



ISSN:1306-3111

e-Journal of New World Sciences Academy
2011, Volume: 6, Number: 4, Article Number: 5A0068

ECOLOGICAL LIFE SCIENCES

Received: September 2011

Accepted: October 2011

Series : 5A

ISSN : 1308-7258

© 2010 www.newwsa.com

Zafer Cambay

Firat University

zcambay@gmail.com

Elazig-Turkey

**DIYABETİK SIÇANLARDA NAR (*Punica granatum*) ÇİÇEĞİNİN SERUMDAKİ
HOMOSİSTEİN DÜZEYİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda narçiçeğinin homosistein üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Diyabetten dolayı homosistein değerlerinin anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.05$) fakat narçiçeği uygulamasının bu değerlere etkisinin olmadığı ($p > 0.05$) gözlenmiştir. Diyabet hastalarına narçiçeği verilmesinin homosistein değerlerinde herhangi olumlu veya olumsuz etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Narçiçeği, Serum, Siçan,
Homosistein,

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF POMEGRANATA FLOWER (*Punica granatum*)
ON SERUM HOMOCYSTEINE LEVEL IN DIABETIC RATS**

ABSTRACT

In this study, the effects of flower of pomegranata on homocysteine in the blood are investigated in the STZ-induced diabetic rats. Because of diabetes, homocysteine values were significantly decreased ($p < 0.05$) but had no effect on these values the application of pomegranate flower ($p > 0.05$) were observed. Administration of pomegranate flower diabetics homocysteine levels were not any positive or negative effect.

Keywords: Diabetes, Pomegranate Flower, Serum, Rat,
Homocysteine

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Diabetes mellitus insülin etkisinin ya da insülin salgılanmasının veya her ikisinin bozukluğunun meydana getirdiği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemi olarak tanımlanır. DM uzun dönemde çeşitli organlarda (gözler, böbrekler, kalp, beyin, kan hücreleri) hasarlar, fonksiyon bozuklukları ve yetersizlikler ile seyreder [1].

Diabetes mellitusun seyri esnasında gelişen kapiller membran değişiklikleri ve yan metabolik yollardaki bozukluklar, tedavisi oldukça güç olan mikroanjiopati, nöropati, katarakt gibi bazı komplikasyonların gelişimine yol açmaktadır. Diyabetes mellitusun ateroskleroza eğilim sağlaması ise büyük damar hastalığının en önemli nedenidir [2 ve 3].Diyabetin komplikasyonları akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır.

Akut komplikasyonlar, diyabetik ketoasidoz, hipoglisemi koması, laktik asidoz koması, hiperglisemi koması ve nonketotik hiperosmolar komadır.

Kronik komplikasyonlar ise mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olmak üzere iki başlık altında incelenir. Diyabetik nefropati, diyabetik retinopati ve diyabetik nöropati mikrovasküler hastalık sonucu oluşurken, büyük damarların aterosklerozunun hızlanması sonucu makrovasküler hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Makrovasküler hastalıklar diyabette mortalitenin en önemli sebebidir [4].

1.1. Homosistein (Homocysteine)

Homosistein sülfür içeren bir amino asittir ve metionin metabolizmasının bir ürünüdür. Homosistein, diyetle alınan ve endojen proteinlerden sentezlenen esansiyel bir aminoasit olan metioninin metil grubu alınmış bir türevidir. Yani metioninden metabolize olan thiol'lü esansiyel bir aminoasittir. Homosistein vücutta remetilasyon ya da transsülfürasyon yoluyla olmak üzere iki şekilde metabolize olmaktadır [5 ve 6];

- Remetilasyon: Normal hücre için homosisteinin yaklaşık % 50 'si iki remetilasyon yoluyla tekrar metil gurubu alarak metionine çevrilir.
- Transsülfürasyon: Remetilasyon yolu satüre olduğunda ya da sistemin yetersiz olduğu durumlarda homosistein, sistasyon β - sentaz (CBS) tarafından sistasyona çevrilmektedir.

