

YÜKSEK YAĞLI DİYET / STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK FARELERDE METFORMİNİN HEPATORENAL HASARA KARŞI KORUYUCU ETKİLERİ

PROTECTIVE EFFECTS OF METFORMIN AGAINST HEPATORENAL INJURY IN HIGH-FAT DIET/STREPTOZOTOCINE-INDUCED DIABETIC MICE

Songül DOĞANAY¹, Özcan BUDAK², Nurten BAHTİYAR³, Veysel TOPRAK⁴

¹Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı

⁴Özel Tatvan Can Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü

ÖZET

AMAÇ: Sunulan bu çalışmada yüksek yağlı diyet ve streptozotocin ile deneysel tip 2 diyabet oluşturulan farelerde metformin tedavisinin karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan etkisinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Yirmi bir adet yetişkin (11-12 haftalık 15-18 g) C57BL6 erkek fare rastgele üç gruba ayrıldı; Kontrol grubu (K), Diyabet grubu (D), ve Diyabet+Metformin tedavi grubu (D+MTF). D ve D+MTF grupları 4 hafta süreyle yağ oranı %60 olan yüksek yağlı diyetle beslendi. 4. Haftanın sonunda 30 mg/kg tek doz streptozotocin intraperitoneal uygulanarak tip 2 diyabet oluşturuldu. Metformin 300 mg/kg/gün dozunda gavaj ile verildi. Dene sonunda alınan karaciğer ve böbrek örneklerinde; glutatyon (GSH), katalaz (KAT) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Hemotoksilen ve Eozin ile boyanan doku kesitleri histomorfolojik olarak değerlendirildi.

BULGULAR: Çalışma sonuçları diyabetik hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerinin arttığını gösterdi. Metformin tedavisinin her iki dokuda da MDA düzeylerini azaltıp, GSH ve KAT düzeylerini artırdığı ancak bu artışın karaciğerde anlamlı düzeyde olmadığı ($p>0,05$), böbrekte ise anlamlı düzeyde olduğu bulundu ($p<0,05$). Ayrıca Histopatolojik değerlendirme sonuçlarında D+MTF grubunda nadir alanlarda vakuolizasyon, yer yer nekroz ve sinozoidal tıkanıklık görülürken, D grubu karaciğerlerinde yoğun vakuolizasyon, yüksek oranda sinozoidal tıkanıklık ve nekroz görüldü. Böbrek dokusunda K grubunda tübül yapısının normal yapıda olduğu; D grubunda, tübüllerin genişlediği ve yoğun kanama alanlarının olduğu; D+MTF grubunda ise nadir alanlarda tübül yapılarında vakuollerin olduğu görüldü.

SONUÇ: Bu çalışmanın sonuçları, Diyabette dokularda oksidatif stresin oluştuğunu, metformin tedavisinin diyabette artan oksidatif stres üzerinde düzeltici etki göstererek dokularda hasar oluşmasını engellediğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Glutatyon, Metformin, Oksidatif stres, Tip 2 diyabet.

ABSTRACT

OBJECTIVE: In this study, it was aimed to investigate the anti-oxidant effect of metformin treatment on liver and kidney tissues in mice with experimental type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin.

MATERIAL AND METHODS: Twenty-one adult C57BL6 male mice were randomly divided into three groups as Control group (C), Diabetes group (D), and Diabetes + Metformin group (D + MTF). Groups D and D + MTF were fed a high-fat diet with 60% fat for four weeks. After the 4th week, 30 mg/kg streptozotocin was applied intraperitoneally, and type 2 diabetes was induced. 300 mg/kg/day Metformin was given by gavage. Glutathione (GSH), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) levels in liver and kidney samples were measured by spectrophotometric method. Tissue sections were stained with Hematoxylin and Eosin and evaluated histomorphologically.

RESULTS: The results showed that MDA levels increased in the liver and kidney tissues of diabetic animals. It was found that MTF treatment decreased MDA levels in both tissues and increased GSH and CAT levels, but this increase was not significant in the liver ($p>0,05$), while it was significant in the kidney ($p<0,05$). In addition, in the histopathological evaluation results, vacuolization, occasional necrosis and synozoid occlusion were observed in rare areas in the D+MTF group, while intense vacuolization, high rates of synozoidal occlusion and necrosis were observed in group D livers. In kidney tissue, the tubular structure in the group C was normal while the tubules were enlarged in group D, and there were dense bleeding areas. In the D+MTF group, vacuoles were observed in the tubule structures in rare areas.

CONCLUSIONS: The results of this study show that oxidative stress occurs in tissues in diabetes and that metformin treatment prevents tissue damage by showing a corrective effect on the increased oxidative stress in diabetes.

KEYWORDS: Glutathione, Metformin, Oxidative stress, Type 2 diabetes.

