

DeneySEL Diyabetik Sıçanlarda Metformin, E Vitamini ve Çörek Otu Yağının Karaciğer Dokusu Üzerine Hepatoprotektif Etkilerinin Karşılaştırılması

Comparison of Hepatoprotective Effects of Metformin, Vitamin E and Black Seed Oil on Liver Tissue in Experimental Diabetic Rats

Hayat AYZ¹ , Seval KAYA² , Yusuf NERGİZ¹ 

¹ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

² İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE

Öz.

Amaç: Çalışmanın amacı, diyabetik sıçanlarda gelişen karaciğer hasarına karşı metformin, E vitamini ve çörek otu yağının hepatoprotektif etkilerini karşılaştırmaktır.

Materyal ve metod: 30 adet Wistar Albino sıçan, Kontrol (n:6), Diyabet (n:6), Diyabet + Çörek Otu Yağı (n:6), Diyabet + E Vitamini (n:6) ve Diyabet + Metformin (n:6) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Diyabeti indüklemek amacıyla tek doz 45 mg/kg Streptozotocin intraperitoneal yolla uygulandı. Diyabet + E vitamini grubuna 100 mg/kg/gün E vitamini, Diyabet + Metformin grubuna 100 mg/kg/gün metformin ve Diyabet + Çörek otu yağı grubuna 2.5 ml/kg/gün çörek otu yağı oral yollarla uygulandı. Karaciğer dokularından elde edilen parafin kesitler Hematoksilin-Eozin, Masson Trikrom ve PAS boyaları ile boyandı.

Bulgular: Grupların histolojik kesitlerinin incelenmesinde; diyabet grubu karaciğer kesitlerinde vakuolizasyon, piknotik çekirdek, sinüzoidlerde dilatasyon, azalan glikojen içeriği ve konjesyon izlendi. Metformin grubunda hasar bulgularında kısmen ve E vitamini grubunda ise minimal iyileşme görüldü. Çörek otu yağı grubunun hasar skorlaması değerlendirilmesinde diğer tedavi uygulamalarına göre daha iyi bir etkiye sahip olduğu görüldü. p<0.01.

Sonuç: Diyabetin sebep olduğu karaciğer hasarına karşı çörek otu yağının iyileştirici etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu yağı, Diyabet, E vitamini, Karaciğer, Metformin

Abstract

Background: The aim of the study was to compare the hepatoprotective effects of metformin, vitamin E and black seed oil against liver damage developed in diabetic rats.

Materials and Methods: 30 Wistar Albino rats Control (n:6), Diabetes (n:6), Diabetes + Black Cumin Oil (n:6), Diabetes + Vitamin E (n:6) and Diabetes + Metformin (n:6) were divided into 5 groups. In order to induce diabetes, a single dose of 45 mg/kg Streptozotocin was administered intraperitoneally. 100 mg/kg/day vitamin E was administered to the Diabetes + Vitamin E group, 100 mg/kg/day metformin to the Diabetes + Metformin group, and 2.5 ml/kg/day black seed oil to the Diabetes + Black Cumin oil group. Paraffin sections obtained from liver tissues were stained with Hematoxylin-Eosin, Masson Trichrome and PAS stains.

Results: Vacuolization, pycnotic core, dilatation of sinusoids, decreased glycogen content and congestion were observed in liver sections of diabetes group. There was partial improvement in the damage findings in the metformin group and minimal improvement in the vitamin E group. It was seen that the black seed oil group had a better effect in the evaluation of damage scoring than other treatment applications. p<0.01.

Conclusions: It is thought that black cumin oil may have healing effects against liver damage caused by diabetes.

Keywords: Black seed Oil, Diabetes, Liver, Metformin, Vitamin E

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Hayat AYZ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 212280 Sur, Diyarbakır, TÜRKİYE

