

## Deneysel diyabetin karaciğer dokusunda oluşturduğu bazı değişiklikler üzerine çam yağının etkisi

### The effect of pine oil on some alterations in liver tissue of experimental diabetes

Ersin DEMİR<sup>1</sup>, Ökkeş YILMAZ<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışma; deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda çam yağının karaciğer dokusunda yağ asidi bileşimi, malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), total protein, ADEK vitaminleri, kolesterol ve bazı sterol parametreleri üzerinde etkisinin araştırılması için tasarlandı.

**Yöntem:** Sıçanlar; kontrol (K), streptozotosin (STZ) ve streptozotosin (STZ) + çam yağı (ÇY) olmak üzere üç grubu ayrıldı. STZ gruplarına intraperitoneal enjeksiyonla streptozotosin (45 mg/kg) verilerek diyabet oluşturuldu. Çam yağı grubundaki sıçanlara haftada iki gün 1 mL/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyonla çam yağı ve ayrıca 0,5 mL çam yağı 500 mL içme suyuna ilave edilerek verildi. Bu uygulamalar sekiz hafta boyunca sürdürüldü.

**Bulgular:** Kontrol grubuna göre; STZ grubunun karaciğer dokusunda MDA ve total protein düzeyinin anlamlı bir şekilde ( $p<0,001$ ) arttığı, GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde ( $p<0,001$ ) azaldığı belirlendi. STZ grubu ile karşılaştırıldığında; STZ + ÇY grubunun karaciğer dokusunda MDA ve GSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde ( $p<0,001$ ) azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde; STZ grubunun karaciğer dokusunda palmitik, palmitoleik ( $p<0,001$ ) ve araşidonik asit ( $p<0,01$ ) düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı,

#### ABSTRACT

**Objective:** The present study was designed to evaluate the impact of pine oil on MDA (malondialdehyde), GSH (glutathione), total protein, fatty acid composition, ADEK vitamins, cholesterol and some sterols parameters in liver tissue of experimental diabetes in rats.

**Method:** The rats were divided into three groups: control (C) streptozotocin (STZ), streptozotocin (STZ) + pine oil (PO) groups. Diabetes induced in rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (45 mg/kg). 1 mL/kg dose pine oil was intraperitoneally injected twice in a week to the streptozotocin (STZ) + pine oil (PO), and additionally 0.5 mL /500 mL dose of pine oil was added to drinking water of this group. The experiment continued for eight weeks.

**Results:** It was observed that MDA and total protein levels were significantly increased ( $p<0.001$ ), GSH level was significantly decreased ( $p<0.001$ ) in the liver tissue of STZ group when compared to the control group. It was detected that MDA and GSH levels were significantly decreased ( $p<0.001$ ) in the liver tissue of STZ + PO group when compared to the STZ group. It was determined that palmitic, palmitoleic ( $p<0.001$ ) and arachidonic acid ( $p<0.01$ ) levels were significantly decreased, stearic, linoleic ( $p<0.001$ ) and docosahexaenoic acid ( $p<0.05$ )

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ELAZIĞ



İletişim / Corresponding Author : Ersin DEMİR

Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ELAZIĞ

Tel : +90 537 791 73 68

E-posta / E-mail : ersnancan.dmr@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 17.03.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 18.08.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2014.45822

Demir E, Yılmaz Ö. Deneysel diyabetin karaciğer dokusunda oluşturduğu bazı değişiklikler üzerine çam yağının etkisi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2014; 71(3): 113-24.

stearik, linoleik ( $p<0,001$ ) ve dokosaheksaenoik asit ( $p<0,05$ ) düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. STZ grubu ile karşılaştırıldığında; STZ + ÇY grubunun karaciğer dokusunda stearik ve araşidonik asit düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı ( $p<0,001$ ), palmitik, palmitoleik, oleik, linoleik,  $\alpha$ -linolenik ve dokosaheksaenoik asit düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı ( $p<0,001$ ) tespit edildi. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde; STZ grubunun karaciğer dokusunda  $\delta$ -tokoferol ve vitamin D<sub>2</sub> düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı ( $p<0,001$ ), vitamin D<sub>3</sub> ( $p<0,05$ ), vitamin K<sub>2</sub>,  $\alpha$ -tokoferol, retinol, vitamin K<sub>1</sub>, kolesterol, stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı ( $p<0,001$ ) saptandı. STZ grubuna göre; STZ + ÇY grubunun karaciğer dokusunda vitamin K<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>,  $\alpha$ -tokoferol, vitamin K<sub>1</sub>,  $\beta$ -sitosterol ( $p<0,001$ ) ve kolesterol ( $p<0,05$ ), düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı,  $\delta$ -tokoferol ve stigmasterol düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı ( $p<0,001$ ) belirlendi.

**Sonuç:** Deneysel diyabetin sıçanların karaciğer dokusunda GSH, total protein, bazı yağ asidi bileşimi ile ADEK vitaminleri üzerinde oluşturduğu metabolik düzensizlikler üzerinde uygulanan çam yağının etkisinin sınırlı kaldığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel diyabet, lipit peroksidasyon, yağ asidi bileşimi, kolesterol, ADEK vitaminleri, sterol, karaciğer

levels were significantly increased in the liver tissue of STZ group when compared to the control group. It was detected that stearic and arachidonic ( $p<0.001$ ) acid levels were significantly decreased, palmitic, palmitoleic, oleic, linoleic,  $\alpha$ -linolenic and docosahexaenoic acid levels were significantly increased ( $p<0.001$ ) in the liver tissue of STZ + PO group when compared to the STZ group. It was observed that  $\delta$ -tocopherol and vitamin D<sub>2</sub> levels were significantly decreased ( $p<0.001$ ), vitamin D<sub>3</sub> ( $p<0.05$ ), vitamin K<sub>2</sub>,  $\alpha$ -tocopherol, retinol, vitamin K<sub>1</sub>, cholesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol levels were significantly increased ( $p<0.001$ ) in the liver tissue of STZ group when compared to the control group. It was determined that vitamin K<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>,  $\alpha$ -tocopherol, vitamin K<sub>1</sub>,  $\beta$ -sitosterol ( $p<0.001$ ) and cholesterol ( $p<0.05$ ), levels were significantly increased,  $\delta$ -tocopherol and stigmasterol levels were significantly decreased ( $p<0.001$ ) in the liver tissue of STZ + PO group when compared to the STZ group.

