



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2019; 33 (1): 01 - 09
http://www.fusabil.org

Cemal ORHAN ^{1, a}
Mehmet TUZCU ^{2, b}
Hafize TELÇEKEN ^{2, c}
Nurhan ŞAHİN ^{1, d}
James Richard KOMOROWSKI ^{3, e}
Kazım ŞAHİN ^{1, f}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Hayvan Besleme ve
Beslenme Hastalıkları
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü Moleküler
Biyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³ AR-GE Bölüm Başkanı
Nutrition 21, LLC, Purchase,
NY, ABD

^a ORCID: 0000-0003-4138-7689

^b ORCID: 0000-0002-1329-3143

^c ORCID: 0000-0003-1267-5307

^d ORCID: 0000-0001-9487-1154

^e ORCID: 0000-0003-2399-838X

^f ORCID: 0000-0001-9542-5244

Geliş Tarihi : 21.12.2018

Kabul Tarihi : 11.02.2019

Yazışma Adresi Correspondence

Kazım ŞAHİN
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Hayvan Besleme ve
Beslenme Hastalıkları
Anabilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

ksahin@firat.edu.tr

Yüksek Yağlı Diyet ile Beslenen Sıçanlarda Krom Histidinatın Farklı İzomerlerinin Pankreas GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R Üzerine Etkileri

Krom (Cr), insülin aktivitesi için esansiyel bir iz elementtir, insülin reseptörüne bağlanır, karbonhidrat ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi de dahil olmak üzere birçok fonksiyonu ve belki de tüm fonksiyonlarında insülinin etkisini güçlendirir. Bu çalışmanın amacı, yüksek yağlı diyet (YYD) ile beslenen sıçanlarda, krom histidinatın (CrHis) üç farklı izomerinin, pankreas glikoz taşıyıcı protein 2 (GLUT-2), insülin reseptör substrat (IRS-1) ve glukagon benzeri peptid 1 reseptör (GLP-1R) protein düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışmada, 42 adet Sprague-Dawley ırkı sıçan rastgele altı gruba (n=7) ayrıldı. Sıçanlar 1: standart diyet ile beslenen (Kontrol); 2: YYD ile beslenen; 3: YYD ile CrHis saflaştırılmış izomer 1 (CrHis1); 4: YYD ile CrHis ile saflaştırılmış izomer 2 (CrHis2); 5: CrHis ile saflaştırılmış izomer 3 (CrHis3); 6: YYD ile üç izomer CrHis (CrHisM) karışımı ile beslenen şeklinde gruplandırıldı. CrHis izomerleri farklı kaynaklardan sağlanmasına karşın sıçanlara aynı miktarda Cr (10 µg elementel Cr/kg CA/gün) verildi. Sıçanlar, insülin direncini indüklemek için yüksek yağlı bir diyetle beslendi. CrHis izomerlerinin uygulanması, YYD ile artan pankreas insülin düzeylerini iyileştirdi. CrHis izomer gruplarındaki insülin seviyeleri YYD grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu (P<0.001). Pankreas GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R protein düzeyleri YYD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0.001). Ayrıca CrHis1 grubunda GLUT-2 ve GLP-1R protein düzeyi CrHis3 grubundan daha yüksek bulunurken (P<0.001), diğer izomerler arasında fark tespit edilmedi (P>0.05). Sonuç olarak, YYD ile oluşabilen insülin direncine karşı, CrHis izomerleri veya bunların karışımının pankreas dokusunda insülin direncine karşı koruyucu bir etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Krom histidinat, yüksek yağlı diyet, GLUT-2, IRS-1, GLP-1R

The Effects of Different Isomers of the Chromium Histidinate on Pancreas GLUT-2, GLP-1R and IRS-1 in Rats Fed High-Fat Diet

Chromium (Cr) is an essential trace element for optimal insulin activity. It binds to the insulin receptor and potentiates many, and perhaps all, of its functions including the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. The objective of this study was to investigate the effects of novel purified isomers of chromium histidinate (CrHis) on protein levels of pancreatic glucose transporter protein 2 (GLUT-2), insulin receptor substrate (IRS-1) and glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R). Forty-two Sprague-Dawley rats allocated to six groups (n=7). The rats were fed either 1: a standard diet (Control) or 2: a high-fat diet (HFD) or 3: a HFD with CrHis purified isomer 1 (CrHis1) or 4: a HFD with CrHis purified isomer 2 (CrHis2) or 5: a HFD with CrHis purified isomer 3 (CrHis3) or 6: a HFD with a mixture of three isomers of CrHis (CrHisM). Rats were fed the same amount of Cr (10 µg elemental Cr/kg BW/day), but from different sources of CrHis isomers. Rats fed a high-fat diet to induce insulin resistance. The administration of CrHis isomers showed an improvement in the HFD-enhanced pancreatic insulin levels. The insulin levels in the CrHis isomer groups were measured significantly lower than the HFD group (P<0.001). Pancreatic GLUT-2, IRS-1 and GLP-1R protein levels were markedly higher than those of the HFD group (P<0.001). Additionally, GLUT-2 and GLP-1R protein levels were higher in the CrHis1 group than the CrHis3 group (P<0.001), while no difference was found between the other isomers (P>0.05). As a result, it is thought that CrHis isomers or their mixture may exhibit a protective effect against HFD-induced insulin resistance in pancreatic tissue.

Key Words: Chromium histidinate, high-fat diet, GLUT-2, IRS-1, GLP-1R

Giriş

Dünya genelinde yaşam standartları ve yaşam tarzının değişmesi, yüksek kalorili beslenme, yetersiz fiziksel aktivite; obezite, diyabet, metabolik sendrom, insülin direnci, hipertansiyon ve hatta bazı kanser türleri gibi birçok sorunla ilişkilendirilmektedir (1-3). Uluslararası diyabet federasyonu (IDF) 2017 yılı istatistiklerine göre; dünya genelinde 425 milyon diyabetli bulunmaktadır ve durum 2045 yılına kadar %48 oranında bir artışla 629 milyona ulaşması ön görülmektedir (1). Hızla artan bu durum ile ilgili olan insülin direncine karşı yeni stratejilerin araştırılmasında sıklıkla rodentler kullanılabilir (3-5). Rodentlerde insülin direncini indüklemek için yüksek yağlı diyetler (YYD) kullanılabilir (5-7).