Geliş Tarihi / Received: 15.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 06.08.2021

Yazışma Adresi / Correspondence: Dr. Öğr. Üyesi Songül DOĞANAY

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı

E-mail: songuldogana@sakarya.edu.tr

Orcid No (Sirasıyla): 0000-0002-1730-133, 0000-0002-2617-3175, 0000-0003-2420-8415, 0000-0002-3280-851X

Etik Kurul / Ethical Committee: Sakarya Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Etik Kurulu (01.07.2020/37).

GİRİŞ

Tip 2 diyabet (DM), diyabetli hastaların %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. Diyabette artmış kan glikoz seviyeleri dokularda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara yol açmaktadır. Hipergliseminin neden olduğu mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişiminin nedenleri arasında; endotel disfonksiyonu, ileri glikasyon son ürünleri, serbest radikallerin oluşumunda artış, trombosit reaktivitesinde artış, sodyum-glukoz taşıyıcı (SGLT-2) hiperekspresyonu yer almaktadır (1).

Diyabette reaktif oksijen türlerinin (ROS) rolü yıllardır tartışılmaktadır. Oksidatif stres, DM ve DM'ye bağlı oluşan komplikasyonlar arasındaki ilişkilerin mekanizmalarını araştıran çalışmalar gün geçtikçe atmaktadır (2). Normal ve sağlıklı hücrelerde ROS düzeyleri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Oksidatif stres, ROS ve vücudun antioksidan savunma kapasitesi arasındaki herhangi bir dengesizlik, yaşlanma ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve diyabetik komplikasyonlarda dahil olmak üzere çok sayıda hastalık ile yakından ilişkilidir (3). DM'de, DM'nin başlıca komplikasyonu olan hiperglisemi oluşumu ROS'un hücresele düzeyde artışını indüklemektedir. Kronik hiperglisemi, vücutta inflamatuvar bir ortam oluşturarak ROS'un oluşumuna uygun ortamı hazırlamış olur. ROS üretiminin artışı ve antioksidan enzim düzeylerinin azalması sonucunda oksidatif stres meydana gelerek, kan glikoz seviyelerinin uzun süre yüksek seyretmesine yol açtığı düşünülmektedir (4). Vücutta, oksidatif stres nedeni ile oluşabilecek hasarı engellemek için antioksidan vitaminler, Glutasyon (GSH), katalaz (KAT), süperoksitdismutazdan (SOD) oluşan antioksidan enzimlerden oluşan bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. GSH, SOD, KAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimler ROS'ların bir elektron redüksiyonunu katalizlerler. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar DM'de oksidatif stres nedeniyle ROS oluşumunun ve lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin önemli oranda arttığı, hücre içi savunmada rol alan GSH, KAT ve SOD antioksidan enzimlerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun DM'nin etiyolojisinde ve ilerlemesinde

de katkısı olduğu bildirilmiştir (5). Tip 2 diyabet risk faktörleri hakkında artan bilgiye ve başarılı önleme programlarına ilişkin kanıtlara rağmen, hastalığın insidansı ve yaygınlığı küresel olarak artmaya devam etmektedir. Tarama programları aracılığıyla erken teşhis ve güvenli ve etkili tedavilerin varlığı, komplikasyonları önleyerek veya geciktirerek morbidite ve mortaliteyi azaltacaktır (1). Bir dimetilbiguanid olan metformin (MTF), genellikle tip II DM'nin kontrolünde reçete edilen hipoglisemik bir ilaçtır. MTF, ROS'a karşı doğrudan temizleyici bir etkiye sahiptir.

Bozulan antioksidan savunma sistemini tekrar güçlendirerek ve DM'de oksidatif stres düzeyini iyileştirmektedir (6). Yapılan çalışmalar, MTF'nin gelişmiş glikasyon son ürünleri gibi oksidatif stres belirteçlerini azaltmadaki koruyucu etkisini ve antioksidan savunma mekanizmasının yeniden yapılanmasını, lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir (7). Bu çalışmaların sonuçları MTF'nin güçlü bir antioksidan ajan olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Araştırmamızda deneysel tip 2 DM oluşturulan farelerin karaciğer ve böbrek dokularında diyabetin oksidatif stres, antioksidan enzimler ve doku histolojisinde neden olduğu değişiklikler ve bu değişikliklere karşı metforminin koruyucu etkisini ortaya koymak amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Etik Beyan

Çalışmada ortalama 15-18 gram ağırlığında 11-12 haftalık 21 adet C57BL6 erkek fare kullanıldı. Deney protokolleri Sakarya Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Etik Kurulu'ndan onay alındıktan (01.07.2020/37) sonra Sakarya Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı'nda uluslararası yönergelerle uygun olarak gerçekleştirildi.