E-mail: ayazhayat44@gmail.com

Geliş tarihi / Received: 13.03.2022

Kabul tarihi / Accepted: 18.05.2022

DOI: 10.35440/hutfd.1087068

Giriş

Diyabetes mellitus (DM), karbonhidrat, lipit, protein ve mineral metabolizmasında işlev bozukluğuna yol açan, kronikleşen yüksek kan glukoz düzeyi ile karakterize bir hastalıktır (1). DM, komplikasyonlarıyla büyük bir küresel sağlık tehdidine sebep olmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonuna (IDF) göre 2015'te 20-79 yaş arası 415 milyon yetişkinin DM hastası olduğu, bu sayının 2040 yılına kadar 642 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (2). DM'nin patofizyolojisi, insülinin sentezlenmesini ve sekresyonunu sınırlayan pankreasın beta hücrelerdeki değişikliklerle ve periferde yer alan dokularda insüline karşı gelişen dirençle ilişkilendirilmiştir (1). Buna bağlı olarak gelişen hiperglisemi inflamasyona, sitokinlerin salgılanmasına, hücre ölümüne ve ardından diyabetik komplikasyonlara yol açar. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkması, hipergliseminin primer nedenidir. ROS'un yükselen seviyeleri ve antioksidan savunma mekanizmasının eş zamanlı olarak bozulması, insülin direncine, artan lipid peroksidasyonuna ve bunları takiben hücre hasara yol açar (3). DM'de zamanla gelişen hiperglisemi ve artan inflamasyon, hiperlipidemi ve nefropati gibi ikincil komplikasyonların gelişmesine sebep olabilir (4). DM, kronik böbrek yetmezliği, alkolsüz steatohepatit ve lipid bozukluklarıyla yakından ilişkilidir (5). DM, karaciğerde oksidatif strese ve apoptoza neden olur. Ayrıca glikojen ve lipid metabolizmasını bozarak yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olmaktadır (4). DM'nin karaciğer dokusu üzerindeki etkisi belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmasına rağmen hala tam olarak anlaşılmayan önemli noktalar bulunmaktadır. Streptozotosin (STZ), doğal olarak meydana gelen bir antineoplastikdir ve pankreas β -hücreleri üzerindeki toksik etkileri sebebiyle deney hayvanlarında insüline bağımlı DM'yi oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir ajandır (6). Medikal bitkiler, hastalıkların tedavisi, sağlığın sürdürülmesi ve yeni ilaçların sentezi için öncü olan maddeleri içermektedir (7,8). Son yıllarda diyabet tedavisinde kaydedilen ciddi ilerlemelere rağmen tedavilerde kullanılan ilaçların ilaç dirençlerine, toksik etkilere ve ilaç etkileşimlerine sebep olmaları nedeniyle hastaların medikal bitkilere yöneldiği görülmektedir (9). Diyabette kullanılan en önemli medikal bitkilerden biri olan çörek otu yağı, ranunculaceae familyasına ait yıllık çiçekli bir çalı bitkisidir. Çörek otu yağı bileşenlerinin immün modülatör, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, hipoglisemik, antioksidan, antikanser ve antiastmatik etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (10). Çörek otu yağı, insülin salınımı uyararak pankreas beta hücrelerinde oluşan hasarı iyileştirebilir (11). Çörek otunun çeşitli formlarının diyabetik sıçanlarda artan kan şekeri, lipiti, plazma insülinini ve lipid peroksidasyon ürünlerini düşürdüğü ve glutatyon, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyelerini yükselttiği belirtilmiştir (12,13). E vitamini, yağda çözünen bir vitamin olup α -tokoferol, E vitaminin doğada en çok bulunan formudur. E vitamininin yüksek kan glukozu ve glikolize hemoglobin (HbA1c) düzeylerini düşürdüğü belirtilmiştir. Ayrıca pankreas β -hücrelerinin fonksiyonunda ve dokulardaki

insülin direncinde iyileşme sağladığı tespit edilmiştir (14). Metformin, Tip II DM tedavisinde sıklıkla kullanılan ve biguanid türevi olan önemli bir antihiperglisemik ajandır (15). Ayrıca periferik dokularda insülin-aracılı glukoz kullanımını artırırken, plazma trigliseridi, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) seviyelerini ve glukoneogenezi azaltmaktadır (16).

Çalışmanın amacı, STZ ile oluşturulan DM'de sıçanların karaciğer dokularında gelişen hasara karşı çörek otu yağı, metformin ve E vitaminin etkilerini karşılaştırmaktır.

Materyal ve Metod

Çalışmamız Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 19-04 protokol numarası ve 35582840-604.01.01- sayılı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmada kullanılan deney hayvanları Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiştir.

Çalışmamızda ağırlıkları 240-350 gr arasında değişen 10-12 haftalık 30 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar standart koşullar altında (oda sıcaklığı 24-26 °C, %55-60 nem oranı, 12 saat gece 12 saat gündüz ışık döngüsü olan odada) tutuldu. Hayvanların beslenmeleri için ad libitum standart pelet yem ve içme suyu kullanıldı. Hayvanlar Kontrol, DM, DM + Metformin, DM + E vitamini ve DM + Çörek otu yağı olarak 5 gruba ayrıldı. Deney başlangıcında DM gruplarında DM oluşturmak amacıyla tek doz 45 mg/kg STZ (Sigma, USA), Sodyum Sitrat solüsyonu (pH: 4.5, 0.1 M) içerisinde çözülerek intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı (17). Kontrol grubundaki hayvanlara ise plasebo 1ml salin i.p yolla uygulandı. Hayvanlara, hipoglisemi önlemek amacıyla 24 saat boyunca ad libitum %10 glukolize su verildi. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra 12 saatlik açlığı takiben, hayvanların kuyruk veninden alınan kan ve glukometre ile kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olan hayvanlar, DM kabul edilip deney gruplarına alındı (18). Kontrol grubunda yer alan hayvanlara deney süresince günlük olarak plasebo 1ml salin oral yolla (p.o) verildi. Diyabet (DM) grubunda yer alan hayvanlara diyabet indüklendikten sonra günlük olarak 1 ml salin p.o verildi. Diyabet + E vitamini (DM +E) grubundaki hayvanlara diyabet oluşturulduktan sonra 100mg/kg E vitamini (kat. no: T325-25G, Sigma, St. Louis, Missouri, ABD) zeytin yağı içerisinde çözülerek p.o uygulandı (19). Diyabet + Metformin (DM +M) grubundaki hayvanlara diyabet indüklendikten sonra 100mg/kg Metformin (Kat. No:sc-202000B, Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, ABD) salin içerisinde çözülerek p.o uygulandı (15). Diyabet + Çörek otu yağı (DM+ Ç) grubunda bulunan hayvanlara diyabetin indüklenmesinin ardından 2.5 ml/kg Çörek otu yağı (Yerel bir firmadan temin edildi. Marka: Günçay) p.o uygulandı (20). 8 haftalık deneyin ardından hayvanlar 75 mg/kg Ketamin + 10 mg/kg Ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildi. Karaciğer dokuları alınıp hassas terazide ağırlıkları ölçüldü.

