



Streptozotosinin Neden Olduğu Tip-1 Diyabette Çam Yağının Karaciğer ve Böbrek Dokusundaki Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkisi

The Effects of Pine Oil on Some Biochemical Parameters in the Liver and Kidney Streptozotocin Induced Tip-1 Diabetes

Ersin Demir*, Ökkeş Yılmaz

Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

Özet

Bu çalışma tip-1 diyabet oluşturulan sıçanlarda, çam yağının hiperglisemi, MDA-TBA, glutatyon, doku total protein, ADEK vitaminleri ve kolesterol üzerine etkilerinin araştırılması için tasarlandı. Sıçanlar kontrol (K), diyabet (STZ-DM) ve diyabet+çam (STZ-DM+ÇY) yağı olmak üzere üç grubu ayrıldı. Diyabet gruplarına intraperitoneal enjeksiyonla streptozotosin (65 mg/kg) verilerek diyabet oluşturuldu. Çam yağı grubundaki sıçanlara (STZ-DM+ÇY) haftada iki gün 1 ml/kg (v/v) dozunda intraperitoneal enjeksiyonla çam yağı ve ayrıca 0.5 ml çam yağı 500 ml içme suyuna ilave edilerek verildi. Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, STZ-DM+ÇY grubunda, postprandial kan glikoz düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.001$), vücut ağırlığının ise anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.001$) tespit edildi. Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, STZ-DM+ÇY grubunda, karaciğer ve böbrek dokusunda TBA-MDA düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.001$), böbrek dokusunda GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.001$) bulundu. Diyabet grubuna göre, uygulanan çam yağının karaciğer ve böbrek dokusunda, ADEK vitaminler ile total kolesterol düzeyi üzerinde düzeltici etkisinin sınırlı kaldığı belirlendi. Bu çalışmada, çam yağının hipoglisemik potansiyele sahip olduğu ve ayrıca karaciğer ve böbrek dokusunda bazı biyokimyasal parametreler üzerinde olumlu etki gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Çam yağı, Hiperglisemi, Lipid peroksidasyon, ADEK vitamin, Kolesterol, Glutatyon

Abstract

The present study was designed to evaluate the effect of pine oil on hyperglycemia and MDA-TBA, glutathione, tissue total protein, ADEK vitamins and cholesterol parameters in streptozotocin-induced type-1 diabetic rats. Rats were divided into three groups: control (C) diabetes (STZ-DM), diabetes+pine oil (STZ-DM+PO) groups. Diabetes induced in rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg). 1 ml/kg the dose pine oil was intraperitoneally injected twice in a week to the diabetes+pine oil (STZ-DM+PO), and additionally 0.5 ml /500 ml dose of pine oil was added to drinking water of these group. Postprandial blood glucose levels decrease significantly ($p<0.001$) STZ-DM+ÇY group and body weight increase significantly ($p<0.001$) when compared to STZ-DM group. MDA-TBA levels of liver and kidney decrease significantly in STZ-DM+ÇY group and GSH level kidney increase significantly when compared to STZ-DM group. ADEK vitamins with total cholesterol level corrective effect on liver and kidney tissue limit remain were determined in applied to pine oil group when compared to STZ-DM group. This study demonstrates that pine oil possesses hypoglycemic potentials in STZ induced diabetic rats and concluded that pine oil has positive effect on some biochemical parameters in the liver and kidney.

Keywords: Pine oil, Hyperglycemia, Lipid peroxidation, Vitamin ADEK, Cholesterol, Glutathione

1. Giriş

Tüm dünyada hastalıkların önlenmesi ile tedavisinde doğal ürünler binlerce yıldan beridir, insanoğlu tarafından kullanılmaktadır (Maimoona vd. 2011). Antidiyabetik aktiviteye sahip doğal besin modülatörlerinin diyabet tedavisinde kullanımına yönelik yapılan araştırmalar

günümüzde büyük bir ivme kazanmıştır (Chandra vd. 2007). Çam türleri Akdeniz ve İran-Turan bölgelerinin en yaygın tıbbi bitkilerindendir. Türkiye’de çam türlerinde elde edilen droglar antiseptik, balgam sökücü, solunum ve üriner sistem hastalıkları, romatizma ağrıları ve cilt hastalıklarının tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Kızılaslan ve Sevgi 2013, Baytop 2001, Tuzlacı ve Erol 1999). Pinus türlerinin yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve bu nedenle gıda ve ilaç sektörlerinin

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: ersnca.dmr@gmail.com

de kullanılmak üzere büyük bir potansiyelinin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Yeşil-Çelikaş vd. 2009).

Çok eski zamanlardan beri diyabet insanoğlunu önemli metabolik hastalıklardan biridir. Bu hastalık bugün dünyaya genelinde 230 milyondan fazla insanı etkilemiş durumda ve bu sayının 2025 yılında 350 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Kowluru ve Chan 2007). Diyabet, insülin salgılanmasında bozukluk, insülin aktivitesine direnç veya her iki kusurdan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir bozukluktur. Kronik hiperglisemi nefropati, nöropati, retinopati ve ateroskleroz gibi mikrovasküler ile makrovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır (Karthikesan vd. 2010).

Diyabetin ortaya çıkması ve gelişmesinde oksidatif stresin rolü iyi bilinmektedir. Kronik hiperglisemi, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ile vücudun redoks dengesinin değişmesine neden olarak oksidatif strese katkıda bulunmaktadır (Prasath ve Subramanian 2013). Hipergliseminin zararlı etkilerine karşı korumada ve aynı zamanda glukoz metabolizması üzerindeki olumlu etkilerden dolayı diyabet tedavisinde antioksidan aktiviteye sahip bitkiler ile bu bitkilerden elde edilen çeşitli biyoaktif bileşiklerin kullanılmasının iyi bir diyet stratejisi olduğu kabul edilmektedir (Nicolle vd. 2011, Dembinska-Kiec vd. 2008). Bitkisel kaynaklı ürünlerin herhangi bir yan etkileri olmaksızın çeşitli farmakolojik özellikleri bulunmaktadır (Prasath ve Subramanian 2013).

