



Phytothérapie

Effets de l'huile de *Pinus Halepensis* sur l'hyperuricémie, la peroxydation lipidique et les activités des enzymes antioxydantes chez le rat

Effects of *Pinus Halepensis* oil on hyperuricemia, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes activities in rat

Nesrine GDOURA^{1#}, Jean-Claude MURAT², Khansa CHAABOUNI³, Fatma MAKNI AYADI³, Abdelfattah ELFEKI¹

¹Laboratoire d'Eco-Physiologie Animale. Département des Sciences de la Vie. Faculté des Sciences. Université de Sfax. BP 1171-3000, Sfax, Tunisie

²Laboratoire de Biologie Cellulaire. Faculté de Médecine, 37, allées Jules-Guesde, 31073 Toulouse, France

³Laboratoire de Biochimie. Faculté de Médecine. 3029 Sfax, Université de Sfax, Tunisie

Reçu le 23 Octobre 2014, Révisé le 10 mars 2015, Accepté le 16 Mai 2015

#Auteur correspondant : ngdoura@yahoo.fr

Résumé Introduction. L'hyperuricémie provoque l'installation de la goutte associée au stress oxydatif. Des plantes à effet antioxydant peuvent contrecarrer les effets délétères de l'acide urique. **Objectif.** Démontrer les effets protecteurs du pin (*Pinus Halepensis*) sur les altérations biochimiques induites par l'acide urique, chez le rat. **Matériel et Méthodes.** Des rats mâles Wistar âgés de 2 mois et pesant 2505 g sont divisés en quatre groupes (n=6). Le 1^{er} groupe reçoit 1 mL de NaCl à 0,9%, le 2^{ème} groupe hyperuricémique reçoit de l'acide urique à une dose de 150 mg/kg poids corporel (PC). Le 3^{ème} groupe hyperuricémique+allopurinol reçoit de l'acide urique (150 mg/kg PC) et de l'allopurinol à une dose de 10 mg/kg PC; le 4^{ème} groupe hyperuricémique+pin reçoit de l'acide urique (150 mg/kg PC) et de l'huile de *Pinus Halepensis* (100 mg/kg PC), durant 7 jours. **Résultats.** A J7, les teneurs sériques et hépatiques en acide urique sont réduites respectivement de 67% et 70% chez les rats hyperuricémiques traités avec l'huile de pin comparés aux rats hyperuricémiques. Une réduction des activités de l'aspartate amino-transaminase (-12%), de l'alanine amino-transaminase (-20%) et de la phosphatase alcaline (-19%) est notée. De même, les teneurs hépatiques en substances réactives à l'acide thiobarbi-

turique et l'activité des enzymes antioxydantes, superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase sont réduites respectivement de 43, 55, 168 et 49% par rapport à celles des rats hyperuricémiques. **Conclusion.** L'huile de pin semble avoir un effet hypouricémiant et atténuer la peroxydation lipidique hépatique malgré une réduction de la défense antioxydante enzymatique.

Mots clés: Rat, Hyperuricémie, Stress oxydatif, Pinus Halepensis, Huile essentielle

Abstract Introduction. Hyperuricemia involves gout installation associated to oxidative stress. Plants with antioxidant effects may counteract the deleterious effects of uric acid. **Objective.** This study aimed to demonstrate the protective effects of pine (*Pinus Halepensis*) on biochemical alterations induced by uric acid in rats. **Materials and Methods.** Male Wistar rats aged two months and weighing 2505 g were divided in four groups (n=6). The 1st group received 1 mL of 0.9% NaCl, the 2nd group received hyperuricemic uric acid at a dose of 150 mg/kg body weight (BW). The 3rd group hyperuricemic + allopurinol received uric acid (150 mg/kg BW) and allopurinol (10 mg/kg BW); the 4th group hyperuricemic + pine received uric acid (150 mg/kg BW) and *Pinus halepensis* oil at a dose of 100 mg/kg BW. **Results.** At day 7, serum and liver uric acid levels were reduced respectively by 67% and 70% in hyperuricemic rats treated with oil pine compared to hyperuricemic rats. Enzymatic activities of aspartate, alanine amino transaminase and alkaline phosphatase were lower by 12, 20 and 19%, respectively. The concentrations of thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzymes activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were decreased by 43, 55, 168 and 49%, respectively compared to those of hyperuricemic rats. **Conclusion.** Pine oil seems to have a hypouricemic effect and reduces liver lipid peroxidation despite a reduced enzymatic antioxidant defense.

