

Ultraviyole Radyasyona Maruz Bırakılan Ratlarda Ellajik Asit Ve Silibininin Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisinin Araştırılması

Investigation of Effects of Ellagic Acid and Silibinin On Some Haematological Parameters In Rats Exposed To Ultraviolet Radiation

Halil Özkol¹, Murat Çetin Rağbetli², Seda Keskin², Yasin Tülüce¹, Ergin Taşkın^{3*}, Veysel Tahiroğlu³, Seda Çelik³, Duygu Mine Yavuz³, Hami Keskin³

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Van

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Van

³Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Kars

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat modelinde ultraviyole A (UVA) ve ultraviyole B (UVB) maruziyetinin neden olduğu hematolojik parametrelerdeki değişiklikler üzerine ellajik asit ve silibininin etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Toplam 20 rat beşer rattan oluşan dört gruba ayrıldı: sağlıklı kontrol grubu (K), UV'ye maruz bırakılan grup (UV), ellajik asit verilerek UV'ye maruz bırakılan grup (UV+EA), silibinin verilerek UV'ye maruz bırakılan grup (UV+S). Tüm ratlarda tam kan sayımı yapıldı.

Bulgular: Alyuvar sayısı ($p = 0.042$), platelet sayısı ($p = 0.017$) ve ortalama trombosit hacmi (MPV) ($p = 0.047$) UV'ye maruz bırakılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. UV+EA grubu ve UV grubu arasında bu parametreler açısından anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Bununla birlikte, alyuvar sayısı UV+S grubunda UV grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p = 0.043$).

Sonuç: Sonuç olarak, vücut yüzeyine UV maruziyeti özellikle çekirdeksiz hücreler olan alyuvarlar ve plateletler üzerinde toksik etkiler oluşturabilir. Güçlü antioksidan özelliklere sahip olan silibinin, UV maruziyetine bağlı alyuvar yıkımında koruyucu etkiler gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Ultraviyole radyasyon, ellajik asit, silibinin, kan hücreleri

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of ellagic acid and silibinin on changes in hematological parameters caused by ultraviolet A (UVA) and ultraviolet B (UVB) exposure in the rat model.

Materials and Methods: All of 20 rats were divided into four groups of five rats: healthy control group (C), group exposed to UV (UV), group administered ellagic acid and exposed to UV (UV+EA), and group administered silibinin and exposed to UV (UV+S). Complete blood count was performed in all rats.

Results: Red blood cell count ($p = 0.042$), platelet count ($p = 0.017$) and mean platelet volume (MPV) ($p = 0.047$) were significantly lower in the UV-exposed group compared to control group. There was no significant difference between the UV+EA group and the UV group in terms of these parameters ($p > 0.05$). However, red blood cell counts were significantly higher in the UV+S group when compared to UV group ($p = 0.043$).

Conclusion: As a result, UV exposure to the body surface can create toxic effects, particularly on red blood cells and platelets, which are anucleate cells. Silibinin, which has strong antioxidant properties, may have protective effects on red blood cell destruction due to UV exposure.

Key Words: Ultraviolet radiation, ellagic acid, silibinin, blood cells

Giriş

Ultraviyole radyasyonun (UVR) temel kaynağı olan Güneş, UVA1 (340-400 nm), UVA2 (320-340 nm),

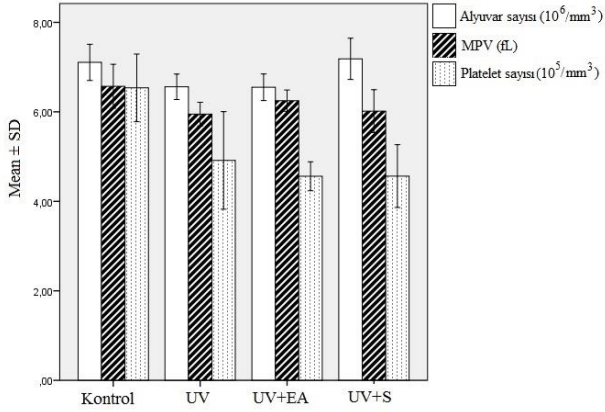
UVB (280-320 nm) ve UVC (<280 nm) olmak üzere dört farklı dalga boyu aralığında ultraviyole ışımaya yapmaktadır (1). Atmosferde UVC'nin tutulması sayesinde yeryüzündeki organizmalar

