



Koşma Egzersizi Uygulanan Deneysel Diyabetik Ratlarda Karaciğer Dokusunun CD68 ile Değerlendirilmesi

Leyla Bahar ¹

1 Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp AD, Mersin, Türkiye

Geliş: 12.07.2021; Revizyon: 23.08.2021; Kabul Tarihi: 24.08.2021

Öz

Amaç: Diyabet, son yıllarda yaygınlığı hızla artan ve ciddi komplikasyonları olan metabolik bir hastalıktır. Canlı sistemlerin önemli bir fonksiyonu olan fiziksel aktivite, birçok sistemi etkilediği gibi metabolik ve histolojik parametreleri de etkileyebilmektedir. Bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulan ratlarda koşma egzersiz uygulamalarının karaciğer dokusu üzerindeki etkilerinin Cd68 ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmaya 32 adet yetişkin Wistar Albino erkek ratların karaciğer dokuları dahil edildi. 1.Grup: Kontrol Sedanter (Cs), 2.Grup: Kontrol Koşma (Cr), 3.Grup: Diyabet Sedanter (Ds), 4.Grup: Diyabet Koşma (Dr) şeklinde dört grup olarak belirlendi. Deneydeki 2 grup; intraperitoneal enjeksiyon ile 45 mg/kg streptozotosin (STZ) tek doz uygulanarak diyabet oluşturulan gruptu. Egzersiz grupları; 4 hafta boyunca (3 gün/haftada) 30 dakika koşma egzersizi yaptırıldı. Deney sonrasında, karaciğer dokuları çıkarılıp, tespit solüsyonuna konuldu, rutin ışık mikroskopik doku takibi uygulandı. 4-5 µm kalınlığında alınan kesitlere, ışık mikroskopik inceleme için rutin Hematoksilen +Eosin boyama yapıldı. İmmünohistokimyasal boyama için deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri gerçekleştirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi, antijen iyileştirme yapıldı. Primer antikor, sırasıyla biyotinlenmiş sekonder antikor ve streptavidin-peroksidaz enzim konjugatı aşamaları uygulandı. DAB ve zıt boyamalar yapılarak kapatıldı ve ışık mikroskopik olarak incelendi. Total Hasar skoru ve immunreaktivite pozitifliği hesaplanarak istatistiki analizleri (T testi ve Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis H) yapıldı.

Bulgular: Kontrol sedanter (Cs) ve kontrol koşma (Cr) gruplarında; karaciğer parankim hücreleri hepatositlerin morfolojik yapıları normal görünümündü. Diabet sedanter (Ds) grubunda ise; karaciğer dokusunun klasik hegzagonal lobüler yapısı bozulmuştu. Sinüzodal kanallarda yer yer düzensiz dizilim ve hepatosit hücrelerinde nekroz ve vakuolizasyona sıklıkla rastlandı. Diabet Koşma (Dr) grubunda ise, hepatik lobüler yapının bütünlüğün bozan dejeneratif alanlara daha az rastlandığı gözlemlendi. Ds ve Dr grupları arasında doku hasar parametrelerinin azalması istatistiki olarak anlamlıydı (p<0.05). İmmünreaktivite yoğunluğu (CD68) açısından yapılan değerlendirme sonucunda ise Cs ve Cr grupları arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi (p>0.05). Cs ile Ds grupları arasında ve Ds ile Dr grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edildi (p<0.05).

Sonuç: Sonuç olarak, bu çalışmada diyabetik hastalarda düzenli egzersizin karaciğerdeki doku hasarını azaltarak, inflamasyonu azalttığı morfolojik olarak gösterilmiştir. Hücresel nekroz, vakuolizasyon ve dejenerasyonun azalması, ayrıca yaygın enflamasyona immün yanıt olarak artan kupffer hücrelerinin sayıca gerilemesi, koşma egzersizinin diyabetik karaciğer dokusunu olumlu yönde etkilediği ve iyileşmeyi artırdığı sonucunu doğrulamaktadır.

Anahtar kelimeler: Diyabet, karaciğer dokusu, egzersiz, CD68.

DOI: 10.5798/dicletip.988084

Correspondence / Yazışma Adresi: Leyla Bahar, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp AD, Çiftlikköy kampüsü, Mersin, Türkiye e-mail: leylabahar@mersin.edu.tr

Assessment of Liver Tissue with CD68 in Experimental Diabetic Rats Applied Running Exercise

Abstract

Objective: Diabetes is a metabolic disease that has increased in prevalence in recent years and has serious complications. Physical activity, which is an important function of living systems, can affect metabolic and histological parameters as well as many systems. In this study, it was aimed to evaluate the effects of running exercise on liver tissue in rats with experimental diabetes using Cd68.