Keywords: Rat, Hyperuricemia, Oxidative Stress, Pinus Halepensis, Essential oil

Introduction

La goutte est une maladie systémique et chronique dont l'incidence est en constante augmentation. Chez certains patients, une arthropathie tophacée chronique peut se développer avec une destruction articulaire progressive [1]. Cette maladie due à l'accumulation de cristaux d'urate de sodium associée à une hyperuricémie chronique, est en augmentation dans de nombreux pays industrialisés [2]. L'hyperuricémie chronique est très vraisemblablement un facteur de risque cardiovasculaire

indépendant [3]. Elle peut se compliquer chez environ 20% des patients de dépôts uraniques silencieux dans les articulations mais aussi les tendons des membres inférieurs [4]. Les conseils alimentaires sont un des aspects fondamentaux de la prise en charge non pharmacologique du patient. En effet, le rôle de l'alimentation dans la pathogénie de la goutte est bien reconnu [5-6]. Une étude rétrospective sur 750 cas, réalisée entre 2000 et 2006 à Sfax (Tunisie) a révélé une atteinte cardiovasculaire dans 56%, un trouble du métabolisme glucidique dans 86%, une dyslipidémie dans 60% et une hyperuricémie dans 11% des

cas [7]. Une autre étude rétrospective réalisée entre 1997 et 2009 à Sousse (Tunisie) a montré que 16 patients hospitalisés (H/F, 12/4) d'un âge moyen de 64 ans ont été diagnostiqués pour une goutte [8]. L'usage de la médecine traditionnelle est répandu et les plantes représentent une grande source d'antioxydants naturels pouvant être utilisés pour le développement de nouvelles drogues [9]. Le traitement actuel, essentiellement des molécules habituelles, telles que la colchicine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, s'avère difficile à suivre en raison, des complications cardiovasculaires et rénales qui accompagnent la maladie [10]. En outre, l'utilisation importante de médicaments diurétiques (notamment dans la prise en charge des patients hypertendus) et la réduction de la filtration glomérulaire liée à l'âge compliquent la prise en charge de ces patients [11-12]. L'évaluation des pratiques médicales en médecine générale comme en rhumatologie fait état de connaissances insuffisantes. L'allopurinol est l'hypouricémiant de référence [3]. Toutefois, de nouvelles thérapeutiques comme les phytomédicaments peuvent posséder plusieurs propriétés pharmacologiques. Le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) de la famille des Pinacées ou Abiétacées est originaire des climats tempérés et froids, il s'agit principalement d'arbres et d'arbustes de type gymnosperme de la classe des conifères. En Tunisie, le pin d'Alep est l'espèce la plus plantée le long de la côte méditerranéenne pour la stabilisation des dunes de sable. Il est également utilisé dans la production de bois et de la résine. Il est utilisé dans l'industrie des pâtes et papiers. Le pin d'Alep est très apprécié pour sa production de semences, largement utilisées dans la préparation des aliments, en particulier, dans la pâtisserie orientale. Ses graines sont traditionnellement utilisées en Tunisie, mais aussi dans d'autres pays du bassin méditerranéen, pour la préparation de pouding doux (Assida Zgougou), de glaces et de bonbons [14]. L'huile de pin est utilisée comme additifs aromatisants pour certains aliments et boissons et en cosmétiques, dans la fabrication des parfums [15]. Les grains de pin d'Alep sont très nutritifs et très appréciés par les consommateurs tunisiens [14]. Quelques travaux ont été publiés sur les graines de pin d'Alep tunisiens révélant, la composition en acides gras,