Bu çalışma, çam yağının deneysel olarak oluşturulan diyabette kan şekeri, vücut ağırlığı ile karaciğer ve böbrek dokularında MDA-TBA, GSH, total protein, ADEK vitaminleri ile kolesterol düzeyine etkisinin araştırılması için tasarlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1 Deney Hayvanları

Deneysel uygulamalar, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirildi (Karar no: 05.05.2011/81). Bu çalışmada 30 adet 8-10 haftalık Wistar albino ırkı erkek sıçanlar kullanıldı.

2.2 Deneysel Diyabet Oluşumu

Hayvanlar rastgele kontrol, STZ-DM ve STZ-DM+ÇY olmak üzere üç gruba ayrıldı. Diyabet oluşturmak için STZ-DM ve STZ-DM+ÇY grubunu oluşturan sıçanlara 65 mg/kg dozunda streptozotosin (STZ) fosfat-sitrat tamponunda (0.1 M, pH 4.5) çözülerek intraperitoneal enjeksiyonla verildi (Baydas vd. 2002).

STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra tüm sıçanlar bir gece önceden aç bırakıldı. Aç bırakılan sıçanların kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazında (Smart Chek) okunması suretiyle açlık kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Açlık kan glikoz düzeyi 250 mg/dl ya da üzeri olan sıçanlar tip-1 diyabet olarak kabul edildi (Baydas vd. 2002). Çalışma sekiz hafta sürdü ve çalışmanın sonunda tüm sıçanlar servikal dekapitasyon yolu ile dekapite edildi. Karaciğer ve böbrek doku örnekleri soğuk serum fizyolojikte yıkandıktan sonra analiz yapıncaya kadar -86°C'de bekletildi.

2.3 Çam Yağının Hazırlanması ve Uygulanması

Çam yağının ticari formu kullanıldı ve dimetil sülfoksitte (DMSO) bire bir oranında çözüldü (v/v). Bu karışım STZ-DM+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 (Demir vd. 2013). STZ-DM ve kontrol grubu sıçanlarına haftada iki gün 1ml/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyonla DMSO verildi.

2.4 Doku Homojenatının Hazırlanması

Bir gram karaciğer ve böbrek doku örnekleri, 6 ml Tris-HCl, Trisbase ve EDTA (pH:7,4) tamponu ile homojenize edildikten sonra +4°C'de 9050× g'de 20 dakika santrifüj edilerek doku pelletinden ayrıldı. Elde edilen supernatant kısımdan MDA-TBA, indirgenmiş glutatyon, total protein analizleri, pellet kısmından ise ADEK vitaminleri ile kolesterol analizi yapıldı.

2.5 Deneysel Prosedürler

2.5.1 Doku TBARS tayini

MDA-TBA düzeyi Ohkawa ve arkadaşlar tarafından tanımlanan metotta bazı değişiklikler yapılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Ohkawa vd. 1979). Standart olarak 1.1',3.3'-tetraetoksipropan çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak hesaplandı (Şekil 1).

2.5.2 Doku GSH Tayini

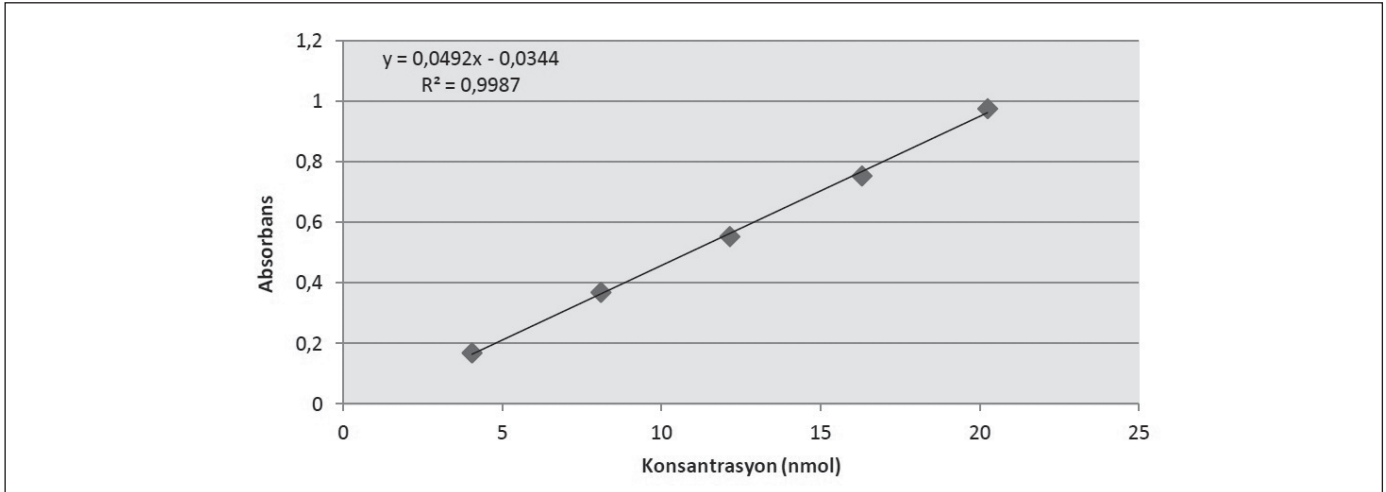
GSH düzeyi Elman tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı (Ellman 1959). Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için GSH standart olarak kullanıldı (Şekil 2).