**Conclusion:** It was determined that the application of pine oil was of limited effect on the metabolic disorders of GSH, total protein, some fatty acid composition and ADEK vitamins in the liver tissue of experimental diabetic rats.

**Key Words:** Experimental diabetes, lipid peroxidation, fatty acid composition, cholesterol, ADEK vitamins, sterols, liver

## GİRİŞ

Diyabet; hiperglisemi ve lipoprotein anormallikleri ile karakterize edilen bir hastalıktır. Bu hastalıkta, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu ve glukoz metabolizmasının artmasıyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminde artış olmakta; artan ROT düzeyi ise hücre membranlarında oksidatif hasara yol açabilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda; hem deneysel hem de doğal diyabette ROT süpürücü mekanizmalarda bir takım bozuklukların olduğu; bildirilmektedir. ROT'un, nörodejeneratif ve kalp-

damar hastalıkları, kanser, ateroskleroz, katarakt, diyabet ve enflamasyon gibi bazı ciddi hastalıklarda önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (1, 2).

Streptozotosin (STZ), pankreasın beta-hücrelerinde oluşturduğu toksik etki ile deney hayvanlarında diyabet oluşturmada kullanılan diyabetojenik bir ajandır. STZ'nin sitotoksik etkisi, reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif hasarla ilişkilidir (2). Doğal ve deneysel diyabette kronik hiperglisemiye bağlı olarak gelişen yüksek oksidatif stres antioksidan savunma

sisteminin aktivitesini tüketmekte ve böylece de novo serbest radikal oluşumu hızlanmaktadır. Diyabet koşullarında ROT düzeyinin artması çeşitli dokularda diyabete özgü komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (3).

Çam türleri Akdeniz ve İran-Turan bölgelerinin en yaygın tıbbi bitkilerden biridir. Türkiye’de çam türlerinde elde edilen ilaç veya ilaç benzeri ürünler özellikle antiseptik, balgam sökücü, solunum ve üriner sistem hastalıkları, romatizma ağrıları ve cilt hastalıklarında kullanıldığı ifade edilmektedir (4, 5). Çam kabuğu, iğne ve reçine ekstraherinin; Çin, Japonya, Hindistan, Rusya ve Kazakistan gibi bölgelerde yaygın olarak kullanılan halk ilaçları olduğu ifade edilmiştir (6). Çam yağının hipoglisemik özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (5, 7). Çam türlerinin yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve bu nedenle gıda ve ilaç sektörlerinde kullanılmak üzere büyük bir potansiyelinin olduğu farklı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (7).

Bu çalışmada; ticari olarak satılan çam yağının deneysel diyabet oluşturulan sıçanların karaciğer dokusunda oksidatif stres, lipit peroksidasyon, kolesterol, yağ asidi bileşimi, ADEK vitaminleri ve sterol düzeyinde oluşan değişiklikler üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Deneysel uygulamalar, Frat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu’ndan onay alınarak gerçekleştirildi (Etik Karar No: 2011/81). Bu çalışmada 30 adet 8-10 haftalık Wistar albino ırkı erkek sıçanlar kullanıldı.

Sıçanlar kontrol (K), streptozotosin (STZ) ve streptozotosin (STZ) + çam yağı (ÇY) olmak üzere rastgele üç gruba ayrıldı. Deneysel diyabet oluşturmak için STZ ve STZ + ÇY grubunu oluşturan sıçanlara 45 mg/kg dozunda streptozotosin (STZ) fosfat-sitrat tamponunda (0,1 M, pH= 4,5) çözülerek intraperitoneal enjeksiyonla verildi (8). STZ enjeksiyonundan 72 sa. sonra, gece açlığını takiben sıçanların kuyruk veninden kan örneği alınarak glukometre (Smart Chek) cihazında

glukoz ölçümleri yapıldı. Bu ölçüm sonucunda, açlık kan glukoz düzeyi 140-200 mg/dL olan sıçanlar diyabetli olarak kabul edildi (9). Bu çalışma sekiz hafta sürdü ve çalışma sonunda tüm sıçanlar servikal dekapitasyon yolu ile dekapite edilerek karaciğer dokuları hızlı bir şekilde alındı ve soğuk serum fizyolojikle yıkandıktan sonra analiz yapılmaya kadar -86 °C’de saklandı.

**Çam yağının hazırlanması:** Çam yağının ticari formu kullanıldı ve dimetil sülfoksit (DMSO) bire bir oranında çözüldü (v/v). Bu karışım STZ + ÇY grubuna haftada iki gün 1 mL/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyonla, ayrıca 0,5 mL çam yağı 500 mL içme suyuna eklenerek sıçanlara bu su verildi. STZ ve kontrol grubu sıçanlarına haftada iki gün 1 mL/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyonla DMSO uygulandı (5, 7).

**Doku homojenatının hazırlanması:** Grupların karaciğer doku örnekleri (1 g), Tris-HCl, trisbase ve EDTA (pH= 7,4) tamponu ile homojenize edildikten sonra +4 °C’de 9050 × g’de 20 dk. santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Elde edilen üst sıvı kısımdan malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), total protein analizleri yapıldı. Pelet kısmından ise yağ asidi, ADEK vitaminleri, kolesterol ve sterol analizi yapıldı (5, 7).

