

Streptozotosin (STZ) İle Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Zakkum (*Nerium oleander* L.) Çiçek Ekstresinin Akciğer ve Dalak Dokularında Antioksidan ve İmmünotoksik Etkilerin Araştırılması

Abdulahad DOĞAN^{1*}, İsmail ÇELİK²

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, Türkiye

²Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, Türkiye

*e-mail: abduhaddogan@yyu.edu.tr

ORCID ID: A.Dogan: <https://orcid.org/0000-0002-5438-8560>, I.Celik: <https://orcid.org/0000-0003-2199-6348>

Geliş tarihi/Received: 18/07/2020

Kabul tarihi/Accepted: 02/09/2020

Özet

Bu çalışmada streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda zakkum (*N. oleander* L.) çiçeği etanolik liyofilize ekstre (Nole)'nin akciğer ve dalak dokularındaki antioksidan ve immünotoksik etkileri araştırıldı. Toksikite testi yapıldıktan sonra 49 adet sıçan 7 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol, Nole-50 mg/kg, DM, DM+ Glibenklamid (Gly) -3 mg/kg, DM+Nole-25 mg/kg, DM+Nole-75 mg/kg ve DM+Nole-225 mg/kg grubu şeklinde oluşturuldu. Yirmi bir günlük tedavi sonrası anestezide alınan sıçanlardan alınan akciğer ve dalak doku supernatantlarında malondialdehid (MDA) içeriği, redükte glutatyon (GSH) düzeyi, glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksid dismutaz (SOD), myeloperoksidaz (MPO) ve adenozin deaminaz (ADA) aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen bulgulara göre, akciğer ve dalak MDA düzeyi DM grubunda diğer gruplara göre anlamlı artışlar gösterdi ($P<0.05$). DM grubu GSH düzeyi ise kontrol gruplarına göre anlamlı düşüş gösterdi. Akciğer GPx aktivitesi Nole ile tedavi edilen gruplarda, DM grubuna göre anlamlı artış gösterdi. Akciğer MPO aktivitesi DM, DM+Gly ve DM+Nole-25 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken, DM+Nole-225 grubu MPO düzeyi kontrol gruplarına yakın bulundu. Dalak MPO düzeyi tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken DM+Gly ve DM+Nole-225 gruplarında ise DM grubuna göre anlamlı düşüş gösterdi. Akciğer ADA düzeyi DM ve DM+Gly gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı artış gösterirken yüksek dozlu gruplar (75 ve 225 mg/kg) ise düşük tedavi doz (25 mg/kg) grubuna göre anlamlı düşüşler gösterdi. Dalak ADA aktivitesi ise yüksek dozlu tedavi gruplarında (75 ve 225 mg/kg) Nole-50, DM+Gly ve DM+Nole-25 mg/kg gruplarına göre düşük bulundu. Elde edilen sonuçlara göre zakkum çiçeği ekstresi genel olarak 75 ve 225 mg/kg dozlarında kullanımının lipidperoksidasyonunu düşürücü, antioksidan ve anti-immünotoksik aktivitelere sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zakkum (*N.oleander*), Diyabet, Antioksidanlar, İmmünotoksik etki, Sıçan

Investigation of the Antioxidant and Immunotoxic Effects of Oleander (*Nerium oleander* L.) Flower Extract on Lung and Spleen Tissue on STZ-Induced Diabetes in Rats

Abstract

The present study investigated the antioxidant and immunotoxic effects of lyophilized extract (Nole) obtained from oleander (*Nerium oleander* L.) in lung and spleen on STZ-induced diabetes in rats. After the toxicity test, 49 rats were divided to 7 groups. The groups were stated following: Groups,

