A and Zern MA: Inhibition of carbon tetrachloride induced liver injury by liposomes containing Vitamin E. Am J Physiol, 30: 476-484, 1994.
18. Urano S and Matsuo M: Membrane stabilizing effect of Vitamin E. Ann NY Acad Sci, 570: 7-22, 1989.