Methods: Liver tissues of 32 adult Wistar Albino male rats were included in the study. Group 1: Control Sedentary (Cs), Group 2: Control Running (Cr), Group 3: Diabetes Sedentary (Ds), Group 4: Diabetes Running (Dr). 2 groups in the experiment; diabetes was formed by administering a single dose of 45 mg/kg streptozotocin (STZ) by intraperitoneal injection. Exercise groups; for 4 weeks (3 days/week); 30 minutes of running exercise was done. After the experiment, liver tissues were removed and placed in fixation solution, and routine light microscopic tissue monitoring was performed. Routine Hematoxylin + Eosin staining was applied to sections taken at 4-5 µm thickness for light microscopic examination. Deparaffinization and rehydration processes were performed for immunohistochemical staining. Inhibition of endogenous peroxidase activity, antigen enhancement was performed. Primary antibody, biotinylated secondary antibody and streptavidin-peroxidase enzyme conjugate steps were applied, respectively. DAB and contrast staining were performed and the light was examined microscopically. Total Damage score and immunoreactivity positivity were calculated and statistical analyzes were done (T test and Mann Whitney U test were determined. Kruskal Wallis H).

Results: In the control sedentary (Cs) and control running (Cr) groups; morphological structures of liver parenchyma cells and hepatocytes were normal. In the sedentary group of diabetes(Ds); The classical hexagonal lobular structure of the liver tissue was impaired. Irregular arrangement in the sinusoidal channels and necrosis and vacuolization in hepatocyte cells were frequently observed. In the Diabetes Running (Dr) group, it was observed that degenerative areas that disrupt the integrity of the hepatic lobular structure were less common. The decrease in tissue damage parameters between Ds and Dr groups was statistically significant ($p<0.05$). As a result of the evaluation made in terms of immunoreactivity density (CD68), it was observed that there was no significant difference between Cs and Cr groups ($p>0.05$). A statistically significant difference was found between Cs and Ds groups and between Ds and Dr groups ($p<0.05$).

Conclusion: In this study, it was morphologically shown that regular exercise in diabetic patients reduces inflammation by reducing tissue damage in the liver. The decrease in cellular necrosis, vacuolization and degeneration, as well as the decrease in the number of kupffer cells, which increase in immune response to diffuse inflammation, confirms the conclusion that running exercise positively affects diabetic liver tissue and increases healing.

Keywords: Diabetes Mellitus, liver tissue, exercise, CD68.

GİRİŞ

Dünyada gelişen ve gelişmekte olan toplumların tümünde diyabet yaygınlığı hızla yükselmektedir. Dünyada diyabet nüfusunun 2030 yılında yaklaşık 438 milyona ulaşması beklenmektedir¹. Bu hastalığın vasküler komplikasyonlarının ilerlemesinde, oksidatif stres ve inflamasyonun anahtar rolleri iyi bilinmektedir². Diabetes mellitus dahil çok çeşitli kronik hastalıklar için değiştirilebilir davranışsal risk faktörleri olarak, fiziksel hareketsizlik ve obezite giderek artmaktadır. Obeziteye ve ilgili metabolik hastalıklara karşı egzersizin savunulması, egzersiz yapılmadan kalori kısıtlanmasının istirahat metabolizma hızını düşürebileceği ve kilo kaybını önleyebileceğinin farkına varılmasıyla, daha da

önem kazanmaktadır³. Faydalı etkileri kanıtlanmış olsa da diyabet tanılı hastaların %69'u yeterli fiziksel aktiviteler yapmamaktadır. Bu sebeple; diyabeti olan insanlarda fiziksel aktivite düzeyini artıracak yeni stratejiler geliştirmek çok önemlidir⁴. Deneysel diyabet modellerinde egzersizin glikoz metabolizması üzerine olumlu etkiler oluşturduğu, oksidatif stresi azaltarak, pankreas β hücrelerinin bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir⁵.

Vücuttaki insülin miktarının %50'si hepatositlerde yıkılmaktadır. Hücre içerisinde oluşan insülin yıkımlarında birçok farklı lizozomal enzim görev almaktadır⁶. Egzersiz sırasında, anaerobik metabolizma aerobik metabolizmaya dönüşür, kas

hücrelerine oksijen ve glukoz girişi artar. Glukoz konsantrasyonu, karaciğerde glukoz üretimi, dolaşıma verilmesi ve kaslar tarafından da alınması, kullanılması ile sabit tutulur. Egzersiz süresi uzadıkça, glikojen depoları birkaç saat içinde tükenir ve lipoliz egzersiz yapan kas için ana yakıt kaynağı olur. Karaciğerde glikoneogenez ile glukoz üretimi olur⁷. Kronik hastalıklarda egzersizin etkilerini araştıran çalışmalarda direnç egzersizleri kullanılması ile insülinin dokulardaki etkisiyle, diyabet oluşum riskinin önlenmesi ve diyabetin tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir⁸.