Control, Nole-50 mg/kg, DM, DM+ Glibenclamide (Gly) -3 mg/kg, DM+Nole-25 mg/kg, DM+Nole-75 mg/kg and DM+Nole-225 mg/kg. After the twenty one days treatment period, malondialdehyde (MDA) content, glutathione (GSH) levels, and the activities of glutathione S-transferase, glutathione reductase (GR), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO), adenosine deaminase (ADA) were evaluated in lung and spleen supernatants obtained from anesthetized rats. According to the our results, the MDA levels of DM group in lung and spleen were significantly ($P<0.05$) increased compared to the other groups. In DM group of GSH levels were decreased compared to the control groups. The GPx activities in lung were increased in DM+Nole-25 mg/kg, DM+Nole-75 mg/kg and DM+Nole-225 mg/kg groups compared to the DM group. Whereas lung MPO activities were significantly increased in DM, DM+Gly ve DM+Nole-25 groups compared to the control group, lung MPO activity of DM+Nole-225 was close to that of control group. Spleen MPO activities of all treatment groups were increased compared to the control group however spleen MPO activities of DM+Gly and DM+Nole-225 groups were significantly decreased compared to the DM group. Lung ADA activities were increased in DM and DM+Gly groups ompared to the control group whereas lung ADA activities of high dose groups (75 and 225 mg/kg) were significantly decreased compared to the low dose group (25 mg/kg). Spleen ADA activities of high dose treatment groups (75 and 225 mg/kg) were significantly diminished compared to the Nole-50, DM+Gly and DM+Nole-25 mg/kg groups. According to our results, oleander flower extract at the doses of 75 and 225 mg/kg caused to the decrease in lipid peroxidation and also it was concluded that this extract has antioxidant and anti-immunotoxic properties.

Keywords: Oleander (*Nerium oleander*), Diabetes, Antioxidants, Immunotoxic effect, Rat

Giriş

Diabetes mellitus (DM), pankreasın Langerhans adacıklarındaki β - hücrelerinden insülin salınımının azlığı/mutlak eksikliği veya glikozun hücre içine taşınmasında görevli glikoz taşıyıcıların (GLUT) glikoza olan ilgisinin azlığı/yokluğu sonucu dolaşımdaki açlık kan glikoz düzeyinin ≥ 126 mg/dL olması ile karakterize endokrinolojik ve metabolik bir bozukluktur. DM'nin başlamasında ve ilerlemesinde artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun rolü vardır (Dogan ve ark., 2015; Doğan ve Çelik, 2016). Oksidatif strese en duyarlı yapılardan β hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Robertson ve ark., 2004). Hidrojen peroksidin (H_2O_2), yüksek reaktiviteye sahip bir ROS ürünü olan hidroksil ($OH\cdot$) radikaline dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında önemli rol oynayabileceği vurgulanmıştır (Houslay, 1991). DM karbohidrat, lipit ve protein metabolizmasını olumsuz etkileyerek (Doğan ve Çelik, 2016) doku ve organlarda istenmeyen biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Uzun süreli hiperglisemik durum nöropati, nefropati, kardiyovasküler ve serebrovasküler komplikasyonlar (Strojek, 2003) kılcal kan damarları, kalp, sinir, böbrek, göz ve nihayetinde organ yetmezliği ve ölüm ile sonuçlanabilmektedir (Huang ve ark., 2005).

İmmünotoksik parametrelerinden adenozin deaminaz (ADA) yapısal geni 20. kromozomda olan ADA1 ve ADA2 olmak üzere 2 fonksiyonel formu bulunan adenosinin inosine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Reçper, 2007). Adenozin deaminaz (ADA)'nın esas biyolojik fonksiyonu lenfositlerde immun fonksiyonların azalmasına yol açan adenozin, deoksiadenozin trifosfat (dATP) ve deoksiadenozin difosfat'ın (dADP) toksik etkilerinden lenfositleri korumaktır (Senesi, 1990). Vücuda herhangi bir şekilde giren yabancı bir ajana karşı mücadele eden ve onu etkisiz hale

getirmeye çalışan bağışıklık sisteminin etkili enzimlerinden biri miyelo peroksidaz (MPO) enzimidir. MPO, (H₂O₂ oksidoredüktaz) tanımlanmış 3 tipi (I, II ve III) bulunan memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzimdir ve fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar.

Sentetik antidiyabetik ilaçlar yerine, doğal ürünlerin iyileştirici gücünü kullanım yolları gün geçtikçe tüm dünyada artmaktadır. Fonksiyonel gıdalar kendi özel bileşenleri yoluyla hastalıklardan koruyucu veya tedavi edici etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Zakkum (*Nerium oleander* L.) Apocynaceae familyasında yer alan çok yıllık zehirli bir bitki türü olup, dünyanın pek çok bölgesinde yayılışı olan, bahar ve yaz mevsimlerinde pembemsi çiçekler açan mızraklı yapraklara ve bakla şeklinde meyvelere sahiptir (Baytop ve ark., 1989). Zakkum'un yapısında bulunan neriin, oleandrin ve diğer digitoksin benzeri glikozitler kardiyak bozuklukların tedavisinde kullanılırken, oleandrinin ise kardiyookaktif ve diüretik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ergun, 1992). *N.oleander* antioksidan, antidiyabetik, antinosiseptif, antikanser, antienflamatuar, antiastmatik, antilösemi, antibakteriyel, antidiyareik, antimikrobiyal, hepatoprotektif, diüretik, immünomodülatör ve larvisidal (Hase ve ark., 2016) ve antihemoliz etkilere sahiptir (Dogan, 2020). *N.oleander* bitki infüzyonları cüzzam, kalp yetmezliği, hazımsızlık, sıtma, saçkıran, düşük tedavisinde, zihinsel hastalıklarda halk hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bandara ve ark., 2010; Botelho ve ark., 2017).

