

## Sulu Çam Çıra Ekstresinin Diyabet Oluşturulan Sıçanların Testis Dokusu Üzerindeki Etkisi

Ökkeş YILMAZ<sup>1</sup>, Ersin DEMİR<sup>\*2</sup>, Halise SARIGÜL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 23119, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Düzce Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 81620, Düzce, Türkiye

(Alınış / Received: 16.02.2018, Kabul / Accepted: 22.06.2018, Online Yayınlanma / Published Online: 13.07.2018)

### Anahtar Kelimeler

Çam çıra ekstresi,  
Diyabet,  
Oksidatif stres,  
Vitamin,  
Yağ asidi

**Özet:** Bu çalışmanın temel amacı Tip 2 diyabetle indüklenen testis hasarında oksidatif stresin baskılanmasında sulu çam çıra ekstresinin olası etkilerini araştırmaktır. Çalışmada 49 adet 2,5 aylık erkek sıçanlar tercih edildi. Sıçanlar; kontrol, diyabet ve farklı dozlardan oluşan diyabet+çam çırası olmak üzere gruplara ayrıldı (D+Ç100, D+Ç200, D+Ç400). Kontrol grubu dışındaki sıçanlara 45 mg/kg streptozotocin (STZ) intraperitoneal olarak verilerek Tip-2 diyabet oluşturuldu. Diyabet oluşumundan sonra sıçanların içme sularına farklı dozlarda (100 g/L, 200 g/L, 400 g/L) çam çıra ekstresi eklenerek suya serbest olarak erişimleri sağlandı. Deneysel uygulamalar 10 hafta sürdü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, diyabet grubunda MDA seviyesinin kayda değer düzeyde arttığı ( $p<0.001$ ), total protein düzeyinin ise önemli düzeyde azaldığı ( $p<0.05$ ) belirlendi. Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında çıra suyu verilen gruplarda MDA düzeyinin önemli düzeyde azaldığı ( $p<0.001$ ), protein seviyesinin ise önemli düzeyde yükseldiği (D+Ç100) ( $p<0.05$ ) belirlendi. İncelenen diğer parametrelerde ( $\alpha$ -tokoferol, palmitik, oleik, linoleik asit ve doza bağlı diğer parametreler) ise istatistiksel açıdan anlamlı değişiklikler tespit edildi ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Sonuç olarak, sulu çam çıra ekstresinin oksidatif stres seviyesini azaltarak testiküler hasarı azaltmada potansiyel olarak yararlı olduğu gözlenmiştir.

## The Effect of Aqueous Pine Extract on Testis Tissue of Rats Induced Diabetes

### Keywords

Diabetes,  
Pine extract,  
Oxidative stress,  
Vitamin,  
Fatty acid

**Abstract:** The primary targets of this study were to scrutinize the probable effects of watery extract of pine extract in prohibiting oxidative stress in Type 2 diabetes generated testicular damage. In this study, we used 49 male rats of 2.5 months. Rats were assigned to groups including control, diabetes and diabetes+pine extract (D+Ç100, D+Ç200, D+Ç400). Type-2 diabetes was generated by giving intraperitoneally streptozotocin (STZ) at 45 mg/kg to rats except the control group. After the formation of diabetes, rats were given free access to the water by adding pine extract (100 g/L, 200 g/L, 400 g/L) to the drinking water at different doses. Experimental applications lasted for 10 weeks. It was ascertained that MDA level was significantly decreased ( $p<0.001$ ), total protein level was significantly increased ( $p<0.05$ ), in the testicular tissue of diabetes group when compared to the control group. It was identified that MDA degree was significantly decreased ( $p<0.001$ ), total protein level (D+Ç100) was significantly raised ( $p<0.05$ ), in the testicular tissue of diabetes+ pine extract groups when compared to the STZ group. It was ascertained statistically significant changes in examined the other parameters ( $\alpha$ -tocopherol, palmitic, oleic, linoleic acid and other dose-dependent parameters) ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). In conclusion, it was observed that aqueous extract of pine extract is potentially useful in shortening testicular damage by descending oxidative stress grade.