Hepatoselüler apoptoz, hepatik inflamasyon ve fibroz, kronik karaciğer hastalıklarında öne çıkan özelliklerdir. Bununla birlikte, bu süreçler arasındaki bağlantı mekanik olarak belirsizliğini korumaktadır. Kupffer hücrelerinin apoptoz ve aktivasyonunun yanı sıra bunların karaciğer fibroz sürecine patofizyolojik katılımı sözkonusudur⁹. Kupffer hücreleri ve infiltre eden monositler / makrofajlar, karaciğerdeki doğuştan gelen immün hücrelerin ana popülasyonunu oluşturur¹⁰. Birkaç istisna dışında, egzersiz yoğunluğunun visseral yağ dokusunu (VAT) azaltma üzerindeki etkisini belirlemek için özel olarak tasarlanmış randomize çalışmalardan elde edilen ön bulgular, gerçekleştirilen egzersiz yoğunluğunun VAT'daki değişimin birincil belirleyicisi olmadığını göstermektedir¹¹. Bazı çalışmadan elde edilen veriler, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı olan hastaların düşük fiziksel aktivite düzeyine sahip olduklarını ve diabetes mellitus hastalarında fiziksel aktivite ve orta-şiddetli fiziksel aktivitenin en düşük çeyreğinde performans gösterdiklerini göstermektedir¹². Francisco Pino-de la Fuente ve ark. nın (2019) bulguları, egzersizin bir NAFLD modelinde karaciğer hasarını kurtardığını ve lipid damlacıkları (LD)'nin boyutunu azalttığını ve de novo lipogenez ve lipolizin protein belirteçlerini normalleştirdiğini göstermektedir. Ayrıca

egzersiz, kontrol farelerinde LD dinamikleri ile ilişkili proteinleri artırır¹³.

Kupffer hücreleri (KC'ler) karaciğerde yerleşik makrofajlardır ve fizyolojik koşullarda ve patolojide karaciğer homeostazının düzenlenmesinde öncü rol oynarlar¹⁴. CD68, makrofajlarda ve diğer mononükleer fagositlerde yüksek oranda eksprese edilen, ağır glikosile edilmiş bir glikoproteindir. Geleneksel olarak CD68, iltihaplı dokuların, tümör dokularının ve diğer immünohistopatolojik uygulamaların histokimyasal analizinde monosit/makrofajları immüno-lekelemek için değerli bir sitokimyasal belirteç olarak kullanılır¹⁵. Anti-fibrotik tedavilerin tasarımı için önemli etkileri olan temizleyici reseptörü CD68, kronik karaciğer hasarında önemli bir rol oynar¹⁶.

Bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulan ratlarda koşma egzersiz uygulamalarının karaciğer dokusu üzerindeki etkilerinin Cd68 ile değerlendirilmesi yapılmıştır ve egzersizin diabetik hastaların karaciğer dokusuna olumlu ve/veya olumsuz etkileri araştırılmıştır.

YÖNTEMLER

Bu çalışma; Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) 12.04.2021 tarihli 06/18 numara ile onay alınmıştır. Çalışmaya 32 adet yetişkin Wistar Albino erkek ratların karaciğer dokuları dahil edildi. Dokuları çıkarılan rat grupları; 1.Grup: Kontrol Sedanter (Cs), 2.Grup: : Kontrol Koşma (Cr), 3.Grup: Diyabet Sedanter (Ds), 4.Grup: Diyabet Koşma (Dr) şeklinde dört grup olarak belirlendi. Deneydeki 2 grup; intraperitoneal enjeksiyon ile 45 mg/kg streptozotosin (STZ) tek doz uygulanarak diyabet oluşturulan gruptu. Egzersiz grupları; 4 hafta boyunca (3 gün/haftada) 30 dakika koşma egzersizi yaptırılan gruplardı. Deney sonrasında anestezi altında eksanguinasyon uygulanan ratların karaciğer dokuları çıkarılıp, tespit solüsyonuna konuldu.

Işık Mikroskopik Doku Takibi

Doku materyalleri, %10'luk formaldehit solusyonunda tespit edildikten sonra, fiksasyonu tamamlanan dokular yükselen konsantrasyonlarda etil alkolle işleme (%70-80-95 - absolü) alındı, şeffaflandırma (ksilen) ve infiltrasyon gibi doku takibi aşamalarından geçirilerek parafin bloklar haline getirildi. 4-5 µm kalınlığında alınan kesitlere, ışık mikroskopik inceleme için rutin Hematoksilen +Eosin (Bright slight;BS01-105-1000) boyama işlemleri uygulandı.