Bu çalışmada *N.oleander* bitki çiçeği etanolik liyofilize ekstresinin üç farklı dozunun (25, 75 ve 225 mg/kg), pozitif kontrol grubu olarak kullanılan oral antidiyabetik ilaç olan glibenklamid (3 mg/kg) ile kıyaslanarak diyabetik ratların akciğer ve dalak dokularında lipid peroksidasyonu, antioksidan belirteçler ve immünotoksik parametreler üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali ve Ekstre Hazırlanması

Zakkum (*N.oleander* L.) bitki çiçekleri 2016 Temmuz ayında Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN tarafından Mardin'in Dargeçit ilçesi yöresinden toplandı. Toplanan bitki örneği Doç. Dr. Süleyman Mesut tarafından teşhis edildi. Teşhis edilen bitki örneği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryum (VANF)'da saklandı (Herbaryum no: 164212). Etanolik liyofilize ekstre hazırlanması Dogan ve ark. (2015) metodunda yapılan bazı değişikliklere göre hazırlandı.

Kimyasal Maddeler ve Kısaltmalar

Streptozotosin (STZ), Süperoksid dismutaz (SOD) enzim kiti (Ransod, SD125), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim kiti (Ransel, RS504), Redükte glutasyon (GSH), Okside glutasyon (GSSG), Bütillenmiş hidroksitolüen (BHT),Tiyobarbitürik asit (TBA), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), Hidroksi metil amino metan (Tris), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum sülfat (Na₂SO₄), Beta Nikotinamid Adenindinükleotit fosfat (NADPH), Metafosforik asit (HPO₃), Triklor asetik asit (TCA), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Sodyum sitrat

(Na₃C₆H₅O₇), Sulfosalisilik asit (SSA), disodyum karbonat (Na₂CO₃), Etanol, Ketamin (%10 luk), Glibenklamid (Gly), 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT).

Deney Hayvanı

Çalışmamızda Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 2-5 aylık, 200-350 gr ağırlığındaki 18+49=67 adet erkek rat (*Wistar albino*) kullanıldı. Ratların 18 tanesi akut toksisite testi için kullanılırken, geri kalan 49 tanesi ise her grupta 7 sıçan olacak şekilde kronik çalışmada kullanıldı. Ratlar 25±1 °C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda standart plastik kaplarda, *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı.

Toksisite Testi ve Deney Uygulaması

Deneye başlamadan önce kullanılan bitki ekstraktının olası toksik etkilerinin belirlenmesi için 18 adet rat toksisite testinde kullanılmıştır. Onsekiz adet hayvan 6 grup (n=3) olarak (OECD, 2002) düşük dozdan yüksek doza doğru (20, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 mg/kg) gavaj yolu ile bitki ekstresine maruz bırakıldı. Uygulamanın, 0.5, 2., 4., 8., 24., 48., 72., 96. ve 120., saatlerinde olası klinik ve toksikolojik semptomlar, belirlendi. Toksisite testi sonrasında, kronik çalışmada uygulanacak dozlar tespit edildi. Yirmibir günsürdürülen çalışmada 49 adet sıçan aşağıdaki gibi her grupta 7 sıçan olacak şekilde gruplandırıldı.

1. Kontrol grubu: Ratlar *ad libitum* beslendi ek bir uygulama yapılmadı.

2. *Nerium oleander* (Nole -50 mg/kg) grubu: Ratların *ad libitum* beslenmelerine ek olarak günde tek doz Nole (50 mg/kg) ekstre gavaj ile verildi.