Homosisteinin insülin veya sülfanüreaların metabolizmasını bozduğuna dair bir delil yoktur. Buna karşılık metformin vit B12 emilimini azalttığı belirtilmiştir dolaylı olarak serum homosistein düzeyini yükseltebilmektedir [7]. Başka bir çalışmada ise metforminin önemli bir etkisi olmadığı belirtilmiştir [8].Yapılan bir çalışmada ratlar 4 gruba ayrılmışlardır. Bunlardan birinci grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiş, ikinci grup düşük doz insülin alan, üçüncü grup yüksek doz insülin alan, son grup da hiç insülin almayan ratlardan oluşturulmuştur. İkinci grup ratların kan şekeri 300-500 arasında değişmektedir, bununla birlikte üçüncü grup yüksek doz insülin alanların kan şekeri, 150-300 arasında değişmektedir. 6 hafta sonunda hiç insülin almayan grupta, kan şekeri, total kolesterol, trigliserit ve LDL seviyeleri, anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Düşük ve yüksek doz alan, ikinci ve üçüncü grup ratlarda insülin dozuna bağlı olarak lipid seviyeleri düşmüştür. Homosistein seviyeleri ise hiç insülin almayan grupta 6 hafta süresinde diğer gruplara göre anlamlı oranda düşük çıkmıştır. Bu çalışmaya göre, diyabetin başlangıcında insülin yokluğunda tHcy seviyeleri düşmektedir. Ama hastalığın seyrinde komplikasyonlar ortaya çıktığında tHcy seviyeleri

yükselmektedir. Ayrıca böbrekte bir sorun varsa homosistein metabolizması etkilenecektir. Diğer taraftan insülin, dokuların aminoasit alımını arttırmaktadır. İntrasellüler metionin alımı da dolaylı olarak artmaktadır ve Hcy seviyeleri de demetilasyonla artış göstermektedir. Homosistein konsantrasyonu hepatik transsülfürasyon enzim aktivitesinin (CBS ve C gama Lyase) düşmesine neden olmaktadır [9].

2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Günümüzde diyabetin kontrolünü sağlamak ve komplikasyonlarını azaltmada artık alternatif tedavilere ihtiyaç duyulduğu gözlenmiştir. Diyabetin tedavisinde ve önlenmesinde pek çok tıbbi bitki kullanılmaktadır. Antioksidan etki gösteren ve tıbbi bitki litaretüründe yer alan günümüzde önemi gittikçe artan tedavi edici etkiye sahip bir meyve Punicaceae familyasından *Punica granatum* (Nar) meyve suyunun, meyve ve kabuk ekstraktlarının çekirdeklerinin tohum yağları, tohum ekstraktlarının ve çiçeğinin önemli oranda antioksidan özelliğe sahip olduğu bulunmuştur [10].

Çalışmada *Punica granatum* çiçeğinin antioksidan etki göstereceği dozlarda deneysel olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlara verilerek serumdaki homosistein düzeyleri saptanmıştır. Ayrıca antioksidan etkisi olan *Punica granatum* çiçeğinin homosistein düzeyine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

3. DENEYSEL YÖNTEM (EXPERIMENTAL METHOD)

Deneylerde kullanılan Wistar albino cinsi ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi.

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) (24.06.2008 / Toplantı: 6; Karar No:31) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının buldukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saatte karanlıkta takip edildi. Deneysel çalışmalarda ortalama ağırlıkları 220 gr (220 ±40 gr) olan toplam 60 adet Wistar-albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar ağırlıkları birbirlerine en yakın olanlar ayrı ayrı seçilerek her kafeste 4 rat olacak şekilde 3'er kafesli 5 grup oluşturuldu. Bu gruplar;

- 1.Grup: Kontrol grubu (n=12)
- 2.Grup: Diyabet (STZ) grubu (n=12)
- 3.Grup: STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği I (n=12)
- 4.Grup: STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği II (n=12)
- 5.Grup: STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği III (n=12)

Mevcut laboratuvar şartlarımızda, deneysel diyabet oluşumunun kaçınıcı günlerde meydana geldiği gözlemlenerek deneysel uygulama başlatıldı. Çalışmanın başlangıcında ve her hafta düzenli bir şekilde ağırlık değişiklikleri kaydedildi.