la fraction insaponifiable et les composés phénoliques [14,16]. En médecine traditionnelle, les différentes parties du genre *Pinus* (écorce, aiguilles, cônes et résine) sont utilisées pour traiter les rhumatismes ou comme anti-inflammatoire, antioxydant ou antiseptique [17]. En Turquie, la résine de *Pinus* est utilisée pour accélérer la cicatrisation des plaies [18]. La décoction est utilisée contre les rhumes, le traitement de la diarrhée et les ulcères gastro-duodénaux [19]. Par ailleurs, il a été rapporté que les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes [20]. Chez l'Homme, en immunodéficiences, il a été démontré que l'huile essentielle extraite des cônes de la famille des Pinacées possède des activités antioxydante, analgésique et antivirale [21]. L'hyper-uricémie provoque l'installation de la goutte. Des plantes à effets antioxydants pourraient contrecarrer les effets délétères de l'acide urique.

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité de l'huile de *Pinus halepensis* sur l'hyperuricémie et le stress oxydatif induits par l'acide urique, chez les rats.

Matériel et méthodes

Animaux et régimes

Des rats mâles de souche Wistar (Pharmacie Centrale de Tunis (SIPHAT)), pesant 2505 g et âgés de deux mois, sont maintenus dans une animalerie à une température de $22\pm 3^\circ\text{C}$ et un rythme circadien (12h jour/12h nuit) et un taux d'humidité relative de 50-60%. Les rats sont soumis quotidiennement à un régime standard contenant 17,5% protéines (Société Industrielle de Concentrés, SICO, Sfax, Tunisie) à raison de $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ PC. L'eau du robinet est donnée *ad libitum* durant toute l'étude. Après une semaine d'adaptation, les animaux sont répartis en 4 groupes de six rats chacun. Le 1^{er} groupe témoin reçoit une solution physiologique de NaCl à 0,9%. Le 2^{ème} groupe hyperuricémique reçoit une solution d'acide urique ($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PC) par voie intrapéritonéale. Le 3^{ème} groupe hyperuricémique est gavé avec de l'allopurinol ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PC) [22]. Le 4^{ème} groupe

hyperuricémique est gavé avec de l'huile de pin (100 mg.kg⁻¹ PC) [23]. Afin d'éviter l'interaction entre l'acide urique, en tant que prooxydant, et l'allopurinol ou l'huile de pin, en tant qu'antioxydant, 2 voies d'administration différentes ont été choisies [24].

Toutes les injections d'acide urique ou de chlorure de sodium et les préparations végétales ont été réalisées quotidiennement à une heure fixe et pendant 7 jours.

Le protocole expérimental a été approuvé par le Comité d'Ethique de l'Institution. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées selon les lignes directrices Internationales pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire [25].

Les graines de pin d'Alep (*Pinus halepensis*) achetées dans un marché local à Sfax (Tunisie) sont directement stockées à 15°C pendant un maximum de 3 jours, puis nettoyées manuellement pour éliminer les résidus. Les graines sont conservées dans des sacs hermétiques à 20°C. Cent grammes de graines de pin d'Alep sont broyés et placés dans un flacon fumé et homogénéisés avec 500 mL d'hexane. Après agitation pendant 4h à l'aide d'un shaker à raison de 180 tr/min, le mélange est centrifugé pendant 15 min à 1 000 x g à température ambiante (20°C). Le surnageant est ensuite filtré. La procédure d'extraction est répétée deux fois. Le solvant recueilli est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C. L'huile obtenue est conservée dans un flacon fumé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Prélèvements des échantillons biologiques

A J7, en phase post-prandiale, le sang est prélevé après décapitation rapide afin d'éviter tout stress dû à l'éther, centrifugé pendant 15 min à 1000 x g à 4°C. Les sérums obtenus sont stockés à -20°C jusqu'au jour de l'analyse. Les foies sont prélevés, excisés et broyés à l'aide d'un homogénéisateur (UltraTurax T25, Allemagne) (1/2, P/V) dans du tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,4. Après homogénéisation, l'homogénat hépatique est centrifugé à 3000 x g à 4°C pendant 15 min. Les surnageants sont récupérés et conservés à -80°C.