İmmünohistokimyasal Yöntemler

Doku parçaları %10'luk formaldehide fikse edildikten sonra, rutin işlemleri takiben parafine gömüldü. 4-5 µm kalınlığında alınan kesitlere, İmmünohistokimyasal boyama için deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri gerçekleştirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi (3% H₂O₂ in PBS; 15 min.) ardından kesitler, 5 dakika mikrodalgada antijen iyileştirme işlemi yapıldı. 30 dakika süreyle %5 sığır serum albümini ile önceden bloke edildi. Sonra 1/200 dilüsyonda hazırlanmış primer antikor (antiCD68;Clone KP1;Ref:RA0060-C.5) ile gece boyunca +4°C de inkübe edildi. PBS'de yıkandıktan sonra, Sırasıyla biyotinlenmiş sekonder antikor (30 min.) ve streptavidin-peroksidaz enzim konjugatı (30 min.) aşamaları uygulandı. ardından 3,3'-diaminobenzidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, ABD) ile 2-5 dakika boyandı. Slaytlar son olarak 2-3 dakika Mayer's hematoksilen (Bright slight;BS01-104-1000) ile zıt boyandı, kapatıldı ve incelendi. Mikrografların elde edilmesi ve değerlendirilmesinde; mikroskopta (Olympus BX53), NIS-Elements Documentation 4.5 görüntü analiz ve DP26 kamera sistemi ile preparatların fotoğraflanması sağlandı. Total Hasar skoru ve immunreaktivite pozitifliği hesaplanarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal (IHC) boyama sonucunda, makrofajlar ve monositler üzerinde CD68 antikorunun ekspresyonu incelendi. Boyama sonrası lamlarda hücre değerlendirmesi yapıldı. Sayım alanları rastlantısal olarak seçildi, her preparat için 10'ar alan sayılarak yapıldı. 500 hücre analiz edilerek CD68 immün pozitif hücrelerin yüzdesi belirlendi. Pozitif hücre sayısı ile analiz edilen toplam hücre sayısı arasındaki oran temsil edildi. IHC skorları, immün boyanmış hücrelerin yüzdesine göre belirlendi: İmmünohistokimyasal sonuçları tahmin etmek için aşağıdaki ölçek oluşturuldu: 0=negatif boyanma hücrelerin %0-5'i; 1+=zayıf pozitif boyanma %5-10'u; 2+=orta pozitiflik boyanma, %10-50'si; 3+=güçlü pozitif boyanma %50'sinden fazlası boyanmıştır.

İstatistiksel Analiz

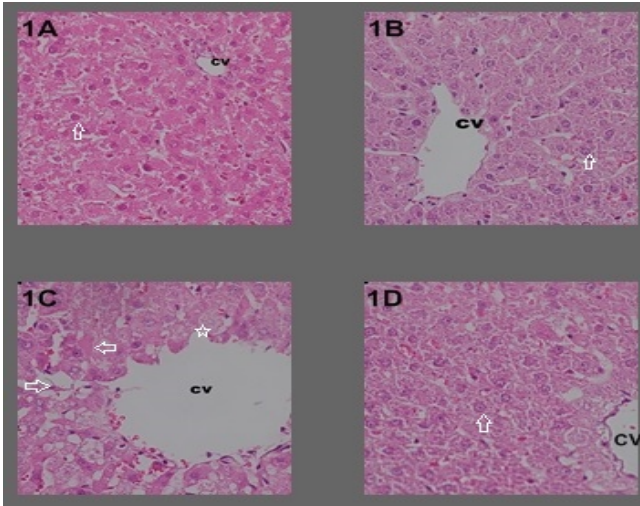
İstatistiksel analizler elde edilen dağılım durumuna bağlı olarak Bağımsız Gruplar için, T testi ve Mann Whitney U testi olarak belirlendi. Kruskal Wallis H testi ile elde edilen bulgularda fark gözlenmesi durumunda bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığının saptanmasında (post-hoc) Mann Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR

H&E Boyama ve İmmünohistokimya

Işık Mikroskopik olarak, Hemotoksilen+Eosin (H+E) boyamaların değerlendirilmesi için bu çalışmada, karaciğer doku yaralanmaları yarı kantitatif olarak "nekroz, dejenerasyon, hücrel vakuolizasyon" parametrelerinin değerlendirilmesi ile puanlandı. 0: hasar yok, 1: hafif hasar, 2: orta hasar, 3: ciddi hasar [Jafaripour,2021]. Deney gruplarının total hasar skorları değerlendirildi. Kontrol sedanter (Cs) ve kontrol koşma (Cr) gruplarında; karaciğer parankim hücreleri hepatositlerin morfolojik yapıları normal görünümündü. Santral yerleşimli yuvarlak-oval nükleuslu, binükleasyonu olan hepatosit hücreleri

