



## Koyunlarda Phlorizinin Serum Lipid Profili ve Oksidatif Stress Parametreleri Üzerine Etkisi\*

İlknur KARACA BEKDİK, Ali Cesur ONMAZ

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları AD, Kayseri-TÜRKİYE

**Özet:** Bu çalışmanın amacı koyunlarda phlorizin uygulamasının serum lipid profili ve oksidatif stres indikatörleri üzerine etkinliğini araştırmaktır. Çalışmada 10 adet laktasyonda ve gebe olmayan koyun kullanıldı. Phlorizin 100 mg/kg dozunda her koyuna derialtı yolla enjekte edildi. Çalışma öncesi ve sonrasında koyunların canlı ağırlık (CA) ve sırt yağı kalınlığı (SYK) ölçüldü. Çalışmadan önceki (0. saat) ve sonraki 12., 24., 48., 72. ve 120. saatlerde alınan kan örneklerinde hematolojik analizler ve lipid profilini içeren biyokimyasal parametreler ve oksidatif stres indikatörleri analiz edildi. Aynı saatlerde idrar örnekleri de analiz edildi. Histopatolojik muayene için, çalışmadan 24 saat önce ve sonra iki adet koyundan karaciğer biyopsi örnekleri alındı. Çalışma sonucunda, phlorizinin ortalama CA, SYK, total lökosit (WBC), insülin, glukoz, kan üre nitrojen (BUN), kreatinin, trigliserit (TG), alkalin fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), total oksidan seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerlerini önemli ölçüde azalttığı ( $p<0.05$ ) ve ortalama trombosit (PLT), hemoglobin (Hgb), esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA) değerlerini ise önemli oranda artırdığı belirlendi ( $p<0.05$ ). İdrar örneklerinde proteinüri ve glikozüri tespit edildi. Histopatolojik muayenede, phlorizin uygulamasından sonra hepatositlerin sitoplazmalarındaki yağ vakuollerinin sayısında azalma görüldü. Bu çalışma koyunlarda phlorizinin antihiperlipidemik, antihiperlipidemik ve antioksidan olarak önerilebileceğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, lipid profili, oksidatif stres, phlorizin

### The Effects of Phlorizin on Serum Lipid Profile and Oxidative Stress Parameters in Sheep

**Summary:** The aim of this study was analyse the effect of phlorizin application on serum lipid profile and oxidative stress indicators in sheep. Ten non-lactating and non-pregnant sheep were used in this study. Phlorizin was subcutaneously injected at a dosage of 100 mg/kg to each animal. Body weight (BW) and subcutaneous fat thickness (SFT) were measured at the beginning and at the end of the study. Hematological, biochemical parameters including lipid profile, and oxidative stress indicators were analysed in blood samples obtained before (0th hour) and 12., 24., 48., 72. and 120th hours after the study. Urine samples were analysed at the same time intervals. Liver biopsy materials were obtained from two sheep 24 hours before and after the study for histopathological examinations. Results indicate that phlorizin significantly decreased the mean BW, SFT, total leukocyte (WBC), insulin, glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinin, triglyceride (TG), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), total oxidative status (TOS) and oxidative stress index (OSI) values ( $p<0.05$ ), and significantly increased the mean platelets (PLT), hemoglobin (Hgb) and non-esterified fatty acids (NEFA) values ( $p<0.05$ ). Proteinuria and glycosuria were determined in urine samples. Histopathological examinations revealed a progressive decrease in cytoplasmic lipid vacuoles of hepatocytes after phlorizin administration. This study suggests that phlorizin could be proposed as an antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant agent in sheep.

**Key Words:** Lipid profile, oxidative stress, phlorizin, sheep

### Giriş

Phlorizin elma ağacının kök kabuklarında, sürgünlerinde ve yapraklarında bulunan başlıca fenolik glikozittir (18). Phlorizin ilk kez Fransız kimyagerler tarafından 1835'de elma ağacının kabuğundan izole edilmiştir. (33). Ayrıca Avustralya yerli saparna (*Smilax glycyphylla*) yaprakları (9), tatlı çay (*Lithocarpus polystachyus*) (11) ve çok düşük seviyede çilek meyvesinde (16) de bulunmaktadır.

Phlorizinin başlıca farmakolojik etkisi renal glikozüri oluşturmak ve sodyuma bağlı glikoz transportunu inhibe ederek bağırsaklardan glikoz emilimini bloke etmektedir (13,38). Phlorizinin hipoglisemi ve hipolipemiye yol açmasının (26,39) yanı sıra, lipid peroksidasyonunun önlenmesi (35), kemik erimesinin önlenmesi (34), hafıza gelişimi sağlanması (5,14) ve insan kolon kanser hücrelerinin büyümesinin önlenmesi (37,40) gibi bir seri yeni biyoaktif fonksiyonu rapor edilmiştir (12,40). Phlorizinin sığırlarda (38) ve koyunlarda (7) renal glikoz reabsorpsiyonunu, ratlarda da intestinal glikoz absorpsiyonunu engellemek için kullanıldığı bildirilmektedir (20,22). Mevcut çalışmada, koyunlardaki etki mekanizmaları tam olarak araştırılmamış phlorizinin, hematolojik parametreler,

Geliş Tarihi / Submission Date : 08.11.2013

Kabul Tarihi / Accepted Date : 27.12.2013

\*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-12-4119 no'lu proje ile desteklenen doktora tezinden özetlenmiştir.

serum lipid profili, oksidatif stres parametreleri, yağlanma (karaciğer, deri altı yağ dokusu) ve insülin hormonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ERÜTAM) temin edilen ortalama 40.15±8.59 kg ağırlıklarında, 1 yaşlı, gebelik ve laktasyon dönemlerinde olmayan, klinik muayeneleri sonucu sağlıklı oldukları belirlenen 10 adet koyun kullanıldı (Erciyes Üniversitesi HADYEK'in 08.02.2012 tarih ve 12/37 nolu etik kurul kararı). Çalışma süresince koyunlar, 6 kg/baş/gün olacak şekilde arpa, mısır silajı, kuru yonca ve arpa samanı içeren rasyon ile beslendi. Koyunlara yalama taşı şeklinde vitamin-mineral premiksleri ve ad libitum su verildi.