**MDA tayini:** Lipid peroksidasyonunun bir ölçüsü olan MDA düzeyi Okhawa ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (10). Alınan karaciğer doku örneklerinin (1,0 mL) üzerlerine 0,5 mL %8,1’lik sodyum dodesil sülfat (SDS), 0,5 mL %0,8’lik tiyobarbitürik asit (TBA), 1,0 mL %10’luk trikloroasetik asit (TCA), 1,0 mL (%2’lik glisiel asetik asit/ sodyum hidroksit (NaOH) pH= 3,5) ve 50 µL %2’lik bütile hidroksitolüen (BHT) eklendi ve bu karışım iyice karıştırıldı ve sonra 60 dk. 95 °C’de su banyosunda bekletildi. Tüpler soğuduktan sonra 4,0 mL bütanol/piridin karışımı (1:15 oranında) ilave edildi ve sonra tüpler 1780 × g +4 °C’de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst kısımdaki organik faz alınarak 532 nm dalga boyunda tüm örneklerin absorbanları okundu. Kör olarak saf su eklenmiş reaktif karışımı

kullanıldı. Standart olarak 1,1',3,3'-tetraetoksipropan çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak hesaplandı.

**GSH tayini:** GSH düzeyi Ellman tarafından tanımlanan yöntemle göre ölçüldü (11). 0,5 mL karaciğer doku örneklerinin üzerine 1,0 mL %10'luk TCA reaktifi ilave edildi ve sonra 10 dk.  $2790 \times g'$ de santrifüj edilerek pelet çöktürüldü. Üst kısım başka bir tüpe alındı ve üzerine 1,0 mL 5,5' ditiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi %1'lik sodyum sitrat içinde 30 mg DTNB çözülerek hazırlandı ve 0,3 M sodyum fosfat dibazik ( $Na_2HPO_4$ ) çözeltisi ilave edildi ve sarı renk oluştuğunda örneklerin absorbansları 412 nm dalga boyunda okundu. Kör olarak saf su eklenmiş reaktif karışımı kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için saf GSH standart olarak kullanıldı (12).

**Protein tayini:** Total protein miktarı Lowry ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntemle göre spektrofotometrik olarak ölçüldü (13). Alınan 10 µL karaciğer doku örneklerine Lowry çözeltisi eklendi, 10 dk. beklendi ve süre sonunda su ile seyreltilmiş folin reaktifi ilave edildi. 30 dk. sonra 760 nm dalga boyunda örneklerin absorbansı okundu. Kör olarak saf su eklenmiş reaktif karışımı kullanıldı. Bovin serum albümin standart olarak kullanıldı.

**Yağ asidi, ADEK vitaminleri, kolesterol ve sterol tayini:** Karaciğer doku örneklerinde yağ asidi, ADEK vitaminleri, kolesterol ve sterol ekstraksiyonu Hara ve Radin tarafından tanımlanan yöntemle göre yapıldı (14). Karaciğer doku örnekleri 3:2 (v/v) oranında hekzan-isopropanol karışımı ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası bu homojenat +4 °C'de  $9050 \times g'$ de 10 dk. santrifüj edilerek elde edilen üst kısımdan yağ asidi, ADEK vitaminleri, kolesterol ve sterol analizi yapıldı.

Yağ asidi bileşimini belirlemek için ayrılan örneklerin üzerine %2'lik metanolik sülfürik asitten ilave edildi, iyice karıştırılarak 55 °C'de 15 sa. etüvde metilleşmeye bırakıldı (12). Süre sonunda tüpler etüvden çıkarıldı, soğuduktan sonra %5'lik NaCl ilave edilerek iyice

karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri hekzan ile ekstre edildi ve hekzan fazı üstten pipetle alınarak %2'lik potasyum bikarbonat ( $KHCO_3$ ) ile muamele edildi ve fazların ayrılması için 4 sa. beklendi. Süre sonunda metil esterlerini içeren karışımların, 45 °C'de ve azot gaz akımı altında çözücülerini uçuruldu, 1 mL n-heptan ile çözüldü ve yağ asidi metil esterleri gaz kromatografisinde analiz edildi. Bu analiz için SP™-2380 kapiler GC kolon (L×ID. 30 m × 0,25 mm, df 0,20 µm) (Sigma) kullanıldı.

ADEK vitaminleri, kolesterol ve sterol için alınan örneklerin üzerine %5'lik metanolik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ilave edildi. Örnekler karıştırıldıktan sonra 85 °C'de 15 dk. bekletildi. Tüpler çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine saf su ilave edilerek karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 mL hekzan ile ekstrakte edildi. Hekzan fazı azot akımı ile uçuruldu. Bir mL (%60 + %40, v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülerek otosampler şişelerine alındı ve HPLC-UV'de analiz edildi. Mobil faz olarak asetonitril/metanol (%60 + %40, v/v) karışımı kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 1 mL/dk. olarak belirlendi. Analiz için UV dedektör ve kolon olarak da Supelcosil LC™ 18 (15 x 4,6 mm, 5 µm; Sigma) kullanıldı (15, 16).

#### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 15,0 paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi (DMRT) kullanılarak yapıldı (5). Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için p değeri  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

#### BULGULAR

Dişabet oluşturulmuş sıçanlarda çam yağının karaciğer dokusunda MDA, GSH ve total protein düzeyine etkisi Tablo 1'de gösterildi. Kontrol grubuna göre; STZ grubunda MDA ve total protein düzeylerinin anlamlı bir şekilde ( $p < 0,001$ ) arttığı, GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde ( $p < 0,001$ ) azaldığı saptandı. STZ grubu ile karşılaştırıldığında; uygulanan çam yağı sonucunda

STZ + ÇY grubunda MDA ve GSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde ( $p<0,001$ ) azaldığı tespit edildi. Total protein düzeyinde oluşan değişikliğin istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlendi.

Diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda çam yağının yağ asidi bileşimine etkisi Tablo 2’de verildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; STZ grubunda palmitik asit, palmitoleik asit ( $p<0,001$ ) ve araşidonik asit ( $p<0,01$ ) düzeylerinin önemli düzeyde azaldığı, buna karşılık stearik asit, linoleik asit ( $p<0,001$ ) ve dokosaheksaenoik asit ( $p<0,05$ )

düzelelerinin önemli düzeyde arttığı, oleik asit ve linolenik asit düzeylerinde görülen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. STZ grubuna göre, STZ + ÇY grubunun karaciğer dokusunda palmitik asit, palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit ve dokosaheksaenoik asit ( $p<0,001$ ) düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı, buna karşılık stearik asit ve araşidonik asit düzeylerinin ise anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ( $p<0,001$ ).

Diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda ADEK vitaminler, kolesterol ve sterol

**Tablo 1.** Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda çam yağının karaciğer dokusunda MDA, GSH ve total protein düzeyine etkisi

	Kontrol	STZ	STZ + ÇY
MDA (nmol/g)	19,30 ± 0,50 <sup>c</sup>	28,52 ± 0,24 <sup>a</sup>	24,66 ± 0,13 <sup>b</sup>
GSH (µmol/g)	15,38 ± 0,43 <sup>a</sup>	6,02 ± 0,16 <sup>b</sup>	3,99 ± 0,14 <sup>c</sup>
Total Protein (µg/g)	156,31 ± 0,81 <sup>b</sup>	162,64 ± 1,25 <sup>a</sup>	159,71 ± 0,92 <sup>ab</sup>

Sonuçlar ortalama ± standart hata (n=10) olarak verildi.

[a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ( $p<0,05$ ) (DMRT)]

**Tablo 2.** Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda çam yağının karaciğer dokusunda yağ asidi bileşimine etkisi (%)

	Kontrol	STZ	STZ + ÇY
Palmitik asit (16:0)	20,88 ± 0,38 <sup>a</sup>	19,36 ± 0,29 <sup>b</sup>	20,65 ± 0,13 <sup>a</sup>
Stearik asit (18:0)	18,30 ± 0,11 <sup>b</sup>	19,15 ± 0,09 <sup>a</sup>	16,78 ± 0,24 <sup>c</sup>
ΣSFA	39,18 ± 0,43	38,50 ± 0,25	37,42 ± 0,25
Palmitoleik asit (16:1)	2,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,65 ± 0,03 <sup>b</sup>
Oleik asit (18:1)	6,06 ± 0,33 <sup>b</sup>	6,32 ± 0,15 <sup>b</sup>	9,13 ± 0,16 <sup>a</sup>
ΣMUFA	8,22 ± 0,34	7,87 ± 0,15	10,78 ± 0,16
Linoleik asit (18:2)	16,22 ± 0,15 <sup>c</sup>	17,18 ± 0,10 <sup>b</sup>	17,82 ± 0,19 <sup>a</sup>
α-Linolenik asit (18:3)	0,24 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>a</sup>
Araşidonik asit (20:4)	27,62 ± 0,17 <sup>a</sup>	26,98 ± 0,14 <sup>b</sup>	24,76 ± 0,18 <sup>c</sup>
Dokosaheksaenoik asit (22:6)	4,07 ± 0,07 <sup>c</sup>	4,20 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,40 ± 0,04 <sup>a</sup>
ΣPUFA	48,02 ± 0,21	48,58 ± 0,16	47,33 ± 0,35
ΣUSFA	56,24 ± 0,39	56,45 ± 0,20	58,11 ± 0,40

Sonuçlar ortalama ± standart hata (n=10) olarak verildi.

[a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ( $p<0,05$ ) (DMRT)]

SFA: Doymuş Yağ Asitleri, MUFA: Tekli Doymamış Yağ Asitleri, PUFA: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri, USFA: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

değişimi Tablo 3’de gösterildi. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde; STZ grubunun karaciğer dokusunda vitamin D<sub>3</sub> (p<0,05), vitamin K<sub>2</sub>, α-tokoferol, retinol, vitamin K<sub>1</sub>, kolesterol, stigmasterol ve β-sitosterol düzeylerinde önemli artış (p<0,001), δ-tokoferol ve vitamin D<sub>2</sub> düzeylerinde ise önemli azalışın (p<0,001) olduğu tespit edildi. STZ grubu ile karşılaştırıldığında, STZ + ÇY grubunun karaciğer dokusunda vitamin K<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>, α-tokoferol, vitamin K<sub>1</sub>, kolesterol (p<0,05) ve β-sitosterol düzeylerinde kayda değer bir (p<0,001) artış δ-tokoferol ve stigmasterol düzeylerinde kayda değer bir azalışın (p<0,001) olduğu bulundu. Vitamin D<sub>2</sub> ve retinol düzeylerinde gözlemlenen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptandı.