Doku Takibi

Karaciğer dokuları histopatolojik değerlendirme için 24 saat Bouin solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyonun ardından dokular %50, %70, %80, %90, %96 ve %100 etil alkol serilerinden geçirildi. Ksilende (2x30 dakika) şeffaflaştırılan dokulara ardından 2 saat süreyle 58°C deki etüvde parafin inküasyonu yapıldı. Ardından dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alınıp histopatolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom ve Periodic Acid-Schiff (PAS) boyaları ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Parafin bloklardan alınan karaciğer doku kesitlerine 3x15 dakika ksilende deparafinizasyon işlemi uygulandı. Kesitler azalan etil alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50) 10'ar dakika geçirilip ve distile suda 5 dakika bekletildi. Harris Hematoksilen boyası içerisinde 8 dakika tutulduktan sonra kesitler akan su altında 5 dakika yıkandı. Eozin boyasında 6 dakika bekletilen kesitler artan etil alkol serilerinden (%80, %90, %96) hızlıca geçirilip absolü alkolde 2 dakika bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilenden geçirilip entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Preparatlar A2 imager Zeiss ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Masson Trikrom Boyama Protokolü

Parafin bloklardan elde edilen karaciğer doku kesitleri 2x10 dakika ksilende deparafinize edildi. Azalan etil alkol serilerinden; %100 Alkolde 10 dakika, %96'lık alkolde 5 dakika, %90'lık alkolde 5 dakika, %70'lik alkolde 2 dakika ve %50'lik alkolde 2 dakika geçirildi. Distile suda 5 dakika tutuldu. Kesitler Masson Trikrom (Kat. no: # 3916 Bio Optica Milano MI, İtalya) hazır kit prosedürü ile takip edilerek boyandı. Doku kesitleri distile suda yıkandıktan sonra artan alkol serilerinden geçirildi. %100'lük etil alkolde 1 dakika tutuldu. 2x10 dakika ksilenden geçirilen kesitler entellan ile kapatılıp ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

Parafin bloklardan elde edilen karaciğer doku kesitleri 2x10 dakika ksilende deparafinize edildi. Azalan etil alkol serilerinden; %100 Alkolde 10 dakika, %96'lık alkolde 5 dakika, %90'lık alkolde 5 dakika, %70'lik alkolde 2 dakika ve %50'lik alkolde 2 dakika geçirildi. 5 dakika distile suda bekletildi. Kesitler PAS (Kat. no: #4117 Bio Optica Milano MI, İtalya) kit prosedürü takip edilerek boyandı. Distile suda 5 dakika yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. %100 etil alkolde 1 dakika tutuldu. Kesitleri 2x10 dakika ksilenden geçirilip entellan damlatılıp lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Histopatolojik Hasar Skorlaması

Hematoksilen-Eozin boyaları ile boyanan karaciğer kesitlerine santral ven yapısı, hepatosit hücre çekirdeklerinin piknotik görünümü, sinüzoidal dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon bulguları baz alınarak hasar skorlaması yapıldı. 0: hasar yok, 1: Minimal hasar, 2: Hasar, 3:

Şiddetli hasar olarak değerlendirildi (21). Her bir gruptan 60 adet olmak üzere 300 adet klasik karaciğer lobülü değerlendirilerek elde edilen değerler için istatistiksel analiz yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Karaciğer Ağırlığı ve Histopatolojik Hasar Skorlaması değerleri IBM SPSS Statistics 24.0 paket programı kullanılarak istatistiksel açıdan incelendi. Verilere istatistiksel analiz yapılmadan önce normallik testi yapıldı. Tüm datasetlerin normal dağılmadığı belirlendikten sonra non-parametrik Kruskal Wallis testine göre istatistiksel anlamlılık değerlendirildi. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma, Post-hoc Tamhane's T2 analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz sonucunda p<0.05 anlamlı kabul edildi ve sonuçlar ortalama ± SD şeklinde sunuldu.

Bulgular**Histopatolojik Bulgular**

Kontrol grubu karaciğer kesitlerinde santral ven çevresinde sinüzoidlerin arasında tek sıra dizilmiş hepatosit kordonları izlendi. Hepatositlerin ökromatik çekirdekleri santralde konumlanmıştı. Ayrıca sitoplazmaları da asidofilik görünümdeydi. Sinüzoidlerin lümeninde yer alan endotel hücreleri iyi seçilmekteydi. Periodik Asit -Schiff (PAS) boyası ile boyanan doku kesitlerinde PAS pozitif glikojen granülleri izlendi.

Diyabet grubu kesitleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında apoptotik hepatositlerde anlamlı bir artış izlendi. Bu apoptotik hücrelerin çekirdekleri genel olarak küçülmüş ve büzümüş bir görünümdeydi. Yağ vakuelleri sebebiyle hepatositlerin görünümünde şekil bozuklukları izlendi. Vakuolizasyon, konjesyon, piknotik çekirdek, hiperemi ve sinüzoidlerde dilatasyon bulguları tespit edildi. Bu grupta yer alan karaciğer doku kesitlerinin PAS boyamalarında, kontrol grubu ile kıyaslandığında glikojen içeriğindeki azalma belirgindi.

Metformin uygulanan diyabet grubu kesitlerinde karaciğer sinüzoidlerinde dilatasyon yanı sıra santral ven çevresinde ışınal olarak dizilen hepatosit kordonları izlendi. Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Masson Trikrom boyama yapılan karaciğer kesitlerinde piknotik çekirdek yapısı, konjesyon, hiperemi ve vakuolizasyon bulgularında azalma tespit edildi. Diyabetik grupta görülen glikojen tablosunda kısmen bir düzelmeye olduğu görüldü.