Çalışmada kullanılan koyunlara 0. saatte kan ve idrar örnekleri alınmasını takiben 10 mg/kg dozunda deri altı yolla tek doz phlorizin (etki süresi 3-10 gün) uygulandı. Koyunlardan phlorizin uygulamasından önce (0. saatte) alınan bütün örnekler kontrol grubu olarak değerlendirildi. Çalışmada, 0. saatte ve phlorizin uygulamasından sonraki 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde, yem verilmeden önce EDTA'lı, Heparinli ve boş tüplere 9 ml kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden çıkarılan serumlarda non-esterified fatty acids (NEFA), beta hidroksi butirik asit (BHBA), asetoasetik asit (AcAc) düzeyleri, total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS) ticari test kitleri kullanılarak (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA, Bio-Tek, Türkiye) tekniği ile belirlendi.

Oksidatif stres indeksi (OSI) (%) =  $[TOS \text{ (mmol Trolox equivalent/L)} / TAS \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L)}]$  formülü kullanılarak hesaplandı. Glukoz, albumin, kan üre nitrojen (BUN), kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalin fosfat (ALP), gama glutamil transferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), trigliserit (TG), total protein (TP), amilaz, lipaz, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), parametreleri ise Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Abbott Architect C 16000, USA) spektrofotometrik olarak, insülin hormonu analizi de tam otomatik biyokimya oto analiz cihazında (Immuno Assay System) (Simens, Immulite 2000XPi, USA) belirlendi. Hematolojik analizler için alınan EDTA'lı kan örneklerinde trombosit (103/ $\mu\text{l}$ ) total lökosit (WBC) (103/ $\mu\text{l}$ ), eritrosit (RBC) (103/ $\mu\text{l}$ ) sayıları, hemoglobin (g/dl) ve hematokrit (%) değerleri kan sayım cihazı (Mindray BC-2800 Vet, China) kullanılarak ölçüldü.

Çalışmada kullanılan koyunlardan 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde alınan idrar örnekleri manuel test stripleri (Healgen, URS-10T Reagent Strips, USA)

kullanılarak lökosit, dansite, pH, glüköz, protein, kan, bilirubin, urobilinojen ve keton cisimcikleri yönünden değerlendirildi.

Ultrasonografik muayeneler, (Schimatzu 350-A, Japonya) ultrasonografi cihazında 5 MHz'lik konveks transduser kullanılarak yapıldı. Karaciğerin ultrasonografik muayenesi, 11. ve 12. interkostal aralıkta gerçekleştirildi. Ultrasonografik muayenede karaciğerin yapısı, portal ve hepatik venleri, diyaframatik ve visseral yüzeyleri yağlanma yönünden incelendi. Ayrıca bu çalışmada, koyunların sırt bölgesindeki yağlanmayı belirlemek amacı ile 0. saat ve 120. saatlerde 12.-13. torakal vertebralar arasındaki bölgede ultrasonografi aracılığı ile sırt yağı kalınlıkları ölçümü yapıldı.

Karaciğerdeki yağlanmanın derecesini belirlemek için phlorizin uygulamasından 24 saat önce ve çalışma bitiminden 24 saat sonra (144. Saatte) iki adet koyundan analjezi (50 mg dozunda acepromazin) ve lokal anestezi (%2'lik lidokain) sağlandıktan sonra 14G (Egemen International®, Türkiye) biyopsi iğnesi kullanılarak sağ 11. interkostal aralıktan biyopsi örnekleri alındı. Alınan biyopsi örnekleri Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında hematoksilin-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelendi.

### İstatistiksel Analizler

Veriler IBM SPSS Statistics 20 ve SigmaStat 3.5 istatistik paket programları ile değerlendirildi. Verilerin özet gösterimi ortalama  $\pm$  standart hata değerleri olarak verildi. Farkların normalliğine Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. İki ölçüm karşılaştırmalarında normal dağılılan veriler için bağımlı örnek t testi, veriler normal dağılmayanlarda Wilcoxon testi kullanıldı. İki den fazla ölçümlerin bulunduğu karşılaştırmalarda normal dağılılan veriler Tek Yönlü Tekrarlı Varyans Analizi, normal dağılmayan veriler Friedman Analizi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırma testleri olarak parametrik ve parametrik olmayan Student-Newman-Keuls testleri kullanıldı.