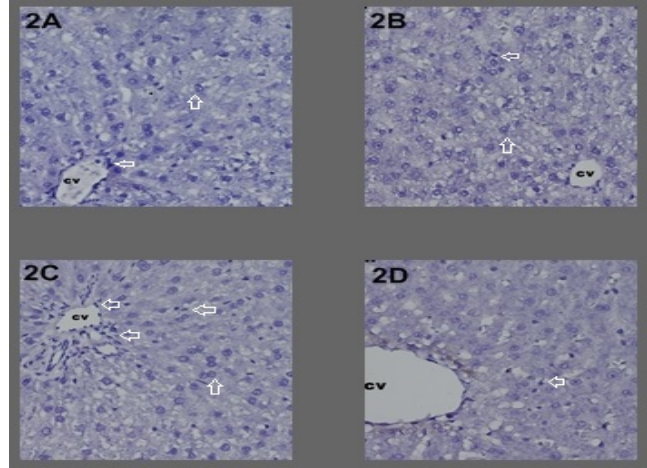
yanısıra, sinüzoid kanalların ayırdığı hepatosit dizilerinin tek sıra halinde, ışınal şekilde düzenlendiği hepatic lobüller ve portal triad yapıları normal morfolojide izlendi; nekroz, degenerasyon ve hücresel vakuolizasyona rastlanmadı veya nadir sayıda değerlendirildi (Şekil 1A,1B). Diabet sedanter (Ds) grubunda ise; karaciğer dokusunun klasik heksagonal lobüler yapısı bozulmuştu. Sinüzodal kanallarda yer yer düzensiz dizilim ve hepatosit hücrelerinde nekroz ve vakuolizasyona sıklıkla rastlandı. Dokunun birçok kısmında hücresel morfolojinin bozulduğu (hepatosit balonlaşması, nükleer lokalizasyon değişikliği ve köprüleşme fibrozisi) ve birbirinden ayrıldığı dejeneratif alanlar mevcuttu. Ayrıca santral ven endotel yapısının bütünlüğünü kaybetmesi belirgin olarak izlendi (Şekil 1C). Diabet Koşma (Dr) grubunda ise, Ds grubunda sık rastlanan, nekroz ve hücresel vakuolizasyonun daha az sayıda olduğu ve hepatic lobüler yapının bütünlüğün bozan dejeneratif alanlara daha az rastlandığı gözlemlendi (Şekil 1D). Semikantitatif değerlendirmelerde de doku hasar parametrelerinin azalması istatistik olarak anlamlıydı.



Şekil 1. Deney gruplarının toplam hasar puanının belirlenmesi (H+E boyama, 40x). Gruplar; 1A: Kontrol sedanter, 1B: Kontrol koşma, 1C: Diabet sedanter, 1D: Diabet koşma. Sol ok: Nekroz, sağ ok: vakuolizasyon, yukarı ok: hepatositler, yıldız: dejenerasyon, cv: central ven.

İmmünohistokimyasal Analiz

Çalışmamızda, Karaciğer makrofajları/Kupffer hücrelerinin, aktivasyonunu izlemek için spesifik bir makrofaj belirteci olan CD68 kullanıldı [Thomas,2011]. Şekil 2’de gösterildiği gibi, Cs grubunda, CD68 ile immünreaktivite yoğunluğu zayıf pozitif veya negatif olarak değerlendirildi, Cr grubunda da benzer sonuçlar belirlendi (Şekil 2A,2B). CD68-pozitif hücreler, Ds grubun hepatic sinüzoidlerinde yaygındı ve normal kontrol grubu karaciğer dokusunda çok düşük seviyelerde olmasına rağmen Ds grubunda yaygın ve çok sayıda gözlemlendi. Güçlü immünreaktivite gösteren CD68-pozitif makrofajlar (Kupffer cell) sadece hepatic sinüzoidlerde değil, aynı zamanda portal alanlarda da ortaya çıktı (Şekil 2C). Dr grubunda ise immünreaktivite yoğunluğu gösteren hücre sayısının azaldığı, daha çok sinüzodal alanlara lokalize olduğu tespit edildi ve bu azalma istatistik olarak da anlamlı bulundu (Şekil 2D).



Şekil 2: Deney gruplarında (CD68, X20) CD68 ile makrofajların (Kupffer hücresi) immünoreaktivite yoğunluğunun belirlenmesi. Gruplar; 2A: Kontrol sedanter, 2B: Kontrol koşma, 2C: Diabet sedanter, 2D: Diabet koşma. Sol ok: makrofaj (Kupffer hücresi), yukarı ok: Hepatosit, cv: central ven.