- Kontrol Grubu: 12 adet rattan oluşan bu gruba 8 haftalık uygulama boyunca hergün sadece rat yemi ve su ile beslendi. Gruptaki ratların bazal ve 7 hafta sonra örneklerin alınması öncesinde olmak üzere toplam 2 kez kan şekerlerine bakıldı.

- STZ Grubu: 12 adet rattan oluşan bu gruba STZ, 60 mg/kg olacak şekilde 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. Bir hafta sonra kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu 220 mg/dl'yi geçen ratlar, diyabetik olarak kabul edildiler. Ratlara 8 haftalık uygulama boyunca her gün sadece rat yemi+su verildi.
 - STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği I: İkinci grupta olduğu gibi diyabetik hale getirilen 12 adet rata 8 hafta boyunca her gün düzenli olarak 300mg/kg/gün nar çiçeği toz haline getirilerek %1.5 oranında nar çiçeği ve rat yemi pellet halinde oral yolla ile beslenmesi sağlandı.
 - STZ+ Nar (*Punica granatum*) çiçeği II: Diyabetik hale getirilen 12 adet rata 8 hafta boyunca her gün düzenli olarak 400mg/kg/gün nar çiçeği toz haline getirilerek %2.0 oranında nar çiçeği ve rat yemi pellet halinde verildi.
 - STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği III: Bu gruptaki diyabetik ratlara yine 8 hafta boyunca her gün düzenli olarak 500mg/kg/gün nar çiçeği toz haline getirilerek %2.5 oranında nar çiçeği ve rat yemi pellet halinde verildi.
- Kontrol grubunun kan glukoz seviyeleri 96±5.8 mg/dL, diyabet grubunun 231±3.2 mg/dL, diyabet + Nar çiçeği-I grubu 222±3.4 mg/dL, diyabet + Nar çiçeği-II grubu 228±3.8 mg/dL, diyabet + Nar çiçeği-III grubu 221±4.4 mg/dL olarak ölçüldü.

3.1.Örneklerin Alınması (Samples Taken)

Deneyisel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen ratların kanları biyokimya tüplerine aktarılıp 5000 x g'de 10 dk. santrifüj edilip tüplere aktarıldı.

4. BULGULAR (FINDINGS)

Deneyisel çalışmaların sonucunda diyabet grubunda 4 rat, diyabet + Nar çiçeği-I grubu 2, diyabet + Nar çiçeği-II grubu 3, diyabet + Nar çiçeği-III grubunun 4'ü öldü. Deney aşamasının sonunda her gruptan 8 hayvan alındı.

Kontrol, Diyabet, diyabet + Nar çiçeği-I grubu, diyabet + Nar çiçeği-II grubu ve diyabet + Nar çiçeği-III grubundan 8'er hayvan dekapite edilerek kan örnekleri alınıp homosistein testi çalışmak üzere tüplere konuldu.

Homosistein Ölçümü (Measurement Of Homocysteine):

Protein bağlı homosistein, serbest homosisteine ve o da enzimatik olarak S-adenosil -L-homosisteine (SAH) dönüşür. [11].İkincil 'rabbit anti-mouse' antikoru, 'horse radish' peroksidaz eklenerek işaretlenir ve bu peroksidaz aktivitesi substrat eklendikten sonra spektrofotometrik olarak ölçülür. Absorbans (450 nm) numunedeki homosistein miktarıyla ters ilişkilidir. EDTA' li tüplere alınarak santrifüj edilip plazmaları ayrılan kanlar ticari test kitleri kullanılarak (Biotek Elx800) ELİSA ile yapıldı.