### Bulgular

Bu çalışmada kullanılan hayvanların phlorizin enjeksiyonundan sonra (120. saatte) yapılan klinik muayenesinde (genel görünüm, vücutun tutuluşu, kıl örtüsü, lenf yumruları, mukoza muayenesi ve iştah) herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Koyunların 0. saat ortalama canlı ağırlıklarında (40.15±8.59), phlorizin uygulandıktan 120 saat sonra (39.09±8.53) istatistiksel olarak önemli azalma görüldü ( $p < 0.05$ ). Çalışmada, koyunlardan phlorizin uygulamadan önce (0. saat) ve uygulandıktan sonra 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde elde edilen hematolojik parametreler Tablo 1'de gösterildi.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan koyunlara (n=10) ait hematoloji değerleri

Parametreler	0.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	12.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	24.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	48.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	72.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	96.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	120.saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	İstatistik Önem Düzeyi
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	12.7±0.75 <sup>a</sup>	12.85±1.31 <sup>a</sup>	11.31±1.06 <sup>a</sup>	12.11±1.08 <sup>a</sup>	13.01±0.90 <sup>a</sup>	10.6±0.87 <sup>b</sup>	10.7±0.99 <sup>b</sup>	p<0.01
RBC (x10 <sup>12</sup> /L)	9.04±0.37	9.39±0.40	9.059±0.35	8.767±0.43	9.212±0.33	9.0±0.37	9.0±0.57	p>0.05
HGB (g/dL)	9.81±0.30 <sup>bc</sup>	10.31±0.33 <sup>ad</sup>	9.99±0.28 <sup>ab</sup>	9.45±0.26 <sup>ce</sup>	9.47±0.24 <sup>cd</sup>	9.3±0.24 <sup>ce</sup>	9.4±0.24 <sup>c</sup>	p<0.001
HCT (%)	27.78±1.04 <sup>ac</sup>	28.83±1.02 <sup>a</sup>	27.83±1.10 <sup>ac</sup>	27.05±1.34 <sup>bc</sup>	28.26±0.92 <sup>ac</sup>	27.7±1.13 <sup>ac</sup>	28.5±1.10 <sup>ac</sup>	p<0.05
MCV (fL)	30.92±0.78 <sup>b</sup>	31.23±0.80 <sup>a</sup>	30.84±0.80 <sup>b</sup>	30.98±0.83 <sup>b</sup>	30.85±0.79 <sup>b</sup>	30.8±0.80 <sup>b</sup>	30.8±0.75 <sup>b</sup>	p<0.01
MCH (pg)	10.86±0.17 <sup>a</sup>	11.1±0.13 <sup>a</sup>	11.02±0.15 <sup>a</sup>	10.43±0.12 <sup>b</sup>	10.28±0.15 <sup>b</sup>	10.4±0.18 <sup>b</sup>	10.5±0.19 <sup>b</sup>	p<0.001
MCHC (g/dL)	35.44±0.86 <sup>a</sup>	36.87±0.69 <sup>b</sup>	36.18±0.80 <sup>ab</sup>	35.2±0.76 <sup>a</sup>	34.5±0.75 <sup>a</sup>	34.7±0.72 <sup>a</sup>	34.3±0.70 <sup>a</sup>	p<0.001
RDW (%)	15.78±0.21	15.68±0.26	16±0.32	15.72±0.25	16.07±0.27	16.0±0.26	16.1±0.24	p>0.05
PLT (x10 <sup>9</sup> /L)	279.8±41.08 <sup>a</sup>	271.9±31.94 <sup>a</sup>	368.6±62.97 <sup>a</sup>	305.7±36.99 <sup>a</sup>	329.3±46.32 <sup>a</sup>	431.0±75.62 <sup>a</sup>	457.4±63.70 <sup>b</sup>	p<0.05
MPV (fL)	4.06±0.06 <sup>a</sup>	3.77±0.09 <sup>cd</sup>	3.87±0.08 <sup>bc</sup>	4±0.06 <sup>ab</sup>	3.89±0.05 <sup>bc</sup>	4.0±0.07 <sup>ab</sup>	3.9±0.09 <sup>ac</sup>	p<0.05
PDW (%)	15.79±0.14	15.82±0.15	14.87±1.04	15.85±0.16	15.69±0.11	15.9±0.15	15.6±0.23	p>0.05
PCT (%)	0.115±0.01	0.103±0.01	0.141±0.02	0.120±0.01	0.129±0.01	0.173±0.03	0.157±0.02	p>0.05

a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çalışmada kullanılan koyunlardan alınan idrar örneklerinin test stripleri ile muayenesinde lökosit rastlanmadı. Bu çalışmada koyunlardan, phlorizin enjeksiyonundan önce ve enjeksiyondan sonraki

saatlerde alınan serum örneklerine uygulanan ölçümler sonucunda elde edilen biyokimyasal parametreler Tablo 2'de belirtildi.

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan koyunlara (n=10) ait biyokimyasal değerler