\*İlgili yazar: ersnca.dmr@gmail.com

## 1. Giriş

Deneysel diyabet modeli oluşturmada streptozotozin (STZ), en sık kullanılan kimyasal ajandır, pankreasta insülin üreten  $\beta$ -hücrelerinde hasar sonucu, insülin üretiminde defektler meydana getirerek metabolizmada insülin düzeyinin azalmasına, buna bağlı olarak da kan glukoz düzeyinin yükselmesine neden olur [1]. Diyabet birçok organı etkilediği gibi, erkek üreme sistemini de etkilemektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisiyle oluşan lipit peroksidasyon hem sperm hücre hasarına hem de DNA hasarına yol açmaktadır. Testisler üzerinde oluşan oksidatif hasar, erkek üreme sisteminin aktivitesinden birinci derecede önemli olan androjen üretiminde değişiklikler oluşturarak üreme siklusunu etkileyebilmektedir [2]. Artmış oksidatif strese karşı antioksidan kapasitenin yetersiz kalması, canlı sistemi diyabetin sekonder etkileri sonucunda görülen patolojiye yataklık yapmaktadır. Oksidatif stresin, hem diyabetin oluşum ve ilerlemesinde hem de komplikasyonlarının gelişiminde önemli bir faktör olduğu ifade edilmiştir. Nitekim çeşitli dokularda hiperglisemi, ROS düzeyinin aşırı artmasına neden olmaktadır [3]. Oksidatif hasar, testis fonksiyonunu etkileyen en zarar verici faktör olarak kabul edilmektedir [4]. Çam kabuk ekstresinin güçlü antioksidan etkisi nedeni ile sağlık ürünlerinde kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Çam kabuğu ekstresinin başlıca bileşenleri flavonoidler ve polifenollerdir [5, 6]. Çam kabuk ekstresinin serbest radikal süpürücü olarak işlev gördüğü, antioksidan enzimlerin sentezini arttırdığı, C ve E vitaminlerinin yenilenmesini düzenlediği bildirilmiştir [5, 7, 8]. Yapılan çalışmalarda çam ekstresinin, şeker hastalığı, astım, hipertansiyon ve oksidatif strese karşı yararlı etkiler gösterebildiği ifade edilmiştir [8, 6-10]. Çamın sahip olduğu güçlü antioksidan aktif bileşiklerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu ve bu nedenle farklı deneysel modeller üzerinde etkisinin araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada diyabet oluşturulmuş sıçanların testis dokusunda bazı biyokimyasal parametreler üzerinde çam çıra ekstresinin koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Deneysel çalışmada kullanılan *Sprague Dawley* cinsi sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden (FÜDAM) sağlandı. Deneysel çalışmalarda ağırlıkları 364-473 g olan, 2,5 aylık, toplam 49 adet erkek sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar kontrol ve Tip-2 diyabet grupları olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldı. Diyabet gurubunda çam çıra ekstresinin farklı dozların etkisinin incelenmesi için kendi içinde üç grup oluşturuldu. Kontrol grubu dışındaki sıçanlara, 45 mg/kg streptozotozin 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözülerek karın içine enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı [11].

Streptozotozin enjeksiyonunu müteakip 72 saat sonra, aç bırakılan hayvanların kuyruk venasından elde edilen kanın glukometre cihazında (Smart Chek) tahlili sonucu açlık kan şekeri seviyesi 140-200 mg/dL arası olan hayvanlar Tip 2 diyabetli olduğuna kanaat getirildi [12]. Yukarıda belirtilen ölçütlere göre diyabet oldukları belirlenen sıçanlara, çam dallarının yağlı çıra kısımlarından elde edilen küçük parçalar içme sularına aşağıda belirtilen miktarlarda katıldı ve sıçanların bu sudan 10 hafta boyunca içmeleri sağlandı.

**Kontrol grubu (n=5):** Herhangi bir uygulama yapılmadı.

**Tip-2 Diyabet grubu (n=11):** Bu sıçanlara tek doz 45 mg/kg STZ verilerek deneysel Tip-2 diyabet oluşturuldu ve deney süresince normal beslenmeleri sağlandı.

**Tip-2 Diyabet+Çam Çırası Grubu-100 g/L (n=11):** Bu sıçanlara tek doz 45 mg/kg STZ verilerek deneysel Tip-2 diyabet oluşturuldu ve diyabet oluşumundan 1 hafta sonra içme sularına 100 g/L çam çırası katılarak deney süresince bu suyu içmeleri sağlandı. Çalışma boyunca sıçanlar aynı kafeste tutuldu.

**Tip-2 Diyabet+Çam Çırası-200 g/L (n=11):** Bu sıçanlara tek doz 45 mg/kg STZ verilerek deneysel Tip-2 diyabet oluşturuldu ve diyabet oluşumundan 1 hafta sonra içme sularına 200 g/L çam çırası katılarak deney süresince bu suyu içmeleri sağlandı. Çalışma boyunca sıçanlar aynı kafeste tutuldu.

**Tip-2 Diyabet+Çam Çırası-400 g/L (n=11):** Bu sıçanlara tek doz 45 mg/kg STZ verilerek deneysel Tip-2 diyabet oluşturuldu ve diyabet oluşumundan 1 hafta sonra içme sularına 400 g/L çam çırası katılarak deney süresince bu suyu içmeleri sağlandı. Çalışma boyunca sıçanlar aynı kafeste tutuldu.

Çalışma sonunda hayvanlar etik yönergelere uygun biçimde dekapite edilerek dokuları alındı ve biyokimyasal işlemler yapıldı. Deneysel prosedürler, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan teyit alındıktan sonra etik kurallara uygun olarak yürütüldü (Karar No: 2013/67).