Analyses biochimiques

Détermination de l'acide urique sérique et hépatique et des biomarqueurs des lésions

hépatiques

La teneur en acide urique est estimée au niveau du sérum et de l'homogénat hépatique par un test colorimétrique (kit uricase-PAP, Biomaghreb Diagnostic Ariana, Tunisie).

Les activités enzymatiques sériques de l'aspartate amino-transaminase (ASAT), de l'alanine amino-transaminase (ALAT) et de la phosphatase alcaline (PAL) sont mesurées par kits (Biomaghreb Diagnostic Ariana, Tunisie).

Détermination de la peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides est déterminée au niveau des homogénats hépatiques selon la technique de Buege & Aust [26]. Chaque homogénat hépatique est mélangé avec 1 mL d'acide trichloroacétique (TCA) et centrifugé à 2500 x g pendant 10 mn. Un mL d'une solution d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,67% et 0,5 mL de surnageant sont incubés pendant 10 mn à une température de 90°C. L'absorbance du complexe TBA-MDA est déterminé à 532 nm.

Activités des enzymes antioxydantes

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est estimée selon la technique de Beyer et Fridovich [27]. Le mélange réactionnel contient 50µL d'homogénat tissulaire dans 0,1M de tampon phosphate de potassium (pH 7,4), 0,1mM d'EDTA, 13mM de L-méthionine, 2 mM de riboflavine et 75mM de nitro bleu tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich). Il se développe une coloration bleue mesurée à 560 nm. L'activité de la SOD est exprimée en unité.mg⁻¹ de protéines et représente la quantité d'enzyme requise pour inhiber la réduction du NBT de 50%. L'activité de la catalase (CAT) est dosée par la méthode d'Aebi [28]. Les absorbances sont mesurées à 240 nm par la variation de la densité optique consécutive à l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7,4, 200 µL de H₂O₂ et 20 µL d'homogénat à une température d'incubation de 25°C. L'activité enzymatique est exprimée en mmoL H₂O₂.mn⁻¹.g⁻¹ de protéines. L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) est mesurée selon la technique de Flohe et Günzler [29]. Un mL de mélange réactionnel contenant 0,3mL de tampon phosphate (0,1M, pH 7,4), 0,2mL de glutathione

2mM (GSH), 0,1mL d'azide de sodium (10mM), 0,1mL de H₂O₂ (1mM) et 0,3mL d'homogénat hépatique sont préparés. Après incubation à 37° C pendant 15 min, la réaction est terminée par addition de 0,5mL de TCA à 5%. Les tubes sont centrifugés à 1500 x g pendant 10 min et le surnageant est recueilli. Au surnageant (0,1mL) est rajouté du dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 0,4mg.mL⁻¹). La lecture se fait à une longueur d'onde $\lambda=420$ nm.

Les activités enzymatiques sont exprimées en fonction des teneurs en protéines du foie. Les protéines sont mesurées par la méthode de Lowry *et al.* [30], utilisant de l'albumine bovine sérique comme standard.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard de 6 rats par groupe. Après analyse de variance, la différence des moyennes entre les groupes de rats témoins et hyperuricémiques et les rats hyperuricémiques traités soit par l'allopurinol ou par l'huile de pin est effectuée par le test de Tukey. Les moyennes sont considérées comme significativement différentes à $P<0,05$. ^a vs témoins ; ^b vs hyperuricémiques.