İstatistiksel Değerlendirme

Deney grupları karaciğer dokuları; necrosis, degeneration and cellular vacuolization bakımından değerlendirilerek total hasar skorları belirlendi, ortalama ve standart

sapmaları hesaplandı (Tablo I). Kontrol sedanter (Cs) ve kontrol koşma (Cr) grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Cs ile Ds grupları arasında ve Ds ile Dr grupları arasında anlamlı fark vardı ($p<0,05$), (Tablo II).

İmmünreaktivite yoğunluğu (CD68) açısından yapılan değerlendirme sonucunda ise ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo I). Cs ve Cr grupları arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Cs ile Ds grupları arasında ve Ds ile Dr grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$), (Tablo II).

Tablo I: Grupların nekroz, dejenerasyon ve hücrel vakuolizasyon değerleri, toplam hasar skoru ve immünreaktivite yoğunluğu (ortalama ve standart sapma)

Gruplar mean±SE M (n=8)	Nekroz mean±SE EM (n=8)	Dejenerasyon mean±SE M (n=8)	Hücrel vakuolizasyon mean±SE M (n=8)	Total hasar skoru mean±SE EM (n=8)	İmmünreaktivite yoğunluk analizi (CD68) mean±SEM (n=8)
Kontrol Sedanter (Cs)	0,71±0,45	0,62±0,21	0,85±0,69	0,72±0,80	12,71±4,07
Kontrol Koşma (Cr)	0,66±0,51	0,58±0,39	0,81±0,48	0,68±0,46	18,09±6,3
Diyabet Sedanter (Ds)	1,90±0,63	2,00±0,57	2,14±0,69	2,01±0,63	67,3±5,77
Diyabet Koşma (Dr)	1,28±0,48	1,14±0,37	1,37±0,51	1,26±0,45	42,1±6,48

Tablo II: İmmünreaktivite yoğunluk analizi ve toplam hasar skorları açısından gruplar arasında istatistiksel karşılaştırmalar

Total hasar skoru		İmmünreaktivite yoğunluk analizi	
Kontrol Sedanter (Cs)	Kontrol Koşma (Cr)	Kontrol Sedanter (Cs)	Kontrol Koşma (Cr)
P = 0.9106		P = 0.0820	
Kontrol Sedanter (Cs)	Diyabet Sedanter (Ds)	Kontrol Sedanter (Cs)	Diyabet Sedanter (Ds)
*P = 0.0058		*P < 0.0001	
Diyabet Sedanter (Ds)	Diyabet Koşma (Dr)	Diyabet Sedanter (Ds)	Diyabet Koşma (Dr)
*P = 0.0249		*P < 0.0001	

Analizler, Pearson'ın ki-kare testi ve uygun olduğu şekilde Student's t-testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz MedCalc free kullanılarak yapıldı. *İstatistiksel anlamlılığı belirtmek için $P < 0,05$ düzeyi kullanılmıştır.

TARTIŞMA

Diyabetes Mellitus, insülin salgılanması ve/veya insülin etkisindeki mutlak veya göreceli eksikliklerle karakterize edilen kronik bir metabolik hastalıktır¹⁷. Kan şekerinin dengelenmesinden sorumlu olan Karaciğer, karbonhidratların metabolizmasında önemli bir role sahiptir¹⁸. Karaciğer hastalığı varlığında, insülin direnci, glukoz intoleransı ve diyabet gibi bozukluklar sonucunda glukozun metabolik homeostazı bozulur¹⁹. İnsülin direnci sadece kas dokusunda değil aynı zamanda yağ dokusunda da oluşur²⁰ ve bu durum hiperinsülinemi ile birlikte karaciğer hastalığında diyabetin önemli patofizyolojik temelleri gibi görünmektedir²¹. Bu çalışmada, diyabetin Karaciğerde oluşturduğu doku hasarı ve inflamatuvar bulgular üzerine egzersizin etkilerini incelemek hedeflenmiştir. Karaciğer hasarı hücrel nekroz ve inflamasyondan oluşur ve bu bozukluklar trigliseritler üzerindeki mitokondriyal oksidatif stresin artmasından kaynaklanır²². Kronik inflamasyon diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli bir rol oynar. İnflamasyonu destekleyen moleküler mekanizmaları anlamak, yeni anti-inflamatuvar tedavilerin tasarımı için bir ön koşuldur. Dolaşımdaki sitokinlerin ve akut faz proteinlerinin kaynağı olarak karaciğer, sistemik inflamasyonun kontrolüne katkıda bulunur. Son yıllarda inflamatuvar yanıtı destekleyen high mobility group box 1 (HMGB1) gibi bazı proteinlerin salınımının bloke edilmesinin, diyabetin neden olduğu iltihabı iyileştirmeyi ve ardından karaciğer hasarını iyileştirmeyi amaçlayan potansiyel olarak etkili bir terapötik stratejiyi temsil ettiği bildirilmektedir²³. Bu çalışmada karaciğeri olumsuz etkileyen diyabetin komplikasyonlarına karşı, terapötik seçeneklerden biri olarak koşma egzersizi ele alınmıştır. Hafif ila orta şiddette hiperglisemi ve kompanse karaciğer hastalığı olan hastaların ilk tedavisi yaşam tarzı değişikliği olabilir, çünkü

