

The Effect of *Plantago major* On Oral Flora in Experimental Diabetic Rats with Streptozotocin

Aynur AKÇAY^{*1}, Tünay KONTAŞ AŞKAR², Şinasi AŞKAR²

¹ Graduate School of Natural And Applied Sciences, Çankırı Karatekin University, 18200, Çankırı, TURKEY

² Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Çankırı Karatekin University, 18200, Çankırı, TURKEY

ABSTRACT

Diabetes mellitus is the most common endocrine disorder all over the world. In recent years, new alternative products are determined associated with diabetes treatment and the effects of many natural plants on diabetes are being studied. In this study we aimed to show the effect of *Pl. major* on oral flora with microbiological and biochemical markers in rats with experimental diabetes. 30 male Wistar albino rats as animal material were used in the study and separated into 5 groups (control, diabetic, *Pl. major*, diabetic + *Pl. major* and diabetic+insülin). All groups during the four week trial fed standard chow and water. Diabetes and diabetes with *Pl. major* to form each group of rats (65 mg / kg) was applied as a single dose STZ intraperitoneally. Following the formation of diabetes, by calculating the amount of water consume per rat 0.3 mg / ml of *Pl. major* extract were added to drinking water of rat groups with diabetes plus *Pl. major* and *Pl. major* per day. In addition, at the beginning and at the end of the study, also after the formation of diabetes, swab samples were taken from rats for determining total aerobic bacteria count in oral mucosa. Serum glucose and HbA1c levels in diabetes + *Pl. major* groups were found to be significantly lower than the diabetes group. There is no significant difference between two groups in the total bacteria number on oral mucosa. In light of the data obtained from the study we determined that application of *Plantago major* on rats with experimental diabetes reduced the blood glucose and HbA1c levels with its insulin-like effect, but did not effect total bacteria number in diabetes.

Keywords: Diabetes mellitus, Immune system, *Plantago major*, Rat

Streptozotosin ile Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Ratlarda *Plantago major*'ün Ağız Florası Üzerine Olan Etkisi

ÖZET

Diabetes mellitus tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır. Son yıllarda diyabet tedavisinde yeni alternatif ürünlerin belirlenmesi ile ilişkili olarak yapılan çalışmalarda pek çok doğal bitkinin diyabete olan etkisi çalışılmaktadır. Bu çalışma ile deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda *Pl. major*'ün ağız florası üzerine olan etkisinin biyokimyasal ve mikrobiyolojik belirteçler ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada hayvan materyali olarak 30 adet erkek Wistar Albino rat kullanılmıştır. Ratlar kontrol, diyabet, *Pl. major*, diyabet+*Pl. major*, diyabet+insülin olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Tüm hayvanlar 4 haftalık deneme boyunca standart yem ve suyla beslenmiştir. Diyabet oluşturmak için; diyabet ve diyabet+ *Pl. major* grubundaki ratlara (65 mg/kg) tek doz streptozotosin i.p. olarak uygulandı. Diyabet oluşumunu takiben diyabet+ *Pl. major* ve *Pl. major* grubunda bulunan ratlara günlük tüketecekleri su miktarı hesaplanarak, rat başına 0,3 mg/ml *Pl. major* olacak şekilde içme sularına eklendi. Ratların oral mukoza total bakteri sayısının belirlenmesi amacı ile 21 günlük deneme süresi boyunca her hafta svap örnekleri ve deneme sonunda kan örnekleri alındı. Diyabette *Plantago major*'ün ağız florası üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada; diyabet+*Plantago major* grubunda glikoz ve HbA1c düzeyleri diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşük bulunmuştur. Oral mukoza total bakteri sayısında ise her iki grup arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir. Yapılan bu çalışma ile; diyabette *Pl. major* uygulanmasının insülin benzeri etki göstererek, kan glikoz düzeyini düzenlediği, fakat ağız florası üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, Immün sistem, *Plantago major*, Rat

GİRİŞ

Diyabetes Mellitus tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır ve dünya nüfusunun yaklaşık % 6'sı diyabet hastasıdır (3,4). Hastalık insülin eksikliği veya in-sülin etkisindeki yetersizlik nedeniyle vücudun kar-bonhidrat, yağ ve proteinden etkili biçimde yarar-lanamadığı akut komplikasyonlarıyla ölüme neden olan ve uzun süreli tedavi gerektiren kronik bir metabolik hastalıktır (14).