Başlıca kan glikoz düzeyinin düzenlenmesinde görev alan, karbonhidrat ve lipid metabolizmasını etkileyen insülin hormonu, pankreasın β -hücrelerinden salgılanmaktadır (6, 8). İnsülin hormonu, etkisini ilgili hücrelerde bulunan insülin reseptörleri (IR) aracılığı ile gerçekleştirmektedir. İnsülin ile reseptör ilişkisi hücresel düzeyde yanıt oluşturarak birçok yolağı uyarabilmektedir (6, 8). İnsülin, glikoz taşıyıcı proteinler (GLUT) aracılığı ile hücrelere enerji kaynağı olan glikozu transfer edebilmektedir. GLUT-2, pankreatik β -hücrelerinde, bağırsak ve böbrek epitel hücreleri ve hepatositlerde yüksek oranlarda ekspresyona sahiptir (9, 10). GLUT'lar, tüm fizyolojik veya diyabetle ilişkili glisemik seviyelerde hücre dışı boşluk ve hücre sitozol arasındaki glikozun hızlı dengelenmesini sağlar. Kan glikoz konsantrasyonlarındaki artış pankreatik β -hücrelerinde insülin sekresyonunu tetikler ve hepatositlerde glikoz, glikolitik ve lipojenik genlerin ekspresyonunu uyarır. GLUT-2'nin eksikliği, pankreas β -hücreleri ve hepatositlerde glikoz duyarlı gen ekspresyonunun regülasyonu yoluyla glikoz ile uyarılan insülin sekresyonunu önler (10).

Hücrelerin insülin cevabının azalması, insülin direnci olarak tanımlanmaktadır (11). İnsülin direnci, serbest yağ asitlerinin (SYA) aşırı düzeyleri, azalmış insülin reseptörü veya insülin reseptörü substratları (IRS) ekspresyonu ile bozulmuş glikoz kullanımı şeklinde oluşurken, hiperglisemi ve hiperinsülinemiye neden olmaktadır (4, 6, 12). İnsülin direnci, obezite ve diyabet gibi birçok problem ile karşımıza çıkabilmektedir (4, 11). İnsülin cevabının azalması enerji metabolizmasını bozmakta ve çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır (11).

İnsülin reseptörü, intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre yüzey reseptör ailesinin bir üyesidir. IR, birbirine disülfid köprüleriyle bağlanmış iki ekstraselüler α -arabirim ve iki transmembran β -arabirimden oluşmaktadır. İnsülin α -arabirimine bağlanarak β -arabirimindeki tirozin fosforilasyonunu indükler (8, 13). Aktive olmuş IR daha sonra insülin reseptör substrat (IRS) proteinleri fosforile eder. Fosforile olmuş proteinler daha sonradan farklı sinyal yollarını aktive edecek olan efektör proteinlerle kenetlenir. Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) yolağı esas olarak büyümeyle ilişkilidir. Buna karşın, IRS-1 vasıtasıyla fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)'ın aktivasyonu tercihen insüline bağlı metabolik olaylarla ilişkilidir (8, 13). IRS-1, IR ve insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü (IGF-IR) sitozolik sinyal transdüksiyonunda görev alır (6, 13). İnsülin, insülin reseptörlerine bağlanarak IRS aracılığıyla insülin sinyalini yaymak ve diğer hücresel sinyal yollarını uyarabilmektedir. IRS ile insülin direnci arasında ve dolayısıyla obezite ve diyabet ile bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (4, 8).

İnsülin, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) ve glukagon benzeri protein (GLP-1) gibi birçok sinyal yolağı ile de ilişkilidir (6, 14). GLP-1 besin maddelerinin alınması ile bağırsaklardan salgılanır ve GLP-1 reseptörlerine (GLP-1R) bağlanarak etki göstermektedir (14). GLP-1R bağlanan GLP-1 glukagon-insülin düzeylerini düzenleme, mide boşalmasını geciktirme ve

pankreas hücrelerini apoptoza karşı koruma özellikleri gösterebilmektedir (14). Dolaşımdaki GLP-1, glukagon salınımını bastırırken, insülin salınımını uyarmak için endokrin pankreastaki Langerhans adacıklarında da bir hormon gibi davranır. Kan glikoz kontrolünün postprandiyal fazı sırasında, GLP-1'in bu ani ve çoklu eylemleri daha düşük kan şekeri seviyelerine uyumlu olarak hareket eder (15). GLP-1, hem insülin hem de glukagon salgısını düzenleyen endojen bir hormondur. Postprandiyal hipergliseminin varlığında GLP-1, β -hücrelerinden insülin salınımını uyarır ve pankreatik α -hücrelerinden glukagon salınımını bastırır (15, 16).

Krom karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması için gerekli olan bir eser elementtir. Krom, insülin hormonunun ko-faktörü olarak görev yapmaktadır (17, 18). Ayrıca Cr, glikoz tolerans faktörü (GTF) yapısında etkin bir rol oynamaktadır. Krom, lipid peroksidasyonunu ve kortikosteron üretimini azaltır, bu nedenle iyi bir antioksidan olarak kabul edilebilir. Stres ve hastalık, kromun atılımını artırır ve krom eksikliği ile sonuçlanabilir. Diyet ile alınan kromun, stresin olumsuz etkilerini hafiflettiği, kortizol seviyelerini düşürdüğü ve hatta bağırsıklığı geliştirmede etkili olduğu bulunmuştur (17, 19, 20). Krom, tüm sistemlerde, optimum insülin aktivitesi oluşması için insülin reseptörüne bağlanır ve insülin etkinliğini artırır (21). Krom, hücresel bazda, düşük molekül ağırlıklı krom bağlı protein (Low-molecular-weight chromium-binding substance LMWCr) veya kromodülin (chromodulin) adı verilen bir yapı oluşturur ve insülin reseptörü ile birleşir. Bu durum insülin reseptör ilişkisini artırarak daha etkin olmasını sağlamakta ve insülin etkinliğini artırmaktadır (17, 18, 21, 22). Krom, trivalent Cr (III) ve hexavalent Cr (VI) türde iki kararlı formda oluşur. Cr (VI), genellikle kromat (CrO_4^{2-}) veya dikromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) oksijenler olarak oksijenle ilişkili şekilde ortaya çıkar. Trivalent Cr, enerji üretimini düzenleyen GTF olarak bilinen moleküler kompleksin ayrılmaz bir parçasıdır (23, 24). Cr-asetat, Cr-fenilalanin, Cr-glisinat, Cr-metiyonin, Cr-nikotinat, ve Cr-pikolinat, gibi çeşitli organik krom formları, üç değerlikli bir krom bileşikleridir ve krom emilimine yardımcı olur (25, 26). Krom histidinat (CrHis), krom ve histidin amino asidinden oluşan organik bir krom bileşiktir (21, 22, 27). CrHis, inorganik krom formlarına göre daha etkin, güvenli ve biyoyararlanımı daha yüksek bir bileşiktir (27, 28). İki krom atomu etrafında dört histidinat molekülünden oluşan CrHis, karbon sayısı eşit fakat geometrik (3 boyutlu) yapıları farklı üç ayrı izomerden meydana gelmektedir (Şekil 1). Bu çalışmanın amacı; YYD ile beslenen sıçanlarda, farklı CrHis izomerlerinin pankreas GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R protein düzeyleri üzerine etkinliğinin araştırılması ve insülin metabolizması üzerine bu izomerlerin etkinliğinin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Hayvanlar ve Deneme Düzeni: Bu çalışmada 42 adet 10 haftalık yaşta Sprague Dawley ırkı sıçanlar (209.9 ± 10.7 g) rastgele her biri yedi hayvandan ($n=7$) oluşan altı gruba ayrıldı. (i) Kontrol; bazal diyet (kalinin %12'si yağlardan elde edilen diyet) ile beslenen sıçanlar,