Parametreler	0.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	12.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	24.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	48.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	72.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	120.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	İstatistik Önem Düzeyi
İnsülin (µU/mL)	12.23±5.94 <sup>a</sup>	11.01±1.55 <sup>a</sup>	8.09±2.67 <sup>b</sup>	5.89±1.99 <sup>c</sup>	5.41±1.52 <sup>c</sup>	4.27±1.58 <sup>c</sup>	p<0.01
Glikoz (mg/dl)	60.1±3.64 <sup>a</sup>	51.3±2.96 <sup>b</sup>	51.1±1.03 <sup>b</sup>	51.9±1.70 <sup>b</sup>	56.1±1.78 <sup>b</sup>	52.0±1.59 <sup>b</sup>	p<0.05
Trigliserit (mg/dl)	28.4±4.40 <sup>a</sup>	23.6±3.15	26.3±3.60	21.6±2.24	20.7±1.73	17.9±1.66 <sup>b</sup>	p<0.05
Kolesterol (mg/dl)	63.7±3.49	63.8±3.48	64.0±3.96	63.4±4.08	62.9±3.83	67.1±4.38	p>0.05
HDL (mg/dl)	33.2±1.54	34.7±1.78	34.5±2.09	33.4±1.83	34.3±1.90	36.1±2.05	p>0.05
LDL (mg/dl)	24.818±2.56	24.378±2.48	24.238±2.43	25.675±2.75	24.458±2.30	27.416±2.48	p>0.05
BUN (mg/dl)	17.8±1.25 <sup>a</sup>	11.5±1.06 <sup>b</sup>	15.3±0.94 <sup>a</sup>	17.6±0.89 <sup>ac</sup>	16.1±0.93 <sup>a</sup>	19.6±1.31 <sup>cd</sup>	p<0.001
Kreatinin (mg/dl)	0.67±0.02 <sup>ac</sup>	0.62±0.02 <sup>b</sup>	0.68±0.02 <sup>ac</sup>	0.66±0.03 <sup>a</sup>	0.67±0.02 <sup>ac</sup>	0.7±0.02 <sup>c</sup>	p<0.01
Amilaz (U/L)	12.8±3.61	12.8±3.49	13.0±3.09	12.2±2.71	13.5±3.17	14.9±4.36	p>0.05
Lipaz (U/L)	20.0±1.31 <sup>e</sup>	22.5±1.62 <sup>c</sup>	24.0±1.95 <sup>b</sup>	22.2±2.03 <sup>d</sup>	27.2±2.07 <sup>a</sup>	21.5±2.52 <sup>de</sup>	p<0.001
GGT (U/L)	51.6±2.78 <sup>a</sup>	51.2±2.62 <sup>a</sup>	52.0±2.50 <sup>a</sup>	52.3±2.76 <sup>a</sup>	54.6±3.05 <sup>a</sup>	58.1±3.67 <sup>b</sup>	p<0.001
LDH (U/L)	714.9±96.61 <sup>b</sup>	733.5±74.54 <sup>a</sup>	642.5±57.75 <sup>c</sup>	622.1±50.55 <sup>c</sup>	670.3±79.98 <sup>c</sup>	588.8±29.03 <sup>c</sup>	p<0.01
AST (U/L)	150.1±19.17	153.6±20.63	145.8±18.98	136.5±16.46	153.8±22.17	138.2±17.30	p>0.05
ALT (U/L)	27.1±3.42	27.9±3.90	27.6±3.91	26.2±3.32	28.6±3.91	26.3±3.44	p>0.05
ALP (U/L)	128.2±13.90 <sup>a</sup>	124.1±11.69 <sup>ac</sup>	122.4±11.46 <sup>a</sup>	107±9.04 <sup>bc</sup>	109.6±8.40 <sup>b</sup>	104.3±7.40 <sup>b</sup>	p<0.01
T.Protein (g/dl)	7.02±0.11	6.90±0.19	6.93±0.13	6.73±0.19	6.99±0.19	7.24±0.16	p>0.05
Albumin (g/dl)	1.37±0.05	1.36±0.06	1.36±0.06	1.31±0.05	1.33±0.05	1.32±0.05	p>0.05

a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Ortalama AcAc düzeyleri arasındaki artış istatistiksel olarak önemsiz (Tablo 3) bulundu. Ancak ortalama BHB konsantrasyonlarında, 0. saat ile kıyaslandığında 12. saatte istatistiksel olarak önemsiz bir artış gösterirken, 0.-72., 0.-120., 12.-72., 12.-120, 24.-72., 24.-120. saatler arasındaki istatistiksel yönden anlamlı

bir azalma gözlemlendi (p<0.05, Tablo 3). Ortalama NEFA düzeyleri ise 0. saate göre 12, 24, 48, 72 ve 120. saatlerde, ayrıca phlorizin uygulamasını takiben 12.-48., 12.-72., 12.-120., 24.-48., 24.-72., 24.-120., 48.-120 ve 72.-120. saatler arasında istatistiksel açıdan önemli bir artış belirlendi (p<0.05, Tablo 3).

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan koyunların (n=10) ortalama BHB, NEFA ve AcAc seviyeleri

Parametreler	0.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	12.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	24.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	48.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	72.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	120.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	İstatistik Önem Düzeyi
AcAc mg/dL	0.38±0.09	0.39±0.08	0.47±0.07	0.53±0.03	0.50±0.03	0.50±0.03	p>0.05
BHB mg/dL	4.39±0.11 <sup>a</sup>	4.62±0.15 <sup>a</sup>	4.25±0.06 <sup>a</sup>	3.96±0.12 <sup>ac</sup>	3.89±0.08 <sup>bc</sup>	3.60±0.12 <sup>bc</sup>	p<0.001
NEFA mg/dL	3.90±0.79 <sup>d</sup>	4.98±0.59 <sup>c</sup>	4.40±0.68 <sup>c</sup>	6.60±0.69 <sup>b</sup>	6.44±0.33 <sup>b</sup>	7.17±0.57 <sup>a</sup>	p<0.001

<sup>a,b,c</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması sonucunda elde edilen oksidatif stress parametrelerinden ortalama TAS düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu tespit edilirken, ortalama TOS değerlerinde 0.-12., 0.-24., 0.-48., 0.-72., 0.-120., 24.-72., 24.-120. saatler arasında azalma (p<0.05) belirlendi (Tablo 5). Phlorizin uygulamasını takiben ortalama TOS değerlerinde

12. saate göre; 24. saatte artış (p<0.05), 48, 72 ve 120. saatlerde azalma belirlendi (p<0.05). Ortalama OSI değerlerinin phlorizin uygulanmadan önce ile kıyaslandığında phlorizin uygulaması sonrasındaki tüm saatlerde azaldığı belirlendi. OSI değeri için 12.-24. saatler hariç, diğer saatler arasındaki azalmanın önemli olduğu belirlendi (p<0.05, Tablo 4).