Tüm fareler deneye başlamadan önce bir hafta boyunca (tel kafeslerde, 12/12 saat aydınlık/karanlık ışık döngüsünde, 22°C, sıcaklıkta, %50-60 nem) laboratuvar ortamına uyumlulukları sağlandı. Fareler her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele 3 gruba bölündü.

Deney Hayvanlarında Diyabetin İndüklenmesi

Diyabetik grupları oluşturacak 14 farede hiperglisemiyi indüklemek için 4 hafta boyunca

toplam enerjinin (25,07 kJ/g) %60'ı yağlardan, %20'si protein ve %20'si karbonhidratlardan karşılayacak şekilde (%52,2 nişasta, %14,3 protein, %17,2 yağ ve %16,3 lifler, şeker, temel vitaminler ve mineraller) hazırlanan yüksek yağlı diyetle (HFD) beslenmeleri sağlandı (8). Fareler 4 haftanın sonunda 16 saat aç bırakıldı. 16 saat açlıktan sonra streptozotosin (STZ; (Cayman Chemical item no, 13104, USA) 0.05M sitrat tamponunda (pH 4.5) çözdürüldü ve 30 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulandı (9). STZ uygulamasından 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinden açlık kan glikoz seviyeleri glikometri (CareSens II- GM505C, Kore) kullanılarak ölçüldü. Açlık kan glikoz seviyeleri 150-250 mg/dL olan fareler hiperglisemik kabul edildi ve deney için kullanıldı.

Deney Tasarımı

Kontrol Grubu (K): Bu grup kontrol grubu olarak belirlendi. Bu gruptaki fareler 8 hafta boyunca (14,3% protein, 4% yağ, 65,4% nişasta ve 16,3% şeker, lifler, vitamin ve minerallerden oluşan) normal fare yemi ve musluk suyu ile beslendi. Ayrıca herhangi bir işlem yapılmadı. Diyabet oluşturulduktan 3 gün sonra 14 hayvan tekrar rastgele her grupta 7 fare olacak şekilde diyabet ve metformin tedavi grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Diyabet Grubu (D): Bu gruptaki farelere diyabet oluşturma protokolü uygulandı. 4 hafta boyunca YYD'yle beslenerek hiperglisemi indüksiyonu yapıldı. Protokole uygun 30mg/kg STZ i.p. uygulanarak Tip 2 DM oluşturuldu. Hayvanlar diyabet olduktan sonrada 4 hafta daha YYD'yle beslenmelerine devam edildi.

Diyabet ve Metformin Grubu (D+MTF): Bu gruptaki fareler tedavi grubu olarak belirlendi. Farelere deneysel tip 2 diyabet oluşturma protokolü uygulandı. Farelere 30mg/kg STZ i.p. uygulandı.

Metformin (MTF) 300mg/kg/gün dozunda (10) %0,09 izotonik içerisinde çözüldükten sonra 4 hafta boyunca gavaj yolu ile verildi. Diyabet oluştuktan sonra bu gruptaki farelerin beslenmesine normal standart diyet ile devam edildi.

8 haftalık deney sonunda, hayvanlar son tedaviden yirmi dört saat sonra aşırıdoz anestezi uygulanarak (pentobarbital 300 mg/kg i.p.) ser-

vikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler. Alınan karaciğer ve böbrek dokuları biyokimyasal analiz için -20°C'de saklandı. Histopatolojik incelemeler için alınan örnekler ise %10 tamponlu formalin içinde sabitlendi.

Histopatolojik Değerlendirme

Farelerden histopatoloji için alınan karaciğer ve böbrek dokuları 48 saat %10 luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Daha sonra örnekler %60, %70, %80, %96 ve %100 lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemi uygulandı.

Ardından ksilol serilerinden geçirilen dokulara şeffaflaştırma işlemi yapıldı ve parafin bloklara gömüldü. 4 mikronluk kesitler alındı ve hemotoksilen eozinle (H&E) ile boyandı. Işık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek fotoğraflar çekildi. Karaciğer dokusu Suzuki'nin (11) yarı sayısal modifiye skorlama sistemi kullanılarak sinüzoidal tıkanıklık, nekroz, vakuolizasyon açısından histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Böbrek doku kesitlerini yarı kantitatif değerlendirmek için tasarlanmış böbrek hasarının ölçeği derecesi (tübüler hücre nekrozu, sitoplazmik vakuol oluşumu, kanama ve tübüler dilatasyon) kullanıldı (12). Spesifik olarak, böbreğin tutulum yüzdesine bağlı olarak hasarın derecesine göre tek bir derin koronal bölüm mikroskop altında incelendi ve 0, normal böbrek; 1, minimum hasar (%0-5 katılım); 2, hafif hasar (%5-25 tutulum); 3, orta derecede hasar (%25-75 katılım); ve 4, şiddetli hasar (%75-100 tutulum) şeklinde puanlama yapılarak değerlendirildi (13).