(ii) YYD; yüksek yağlı diyet (YYD, kalorinin %42'si yağlardan elde edilen yağlı diyet) ile beslenen sıçanlar, (iii) CrHis1; YYD beslenen ve CrHis bileşiğinin saflaştırılmış 1. izomerinin uygulandığı sıçanlar, (iv) CrHis2; YYD beslenen ve CrHis bileşiğinin saflaştırılmış 2. izomerinin uygulandığı sıçanlar, (v) CrHis3; YYD beslenen ve CrHis bileşiğinin saflaştırılmış 3. izomerinin uygulandığı sıçanlar (vi) CrHisM; YYD ile beslenen ve üç ayrı izomerin birlikte (miks) uygulandığı sıçanlar. Gruplarda tüm krom bileşikleri hayvanlara, elementel krom miktarı 10 μ g/kg/gün dozunda olacak şekilde içme suyu ile uygulandı. Bu miktar, metabolik canlı ağırlık üzerinden ihtiyaç duyulan doz ayarlamaları yapıldıktan sonra 70 kg'lık bir yetişkin insan için gerekli olan 560 μ g Cr dozu ($70^{0.70} = 19.57$ kg, 560 μ g Cr, $\sim 0.220^{0.70} = 0.35$ kg 10.02 μ g Cr'ye ihtiyaç duyar) baz alınarak hesaplanmıştır (19). Çalışma diyetleri saf hammaddeler kullanılarak kontrol diyeti için kalorinin %12'si yağlardan, YYD için kalorinin %42'si yağlardan olacak şekilde hazırlandı (29). Hayvanlara yem ve su, sekiz haftalık çalışma süresince *ad libitum* olarak verildi. Çalışmada kullanılan bazal ve yüksek yağlı diyetlerin bileşimi Tablo 1'de sunulmuştur. Hayvanlara uygulanan, CrHis preparatı (Lot#Z0805216) ve saflaştırılmış izomerleri (Lot#27901CHC1, Lot#27901CHC2, Lot#27901CHC3) (Şekil 1) ticari bir firmadan (Nutrition21 Inc., Purchase, NY, ABD) temin edilmiştir. Krom histidinat için önerilen üç yapının her biri, ya amino grubunun azot çiftinin ya da karboksil grubunda negatif yük taşıyan oksijenin yalnız bir çiftinin yanı sıra negatif yük tarafından koordine edilen iki krom atomuna sahiptir. Bu ligandların iki krom atomu etrafındaki kompleksin merkezinde düzenlenmesi, kompleksin yapısını belirlemektedir (Şekil 1).

Hayvanlar üzerinde uygulanan tüm prosedürler, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış etik kurul izin belgesi (Onay Numarası 164/2014/17) ile ve ilgili yasalara, hayvan refahına, halk sağlığı, hayvan bakım ve kullanım standartlarıncı (2010/63/AT Direktifi) belirlenen kurallara sıkı sıkıya bağlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar Analizleri: Deneme sonunda, sıçanlar dekapite edilerek pankreas doku örnekleri alındı. Dokular hızlı bir şekilde çıkarılarak protein analizleri için buz içerisine plastik kilitli poşetlere alındı. Pankreas örnekleri analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (Hettich Ferezer, Almanya) -80°C'de muhafaza edildi.

Sıçanların pankreas dokularında insülin, GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R protein düzeyleri Western blot yöntemi ile, sıçan spesifik antikorlar kullanılarak önceki çalışmalarda belirtilen şekilde tespit edildi (30). Pankreas dokuları, 200 mg porsiyonlar halinde 1 mL buz soğukluğunda hipotonik homojenizasyon tampon I (0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM PMSF) ile cam homojenizatör

kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlara %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisinden 80 μ L ilave edilerek +4°C'de 45 dk süreyle (21.000 devir/dk) santrifüjlendi. Homojenatların üst fazı toplanarak, pelletler bir kez 500 μ L hipotonik tampon ve 40 μ L %10'luk Nonidet P-40 ile yıkandı, santrifüjlendi, 200 μ L homojenizasyon tampon II (0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, %20 gliserol, 50 mM HEPES (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM PMSF) ile süspanasyon haline getirildi ve +4°C'de 45 dk (21.000 devir/dk) santrifüjlendi. Tüm süpernatantlarda, protein yoğunlukları Lowry metodu (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika) ve nano spektrofotometre yardımı ile (MN-913, MaestroGen Inc., Tayvan) belirlendi. Gruplar için aynı miktarda protein içeren çalışma numuneleri SDS-PAGE yöntemi ile %12'lik akrilamid içeren jelde koşturuldu. Jeldeki proteinler, 90 dakika boyunca 250 mA akımda immuno-blotlama yöntemi ile nitroselüloz membrana aktarıldı (Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell, CA, Amerika). Blotlama işleminden sonra membranlar PBS tampon çözeltisi ile 5 kez yıkandı. Nitroselüloz membranlar BSA ile 37 °C sıcaklıkta 90 dakika boyunca blokama işlemine tabi tutularak spesifik olmayan proteinlerin kapatılması sağlandı. Primer antikor (Abcam, Cambridge, İngiltere) olarak anti-insülin (ab18157), anti-GLUT-2 (ab54460:), anti-IRS-1 (ab27712) ve anti-GLP-1R (ab186051) antikorları ile sekonder (ab6721: Abcam, Cambridge, İngiltere) antikorları %0.05 Tween-20 bulunan tampon çözeltisi kullanılarak uygun oranlarda seyreltilerek inkübe edildi. Membranlar yine tampon çözeltisi ile yıkandı ve görüntüleme aşamasına geçildi. Bantların görüntülenmesi için diaminobenzidin 7.4 pH'ya sahip 1 M Tris tamponunda %0.03-0.05 oranında seyreltilerek kullanıldı. Kuruyan membranların üzerindeki bantların rölatif yoğunlukları Image J analyses system (Image J National Institute of Health Bethesda, Amerika) programı kullanılarak belirlendi. Hesaplanan insülin, GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R için bant yoğunlukları kontrolün yüzdesi olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz: Çalışmada örneklem sayısı, önceki çalışmalardan hesaplanan etki büyüklüğü 0.80 ile alfa hata 0.05 ve %95 güçte G*Power paket programı (Versiyon 3.1.9.2) yardımı ile toplamda 42 sıçan (n=7; 6 grup) olacak şekilde belirlendi (31, 32). Verilerin değerlendirilmesinde SPSS istatistik paket programı (IBM SPSS Versiyon 22.0) kullanılmıştır (33). Veriler için parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği “Levene” testi ile kontrol edilirken, normallik varsayımına ise “Shapiro-Wilk” testi ile bakıldı. Gruplar arası farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve grupların ikili karşılaştırmalarında *post-hoc* analizi olarak “Tukey” testi kullanıldı. Veriler gruplar için ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur. Ayrıca, sıçanlarda pankreas dokusu insülin protein değeri ile GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R protein düzeyleri arasındaki ilişki “Pearson” korelasyonu ile incelendi. İstatistiksel anlamlılık P<0.05 olarak kabul edildi.