2.5.3 Doku Protein Tayini

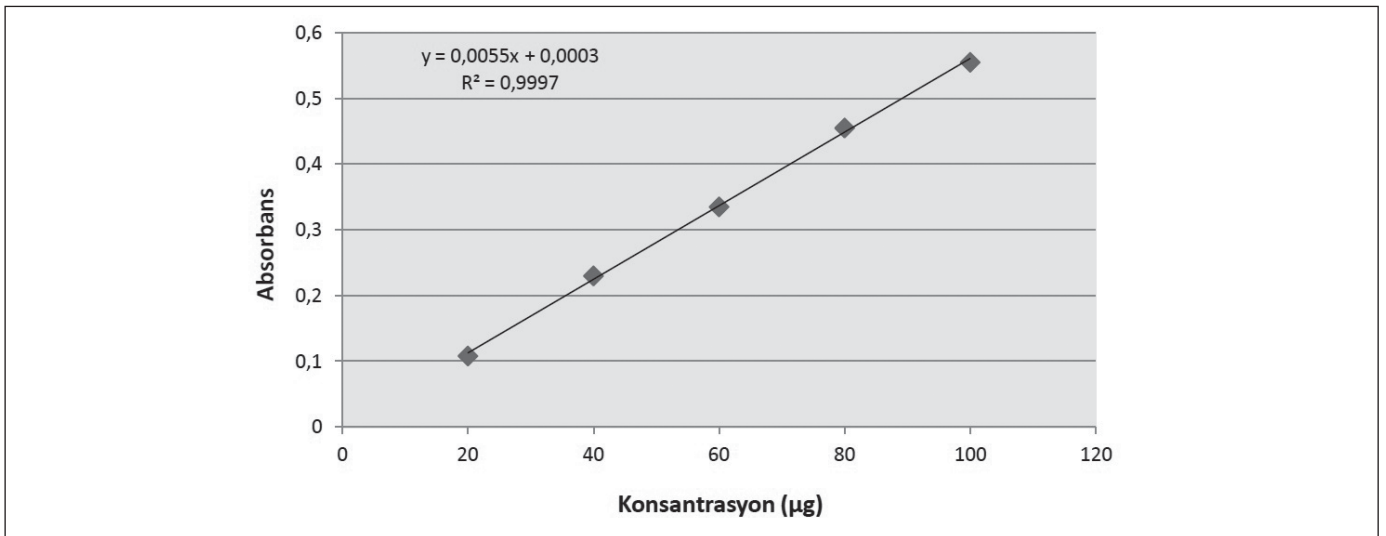
Doku total protein tayini Lowry ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre spektrofotometrik olarak ölçüldü (Lowry vd. 1951). Standart olarak Bovin serum albümin kullanıldı (Şekil 3).

2.5.4 Dokuda ADEK Vitaminler ve Kolesterol Tayini

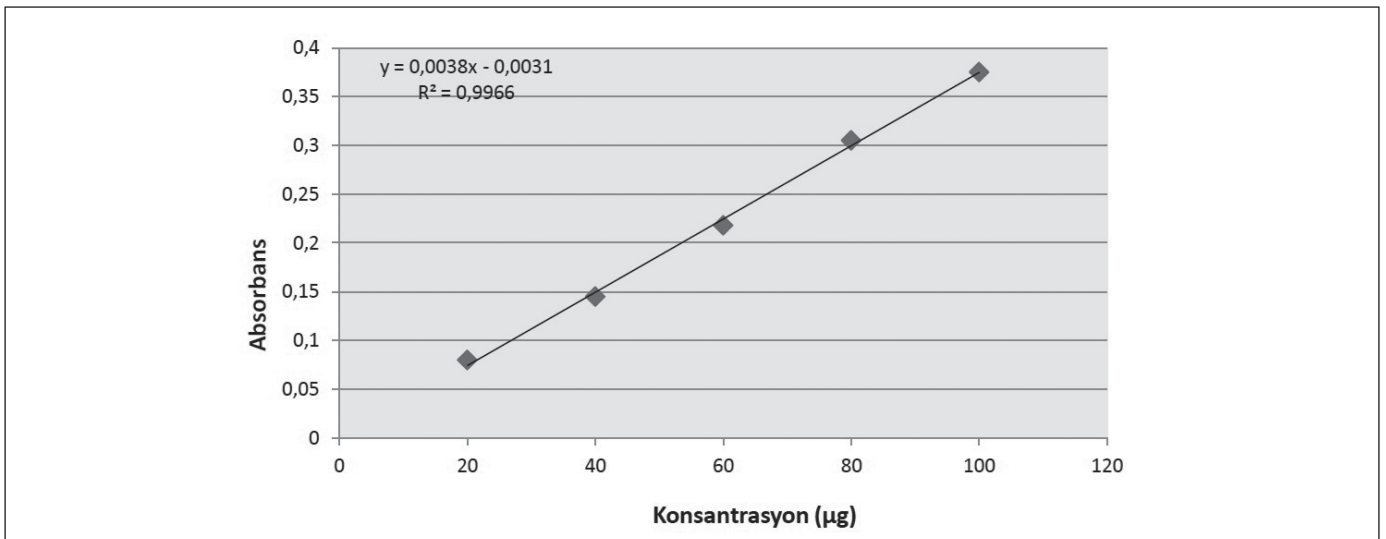
Karaciğer ve böbrek doku örneklerinde ADEK vitaminleri



Şekil 1. MDA-TBA kalibrasyon eğrisi.



Şekil 2. Glutasyon kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3. Protein kalibrasyon eğrisi.

ile kolesterol ekstraksiyonu Hara ve Radin tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı (Hara ve Radin 1978). Bunun için, doku örnekleri 3:2 (v/v) oranında hekzanisopropanol karışımı ile homojenize edildi. Daha sonra bu homojenat +4°C'de 9050× g'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen supernatant kısımdan ADEK vitaminleri ile kolesterol analizi yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril/metanol (%60+%40, v/v) karışımı kullanıldı. Analiz için UV dedektör, kolon olarak da Süpelcosil LC™ 18 (15x4.6 mm, 5 µm; Sigma, USA) kullanıldı (Katsanidis ve Addis 1999, Bragagnolo ve Rodriguez-Amaya 2003).

2.5.5 İstatistik Analizi

İstatistiksel analiz için, SPSS 15.0 paket programı kullanıldı. Grupları arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi (DMRT) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. Anlamlılık düzeyi olarak p<0.05 kabul edildi.