### TARTIŞMA

Kronik hiperglisemi; kalp damar hastalığı, retinopati, nefropati ve nöropati gibi diyabet komplikasyonların gelişiminde önemli bir faktördür. Diyabet ve diyabete özgü komplikasyonların oluşması ile şiddetlenmesinde bilinen mekanizmaları arasında oksidatif stresin

çok önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (17). Hiperglisemiye uzun süre maruz kalmanın bir sonucu olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmaların aktivitelerinin azalmasından dolayı diyabette, oksidatif stresin önemli ölçüde arttığı tespit edildi. Serbest radikal üretimi, hücrenin antioksidan kapasitesini aştığı zaman oksidatif stres oluşmaktadır (18). Vücuttaki radikallerin çoğunu hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türleri oluşturmakta ve bu radikaller lipit, karbohidrat, protein ve DNA gibi hücrel biyomoleküllerde hasar oluşturabilmektedir (19). Diyabet durumunda; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), lipit peroksidasyon ve glisemik kontrol sağlayan sistemlerin aktivitesinde önemli değişikliklerin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Diyabetin ortaya çıkardığı koşullarda antioksidan kapasitenin ciddi anlamda etkilenmesi oksidatif strese bağlı uzun dönemli komplikasyonların gelişmesine zemin hazırlamaktadır. Antioksidanların, serbest radikallerin aktivitelerini engelleyerek diyabete özgü komplikasyonları azalttıkları bildirilmiştir (20).

**Tablo 3.** Diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda ADEK vitaminler, kolesterol ve sterol değişimi üzerine çam yağının etkisi (µg/g)

	Kontrol	STZ	STZ + ÇY
Vitamin K <sub>2</sub>	1,98 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,36 ± 0,13 <sup>b</sup>	16,75 ± 0,29 <sup>a</sup>
δ-Tokoferol	0,94 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>c</sup>
Vitamin D <sub>2</sub>	0,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,01 <sup>b</sup>
Vitamin D <sub>3</sub>	0,38 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,03 <sup>a</sup>
α-Tokoferol	9,67 ± 0,11 <sup>c</sup>	22,75 ± 0,19 <sup>b</sup>	33,75 ± 0,27 <sup>a</sup>
Retinol µmol/g	1,86 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,02 <sup>a</sup>
Vitamin K <sub>1</sub>	3,99 ± 0,06 <sup>c</sup>	8,66 ± 0,13 <sup>b</sup>	11,86 ± 0,16 <sup>a</sup>
Kolesterol µmol/g	1,82 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,28 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,38 ± 0,04 <sup>a</sup>
Stigmasterol	90,29 ± 0,56 <sup>c</sup>	207,00 ± 1,01 <sup>a</sup>	185,04 ± 1,50 <sup>b</sup>
β-sitosterol	10,73 ± 0,18 <sup>c</sup>	21,32 ± 0,23 <sup>b</sup>	25,55 ± 0,40 <sup>a</sup>

Sonuçlar ortalama ± standart hata (n=10) olarak verildi.

[a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (p<0,05) (DMRT)]

Çam türlerinin (*Pinus maritima*) kabuk ve yaprak gibi kısımlarından elde edilen ürünlerin yüksek antioksidan kapasite gösterdiği tespit edilmiştir (21). Bu kısımların kateşin, epikateşin ve taksifolin gibi monomerik ve oligomerik birimlerinden oluşan biyoflavonoidler olduğu saptanmıştır (22). Yaptığımız çalışmada; STZ grubunun karaciğer dokusunda MDA düzeyinin arttığı, GSH düzeyinin azaldığı, STZ + ÇY grubuna uyguladığımız çam yağı sonucunda karaciğer dokusunda MDA ve GSH düzeylerinin azaldığı belirlendi (Tablo 1). Çam yağının antioksidan özelliğine bağlı olarak MDA düzeyinin azaldığını düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalar sonucunda; çamdan elde edilen ürünlerin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir (21, 22). Parveen ve ark.; diyabet oluşturulmuş sıçanlara çamdan elde edilen fenolik bileşik, piknogenol uygulanması sonucunda oksidatif stres parametrelerinde azalış, antioksidan parametrelerde artış olduğunu bildirmişlerdir (22). Tip-1 diyabet oluşturulmuş sıçanlara uygulanan çam yağının kan glukoz düzeyini düşürdüğü, karaciğer ve böbrek dokusunda MDA düzeyini azalttığı, GSH düzeyinde artış sağladığı saptanmıştır (7). STZ'nin sıçanlarda oluşturduğu diyabette; karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda azalan antioksidan mekanizmaların, uygulanan piknogenol sayesinde aktivitelerinde düzelmelerin olduğu kaydedilmiştir (23). Düşük karbohidratlı diyetle kombine edilmiş piknogenol uygulamasının retinada glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz aktivitelerinde artış sağladığı, bu artışın piknogenolün sahip olduğu antioksidan ve antihiperglisemik özelliğinden ileri geldiği vurgulanmıştır (24). Çam kabuğundan elde edilen ve fenolik bileşiklerden oluşan piknogenolün güçlü antioksidan aktivite göstererek süperoksit radikalinin üretimini azaltarak endotel disfonksiyonunda iyileşme gösterdiği belirlenmiştir (25).

Lipit profili değişiklikleri diyabet koşullarında yaygındır. Diyabette, kanda bulunan glukoz dokular tarafından kullanılmadığından dolayı, enerji elde

etmek için yağ dokusundan yağ asitlerinin salınımı artmakta fakat yağ asitlerinin fazlası karaciğerde trigliseritlere dönüştürülmektedir. Diyabet koşullarında, kolesterol biosentezinin artması ve kolesterol alımının azalmasından dolayı kanda kolesterol düzeyi yükselmektedir (26). Diyabette doku yağ asidi bileşiminde değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (5, 12, 27).