**Testis numunenin hazırlanması:** Grupların testis numuneleri, Tris-HCl, Trisbase ve EDTA (pH:7) tamponunda parçalandıktan sonra +4°C'de 9000 rpm'de 25 dakika (dk) santrifüj edildi. Sonuçta elde edilen üst faz malondialdehit (MDA) ve total protein analizlerinde kullanıldı. Alt faz ise yağ asidi, A, E (yağda çözünebilir) vitaminleri ile kolesterol analizlerinin yapılmasında kullanıldı [13].

**MDA analizi:** MDA, Lipit peroksidasyonunun en önemli göstergesidir ve Okhawa ve arkadaşlarının tanımladığı metotta bazı değişiklikler yapılarak spektrofotometre cihazında ölçümler yapıldı [14]. Değerler nmol/g doku olarak ifade edildi.

**Protein analizi:** Lowry ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre Total protein miktarı ölçüldü [15]. Değerler µg/g olarak gösterildi.

**Doku numunesinde yağ asidi, A ve E vitaminleri ile kolesterol analizi:** Hara ve Radin'in tarafından rapor edilen ekstraksiyon metoduna göre doku numuneleri hazırlandı [16]. Doku numuneleri hekzan-isopropanol (3:2 (v/v)) çözeltisinde parçalandı ve santrifüj edildi. Yağ asidi içerik ve miktarını tespit edebilmek için ayrılan numunelere metanolik sülfirik asit (% 2'lik) eklendi ve numunelerin reaktifle karışması sağlandı. Sonra bu homojenat 55°C'de 15 saat metil esterlerinin oluşumu için beklenildi [17]. Metil esterini içeren karışımlar, azot gaz akımı (45°C) kullanılarak çözücüleri uçuruldu, kalan kısım n-heptan (1,0 ml) yardımı ile çözüldü. Analizler gaz kromatografisinde yapıldı. Analiz için SP™-2380 kapiller GC kolon (L× ID. 30 m × 0.25 mm, df 0.20 µm) (Supelco, Sigma, USA) kullanıldı. Azot gazı taşıyıcı olarak kullanıldı [18].

A, E vitaminleri ile kolesterol için ayrılan numunelere metanolde çözülmüş potasyum hidroksit (% 5'lik, KOH) eklendi ve karıştırıldı sonra bu karışım 85°C'de 15 dk tutuldu. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller hekzan ile karıştırıldı. Hekzanlı kısım azot gazının yardımı ile uçuruldu. Kalan tortu 1,0 ml eşit hacimdeki asetonitril/metanol karışımında çözümlenerek analiz edildi. Analizler HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan) cihazında yapıldı. Taşıyıcı faz asetonitril/metanol (% 60+% 40, v/v) karışımı kullanıldı. Süpelsil LC 18 (15×4.6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolon kullanıldı. 326 nm dedeksiyon dalga boyunda A vitamini, 202 nm dedeksiyon dalga boyunda α-tokoferol analizi yapıldı [19, 20].

**İstatistik Analizi:** İstatistik analizler, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programında yapıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırmada ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi ve grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise LSD testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak gösterildi ve anlam düzeyi P<0.05 olarak tayin edildi.

### 3. Bulgular

Testis dokusundan elde edilen biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde (Tablo 1); total protein düzeyi kontrol grubuna göre Diyabet, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarında kısmen azalmasına rağmen ( $p<0.05$ ), D+Çıra-100 grubunda görülen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) görüldü. Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında D+Çıra-100 grubunda total protein düzeyinin kısmen yüksek olduğu halde ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ).

MDA düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; D+Çıra-100, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarında görülen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı

olmadığı ( $p>0.05$ ), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Diyabet grubunda MDA düzeyinin kayda değer düzeyde arttığı ( $p<0.001$ ) görüldü. MDA düzeyi diyabet gruplarına göre diğer gruplarda (D+Çıra-100, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400) belirgin düzeyde azalmıştır ( $p<0.001$ ).

Retinol düzeyi kontrol grubuna göre; D+Çıra-400 grubunda kısmen yüksek olmasına rağmen ( $p<0.05$ ), D+Çıra-200, Diyabet ve D+Çıra-100 gruplarında kayda değer düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Retinol düzeyi diyabet grubuna göre D+Çıra-100 grubuna göre farklılık göstermediği halde ( $p>0.05$ ), D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarında azalmıştır ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ).

α-Tokoferol düzeyi kontrol grubuna göre; Diyabet grubunda kayda değer düzeyde arttığı ( $p<0.01$ ) yine D+Çıra-100, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarında da kayda değer düzeyde arttığı saptandı ( $p<0.001$ ). α-Tokoferol düzeyi diyabet grubuna göre çam çıra ekstresi verilen gruplarda belirgin düzeyde artmıştır ( $p<0.001$ ).