3. Diabetes mellitus (DM) grubu: Ratların *ad libitum* beslenmelerine ek olarak streptozotosin (STZ) [Belirlenen STZ miktarı 0.1 M soğuk sitrat tamponu (pH:4.5) içinde çözündürüldü] ile canlı ağırlıklarına göre tek doz (50 mg/kg, intraperitoneal) yapıldı (Dogan ve ark., 2015). STZ verilen ratların açlık kan glukoz değerleri 72 saat sonra Accu-Chek Go (Roche) strip ile ölçüldü ve 200 mg/dL üzerindeki açlık kan glukoz değerleri diyabet olarak kabul edildi.

4. Diabetes mellitus + glibenklamid (DM+Gly -3 mg/kg) grubu: Ratların *ad libitum* beslenmelerine ek olarak günde tek doz Gly (3 mg/kg) gavaj ile verildi (Rabbani ve ark., 2010).

5. Diabetes mellitus + *N.oleander* (DM+Nole -25 mg/kg, ekstre) grubu: Ratların *ad libitum* beslenmelerine ek olarak günde tek doz NO-25 (25 mg/kg, ekstre) gavaj ile verildi.

6. Diabetes mellitus + *N.oleander* (DM+Nole -75 mg/kg, ekstre) grubu: Ratların *ad libitum* beslenmelerine ek olarak günde tek doz NO-75 (75 mg/kg, ekstre) gavaj ile verildi.

7. Diabetes mellitus + *N.oleander* (DM+Nole -225 mg/kg, ekstre) grubu: Ratların *ad libitum* beslenmelerine ek olarak günde tek doz NO-225 (225 mg/kg, ekstre) gavaj ile verildi.

Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Uygulama sonunda sıçanlar %10'luk ketamin ile anesteziye tabi tutuldu. Daha sonra akciğer ve dalak dokuları fizyolojik suyla yıkandı ve analizlerin yapılacağı

zamana kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edildi. Homojenizasyon tamponu (0.32 mol/L sukroz, 1mmol/L EDTA, 10nm/L Tris HCl (pH 7.4) kullanılarak 9500 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj edilmesi ile elde edilen doku supernatantları, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT), immün sistemin indikatör enzimleri olan adenozin deaminaz (ADA) ve miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ve GSH ile MDA ölçümlerinde kullanıldı.

Antioksidan, İmmünotoksik ve MDA Düzeyinin Okunması

İndirgenmiş glutatyon (GSH) sülfidril gruplarının DTNB (5,5'-2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin, köre karşı 412 nm'de ölçülmesiyle tespit edildi (Beutler ve ark, 1963). Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivitesi glutatyonun 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) bağlanma şiddetinin 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi (Mannervik ve Guthenberg, 1981). (Mannervik ve Guthenberg, 1981). Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi 340 nm'de NADPH'nin absorbansındaki azalış esasına dayanan, Carlberg ve Mannervik'in (1975) geliştirmiş oldukları metoda göre yapıldı. Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi Paglia ve Valentine (1971)'nin geliştirmiş oldukları GSH'in kümen hidroperoksid ile glutatyon oksidasyonunun GPx katalizleme esasına dayalı metoda göre gerçekleştirildi. Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi: ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksit radikalının INT ile kırmızı boya formuna dönüşümünden sonra SOD tarafından bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülerek tespit edildi (McCord ve Fridovich, 1969). Doku süpernatant adanozin deaminaz (ADA) aktivitesi Giusti (1974)'ye göre yapıldı. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivite ölçümü Bradley ve ark (1982) tarafından geliştirilen yöntemine göre yapıldı. Doku lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) seviyesi, tiyobarbitürik asit (TBA) reaktifi ile meydana gelen menekşe renk oluşumunun 532 nm'de spektrofotometrik ölçüme dayalı metoda göre yapıldı (Jain ve ark., 1989).

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizinde Minitab 14 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Tukey testi kullanıldı. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda $P<0.05$ değerleri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular ve Tartışma

N.oleander (Nole) bitki çiçeği etanolik liyofilize ekstresinin, diyabetik hayvanlardaki akciğer ve dalak dokularına ait MDA içeriği ve antioksidan enzim parametreleri üzerindeki etkileri Tablo 1'de gösterilmiştir. DM grubu akciğer ve dalak MDA düzeyi diğer gruplara göre önemli artış gösterirken, DM grubu GSH düzeyi ise kontrol gruplarına göre önemli düşüş göstermiştir. Akciğer GPx aktivitesinin Nole ile tedavi edilen gruplarda DM grubuna göre önemli artış gösterdiği gözlemlendi. Serbest radikaller doymamış yağ asitlerin çift bağlarına saldırarak lipid peroksidasyonunun majör ürünü olan MDA oluşumuna sebep olur (Dogan, 2020). Oksidatif stres diyabete bağlı komplikasyonlarının oluşmasında önemli rolü olan ve hiperglisemide serbest