Çalışmamızda; kontrol grubuna göre STZ grubunda palmitik asit düzeyinin azaldığı, stearik asit düzeyinin arttığı, uygulanan çam yağı sonucunda STZ + ÇY grubunda palmitik düzeyinin artarak kontrol grubu değerlerine yaklaştığı, stearik asit düzeyinin ise azaldığı saptandı (Tablo 2). Pari ve Venkateswaran; yaptıkları çalışmada; STZ grubunun karaciğer dokusunda palmitik ve stearik asit düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını, aynı zamanda uyguladıkları *Coccinia indica* bitki ekstraktının her iki yağ asidi değerlerinde oluşan anormallikleri önlediğini belirlemişlerdir (27). Douillet ve ark., STZ verdikleri sıçanların karaciğer dokusunda palmitik asit düzeyinin arttığını, stearik asit düzeyinin azaldığını tespit etmişlerdir (28). Levant ve ark., deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda palmitik ve stearik asit fosfolipit düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (29). Çelik ve ark., diyabet oluşturdukları sıçanların karaciğer dokusunda palmitik ve stearik asit düzeylerinin azaldığını, uyguladıkları E vitamininin palmitik asit düzeyini azalttığı, stearik asit düzeyini ise arttırdığını bulmuşlardır (30). Kontrol grubuna göre, deneysel diyabet oluşturulan sıçanların karaciğer dokusunda palmitik ve stearik asit düzeylerinde önemli değişikliklerin olduğu, bu açıdan bakıldığında elde ettiğimiz bulguların önceki çalışma bulgularıyla uyumluluk gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmalarımızın sonuçlarına göre, palmitoleik asit düzeyinin azaldığı, oleik asit düzeyinin önemsiz düzeyde arttığı, uygulanan çam yağı sonucunda STZ + ÇY grubunda palmitoleik ve oleik asit düzeylerinin arttığı görüldü (Tablo 2). Douillet ve ark. ile Çelik ve ark., diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda oleik asit

düzeinin azaldığını, uyguladıkları tedavi edici ajanların oleik asit düzeyinde artış sağladığını tespit etmişlerdir (28, 30). Pari ve Venkateswaran 'da; diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda oleik asit düzeyinin arttığını, uyguladıkları tedavi edici ajanın bu yağ asidi değerinde oluşan değişikliği azalttığını saptamışlardır (27). Steroil CoA desaturaz (SCD), palmitik (16:0) ve stearik asidi (18:0) substrat olarak kullanarak palmitoleik ve oleik asit sentezlemektedir. Doymuş ve doymamış yağ asitleri arasındaki oran membran akışkanlığı ve membranın fiziksel özelliği için çok önemlidir. Bu oranın korunması bazı kronik hastalıkların engellenmesi açısından oldukça önemlidir (31). Çalışmamızda; kontrol grubuna göre, STZ + ÇY grubunda doymuş yağ asidi miktarının (SFA) azaldığı, tekli doymamış yağ asidi (MUFA) miktarının arttığı görülmekte (Tablo 2), uyguladığımız çam yağının doymuş yağ asitleri ile tekli doymamış asitleri arasındaki oranın korunmasına katkı yaparak kronik hastalıklara karşı koruyucu özellik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Linoleik,  $\alpha$ -linolenik, araşidonik ve dokosaheksaenoik asitler organizmada yaygın olarak bulunan çoklu doymamış yağ asitleridir (PUFA). Çalışmamızda; kontrol grubuna göre, STZ grubunda linoleik ve dokosaheksaenoik asit düzeylerinin arttığı,  $\alpha$ -linolenik ve araşidonik asit düzeylerinin azaldığı tespit edildi (Tablo 2). Brenner ve ark., diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda araşidonik asit düzeyinin azaldığını, linoleik ve dokosaheksaenoik asit düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (32). Çelik ve ark., diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda linoleik asit düzeyinin azaldığını, araşidonik ve dokosaheksaenoik asit düzeylerinin arttığını, uyguladıkları E vitamininin bu yağ asidi değerlerinde oluşan değişiklikler üzerinde etkisinin sınırlı olduğu gözlemişlerdir (30). Douillet ve ark., linoleik ve  $\alpha$ -linolenik asit düzeylerinin azaldığını, araşidonik ve dokosaheksaenoik asit düzeylerinin arttığını belirlemişlerdir (28). Pari ve Venkateswaran ise  $\alpha$ -linolenik ve araşidonik asit düzeylerinin azaldığını, uyguladıkları bitkisel

ekstraktın bu yağ asidi değerlerinde oluşan anormallikleri azalttığını belirlemişlerdir (27). Levant ve ark., linoleik, araşidonik ve dokosaheksaenoik asit fosfolipit düzeylerinin azaldığını tespit etmişlerdir (29). Çalışmamızda; PUFA düzeylerinde elde ettiğimiz sonuçlar ile STZ grubundaki sonuçlar genel olarak önceki çalışma bulgularıyla paralellik gösterdiğini söyleyebiliriz (Tablo 2). Dokularda bulunan linoleik,  $\alpha$ -linolenik, araşidonik, eikosapentaenoik ve dokosaheksaenoik yağ asitleri esansiyel yağ asitleridir. Memelilerde  $\Delta 12$  ve  $\Delta 15$  desaturaz enzimleri bulunmadığından linoleik ve  $\alpha$ -linolenik yağ asitleri diyetle alınması gerekmektedir. Bu yağ asitleri diyetle alındıktan sonra araşidonik, eikosapentaenoik ve dokosaheksaenoik asit gibi yapısında çift bağ sayısı fazla olan uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürülebilmesi için  $\Delta 6$  ve  $\Delta 5$  desaturaz enzimlerinin yer aldığı desaturasyon yolunda uzun zincirli doymamış yağ asitlerine metabolize edilmektedir. Bu desaturasyon yolunda bulunan enzimlerin aktivitesi insülin hormonunun etkisi altında bulunmaktadır (33). Yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçlarında bulunan farklı yağ asidi değerlerinin deneysel diyabet koşullarında ortaya çıkan insülin eksikliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Yağ asidi biyosentezine katılan enzimlerin aktivitesinden insülinin sorumlu olduğu ve insülin düzeyinde oluşan dalgalanmaların doku yağ asidi bileşiminde değişikliklerin ortaya çıkmasında önemli unsur olduğu ifade edilmektedir (32, 34-36). Çamdan elde edilen ürünlerin deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda insülin metabolizması üzerinde sınırlı etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (22).

Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), yağda çözünebilir ve hücre membranında bulunan zincir kırıcı özelliğinden dolayı çoklu doymamış yağ asitlerini oksidatif hasarlara karşı koruyan antioksidan bir molekül olarak kabul edilmektedir.  $\alpha$ -tokoferol transfer proteini ( $\alpha$ -TTP),  $\alpha$ -tokoferol için yüksek afiniteye sahiptir ve  $\alpha$ -tokoferol düzeyinin korunmasında önemli rol oynamaktadır.



Oksidatif strese  $\alpha$ -tokoferol transfer protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (37). STZ'nin neden olduğu diyabette oksidatif stresin arttığı birçok çalışmada ortaya çıkmıştır (7, 18, 22). Çalışmamız sonucunda; kontrol grubuna göre, STZ gruplarında  $\alpha$ -tokoferol düzeyinin arttığı saptandı (Tablo 3). Miyazaki ve ark., tip 2 diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda oksidatif stres ve  $\alpha$ -tokoferol düzeylerinin arttığını tespit etmişlerdir (38). Yine bu çalışmada; kontrol grubuna göre diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda  $\alpha$ -TTP gen ifadesinin arttığı da saptanmıştır. Diyabette ortaya çıkan yüksek oksidatif stres,  $\alpha$ -tokoferol transfer protein ( $\alpha$ -TTP) ekspresyonunu artmasına sebep olmakta ve incelediğimiz gruplarda (STZ, STZ + ÇY)  $\alpha$ -tokoferol düzeyindeki artışı açıklamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçların yukarıda bahsedilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Memelilerde sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler SREBPs-1 ve SREBPs-2 adı verilen iki ayrı SREBP transkripsiyon faktörü bulunmaktadır. SREBPs-2 kolesterol metabolizmasından sorumlu genlerin aktivitesini kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Aktivitesi insüline bağlıdır. Dolaşımdaki insülin düzeyi azaldığında aktivitesi baskılanan bu transkripsiyon faktörünün kolesterol biyosentezinde görev alan enzimlerin gen ekspresyonları ile LDL reseptör sayısının düzenlenmesinde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (35, 39). STZ' nin neden olduğu diyabette insülin sekresyonunun azaldığı bu durumda büyük olasılıkla kolesterol biyosentezinde görev alan enzimlerin aktivitesinin değişmesine neden olduğu ve bundan dolayı karaciğer dokusunda kolesterol düzeyinin arttığını düşünmekteyiz (Tablo 3).

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir (FÜBAP - FF. 11.39).

Çalışmamızda; STZ gruplarının karaciğer dokusunda sterol düzeylerinin arttığı belirlendi (Tablo 3). Diyabetik sıçanların dokularında kolesterol ve sterol birikiminin olduğu ifade edilmiştir. Diyabetik sıçanların, karaciğer dokusunda kolesterol ve bitkisel sterol düzeyinde oluşan artışın taşıyıcı protein aktivitesinde oluşan belirgin azalma ile sterol aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan genlerin mRNA ekspresyonunun azalması ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (40). Çalışmamızda; karaciğer dokusunda oluşan sterol artışından yukarıda ifade edilen metabolik yolların diyabet koşullarından etkilenmesi neticesinde ortaya çıktığını öngörmekteyiz.

Yapılan çalışmalarda; diyabet durumunda, plazma ve karaciğer dokusunda retinol ve retinol taşıyıcı protein aktivitesinin etkilendiği gösterilmiştir. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların karaciğer dokusunda retinol düzeyinin arttığı saptanmıştır (41). Çalışmamızda da STZ gruplarında retinol düzeyinin arttığı tespit edildi (Tablo 3). Retinol metabolizmasının diyabet koşullarından etkilenmesi neticesinde karaciğer dokusunda retinol düzeyinin arttığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonucunda; çam yağının, karaciğer dokusunda MDA düzeyi üzerinde olumlu etki gösterdiği, fakat yağ asidi ile ADEK vitaminleri üzerinde oluşan anormallikler üzerinde etkisinin sınırlı kaldığı tespit edildi. Bu çalışmada ortaya çıkan verilerin daha kapsamlı yöntemler içeren çalışmalarla desteklenmesi halinde daha tatmin edici sonuçlara ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Ugochukwu NH, Babady NE. Antioxidant effects of *Gongronema latifolium* in hepatocytes of rat models of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Fitoterapia*, 2002; 73(7-8): 612-8.
2. Bellamkonda R, Rasineni K, Singareddy SR, Kasetti RB, Pasurla R, Chippada AR, et al. Antihyperglycemic and antioxidant activities of alcoholic extract of *Commiphora mukul* gum resin in streptozotocin induced diabetic rats. *Pathophysiology*, 2011; 18(4): 255-61.
3. Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PS. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. *J Appl Toxicol*, 2008; 28(6): 806-13.
4. Kızılaslan Ç, Sevgi E. Ethnobotanical uses of genus *Pinus L.* (Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Know*, 2013; 12(2): 209-20.
5. Demir E, Yılmaz Ö. Streptozotosin ile tip-2 diyabet oluşturulan sıçanlarda çam yağının antihiperlipidemik ve bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *Marmara Üniv Fen Bil Derg*, 2013; 25(3): 140-56.
6. Clark SP, Bollag WB, Westlund KN, Ma F, Falls G, Xie D, et al. Pine oil effects on chemical and thermal injury in mice and cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Phytother Res*, 2014; 28(2): 252-60.
7. Demir E, Yılmaz Ö. Streptozotosinin neden olduğu tip-1 diyabette çam yağının karaciğer ve böbrek dokusundaki bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *Karaelmas Fen Müh Derg*, 2014; 4(1): 43-51.
8. Biswas A, Chatterjee S, Chowdhury R, Sen S, Sarkar D, Chatterjee M, et al. Antidiabetic effect of seeds of *Strychnos potatorum* Linn. in a streptozotocin-induced model of diabetes. *Acta Pol Pharm*, 2012; 69(5): 939-43.
9. Dewanjee S, Das AK, Sahu R, Gangopadhyay M. Antidiabetic activity of *Diospyros peregrina* fruit: effect on hyperglycemia, hyperlipidemia and augmented oxidative stress in experimental type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol*, 2009; 47(10): 2679-85.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95(2): 351-8.
11. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959; 82: 70-7.
12. Demir E, Yılmaz O, Ozsahin AD. The effect of some biochemical parameters in brain tissue of rats pine oil streptozotocin with experimental diabetes in rats. *Int J Diabetes Res*, 2013; 2(3): 39-44.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193(1): 265-75.
14. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a lowtoxicity solvent. *Anal Biochem*, 1978; 90: 420-6.
15. Sánchez-Machado DI, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macroalgae. *J Chromatogr A*, 2002; 976(1-2): 277-84.
16. López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Ríos-Vázquez NJ. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J Chromatogr A*, 2006; 1105(1-2): 135-9.
17. Budin SB, Othman F, Louis SR, Bakar MA, Das S, Mohamed J. The effects of palm oil tocotrienol-rich fraction supplementation on biochemical parameters, oxidative stress and the vascular wall of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinics (Sao Paulo)*, 2009; 64(3): 235-44.
18. Huang CS, Yin MC, Chiu LC. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Psidium guajava* fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 2011; 49(9): 2189-95.
19. Peerapatdit T, Likidilid A, Patchanans N, Somkasetrin A. Antioxidant status and lipid peroxidation end products in patients of type 1 diabetes mellitus. *J Med Assoc Thai*, 2006; 89 Suppl 5: 141-6.