E vitamini uygulanan diyabet grubu kesitlerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında hiperemi, piknotik görümlü çekirdekler, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vakuolizasyon bulgularında minimal düzeyde iyileşme izlendi.

Sinüzoidlerde görülen dilatasyonun kısmen azaldığı görüldü. PAS boyama yapılan karaciğer kesitlerinde glikojen içeriğinde görülen azalma ise diyabet grubuna benzerdi.

Çörek otu yağı verilen diyabet grubunun doku kesitleri incelendiğinde hasar bulgularında anlamlı bir düzelmeye tespit edildi. Hepatosit çekirdeklerindeki piknotik görünümde düzelmeye kaydedildi. Ayrıca diyabet grubunda sayısı ve hacmi artan vakuollerde belirgin bir azalma izlendi. Hepatositlerin kontürleri belirgindi ve sinüzoidlerin görünümü

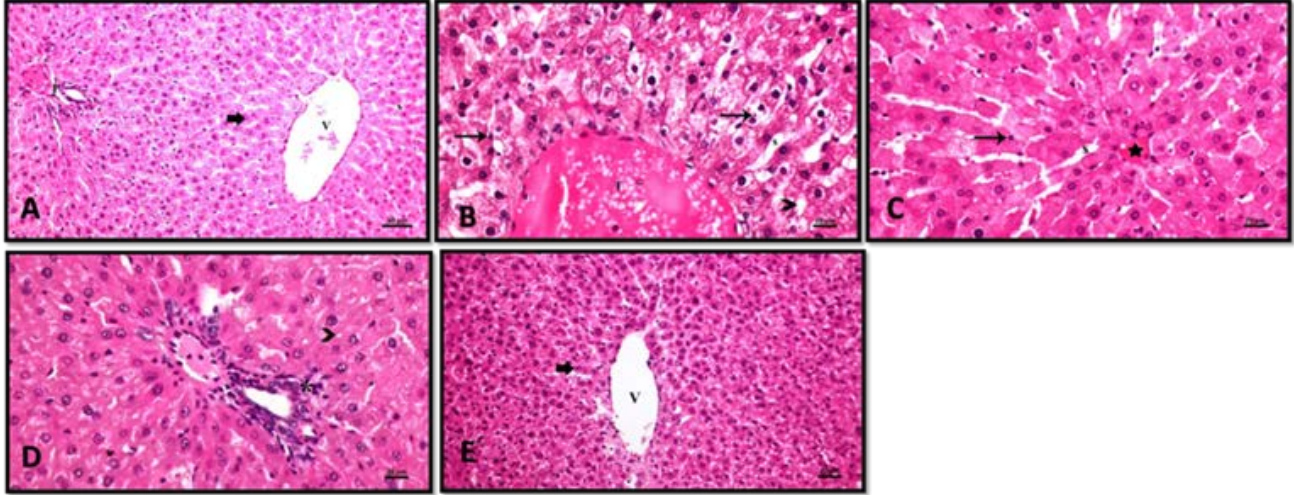
normaldi. Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında glikojen miktarının belirgin düzeyde arttığı görüldü (Şekil 1-3).

İstatistiksel Bulgular

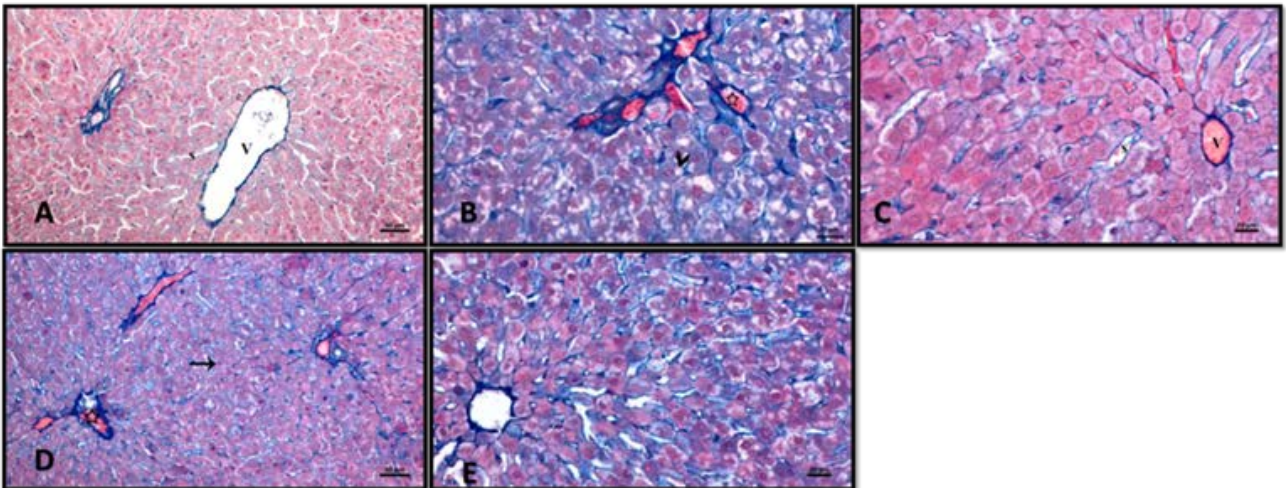
Histopatolojik Hasar Skorlaması İstatistiksel Bulguları

Yaptığımız analiz sonucunda karaciğer hasarının en yüksek diyabet grubunda olduğu ve E vitamini tedavisi uygulanan diyabet grubunun da başarılı sonuç vermediği belirlendi. Diyabet ve E vitamini gruplarının karaciğer hasar ortalamaları benzerlik göstermektedir ($p>0.05$). Ancak bu iki grubun diğer bütün gruplardan anlamlı düzeyde farklı ($p<0.01$) karaciğer