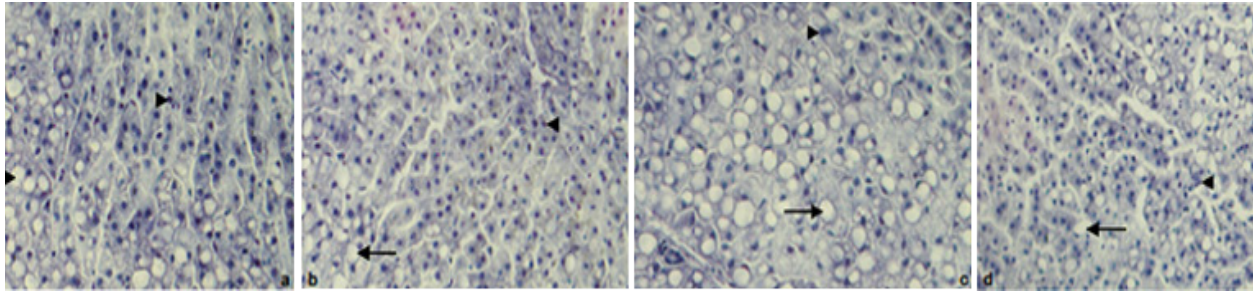
**Tablo 4.** Çalışmada kullanılan koyunların (n=10) ortalama oksidatif stres parametreleri

Parametreler	0.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	12.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	24.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	48.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	72.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	120.Saat $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	İstatistik Önem Düzeyi
TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalent/L)	4.38±0.31 <sup>a</sup>	2.81±0.38 <sup>c</sup>	3.45±0.26 <sup>b</sup>	2.79±0.25 <sup>c</sup>	2.33±0.20 <sup>d</sup>	2.37±0.23 <sup>d</sup>	p<0.001
TAS (mmol Trolox equivalent/L)	0.27±0.03	0.26±0.03	0.33±0.03	0.27±0.01	0.25±0.02	0.25±0.01	p>0.05
OSI (%)	17.46±1.96 <sup>a</sup>	11.26±1.60 <sup>b</sup>	11.11±0.91 <sup>b</sup>	10.56±0.88 <sup>c</sup>	9.89±0.99 <sup>d</sup>	9.72±0.99 <sup>e</sup>	p<0.001

<sup>a,b,c,d,e</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Koyunların 0. saat ortalama sırt yağı kalınlığında (0.52±0.12) phlorizin uygulaması sonrasındaki 120. saatte (0.44±0.09) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (p=0.008). Çalışmada yapılan biyopsi sonrası histopatolojik inceleme sonucunda; iki hayvanda da phlorizin uygulama öncesinde karaciğer epitel hücrelerinin birçoğunun sitoplazmasında büyüklükleri farklı, elipsten yuvarlağa kadar değişen,

keskin kenarlı yağ vakuollerine rastlandı. Ayrıca Kupfer hücrelerinin sayıca fazla olması dikkat çekti (Şekil 1a,c). Phlorizin uygulandıktan sonra (144. saat) ise iki hayvanda da çok dikkat çekici şekilde olmasa da fokal alanlar tarzında hepatositlerin sitoplazmalarındaki yağ vakuollerinin sayısında azalma görüldü. Kupfer hücrelerinin görünümü çalışma öncesine benzer şekilde tespit edildi (Şekil 1b,d).



**Şekil-1 a.** Phlorizin uygulamasından önce 1 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü **b.** Phlorizin uygulamasından sonra (144. saat) 1 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü **c.** Phlorizin uygulamasından önce 2 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü **d.** Phlorizin uygulamasından sonra (144. saat) 2 numaralı hayvanın karaciğerinin histopatolojik görünümü (Hx E., x200). Yağ vakuelleri siyah oklar, Kupfer hücreleri ok başı ile gösterilmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, phlorizin uygulanması öncesine göre koyunların ortalama canlı ağırlıklarında, phlorizin uygulanması sonrasındaki 120. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi ( $p<0.05$ ). Bu çalışmaya paralel olarak Cai ve ark. (8) farelerde, Najafian ve ark. (28) ve Lu ve ark. (23) ratlarda yaptıkları çalışmalarda phlorizin uygulamasından sonra vücut ağırlıklarında önemli derecede azalma tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Canlı ağırlık kaybı phlorizinin plazma glikoz seviyesini düşürmesine bağlı olarak şekillenen hipoinsülinemisi sonucunda adipoz dokudaki lipolizisin artmasına bağlanabilir. Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması ile hematolojik parametrelerin, referans değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişebileceği belirlendi. Bu parametreler göz önünde bulundurulduğunda Aslan ve ark. (1)'nin çalışmasındaki hematolojik parametre bulguları bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Çalışmada kullanılan koyunların idrarlarındaki ortalama protein miktarlarının phlorizin uygulanmasından önceki ile kıyaslandığında 12. ve 24. saatlerde arttığı, 48., 72., 96. ve 120. saatlerde azaldığı belirlendi ( $p<0.05$ ). Benzer şekilde Janssen ve ark. (19) obez ratlarda, Malatiali ve ark. (25) ve Osorio ve ark. (30) diabetik ratlarda yaptıkları deneysel çalışmalarda, phlorizin tedavisinin proteinüriye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada phlorizin uygulamasından sonraki bütün saatlerde glikozüri görülmüştür ( $p<0.05$ ). Çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda phlorizinin glikozüri oluşturduğu bildirilmiştir (4,6,21,25,41,42). Glikozürinin nedeni diğer çalışmalara paralel olarak phlorizinin sodyum bağımlı glikoz taşıyıcı 2 (SGLT2)'yi inhibe etmesi sonucunda (32) proksimal renal tubullerinden glikoz reabsorpsiyonunun engellenmesi olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada phlorizin uygulanmasından sonraki 72., 96. ve 120. saatlerde az miktarda ketonüri görülmüştür ( $p>0.05$ ). Fakat Başoğlu ve ark. (4) tarafından koyunlarda yapılan bir çalışmada deney grubundaki bütün hayvanların idrarında keton cisimcikleri belirlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada oluşturulan deney grubunun hepsinde ve phlorizin uygulamasını takiben bütün saatlerde ketonüri görülmesinin sebebi phlorizin uygulaması ile birlikte hayvanların aç bırakılması ve buna bağlı olarak şekillenen açlık ketozisi ile açıklanabilir. Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanmasından sonraki bütün saatlerde ortalama serum glikoz düzeylerinde düşme gözlemlendi. Bu çalışmaya paralel olarak çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda, phlorizin uygulanması sonucu plazma glikoz seviyesinde hızlı bir düşüş görüldüğü rapor edilmiştir (4,8,19,23,28,29,31,42).