Kolesterol düzeyi kontrol grubuna göre; D+Çıra-100 grubunda kısmen yüksek olmasına rağmen ( $p<0.05$ ), Diyabet, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarında kayda değer düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0.01$ ). Kolesterol düzeyi diyabet grubuna göre D+Çıra-100 grubunda kısmen azalmış olmasına rağmen ( $p<0.05$ ), diğer gruplarda değişim gözlenmedi ( $p>0.05$ ).

Palmitik asit (16:0) düzeyi kontrol grubuna göre; Diyabet grubunda kısmi düzeyde azalmasına karşın ( $p<0.05$ ), D+Çıra-100, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarında kayda değer düzeyde yüksek olduğu saptandı ( $p<0.01$ ). Palmitik asit düzeyi D+Çıra-100, D+Çıra-200 ve D+Çıra-400 gruplarına göre diyabet grubunda belirgin düzeyde azaldığı belirlendi ( $p<0.001$ ).

Stearik asit (18:0) düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; diyabet grubunda azaldığı halde ( $p<0,05$ ), D+Çıra-100 ve D+Çıra-400 gruplarında yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). D+Çıra-200 grubunda ise farklılık bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Oleik asit (18:1) düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; D+Çıra-100 ve D+Çıra-200 gruplarında kayda değer bir düzeyde arttığı ( $p<0.05$ ), D+Çıra-400 grubunda ise kayda değer bir şekilde azaldığı ( $p<0.01$ ), aynı şekilde Diyabet grubunda da kayda değer bir şekilde azaldığı görüldü ( $p<0.001$ ).

Linoleik asit (18.2) düzeyi kontrol grubuna göre; D+Çıra-200 grubunda görülen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ), D+Çıra-100 grubunda bu düzeyin kısmen yüksek olmasına rağmen ( $p<0.05$ ), Diyabet ve D+Çıra-400 gruplarında belirgin bir düzeyde azalışın olduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

**Tablo 1.** *Pinus* sp'nin odun kısmından elde edilen su ekstrenin sıçan testis dokusu üzerindeki biyokimyasal parametrelere etkisi (mg/g)

Gruplar	Kontrol	Tip-2 Diyabet grubu	Tip-2 Diyabet+Çam Çıra 100 g/L	Tip-2 Diyabet+Çam Çıra 200 g/L	Tip-2 Diyabet+Çam Çıra 400 g/L
Total Protein	157.34±7.40 <sup>a</sup>	132.65±4.88 <sup>b</sup>	155.96±4.46 <sup>a</sup>	130.19±6.53 <sup>b</sup>	135.11±6.58 <sup>b</sup>
MDA (µmol/g)	83.60±2.28 <sup>a</sup>	138.91±7.30 <sup>d</sup>	82.83±8.11 <sup>a</sup>	89.45±5.54 <sup>a</sup>	88.67±5.26 <sup>a</sup>
Retinol	0.51±0.25 <sup>a</sup>	1.06±0.15 <sup>d</sup>	1.13±0.29 <sup>d</sup>	0.87±0.15 <sup>c</sup>	0.66±0.10 <sup>b</sup>
α-Tokoferol	5.44±1.02 <sup>a</sup>	7.96±1.51 <sup>c</sup>	18.9±5.16 <sup>d</sup>	14.82±4.29 <sup>d</sup>	11.18±3.32 <sup>d</sup>
Kolesterol	0.77±0.02 <sup>a</sup>	1.16±0.09 <sup>c</sup>	0.93±0.06 <sup>b</sup>	1.06±0.14 <sup>c</sup>	1.11±0.01 <sup>c</sup>
Palmitik asit (16:0)	0.50±0.13 <sup>a</sup>	0.36±0.11 <sup>b</sup>	0.84±0.35 <sup>c</sup>	0.65±0.24 <sup>c</sup>	0.70±0.17 <sup>a</sup>
Stearik asit (18:0)	0.12±0.04 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>b</sup>	0.17±0.06 <sup>b</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>b</sup>
Oleik asit (18:1), n9	0.45±0.01 <sup>a</sup>	0.20±0.05 <sup>d</sup>	0.75±0.43 <sup>c</sup>	0.55±0.26 <sup>b</sup>	0.34±0.12 <sup>b</sup>
Linoleik asit (18.2), n6	0.56±0.015 <sup>a</sup>	0.14±0.04 <sup>d</sup>	0.78±0.09 <sup>b</sup>	0.50±0.04 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>d</sup>
Araşidonik asit (20:4), n6	0.26±0.07 <sup>a</sup>	0.22±0.07 <sup>a</sup>	0.32±0.084 <sup>a</sup>	0.26±0.083 <sup>a</sup>	0.42±0.11 <sup>d</sup>
Dokosaheksaenoik (22:6), n3	0.11±0.02 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>b</sup>	0.15±0.03 <sup>b</sup>	0.16±0.02 <sup>b</sup>	0.12±0.04 <sup>a</sup>

**a: p>0.05** = Gruplar arasındaki nüanslar istatistiksel bakış açısı ile anlamlı değil, **b: p<0.05** = Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel bakış açısı ile anlamlıdır, **c: p<0.01** = Gruplar arasındaki farklılıkların derecesi önemli düzeydedir, **d: p<0.001** = Gruplar arasındaki farklılıkların derecesi belirgin düzeydedir

Araşidonik asit (20:4) düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Diyabet, D+Çıra-100 ve D+Çıra-200 gruplarında görülen değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $p>0.05$ ), D+Çıra-400 grubunda ise belirgin bir düzeyde arttığı görüldü ( $p<0.001$ ). Araşidonik asit düzeyi diyabet grubuna göre D+Çıra-400 grubunda anlamlı düzeyde yükseldiği tespit edildi ( $p<0,001$ ).