3. Bulgular

STZ enjeksiyonundan sonra, K grubuna göre hem STZ-DM hem de STZ-DM+ÇY grubunda, postprandial kan glukoz düzeyinin anlamlı derecede arttığı (p<0.001), çam yağı uygulamasından sonra STZ-DM+ÇY grubunda postprandial kan glukoz düzeyinin STZ-DM grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (p<0.001). Ayrıca STZ-DM+ÇY grubunda, STZ-DM grubuna göre vücut ağırlığının önemli derecede arttığı tespit edildi. (p<0.001) (Çizelge 1 ve 2).

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, STZ-DM grubunun karaciğer ve böbrek dokusunda MDA-TBA düzeyinin önemli derecede arttığı (p<0.001), STZ-DM+ÇY grubunda ise önemli derecede azalarak kontrol grubu değerlerine yaklaştığı saptandı (p<0.001) (Çizelge 3).

Kontrol grubuyla mukayese edildiğinde, STZ-DM grubunun karaciğer ve böbrek dokusunda GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi (p<0.001). STZ-DM

Çizelge 1. Çam yağının kan şekerine etkisi (mg/dl)

	K	STZ-DM	STZ-DM+ÇY
Deneyin başlangıcı	99.83±0.83	98.01±1.07	98.54±0.92
STZ'den sonra	92.17±0.40 ^b	296.92±8.87 ^a	308.54±14.86 ^a
Deneyin sonu	102.33±1.98 ^c	435.91±9.44 ^a	271.22±13.39 ^b

Sonuçlar ortalama±standart (n=10) hata olarak verildi. [a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P<0.05) (DMRT)].

Çizelge 2. Çam yağının canlı ağırlığa etkisi (g)

	K	STZ-DM	STZ-DM+ÇY
Deneyin Başlangıcı	184.67±0.49 ^b	219.62±1.27 ^a	218.46±1.03 ^a
Deneyin Sonu	254.67±0.88 ^a	216.09±0.89 ^c	231.22±1.49 ^b

Sonuçlar ortalama±standart (n=10) hata olarak verildi. [a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P<0.05) (DMRT)].

Çizelge 3. Karaciğer ve böbrek dokusunda MDA-TBA, GSH ve Protein değişimi

	K	STZ-DM	STZ-DM+ÇY
MDA-TBA (nmol/g)			
Karaciğer	34.18±0.08 ^b	44.92±0.17 ^a	36.20±0.14 ^b
Böbrek	22.58±0.30 ^b	30.28±0.76 ^a	23.35±0.29 ^b
GSH (µmol/g)			
Karaciğer	10.23±0.13 ^a	6.74±0.07 ^b	7.12±0.17 ^b
Böbrek	3.96±0.22 ^a	1.89±0.05 ^c	2.43±0.05 ^b
Total protein (µg/g)			
Karaciğer	152.97±0.80 ^b	173.33±1.22 ^a	168.70±0.78 ^a
Böbrek	89.25±1.05 ^a	62.23±2.37 ^b	63.61±1.01 ^b

Sonuçlar ortalama±standart (n=10) hata olarak verildi. [a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P<0.05) (DMRT)].

grubuna göre, STZ-DM+ÇY grubunun böbrek dokusunda GSH düzeyinin anlamlı derecede arttığı ($p<0.001$), karaciğer dokusunda ise GSH düzeyinin arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Çizelge 3). Karaciğerde total protein düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, STZ-DM grubunda anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.001$), buna karşılık STZ-DM+ÇY grubunun karaciğer dokusunda STZ-DM grubuna göre total protein düzeyinin kısmı oranda azaldığı, böbrek dokusunda ise kısmı oranda arttığı belirlendi (Çizelge 3).

Kontrol grubuna göre, STZ-DM grubunun karaciğer dokusunda vitamin K₂, α-tokoferol, retinol, vitamin K₁ ve kolesterol düzeylerinde anlamlı artma ($p<0.001$), vitamin D₂ düzeyinde ise anlamlı azalmanın ($p<0.001$) olduğu tespit edildi. STZ-DM grubuna göre, STZ-DM+ÇY grubunda vitamin K₂, α-tokoferol, retinol ve vitamin K₁ düzeylerinde anlamlı azalma ($p<0.001$), vitamin D₂ ile kolesterol düzeylerinde ise anlamlı bir artışın ($p<0.001$) olduğu bulundu (Çizelge 4).

Kontrol grubuna göre, STZ-DM grubunun böbrek dokusunda vitamin K₂ ve kolesterol düzeylerinde anlamlı azalma ($p<0.001$), δ-tokoferol, vitamin D₂, vitamin D₃, α-tokoferol, retinol ve vitamin K₁ düzeylerinde anlamlı

bir artışın ($p<0.001$) olduğu saptandı. STZ-DM grubu ile mukayese edildiğinde, STZ-DM+ÇY grubunda vitamin K₂, vitamin D₂, vitamin D₃ ve kolesterol düzeylerinde anlamlı artış ($p<0.001$), δ-tokoferol, retinol, vitamin K₁ ve sterol düzeylerinde anlamlı azalmanın ($p<0.001$) olduğu belirlendi. α-tokoferol düzeyinde görülen değişikliğin istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlendi (Çizelge 5).

4. Tartışma ve Sonuç

Diyabette hem açlık hem de postprandial kan glukoz düzeyinin azaltılması glisemik kontrol sağlamanın yanında diyabete özgü komplikasyonlarının önlenmesi açısından da oldukça önemlidir (Ejike vd. 2013).