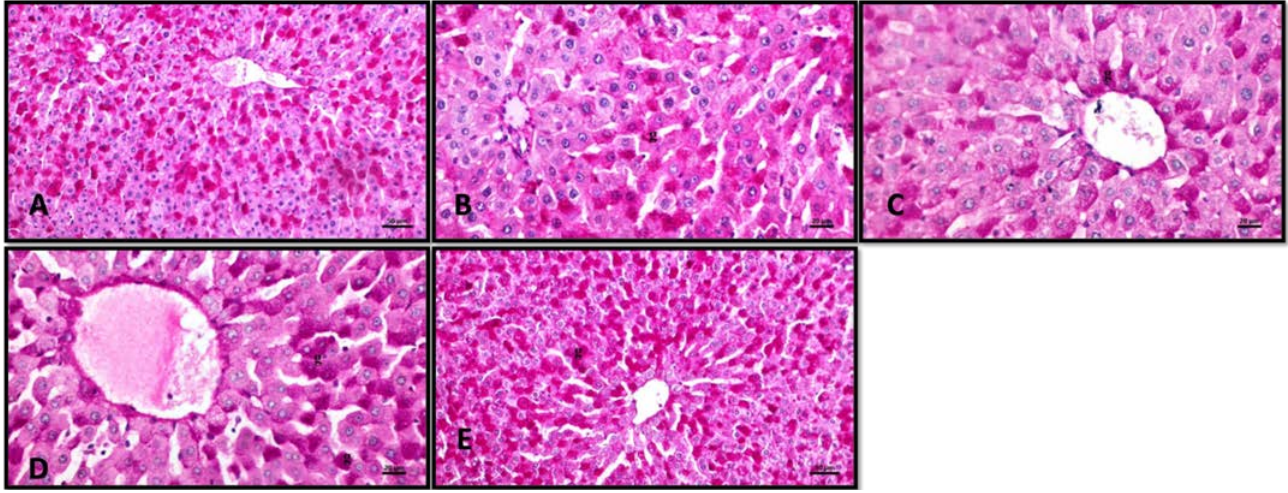
hasar bulgusuna sahip olduğu sonucuna ulaşıldı. Ayrıca metformin ve çörek otu yağı tedavisi uygulanan diyabetik grupların karaciğer hasar skoru ortalama değerinin hem birbirlerinden hem de diğer deney gruplarından anlamlı düzeyde farklı olduğu görüldü ($p<0.01$). Yaptığımız skorlama sonucunda en düşük hasar ortalamasının kontrol grubunda olduğu tespit edildi. Ayrıca bütün deney gruplarından anlamlı düzeyde farklı bir ortalama değerinin olduğu ($p<0.01$) sonucuna ulaşıldı. Kontrol grubuna en yakın hasar skor değeri çörekotu yağı grubunda izlendi ve skor değeri tüm gruplardan anlamlı derecede farklıydı ($p<0.01$). (Tablo 1, Şekil 4).



Şekil 1. Hematoksilen-Eozin Boyama. Şekil A Kontrol grubu karaciğer kesiti. Vena sentralise doğru ışınal dizilim gösteren hepatositler (→) arasında sinüzoidler (s), vena sentralis (V) ve portal alan (P) (Hematoksilen-Eozin (H-E), Bar: 50 µm). Şekil B Diyabet grubu karaciğer kesiti. Vena sentraliste trombus (T), sinüzoidlerde dilatasyon (s), piknotik çekirdekler (→) ve globüler yağ vakuelleri (kalın ok), (H-E, Bar: 20 µm). Şekil C Diyabet + Metformin grubu karaciğer kesiti. Damarda konjesyon (yıldız), sinüzoidlerde dilatasyon (s) ve piknotik çekirdekler (ok), (H-E, Bar: 20 µm). Şekil D Diyabet + E vitamini grubu karaciğer kesiti. Hepatosit sitoplazmalarında yağ vakuelleri (kalın ok başı) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (*), (H-E, Bar: 20 µm). Şekil E Diyabet + Çörek otu yağı grubu karaciğer kesiti. Kontrol grubuna benzer karaciğer parankim hücreleri (→) ile vena sentralis (V) görünümü, (H-E, Bar: 20 µm).



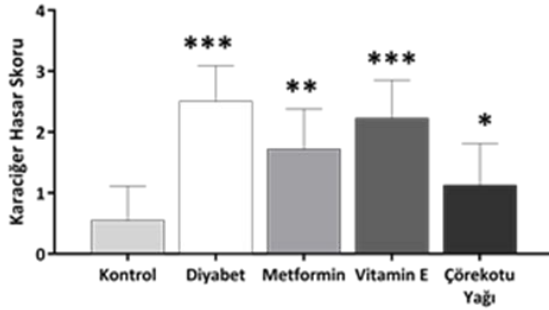
Şekil 2. Masson Trikrom Boyama. Şekil A Kontrol grubu karaciğer kesiti. Vena sentralis (V), radier dizilen hepatositler ve aralarında sinüzoidler (s) normal yapıda (Masson Trikrom, Bar: 50 µm). Şekil B Diyabet grubu karaciğer kesiti. Damarlarda konjesyon (☆) ve hepatosit sitoplazmasında multiveziküler yağ vakuelleri (kalın ok başı), (Masson Trikrom, Bar: 20 µm). Şekil C Diyabet + Metformin grubunda karaciğer kesiti. Sinüzoidler (s) ile vena sentralis'te (V) konjesyon tablosu, (Masson Trikrom, Bar: 20 µm). Şekil D Diyabet + E vitamini grubu karaciğer kesiti. Damar konjesyonu (☆) ve hepatosit çekirdeklerinde piknozis (→) (Masson Trikrom, Bar: 50 µm). Şekil E Diyabet + Çörek otu yağı grubu karaciğer kesiti. Kontrol grubuna benzer karaciğer kesiti, (Masson Trikrom, Bar: 20 µm).