Tablo 1. Sıçanlara verilen bazal (kontrol) ve yüksek yağlı diyetlerin (YYD) bileşimi ve kimyasal analizleri

Hammadde, g/kg	Bazal	YYD
Kazein	200.00	200.00
Mısır Nişastası	579.50	150.00
Sükroz	50.00	149.50
Soya Yağı	70.00	-
Sığır Don Yağı (İç yağı)	-	400.00
Selüloz	50.00	50.00
Vitamin-mineral karışımı*	45.00	45.00
L-sistein	3.00	3.00
Kolin bitartarat	2.50	2.50
Kimyasal Analizler		
Ham Protein, %	17.8	17.8
Metabolik Enerji, kcal/kg**	3802	4811
Ham Yağ, %	7.0	39.8
Ham Selüloz, %	4.9	4.9
Ham Kül, %	4.3	4.3

*Vitamin-mineral karışımının kilogramı; 1.8 mg tüm-trans retinil asetat (A vitamini), 0.025 mg kolekalsiferol (D Vitamini), 12.5 mg tüm rac-alfa-tokoferol asetat (E vitamini), 1.1 mg menadion sodyum bisulfid (K₃ Vitamini), 1.1 mg tiyamin (Vitamin B₁), 4.4 mg ribolavin (Vitamin B₂), 35 mg niyasin (Vitamin B₃), 10 mg kalsiyum pantotenat (Vitamin B₅), 2.2 mg Vitamin B₆, 0.02 Vitamin B₁₂, 0.55 mg folik asit, 0.1 mg d-biyotin, 40 mg Mn (MnO), 12.5 mg Fe (FeSO₄), 25 mg Zn (ZnO), 3.5 mg Cu (CuSO₄), 0.3 mg I (KI), 0.15 mg Se (Na₂SeO₃), 175 mg kolin klorit (C₅H₁₄ClNO).

** Hesaplama ile belirlenmiştir.

Bulgular

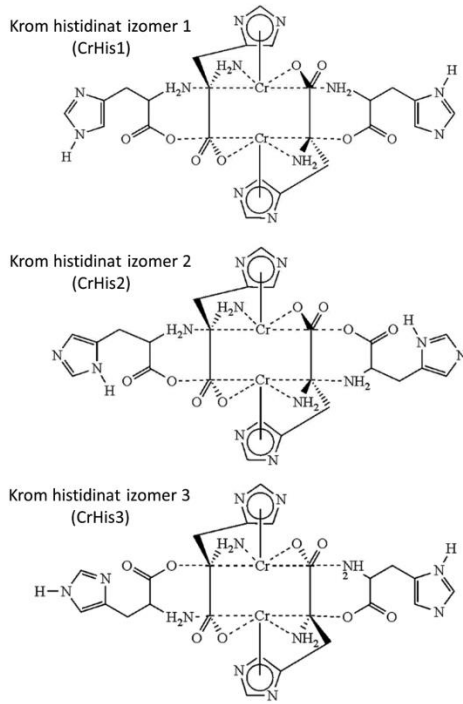
Pankreas insülin değeri yüksek yağlı diyet ile beslenen tüm gruplarda artış gösterirken (Şekil 2, Panel A; P<0.001), sadece YYD uygulanan grupta bazal diyet ile beslenen kontrol grubuna göre 2.8 kat yükselmiştir (P<0.001). CrHis izomerleri (CrHis1, CrHis2, CrHis3) ve izomerlerin kombinasyonu (CrHisM) pankreas insülin düzeyini YYD grubuna göre sırasıyla %35.9, %34.2 %29.5 ve %35.6 oranında düşürmüştür (Şekil 2, Panel A; P<0.001). Bu çalışmada pankreas insülin değerleri, YYD ile beslenen sıçanlarda CrHis uygulamaları kontrol grubuna göre daha yüksek bulunurken, CrHis izomerleri ve kombinasyonu arasında bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 2, Panel A; P>0.05).

Sıçanlarda, pankreas GLUT-2 protein düzeyleri, gruplar arasında farklılık göstermektedir (Şekil2, Panel B; P<0.001). YYD grubu sıçanlarda pankreas GLUT-2 protein düzeyi kontrol grubuna kıyasla 2.3 kat azalırken, bu azalma CrHis izomerleri ve bunların kombinasyonu uygulanan gruplarda daha düşük olarak tespit edilmiştir (P<0.001). CrHis uygulanan gruplar (CrHis1, CrHis2, CrHis3 ve CrHisM), YYD grubu ile kıyaslandığında pankreas GLUT-2 protein düzeylerinde sırasıyla %76.6, %67.2, %52.2 ve %60.9 oranlarında artış göstermiştir (Şekil 2, Panel B; P<0.001). Sıçanlarda pankreas GLUT-2 protein düzeyleri açısından CrHis izomerleri ve kombinasyonu grupları arasında sadece CrHis1 grubu ile CrHis3 grubu arasında istatistiksel bir fark tespit edilirken (P<0.05), diğer CrHis grupları arasında fark bulunmamaktadır (Şekil2, Panel B; P>0.05). Bu gruplar arasında pankreas GLUT-2 protein düzeyi üzerine YYD ile beslenen ve CrHis uygulanan sıçanlarda en yüksek değer CrHis1 grubunda (%78.3) bulunurken, en düşük değer CrHis3 (%66.4) grubunda belirlenmiştir.