bu aşamada insülin direnci baskın bir faktördür²⁴. Önemli kanıtlar karaciğer yağının artan sağlık riski ile pozitif olarak ilişkili ve azalmanın iyileştirilmiş bir metabolik profil ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır. Egzersiz veya diyetin neden olduğu negatif enerji dengesi ile karaciğer yağında azalma arasında bir doz-yanıt ilişkisi olup olmadığı ve karaciğer yağını azaltmak için tasarlanmış yaşam tarzı temelli stratejilerle ilgili bilgi boşluklarını doldurmaya yönelik çalışmalar artmıştır²⁵. Bizim çalışmamızda da deneysel diyabetli ratların karaciğer parankimal dokusu, kontrol gruplarıyla morfolojik olarak kıyaslandığında, nekroz, vakuolizasyon ve dejenerasyon gibi doku harabiyeti nedeniyle işlevini tam olarak yapamayacak durumda olduğu izlenmiştir (Şekil 1). Egzersiz eğitimi, Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)' de karaciğer histolojisinin iyileşmesine katkıda bulunabilir ve insan kesitsel verileri yoğun egzersizin daha fazla fayda sağladığını düşündürmektedir²⁶. Egzersiz programı ve diyet kısıtlaması immün bir hücre olan hepatik stellat hücre aktivasyonunu değiştirerek, bağımsız olarak karaciğer fibrozisinin azalmasını sağlayabilir²⁷. Bizim çalışmamızda, Karaciğer dokularının inflamatuvar yanıtında önemli olan makrofajların (Kupffer hücre) immünreaktivite yoğunluğu hesaplanarak, azalma olduğu tespit edilmiştir (Tablo I). Kupffer hücrelerinin, aktivasyonunu izlemek için spesifik bir makrofaj belirteci olan CD68 kullanılmıştır²⁸. Ds grubunda CD68-pozitif kupffer hücrelerinin, sadece hepatik sinüzoidlerinde değil, aynı zamanda portal alanlarda da yaygın olarak gözlenmesi, diyabetin oluşturduğu inflamasyona karşı gelişen immün yanıt olarak değerlendirilmiştir. Dr grubunda ise immünreaktivite yoğunluğu gösteren hücre sayısının azaldığı, daha çok sinüzodal alanlara lokalize olduğu tespit edilmesi koşma egzersizinin karaciğerde diyabete bağlı gelişen inflamasyonun azalması olarak yorumlanmıştır. Son çalışmaların birçoğunda farklı

egzersizlerin, bir metabolik sendrom olarak değerlendirilen diyabet metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Bahar ve ark.nın çalışmasında Kontrol-Sedanter ve Diyabet Koşma grupları arasında oksidatif stres belirteci olarak total antioxidant statü (TAS) anlamlı bulunmuştur. Kontrol-Sedanter grubunda, Diyabet Koşma grubuna göre TAS değerinin ortalaması yüksektir²⁹. Bir başka çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda 8 haftalık düzenli koşu bandı antrenmanının, böbrekte ve vastus lateralis kasında lipit peroksidasyonunu ve hiperglisemiyi azaltmasına karşın, akut egzersizin karaciğer lipit peroksidasyonundaki artışı önleyemediği bildirilmektedir³⁰.

Ancak son zamanlarda kesinleşen bulgular içeren çalışmalar mevcuttur. Hem düzenli aerobik egzersiz hem de hipokalorik diyet tüketiminin yaş, biyolojik cinsiyet veya etnik kökenden bağımsız olarak karaciğer yağlanmasında önemli bir azalma ile ilişkili olduğu artık kesin olarak tespit edilmiştir²⁵.

Sonuç olarak, bu çalışmada diyabetik hastalarda düzenli egzersizin karaciğerdeki doku hasarını azaltarak, inflamasyonu azalttığı morfolojik olarak gösterilmiştir. Hücrel nekroz, vakuolizasyon ve dejenerasyonun azalması, ayrıca yaygın enflamasyona immün yanıt geliştirmek üzere artan kupffer hücrelerinin sayıca gerilemesi, koşma egzersizinin diyabetik karaciğer dokusunu olumlu yönde etkilediği ve iyileşmeyi artırdığı sonucunu doğrulamaktadır.

Fiziksel aktiviteyi artırmayı ve enerji alımını azaltmayı hedefleyen yaşam tarzı değişiklikleri, sağlık hizmeti sağlayıcıları tarafından optimal sağlık için tavsiye edilebilir ve diyabet teşhisi konan bireyler için en yaygın reçete edilen tedavi olarak önerilebilir.

