



VACCINIUM MYRTILLUS'UN DENEYSEL DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE ANTIOKSİDAN SİSTEM VE LİPİT PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

The Effects of *Vaccinium Myrtillus* on Antioxidant System and Lipid Peroxidation in Experimental Diabetic Rats Model

Hasan Basri Savaş¹, Asuman Türkan², Berire Yavuz², Ayşe Yiğit³, Efkan Uz³, Nezihe Aslı Bayram⁴, Banu Kale⁵

¹SDU Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, Isparta, Türkiye

²SDU Üniversitesi tıp fakültesi, Isparta, Türkiye

³SDÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D., Isparta, Türkiye

⁴SDÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D., Isparta, Turkey

⁵SDÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D., Isparta, Türkiye

Özet

Amaç: Yaban mersini olarak bilinen ve halk arasında diyabet başta olmak üzere birçok hastalıkta tedavi edici olarak kullanılan *Vaccinium myrtillus*, Türkiye'de yaygın bir yetiştirme alanına sahiptir. Bu çalışmada, *Vaccinium myrtillus*'un, streptozotocin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, lipit peroksidasyonu, antioksidan sistem ve plazma glikoz düzeyi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod: 32 adet Sprague-Dawley yetişkin erkek sıçan, her grupta 8'er adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Gruplar: Kontrol (K), streptozotocin (STZ), *Vaccinium myrtillus* (VM), ve *Vaccinium myrtillus* + streptozotocin (VM + STZ) verilecek şekilde belirlendi. STZ sitratlı tampon (0,1 M, pH 4,5) içerisinde 55 mg/kg olacak şekilde hazırlandıktan sonra sıçanlara tek doz ve intraperitoneal uygulandı. Hazırlanan ekstre hayvanlara gruplarına göre 10 gün boyunca her gün gavaj olarak verildi (100 mg/kg). 11. gün hayvan gruplarına göre streptozotocin ile diyabet oluşturuldu (55 mg/kg). Kuyruktan alınan kan ile glikoz ölçüldü. Antioksidan bir enzim olan katalaz, Aebi'nin metodu kullanılarak; lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, Draper ve Hadley'in spektrofotometrik metoduyla; protein tayini ise doku homojenatlarından oluşan ekstratların süpernatantlarının Lowry'nin yöntemine göre belirlenmesiyle hesaplandı. Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilip, p<0,05 değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar: STZ ile diyabet yapılmadan önce VM verilen grupta karaciğer CAT değerlerinde anlamlı bir artış saptandı. Karaciğer MDA değeri incelendiğinde STZ ile VM arasında ve STZ ile K arasında anlamlı farklılık gözlemlendi. Böbrek MDA değerinde, STZ ile VM karşılaştırıldığında STZ grubunda MDA değeri yüksek bulundu (p <0,05).

Tartışma: Sıçanlarda diyabet oluşturulmasıyla oksidatif stres artmaktadır. Diyabetik sıçanlara *Vaccinium myrtillus* verilmesi oksidatif stresi azaltmakta ve bu durum sıçanın genel durumunu iyileştirmektedir. *Vaccinium myrtillus*'un antidiyabetik ve antioksidan etkilerinin daha net belirlenmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Vaccinium myrtillus*, Diyabetes Mellitus, MDA, CAT, Antioksidan.

Abstract

Aim: *Vaccinium myrtillus* (VM) is popularly known as blueberries used as a therapeutic in many diseases, especially diabetes. VM has an extensive habitat in Turkey and America. In this study, we aimed to investigate the effect of *Vaccinium myrtillus* on lipid peroxidation, antioxidant system and plasma glucose levels in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats.

Materials and Methods: 32 adult male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups, including 8 rats in each group. Groups were determined as control (C), streptozotocin (STZ), *Vaccinium myrtillus* (VM) and *Vaccinium myrtillus* + streptozotocin (STZ+VM). After preparation of STZ contains citrate buffer (0.1 M, pH 4.5), containing 55 mg/kg, it was applied to the rats as intraperitoneal and single dose. Extracts were given as oral gavage according to the group of animals every day during 10 days (100mg / kg). On day 11, diabetes were introduced by streptozotocin (55mg / kg) according to animal groups. Blood glucose was measured from the queue. The catalase that is an antioxidant enzyme, activity was measured, by the Aebi method. Lipid peroxidation product that malondialdehyde (MDA) content was studied by spectrophotometric method according to Draper and Hadley method. The determination of supernatant of the resulting protein extracts of tissue homogenates was made by determining by the Lowry method. The results are evaluated by ANOVA, p<0.05 were considered significant.