Şekil 3. Periodik Asit -Schiff Boyama. Şekil A Kontrol grubu karaciğer kesiti. Hepatositlerde homojen dağılım gösteren karaciğer glikojen tablosu, (Periodik Asit -Schiff (PAS), Bar: 50 µm). Şekil B Diyabet grubu karaciğer kesiti. Kontrolle göre azalan glikojen (g) heterojen bir dağılımı (PAS, Bar: 20 µm). Şekil C Diyabet + Metformin grubu karaciğer kesitinde heterojen olarak dağılan ve santral zonda kümelenmiş glikojen partikülleri (g) (PAS, Bar: 20 µm). Şekil D Diyabet + E vitamini grubu karaciğer kesiti. Periferik zonda yoğunlaşan glikojenin (g) tablosu (PAS Bar: 20 µm). Şekil E Diyabet + Çörek otu yağı grubu karaciğer kesiti. Kontrol grubuna benzeyen glikojen (g) tablosu (PAS, Bar: 50 µm).

Tablo 1. Histopatolojik Hasar Skorlaması sonuçları

Deney Grupları	Karaciğer Hasar Skoru	p
Kontrol	0.55 ± 0.56 ^a	
Diyabet	2.51 ± 0.58 ^d	a-b-c-d p<0.01
Metformin	1.72 ± 0.66 ^c	
Vitamin E	2.23 ± 0.62 ^d	
Çörekotu Yağı	1.13 ± 0.68 ^b	



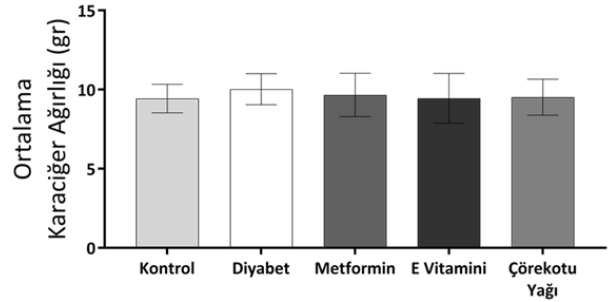
Şekil 4. Karaciğer Hasar Skorlaması istatistik sonuçlarının grafiksel görüntüsü. *p<0.01, **p<0.01 ve ***p<0.01

Karaciğer Ortalama Ağırlıkları

Deney gruplarının karaciğer ağırlığına bakıldığında grup ortalamaları arasında belirgin bir fark görülmedi (p>0,05) (Tablo 2, Şekil 5).

Tablo 2. Deney Gruplarının Ortalama Karaciğer Ağırlıkları gram (gr)

Deney grupları	Ortalama Karaciğer Ağırlığı (gr)	p
Kontrol	9,43 ± 0,90	
DM	10,02 ± 0,98	p>0.05
DM+M	9,66 ± 1,37	
DM+E	9,45 ± 1,57	
DM+Ç	9,52 ± 1,14	



Şekil 5. Deney Gruplarının Ortalama Karaciğer Ağırlıklarının istatistiksel analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü. p>0.05

Tartışma

Sunulan çalışma, 45mg/kg STZ ile indüklenen DM sıçanlarda karaciğer hasarına karşı E vitamini, çörek otu yağı ve metforminin koruyucu etkisini karşılaştırmayı amaçladı. DM, yüksek kan glukoz düzeyi ile tanımlanan, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasındaki değişiklikleri içeren kronik ve metabolik bir hastalıktır. Ayrıca lipid ve protein metabolizmalarındaki bozukluklarla ilişkilidir. Dolayısıyla nöropati, nefropati, retinopati, vaskülopati ve hepatopati gibi birçok ciddi ve yaşamı tehdit eden komplikasyona yol açar (22). DM'de karaciğer hasarının en önemli sebebi hipergliseminin sebep olduğu oksidatif stres ve sonrasında ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarındaki bozukluklardır (23).

Yaptığımız çalışmada kontrol grubunda yer alan sıçanların karaciğer kesitlerinde santral vene doğru radier dizilim gösteren hepatosit, hepatositler arasında yer alan sinüzoid, santral ven ve portal alan yapıları normal görünümdeydi. Çalışmamızla uyumlu olarak El-Shemi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kontrol grubunda bulunan sıçanların karaciğer

kesitlerinde portal ven, hepatosit ve santral ven yapıları normal görünümdeydi (24).

Çalışmamızda diyabet grubu karaciğer kesitlerinde glikojenin azalan ve heterojen dağılımı, damarlarda konjesyon, santral vende trombus, sinüzoidlerde dilatasyon tablosu, çekirdeklerde piknotik görünüm ve globüler yağ vakuolleri izledi. Bulgularımız; sırasıyla Li ve arkadaşlarının diyabetik sıçanların karaciğer kesitlerinde glikojen içeriğinin azalması bulgusuyla ve Abdellatif ve arkadaşlarının globüler yağ vakuolleri bulgusuyla uyumludur (25, 26). Ayrıca Yanardağ ve ark. vakuolizasyon, piknotik çekirdekler ve büyük sitoplazmik granüller bulgularıyla ve Oktayoğlu ve arkadaşlarının sinüzoidlerde görülen dilatasyon bulgularıyla da uyum göstermektedir (27, 28).