radikal oluşumunu artırarak endojen ve eksojen antioksidanların etkisini azalttığı bilinmektedir (Dogan ve ark., 2015). SOD moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak oluşan süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksitine (H_2O_2) katalizini spontan olarak sağlayan bir antioksidan enzimdir. H_2O_2 düşük konsantrasyonlarda glutatyon varlığında GPx enzimi ile H_2O 'ya ve GSSG dönüşürken; yüksek konsantrasyonlarda ise CAT enzimi ile H_2O ve O_2 'ye dönüşmektedir. GST hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolü olan ve detoksifikasyonda rol oynayan etkili bir enzimdir. GSH yabancı maddeleri katalitik olarak sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar (Dogan ve ark., 2015; Doğan ve Çelik, 2016). 50 ve 200 mg/kg *Nerium oleander* bitki yaprak ekstre dozları ile tedavi edilen diyabetik farelerin 10 ve 20'nci günlerde ölçülen kan glukoz, HbA1c ve MDA düzeyi normal diyabetik grubuna göre önemli azalma gösterirken, insülin, GSH ve CAT ise önemli artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Dey ve ark., 2015). Dört hafta boyunca günde tek doz diyabetik ratlara 0.1 mg/kg glibenklamid ve 250 mg/kg *Nerium oleander* çiçek etanolik liyofilize ekstrenin önemli hipoglisemik etki ve karaciğer koruma sağladığı rapor edilmiştir (Mwafy ve Yassin, 2011).

Tablo 1. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda (*N.oleander* L.) çiçek ekstresinin MDA, GSH ve antioksidan enzim düzeyleri üzerindeki etkisi.

Doku	Parametre	Kontrol	Nole-50 mg/kg	DM	DM+Gly-3 mg/kg	DM+Nole-25 mg/kg	DM+Nole-75 mg/kg	DM+Nole-225 mg/kg
Akciğer	MDA	11.00±3.22	12.86±2.71	16.45±2.08 ^{ab}	14.18±1.08	13.33±2.07 ^c	11.10±2.82 ^e	10.97±2.77 ^{ab}
	GSH	63.91±9.47	61.03±7.87	50.05±6.35 ^{ab}	62.13±11.42	55.71±13.71	61.72±10.62	62.80±12.18
	GST	5.11±1.15	5.14±0.82	4.09±1.02	4.47±0.70	4.56±0.79	4.55±0.46	4.35±0.50
	GR	0.28±0.05	0.27±0.05	0.27±0.07	0.29±0.06	0.26±0.03	0.27±0.05	0.28±0.08
	CAT	26.74±5.19	26.27±4.52	21.27±3.50	29.35±6.25 ^e	24.02±6.09	24.76±5.45	25.43±4.28
	GPx	28.12±5.61	29.31±5.61	18.38±2.91 ^{ab}	22.84±4.91	27.25±6.13 ^c	26.98±4.11 ^c	24.79±2.79 ^f
	SOD	2288.62±35.80	2279.42±24.49	2264.04±54.83	2298.23±28.46	2282.53±27.89	2312.24±14.59	2276.53±27.62
Dalak	MDA	15.54±2.55	16.84±3.33	21.24±3.70 ^a	16.06±3.02 ^e	15.03±2.40 ^f	14.77±2.57 ^e	12.56±2.36 ^{bc}
	GSH	81.89±7.71	79.82±6.81	59.78±14.77 ^{ab}	62.79±11.13 ^{ab}	72.06±10.72	76.91±9.73	80.36±21.93
	GST	5.72±0.56	6.00±0.41	6.31±1.03	5.90±1.17	5.49±0.36	5.10±0.64	5.01±0.94
	GR	0.18±0.02	0.19±0.04	0.18±0.04	0.17±0.04	0.17±0.06	0.17±0.03	0.21±0.05
	CAT	47.77±8.87	47.98±3.84	38.13±6.71	43.35±7.46	46.70±4.41	47.31±8.66	49.95±9.68
	GPx	42.20±9.43	43.96±10.36	34.59±9.94	31.75±7.13	45.10±10.16	39.76±11.16	41.87±12.26
	SOD	2281.28±39.19	2276.09±31.99	2231.93±59.10	2288.78±26.50	2249.17±61.47	2245.67±56.24	2262.27±33.23