Dokosaheksaenoik (22:6) düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Diyabet, D+Çıra-100 ve D+Çıra-200 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ( $p<0.05$ ), D+Çıra-400 grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olmadığı ( $p>0.05$ ) görüldü.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bitkilerde bulunan çeşitli polifenolik bileşiklerin, antitümör, immünomodülatör ve antioksidan aktiviteler sergilediği ve kimyasal ilaçlarla karşılaştırıldığında düşük toksisite gösterdikleri bildirilmiştir [21]. Oksidatif stres, metabolizmada reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik sonucunda ortaya çıkmakta, kanser, diyabet, sinir sistemi hastalıkları ile kalp hastalıklarının patogeneğinde rol oynamaktadır [22]. ROS üretimini engelleme veya süpürme kabiliyeti olan antioksidan bileşiklerin, hastalıkları önleme veya azaltma

konusunda terapötik potansiyel sağlayabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, antioksidan takviyesinin hiperglisemiye bağlı olarak gelişen komplikasyonlar üzerinde yararlı etkiler gösterdiği ve oksidatif stresin modüle edilmesinde olumlu özellikler gösterdiği ifade edilmiştir [23, 25]. Çamdan elde edilen ekstraktın farklı aktif bileşikler açısından zengin olduğu ve güçlü antioksidan özellikler sergiledikleri ifade edilmiştir [25, 27]. Diyabette çeşitli dokularda ve testis dokusunda MDA düzeyinin arttığı ifade edilmiştir [28, 1-31]. Testiküler hücrelerin plazma zırları yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) oluşan fosfolipidleri içermekte fakat sitoplazmaları ise nispeten düşük konsantrasyonda antioksidan sisteme sahiptir. Bu durum bu hücreleri oksidatif strese yatkın hale getirmektedir. STZ'nin neden olduğu diyabette oksidatif strese bağlı olarak yapısal ve işlevsel değişiklikler testis dokusunda patofizyolojik işlev bozukluklarının gelişimine katkıda bulunabilmektedir [31]. Bizim çalışmamızda da testis dokusunda MDA düzeyinin arttığı ( $p<0.05$ ), çam çıra ekstresi verdiğimiz gruplarda MDA düzeyinin azaldığını belirledik ( $p<0.05$ ) (Tablo 1). Bu durum çam çırasında bulunan güçlü antioksidan bileşiklerin etkisine bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir. Çam çıra ekstraktında bulunan aktif bileşiklerin diyabete bağlı olarak testis dokusunda patofizyolojik işlev bozuklukların önlenmesinde yararlı etkiler göstereceğini söyleyebiliriz. Diyabet kaynaklı oksidatif hasarın, testis dokusunda antioksidan