Yaptığımız çalışmada metformin uygulanan diyabet grubunda bulunan karaciğer kesitlerimizde diyabet grubunda görülen konjesyon, piknotik çekirdek görünümü ve sinüzoidal dilatasyon bulgularının kısmen düzeldiği ve globüler yağ vakuollerinin azaldığı tespit edildi. Bulgularımız diyabet grubu ile karşılaştırıldığında daha iyi görünümdeydi. Çalışmamızla paralel olarak Hacıoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada diyabetik sıçanlarda metformin uygulamasında histolojik olarak konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon bulguları olan karaciğer görünümü tespit edilmiştir (15). Balamsh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada metformin uygulanan diyabetik sıçanlarda piknotik çekirdekler tespit edilmiştir (29). Zou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise metformin uygulanan diyabetik sıçanların karaciğer kesitlerinde globüler yağ vakuollerinin azaldığı belirlenmiştir (5).

Çörek otu yağı uyguladığımız diyabetik sıçanların karaciğer kesitlerinde kontrole yakın görünen glikojen tablosu tespit edildi. Hepatositlerin, sinüzoidlerin ve vena santralisin normal görünümü izlendi. Aktaş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çörek otu yağının etken maddesi olan timokinonun, diyabetik sıçanların karaciğer dokularında azalan glikojen içeriğini arttırdığı ve kontrol grubuna benzer görünüm sağladığı tespit edilmiştir (30). Ayrıca diyabet grubunda gözlemlenen sinüzoidal dilatasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulgularının düzeldiği belirtilmiştir. Abdellatif ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabetik sıçanların karaciğer kesitlerinde, hepatositlerin büyük bir bölümünün normal büyüklükte olduğu çekirdeklerinde DM'de görülen piknozis bulgusunun izlenmediği, vakuollerin sayısının ve boyutunun belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiş. Ayrıca sinüzoidal dilatasyonun gözlenmediği ve hepatositlerde homojen glikojen dağılımı olduğu belirtilmiştir (31). Abdelrazek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çörek otu yağı tedavi edilen diyabetik sıçanların karaciğer kesitlerinde hepatositlerde yaşanan dejenerasyonun ve portal alanda görülen inflamasyonun onarıldığı tespit edilmiştir (32). Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular bulgularımızla uyumludur.

E vitamini uygulanan diyabetik sıçanların karaciğer kesitlerinde periferik zonda yoğunlaşan glikojen tablosu, hepatosit sitoplazmalarında yağ vakuolleri, piknotik çekirdekler ve santral vende damar konjesyonu gözlemledik. Bulgularımız

diyabetik gruba benzer şekilde devam etmekteydi. Çalışmamızla uyumlu olarak Daniel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada E vitamini uygulanan diyabetik sıçanlarda karaciğer dokularında portal ve sinüzoidal konjesyon ve hepatositlerde yaygın vakuoler dejenerasyon tespit etmişlerdir (33). Yaptığımız çalışmada deney gruplarının karaciğer ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Çalışmamızda STZ ile indüklenen diyabetik sıçanların karaciğer dokularında histopatolojik bulgulara bağlı olarak hasar olduğu tespit edildi. Yapılan hasar skorlamasında oluşan hasarın tedavisinde, metforminin kısmen yararlı olduğu E vitamini etki göstermediği, buna karşın çörek otu yağının oluşan hasara karşı oldukça etkili olduğu sonucuna varıldı. Yapılan çalışmalarda çörek otu yağının antioksidan antienflamatuar ve antihiperglisemik etkilere sahip olduğu belirlenmiş. Bu etkilere bağlı olarak oksidatif stresin azalabileceği ve bozulan karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasının düzelebileceği belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada çörek otu yağının belirtilen etkilere bağlı olarak diyabette gelişen karaciğer hasarına karşı iyileştirici bir etkisi olabileceğini düşünmekteyiz. Metforminin uygulanma dozu ve tedavi süresinin elde ettiğimiz sonuçlarda etkili olabilir. E vitamini grubunda elde edilen sonuçların ise E vitamini dozu, kimyasal formundaki farklılık ve tedavi süresi ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Etik onam: Çalışmamız, Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (DÜHADEK) tarafından 19-04 protokol numarası ve 35582840-604.01.01- sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Yazar Katkıları:

Konsept: H.A, S.K, Y. N.

Literatür Tarama: H.A, S.K, Y. N.

Tasarım: H.A, S.K, Y. N.

Veri toplama: H.A, S.K.

Analiz ve yorum: S.K, H.A, Y. N.

Makale yazımı: H.A.

Eleştirel incelenmesi: Y.N., S.K.

Çıkar Çatışması: Yok

Finansal Destek: Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜ-BAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.20.002 Numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Carvalho DS, de Almeida AA, Borges AF, Vannucci Campos D. Treatments for diabetes mellitus type II: New perspectives regarding the possible role of calcium and cAMP interaction. European journal of pharmacology. 2018;830:9-16.
2. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. Diabetes Res Clin Pract. 2017;128:40-50.
3. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. Cell Death Dis. 2018;9(2):119.
4. Palsamy P, Sivakumar S, Subramanian S. Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. Chem Biol Interact. 2010;186(2):200-10.