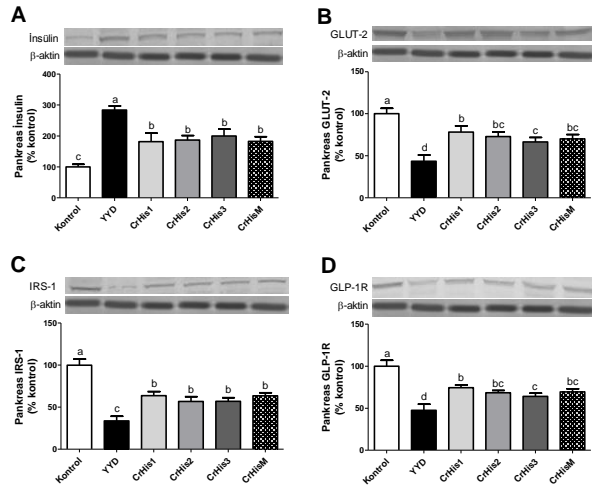
IRS-1 protein düzeyi tüm YYD uygulanan sıçanların pankreas dokularında, bazal diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanlarına göre azalma göstermiştir (Şekil 2, Panel B; P<0.001). Krom uygulanmayan YYD grubu sıçanlarda pankreas IRS-1 protein düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat daha düşük bulunmuştur (P<0.001). CrHis uygulanan tüm gruplar arasında, pankreas IRS-1 protein düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmazken (Şekil 2, Panel B; P>0.05), sadece YYD grubu uygulanan sıçanlara kıyasla CrHis1 grubunda %89.5, CrHis2 ile CrHis3 gruplarında yaklaşık %69.2 ve CrHisM grubunda %89.0 oranında bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 2, Panel B; P<0.001).

Pankreas GLP-1R protein düzeyi, kontrol grubundaki sıçanlar ile kıyaslandığında diğer gruplarda anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 2, Panel B; P<0.001). Bu düşüş, YYD grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2.1 kat olurken, CrHis1, CrHis2, CrHis3 ve CrHis4 gruplarında sırasıyla 1.3, 1.5, 1.6 ve 1.4 olarak tespit edilmiştir (P<0.001). Krom uygulamaları, pankreas GLP-1R protein düzeyini YYD grubuna göre CrHis izomerlerinde (CrHis1, CrHis2 ve CrHis3) sırasıyla %56.3, %43.8 ve %34.4 oranlarında artırırken, bu artış CrHis izomerlerinin kombinasyonu (CrHisM) grubunda %45.9 oranında bulunmuştur (P<0.001). YYD ile beslenen ve krom uygulaması yapılan gruplar arasında CrHis1 ve CrHis3 dışında (P<0.01) pankreas GLP-1R protein düzeyi bakımından bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 2, Panel B; P>0.05).

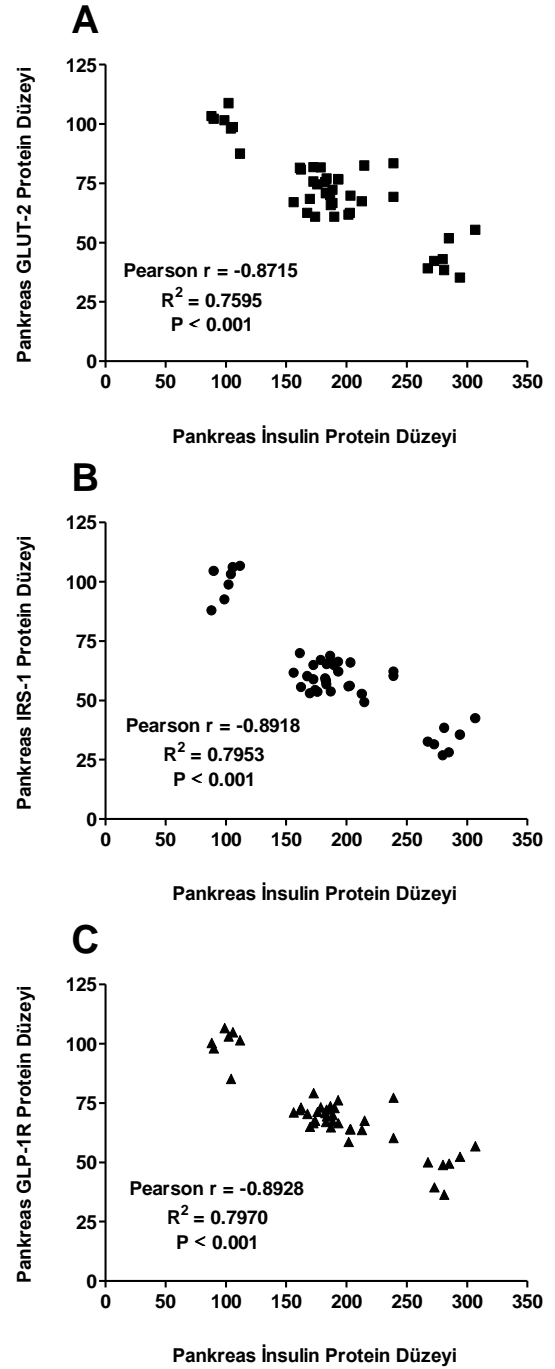
Sıçanların pankreas dokusunda Western blot yöntemi ile tespit edilen rölatif insülin düzeyi ile GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R protein düzeyleri arasında sırasıyla -0.872, -0.892 ve -0.893 düzeylerinde güçlü bir negatif korelasyon tespit edilmiştir (Şekil 3; P<0.001).



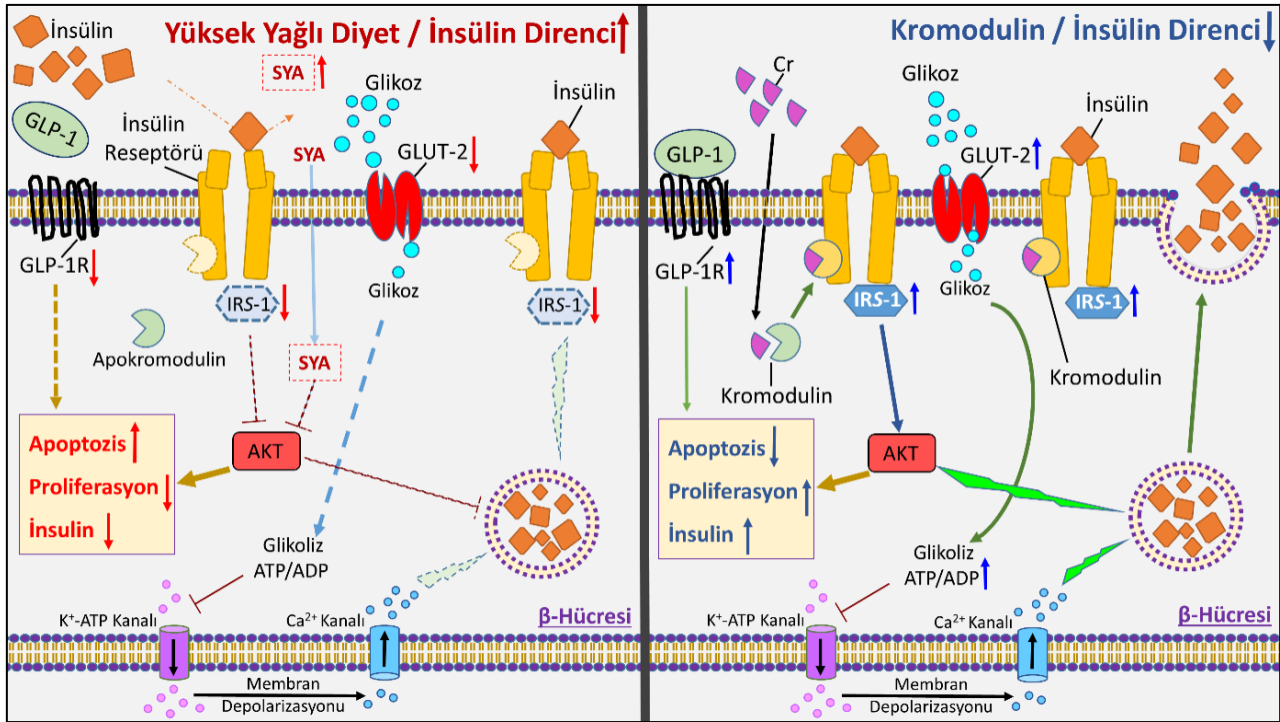
Şekil 1. Krom histidinatin (CrHis) üç izomerinin (CrHis1, CrHis2, CrHis3) geometrik yapısı.