İstatistiksel analizler Minitab 14 One-Way ANOVA Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda $P<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olarak değerlendirilmiştir.

a: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

b: Nole-50 grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

c: DM grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

d: DM+Gly-3 grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

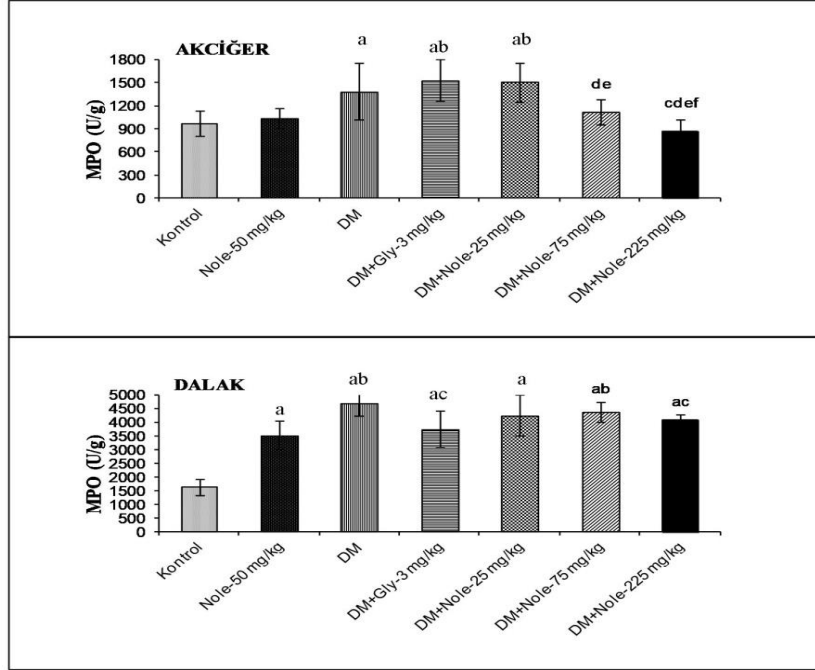
e: DM+Nole-25 grubu ile DM+Nole-75 ve DM+Nole-225 grupları arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

f: DM+Nole-75 grubu ile DM+Nole-225 grubu arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

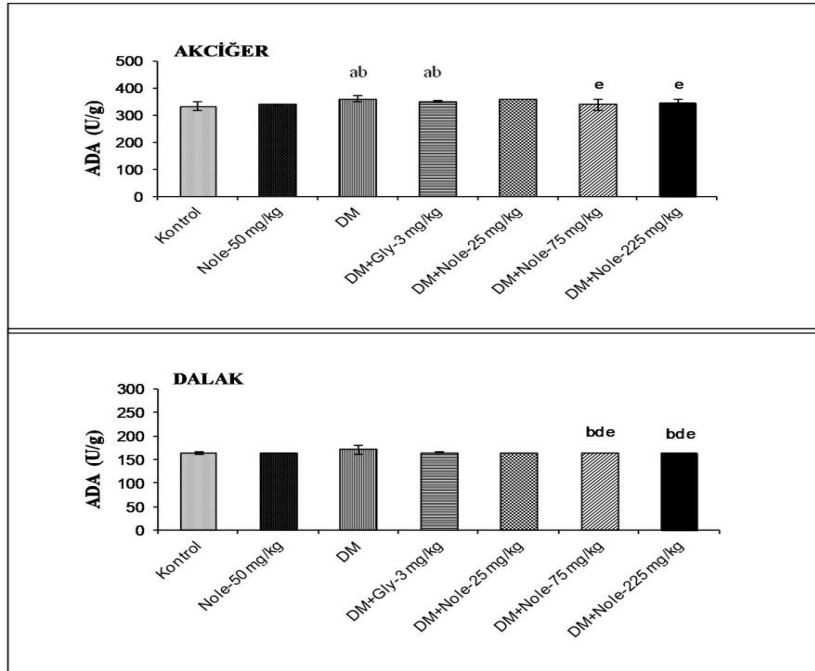
DM: Diabetes mellitus; Nole: *Nerium oleander*; Gly: Glibenklamid; MDA: Malondialdehid; GSH: Redükte glutatyon; GST: Glutatyon s-transferaz; GR: Glutatyon reduktaz; CAT: Katalaz; GPx: Glutatyon peroksidaz; SOD: Süperoksit dismutaz.