Tablo 1. Deney hayvanlarının ortalama vücut ağırlıkları
(Table 1. Mean body weights of experimental animals)

Vücut Ağırlığı (gr)	Kontrol	STZ	STZ+NÇI	STZ+NÇII	STZ+NÇIII
Deney Öncesi	232±36	211±17	216±22	220±26	228±30
Deney Sonrası	276±42	154±18	176±20	182±24	196±26

Tablo 2. Grupların homosistein düzeyleri
(Table 2. Homocysteine levels of groups)

TEST	KONTROL	STZ	STZ+NÇI	STZ+NÇII	STZ+NÇIII
Homosistein (Mikromol/l)	5.1±1.42	2.4±1.28 ^a	2.5±1.34	2.6±1.18	2.6±1.28

a-p<0.05

5. TARTIŞMA (DISCUSSIONS)

Diyabet, dünya genelini ilgilendiren kronik bir rahatsızlıktır. Bu hastalık, kronik hiperglisemiyle ve karbohidrat, protein ve lipid metabolizmasındaki düzensizliklerle bağlantılı olacak şekilde nispeten veya tamamen insülin salınımındaki azalmayla karakterize edilir [12]. Son zamanlarda bitkisel materyallerdeki doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır. Hem bilimsel raporlardan ve hem de laboratuvar çalışmalarından elde edilen bilgiler göstermiştir ki bitkiler çok çeşitli antioksidan özellikte maddeler ihtiva etmektedir. Antioksidan özellik gösteren fitokimyasalların bazıları polifenoller, monoterpenler, lignanlar, flavonoidler, diterpenler, taninler gibi maddelerdir [23]. Çalışmamız narçiçeğinin antioksidan etki göstereceği dozlarda deneysel olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlara verilmesi ve diyabet sonucu homosistein miktarını nasıl etkilediği, narçiçeğinin diyabette homosisteine etkisi araştırıldı.