Résultats

Teneurs sériques et hépatiques en acide urique

Chez les rats hyperuricémiques traités par l'huile de *Pinus Halepensis*, les teneurs en acide urique sérique et hépatique sont réduites de 67 et 70 %, comparées à celles du groupe hyperuricémique.

Activités de l'ASAT, l'ALAT et la PAL

L'activité enzymatique de l'ASAT, l'ALAT et la PAL est augmentée, respectivement de 42, 24 et 28% chez les rats hyperuricémiques comparés aux rats témoins. L'administration de l'allopurinol ou l'huile de pin réduit l'activité de ces enzymes de 3, 17 et 23% et de 12, 20 et 19%, respectivement par rapport à celle des rats hyperuricémiques.

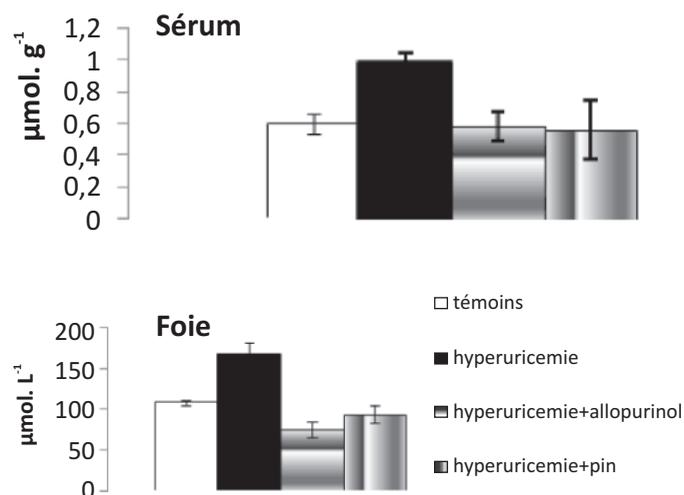


Fig. 1. Teneurs en acide urique du sérum et du foie
Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard de six rats par groupe. Après analyse de variance, la différence entre les moyennes est effectuée par le test de Tukey. $p<0,05$; ^a vs témoins, ^b vs hyperuricémiques.

Peroxydation lipidique au niveau hépatique

La peroxydation lipidique est augmentée de 274% chez les rats hyperuricémiques, comparés aux témoins ($p<0,05$) (Fig. 3). Le traitement par l'allopurinol ou l'huile de pin diminue la peroxydation lipidique de 93 et 44%, respectivement par rapport à celle des rats hyperuricémiques.

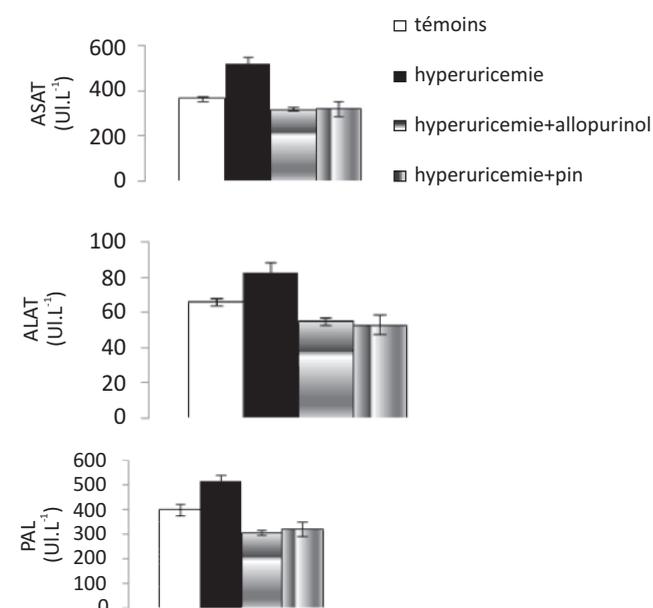


Fig. 2. Activités des biomarqueurs de lésions hépatiques
Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard de six rats par groupe. ASAT : Aspartate amino-transférase, ALAT : Alanine amino-transférase, PAL : Phosphatase alcaline. Après analyse de variance, la différence entre les moyennes est effectuée par le test de Tukey. $p<0,05$; ^a vs témoins, ^b vs hyperuricémiques.