Bu çalışmada, serum insülin düzeylerinin phlorizin uygulanmasından sonra sürekli olarak azaldığı belirlendi. Bu çalışma sonuçlarına paralel olarak,

bazı araştırmacıların farklı hayvan türlerindeki çalışmalarında, phlorizin uygulanmasından sonra serum insülin seviyelerinin önemli derecede düştüğü belirtilmiştir (2,15,17,24,28). Bazı araştırmacılar ise farklı hayvan türlerinde, phlorizin enjeksiyonunun plazma insülin konsantrasyonunda önemli bir değişikliğe sebep olmadığını bildirmişlerdir (6,29,31,42). Bu çalışmalarda insülin seviyesinin değişmemesi hayvanların beslenme şekillerinin bu çalışmadaki ile farklılığından ya da kan glikoz miktarlarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

Koyunlara phlorizin uygulandıktan sonraki bütün saatlerde ortalama serum trigliserit düzeylerinde azalma belirlendi. Benzer şekilde farklı araştırmacılar farklı hayvan türlerinde yaptıkları çalışmalarda, phlorizin uygulamasından sonra serum TG seviyesinde önemli ölçüde azalma olduğunu bildirmişlerdir (8,23,28,29). Bunun nedeni olarak TG'lerin hidrolize olarak serbest yağ asitlerine dönüşmesi gösterilebilir.

Phlorizin uygulamasından sonra çalışmada kullanılan koyunların ortalama serum AST değerlerine bakıldığında 12. ve 72. saatlerde hafif derecede artma ve diğer saatlerde aynı şekilde azalma görüldü. ALT değerleri ise 12., 24. ve 72. saatlerde artış, 48. ve 120. saatlerde azalma göstermiştir. Deng ve ark. (10) tarafından karbon tetraklorür ile oluşturulmuş hepatik fibrosisli ratlarda, phlorizinin serum AST ve ALT seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir. Phlorizin enjeksiyonundan sonraki ortalama BHB değerlerinin 48. saate kadar değişmediği ancak 72. ve 120. saatlerde azaldığı belirlendi. Bu çalışmanın aksine bazı araştırmacılar tarafından koyunlarda (15,17,31) ve boğalarda (27) yapılan çalışmalarda phlorizinin tekrarlayan deri altı enjeksiyonları sonucu ortalama BHB değerlerinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Ortalama BHB konsantrasyonunun diğer çalışmalardan (15,17,27,31) farklı olarak fazla etkilenmemesinin nedeni, phlorizinin deri altı ve tek doz uygulanması olabilir.

Bu çalışmada koyunlarda phlorizin enjeksiyonundan sonra ortalama NEFA seviyelerinin bütün ölçümlerde arttığı belirlendi. Yapılan bazı çalışmalarda da, phlorizinin plazma NEFA konsantrasyonunda artışa yol açtığı belirtilmiştir (4,6,15,17,21,31). Çalışmada NEFA konsantrasyonundaki artışın nedeni, phlorizin uygulanan hayvanlarda glikozüri nedeniyle total kan şekeri düzeyinin düşmesine bağlı olarak şekillenen hipoinsülemi sonucunda adipoz dokudaki lipolizise bağlanabilir (17,24,31). Çalışmada koyunlara phlorizin uygulanması sonucunda elde edilen oksidatif stres parametreleri değerlendirildiğinde; phlorizin enjeksiyonundan sonra ortalama TOS seviyelerinin bütün saatlerde azaldığı tespit edilmiştir. TAS değerlerindeki değişimlerin ise istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi. Koyunlarda belirlenen ortalama OSI değerlerinin 0. saate göre bütün saatlerde

daha düşük olduğu tespit edildi. Osorio ve ark. (30) diabetik ratlara 4 hafta phlorizin uygulanmasının hiperglisemi ve böbreklerdeki oksidatif stresi engellediğini belirtmişlerdir. Baldisserotto ve ark. (3) phlorizinin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar da phlorizinin oksidatif stresi azalttığını belirtmişlerdir (35,36).