Şekil 2. Yüksek yağlı diyet (YYD) ile beslenen sıçanlarda krom histidinatin (CrHis) üç farklı izomeri (CrHis1, CrHis2, CrHis3) ve bunların kombinasyonunun (CrHisM) pankreas insülin (Panel A), glikoz taşıyıcı protein 2 (GLUT-2; Panel B), insülin reseptör substrat (IRS-1; Panel C) ve glukagon benzeri peptid 1 reseptör (GLP-1R; Panel D) protein düzeyleri üzerine etkisi. Veriler, bantların dansitesine göre kontrolün yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Western blot tekniği ile ölçülen parametre için blotlar en az 3 kez tekrarlandı, eşit miktarda protein yüklemesini sağlamak için β-aktin ile analiz yapıldı. Her bir kutu grafiği gruplara ait değerleri göstermektedir. a, b, c: Kutu grafiklerinde farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistikisi olarak anlamlıdır (Turkey *post-hoc* test, $P < 0.05$).



Şekil 3. Sıçanların pankreas dokusunda, insülin ile glikoz taşıyıcı protein 2 (GLUT-2; Panel A), insülin reseptör substrat (IRS-1; Panel B) ve glukagon benzeri peptid 1 reseptör (GLP-1R; Panel C) düzeyi arasındaki korelasyon.



Şekil 4. Yüksek yağlı diyet ile indüklenen insülin direncine karşı pankreas β-hücresinde krom (Cr) bileşiklerinin hücresel düzeyde yanıtı.

Tartışma

Yüksek yağlı diyet insülin direncine yol açarak obezite, metabolik sendrom ve diyabet gibi bir çok durumun patogenezinde rol oynamaktadır (2, 34). Ancak, son yıllarda Cr gibi bazı iz elementlerin obezite ve diyabet gibi kronik problemlerin gelişmesine karşı koruyucu veya olumsuz etkilerini azaltma ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır (28, 35-37). Bundan dolayı, bu çalışmada YYD ile insülin direnci indüklenen sıçanlarda, üç farklı CrHis izomerinin ayrı ayrı ve birlikte kullanımının pankreas insülin, GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R protein düzeyleri üzerine etkileri araştırılmış ve YYD ile beslenen sıçanlarda pankreas insülin düzeyi önemli bir biçimde yükselmiştir. Bu bulgulara benzer olarak, daha önce yapılan pek çok çalışmada da sıçanlarda YYD uygulamasının insülin direnci, oksidatif stres ve pankreas islet hücrelerinde hipertrofi ile hiperplaziye neden olduğu bildirilmektedir (6, 38). İnsülin direnci durumunda, artan insülin salgısı ile istenilen insülin etkisi oluşturulamadığından organizma tarafından insüline ihtiyaç duyulduğu ve insülin yapımının uyarıldığı düşünülmektedir. Bu durum hiperglisemi ve hiperinsülinemi durumunu oluşturmaktadır (4, 6). YYD ile beslenme sonucunda yükselmiş SYA'ların, glikoz ile uyarılmış β-hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, bu durumun dislipidemi ve hiperglisemi kombinasyonunun azalmış bir β-hücre replikasyon cevabına neden olacağı düşünülmektedir (4). SYA ile insülin direnci ve obezite arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (6, 12).

Bu çalışmada, CrHis izomerleri ve kombinasyonları YYD ile beslenen sıçanların pankreas GLUT-2 protein düzeylerini artırmıştır. Artan GLUT-2 düzeyi ile hücre içine glikoz taşınmasının artırılarak hücre proliferasyonu ve insülin sekresyonunun düzenlenmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu bulguları destekler nitelikte olan bir çalışmada, YYD ile beslenen sıçanlarda pankreatik GLUT2 düzeyinin, stres kaynaklı veya östradiol seviyelerine müdahale edilerek düşürüldüğü, GLUT2 protein seviyesinin düşüklüğüne bağlı olarak insülin üretiminde kısmi bir azalma olduğu bildirilmektedir (39). Pankreas β-hücrelerinde, GLUT-2 proteinleri aracılığıyla glikoz hücre içine alınmakta, glikoliz ile ATP/ADP oranı artmakta ve ATP K⁺ kanalı inhibe edilmektedir. Membran depolarizasyonu nedeniyle voltaj bağımlı Ca²⁺ kanalları açılarak, hücreye Ca girişi artar ve insülin salınımı düzenlenir (40). Organik krom formları olan Cr glisinat ve Cr asetat uygulanan YYD ile beslenen sıçanlarda, beyin dokusunda GLUT protein düzeyleri regüle edilerek ve glikoz homeostazisi düzenlenerek insülin direncinin olumsuz etkilerinin azaltılabileceği bildirilmiştir (26).

Bu çalışmada, YYD ile beslenen sıçanlarda benzer şekilde insülin seviyesi artarken, pankreas IRS-1 protein düzeyi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Uygulanan CrHis izomerleri ve kombinasyonu pankreas insülin ve IRS-1 değerlerinde bir iyileşme göstermiştir. Bu parametrelerin regüle edilmesinin insülin salınımı ve sinyalasyonunda artışa neden olarak, insülin direncine karşı kısmi bir koruma sağlayacağı düşünülmektedir.