Oksidatif stres belirteçlerinin değerlendirilmesi

Karaciğer ve böbrek dokuları (100mg) %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra santrifüj edildi (+4 °C, 3000 RPM, 10 dk). Sonra soğuk %1,15 KCl, 0,01 M sodyum potasyum fosfat (pH=7.4) çözeltisi ile karıştırılarak %10'luk doku homojenatları hazırlandı. Homojenatlar +4°C'de 20 dk santrifüj (10.000xg) edildi. Elde edilen süpernatantlardan Lowry yöntemi kullanılarak protein ölçümü yapıldı (14). Lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan MDA tayini Buege ve Aust'un yöntemi kullanılarak (15), indirgenmiş glutatyon (GSH) konsantrasyon tayini Beutler'in yöntemi kullanılarak (16), KAT aktivitesi Iwase'nin yöntemi kullanılarak belirlendi (17).

Etik Kurul

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (01.07.2020/37).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 paket programı (SPSS Inc. ve Lead Tech. Inc. Chicago. ABD) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılımı için Shapiro Wilk testi kullanıldı. İki'den fazla değişkenin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grup içi tekrarlı ölçümlerin değerlendirilmesi Friedman Test ile yapıldı. Test sonucunun anlamlı olması durumunda ikili karşılaştırmalar Wilcoxon test ile yapıldı ve olası alfa hatalarını önlemek için Bonferroni düzeltmesi yapıldı. Tüm sonuçlar medyan ve interquartil range (IQR) olarak sunuldu. $P < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Vücut Ağırlığı ve Kan Şekeri Seviyeleri

Deney gruplarına ait vücut ağırlıkları değişimi ve kan glikoz seviyelerindeki değişimler Tablo 1'de sunuldu. Çalışma başlangıcında tüm gruplar arası vücut ağırlığı ve kan glikoz seviyeleri yönünden istatistiksel açıdan anlamlı farklılık yoktu ($p > 0,05$). Yapılan grup içi karşılaştırmada K grubu ve D+MTF grubunda vücut ağırlıkları 1. hafta ile kıyaslandığında 4. hafta ve 8. hafta arasında, 4. hafta ile kıyaslandığında 8. hafta arasında istatistiksel farklılık bulundu (hepsi için $p = 0,006$). Gruplar arası karşılaştırmada ise K ile kıyaslandığında D+MTF grubu arasında 4. hafta vücut ağırlıklarında, D ile kıyaslandığında D+MTF grubu arasında 8. hafta vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü (sırası ile $p = 0,000$, $p = 0,000$) (**Tablo 1**).

Tablo 1: Deney hayvanlarının 1., 4. ve 8. hafta vücut ağırlıkları ve kan glikoz seviyelerindeki değişim

Parametre	Grup (Her grup, n=7)	1. hafta Median (IQR)	4. hafta Median (IQR)	8. hafta Median (IQR)	Grup içi P	Grup içi Anlamlılık
Vücut ağırlığı (g)	K	16,50 (0,60)	19,20 (0,90)*	22,40 (0,80)	0,001	1-4, 1,8-4-8
	D	16,40 (0,50)	20,30 (0,90)	29,60 (1,70)	0,001	1-8
	D+MTF	16,40 (0,40)	22,60 (0,50)	17,20 (0,60)**	0,001	1-4, 1,8-4-8
Kan şekeri (mg/dL)	K	89,30 (2,00)	90,30 (3,20)*	89,60 (2,60)*	0,857	-
	D	90,00 (3,00)	140,30 (14,00)	274,30 (12,90)	0,001	1-4, 1,8-4-8
	D+MTF	90,00 (3,00)	135,50 (11,80)	140,80 (3,70)	0,005	1-4-8

K: Kontrol, D: Diyabet, D+MTF: Diyabet ve Metformin tedavisi grubu, IQR: Interquartile Range. Anlamlılık sınırı $P < 0,05$ olarak kabul edildi. Sonuçlar medyan (IQR) olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalar: * $p < 0,05$ D+MTF ile karşılaştırıldığında, ** $p < 0,001$ D ile karşılaştırıldığında, * $p < 0,001$ D ve D+MTF ile karşılaştırıldığında.

Deney süresince grup içi kan glikoz seviyeleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p > 0,05$). D ve grubunda 1. hafta ile kıyaslandığında 4. hafta ve 8. Hafta arasında, 4. hafta ile kıyaslandığında 8. hafta arasında istatistiksel farklılık bulundu (hepsi için $p = 0,006$).