Çalışmada koyunların sırt bölgesindeki yağ kalınlığında 0. saate göre 120. saatte azalma belirlendi. Bu çalışmaya paralel olarak Zhao ve ark. (42)'nin farelerde yaptıkları çalışmada, phlorizin tedavisinin yağ kitlesinde azalmaya sebebiyet verirken, yağsız vücut kitlesinde değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir. Phlorizin uygulamasından sonra ki 120. saatte karaciğerlerinin histopatolojik muayenesinde; fokal alanlar tarzında hepatositlerin sitoplazmalarındaki yağ vakuollerinin sayısında azalma görüldü. Bradford ve ark. (6) sığırlarda yaptıkları çalışmada, phlorizinin lipolizisi stimüle ettiğini bildirmişlerdir. Herdt ve ark. (15) açlığın karaciğer yağlanmasını indüklediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmalarda phlorizinin yoğun şekilde uzun süre kullanımı ve hayvanların aç bırakılmasına bağlı olarak, hepatositler ve yağ metabolizması üzerindeki olumsuz etkiler göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan koyunlara deri altı phlorizin enjeksiyonundan sonra, oksidatif stres indikatörlerinden TOS ve OSI değerlerinde görülen azalma phlorizinin oksidatif stresi azalttığı görüşünü destekledi. Bu çalışmada phlorizinin serum NEFA ve HDL konsantrasyonunu yükselttiği, trigliserit miktarını azalttığı, kan glikoz konsantrasyonu ve insülin seviyesini düşürdüğü ve karaciğer enzimlerinin aktivasyonunda kısmi azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar phlorizinin karaciğer fonksiyonlarını olumsuz etkilemediğini göstermektedir. Ayrıca ultrasonografik muayenede ortalama vücut sırt yağı kalınlığının azalması ve karaciğerden alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesinde hepatositlerdeki yağ vakuolü miktarının düşme eğiliminde olması, phlorizinin uygun doz ve uygulama şekli ile yağ metabolizması bozukluklarından kaynaklanan hastalıkların tedavisinde olumlu etkiler yapabileceğini gösterdi.

#### Teşekkür

Çalışmamızda biyopsi örneklerinin alınması ve histopatolojik yönden incelenmesinde emeği geçen Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gültekin ATALAN ve Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayhan ATASEVER'e teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

1. Aslan V, Aştı RN, Nizamlioğlu M, Tekeli T, Başoğlu A, Demirci Ü. Postpartum dönem hastalıklarının yağlı karaciğer sendromu ile ilgisi. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1989; 4(1): 43-51.

2. Aslan V, Aştı RN, Tiftik AM, Eksen M. Effect of niacin on blood metabolites, rumen protozoa, insulin levels and fatty liver in experimentally induced ketosis in ewes. Selçuk Ü Vet Fak Derg 1988; 4(1): 109-21.
3. Baldisserotto A, Malisardi G, Scalambra E, Andreotti E, Romagnoli C, Vicentini CB, Manfredini S, Vertuani S. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications. Molecules 2012; 17(11): 13275-89.
4. Başoğlu A, Turgut K, Eksen M, Traş B, Maden M, Ok M, Baş L, Keskin E. Effect of phlorizin - induced ketosis on riboflavin and niacin levels in sheep. Selçuk Üniversitesi Vet Fak Derg 1993; 9(1): 58-63.
5. Boccia MM, Kopf SR, Baratti CM. Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, facilitates memory storage in mice. Neurobiol Learn Mem 1999; 71: 104-12.
6. Bradford BJ, Allen MS. Phlorizin induces lipolysis and alters meal patterns in both early and late lactation dairy cows. J Dairy Sci 2007; 90: 1810-5.
7. Burtis CA, Jackson HD, Packett LV, Goetsch GD. Effects of glucagon, glycerol, and insulin on phlorizin induced ketosis in fasted, nonpregnant ewes. Am J Vet Res 1968; 29: 647.
8. Cai O, Li B, Yu F, Lu W, Zhang Z, Yin M, Gao H. Investigation of the protective effects of phlorizin on diabetic cardiomyopathy in db/db mice by quantitative proteomics. J Diabetes Res 2013; 1-9.
9. Cox SD, Jayasinghe KC, Markham JL. Antioxidant activity in Australian native sarsaparilla (*Smilax glycyphylla*). J Ethnopharmacol 2005; 101(1-3): 162-8.
10. Deng G, Wang J, Zhang Q, He H, Wu F, Feng T, Zhou J, Zou K, Hattori M. Hepatoprotective effects of phloridzin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride against oxidative stress-triggered damage and fibrosis in rats. Biol Pharm Bull 2012; 35(7): 1118-25.
11. Dong H, Ning Z, Yu L, Li L, Lin L, Huang J. Preparative separation and identification of the flavonoid phlorizin from the crude extract of *Lithocarpus Polystachyus* Rehd. Molecules 2007; 12(3): 552-62.
12. Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. Diabetes/ Metab Res Rev 2005; 21: 31-8.