*Sorumlu Yazar: Ergin Taşkın, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Kars

E-mail: ergintaskin65@hotmail.com, Tel: 0 (544) 499 42 30

ORCID ID: Halil Özkol: 0000-0002-7563-1347, Murat Çetin Rağbetli: 0000-0002-8189-264X, Seda Keskin: 0000-0002-4726-982X, Yasin Tülüce: 0000-0002-7312-5934, Ergin Taşkın: 0000-0002-1883-6055, Veysel Tahiroğlu: 0000-0003-3516-5561, Seda Çelik: 0000-0003-2055-3537, Duygu Mine Yavuz: 0000-0002-0425-0766, Hami Keskin: 0000-0001-7253-9556

Geliş Tarihi: 16.12.2019, Kabul Tarihi: 22.05.2020



Şekil 1. Çalışma gruplarında alyuvar sayısı, platelet sayısı ve ortalama platelet hacmi (MPV). UV: Ultraviyole; EA: Ellajik asit; S: Silibinin

sadece UVB ve UVA radyasyona maruz kalmaktadır (1). Hem UVA hem de daha az oranda UVB radyasyonu, biyolojik dokularda reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesine neden olarak oksidatif stres oluşturmaktadır (1, 2). Oksidatif stresin eritrosit ve lökosit apoptozunda ve platelet hiperaktivitesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (3-5). Nar, ahududu ve yaban mersini gibi meyve ve sebzelerde bulunan ellajik asit ile Meryemana dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden elde edilen silibininin her ikisi de polifenolik bileşikler olup, güçlü antioksidan ve antikanser özellikleri ile bilinmektedir (6-8). Bu çalışmanın amacı rat modelinde UVA ve UVB ışınlarına maruziyetin hematolojik parametrelerde yarattığı değişiklikler üzerine ellajik asit ve silibininin etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 25.05.2017/05 nolu onay alınarak başlandı. Araştırmamız randomize kontrollü bir çalışmadır. Bu çalışma için iki aylık, 180-200 gram ağırlığında 20 adet Wistar albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar üniversitemizin Deney Hayvanları Ünitesi'nde ad libitum beslenerek, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık siklusu altında, uygun sıcaklık ve nem koşullarında barındırıldı. Deney öncesi tüm ratların yaklaşık 15 cm²'lik bir cilt alanı deney boyunca yeniden uygulama yapılacak şekilde tıraş edildi. Daha sonra her grupta beş rat olacak şekilde dört grup oluşturuldu:

Kontrol Grubu (K): Gavaj uygulaması yapılarak serum fizyolojik verilen ve bir ay boyunca barındırılan şam grubu.

Ultraviyole Grubu (UV): Özel olarak ayarlanmış kabin (65x126x30 cm) içerisinde günde iki saat

süreyle bir ay boyunca 30 cm uzaklıktan UV (1.25 mW/cm² UVA, Philips TL-D 15W ve 0.22 j/cm² UVB, Philips TL 20W/01 RS) ışığa maruz bırakılan ve gavaj uygulaması yapılarak serum fizyolojik verilen grup (9, 10).

Ultraviyole + Ellajik Asit Grubu (UV+EA): UV grubundaki uygulamanın yanında, bir ay boyunca 50 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yoluyla UV maruziyetinin hemen öncesinde serum fizyolojik içerisinde çözünerek taze hazırlanmış bir cc kadar ellajik asit verilen grup (11).

Ultraviyole + Silibinin Grubu (UV+S): UV grubundaki uygulamanın yanında, bir ay boyunca 50 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yoluyla bir ay boyunca serum fizyolojik içerisinde çözünerek taze hazırlanmış bir cc kadar silibinin verilen grup (12).