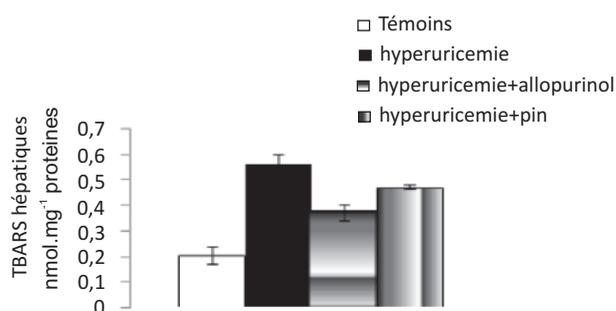


Fig.3. Teneurs hépatiques en TBARS

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard de six rats par groupe. TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique. Après analyse de variance, la différence entre les moyennes est effectuée par le test de Tukey. $p < 0,05$; ^a vs témoins, ^b vs hyperuricémiques.

Activités des enzymes antioxydantes hépatiques

L'activité des enzymes antioxydantes superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase (GPx) sont augmentées respectivement de 104, 210 et 177%, chez les rats traités par l'acide urique comparé à celles des rats témoins (Fig. 4). De même, chez les rats traités avec l'huile de pin, l'activité de la SOD, CAT et GPx sont diminuées respectivement de 32, 63 et 34% chez les rats traités par l'allopurinol et de 55, 168 et 49%, par rapport aux rats hyperuricémiques.

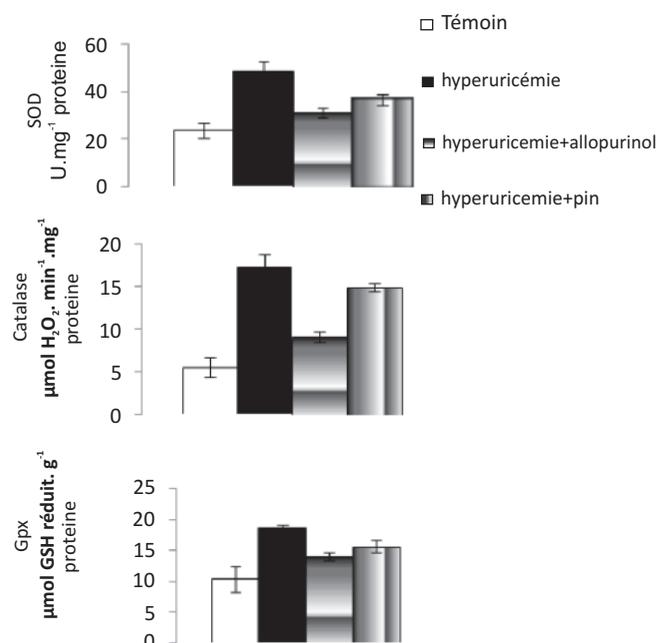


Fig. 4. Activités des enzymes antioxydantes hépatiques

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard de six rats par groupe. SOD : Superoxyde dismutase, GPs : Glutathion peroxydase. Après analyse de variance, la différence entre les moyennes est effectuée par le test de Tukey. $p < 0,05$; ^a vs témoins, ^b vs hyperuricémiques.