Teşekkür: Çalışmada deneysel kurgu ve bilgi paylaşımında emeğini esirgemeyen Doç. Dr. Nevzat Demirci ve Doç. Dr. Leyla Şahin'e teşekkür ederim.

Etik Kurul Kararı: Bu çalışma; Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) 12.04.2021 tarihli 06/18 numara ile onay alınmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma için herhangi bir finans desteği alınmamıştır.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Fang ZY, Sharman J, Prins JB, Marwick TH. Determinants of exercise capacity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28: 1643-8.
2. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012:941868. doi: 10.1155/2012/941868.
3. Ghosh, S. Golbidi, I. Werner, BC. Verchere, and I. Laher, "Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview," *Clinical Science*. 2010; 119: 57-74.
4. Richardson JK, Thies SB, DeMott TK, Ashton-Miller JA. Interventions improve gait regularity in patients with peripheral neuropathy while walking on an irregular surface under low light. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2004; 52: 510-15.
5. Coskun O, Ocakci A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med*. 2004; 203: 145-54.
6. Pedersen O, Bak JF, Andersen PH, et al. Evidence Against Altered Expression of GLUT1 or GLUT4 in Skeletal Muscle of Patients With Obesity or NIDDM. *Diabetes*. 1990; 39: 865-70.
7. Steppel JH, Horton ES, Diyabetes mellituslu hastalarda egzersiz. *Joslin's Diabetes Mellitus*, 14. baskı, Khan C.R., Weir G.C., King G.L., Jacobson A.M., Moses A.C., Smith R.C., eds. *Istanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul*, 2008, pp. 649-56.
8. O'Hagan C, De Vito G, Boreham CA. Exercise prescription in the treatment of type 2 diabetes mellitus: current practices, existing guidelines and future directions. *Sports Med*. 2013; 43: 39-49.
9. Liu C, Tao, Q, Sun M, et al. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Laboratory Investigation*. 2010; 90: 1805-16.
10. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol*. 2014; 61: 660-71.
11. Cowan TE, Brennan AM, Stotz PJ, et al. Separate Effects of Exercise Amount and Intensity on Adipose Tissue and Skeletal Muscle Mass in Adults with Abdominal Obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2018; 26: 1696-703.
12. Gerber L, Otgonsuren M, Mishra A, et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Is Associated with Low Level of Physical Activity: A Population-Based Study. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2012; 36: 772-81.
13. Pino-de la Fuente F, Quezada L, Sepúlveda C, et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019; Volume 1864, Issue 12.158519.
14. Liu Y, Tian F, Shan J, et al. Kupffer Cells: Important Participant of Hepatic Alveolar Echinococcosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 2020.00008.
15. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017; 97: 4-13.
16. Yang L, Yang L, Dong C, Li L. The class D scavenger receptor CD68 contributes to mouse chronic liver injury. *Immunol Res*. 2018; 66: 414-24.
17. Uğan R, Yayla M, Ün H, et al. Nar kabuğu ekstresinin sıçanlarda diyabetik şartlarda sepsis ile indüklenen akciğer hasarına karşı etkileri. *DicleTıp Dergisi*. 2020; 47: 678-86.

18. Postic C, Dentin R, Girad J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 2004; 30: 398-408.
19. Picardi A, D'Avola D, Gentilucci UV, et al. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006; 22: 274-83.
20. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; 409: 307-312.
21. Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol.* 2009;15: 280-88. doi:10.3748/wjg.15.280.
22. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16: 1095-105.
23. Jovanović Stojanov S, Martinović V, Bogojević D, et al. Modulation of diabetes-related liver injury by the HMGB1/TLR4 inflammatory pathway. *J Physiol Biochem.* 2018; 74: 345-58.
24. Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, et al. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology.* 1998; 28: 141-9.
25. Ross R, Soni S, Houle SA. Negative Energy Balance Induced by Exercise or Diet: Effects on Visceral Adipose Tissue and Liver Fat. *Nutrients.* 2020; 25; 12: 891.
26. Kistler KD, Brunt EM, Clark JM, et al. NASH CRN Research Group. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106: 460-69.
27. Linden MA, Sheldon RD, Meers GM, et al. Aerobic exercise training in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis. *J Physiol.* 2016 Sep 15; 594: 5271-84.
28. Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology.* 2011; 53: 2003-15.
29. Bahar M. Farklı egzersiz uygulamalarının tip1 diyabetik ratlarda oksidan-antioksidan ve lipid profili üzerine etkisi. Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tez. Mersin, 2020.
30. Gul M, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hanninen O. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports.* 2002; 12: 163-70.