Results: There was a significant increase in liver CAT values in VM group (p <0.05). When the liver MDA levels were examined, there were significant differences between STZ and VM, STZ and C. When the kidney MDA levels were compared, MDA levels in STZ group were significantly higher than VM (p <0.05).

Conclusion: The oxidative stress increase in rats by creation of diabetes. The applying of *Vaccinium myrtillus* to the diabetic rats reduces oxidative stress and this improves the general state of the rats. More studies are needed to determine more clearly the antidiabetic and antioxidant effects of *Vaccinium myrtillus*.

Keywords: *Vaccinium myrtillus*, Diabetes Mellitus, MDA, CAT antioxidant.

GİRİŞ

Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*), fenolik pigmentler ve antosiyanidinler bakımından

zengin bir bitkidir. Antosiyanidinler ve diğer fenolik bileşenler organizmada antioksidan aktivite göstermektedirler¹⁻⁵. Antioksidanlar,

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

SDU Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, Isparta, Türkiye
Email: drhbs63@gmail.com

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 12.01.2015
Date Accepted / Kabul Tarihi: 20.06.2016
Int J Basic Clin Med 2016; 4(2): 53-9

lipit peroksidasyon ürünü olan ve organizma için oldukça zararlı maddelerin hasar verici etkilerini azaltmaktadırlar⁶. Doğal fenolik antioksidanların diyetle alınmasının, kalp hastalıklarını ve kanseri önlediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{7,8}. İn vitro yapılan bir çalışmada barsak epitel hücrelerinde de yenilenmeyi artırdığı bulunmuştur⁹. Yirmi kişilik pediatrik grupta yapılan çalışmada kemoterapi sonrası oluşan gastrointestinal problemler üzerinde kullanılan *Vaccinium myrtillus* ekstresinin olumlu yönde etkisi olduğuna dair sonuçlar bulunmuştur¹⁰.

Vaccinium myrtillus, yüksek antioksidan aktivite göstermekte ve bu aktivite, içinde bulunan antosiyanidin ve fenolik grupların miktarına bağlı olduğu düşünülmektedir^{11,12,13}.

Vaccinium myrtillus ile yapılan bir çalışmada STZ ile diyabet yapılmış sıçanlarda *vaccinium myrtillus*'un kan glikozunu düşürdüğü gözlenmiştir¹⁴. *Vaccinium myrtillus*'un içinde bulunan antosiyanin ve polifenol'ün insülin sekresyonunu artırıcı, insülin direncini azaltıcı, beta hücre rejenerasyonunu artırıcı etkisi olduğu bilinmektedir¹⁵. Alloksan ile diyabet oluşturulmuş sıçanlara 4 hafta *Vaccinium myrtillus* verilmiş, 2. ve 4. hafta kan glikoz ve insülin düzeylerine bakılmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, *Vaccinium myrtillus*'un glikoz düzeyi üzerine anlamlı bir düşüşe ve insülin düzeyinde artışa sebep olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada yapılan histolojik incelemede ise *Vaccinium myrtillus* verilen grupta adacık hücrelerinde önemli bir artış saptanmıştır¹⁶. Diyet ve yaşam tarzı değişikliği ile kontrol edilen tip 2 diyabetli gönüllülerle yapılan bir çalışmada, karbonhidrat emilimini ve böylece postprandiyal glisemiye etkileyen fenofenolden