Ellajik asit (Merck E2250) ve silibinin (Merck S0417) ticari olarak elde edildi. Kimyasal ajanların ko-morbid olup olmadığına dair bir ön çalışma yapılmadı. Uygulama dozajları, daha önce yapılmış çalışmalar baz alınarak belirlendi (11, 12).

Hematolojik analizler MS4e (Melet Schloesing, Fransa) cihazında rat kiti kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel Analizler: İstatistiksel analizler SPSS 20.0 sürüm programı ile gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Grup ortalamaları arasında bir farklılık olup olmadığı One-Way ANOVA testi ile değerlendirildi. İki grup arasındaki farklılıklar ise student t testi ile analiz edildi.

Bulgular

Çalışma gruplarında hematolojik parametrelerin ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre UV'ye maruz bırakılan grupta alyuvar sayısı (p=0.042), platelet sayısı (p=0.017) ve ortalama platelet hacmi (MPV) (p=0.047) anlamlı şekilde daha düşüktü (Şekil 1). UV maruziyetinden önce ellajik asit verilen grupta, UV grubuna göre bu parametreler açısından anlamlı bir farklılık oluşmadı (p>0.05). Bununla birlikte, UV maruziyetinden önce silibinin verilen grupta alyuvar sayıları anlamlı ölçüde daha yüksekti (p=0.043); ancak silibininin platelet sayısı ve MPV'yi anlamlı ölçüde etkilemediği görüldü (p>0.05).

Tartışma

Bu çalışmada, UV maruziyetinin alyuvar sayısını, platelet sayısını ve MPV'yi azalttığı görüldü. Ayrıca, UV maruziyetinden önce silibinin

Tablo 1. Çalışma gruplarında hematolojik parametreler

		Kontrol	UV	UV+EA	UV+S	p*
RBC (10 ⁶ /mm ³)	Mean±SD	7.1±0.4	6.6±0.3	6.6±0.3	7.2±0.5	0.029
	Medyan	7.1	6.6	6.5	7.1	
	(Min-Max)	(6.5-7.6)	(6.3-6.8)	(6.2-7.0)	(6.7-7.8)	
HCT (%)	Mean±SD	42.2±3.3	39.5±1.8	39.4±1.7	44.4±3.0	0.028
	Medyan	42.1	39.6	39.4	44.8	
	(Min-Max)	(37.1-46.4)	(37.3-41.6)	(37.3-41.4)	(40.9-47.6)	
HGB (g/dL)	Mean±SD	16.5±1.3	15.5±0.6	15.2±0.6	17.3±1.0	0.015
	Medyan	16.3	15.4	15.3	17.6	
	(Min-Max)	(14.8-18.2)	(15.0-16.3)	(14.5-16.0)	(15.9-18.3)	
MCV (fL)	Mean±SD	59.5±1.9	60.4±1.8	60.2±0.5	61.9±1.3	0.067
	Medyan	61.0	60.5	60.1	61.5	
	(Min-Max)	(57.3-61.0)	(58.3-62.2)	(60.0-61.0)	(60.7-63.5)	
MCH (pg)	Mean±SD	23.1±0.7	23.6±0.7	23.2±0.2	24.1±0.7	0.078
	Medyan	23.5	23.7	23.2	23.8	
	(Min-Max)	(22.2-23.9)	(23.0-24.2)	(22.9-23.5)	(23.5-24.9)	
MCHC (g/dL)	Mean±SD	39.0±0.4	39.1±1.1	38.6±0.2	39.0±0.5	0.708
	Medyan	38.7	39.0	38.7	39.0	
	(Min-Max)	(38.7-39.8)	(38.0-41.0)	(38.4-38.8)	(38.4-39.7)	
RDW (%)	Mean±SD	8.6±1.0	8.2±0.4	8.7±0.6	8.6±0.2	0.676
	Medyan	8.2	8.2	8.5	8.6	
	(Min-Max)	(7.8-10.0)	(7.8-8.7)	(8.3-9.6)	(8.4-8.8)	
PLT (10 ³ /mm ³)	Mean±SD	654±76	492±109	456±32.3	456±70	0.001
	Medyan	698	503	446	451	
	(Min-Max)	(497-705)	(360-601)	(430-503)	(336-527)	
MPV (fL)	Mean±SD	6.6±0.5	6.0±0.3	6.3±0.2	6.0±0.5	0.081
	Medyan	6.8	5.9	6.3	5.9	
	(Min-Max)	(6.0-7.1)	(5.7-6.3)	(6.0-6.5)	(5.5-6.8)	
PDW (%)	Mean±SD	9.0±0.5	8.5±0.5	8.9±0.4	7.9±0.6	0.009
	Medyan	9.2	8.6	9.0	7.9	
	(Min-Max)	(8.4-9.5)	(7.9-8.9)	(8.4-9.3)	(7.3-8.8)	
WBC (10 ³ /mm ³)	Mean±SD	7.3±2.2	6.1±0.5	5.1±0.5	4.7±1.0	0.031
	Medyan	7.1	6.3	5.1	4.5	
	(Min-Max)	(5.1-10.3)	(5.3-6.5)	(4.6-5.5)	(3.9-6.6)	