Homosistein yüksekliğinin, koroner kaynaklı hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya çıkmıştır [13 ve 14]. Homosistein serbest radikal gibi davranarak LDL'yi oksitlemektedir [15]. Hipo- ve hipertiroidili olgularda plazma homosistein düzeylerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı hipo- ve hipertiroidide plazma homosistein düzeylerinin değişmediğini savunurken bir kısım çalışma ise hipertiroidide plazma homosistein düzeylerinin arttığı belirtilmiştir [16 ve 17]. Nedrebo ve arkadaşları kontrol grubuna göre hipertiroidili grupta plazma homosistein düzeylerinin istatistik açıdan değişmediğini bildirmelerine rağmen, hipertiroidili kardiyovasküler kaynaklı ölümlerden plazma homosistein düzeylerinin artmış olmasının katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Farklı bir çalışmada [18]. Tip 1 diabetik hastaların %35'inde homosistein seviyesi yükselmiştir ve bunlarda diyabetin yan etkileri olan retinal hasar, nefron hasarı ve kardiyovasküler hastalıklar gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada Chico ve arkadaşları [19] Tip 1 diyabetiklerde homosistein miktarının değişmediği, Tip 2 diyabetiklerde ise homosistein miktarının kontrole göre yüksek olduğu ve Tip 2 diyabetik hastalarda homosistein seviyesiyle vasküler hastalıklar arasında bir ilişki olduğu görülmüştür. Homosistein fazlalığında homosistein tiolakton ortaya çıkararak, LDL'nin apolipoproteinlerinde değişikliğe yol açar. Değişikliğe uğramış LDL'ler makrofajlarca fagosite edilirler ve köpük hücreleri ortaya çıkar ve bu da ateroskleroza zemin hazırlar [20]. Robillon ise, Tip 1 diyabetiklerde homosistein seviyesini kontrole göre düşük bulmuştur [21]. Bulgularımızda ise diyabetik gruptaki homosistein seviyesi kontrole göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Bunun nedeni, transsülfürasyonda görevli enzim aktivitesinin yükselmesiyle [22] homosisteinin sisteine dönüşmesi olabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda homosistein düzeyinin STZ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü (p<0.05) STZ gruplarına verilen narçiçeğinin homosistein miktarını anlamlı olarak düşürmediği saptanmıştır.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Vincent, A.M., Russell J.W., Low, P., and Feldman, E.L., (2004). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25, 612-628.
2. Kaur, C. ve Kapoor, H.C., (2005). Antioxidant activity of some fruits in Indian diet. *Acta Horticulturae*, 696, 563-565.
3. Memişoğulları, R., (2003), Plazma homosistein düzeyleri ile tip 2 diyabet, komplikasyonları, kontrolü ve süresi arasındaki ilişkinin karşılaştırılması, Biyokimya Programı Uzmanlık Tezi, Erzurum.
4. Deedwania, P.C., (2000) Mechanism of the deadly quartet, *Can. J. Cardiol.*, 16, 17-20.
5. Hankey, G.J. and Eikelboom, J.W., (1999). Homocysteine and vascular disease, *The Lancet*, 354, 407 - 413.
6. Selhub, J., (1999), Homocysteine Metabolism, *Ann. Review of Nutrition*, 19, 219 - 246.
7. DeFronzo, R.A. and Goodman, A.M., (1995). The multicenter metformin study group. Efficacy of metformin in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 333, 541-549.
8. Hoogeveen, E.K., Kostense, P.J., Jakobs, C., Bouter, L.M., Heine, R.J., and Stehouwer, C.D., (1997). Does metformin increase the serum total homocysteine level in non-insulin-dependent diabetes mellitus *J. Intern. Med.* 242, 389 - 394.
9. Gursu, F.M., Baydas, G., Cikim, G., and Canatan, H., (2002). Insulin increases homocysteine levels in a dose dependent manner in diabetic Rats, *Archives of Med. Res.*, 33, 305 - 307.
10. Nawwar, M.A., Hussein, S.A., and Merfort, I., (1994). NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry* 36: 793-798.
11. Sundrehagen, E., Axis Biochemicals ASA., Enzymatic assay for homocysteine and a kit therefor. EP 623174/US5631127.
12. Kahn, C.R., Weir, G.C., King, G.L., Jacobson, A.M., Moses, A.C., and Smith, R.J., Joslin's, (2005). *Diabetes Mellitus*. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston. 331-338.
13. Sansoy, S., (2000) Risk Faktörleri ve hiperlipidemi tedavisinde kılavuz kurallar, *Türkiye Klinikleri Journal of Cardiology Hiperlipidemi Özel Sayısı* 13: 33-40.
14. Challem, J. and Dolby, V., (1997), Homocysteine: The Secret killer, the real cause of heart disease and stroke, *Good Healty Pub* 13-21.
15. Köseoğlu, M.H., Fadıloğlu, M., Çelik, Y. ve Güneri, S., (1999), Koroner kalp hastalığında serum malondialdehid düzeylerinde oluşan değişiklikler, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 77-88.
16. Nedrebo, B.G., Ericsson, U.B., and Nygard. O., (1998), Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hyperthyroid patients. *Metabolism* 47: 89- 93.
17. Demirbas, B., Özkaya, M., Cakal, E., (2004) Plasma homocystein levels in hyperthyroid patients. *Endocr J* 51: 121-125.
18. Hofman, M.A., (1997), Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care*; 20; 1880-1886.
19. Chico, A., Perez, A., Cordoba, A., Arcelus, R., and Carreras, G., (1998) Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus, *Diabetologia* 41: 684-693.



20. Boushey, C.J., Beresford, S.A., Omenn, G.S., and Motulsky, A.G., (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Jama* 274: 1049-1057.
21. Robillon, J.F., Canivet, B., Candito, M., et al. (1994) Type 1 diabetes mellitus and homocysteine. *Diabetes Metab.* 20: 494-496.
22. Wing, R.R., Koeske, R., Epstein, L.H., et al. (1987) Long-term effects of modest weight loss in type 2 diabetic patients. *Arch Intern Med* 147: 1749-1753.