ilavesi ile düzeltilebileceği bildirilmiştir [32]. Farklı deney modellerinde çam ürünlerinin oksidatif stresi azalttığı, antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve radikal süpürücü özellikler gösterdiği belirlenmiştir [6, 26-33, 35]. Doğada E vitamininin en bilinen şekli  $\alpha$ -tokoferoldür. E vitamini, lipid peroksidasyonunun yayılımını önleyen zincir kırıcı bir antioksidan olarak işlev görmektedir, aynı zamanda radikal süpürücü ve membran fosfolipidleri ile plazma lipoproteinlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini oksidatif hasara karşı korumaktadır [36]. Çoklu doymamış yağ asitleri normal testiküler fonksiyonun korunması için gereklidirler. Bu çalışmada kontrol grubuna göre tüm gruplarda  $\alpha$ -tokoferol düzeyi yükselmiştir ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Fakat çıra ekstresi verdiğimiz gruplarda testis dokusunda MDA düzeyi azalarak kontrol grubu düzeyine kadar azalmıştır ( $p>0.05$ ). Diyabet grubunda ise MDA düzeyi artmış ( $p<0.05$ ),  $\alpha$ -tokoferol düzeyindeki yükselme sınırlı kalmış buda oksidatif hasara yatkınlığın gelişmesine yol açmış olabilir (Tablo 1). Çam çıra ekstresi uygulanan gruplarda MDA düzeyindeki azalmaya olasılıkla testis dokusunda artan  $\alpha$ -tokoferol düzeyi sebep olmuş ve testis dokusunu oksidatif hasardan korumuştur. Çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyondan korumada,  $\alpha$ -tokoferolün antioksidan fonksiyonu kritik öneme taşımaktadır [37]. Kolesterol yaşam için gerekli ve hücre zar yapısında yer alan bir moleküldür. Beyinde, sinir dokusunda, deri ve adrenal bezlerde bol miktarda bulunur. Kolesterol aynı zamanda steroid hormonlar, D vitamini ve safra asitlerinin üretimi içinde gerekli olan bir bileşiktir. Çalışmamızda diyabet gruplarında kolesterol düzeyinin arttığını bulduk ( $p<0.01$ ). Bazı çalışmalarda diyabet grubunda kolesterol düzeyinin azaldığı [38, 39], bazı çalışmalarda da, bizim çalışmamızda olduğu gibi arttığı bulunmuştur [40]. Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse de tıbbi diyabet bulgularında doku yağ asidi kompozisyonunun bozulduğu bilinmektedir. Testis fosfolipitleri linoleik, araşidonik, dokosapentaenoik ve dokosaheksaenoik asit türlerinden oluşur [31, 37]. Diyabette testis dokusunda, yağ asidi desaturasyonunda yer alan enzimlerin inhibisyonuna bağlı olarak çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) biyosentezinde bozulmalar ortaya çıkmaktadır [41]. Bu çalışmada da, diyabetik sıçanların testis doku lipid bileşiminde önemli değişikliklerin olduğunu gözlemledik ( $p>0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Çalışmamızda diyabet grubunda gözlenen düşük palmitik asit seviyesi insülin yetersizliği ile ilişkili olabilir, çünkü hem asetil CoA karboksilaz hem de yağ asidi sentezinin aktiviteleri insüline bağlıdır. Çam çıra ekstresi verdiğimiz gruplarda, çıra ekstresinde bulunan aktif bileşiklerin bu enzimler üzerinde etkili olduğu söylenebilir, çünkü diyabet grubuna göre çıra verilen grupta palmitik asit düzeyinin önemli ölçüde arttığı görülmektedir ( $p<0.01$ ,  $p>0.05$ ). Stearoil-CoA desaturaz (SCD) stearik asidi substrat olarak kullanır ve tekli doymamış yağ asidi olan oleik asidi (18:1) sentezler [42]. SCD enziminin aktivitesi insülin

varlığında artmaktadır. Bu yağ asidi, sinyal transdüksiyonu ve hücreler arası iletişim gibi görevler üstlenmiştir [43]. Linoleik asit düzeyi diyabet grubunda önemli düzeyde azaldığı ( $p<0.001$ ), çıra ekstresi verilen gruplarda genelde linoleik asit düzeyinin korunduğu görülmektedir ( $p>0.05$ ,  $p<0.05$ ). Olasılıkla çıra ekstresinde bulunan aktif bileşiklerin özellikle düşük konsantrasyonlarda yağ asidi sentezi üzerinde olumlu etkiler göstermiş olabilir. Bu süreç  $\Delta 6$  desaturaz ve  $\Delta 5$  desaturaz marifeti ile gerçekleşmekte ve bu desaturazların metabolik kontrolünü insülin sağlamaktadır [44]. Kontrol grubuna göre diyabetik sıçanlarda araşidonik asit düzeyinin azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) dokosaheksaenoik düzeyinin arttığı ( $p<0.05$ ), diyabet gruplarına uygulanan çam çıra ekstresinin istatistiksel olarak farklı sonuçlar gösterdiği görülmektedir ( $p>0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ). Diyabette testis dokusunda araşidonik asit düzeyinin değerlendirildiği çalışmalarda araşidonik asit düzeyinin azaldığı görülmektedir [45,31-47]. Araşidonik asidin, sinyal iletimi, kemotaksis, hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptozis, testiküler steroidogenez gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir [48]. E vitamini fosfolipaz A2 ve 5-lipoksigenaz aktivitelerini etkileyerek araşidonik asit metabolizmasını düzenlediği ifade edilmiştir [49]. Çalışmamızda da çam çıra ekstresi verilen gruplarda  $\alpha$ -tokoferol düzeyinin yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 1). Membran lipidlerinin peroksidasyonu, PUFA tüketimini önleyen veya en aza indirgeyen yağ asidi metabolizmasında adaptif değişikliklere yol açtığı ifade edilmiştir [50]. Buna göre doymamış yağ asidi biyosentezinde ortaya çıkan sonuçlar, oksidatif strese doku yağ asidi bileşiminin korunmasına yönelik düzenleyici mekanizmalara bağlı olabilir.

Sonuç olarak sulu çam çıra ekstresinin diyabet kaynaklı oksidatif strese, stres seviyesini azaltarak testiküler hasarı azaltmada potansiyel olarak yararlı olabileceği görülmüştür.

## Teşekkür

Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FF.13.17) tarafından bu bilimsel aktivite desteklenmeye değer bulunmuştur.