zengin *Vaccinium myrtillus*, standardize edilmiş ekstratlar halinde hazırlanarak verilmiş ve glikoz metabolizması ve antioksidan sistem üzerine akut etkileri araştırılmıştır. *Vaccinium myrtillus*'un postprandiyal glikoz ve insülini azalttığı gözlenmiş, antioksidan metabolizma üzerine bir etki görülmemiştir¹⁷. Biyokimyasal düzeyde yapılan başka bir çalışmada, diyabetik sıçanlarda, *Vaccinium myrtillus*'un AMP-activated protein kinaz aracılığıyla kan glikozunu düşürdüğü ve insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir¹⁸. Yapılan bazı çalışmalarda ise *Vaccinium myrtillus*'un antiglisemik etki gösterdiğine yönelik bir sonuç bulunmamıştır. 5 hafta boyunca diyabetik sıçanlara verilen *Vaccinium myrtillus*, kan şekerinde anlamlı bir düşüşe sebep olmamıştır¹⁹.

Diyabet, insülin salgısı yokluğuna veya dokuların insüline duyarlılığında azalmaya bağlı karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozulmasıyla gelişen bir durumdur. Diyabetiklerde açlık kan şekeri, plazma LDL (Düşük Dansiteli Lipoprotein), serbest yağ asidi değerleri belirgin şekilde artmaktadır²⁰. Diyabet patofizyolojisi ile oksidatif stres ve oksidatif hasar arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir²¹. Ayrıca uzun dönemde diyabet komplikasyonları ile oksidatif stres arasında bağlantılı olduğuna dair çalışma yapılmıştır²².

Günümüzde diyabetten korunma ve tedavide alternatif tıp ve tedavi araştırmaları yoğunluk kazanmıştır²³. Halk arasında hem yaşlılarda hem de gençlerde diyabet tedavisinde *Vaccinium myrtillus* yaygın kullanılmaktadır. Bu çalışmada, başta diyabet olmak üzere birçok hastalığı tedavi edici özelliği olduğuna inanılan ve bu amaçla yaygın

bir biçimde kullanılan *Vaccinium myrtillus*'un sıçanlarda profilaktik olarak antioksidan sistem ve plazma glikoz düzeyleri üzerine etkilerini araştırmak amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Hayvan materyali

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınan izinle yapılan araştırma, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütüldü.

32 Sprague-Dawley yetişkin erkek sıçan, 8 sıçanlık dört gruba sırasıyla şöyle bölündü: Kontrol (K), streptozotocin (STZ), *Vaccinium myrtillus* (VM), ve *Vaccinium myrtillus*+streptozotocin (VM + STZ).

Vaccinium myrtillus hazırlanması

Nisan ve Mayıs aylarında Antalya Serik ilçesinden toplanan *Vaccinium myrtillus*, yaprakları ayrılarak 45 °C de 5-6 saat kurutulmuştur. Blenderde küçük parçalara ayrılarak bitki özütü hazırlanmıştır. Kuru ve öğütülmüş bitki yaprakları 1/5 oranında %95'lik etanolle karıştırılmıştır. Karışım 40C de 24 saat bekletildikten sonra önce kaba filtre daha sonra 0.45µm'lik membran filtreden süzülerek, çözüldükten etanol uzaklaştırıldıktan sonra -20 °C'de kullanılmaya kadar muhafaza edilmiştir.

DeneySEL diyabet oluşumu

STZ sitratlı tampon (0,1 M, pH 4,5) içerisinde 55 mg/kg olacak şekilde hazırlandıktan sonra sıçanlara tek doz ve intraperitoneal uygulandı²⁰. Hazırlanan ekstre hayvanlara gruplarına göre 10 gün boyunca her gün oral

gavaj olarak verildi (100mg/kg). 11. gün hayvan gruplarına göre streptozotocin ile diyabet oluşturuldu (55mg/kg). Kuyruk ucundan glukometre striplerine alınan kan ile plazma glikoz düzeyi ölçüldü ve diyabet oluşumu gösterildi. Kan glikoz düzeyinin 250 mg/dl geçmesi durumunda diyabet oluşumu kabul edildi. STZ verildikten sonra her gün kan şekeri düzeyleri takip edildi. 2 haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek, karaciğer ve böbrek dokuları çıkartılıp antioksidan parametreler incelendi.