Discussion

Dans la présente étude, l'injection d'acide urique, à raison de 150 mg.kg^{-1} PC chez des rats adultes, provoque l'apparition d'une hyperuricémie. Après 7 jours de traitement, l'huile de pin induit chez les rats hyperuricémiques une réduction de l'acide urique, comparés aux animaux hyperuricémiques. L'effet hypouricémiant de l'huile de pin est comparable à celui de l'allopurinol, un médicament antihyperuricémique. L'hypouricémie observée dans cette étude, chez les rats rendus hyperuricémiques est accompagnée d'une réduction de l'acide urique hépatique. Le traitement des rats hyperuricémiques, après 7 jours, avec l'huile de pin provoque une amélioration totale du contenu en acide urique, qui est similaire à celui des rats témoins. Le traitement des rats hyperuricémiques atténue l'hyperuricémie, ce qui laisse suggérer un effet anti-goutteux.

La correction de l'uricémie observée dans cette étude, chez les rats hyperuricémiques et traités avec l'huile de pin pourrait être expliquée par l'inhibition de la production d'acide urique ou par l'augmentation de son excrétion [31]. La composition chimique de l'huile de pin, telles que les teneurs en composés phénoliques, en sels minéraux et en acides gras poly-insaturés [14] pourraient être à l'origine de l'activité hypouricémiante observée chez les rats rendus hyperuricémiques.

Ces résultats montrent que l'huile agit efficacement sur les biomarqueurs des lésions hépatiques, en diminuant les activités sériques de l'ASAT, l'ALAT et de la PAL. De même, chez les rats hyperuricémiques traités par l'allopurinol, les biomarqueurs des lésions hépatiques sont atténués, comparés à ceux des groupes hyperuricémiques.

L'analyse du statut redox hépatique montre une augmentation significative de la peroxydation lipidique et de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) chez les rats hyperuricémiques comparés aux rats témoins. Le groupe traité par l'huile de pin présente une amélioration significative des différents paramètres indicateurs de l'effet antioxydant. Une diminution du taux des TBARS a été observée chez les rats hyperuricémiques traités à l'huile de pin,

comparés au groupe hyperuricémique non traité. L'activité élevée des enzymes antioxydantes explique la réactivité des animaux hyperuricémiques pour lutter contre le stress oxydatif.

Conclusion

Il ressort de cette étude que, chez le rat rendu hyperuricémique, la supplémentation de l'huile de pin d'Alep entraîne une réduction du taux d'acide urique sérique et hépatique et des biomarqueurs des lésions hépatiques. Par ailleurs, l'huile de pin corrige le stress oxydatif induit par l'acide urique, en augmentant, la défense antioxydante enzymatique. D'autres études expérimentales, sur une durée plus longue de traitement à l'huile de pin, sont nécessaires pour confirmer ces résultats et approfondir, non seulement les connaissances sur les différents composés pourvus de cette activité, mais aussi pour cerner d'une manière plus fine les différentes actions possibles de ces composés et leur synergie.

Conflit d'intérêts

Aucun conflit d'intérêts.