5. Zou W, Zhang C, Gu X, Li X, Zhu H. Metformin in Combination with Malvidin Prevents Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease via Improving Lipid and Glucose Metabolisms, and Inhibiting Inflammation in Type 2 Diabetes Rats. *Drug design, development and therapy*. 2021;15:2565-76.
6. Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PS. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2008;28(6):806-13.
7. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*. 2013;10(5):210-29.
8. Kurt S, Koca R, Hürkul MM, Seker U, Köroğlu A. The antioxidant effect of *Michauxia campanuloides* on rat ovaries. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2021;72:163-70.
9. Kooti W, Farokhipour M, Asadzadeh Z, Ashtary-Larky D, et al. M. The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electronic physician*. 2016;8(1):1832-42.
10. Khan Z, Hasan N, Ahmad N, Vartika S, Khalid M, et al. Pharmacological Activity of *Nigella Sativa*: A Review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;4:234-41.
11. Shady AM, Nooh HZ. Effect of Black Seed (*Nigella Sativa*) on Compact Bone of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *The Egyptian Journal of Histology*. 2010;33:168-77.
12. Kaleem M, Kirmani D, Asif M, Ahmed Q, Bano B. Biochemical effects of *Nigella sativa* L seeds in diabetic rats. *Indian journal of experimental biology*. 2006;44(9):745-8.
13. Seker U, Kaya S, Kandemir S, Sener D, Demirel O, et al. Effects of Black Cumin Seed Oil on Oxidative Stress and Expression of Membrane-Cytoskeleton Linker Proteins, Radixin and Moesin, in Streptozotocin Induced Diabetic Liver. *Hepatology Forum*. 2022;3:21-26.
14. Institute of Medicine Panel on Dietary A, Related C. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright 2000 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.; 2000.
15. Hacıoğlu C, Kar F, Kara Y, Yücel E, Donmez DB, et al. Comparative effects of metformin and *Cistus laurifolius* L. extract in streptozotocin-induced diabetic rat model: oxidative, inflammatory, apoptotic, and histopathological analyzes. *Environmental science and pollution research international*. 2021;28(41):57888-901.
16. Grzybowska M, Bober J, Olszewska M. Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*. 2011;65:277-85.
17. Behera SR, Sekkizhar M, Babu S. Nephro-protective Effect of Aqueous Extract of *Syzygium cumini* Seed on Streptozotocin Induced Diabetes in Rats. *International Journal of Chemical and Lifesciences*. 2019;3(2):1285-8.
18. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Catechin Treatment Ameliorates Diabetes and Its Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Dose-response : a publication of International Hormesis Society. 2017;15(1):1559325817691158.
19. Sahintürk V, Guclu C, Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian journal of andrology*. 2007;9(1):117-24.
20. Houcher Z, Boudiaf K, Benboubetra M, Houcher B. Effects of Methanolic Extract and Commercial Oil of *Nigella sativa* L. on Blood Glucose and Antioxidant Capacity in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Pteridines*. 2007;18(1):8-18.
21. Rashid U, Khan MR. Phytochemicals of *Periploca aphylla* Dcne. ameliorated streptozotocin-induced diabetes in rat. *Environmental health and preventive medicine*. 2021;26(1):38.
22. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1997;14 (Suppl 5):S1-85.
23. Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyantey AH, Budin SB. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University medical journal*. 2016;16(2):e132-41.
24. El-Shemi AG, Kensara OA, Alsaegh A, Mukhtar MH. Pharmacotherapy with Thymoquinone Improved Pancreatic β -Cell Integrity and Functional Activity, Enhanced Islets Revascularization, and Alleviated Metabolic and Hepato-Renal Disturbances in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Pharmacology*. 2018;101(1-2):9-21.
25. Li S, Huang Q, Zhang L, Qiao X, Zhang Y et al. Effect of CAPE-pNO₂ against type 2 diabetes mellitus via the AMPK/GLUT4/GSK3 β /PPAR α pathway in HFD/STZ-induced diabetic mice. *European journal of pharmacology*. 2019;853:1-10.
26. Abdellatif NA. Protective Effect of *Nigella Sativa* Against Diabetic Complications on The Liver in White Male Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2013;53(1):1072-82.
27. Yanardag R, Ozsoy-Sacan O, Bolkent S, Orak H, Karabulut-Bulan O. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. *Human & experimental toxicology*. 2005;24(3):129-35.
28. Gezgin-Oktayoglu S, Basaraner H, Yanardag R, Bolkent S. The effects of combined treatment of antioxidants on the liver injury in STZ diabetic rats. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(3):538-46.
29. Balamash KS, Alkreathy HM, Al Gahdali EH, Khoja SO, Ahmad A. Comparative Biochemical and Histopathological Studies on the Efficacy of Metformin and Virgin Olive Oil against Streptozotocin-Induced Diabetes in Sprague-Dawley Rats. *Journal of diabetes research*. 2018;2018:4692197.
30. Aktaş İ, Mehmet Gür F. Hepato-protective effects of thymoquinone and beta-aminoisobutyric acid in streptozotocin induced diabetic rats. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 2022;97(1):67-76.
31. Abdellatif NA. Protective Effect of *Nigella Sativa* Against Diabetic Complications on The Liver in White Male Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2013;53:1072-82.
32. Abdelrazek HMA, Kilany OE, Muhammad MAA, Tag HM, Abdelazim AM. Black Seed Thymoquinone Improved Insulin Secretion, Hepatic Glycogen Storage, and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Wistar Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:8104165.
33. Daniel OO, Adeoye AO, Ojowu J, Olorunsogo OO. Inhibition of liver mitochondrial membrane permeability transition pore opening by quercetin and vitamin E in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;504(2):460-9.