Biyokimyasal ölçümler

Dokularının homojenizasyonunda pH 7,4 olan 0,05 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. Alınan doku örnekleri hassas terazi ile tartılarak yağ ağırlıkları kaydedildi. Eppendorf tüplerinin içine yerleştirilerek biyokimyasal çalışmalar yapılabileceği kadar -80 °C'de saklandı.

Homojenizasyon işlemi başlangıcında karaciğer ve böbrek dokularının yağ ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe konup dokuların üzerine 2 ml soğuk Tris-HCl tamponu eklendi. Plastik kaplar içine buz doldurulup cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Homojenatlar soğukluğu korunarak eppendorf tüplere konuldu. Elde edilen homojenatlardan;MDA, protein miktar tayini yapıldı. Homojenatlar;soğutmalı santrifüjde, +4 °C'de 5000 devir/dk hızında 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan;CAT enzim aktiviteleri ile protein miktar tayini yapıldı. Doku

homojenatları, süpernatantları ve ekstratları yedeklenerek -80 °C'de saklandı.

Protein Tayini

Homojenize edilen karaciğer ve böbrek dokularının homojenatlarında, süpernatantlarında ve ekstratlarında protein tayini Lowry²⁵ yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu metoda göre;alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Buradaki rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

MDA Tayini

Malondialdehid (MDA) lipid peroksidasyon ürünüdür. MDA miktarı Draper ve Hadley'in²⁶ metoduna göre spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. Bu yöntemde, MDA ile tiobarbitürik asit (TBA) reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirilmektedir.

CAT Aktivite Tayini

Katalaz aktivitesi Aebi'nin²⁷ metoduna göre çalışıldı. Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorban verir. Deney ortamına eklenen H₂O₂, katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorban azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantı göstermektedir.

Verilerin analizi

Verilerin analizinde, SPSS 21.0 paket programı kullanıldı. Veriler Levene homojenite testine tabi tutuldu. Verilerin homojenliği, denek sayısı ve parametrik dağılım göz önüne alınarak,

Anova test ve posthoc Bonferroni, Tukey, Duncan testlerle gruplar arası farklılıklar değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi olarak <0,05 sınır kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak verildi.

BULGULAR:

TABLO 1:Gruplara göre doku MDA-CAT ve serum glikoz seviyeleri: (ortalama±standart hata (SEM))

	K	STZ	VM	VM+STZ
Karaciğer MDA	0,15±0,01	0,27±0,04	0,15±0,03	0,20±0,01
Karaciğer CAT	2,32±0,06	1,55±0,11	2,99±0,11	1,74±0,07
Böbrek MDA	0,32±0,01	0,39±0,01	0,32±0,01	0,34±0,02
Böbrek CAT	0,74±0,02	0,52±0,02	1,26±0,06	0,84±0,45
STZ Sonrası Glikoz	192,75±16,28	431,38±20,06	193,75±3,58	364,38±37,73

Karaciğer MDA değeri incelendiğinde STZ ile VM arasında ve STZ ile K arasında, STZ grubunda yüksek olmak üzere anlamlı farklılık gözlenmiştir (sırasıyla;p=0,019 ve p=0,021)

Böbrek MDA değerinde, STZ ile VM karşılaştırıldığında STZ grubunda MDA değeri yüksek bulunmuştur (p=0,047).

Karaciğer CAT düzeyine baktığımız zaman, K ile VM karşılaştırıldığında VM de CAT düzeyinin yüksek olduğu (p=0.00), K ile STZ karşılaştırıldığında K düzeyinin yüksek olduğu (p=0,00), K ile VM+STZ karşılaştırıldığında K düzeyinin yüksek olduğu (p=0,003) görülmüştür. VM ile STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu (p=0,00), VM ile VM+STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu (p=0,00) bulunmuştur. STZ ile STZ+VM arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,775)

Böbrek CAT değerinde ise, K ile VM karşılaştırıldığında VM'de CAT düzeyinin yüksek olduğu ($p=0.00$), K ile STZ karşılaştırıldığında K grubunda düzeyin yüksek olduğu ($p=0,031$) görülmüştür. VM ile STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu ($p=0,00$), VM ile VM+STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu ($p=0,00$) bulunmuştur. STZ ile VM+STZ karşılaştırıldığında, STZ+VM de CAT değerinin yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Glikoz düzeylerini incelediğimizde, K ile STZ karşılaştırıldığında STZ düzeyinin yüksek olduğu ($p=0,00$), K ile STZ+VM karşılaştırıldığında, STZ+VM de daha yüksek olduğu görülmüştür. VM ile STZ karşılaştırıldığında STZ de glikoz değerinin daha yüksek olduğu ($p=0,00$), VM ile VM+STZ karşılaştırıldığında VM+STZ de glikoz değerinin daha yüksek olduğu ($p=0,00$) bulunmuştur.