Çünkü insülin hormonu, hedef hücrelerde insülin reseptörüne bağlanarak, insülin reseptör tirozin kinaz alanını aktive ederek IRS'nin fosforilasyonunu sağlar (6, 13, 41). Fosforlanmış IRS proteinleri ise PI3K ve daha sonra AKT (protein kinaz B) sinyal yollarını aktive ederek hücrelerin proliferasyon ve apoptozisinin düzenlenmesinde, ayrıca glikojen sentezinde aktif rol oynamaktadır (6, 42). Ayrıca, YYD uygulamaları, reseptör yetmezliği olmaksızın toplam insülin reseptör sayısının azalmasına, IRS-1, PI3K ve Akt fosforilasyonu ve aktivitesini azalmasına ve hedef dokularda insülin etkinliğinin değiştirilmesi ile insülin direncine neden olarak diyabet oluşumunu indükleyebilirler (4, 5, 43). Nitekim, bu çalışmada elde edilen bulguları destekler nitelikte, YYD ile beslenen hayvanlarda hem insülin reseptörünün hem de IRS'lerinin azaldığı ortaya konmuştur (4, 41). Ayrıca, Liu ve ark. (3), YYD ile insülin direnci indüklenen sıçanlarda, vaspin uygulaması ile IRS/PI3K/Akt/GLUT sinyal yollarının aktivasyonu ve IκBα/NF-κB gibi inflamatuvar sinyal yollarının inhibisyonunun gerçekleştiğini ve bu etkinin metabolik sendrom, diyabet, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi durumların patogeneğinde etkili insülin direncinin azaltılması anlamına geldiğini bildirmişlerdir (3).

İnsülin sinyal iletimi, sadece pankreas β-hücrelerindeki sinyalleşmeyi etkilemekle kalmaz, aynı zamanda insülinin, α-hücrelerden gelen glukagon sekresyonunu IRS-1-PI3K yolu ile negatif yönde düzenlediği için insülin direnci artmış glukagon sekresyonuna da yol açabilir. Bu değişiklikler, hem insülin direncinin hem de artmış glukagon sekresyonunun, diyabet gelişimi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (4, 43).

Sreejayan ve ark. (17) obez farelerde yaptıkları bir çalışmada, Cr uygulaması ile insülin direncinin ve hücrel stresin azaldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, obez sıçanlarda krom pikolat uygulamasının insülin duyarlılığını artırdığı, karbonhidrat ve lipit metabolizmasını düzenlediği bildirilmektedir (35). Sıçanlarda CrHis ve biyotin uygulamasının glikoz ve insülin homeostazı ile lipit profili düzenlediği, IRS-1 ekspresyonunu regüle ettiği bildirilmektedir (44). Pankreas hücrelerinde insülin reseptörlerinin uyarılması ile IRS proteinlerinin insülin ve IGF-1 sinyalizasyonunun regülasyonu ile islet hücrelerinin büyümesi ve insülin sekresyonunun düzenlendiği gösterilmiştir (45). Bu durumun insülin reseptör sayısının azalması ve insülin direnci oluşması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (4, 5 45).

Bağırsak L hücrelerinden salgılanan GLP-1, pankreas β hücrelerinde bulunan GLP-1R ile

bağlanarak, pankreasta insülin salınımının düzenlenmesinde, apoptozun inhibe edilmesinde, proliferasyon ve neogenезin teşvik edilmesinde görev almaktadır (15, 16, 46). Ayrıca, GLP-1 insülin sekresyonunu artırarak, glukagon sekresyonunu azaltarak ve gastrik boşalmayı geciktirerek diyabetin olumsuz etkilerinin azaltılmasında etkili bir faktör olarak da görülmektedir. Diyabet tedavisinde, GLP-1 agonistleri GLP-1R'ne bağlanarak aktive eder ve diyabet tedavisinde kullanılabilir (15, 16). Bu çalışmada YYD ile beslenen sıçanların pankreas GLP-1R düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olmuştur. Sıçanlara CrHis izomerleri ve kombinasyonlarının uygulanması pankreas hücrelerinde GLP-1R düzeyinin artışı sağlamıştır. Bu durum insülin reseptör etkinliğinin artışı, hiperglisemi durumunun azalışı ve insülin direncinin azaltılması ile ilişkili olabilir. Çünkü, krom, hücrel düzeyde kromodulin yapısını tamamlamakta ve optimum insülin etkisinin oluşmasına yardımcı olmakta, ve ayrıca glikoz tolerans faktörü olarak görev yapmaktadır (17, 20, 47). Örneğin, Anderson ve ark. (27) organik krom bileşikleriyle yaptıkları bir çalışmada CrHis preparatının diğer organik krom bileşiklerinden daha iyi absorbe edildiğini ve organizmada daha yüksek konsantrasyonda bulunduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan, GLP-1R nakavt farelerde yapılan bir çalışmada insülin direnci durumunda pankreas islet hücreleri sayısında ve büyüklüğünde kontrol farelere göre anlamlı bir azalma olduğu bildirilmektedir (46). Bu durum insülin sentezi ve sekresyonu ile ilişkilendirilebilmektedir.

Organik krom bileşiği olan CrHis ve izomerleri hücrel düzeyde kromodulin yapısı ile insülin sinyalizasyonunu iyileştirmekte ve YYD ile indüklenen insülin direncini azaltıcı yönde bir etki göstermektedir. İnsülin reseptör etkinliğini artıran CrHis, artan IRS-1 protein düzeyi ve artan GLP-1R etkisi ile pankreas β-hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ederken, apoptozisini baskılayıcı etki göstermesini sağlayacak ve insülin direncinin diyabet gibi kronik bir probleme dönüşüm riskini azaltabilecektir (Şekil 4). Sonuç olarak, CrHis ve izomerleri YYD ile beslenen sıçanlarda pankreas GLUT-2, IRS-1 ve GLP-1R sinyalizasyonlarını düzenleyebilmektedir. Bu durum obezite, metabolik sendrom ve diyabet gibi durumlarda etkili insülin direncinin kontrol altına alınmasında umut verici olabilir.

Teşekkür

Bu çalışmaya desteklerinden dolayı Nutrition21 (NY, ABD)'e ve Türkiye Bilimler Akademisi'ne (TÜBA, KS) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. International Diabetes Federation. "IDF Diabetes Atlas 8th Edition International Diabetes Federation, Brussels, Belgium". <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/134-idf-diabetes-atlas-8th-edition.html/> 10.05.2017.
2. Nandipati KC, Subramanian S, Agrawal DK. Protein kinases: Mechanisms and downstream targets in

inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 2017; 426: 27-45.