13. Ghanem E, Robaye B, Leal T, Leipziger J, Van Driessche W, Beauwens R, Boeynaems JM. The role of epithelial P2Y(2) and P2Y(4) receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *Brit J Pharm* 2005; 146: 364-9.
14. Hall JL, Reilly RT, Cottrill KL, Stone WS, Gold PE. Phlorizin enhancement of memory in rats and mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 41(2): 295-9.
15. Herdt TH, Gerloff BJ. Hepatik lipidosis and liver function in 49 cows with displaced abomasum Twelfth World Congress on Diseases of Cattle. September, 7-10, 1984; Amsterdam-Hollanda.
16. Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad JR, Beifuss U, Carle R. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 2896-9.
17. Holtenius BK, Holtenius P. Effects of peroral alanine administration in lactating ewes with decreased availability of glucose. *Br J Nut* 1997; 78: 805-13.
18. Hutchinson A, Taper C, Towers G. Studies of phloridzin in malus. *Can J Med Sci* 1959; 37(7): 901-10.
19. Janssen SW, Martens GL, Sweep PN, Span PN, Verhofstad AAJ, Hermus ARMM. Phlorizin treatment prevents the decrease in plasma insulin levels but not the progressive histopathological changes in the pancreatic islets during aging of Zucker diabetic fatty rats. *J Endocrinol Invest* 2003; 26(6): 508-15.
20. Jervis EL, Johnson FR, Sheff MF, Smyth DH. The effect of phlorizin on intestinal absorption and intestinal phosphatase. *J Physiol* 1956; 134: 675.
21. Kıyıcı Şıklaroğlu R. Deneysel Ketozis Oluşturulan Koyunlarda Parenteral Lipid Emilsiyonlarının Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner İç Hastalıkları Programı. Kayseri-Türkiye, 2012.
22. Largis EE, Jacobs FA. Effects of phlorizin on glucose transport into blood and lymph. *Biochim Biophys Acta* 1971; 255: 301.
23. Lu WD, Li BY, Yu F, Cai Q, Zhang Z, Yin M, Gao HQ. Quantitative proteomics study on the protective mechanism of phlorizin on hepatic damage in diabetic db/db mice. *Med Report* 2012; 5(5): 1285-94.
24. Lyle RR, de Boer G, Mills SE, Russell RW, Beitz DC, Young JW. Glucose kinetics, plasma metabolites, and endocrine responses during Experimental ketoin in steers, *J Dairy Sci* 1984; 67(10): 2255-64.
25. Malatiali S, Francis I, Barac NM. Phlorizin prevents glomerular hyperfiltration but not hypertrophy in diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2008; 2008: 1-7.
26. McCrimmon R, Evans M, Jacob R, Fan X, Zhu Y, Shulman GI, Sherwin RS. AICAR and phlorizin reverse the hypoglycemia-specific defect in glucagon secretion in the diabetic BB rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(5): 1076-83.
27. Mills SE, Lyle RR, Beitz DC, Young JW. In vitro hepatic gluconeogenesis during experimental ketosis produced in steers by 1,3-butanediol and phlorizin. *J Dairy Sci* 1984; 67: 2265-73.
28. Najafian M, Jahromi MZ, Nowroznejhad MJ, Khajeaian P, Kargar MM, Sadeghi M, Arasteh A. Phloridzin reduced blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 5299-306.
29. Ohta T, Morinaga H, Yamamoto T, Yamada T. Effect of phlorizin on metabolic abnormalities in spontaneously diabetic torii (STD) rats. *J Anim Sci* 2012; 2(2): 113-8.
30. Osorio H, Bautista R, Rios A, Franco M, Arellano A, Vargas-Robles H, Romo E, Escalante B. Effect of phlorizin on SGLT2 expression in the kidney of diabetic rats. *J Nephrol* 2010; 23(5): 541-6.
31. Overton TR, Drackley JK, Otteman-Abbamonte CJ, Beaulieu AD, Clark JH. Metabolic adaptation to experimentally increased glucose demand in ruminants. *J Anim Sci* 1998; 76: 2938-46.
32. Panayotova-Heiermann M, Loo DDR, Wright EM. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 1995; 270: 27099-105.
33. Petersen C. Analyse des phloridzins. *Ann Acad Sci France* 1835; 15: 178. 'Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes/ Metab Res Rev* 2005; 21: 31-8.'
34. Puel C, Quintin A, Mathey J, Obled C, Davicco MJ, Lebecque P, Kati-Coulibaly S, Horcjada MN, Coxam V. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions. *Calcif Tissue Int* 2005; 77: 311-8.
35. Ridgway T, O'Reilly J, West G, Tucker G, Wiseman H. Antioxidant action of novel derivatives of the apple-derived flavonoid phloridzin compared to oestrogen; relevance to potential cardioprotective action. *Biochem Soc Trans* 1997; 106: 125.
36. Shen L, You BA, Gao HQ, Li BY, Yu F, Pei F. Effects of phlorizin on vascular complications in diabetes db/db mice. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125(20): 3692-6.

37. Ugocsai K, Varga A, Molnar P, Antus S, Molnar J. Effects of selected flavonoids and carotenoids on drug accumulation and apoptosis induction in multidrug-resistant colon cancer cells expressing MDR1/LRP. *In Vivo* 2005; 19: 433-8.
38. Walle T, Walle UK. The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 1288-91.
39. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med* 2001; 345: 1359-67.
40. Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinogen* 2006; 45: 164-74.
41. Young JW, Schmidt SP, Akawuah ES, Hess GS, McGilliard AD. Effects of phlorizin on glucose kinetics in the bovine. *J Dairy Sci* 1974; 57: 689.
42. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, Setser J, Jou W, LeRoith D. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 2901-9.

**Yazışma Adresi:**

Dr. İlnur KARACA BEKDİK  
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı,  
Kayseri / TÜRKİYE  
e-mail: ikaraca\_38@hotmail.com