Diyabetik hastaların bozulmuş bir savunma mekanizmaları vardır ve oral bakteriyel enfeksiyonların gelişimine daha duyarlıdır (13). Çünkü tükürük sekresyonunda azalma ve kimyasal yapısında değişme vardır. Ağız kuruluğu ve nefesin aseton kokması diyabet için karakteristiktir (12).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre tedavi amaçlı olarak 20.000 civarında tıbbi bitki kullanılmaktadır (2,6). Plantago major geçmişten günümüze kadar tıbbi amaçlar için çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve Plantaginaceae (Sinirliotgiller) familyasına ait bir bitkidir. Ülkemizde Karadeniz bölgesinde Giresun, Trabzon ve Rize'de yoğun olarak yetişmektedir. (10). Bitki ile yapılan farmakolojik çalışmalarda antienflamatuar, antibakteriyel, antioksidan, immun modulator ve antiülserojenik etki gibi birçok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bitki içeriğindeki bazı etken maddeler; alkaloidler, kafeik asit türevleri (plantamajoside ve acteoside), flavonoidler, iridoid glikozitler (Aucubin, Aucubigenin) olarak bildirilmektedir (5). Özellikle bitkinin içerdiği klorogenik asit ve neoklorogenik asidin antienflamatuar ve yara iyileştirici özellikleri yapılan in-vivo çalışmalarla gösterilmiştir.



Şekil 1. Plantago major (15)

Ayrıca Pl. major'un kan şekeri düzeylerini düşürdüğü halk arasında bilinmesine rağmen, bitkinin diyabetin ağız bölgesindeki komplikasyonlarına etkisi ile ilişkili çalışma bulunmamaktadır (6). Bu nedenle bu çalışmada deneysel

olarak diyabet oluşturulan ratlarda Pl. major'un ağız florası üzerine olan etkisinin biyokimyasal ve mikrobiyolojik belirteçler ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada 21-22 haftalık 30 adet 260-350 g ağırlığında erkek Wistar cinsi albino ratlar kullanıldı. Ratlar, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ritminde ışıklandırılan, 22±20C'deki odalarda, çeşme suyu ve standart pelet yem ile Pl. major ekstraktı ile beslendi. Çalışma için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar sayısı: 2014/18).

Ratlar 7 gün su ve standart rat yemi ile adaptasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda glukometre (One Touch Lifescan, America) ile başlangıç açlık kan şekerleri değerleri ölçüldü, vücut ağırlıkları tartıldı. Daha sonra ratlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı: a) Kontrol grubu; 4 haftalık deneme boyunca standart yem ve suyla beslendi.

b) Pl. major grubu ise 4 haftalık deneme boyunca günlük tüketilecekleri su miktarı hesaplanarak rat başına 100 mg/kg ticari Pl. major ekstraktı olacak şekilde içme sularına günlük olarak eklendi. c) Diyabet grubundaki hayvanlara diyabet oluşturulmak üzere pH 4,5'deki 0,1 M sitrat tamponu içinde eritilen streptozotosinin (STZ) 65 mg/kg olacak şekilde tek doz intraperitoneal (i.p.) enjekte edildi. Enjeksiyondan 7 gün sonra kuyruk veninden ölçülen kan glikoz düzeyi 300 mg/dl ve üzeri olan ratlar diyabetik olarak kabul edilerek sadece diyabet olan hayvanlarla çalışmaya devam edildi.

d) Diyabet+Pl. major grubundaki hayvanlarda streptozotosin ile diyabet oluşturuldu ve kan glikoz düzeyi 300 mg/dl ve üzeri olan ratlar diyabetik olarak kabul edilerek sadece diyabet olan hayvanlarla çalışmaya devam edildi. Diyabet olan ratlara 4 hafta boyunca günlük tüketilecekleri su miktarı hesaplanarak rat başına 100 mg/kg Pl. major ekstraktı olacak şekilde içme sularına bitki ekstresi günlük olarak eklendi.

e) Diyabet+ insulin grubunda da streptozotosin ile diyabet oluşturulduktan sonra kan glikoz düzeyi 300 mg/dl ve üzeri olan ratlar diyabetik olarak kabul edilerek sadece diyabet olan hayvanlarla çalışmaya devam edildi. Diyabet olan ratlar 4 hafta boyunca her gün standart yemle beslendi ve rat başına 1 IU insülin subkutan olarak verildi.