Références

- Dalbeth N., Clark B., Gregory K., Gamble G., Sheehan T., Doyle A., et al. Mechanisms of bone erosion in gout: a quantitative analysis using plain radiography and computed tomography. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1290-5.
- Zhu Y., Pandya BJ., Choi HK. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3136-41.
- Bardin T., Richette P. Gout. *Lancet* 2010; 375:318-28.
- Pineda C., Amezcua-Guerra LM., Solano C., Rodríguez-Henríquez P., Hernández-Díaz C., Vargas A., et al. Joint and tendon subclinical involvement suggestive of gouty arthritis in asymptomatic hyperuricemia: an ultrasound controlled study. *Arthritis Res Ther* 2011; 13:R4.
- Bardin T. Épidémiologie de la goutte. *Rev Rhum* 2007; 74:147-9.
- Dalbeth N., Wong S., Gamble GD., Horne A., Mason B., Pool B., et al. Acute effect of milk on serum urate concentrations: a randomised controlled crossover trial. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1677-82.
- Charfi N., Dammak M., Mnif Feki M., Kaffel N., Rekik N., Mnif F., et al. Profil épidémiologie, clinique, métabolique et nutritionnel de l'obésité dans la région de Sfax (Tunisie). *Diab Metabolism* 2008; 34:A40-A100.
- Alaya Z., Ben Haj Slama K., Zeglaoui H., Ben Fredj H., Jamel A., Ben Abdesslem H., Bouajina E. Les motifs d'hospitalisation au cours de la goutte à propos de 16 cas. *La Tunisie Médicale* 2011; 89:121-2.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti GA., Uzunov D., et al. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem* 2009; 112:587-94.
- Keenan RT., O'Brien WR., Lee KH, Crittenden DB., Fisher MC., Goldfarb DS., et al. Prevalence of contraindications and prescription of pharmacologic therapies for gout. *Am J Med* 2011; 124:155-63.
- Pillinger MH., Goldfarb DS., Keenan RT. Gout and its comorbidities. *Bull Hosp J Dis* 2010; 68:199-203.
- Van den Bussche H., Koller D., Kolonko T., Hansen H., Wegscheider K., Glaeske G., et al. Which chronic diseases and disease combinations are specific to multimorbidity in the elderly? Results of a claims data based cross-sectional study in Germany. *BMC Public Health* 2011; 1186:1471-78.
- Bennesser Alaoui H., Tazi Mezalek Z., Harmouche H., Aouni M., Maaouni A. La goutte: nouvelles recommandations. *Espérance Médicale* 2010; 166:119-33.
- Cheikh-Rouhou S., Hentati B., Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Attia H. Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia. *Food Sci Technol Int* 2006; 15:407-16.
- Sezik E., Osman U., Demirci B., Baser KHC. Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turk J Chem* 2010; 34:313-25.
- Nasri N., Triki S. Lipid analysis of Tunisian pine seeds: *P. halepensis* Mill. and *P. pinea* L. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 2004; 4:244-7.
- Baytop T. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), 1st ed. Istanbul University, Istanbul; 2001, p.178-249.
- Blazso G., Gabor M., Schonlau F., Rohdewald P. Pycnogenols accelerates wound healing and

- reduces scar formation. *Phytother Res* 2004; 18:579-81.
19. Fujita T., Sezik E., Mamoru T., Yesilada E., Honda G., Takeda Y., et al. Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea Regions. *Econ Bot* 1995; 49:406-22.
 20. Tumen I., Hafizoglu H., Kilic A., Donmez IE., Sivrikaya H., Reunanen M. Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. Natively grown in Turkey. *Molecules* 2010; 15:5797-806.
 21. Gulçin I., Buyukokuroglu M E., Oktay M., Kufrevioglu O I. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra Arn. Subs p. pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *J Ethnopharmacol* 2003; 86:51-8.
 22. Essawy SS., Abdel-Sater KA., Elbaz AA. Comparing the effects of inorganic nitrate and allopurinol in renovascular complications of metabolic syndrome in rats: role of nitric oxide and uric acid. *Arch Med Sci* 2014; 10(3):537-45.
 23. Ince I., Yesil-Celiktas O., Karabay-Yavasoglu NU., Elgin G. Effects of *Pinus brutia bark* extract and Pycnogenols in a rat model of carrageen an induced inflammation. *Phytomedicine* 2009; 16:1101-4.
 24. Turner PV., Brabb T., Pekow C., Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50(5):600-13.
 25. Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. *Official Journal of the European Communities*, 1986, (JO 86/609/CEE) L358, p 1-18.
 26. Buege JA., Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology* 1984; 105:302-10.
 27. Beyer WF., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 1987; 161:559-66.
 28. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol* 1984; 105:121-6.
 29. Flohe L., Gunzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Method Enzymol* 1984; 105:114-21.
 30. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
 31. Garay RP., El-Gewely MR., Labaune JP., Richette P. Therapeutic perspectives on uricases for gout. *Joint Bone Spine* 2012; 79:237-42.