Diyabet grubunda postprandial kan glukoz düzeyinin önemli düzeyde arttığını, çam yağı uyguladığımız grupta ise postprandial kan glukoz düzeyinin önemli düzeyde azaldığını belirledik. Bazı etkin biyomoleküllerin karbohidratların sindiriminde görevli α-amilaz ve α-glukozidaz gibi enzimlerin aktivitelerini engellemeleri sonucunda monosakkaritlerin kana geçişlerinin geciktirerek postprandial glikoz düzeyini azalttığı ileri sürülmüştür (Wolffenbuttel ve Graal 1996). Bir araştırmacı grubu, çam kabuğu ile yaprağından

Çizelge 4. Çam yağının karaciğer dokusunda ADEK vitaminler ile kolesterol düzeyine etkisi (µg/g)

	K	STZ-DM	STZ-DM+ÇY
Vitamin K ₂	2.64±0.02 ^c	5.53±0.05 ^a	4.49±0.07 ^b
Vitamin D ₂	0.95±0.02 ^a	0.70±0.01 ^c	0.89±0.01 ^b
α-Tokoferol	15.71±0.17 ^c	108.42± 0.49 ^a	104.03±0.62 ^b
Retinol µmol/g	2.12±0.01 ^b	4.30±0.04 ^a	4.20±0.02 ^a
Vitamin K ₁	2.34±0.08 ^c	7.89±0.12 ^a	5.14±0.02 ^b
Kolesterol µmol/g	1.76±0.01 ^c	3.56±0.02 ^b	3.68±0.02 ^a

Sonuçlar ortalama±standart (n=10) hata olarak verildi. [a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$) (DMRT)].

Çizelge 5. Çam yağının böbrek dokusunda ADEK vitaminler ile kolesterol düzeyine etkisi (µg/g).

	K	STZ-DM	STZ-DM+ÇY
Vitamin K ₂	14.01±0,04 ^a	6.21±0.01 ^c	7.07±0.04 ^b
δ-Tokoferol	0.28±0,08 ^c	0.61±0.01 ^a	0.46±0.01 ^b
Vitamin D ₂	0.19±0,01 ^c	0.22±0.01 ^b	0.30±0.01 ^a
Vitamin D ₃	0.19±0,01 ^c	0.28±0.01 ^b	0.47±0.01 ^a
α-Tokoferol	24.93±0,33 ^b	95.88± 0.33 ^a	94.60±0.71 ^a
Retinol	3.58±0,02 ^c	6.81±0.02 ^a	4.82±0.01 ^b
Vitamin K ₁	1.32±0,02 ^b	2.06±0.01 ^a	1.11±0.02 ^c
Kolesterol µmol/g	4.46±0,01 ^a	4.29±0.01 ^c	4.34±0.01 ^b

Sonuçlar ortalama±standart (n=10) hata olarak verildi. [a-c: aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$) (DMRT)].

izole ettikleri moleküllerin α -glukozidaz aktivitesini engellediğini (Kim vd. 2004) ve daha sonra izole edilen bu moleküllerin diyabet hastalarında postprandial kan glukoz düzeyini azalttığını rapor etmişler (Kim vd. 2005). Çam kabuğundan izole edilen piknogenolün oligomerik prosiyanidin, monomerik epikateşin ve kateşinden oluştuğu, prosiyanidinin α -glukozidaz aktivitesini inhibe edici özelliği olduğu, epikateşinin pankreasta bulunan beta hücre rejenerasyonuna neden olduğu, kateşinlerin ise bağırsakta glikoz emilimini inhibe ederek kan glukoz düzeyini azalttığı ifade edilmiştir (Parveen vd. 2010). Çam yağında α -glukozidaz aktivitesinin engelleyen aktif bileşiklerin bulunduğu, bu bileşiklerin yukarıda bahsedilen metabolik olaylar üzerindeki etkisi neticesinde kan glukoz düzeyinin azaldığını düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalar incelendiğinde çamın yapısında bulunan bazı aktif bileşiklerin kan glukoz düzeyini azaltma potansiyelleri olduğu belirlenmiştir (Liu vd. 2004, Maimoona vd. 2011).

Diyabette görülen kilo kayıpları diyabet hastalığının en klasik semptomlarından biridir. Vücut ağırlığına yapısal proteinlerin önemli katkısı bulunmaktadır, diyabette yapısal proteinlerinde meydana gelen bozulmalardan dolayı kilo kayıplarının ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Ramesh vd. 2007, Hakim vd. 1997). Yaptığımız çalışmada, diyabet grubunda kilo kayıpları olduğu halde çam yağı uyguladığımız grupta kilo artışının olduğunu belirledik. Elde ettiğimiz bu bulgunun daha önceki çalışma bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir (Maritim vd. 2003a). Çam yağının enerji metabolizması üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı bu grupta ağırlık artışının ortaya çıktığını öngörmekteyiz. Benzer çalışma verileri incelendiğinde uygulanan hipoglisemik ajanların glukoz metabolizması üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı diyabetik sıçanlarda kilo artışlarının olduğu saptanmıştır (Saini ve Sharma 2013, Parveen vd. 2010).

Lipit peroksidasyon (LPO) düzeyi, hücre membranlarında ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri ile membran hasarının önemli bir göstergelerinden biridir. Serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyon, diyabet dahil olmak üzere bazı dejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Ramachandran ve Saravanan 2013). Elde ettiğimiz verilere göre, diyabetik sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında MDA-TBA düzeyinin arttığını tespit ettik. MDA-TBA düzeyinin artması peroksidatif hasarın ve diyabete ait komplikasyonların ilerlemiş olduğunun en önemli göstergelerinden biridir (Saravanan ve Ponmurugan 2011). Çam yağı uyguladığımız sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında MDA-TBA düzeyinin önemli ölçüde azalarak kontrol grubu değerlerine yaklaştığını saptadık. Yukardaki sonuçlara göre çam yağının

içeriğinde bulunan çeşitli antioksidan etkili moleküllerin lipit peroksidasyondan bu dokuları koruduğunu öngörmekteyiz. Sıçanlarda karbon tetraklorüre bağlı olarak karaciğerde oluşturulan oksidatif hasar sonucunda MDA-TBA düzeyinin arttığı, çam kabuk ekstraktından izole edilen piknogenol uygulanması sonucunda MDA-TBA düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (Ahn vd. 2007). STZ'nin sıçanlarda neden olduğu oksidatif strese, piknogenolün antioksidan parametrelerde oluşan değişiklikleri normal değerlerine yaklaştırdığı ifade edilmiştir (Maritim vd. 2003a). Sisplatin uygulanmış sıçanların böbrek dokusunda MDA-TBA düzeyinde oluşan artışı piknogenolün azalttığı, ortaya çıkan bu azalmaya piknogenolün güçlü antioksidan özelliğinin neden olduğu ifade edilmiştir (Aydın et al. 2011). Farklı dokuların incelendiği birçok çalışmada çamda bulunan biyomoleküllerin MDA-TBA düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Parveen vd. 2010a, b, 2013, Scheff vd. 2013, Devaraj vd. 2002, Lee vd. 2012).