## Kaynakça

- [1] Koroglu, P., Senturk, G. E., Yucel, D., Ozakpinar, O. B., Uras, F., Arbak, S. 2015. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes, *Peptides*, 63, 47-54.
- [2] Yigitturk, G., Acara, A. C., Erbas, O., Oltulu, F., Yavasoglu, N. U., Uysal, A., Yavasoglu, A. 2017. The antioxidant role of agomelatine and gallic acid on oxidative stress in STZ induced type I

- diabetic rat testes. *Biomed Pharmacother*, 87, 240-246.
- [3] Adedara, I. A., Awogbindin, I. O., Anamelechi, J. P., Farombi, E. O. 2015. Garcinia kola seed ameliorates renal, hepatic, and testicular oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*, 53(5), 695-704.
- [4] Li, M., Liu, Z., Zhuan, L., Wang, T., Guo, S., Wang, S., Liu, J., Ye, Z. 2013. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Mol Med Rep*, 7(1), 47-52.
- [5] Rohdewald, P. 2002. A review of the French maritime pine bark extract (pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 40, 158-168.
- [6] Lee, I. C., Ko, J. W., Park, S. H., Shin, N. R., Shin, I.S., Kim, Y. B., Kim, J. C. 2017. Ameliorative effects of pine bark extract on cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Ren Fail*, 39(1), 363-371.
- [7] Guo, Q., Zhao, B., Packer, L. 1999. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*, 27, 1308-1312.
- [8] Maritim, A., Dene, B. E., Sanders, R. A., Watkins, J.B. 2003. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 17, 193-198.
- [9] McGrath, K. C., Li, X. H., McRobb, L. S., Heather, A. K. 2015. Inhibitory Effect of a French Maritime Pine Bark Extract-Based Nutritional Supplement on TNF- $\alpha$ -Induced Inflammation and Oxidative Stress in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 260530.
- [10] Eryılmaz, A., Eliyatkin, N., Demirci, B., Basal, Y., Kurt Omurlu, I., Gunel, C., Aktas, S., Toka, A., Basak S. 2016. Protective effect of Pycnogenol on cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Pharm Biol*, 54(11), 2777-2781.
- [11] Erdal, N., Gürgül, S., Kavak, S., Yildiz, A., Emre, M. 2011. Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetes mellitus in rats. *Biol Trace Elem Res*, 140(3), 342-53.
- [12] Dewanjee, S., Das, A. K., Sahu, R., Gangopadhyay, M. 2009. Antidiabetic activity of *Diospyros peregrina* fruit: effect on hyperglycemia, hyperlipidemia and augmented oxidative stress in experimental type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol*, 47(10), 2679-85.
- [13] Demir, E., Yılmaz, Ö. 2014. Streptozotosin ile Tip-1 diyabet oluşturulan sıçanlarda acı badem yağının serum ve eritrositlerdeki bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18, 13-21.
- [14] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-8.
- [15] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- [16] Hara, A., Radin, N. S., 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*, 90(1), 420-6.
- [17] Christie, W. W. 1992. Gas chromatography and lipids. The Oil Press, Glasgow, 302s.
- [18] Tvrzická, E., Vecka, M., Staňková, B., Žák, A., 2002. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, 465, 337-350.
- [19] Sánchez-Machado, D. I., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macroalgae. *J Chromatogr A*, 976(1-2), 277-84.
- [20] López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I., Ríos-Vázquez, N. J. 2006. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J Chromatogr A*, 1105(1-2), 135-9.
- [21] Yi, J., Cheng, C., Li, X., Zhao, H., Qu, H., Wang, Z., Wang, L. 2017. Protective mechanisms of purified polyphenols from pinecones of *Pinus koraiensis* on spleen tissues in tumor-bearing S180 mice in vivo. *Food Funct*, 8(1), 151-166.
- [22] Aruoma, O. I. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 72(2), 199-212.
- [23] Bajaj, S., Khan, A. 2012. Antioxidants and diabetes. *Indian J Endocrinol Metab*, 16(Suppl 2), S267-S271.
- [24] Rahimi-Madiseh, M., Malekpour-Tehrani, A., Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M. 2016. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pac J Trop Med*, 9(9), 825-31.
- [25] Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*, 27(5-6), 704-24.