20. Fenercioglu AK, Saler T, Genc E, Sabuncu H, Altuntas Y. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus without complications. *J Endocrinol Invest*, 2010; 33(2): 118-24.
21. Rohdewald PA. review of the French maritime pine bark extract (pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2002; 40(4): 158-68.
22. Parveen K, Ishrat T, Malik S, Kausar MA, Siddiqui WA. Modulatory effects of pycnogenol in a rat model of insulin-dependent diabetes mellitus: biochemical, histological, and immunohistochemical evidences. *Protoplasma*, 2013; 250(1): 347-60.
23. Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003; 17(3): 193-9.
24. Kamuren ZT, McPeck CG, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of low-carbohydrate diet and pycnogenol treatment on retinal antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2006; 22(1): 10-8.
25. Jankyova S, Hlavackova L, Kralova E, Slazneva J, Drobna V, Zuzik P, et al. The evaluation of efficacy of pycnogenol® fractions on endothelial dysfunction. *Acta Fac Pharm Univ Comen*, 2013; LX(1): 7-14.
26. Das J, Vasan V, Sil PC. Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012; 258(2): 296-308.
27. Pari L, Venkateswaran S. Protective effect of *Coccinia indica* on changes in the fatty acid composition in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmazie*, 2003; 58(6): 409-12.
28. Douillet C, Bost M, Accominotti M, Borson-Chazot F, Ciavatti M. Effect of selenium and vitamin E supplements on tissue lipids, peroxides, and fatty acid distribution in experimental diabetes. *Lipids*, 1998; 33(4): 393-9.
29. Levant B, Ozias MK, Guilford BL, Wright DE. Streptozotocin-induced diabetes partially attenuates the effects of a high-fat diet on liver and brain fatty acid composition in mice. *Lipids*, 2013; 48(9): 939-48.
30. Celik S, Baydaş G, Yılmaz O. Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats. *Cell Biochem Funct*, 2002; 20(1): 67-71.
31. Ntambi JM. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res*, 1999; 40(9): 1549-58.
32. Brenner RR, Bernasconi AM, Garda HA. Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidylcholine and physical properties of hepatic microsomal membranes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000; 63(3): 167-76.
33. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 2004; 24: 345-76.
34. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*, 2001; 40(6): 439-52.
35. Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci*, 2006; 119(Pt 6): 973-6.
36. Mimouni V, Poisson JP. Altered desaturase activities and fatty acid composition in liver microsomes of spontaneously diabetic Wistar BB rat. *Biochim Biophys Acta*, 1992; 1123(3): 296-302.
37. Etlz RP, Vrekoussis T, Kuhn C, Schulze S, Pöschl JM, Makrigiannakis A, et al. Oxidative stress stimulates  $\alpha$ -tocopherol transfer protein in human trophoblast tumor cells BeWo. *J Perinat Med*, 2012; 40(4): 373-8.
38. Miyazaki H, Takitani K, Koh M, Takaya R, Yoden A, Tamai H.  $\alpha$ -Tocopherol status and expression of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2013; 59(1): 64-8.

39. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997; 89(3): 331-40.
40. Scoggan KA, Gruber H, Chen Q, Plouffe LJ, Lefebvre JM, Wang B, et al. Increased incorporation of dietary plant sterols and cholesterol correlates with decreased expression of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 in diabetic BB rats. *J Nutr Biochem*, 2009; 20(3): 177-86.
41. Tuitoek PJ, Ziari S, Tsin AT, Rajotte RV, Suh M, Basu TK. Streptozotocin-induced diabetes in rats is associated with impaired metabolic availability of vitamin A (retinol). *Br J Nutr*, 1996; 75(4): 615-22.