D+MTF grubunda 1. hafta ile kıyaslandığında 4. hafta ve 8. hafta arasında, istatistiksel farklılık görüldü (hepsi için $p = 0,006$). Kan glikoz seviyeleri açısından yapılan gruplar arası karşılaştırmada 4. hafta sonunda standart fare yemi ile beslenen K grubu ile karşılaştırıldığında YYD ile beslenen D ve D+MTF gruplarında kan glikoz seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu bulundu (her ikisi için $p = 0,000$). D ve D+MTF grupları arasında kan glikoz seviyeleri açısından anlamlı farklılık yoktu ($p > 0,05$). Dört haftalık Metformin tedavisinden sonra D+MTF grubu kan glikoz seviyeleri tedavi almayan D grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük iken ($p = 0,001$), K grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksekti ($p = 0,000$) Tablo 1.

Biyokimyasal Parametreler

Karaciğer dokusu MDA, GSH ve KAT düzeyleri Tablo 2'de sunulmuştur. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri D'de en yüksek düzeyde iken [0,84(1,15)] tedavi grubu olan D+MTF'de en düşük [0,62 (0,46)] düzeydeydi. Gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. ($p > 0,05$). GSH ve KAT düzeylerinde K grubuna göre D+MTF'de artış, D'de ise azalma tespit edildi. GSH değerleri: K'de; 2,07 (1,17), D'de; 1,52 (0,79), ve D+MTF'te 1,95 (1,19); KAT değerleri: K'de 1,60 (1,08), D'de 1,55 (0,27), ve D+MTF'de 2,08 (0,97) olduğu görüldü. Metformin uygulamasının GSH ve KAT düzeylerinde artışa neden olduğu, fakat bu artışın istatistiksel yönden anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$) (**Tablo 2**).

Tablo 2: Deney grupları karaciğer dokularında biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

Grup (Her grup n=7)	MDA (nM/mg) Median (IQR)	GSH (μ M/mg Protein) Median (IQR)	KAT (U/mg Protein) Median (IQR)
K	0,75 (1,11)	2,07 (1,17)	1,60 (1,08)
D	0,84 (1,15)	1,52 (0,79)	1,55 (0,27)
D+MTF	0,62 (0,46)	1,95 (1,19)	2,08 (0,97)
P Değeri	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

K: Kontrol, D: Diyabet, D+MTF: Diyabet ve Metformin tedavisi grubu, IQR: Interquartile Range. Anlamlılık sınırı $P < 0,05$ olarak kabul edildi. Sonuçlar medyan (IQR) olarak verildi. Tüm karşılaştırmalar için $p > 0,05$

Çalışmamızın sonucunda; böbrek MDA seviyeleri diyabet grubu olan D'de, K ve D+MTF'ye oranla artmış olduğu ancak bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu (K; 0,80 (0,26), D; 0,89 (0,41), D+MTF; 0,59 (0,19). Böbrek GSH düzeylerinin D+MTF'de K ve D'ye oranla anlamlı düzeyde artış gösterdiği (sırasıyla $p=0,012$, $p=0,004$) belirlendi. KAT düzeyleri incelendiğinde; KAT düzeyi D'de, K ve D+MTF'ye kıyasla oldukça düşüktü. Gruplar arası karşılaştırılarda bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlıydı (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,010$), (Tablo 3).

Tablo 3: Deney grupları böbrek dokularında biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

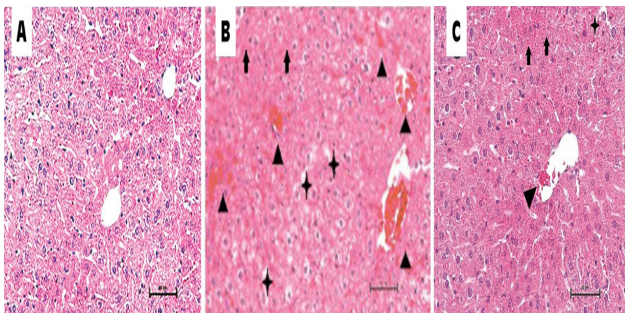
Grup (Her grup n=7)	MDA (nM/mg) Median (IQR)	GSH (μ M/mg Protein) Median (IQR)	KAT (U/mg Protein) Median (IQR)
K	0,80 (0,26)	1,54 (0,08)	2,07 (0,51)
D	0,89 (0,41)	1,33 (0,64)	1,53 (0,66)
D+MTF	0,59 (0,19)	3,18 (1,60)	1,81 (1,00)
P Değeri	$p>0,05$	0,004 (D-D+MTF) 0,012 (K-D+MTF)	0,005 (K-D) 0,010 (D-D+MTF)

K: Kontrol, D: Diyabet, D+MTF: Diyabet ve Metformin tedavi grubu, IQR: Interquartile Range. Anlamlılık sınırı $P<0,05$ olarak kabul edildi. Sonuçlar medyan (IQR) olarak verildi.