Çalışmada şeker hastalığının oluşumu; ratların kuyruk

veninden alınan kan örneklerinde glikoz düzeyinin glukometre (One Touch Lifescan, America) kullanılarak ölçülmesi ile belirlendi. 4 haftalık çalışma periyodunun sonunda, 12 saatlik açlığı takiben, genel anestezisi altında serum tüplerine kan alındı. Kan örneklerinde HbA1c düzeylerinin ölçümü ise immünotürbidimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Kan glikoz düzeylerinin ölçümünde ise enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı.

Çalışmada toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının belirlenmesi amacı ile denemenin başlangıcında, şeker hastalığı oluşturulduktan sonra hayvanlardan svap örnekleri alındı. Transport besiyerli svaplara alınan örnekler laboratuvarında %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde on katlı (log10-2) olacak şekilde dilue edildi. Her bir sulandırmadan (log 10, Log 10-1, Log10-2) 0,1 ml alınarak yayma plak yöntemine göre üç paralelli olacak şekilde pleyt count avara (PCA Merck, pH=7.0) ekildi. Ekim sonrası agarlar 37 °C'de 24-48 saat inkube edildikten sonra, besi yerinde oluşan olan koloniler sayılarak toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı belirlendi.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde "SPSS 17.0" paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Student t test kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar $X \pm Se$ olarak verildi. $P < 0,05$ ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

BULGULAR

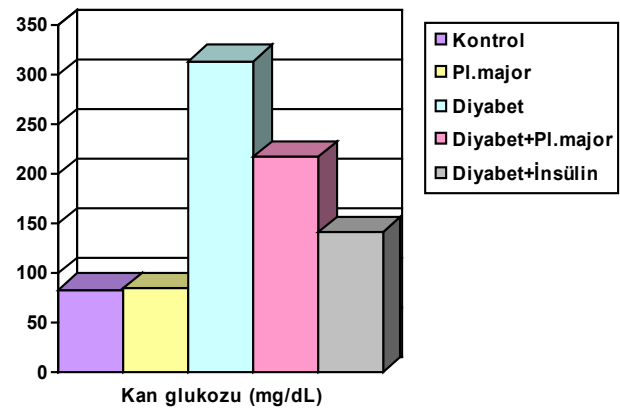
Deneyisel olarak streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda *Plantago major*'un ağız florası üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanan bu çalışmada, deneyisel diyabet oluşturulan ve 21 günlük deneme süresi boyunca *Pl. major* ekstratı ile beslenen ratların ağız mukozası total bakteri sayıları Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışmada 21 günlük deneme süresinin sonunda oral mukozanın total bakteri sayısında ratların dişlerinin fırçalanmaması ve ortam koşullarına bağlı olarak tüm gruplarda bir artış olmuştur. Diyabet, diyabet+*Pl. major* ve diyabet+insülin grubunun total bakteri sayısı kontrol ve *Pl. major* grubuna göre yüksek bulunmuştur. Diyabet+insülin grubunun total bakteri sayısı, diyabet ve diyabet+*Pl. major* grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

Tablo 1. Deneme gruplarındaki ratların haftalık oral flora total bakteri sayısı (log10¹kob/ml)

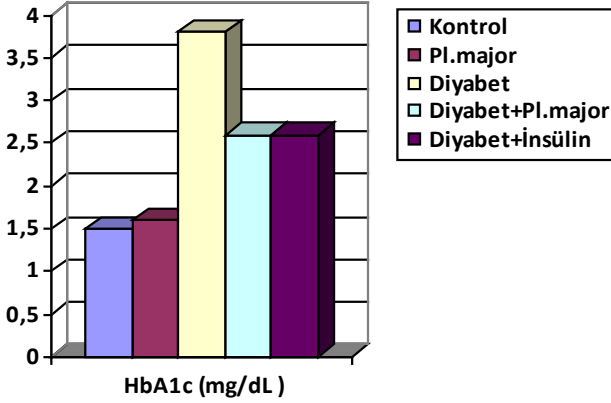
Gruplar	0. Gün	7. Gün	14. gün	21.gün
Kontrol	422±12	607±15a	730±10b	952±13c
<i>Pl. major</i>	470±15	630±12a	820±14b*	1050±16c
Diyabet	510±16 *	1250±13a*	1713±12 b	1890±10c*
Diyabet + <i>Pl. major</i>	505±13 *	1026±16 a*	1582±10 b	1764±14 c*
Diyabet + İnsülin	480±11	850±15a	1228±12b	1380±14c