3. Liu S, Duan R, Wu Y, et al. Effects of vaspin on insulin resistance in rats and underlying mechanisms. *Sci Rep* 2018; 8: 13542.
4. Gu JJ, Gao FY, Zhao TY. A preliminary investigation of the mechanisms underlying the effect of berberine in

- preventing high-fat diet-induced insulin resistance in rats. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63: 505-513.
5. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacother* 2017; 95: 605-613.
 6. Linnemann AK, Baan M, Davis DB. Pancreatic β -cell proliferation in obesity. *Adv Nutr* 2014; 5: 278-288.
 7. Sahin K, Orhan C, Akdemir F, et al. Mesozeaxanthin protects the liver and reduces cardio-metabolic risk factors in an insulin resistant rodent model. *Food Nutr Res* 2017; 61: 1353360.
 8. Peng J, He L. IRS posttranslational modifications in regulating insulin signaling. *J Mol Endocrinol* 2018; 60: R1-R8.
 9. Stolarczyk E, Le Gall M, Even P, et al. Loss of sugar detection by GLUT2 affects glucose homeostasis in mice. *PLoS One* 2007; 2: e1288.
 10. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E141-145.
 11. Chakraborty C, Doss CG, Bandyopadhyay S, Agoramorthy G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: Micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014; 5: 697-712.
 12. Boden G. Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance. *Endocr Pract* 2001; 7: 44-51.
 13. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
 14. Barakat G, Moustafa ME, Khalifeh I, et al. Effects of exendin-4 and selenium on the expression of GLP-1R, IRS-1, and preproinsulin in the pancreas of diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2016; 73: 387-394.
 15. Nadkarni P, Chepurny OG, Holz GG. Regulation of glucose homeostasis by GLP-1. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014; 121: 23-65.
 16. Janzen KM, Steuber TD, Nisly SA. GLP-1 agonists in type 1 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 2016; 50: 656-665.
 17. Sreejayan N, Dong F, Kandadi MR, Yang X, Ren J. Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 1331-1337.
 18. Chen Y, Watson HM, Gao J, et al. Characterization of the organic component of low-molecular-weight chromium-binding substance and its binding of chromium. *J Nutr* 2011; 141: 1225-1232.
 19. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, et al. The effects of chromium picolinate and chromium histidinate administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathway in the brain of diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 2012; 150: 291-296.
 20. Gitoee A, Sadeghi G, Karimi A. Combination effects of organic and inorganic chromium on production performance, reproductive response, immune status, and maternal antibody transmission in breeder quails under heat stress. *Biol Trace Elem Res* 2018; 184: 508-516.
 21. Vincent JB. New evidence against chromium as an essential trace element. *J Nutr.* 2017; 147: 2212-2219.
 22. Vincent JB. The biochemistry of chromium. *J Nutr* 2000; 130: 715-718.
 23. Sharma I, Pati PK, Bhardwaj R. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant defence system in *Raphanus sativus* L. under chromium toxicity. *Ecotoxicology* 2011; 20: 862-874.
 24. Tian H, Guo X, Wang X, et al. Chromium picolinate supplementation for overweight or obese adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 11: CD010063.
 25. Cathum S, Brown CE, Wong W. Determination of Cr^{3+} , CrO_4^{2-} and $Cr_2O_7^{2-}$ in environmental matrixes by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD). *Anal Bioanal Chem* 2002; 373: 103-110.
 26. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, et al. The effects of chromium complex and level on glucose metabolism and memory acquisition in rats fed high-fat diet. *Biol Trace Elem Res* 2011; 143: 1018-1030.
 27. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA. Stability and absorption of chromium and absorption of chromium histidinate complexes by humans. *Biol Trace Elem Res* 2004; 101: 211-218.
 28. Selcuk MY, Aygen B, Dogukan A, et al. Chromium picolinate and chromium histidinate protects against renal dysfunction by modulation of NF- κ B pathway in high-fat diet fed and Streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9: 30.
 29. Orhan C, Sahin N, Tuzcu Z, Komorowski JR, Sahin K. Combined oral supplementation of chromium picolinate, docosahexaenoic acid, and boron enhances neuroprotection in rats fed a high-fat diet. *Turk J Med Sci* 2017; 47: 1616-1625.
 30. Gencoglu H, Tuzcu M, Hayirli A, Sahin K. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/sirtuin-1 pathway and glucose transporters. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66: 314-320.
 31. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd Edition, Lawrence Erlbaum Associates Inc.: Hillsdale, NJ, USA: Hillsdale, NJ, USA, 1988.
 32. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007; 39: 175-191.
 33. IBM SPSS, IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: USA.
 34. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* 2018; 98: 2133-2223.
 35. Cefalu WT, Wang ZQ, Zhang XH, Baldor LC, Russell JC. Oral chromium picolinate improves carbohydrate and lipid metabolism and enhances skeletal muscle Glut-4 translocation in obese, hyperinsulinemic (JCR-LA corpulent) rats. *J Nutr* 2002; 132: 1107-1114.
 36. Hua Y, Clark S, Ren J, Sreejayan N. Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 313-319.
 37. Orhan C, Kucuk O, Tuzcu M, et al. Effect of supplementing chromium histidinate and picolinate complexes along with biotin on insulin sensitivity and related metabolic indices in rats fed a high-fat diet. *Food Sci Nutr* 2018; 00: 1-12.

38. Auberval N, Dal S, Maillard E, et al. Beneficial effects of a red wine polyphenol extract on high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr* 2017; 56: 1467-1475.
39. Lan D, Xu N, Sun J, et al. Electroacupuncture mitigates endothelial dysfunction via effects on the PI3K/Akt signalling pathway in high fat diet-induced insulin-resistant rats. *Acupunct Med* 2018; 36: 162-169.
40. Salimi M, Zardooz H, Khodaghali F, Rostamkhani F, Shaerzadeh F. High-fat diet with stress impaired islets' insulin secretion by reducing plasma estradiol and pancreatic GLUT2 protein levels in rats' proestrus phase. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67: 653-666.
41. Adeghate E, Saeed Z, D'Souza C, et al. Effect of nociceptin on insulin release in normal and diabetic rat pancreas. *Cell Tissue Res* 2018; 374: 517-529.
42. Wong JC, Vo V, Gorjala P, Fiscus RR. Pancreatic- β -cell survival and proliferation are promoted by protein kinase G type I α and downstream regulation of AKT/FOXO1. *Diab Vasc Dis Res* 2017; 14: 434-449.
43. Ercin M, Sancar-Bas S, Bolkent S, Gezginci-Oktayoglu S. Tub and β -catenin play a key role in insulin and leptin resistance-induced pancreatic beta-cell differentiation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018; 1865: 1934-1944.
44. Turgut M, Cinar V, Pala R, et al. Biotin and chromium histidinate improve glucose metabolism and proteins expression levels of IRS-1, PPAR- γ , and NF- κ B in exercise-trained rats. *J Int Soc Sports Nutr* 2018; 15: 45.
45. Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* 2004; 181: 25-38.
46. Vasu S, Moffett RC, Thorens B, Flatt PR. Role of endogenous GLP-1 and GIP in beta cell compensatory responses to insulin resistance and cellular stress. *PLoS One* 2014; 9: e101005.
47. Machac N, Kaya Karasu G, Sahin N, et al. Effects of supplementation of chromium histidinate on glucose, lipid metabolism and oxidative stress in cats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2018: doi: 10.1111/jpn.13023.