Histopatolojik Bulgular

Genel olarak kontrol grubunda portal ven, karaciğer sinozoidleri normal hücre kontürlerinde olduğu gözlemlendi. Vakuolizasyon, sinozoidal tıkanıklık ve nekroz açısından değerlendirme yapıldığında kontrol grubunda karaciğer dokusu normal bir yapı gösterdi. Diyabet+Metformin tedavi grubunda nadir alanlarda vakuolizasyon, yer yer nekroz ve sinozoidler tıkanıklık görüldü.

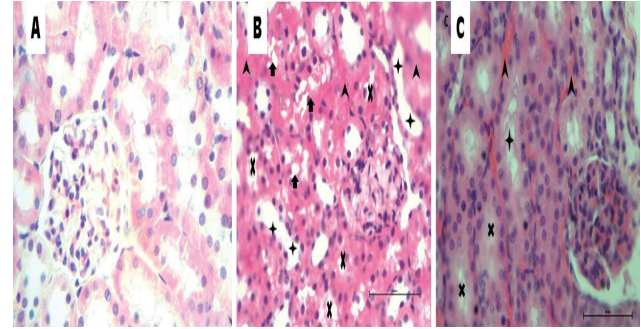
Diyabetik gruptaki farelerin karaciğer dokularında ise yoğun bir şekilde vakuolizasyon, yüksek oranda sinozoidal tıkanıklık ve nekrozun olduğu görüldü (Şekil 1A, B, C).



Şekil 1: Farelerde yüksek yağlı diyet / streptozotisin ile indüklenen tip 2 diyabette metforminle tedaviyi takiben karaciğerdeki histolojik değişikliklerin görüntüleri (Siyah ok; nekrotik alanlar). A: Kontrol, B: Diyabet, C: Diyabet+Metformin

Böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmeleri yapıldığında glomerulus ve renal tübüllerin morfolojik yapılarında farklılıklar olduğu görüldü. Kontrol grubunda; glomerül ve tübü-

ler yapınının histolojik olarak normal yapıda olduğu; Diyabet grubunda, genişlemiş tübüller ve yoğun kanama alanlarının olduğu; diyabet ve metformin tedavi grubunda ise normale yakın glomeruler yapınının görülmesi ile beraber, nadir olarak tübül yapılarında vakuollerin olduğu görüldü (Şekil 2A, B, C).



Şekil 2: Farelerde yüksek yağlı diyet / streptozotisin ile indüklenen tip 2 diyabette metforminle tedaviyi takiben böbrekteki histolojik değişikliklerin görüntüleri. A: Kontrol, B: Diyabet, C: Diyabet+Metformin

TARTIŞMA

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar diyabette lipid peroksidasyonunun artması sonucunda metabolik kontrolün azaldığını ve oluşan oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının gelişiminde rol oynayabileceğini bildirmektedir.

Diyabette artan lipid peroksidasyonu nedeni ile hücre zarının akıcılığında değişiklikler oluşması ile glikozun hücre içine taşınmasını azaltmaktadır (18). Çalışmamızda dört hafta boyunca YYD ve STZ ile indüklenerek Tip 2 DM oluşturulan farelerde Metformin tedavisinin farelerin karaciğer ve böbrek dokularındaki koruyucu etkileri biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırıldı.

Çalışmamızda, dört haftalık YYD ile beslenme sonunda farelerde kilo ve kan glikoz seviyelerinde artışın olduğu görüldü. Yapılan bazı çalışmalarda bizim çalışmamızda olduğu gibi yüksek yağlı diyetin hiperglisemiye ve insülin rezistansına yol açtığı gösterilmiştir (19, 20). Tripathy ve ark. çalışmalarında yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde hiperglisemik, hiperinsulinemik ve hipertrigliseridemik bir metabolik tablonun oluştuğunu bildirmişlerdir (21). Çalışmamızda MTF tedavisine başlandıktan sonra farelerde kilo kaybının başladığı görüldü. Tedavinin son haftasında D+MTF grubundaki farelerin hem ortalama vücut ağırlıklarında hem de kan glikoz seviyelerinde belirgin bir şekilde düşüş oldu.

Bu durum MTF'nin açlık dürtüsünü azaltarak kilo kaybına yapması özelliğinden kaynaklanmaktadır. Metformin bu özelliği nedeni ile özellikle kilolu ve obez bireylerde Tip 2 DM tedavisi için oral olarak ilk tercih edilen ajandır (22).

Metformin, Tip 2 DM tedavisinde tüm dünyada en sık reçete edilen ilaçtır. Çok yönlü faydalı etkilere sahip olması nedeniyle potansiyel olarak yeni klinik uygulamalar için de kullanımı önerilmektedir (23). Karbonhidrat, protein, ve lipid metabolizmasındaki bozuklukların yanı sıra hiperglisemik koşullarda oksidatif stres diyabetik hastalarda karaciğer hasarının en önemli nedenidir. Ayrıca böbrek dokusunda diyabette serbest radikal oluşumu ve arteriyel hipertansiyonla ilişkili oksidatif hasardan etkilenir ve bu durum diyabetik nefropatiye neden olur (24).