Yapılan bu çalışmada kan glukoz düzeyleri ise; kontrol grubunda ortalama 83,4 mg/dL olarak ölçülürken, diyabet grubunda ortalama 314,5 mg/dL, diyabet+ *Pl. major* grubunda ortalama 216,9 mg/dL ve insülin grubunda ortalama 141,5 mg/dL olarak ölçülmüştür. Diyabet grubunun kan glukoz değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Diyabet+ *Pl. major* grubunun kan glukoz sonuçları diyabet grubundaki ratlara göre daha düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Diyabet+ *Pl. major* grubunun kan glukoz sonuçları kontrol grubundan, istatistiksel olarak ($p < 0,001$) önem düzeyinde yüksek bulunmuştur. Diyabet+ İnsülin grubunun kan glukoz sonuçları diyabet+*Pl. major* grubundaki ratlara göre daha düşük bulunmuştur. Diyabet+ İnsülin grubunun kan glukoz sonuçları kontrol grubundan, istatistiksel olarak ($p < 0,001$) önem düzeyinde yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ve *Pl. major* grubu arasında kan glukoz seviyelerinde istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (Şekil 1).



Şekil 2. Deneme gruplarındaki ratların kan glukoz düzeyleri
Çalışmada HbA1c düzeyi ise; kontrol grubunda ortalama 1.5 mg/dL olarak ölçülürken, diyabet grubunda ortalama 3.8 mg/dL

dL ve diyabet+ Pl.major grubunda ortalama 2.6 mg/dL olarak ölçülmüştür. Diyabet+ Pl.major grubunun HbA1c sonuçları diyabet grubundaki ratlara göre daha düşük bulunmuştur. Diyabet+ Pl.major grubunun HbA1c sonuçları kontrol grubundan, istatistiksel olarak $p<0,001$ önem düzeyinde yüksek bulunmuştur. İnsülin grubunun kan HbA1c değerleri ise diyabet grubuna göre düşük bulunurken ($p<0,01$), diyabet +Pl. major grubu ile anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 2).



Şekil 3. Deneme gruplarındaki ratların HbA1c düzeyleri

TARTIŞMA ve SONUÇ

Diabetes mellitus, vücutta çeşitli rahatsızlıklara hatta ölüme yol açabilecek, hiperglisemi ile seyreden sistemik bir metabolik hastalıktır. Diyabet tedavisinde yeni alternatif ürünlerin belirlenmesine katkı sağlamak amacı ile yapılan bu çalışmada, STZ ile deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda Pl.major ekstraktının etkisi incelenmiştir.

Diyabet hastalarında çok erken yaşlarda görülen diş kaybının esas sebebinin periodontal hastalık olduğu ifade edilmiştir. Diyabette periodontal hastalıkla birlikte gözlenen oral bulgular damar değişiklikleri, anormal kollojen metabolizması, oral mikrobiyal florada değişiklikler ve anormal savunma mekanizması şeklinde özetlenebilir (11). 21 günlük çalışmamızdaki deneme gruplarının ağız mukozası total bakteri sayı değişiklikleri Çizelge 1'de görüldüğü gibidir. Tüm grupların total bakteri sayılarında bir artış söz konusudur, bunun nedeninin ratların ağız ve diş temizliği sağlanmaması ile ilişkili olabilir. Diyabet, diyabet+Pl. major ve diyabet+insülin gruplarının total bakteri sayıları kontrol ve Pl. major grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bu artış diyabetli hastalardaki oral flora değişikliği ile ilişkili olabilir. Cianter