Glutatyon (GSH), tüm memeli hücrelerinde bulunan ve reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı en önemli hücre savunma elemanıdır. GSH enzimatik olmayan reaksiyonlarla doğrudan radikallerle reaksiyona girerek bu radikallerin elimine edilmesinde elektron verici olarak görev yapmaktadır (Dringen 2000). Dokuda GSH düzeyinin azalması, LPO miktarının artışıyla paralel olduğu ileri sürülmüştür (Maritim vd. 2003b). Elde ettiğimiz bulgularda, diyabet grubunun hem karaciğer hem de böbrek dokusunda GSH düzeyinin azaldığı, buna karşılık çam yağı uygulanan sıçanların böbrek ve karaciğer dokusunda GSH düzeyinin arttığını tespit ettik. Bu artışa çam yağının içeriğinde bulunan antioksidan moleküllerin etkisinin olduğunu öngörmekteyiz. Çünkü piknogenol fenolik bileşiklerden oluşmuştur ve fenolik bileşiklerin antioksidan potansiyele sahip oldukları ifade edilmiştir (Torel vd. 1986, Pietta 2000). Sisplatin uygulanmış sıçanların böbrek dokusunda GSH düzeyinin azaldığı, uygulanan piknogenol sonucunda GSH düzeyinin arttığı saptanmıştır (Aydın vd. 2011). Yüksek yağlı diyet ve STZ vererek Tip-2 diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer dokusunda GSH düzeyinin azaldığı, uygulanan piknogenol neticesinde GSH düzeyinin arttığı ifade edilmiştir (Parveen vd. 2010). Travmatik beyin yaralanması oluşturulmuş sıçanlarda piknogenolün GSH düzeyini arttırdığı, GSSG düzeyini azalttığı ve GSH/GSSG oranını arttırdığı ifade edilmiştir (Scheff vd. 2013). Diyabetik sıçanlara uyguladığımız çam yağının beyin dokusunda MDA-TBA ve GSH düzeyinde ortaya çıkan anormallikler üzerinde yararlı etkiler gösterdiğini belirledik (Demir vd. 2013).

α -tokoferol, E vitamininin tabiatla en bol bulunan ve en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan formudur

(Brigelius-Flohè ve Traber 1999). Elde ettiğimiz bulgulara göre, diyabet grubunda α -tokoferol düzeyinin arttığı, uygulanan çam yağı neticesinde karaciğer ve böbrek dokusunda α -tokoferol ve δ -tokoferol düzeyinde düşük düzeyde azalmaların olduğu tespit edilmiştir. α -tokoferol transfer proteini (α -TTP), plazma ve periferik dokulara alfa tokoferolün dağıtılması ile regülasyonundan sorumludur. Diyabetik kişilerin plazmaları ile kemirgenlerin plazma ve karaciğer dokusunda α -tokoferol düzeyinin arttığı rapor edilmiştir (Maritim vd. 2003b, Miyazaki vd. 2013). Hiperglisemi veya insülin direncinin α -TTP gen ekspresyonunu regüle etmesi sonucunda plazmada α -tokoferol düzeyinin arttığı ifade edilmiştir (Miyazaki vd. 2013). Elde ettiğimiz bu bulgunun daha önceki çalışma bulgularıyla paralel olduğu görülmektedir ve α -TTP aktivitesinde görülen artıştan dolayı karaciğer ve böbrek dokularında α -tokoferol düzeyinin arttığını düşünmekteyiz. Benzer sonuçlara daha önceki çalışmalarda da rastlanmaktadır (Hozumi vd. 1998, Arulselvan ve Subramanian 2007).

A vitamini (retinol) vücutta serbest radikallere karşı antioksidan aktivite göstermektedir. Serbest radikallerin diyabet dahil olmak üzere bir çok dejeneratif hastalığın patogenezinde rol oynadığı kabul edilmektedir (Cao vd. 2006). Elde ettiğimiz verilere göre diyabetik sıçanların karaciğer ve böbrek dokusunda A vitamini düzeyinin arttığı, uyguladığımız çam yağı neticesinde özellikle böbrek dokusunda A vitamini düzeyinin azaldığı bulunmuştur. STZ kullanılarak diyabet yapılan sıçanların plazmalarında A vitamini düzeyinin azaldığı, karaciğerde ise arttığı ifade edilmiştir. A vitamininin taşınmasından sorumlu retinol taşıyıcı protein (RBP) aktivitesinin azalmasından dolayı bu artışın ortaya çıktığı ileri sürülmüştür, fakat insülin uygulanması ile diyabette A vitamini metabolizmasında ortaya çıkan anormalliklerin normale döndüğü tespit edilmiştir (Basu ve Basualdo 1997). Yapılan bir çalışmada, STZ vererek diyabet oluşturulan sıçanların plazmalarında retinol düzeyinde önemli değişikliklerin olmadığı, fakat deney boyunca karaciğerde retinol düzeyinin sürekli arttığı belirlenmiştir (Tsin vd. 1993). Çam yağının içeriğinde bulunan biyomoleküllerin glukoz metabolizması üzerindeki olumlu etkilerine bağlı olarak böbrek dokusunda A vitamini düzeyi üzerinde olumlu sonuçların ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Benzer sonuçlara daha önceki çalışmalarda da rastlanmaktadır (Cemek vd. 2008).