Lipid peroksidasyonu aynı zamanda, diyabetik hayvanlarda ciddi doku hasarına neden olan aşırı serbest radikal üretimini tetikler. Bu nedenle, diyabeti yönetmek için antioksidanlar ve serbest radikal temizleyici moleküller aracılığıyla zararlı olan ROS'un hızlı bir şekilde zararsız seviyelere indirilmesi gereklidir. STZ ile indüklenen diyabetik farelerde hepatik ve renal antioksidan enzimlerin belirgin bir şekilde baskılandığı gözlemlendi.

Çalışmamızda MTF tedavisi alan farelerin karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif stres belirteci olan MDA düzeyleri K ve D grubuna kıyasla daha düşüktü. Yine hücre içi önemli antioksidan enzimlerden olan GSH ve KAT aktivitesi D+MTF grubunda daha yüksekti. Bu yükseklik böbrek dokusunda anlamlı düzeydeydi. Çalışmamız sonuçları daha önceden araştırmacılar tarafından bildirilen bulgularla uyumludur (25, 26). Yapılan bir çalışmada STZ ile indüklenen diyabetik farelerde Karaciğer dokularında MDA düzeylerinin arttığı, GSH ve KAT düzeylerinin ise azaldığı rapor edilmiştir (27). Nabi ve ark. (28) araştırmalarında diyabetik farelerde, hepatik (SGOT, SGPT ve ALP) ve renal (serum üre ve kreatinin) fonksiyonel belirteçlerin yüksek olduğunu, bu enzim aktivitelerinin diyabetik tedavi gören grupta normale yakın seviyelerde olduğunu bildirmişlerdir. Wnag ve ark. (29) da benzer şekilde diyabetik farelerde karaciğer enzimlerinin artış göstermesinin nedenini artmış ketogenez ve glukoneogenez ile ilişkilendirmişlerdir.

Çalışmamız böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmelerinde tedavi alan D+MTF grubundaki farelerin glomeruler ve tübüller yapılarının normale yakın olduğu nadir olarak tübül yapılarında vakuollerin olduğu görüldü. D grubunda böbrek dokusunda ciddi hasarlanmanın varlığı tespit edildi. Yine D+MTF tedavi grubunda nadir alanlarda vakuolizasyon, yer yer nekroz ve sinozoider tıkanıklıkların olduğu, D grubunda ise yoğun vakuolizasyon, yüksek oranda sinozoidal tıkanıklık ve nekrozun olduğu görüldü.

Yapılan bir çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetik ratlarda, diyabete bağlı gelişen anormal karaciğer hücrelerinin oluşumunun metformin tedavisi ile baskılandığını bildirmişlerdir (30).

Bir başka çalışma da thioacetamide ile hepatik hasar oluşturulan ratlara metforminin uygulanmasının hepatik hücrelerde koruyucu etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada metforminin karaciğer fibrozunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve karaciğerin yapısını kısmen koruduğunu vurgulanmıştır (31). Albasher ve ark'da YYD ve STZ ile indüklenen diyabetik farelere MTF tedavisi ile beraber yardımcı bir antioksidan ajan kullanarak antioksidan, antiapoptotik ve anti-inflamatuvar etkilerini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmışlar. Araştırmanın sonucunda karaciğer ve böbrek ve pankreas dokularında lipit peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeylerinin arttığı, karaciğer enzimlerinden AST, ALT düzeylerinde artışın olduğunu, MTF tedavisi alan grupta hem bu parametrelerin azaldığını hem de antioksidan enzimlerden SOD, KAT, GSH ve GPx düzeylerinde önemli düzeyde artış ve apoptozun azalmış olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca mikroskopik olarak, STZ enjekte edilmiş farelerin böbrek dokusunda glomerüler tıkanıklık, bowman kapsülünde genişleme, vakuolar dejenerasyon, interstisyel dokudaki inflamatuvar hücreler ve bazı renal tübüllerin lümeninde hasarlanmaların olduğunu tedavi grubunda bu hasarların azaldığını bildirilmiştir (10).