TARTIŞMA:

Oksidatif hasar, organizmada meydana gelen fizyolojik veya patolojik süreçler içerisinde ortaya çıkan serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki dengenin, serbest radikaller lehine bozulması durumunda oluşan bir durumdur. Organizma ise enzimatik ve nonenzimatik yollarla bu hasardan kendisini korumaya çalışmaktadır²⁷.

Diyabet, glisemik kontrol bozukluğu ile giden ve kliniğin oluşmasında antioksidan metabolizma bozukluğunun da rol aldığı bir hastalıktır. *Vaccinium myrtillus* ile birçok çalışma yapılmış ve organizmada antioksidan sistem ve diyabet üzerine etkileri araştırılmıştır. STZ ile diyabet yapılmış sıçanlarla yapılan bir

çalışmada *Vaccinium myrtillus*'un kan glikozunu düşürdüğü gözlenmiştir¹⁴. Bozulmuş plazma glikozu olan 106 kişi ile yapılan bir araştırmada, *Vaccinium myrtillus*'un glisemik kontrolü düzeltici etkisinin olduğu ve tip 2 diyabet için riskli kişilerde kullanımının faydalı olabileceği gösterilmiştir²⁸.

Biyokimyasal düzeyde yapmış olduğumuz araştırmada, sıçanların karaciğer ve böbrek dokularındaki antioksidan aktiviteyi ve lipit peroksidasyonunu inceledik. Bu aktiviteyi antioksidan bir enzim olan katalaz düzeyleri üzerinden, lipit peroksidasyonunu ise MDA üzerinden hesaplamak amaçlandı.

Karaciğer MDA değeri incelendiğinde STZ ile VM arasında ve STZ ile K arasında, STZ grubunda yüksek olmak üzere anlamlı farklılık gözlenmiştir. Böbrek MDA değerinde, STZ ile VM karşılaştırıldığında STZ grubunda MDA değeri yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, *Vaccinium myrtillus*'un lipit peroksidasyonunu azaltıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Böbrek CAT değerinde ise, K ile VM karşılaştırıldığında VM de CAT düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür. VM ile STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu, VM ile VM+STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. STZ ile VM+STZ karşılaştırıldığında, STZ+VM de CAT değerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Karaciğer CAT düzeyine baktığımız zaman, K ile VM karşılaştırıldığında VM de CAT düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür. VM ile STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu, VM ile VM+STZ karşılaştırıldığında VM'de CAT değerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Katalazın VM gruplarında yüksek olması, *Vaccinium*

myrtillus'un oksidatif stresi azaltıcı yönde etki gösterebileceğini düşündürmektedir. STZ ile STZ+VM arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

STZ ile STZ+VM verilen grup kan şekeri karşılaştırıldığında, STZ+VM'de kan şekeri düzeyi daha düşük çıksa da sonuç anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, diyetle vermiş olduğumuz *Vaccinium myrtillus*, sıçanlarda antioksidan enzim olan CAT düzeyinde yükselmeye ve plazma glikoz düzeyinde azalmaya sebep olmaktadır. Oksidatif stresin azaltılmasının diyabette kliniğin düzelmesi ve genel durumun iyileşmesi yönünde olumlu katkılar sağlanacağını göz önünde bulundurursak, *Vaccinium myrtillus*'un diyabet hastalarında kliniği iyileştirme yönünde faydası olabilecektir. Denek sayısının artırılması, klinik çalışmalar yapılması, doz ve sürenin kademeli artırılarak deneylerin tekrarlanması sonucunda daha geniş verilere ve sonuçlara ulaşmak mümkün olabilecektir. *Vaccinium myrtillus*'un bu etkilerini daha iyi saptayabilmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