Kolesterol hücre zarının en önemli bileşenlerinden biridir. Hücresel kolesterol dengesinin korunması hücrelerin normal fizyolojileri için oldukça önemlidir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, kontrol grubuna kıyasla

diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda total kolesterol düzeyinin arttığı, böbrek dokusunda ise azaldığı, uygulanan çam yağı sonucunda karaciğer dokusunda total kolesterol düzeyinin arttığı, böbrek dokusunda azalan total kolesterol düzeyinin artarak kontrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edildi. STZ vererek diyabet yapılan sıçanların bazı dokularında kolesterol düzeyinde oluşan değişikliklerin araştırıldığı bir çalışmada kontrol grubuna göre diyabetik sıçanların karaciğer ve böbrek dokusunda total kolesterol düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (Wang vd. 2012). Bir başka çalışmada ise diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda total kolesterol düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Lee 2005). Diyabette bozulmuş karbohidrat metabolizması ve artan lipoliz sonucunda asetil CoA birikimi ortaya çıkmaktadır. Artmış asetil CoA düzeyi kolesterol biyosentezinde artışa yol açarak, hiperlipidemiye neden olmaktadır. İnsülin, lipid metabolizmasının regülasyonunda önemli role sahip olan bir moleküldür. Diyabette hiperkolesterolemi, insülin eksikliği sonucu ortaya çıkan metabolik bozukluklar ile ilişkilidir (Raja vd. 2010). Özellikle böbrek dokusunda kolesterol düzeyinde görülen artışın çam yağının glukoz metabolizması üzerindeki olumlu yansımaları neticesinde ortaya çıktığını öngörmekteyiz. Elde ettiğimiz veriler neticesinde özellikle karaciğer dokusunda kolesterol düzeyinde ortaya çıkan artışın, insülin düzeyinde oluşan azalmadan dolayı ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Çünkü çamdan elde edilen piknogenolün diyabet oluşturulmuş sıçanlarda salgılanan insülin düzeyi üzerinde etkisinin sınırlı kaldığı belirlenmiş (Parveen vd. 2013), aynı zamanda çamdan elde edilen ve diyabet üzerinde etkisi incelenen gerek kabuk gerekse de yaprak ekstraktının insülin dışındaki mekanizmalar yolu ile kan glukoz düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir (Kim vd. 2004, Kim vd. 2005). Bitkisel ekstraktların kullanıldığı çalışmalarda bu ekstraktlar ile bu ekstraktlardan izole edilen çeşitli bileşiklerin kolesterol metabolizması üzerinde faydalı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerde bulunan çeşitli aktif bileşiklerin karbohidrat metabolizması üzerindeki etkileri neticesinde yararlı etkilerin ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Hahm vd. 2011, Harnafi vd. 2013, Parveen vd. 2013).

Diyabetik sıçanların beyin dokusunda ADEK vitaminler ile kolesterol parametrelerinde görülen değişiklikler üzerinde çam yağının yararlı etki gösterdiği belirlendi (Demir vd. 2013). Yine bazı sağlık sorunlarının tedavisinde çam yağının olumlu etkileri olduğu görülmektedir (Clark vd. 2013).

Elde ettiğimiz verileri incelediğimizde çam yağının antihiperglisemik aktiviteye sahip olduğu ve vücudun antioksidan mekanizmalarını destekleyerek oksidatif

hasara karşı koruyucu özellik gösterdiğini belirledik. Aynı zamanda ADEK vitaminler ile kolesterol düzeyine de önemli etkisinin olduğunu gördük.

5. Kaynaklar

- Ahn, TH., Yang, YS., Lee, JC., Moon, CJ., Kim, SH., Jun, W., Park, SC., Kim, JC. 2007. Ameliorative effects of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage in rats. *Phytother. Res.*, 21: 1015-1019.
- Arulselvan, P., Subramanian, S.P. 2007. Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic β -cells in experimental diabetes in rats. *Chemico-Biol. Interact.*, 165: 155-164.
- Aydin, B., Unsal, M., Sekeroglu, ZA., Gülbahar, Y. 2011. The antioxidant and antigenotoxic effects of Pycnogenol® on rats treated with cisplatin. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 142: 638-650.
- Basu, T.K., Basualdo, C. 1997. Vitamin A homeostasis and diabetes mellitus. *Nutrition*, 13(9): 804-806.
- Baydas, G., Canatan, H., Türkoglu, A. 2002. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J. Pineal Res.*, 32: 225-230.
- Baytop, T., 2001. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), 1st ed. Istanbul University, Istanbul, 178-249.
- Bragagnolo, N., Rodriguez-Amaya, DB. 2003. Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *J. Food Comp. Anal.*, 16: 147-153.
- Brigelius-Flohè, R., Traber, M.G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13: 1145-1155.
- Cao, U., Dc, E., In, U., Ac, N. 2006. Effect of glycaemic control on serum retinol and beta carotene levels in Type 2 diabetics in Calabar, Nigeria. *Mal. J. Nutr.*, 12(1): 55-65.
- Cemek, M., Kağa, S., Simşek, N., Büyükokuroğlu, M.E., Konuk, M. 2008. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Natural Med.*, 62(3): 284-293.
- Chandra, A., Mahdi, A.A., Ahmad, S., Singh, R.K. 2007. Indian herbs result in hypoglycemic responses in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.*, 27: 161-168.
- Clark, SP., Bollag, WB., Westlund, KN., Ma, F., Falls, G., Xie, D., Johnson, M., Isales, CM., Bhattacharyya, MH. 2013. Pine oil effects on chemical and thermal Injury in mice and cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Phytother. Res.*, DOI: 10.1002/ptr.4991.
- Dembinska-Kiec, A., Mykkänen, O., Kiec-Wilk, B., Mykkänen, H. 2008. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Brit. J. Nutr.*, 99, E-Suppl. 1: 109-117.
- Demir, E., Yılmaz, O., Ozsahin, A.D. 2013. The effect of some biochemical parameters in brain tissue of rats pine oil streptozotocin with experimental diabetes in rats. *Int. J. Diabet. Res.*, 2(3): 39-44.
- Devaraj, S., Vega-López, S., Kaul, N., Schönlau, F., Rohdewald, P., Jialal, I. 2002. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*, 37: 931-934.
- Dringen, R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progres. Neurobiol.*, 62: 649-671.
- Ejike, C.E., Awazie, S.O., Nwangozi, P.A., Godwin, C.D. 2013. Synergistic postprandial blood glucose modulatory properties of *Vernonia amygdalina* (Del.), *Gongronema latifolium* (Benth.) and *Occimum gratissimum* (Linn.) aqueous decoctions. *J. Ethnopharmacol.*, 149(1): 111-116.
- Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Hahm, S.W., Park, J., Son, Y.S. 2011. *Opuntia humifusa* stems lower blood glucose and cholesterol levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.*, 31: 479-487.
- Hakim, Z.S., Patel, B.K., Goyal, R.K. 1997. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 41: 353-360.
- Hara, A., Radin, NS. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochem.*, 90(1): 420-426.
- Harnafi, H., Ramchoun, M., Tits, M., Wauters, J.N., Frederich, M., Angenot, L., Aziz, M., Alem, C., Amrani, S. 2013. Phenolic acid-rich extract of sweet basil restores cholesterol and triglycerides metabolism in high fat diet-fed mice: A comparison with fenofibrate. *Biomed. Prevent. Nutr.* 3: 393-397.
- Hozumi, M., Murata, T., Morinobu, T., Manago, M., Kuno, T., Tokuda, M., Konishi, K., Mingci, Z., Tamai, H. 1998. Plasma beta-carotene, retinol, and alpha-tocopherol levels in relation to glycemic control of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Nutr.Sci.Vitaminol.* 44:1-9.
- Karthikesan, K., Pari, L., Menon, VP. 2010. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen. Physiol. Biophys.*, 29: 23-30.
- Katsanidis, E., Addis, PB. 1999. Novel HPLC analysis of tocopherols and cholesterol in tissue. *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 1137-1140.
- Kızılaslan, Ç. Sevgi, E., 2013. Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L. (Pinaceae) in Turkey. *Indian J. Trad. Know.*, 12: 209-220.
- Kim, YM., Jeong, YK., Wang, MH., Lee, WY., Rhee, HI. 2005. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21: 756-761.
- Kim, YM., Wang, MH., Rhee, HI. 2004. A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Res.*, 339: 715-717.
- Kowluru, R.A., Chan, P.S. 2007. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experiment. Diabet. Res.*, Volume 2007, Article ID 43603, doi:10.1155/2007/4360.