RBC: Alyuvar sayısı; HCT: Hematokrit; HGB: Hemoglobün konsantrasyonu; MCV: Ortalama eritrosit hacmi; MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini; MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobün konsantrasyonu; RDW: Eritrosit dağılım genişliği; PLT: Platelet sayısı; MPV: Ortalama platelet hacmi; PDW: Platelet dağılım genişliği; WBC: Akyuvar sayısı; UV: Ultraviyole grubu; EA: Ellajik asit grubu; S: Silibinin grubu. *One-Way ANOVA testine ait p değerleri

verilmesinin alyuvarları UV maruziyetinin olumsuz etkilerine karşı koruyabileceği gözlemlendi. Oksidatif stres, UV radyasyonun sitotoksik etkilerinin temelinde yatan başlıca faktördür (1, 2). Alyuvarlar, oksijen taşıma fonksiyonu için özelleşmiş hücreler olup, devamlı şekilde yüksek oksijene maruz kalır; buna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres, alyuvarlarda geri dönüşümsüz hasara yol açabilir (13). Bunun sebebi, olgun alyuvarların çekirdek ve diğer hücre

organellerinden yoksun olması ve dolayısıyla hasarlanmış bileşenleri tamir edebilme kapasitelerinin olmamasıdır (13). Bu durum, hasarlı alyuvarların dolaşımdan uzaklaştırılmasıyla sonuçlanır. Kumar ve Joshi (14) UVB ışınların deri tabakalarını geçerek alyuvar yıkımına yol açabileceğini öne sürmüşlerdir. Zuniga-Gonzalez ve ark. (15) ise UVA ışına maruz bırakılan gebe ratların yavrularında bile alyuvarlarda hasar olabileceğini rapor etmişlerdir. Mitokondri ve

endoplazmik retikulum gibi bazı organellere sahip olmakla birlikte, çekirdekleri olmayan plateletler için de, alyuvarlardakine benzer bir duyarlılık söz konusu olabilir (16). Bu çalışmada, UV ışına maruz bırakılan ratlarda, lökosit sayısında belirgin bir değişiklik olmazken, alyuvar ve platelet sayısının azalması, çekirdekten yoksun olan bu hücrelerin oksidatif hasara karşı tamir kapasitelerinin sınırlı oluşuyla açıklanabilir. UV'ye maruz bırakılan ratlarda MPV'de görülen azalma, özellikle büyük hacimli plateletlerin etkilendiğine işaret etmektedir.