Özet olarak, mevcut çalışma YYD ile beraber STZ enjeksiyonunun, insülin seviyelerinde bir düşüş ile serum glikoz seviyelerinde ve oksidatif stres belirteçlerinde artışlara, antioksidan enzimlerde kayda değer azalmalara neden olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, Metformin ile tedavi edilen farelerin hepatorenal dokularında oksidatif

stresin arttığı antioksidan enzimlerin azaldığı, Metformin tedavisinin diyabetin neden olduğu diyabetik hepatorenal hasarı tersine çevirdiği veya hasarı hafifletmede etkili olduğu görüldü. Ancak metforminin uzun dönemde kullanımının etkilerini derinlemesine araştırılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2017; 389(10085): 2239-51.
- Kemerci G, Elçioğlu HK. Diyabet ve hipertansiyonda kullanılan takviye edici gıdalar. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017;(21):10-18.
- Hamamcıoğlu AC. Diyabette Oksidatif Stres ve Antioksidanların Rolü. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*. 2017;1(1):7-13.
- Çetiner Ö, Rakıcioğlu N. Hiperglisemi, Oksidatif Stres ve Tip 2 Diyabette Oksidatif Stres Belirteçlerinin Tanımlanması. *Türk Diyab Obez*. 2020; 4(1):60-68.
- Song Y, Huang L, Yu J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling. *Journal of Neuroimmunology*. 2016;(301):1-6.
- Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, et al. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*. 2013;32(2):179-185.
- Taheri N, Azarmi Y, Neshat M, Garjani A, Doustar Y. Study the effects of metformin on renal function and structure after unilateral ischemia-reperfusion in rat. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2012;7(5):77.
- Silvaes RR, da Silva Pereira ENG, Flores EIE, et al. High-fat diet-induced kidney alterations in rats with metabolic syndrome: Endothelial dysfunction and decreased antioxidant defense *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;(12): 1773-1781.
- Zhang S, Xu H, Yu X, Yu W, Sui D. Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;14(1):383-390.
- Albasher G, Alwahaibi M, Abdel-Daim MM, et al. Protective effects of *Artemisia judaica* extract compared to metformin against hepatorenal injury in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(32):40525-40536.
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez F J, et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-1272.
- Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with α -tocopherol in rat kidneys. *Urological Research*. 2001;29(3):190-193.
- Kalyoncu Ş, Yılmaz B, Demir M, et al. Melatonin attenuates ovarian ischemia reperfusion injury in rats by decreasing oxidative stress index and peroxynitrite. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2020;50(6):1513-1522.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265-275.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-310.
- Beutler E. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-888.
- Iwase T, Tajima A, Sugimoto S, et al. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Scientific Reports*. 2013;3(1):1-4.
- Tümer G, Çolak G. Tip 2 diabetes mellitusda tıbbi beslenme tedavisi. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012;29(1s):12-15.
- Jump DB. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Current opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2011;14(2):115-120.
- Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Lee HY, et al. A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010;299(5):808-815.
- Tripathy S, Torres-Gonzalez M, Jump DB. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese BL/6J mice. *Journal of Lipid Research*. 2010;51(9):2642-2654.
- Yates MS, Coletta AM, Zhang Q, et al. Prospective randomized biomarker study of metformin and lifestyle intervention for prevention in obese women at increased risk for endometrial cancer. *Cancer Prevention Research*. 2018;11(8):477-490.
- Wang YW, He SJ, Feng X, et al. Metformin: a review of its potential indications. *Drug design, Development and Therapy*. 2017;11:2421-2429.
- Mohamed J, Nafizah AN, Zariyantey AH, et al. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: the role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2016;16(2): 132-141.
- Nna VU, Abu Bakar AB, Ahmad A, et al. Oxidative stress, NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis in the testes of streptozotocin-induced diabetic rats: Combined protective effects of Malaysian propolis and metformin. *Antioxidants*. 2019;8(10):465.

- 26.** Yazdi HB, Hojati V, Shiravi A, et al. Liver Dysfunction and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Protective Role of *Artemisia Turanica*. *Journal of Pharmacopuncture*. 2019;22(2):109-114.
- 27.** Doğanay S, Trabzon Ő, Bahtiyar N, ark. Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçanlarda Melatoninin Antioksidan Aktivitesi; Kan ve Karaciğer Dokusunda. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2020;10(4):608-614.
- 28.** Nabi SA, Kasetti RB, Sirasanagandla S, et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Piper longum* root aqueous extract in STZ induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;18(2):13-37.
- 29.** Wang X, He H, Liang LB, et al. The Preliminary Investigation of GLP-1 Receptor Agonist on Liver Steatosis in Obese Mice. *Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*. 2017;48(1):28-32.
- 30.** Gopal V, Mandal V, Tangjang S, et al. Serum Biochemical, Histopathology and SEM Analyses of the Effects of the Indian Traditional Herb *Wattakaka Volubilis* Leaf Extract on Wistar Male Rats. *Journal of Pharmacopuncture*. 2014;17(1):13-19.
- 31.** Al-Hashem F, Al-Humayed S, Amin SN, et al. Metformin inhibits mTOR–HIF-1 α axis and profibrogenic and inflammatory biomarkers in thioacetamide-induced hepatic tissue alterations. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(6):9328-9337.