NOT: 1. Bu çalışma daha önce;2015 yılında İstanbul'da düzenlenen 'The XXIV ISMS (International Symposium on Morphological Sciences)'da poster olarak sunulmuştur. Kongrenin bildiri özetleri '*Anatomy*' dergisinin 2015 kongre özel sayısında 'abstract' olarak yayınlanmıştır. 2. Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Moyer RA, Hummer KM, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. J Agric Food Chem 2002;50(3):519-25.

2. Liu M, Li XQ, Weber C, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J Agric Food Chem 2002;50(10):2926-30.
3. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. J Agric Food Chem. 2002;50(8):2432-38.
4. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. J Agric Food Chem 2002;50(12):3495-500.
5. Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. J Agric Food Chem 2002;50(4):850-7.
6. R-Tortosa CR, Andersen OM, Gardner PT, et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. Free Radical Biol Med 2001;31(9):1033-7.
7. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. Proc, Natl, Acad, Sci USA 1993;90:7915-22.
8. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science. 1983;22(3):1256-63.
9. Kšonžeková P, Mariychuk R, Eliašová A, et al. In vitro study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells. J Sci Food Agric 2015;96(4):1093-100.
10. Bertoglio JC, Bertolio JC, Folatre I, et al. Management of gastrointestinal mucositis due to cancer therapies in pediatric patients: results of a case series with SAMITAL(®) Future Oncol 2012;8(11):1481-6.
11. Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. J Agric Food Chem 1998;46(10):4107-12.
12. Connor AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. J Agric Food Chem 2002;50(4):893-8.
13. Pior RL, Cao G, Martin A, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. J Agric Food Chem 1998;46(7):2686-93.
14. Cignarella A, Nastasi M, Cavalli E, Puglisi L. Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate. Thromb Res 1996;84(5):311-22.
15. Koupý D, Kotolová H, Kučerová J. Effectiveness of phytotherapy in supportive treatment of type 2

- diabetes mellitus Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Ceska Slov Farm 2015;64:(1-2):3-6.
16. Asgary S, Rafeian Kopaei M, Sahebkar A, Shamsi F, Goli-Malekabadi N. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of *Vaccinium myrtillus* fruit in experimentally induced diabetes (antidiabetic effect of *Vaccinium myrtillus* fruit). *J Sci Food Agric* 2015;96(3):764–8.
 17. Hoggard N, Cruickshank M, Moar KM, et al. A single supplement of a standardised bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract (36 % wet weight anthocyanins) modifies glycaemic response in individuals with type 2 diabetes controlled by diet and lifestyle. *J Nutr Sci* 2013;24(2):1-9.
 18. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr* 2010;140(3):527-33.
 19. Ștefănuț MN, Căta A, Pop R, et al. Anti-hyperglycemic effect of bilberry, blackberry and mulberry ultrasonic extracts on diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2013;68(4):378-84.
 20. Thomas E. Andreoli:- 4th ed. Cecil Essential of Medicine. 1997. Pp:822-69.
 21. Helmstädter A, Schuster N. *Vaccinium myrtillus* as an antidiabetic medicinal plant--research through the ages. *Pharmazie*. 2010;65(5):315-21.
 22. Deliorman D, Ergun F, Şener B. Viskotoksinler, *FABAD J Pharm Sci* 1995;20(4):149-56.
 23. Kuppasamy UR, Indran M, Rokiah P. Glycaemic control in relation to xanthine oxidase and antioxidant indices in Malaysian Type 2 diabetes patients. *Diabet Med* 2005;22(10):1343-6.
 24. Cderiello A, Quatraro A, Giu gliano D. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet Med* 1992;9(3):297-9.
 25. Lowry OH, rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
 26. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-432.
 27. Aebi H. Catalase In:Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London Academic Press, 1974;pp.673-7.
- Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, et al. Whole grain products, fish and bilberries alter glucose and lipid metabolism in a randomized, controlled trial:the Sysdimet study. *PLoS One* 2011;6(8):e22646.