Girish ve ark. (17) farelerde parasetamolün indüklediği hepatotoksisite modelinde, 50 mg/kg dozlarında silibininin ellajik aside göre koruyuculuk açısından daha etkili bulmuşlardır. Biz de yaptığımız çalışmada, ellajik asidin etkili olmadığını, silibininin ise UV maruziyetine bağlı alyuvar azalmasını önlediğini gözlemledik. Silibinin, Meryemana diken (Silybum marianum) bitkisinin ekstraktı olan silimarininin major aktif bileşenidir (18). Fernandes ve ark. (19) insan kan hücrelerinde DNA hasarına karşı silibininin koruyucu etkileri olduğunu rapor etmişler ve bunun silibininin antioksidan özellikleriyle ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Sonuç olarak, vücut yüzeyine UV maruziyeti özellikle çekirdeksiz hücreler olan alyuvarlar ve plateletler üzerinde toksik etkiler oluşturabilir. Güçlü antioksidan özelliklere sahip olan silibinin, UV maruziyetine bağlı alyuvar yıkımı üzerinde koruyucu etkiler gösterebilir.

Kaynaklar

- Bernard JJ, Gallo RL, Krutmann J. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nat Rev Immunol* 2019; 19(11): 688-701.
- Laikova KV, Oberemok VV, Krasnodubets AM, Gal'chinsky NV, Useinov RZ, Novikov IA, et al. Advances in the understanding of skin cancer: ultraviolet radiation, mutations, and antisense oligonucleotides as anticancer drugs. *Molecules* 2019; 24(8): E1516.
- Bissinger R, Bhuyan AAM, Qadri SM, Lang F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *FEBS J* 2019; 286(5): 826-854.
- El Haouari M. Platelet oxidative stress and its relationship with cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus patients. *Curr Med Chem* 2019; 26(22): 4145-4165.
- Szuster-Ciesielska A, Slotwinska M, Stachura A, Marmurowska-Michalowska H, Dubas-Slemp H, Bojarska-Junak A, et al. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32(3): 686-694.
- Ceci C, Lacal PM, Tentori L, De Martino MG, Miano R, Graziani G. Experimental evidence of the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic activity of ellagic acid. *Nutrients* 2018; 10(11): E1756.
- Rios JL, Giner RM, Marin M, Recio MC. A pharmacological update of ellagic acid. *Planta Med* 2018; 84(15): 1068-1093.
- Xie Y, Zhang D, Zhang J, Yuan J. Metabolism, transport and drug-drug interactions of silymarin. *Molecules* 2019; 24(20): E3693.
- Inal ME, Kahramant A, Kökent T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 536-539.
- Silva MA, Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Boligon AA, Walker CI, et al. Antiinflammatory and antioxidant effects of Aloe saponaria Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *J Photochem Photobiol* 2014; 133: 47-54.
- Uzar E, Alp H, Cevik MU, Fırat U, Evliyaoglu O, Tufek A, et al. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurol Sci* 2012; 33: 567-574.
- Muriel P, Moreno MG, Hernandez Mdel C, Chavez E, Alcantar LK. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl4 administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96(5): 375-380.
- Maurya PK, Kumar P, Chandra P. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World J Methodol* 2015; 5(4): 216-222.
- Kumar S, Joshi PC. Haemolysis by ultraviolet B of red blood cells from different animal species. *Toxicol In Vitro* 1992; 6(4): 345-347.
- Zuniga-Gonzalez GM, Gomez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Martinez-Gonzalez MA, Munoz de Haro IA, Perez-Navarro AE, et al. Micronucleated erythrocytes in newborns of rat dams exposed to ultraviolet-A light during pregnancy; protection by ascorbic acid supplementation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2015; 782: 36-41.
- Yadav S, Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets* 2017; 28(2): 108-118.

17. Girish C, Koner BC, Jayanthi S, Ramachandra Rao K, Rajesh B, Pradhan SC. Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23(6): 735-745.
18. Soleimani V, Delghandi PS, Moallem SA, Karimi G. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. *Phytother Res* 2019; 33(6): 1627-1638.
19. Fernandes Veloso Borges F, Ribeiro E Silva C, Moreira Goes W, Ribeiro Godoy F, Craveiro Franco F, Hollanda Veras J, et al. Protective effects of silymarin and silibinin against DNA damage in human blood cells. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 6056948.