- [26] Iravani, S., Zolfaghari, B. 2014. Phytochemical analysis of *Pinus eldarica* bark. *Res Pharm Sci*, 9(4), 243-50.
- [27] Babaee, F., Safaeian, L., Zolfaghari, B., Haghjoo Javanmard, S. 2016. Cytoprotective Effect of Hydroalcoholic Extract of *Pinus eldarica* Bark against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. *Iran Biomed J*, 20(3), 161-7.
- [28] Nain, P., Saini, V., Sharma, S., Nain, J. 2012. Antidiabetic and antioxidant potential of *Emblica officinalis* Gaertn. leaves extract in streptozotocin-induced type-2 diabetes mellitus (T2DM) rats. *J Ethnopharmacol*, 142(1), 65-71.
- [29] Florence, N. T., Benoit, M. Z., Jonas, K., Alexandra, T., Désiré, D. D., Pierre, K., Théophile, D. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 151(2), 784-90.
- [30] Saliu, J. A., Oboh, G., Omojokun, O. S., Rocha, J. B., Schetinger, M. R., Guterries, J., Stefanello, N., Carvalho, F., Schmatz, R., Morsch, V. M., Boligon, A. 2016. Effect of dietary supplementation of *Padauk* (*Pterocarpus soyauxii*) leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats' brain and platelets. *Biomed Pharmacother*, 84, 1194-1201.
- [31] Bal, R., Türk, G., Tuzcu, M., Yılmaz, O., Ozercan, I., Kuloglu, T., Gür, S., Nedzvetsky, V. S., Tykhomyrov, A. A., Andrievsky, G. V., Baydas, G., Naziroglu, M. 2011. Protective effects of nanostructures of hydrated C(60) fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology*, 282(3), 69-81.
- [32] Shrilatha, B., Muralidhara. 2007. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol*, 23(4), 578-87.
- [33] Won, S. B., Jung, G. Y., Kim, J., Chung, Y. S., Hong, E. K., Kwon, Y. H. 2013. Protective effect of *Pinus koraiensis* needle water extract against oxidative stress in HepG2 cells and obese mice. *J Med Food*, 16(7), 569-76.
- [34] Devaraj, S., Vega-López, S., Kaul, N., Schönlaue, F., Rohdewald, P., Jialal, I. 2002. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*, 37(10), 931-4.
- [35] Parveen, K., Khan, M. R., Mujeeb, M., Siddiqui W. A. 2010. Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chem Biol Interact*, 186(2), 219-27.
- [36] Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., Mahdi, F. 2014. The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 14(2), 157-65.
- [37] Gavazza, M., Catalá, A. 2001. The effect of alpha-tocopherol on the lipid peroxidation of mitochondria and microsomes obtained from rat liver and testis. *Mol Cell Biochem*, 225(1-), 121-8.
- [38] De, A., Singh, M. F., Singh, V., Ram, V., Bisht, S. 2016. Treatment effect of l-Norvaline on the sexual performance of male rats with streptozotocin induced diabetes. *Eur J Pharmacol*, 771, 247-54.
- [39] Hamden, K., Jaouadi, B., Carreau, S., Aouidet, A., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Elfeki, A. 2010. Potential protective effect on key steroidogenesis and metabolic enzymes and sperm abnormalities by fenugreek steroids in testis and epididymis of surviving diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*, 116(3), 146-55.
- [40] Arikawe, A. P., Oyerinde, A., Olatunji-Bello, I. I., Obika, L. F. 2012. Streptozotocin diabetes and insulin resistance impairment of spermatogenesis in adult rat testis: central vs. local mechanism. *Niger J Physiol Sci*, 27(2), 171-9.
- [41] Huang, Y. S., Horrobin, D. F., Manku, M. S., Mitchell, J., Ryan, M. A. 1984. Tissue phospholipid fatty acid composition in the diabetic rat. *Lipids*, 19(5), 367-70.
- [42] Ntambi, J. M. 1995. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res*, 34, 139-150.
- [43] Miyazaki, M., Gomez, F. E., Ntambi, J. M. 2002. Lack of stearoyl-CoA desaturase-1 function induces a palmitoyl-CoA Delta6 desaturase and represses the stearoyl-CoA desaturase-3 gene in the preputial glands of the mouse. *J. Lipid Res*, 43, 2146-2154.
- [44] Nakamura, M. T., Nara T. Y. 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 24, 345-76.
- [45] Wilder, P. J., Coniglio J. G. 1984. The effects of streptozotocin diabetes and of dietary protein content on the composition and metabolism of testicular lipids. *Proc Soc Exp Biol Med*, 177(3), 399-405.
- [46] Hurtado de Catalfo, G. E., De Gómez Dumm, I. N. 1998. Lipid dismetabolism in Leydig and Sertoli cells isolated from streptozotocin-diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(9), 1001-10.
- [47] Hu, Q., Ishii, E., Nakagawa, Y. 1994. Differential changes in relative levels of arachidonic acid in major phospholipids from rat tissues during the

- progression of diabetes. *J Biochem*, 115(3), 405-408.
- [48] Romanelli, F., Valenca, M., Conte, D., Isidori, A., Negro-Vilar, A. 1995. Arachidonic acid and its metabolites effects on testosterone production by rat Leydig cells. *J Endocrinol Invest*, 18(3), 186-93.
- [49] Chan, A. C. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol*, 71(9), 725-31.
- [50] Burczynski, J. M., Southard, S. J., Hayes, J. R., Longhurst, P. A., Colby, H. D. 2001. Changes in mitochondrial and microsomal lipid peroxidation and fatty acid profiles in adrenal glands, testes, and livers from alpha-tocopherol-deficient rats. *Free Radic Biol Med*, 30(9), 1029-35.