MPO önemli immünotoksik parametrelerden biridir. MPO kemik iliğindeki myeloid farklılaşması sırasında sentezlenen ve 150-165 kDa molekül ağırlığına sahip, glikozillenmiş bir hem proteindir (Günkur, 2019). MPO güçlü katyonik özelliği sayesinde hücre kompartımanlarındaki protein ve lipid hedef biyomoleküllerin yapı ve fonksiyonunda değişime neden olur (Salavej ve ark., 2006; Tiruppathi ve ark., 2004). *Nerium oleander* ekstraktı ratlarda yara iyileştirilmesinde MPO ve tümör nekrozis faktörü düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli artışa neden olduğu bildirilmiştir (Akgun ve ark., 2017). Şekil 1'de görüldüğü gibi akciğer MPO aktivitesi DM, DM+Gly ve DM+Nole-25 gruplarında kontrol grubuna göre önemli artış gösterirken DM+Nole-

225 grubu MPO düzeyi ise kontrol gruplarına yakın olduğu ve anti-immünotoksik etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Dalak MPO düzeyi tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre önemli artış gösterirken DM+Gly ve DM+Nole-225 grupları ise DM tedavisinde MPO aktivitesinin baskılanmasında etkin rolü olabileceği görülmektedir.



Şekil 1. *N.oleander* bitki ekstresinin akciğer ve dalaktaki MPO aktivitesi üzerindeki etkisi.



Şekil 2. *N.oleander* bitki ekstresinin akciğer ve dalaktaki ADA aktivitesi üzerindeki etkisi.

Yapılan çeşitli toksikolojik çalışmalarda *N.oleander*'in farklı kısımlarından hazırlanan ekstrelerin antioksidan, antibakteriyal ve antihiperglisemik etkilerinin ve enflamasyonu engelleyici rolünün bitki içindeki çeşitli fitokimyasal bileşenlerin bir sonucu olabileceği belirtilmiştir (Dey ve ark., 2015; Dey ve ark., 2016). Purin katabolizmasının bir ürünü olan ADA, lenfositlerin, özellikle de T-lenfositlerin farklılaşmasında ve proliferasyonunda önemli rol oynayan ve adenozinin inozine dönüşümünü katalize eden bir enzimdir (Carson ve Seegmiller, 1976; Shore ve ark., 1981).

Şekil 2'de görüldüğü gibi, akciğer ADA düzeyi, DM ve DM+Gly gruplarında kontrol gruplarına göre önemli artış gösterirken, yüksek dozlu gruplar (75 ve 225 mg/kg) ise düşük tedavi doz (25 mg/kg) grubuna göre önemli düşüş göstermiştir. Dalak ADA aktivitesi ise yüksek dozlu tedavi gruplarında (75 ve 225 mg/kg) Nole-50, DM+Gly ve DM+Nole-25 mg/kg gruplarına göre önemli düşüşlere neden olduğu tespit edilmiştir. Diyabet oluşturma modellerinde *N.oleander* bitkisinin ADA aktivitesi üzerindeki etkisine dair çalışmaya rastlanılmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak yapılan bazı diyabet çalışmalarında, ADA (total ADA, ADA1 ve ADA2) düzeyinin diyabet gruplarında önemli artış gösterdiği rapor edilmiştir (Hoshino ve ark., 1994). Çalışmamızdan elde edilen bulgular, Bottini, ve Gloria-Bottini (1999)'nin diyabetik bozukluklarda metabolik kontrolü güçlendirmek için adenosin reseptörünün farmakolojik modülasyonuna dayanan çalışmalarını destekler niteliktedir.

Sonuç

Sonuç olarak *N.oleander* bitki çiçeği liyofilize ekstresinin diyabetik rat modelinde antioksidan etkilerinin yanı sıra immun sistem parametreleri üzerinde de olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu olumlu etkilerin altında, bitkinin içeriğinde yer alan zengin vitamin ve fitokimyasal bileşiklerin (fenoller, flavonoidler ve glikozidler) olmasının yattığı kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

Bu araştırmaya maddi destek sağlayan, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na (Proje no: TSA-2016-5097) ve bitki örneklerinin teşhis edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Süleyman Mesut PINAR'a teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

- Akgun, S. G., Aydemir, S., Ozkan, N., Yuksel, M., Sardas, S. (2017). Evaluation of the wound healing potential of Aloe vera-based extract of Nerium oleander. *Northern Clinics of Istanbul*, 4(3), 205.
- Baytop, T., Baytop, A., Mat, A., Sun, S. (1989). Türkiyede zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3560, 975-404-111-3.
- Beutler, E, Dubon, O. B., Kelly, M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882-888.
- Bottini, E., Gloria-Bottini, F. (1999). Adenosine deaminase and body mass index in non—insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 48(8), 949-951.

- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol*, 78, 206-209.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Carson, D. A., Seegmiller, J. E. (1976). Effect of adenosine deaminase inhibition upon human lymphocyte blastogenesis. *J Clin Invest*, 57, 274-82.
- Dey, P., Dutta, S., Biswas-Raha, A., Sarkar, M. P., Chaudhuri, T. K. (2016). Haloalkane induced hepatic insult in murine model: amelioration by Oleander through antioxidant and anti-inflammatory activities, an in vitro and in vivo study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 280.
- Dey, P., Saha, M. R., Chowdhuri, S. R., Sen, A., Sarkar, M. P., Haldar, B., Chaudhuri, T. K. (2015). Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant Nerium oleander through alloxan induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 128-137.
- Dogan, A., Celik, I., Kaya, M. S. (2015). Antidiabetic properties of lyophilized extract of acorn (*Quercus brantii* Lindl.) on experimentally STZ-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 243–251.
- Dogan, A., Celik, İ. (2012). Hepatoprotective and antioxidant activities of grapeseeds against ethanol-induced oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition (BJN)*. 107(1), 45-51.
- Doğan, A. (2020). Diyabetik Ratlarda Zakkum (*Nerium oleander* L.) Çiçeği Etanolik Liyofilize Ekstresinin Eritrosit Frajilite, Hematolojik ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6), 1495-1502.
- Ergun, B. (1992). *Nerium oleander'in Bazı Suda Çözünen Bileşiklerinin in vitro Biyolojik Etkileri*. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Giusti, G., Bergmeyer, H. U. (1974). Handbook of enzymatic methods of analysis. New York Academic Press NO:2, pp. 1092–1099. New York-USA.
- Günkür K. (2019). *Preeklampside Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz, Paraoksonaz, Myeloperoksidaz ile Serum Amiloid A Düzeylerinin Belirlenmesi ve Aralarındaki İlişkinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Hase, G. J., Deshmukh, K. K., Murade, V. D., Pokharkar, R. D., Phatanagre, N. D., Hase, D. P., Dichayal, S., Gosavi, A. B. (2016). Phytopharmacology of *Nerium oleander* L. A review. *International Journal of Phytopharmacology*, 7 (2), 0975-9328.
- Hoshino, T., Yamada, K., Masuoka, K., Tsuboi, I., Itoh, K., Nonaka, K., Oizumi, K. (1994). Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 25(2), 97-102.
- Houslay, M. D. (1991). Crosstalks: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry*, 195(1), 9-27.
- Huang, T. H. W., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y. (2005). Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-c and identification of an active component. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 160–169.

- Jain, S. K., McVie, R., Duett, J., Herbst, J. J. (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycolylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, 38, 1539-1543.
- Mannervik, B., Guthenberg, C. 1981. Glutathione S-transferase (human placenta). *Methods Enzymol*, 77, 231-235.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem*, 244, 6049-6053.
- Mwafy, S., Yassin, M. (2011). Antidiabetic activity evaluation of glimepiride and Nerium oleander extract on insulin, glucose levels and some liver enzymes activities in experimental diabetic rat model. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14 (21), 984-990.
- Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967). Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158-169.
- Rabbani, S.I., Devi, K., Khanam, S. (2010). Protective role of glibenclamide against nicotinamide-streptozotocin induced nuclear damage in diabetic Wistar rats. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 1(1), 18-23.
- Reçper, M. (2007). *Tüberküloz Plörezide Plevra Sıvısı ve Serumda Ölçülen Adenosin de Aminaz, Gama İnterferon ve İnterlökin-18 Düzeylerinin Tanısal Değeri*. Uzmanlık Tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Senesi, S. (1990). Questioning the role of adenosine deaminase in the development of B lymphocytes in chicken bursa. *Developmental and Comp. Immunology*, 14, 95–104.
- Shore, A., Dosch, H. M., Gelfond, E. W. (1981). Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. *Clin Exp Immunol*, 44, 152-155.
- Strojek, K., (2003). Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetologica*, 40, 334–337.