ve ark. (7) yaptıkları çalışmada diyabeti ve periodontitisi olan bireylerin ilgili bölgedeki Capnocytophaga spp. gibi mikroorganizmaların sayısını diyabeti olmayan periodontitisi bireylerden daha fazla bulmuşlardır. Diyabet+insülin grubunun total bakteri sayısı diyabet ve Diyabet+Pl. major grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Kontrol altında olan diyabet, diş hastalıkları bakımından predispozan faktör teşkil etmediğinden (12) dolayı insülin ile kontrol altına alınmaya çalışılan diyabetli ratlarda total bakteri sayısı daha az artış göstermiştir. Pl. major ekstraktının total bakteri sayısını üzerinde azaltıcı etki göstermediği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada diyabetli ratlar ile Pl. major takviyesi verilen ratlarda karbonhidrat metabolizması belirteçlerinin düzeyleri de belirlenmiştir. Pl. major ekstraktı verilen diyabetli ratların kan glikoz ($p<0,05$) ve HbA1c ($p<0,01$) düzeyleri diyabet grubundaki ratlara göre düşük bulunmuştur (Şekil 1,2). Günümüzde HbA1c'nin diyabetlilerde glisemik kontrolü göstermesi ile birlikte diyabetik komplikasyon gelişme riskini ve diyabetik bakımın kalitesini yansıttığı kabul edilmektedir (8). Çalışmada Pl.major takviyesi yapılan diyabetli ratlarda kan glikoz ve HbA1c düzeylerinde belirlenen değişimlerin Pl.major'un pankreas hücrelerinden insülin stimülasyonunu ve hücrelerde reseptör düzeyinde insülin etkinliğini arttırmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bitkiler her zaman için önemli bir ilaç kaynağı olmuştur ve günümüzde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı doğrudan veya dolaylı olarak bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir (1). Diyabet tedavisinde insülin ve çeşitli sentetik anti-diyabet ilaçlar kullanılmaktadır (4, 9). Plantago major'un antienflamatuvar, antibakteriyel, antioksidan, immun modulator ve antiülserojenik etki gibi birçok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (5). Yapılan bu çalışma ile; diyabette Pl. major uygulanmasının insülin benzeri etki göstererek, kan glikoz düzeyini düzenlediği, fakat ağız florası üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi BAP(Proje No:FF12035L15) ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Aşkar Ş, Deveboynu ŞN, (2018). Investigation of In-Vitro Antibacterial Activity of Curcuma longa Commercial Extract. Eurasian Journal of Health Sciences 1(1);1-6.
2. Aşkar TK, Er H, Demirdöğen RE, (2018). The Effects of Boron on Bone Metabolism as a Nutraceutical: A Review. Eurasian Journal of Health Sciences 1(1);7-12.
3. Al Shamsi M, Amin A, Adeghate E, (2006). Effect of vitamin C on liver and kidney functions in normal and diabetic rats. Annals New York Academy of Sciences 1084: 371-390.
4. Aslan M, Orhan N, (2010). Diyabet tedavisinde kullanılan bitkisel ürünler ve gıda destekleri. Mised 23-24; 27-38.
5. Bingöl NT, Karslı MA, Aldemir R, Yılmaz O, Türel İ, (2010). Etli piliçlerin yemlerine katılan Plantago major ekstraktının performans ve karkas özellikleri üzerine etkisi. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi 21(1); 49-53.
6. Choi SY, Jung SH, Lee SL, Park KW, Yun BS, Lee KW, (2008). Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in Plantago asiatica extract. Phytother Res 22; 323-329.
7. Cianter M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA, (2005). Capnocytophage spp. İn periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. Journal of Periodontology 76(2); 194-203.
8. Herman WH, Fajans SS, (2010). Hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes: practical considerations. Pol Arch Med Wewn 120; 37-40.
9. Irudayaraj SS, Sunil C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, (2012). Antidiabetic and antioxidant activities of Toddalia asiatica (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 143:515-523.
10. Okan OT, Varlıbaş H, Öz M, Deniz İ, (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi 13(1);48-59.
11. Özsoy N, Bostancı H, Ayvalı C, (2003). Alloksan diyabetin sıçanlarda dişeti dokusuna etkisi. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 20(2): 35-41.
12. Öztürk A, Keskin A, (2003). Diş hekimliğinde tıbbi sorunlar. 6. baskı, 112-120. Ankara.
13. Tunalı M, Erşahan Ş, Aydınbelge M, (2014). Periodontal hastalık ile diyabet arasında çift yönlü ilişki. Sağlık Bilimleri Dergisi 23(1); 28-38.
14. Türken M, Yılmaz S, Çolpan L, Aydınol B, Tuzcu AK, (2015). Tip I diyabetli erişkinlerde D vitamini eksikliğinin serum sIL-2R, IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri üzerine etkisi. Dicle Tıp Dergisi 42(4); 432-437.
15. Naturally by Trisha. Plantain (Kopakopa) Plantago major, Erişim tarihi: 16.5.2018, Erişim adresi: URL-<http://www.naturallybytrisha.com/trisha-s-blog/plantain-plantago-major/>