- Lee, IC., Kim, SH., Shin, IS., Moon, C., Park, SH., Kim, SH., Park, SC., Kim, HC., Kim, JC. 2012. Protective effects of pine bark extract on hexavalent chromium-induced dermatotoxicity in rats. *Phytother. Res.*, 26: 1534-1540.
- Lee, J.S. 2005. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.*, 25: 187-195.
- Liu, X., Wei, J., Tan, F., Zhou, S., Würthwein, G., Rohdewald, P. 2004. Antidiabetic effect of Pycnogenol® French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci.*, 75: 2505-2513.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265-275.
- Lushchak, VI. 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*, 2012: 736837.
- Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z., Jameel, K. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J. Ethnopharmacol.*, 133: 261-277.
- Maritim, A., Dene, BA., Sanders, RA., Watkins, JB. 3rd. 2003a. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17(3): 193-199.
- Maritim, AC., Sanders, RA., Watkins, JB. 3rd. 2003b. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17(1): 24-38.
- Miyazaki, H., Takitani, K., Koh, M., Takaya R., Yoden A. Tamai, H. 2013. α -tocopherol status and expression of α -tocopherol transfer protein in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 59: 64-68.
- Nicolle, E., Souard, F., Faure, P., Boumendjel, A. 2011. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure activity relationship. *Curr. Med. Chem.*, 18(17): 2661-2672.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95(2): 351-358.
- Parveen, K., Ishrat, T., Malik, S., Kausar, MA., Siddiqui, WA. 2013. Modulatory effects of Pycnogenol® in a rat model of insulin-dependent diabetes mellitus: biochemical, histological, and immunohistochemical evidences. *Protoplasma*, 250: 347-360.
- Parveen, K., Khan, MR., Mujeeb, M., Siddiqui, WA. 2010. Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chemico-Biol. Interact.*, 186: 219-227.
- Pietta, PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63(7): 1035-1042.
- Prasath, GS., Subramanian, SP. 2013. Fisetin, a tetra hydroxy flavone recuperates antioxidant status and protects hepatocellular ultrastructure from hyperglycemia mediated oxidative stress in streptozotocin induced experimental diabetes in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 59: 249-255.
- Raja, AB., Elanchezhiyan, C., Sethupathy, S. 2010. Antihyperlipidemic activity of *Helicteres isora* fruit extract on streptozotocin induced diabetic male wistar rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 14: 191-196.
- Ramachandran, V., Saravanan, R. 2013. Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Funct. Food.*, 5: 1077-1087.
- Ramesh, B., Viswanathan, P., Pugalendi, K.V. 2007. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 566: 231-239.
- Saini, S., Sharma, S. 2013. Antidiabetic effect of *Helianthus annuus* L., seeds ethanolic extract in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5(2): 382-387.
- Saravanan, G., Ponnurugan, P. 2011. Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interact.*, 189: 100-106.
- Scheff, SW., Ansari, MA., Roberts, KN. 2013. Neuroprotective effect of Pycnogenol® following traumatic brain injury. *Experiment. Neurol.*, 239: 183-191.
- Torel, J., Cillard, J., Cillard, P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25(2): 383-385.
- Tsin, ATC., Griffin, BW., Mata, NL., Yu, HS., Williams, GW., Crider, JY., Chandler, ML. 1993. Vitamin A homeostasis in the diabetic rat. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 15: 23-31.
- Tuzlacı, E., Erol, MK. 1999. Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğridir (Isparta). *Fitoterapia*, 70: 593-610.
- Wang, XT., Li, J., Liu, L., Hu, N., Jin, S., Liu, C., Mei, D., Liu, XD. 2012. Tissue cholesterol content alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, 33: 909-917.
- Wolffenbittel, BHR., Graal, M.B. 1996. New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. *Postgrad. Med. J.*, 72: 657-662.
- Yesil-Celiktas, O., Ganzera, M., Akgun, İ., Sevimli, C., Korkmaz, KS., Bedir, E. 2009. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different Pinus species. *J. Sci. Food Agric.*, 89: 1339-1345.