



***Rheum ribes* Uygulamasının Diyabetik Ratların Karaciğer ve Böbreklerinde TLR2 ve TLR4'ün Immunohistokimyasal Lokalizasyonu Üzerine Etkisi\***

Ayhan AKGÜN<sup>1,a</sup>, Turgay DEPREM<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Iğdır Üniversitesi, Tuzluca Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Iğdır-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

ORCID: <sup>a</sup>0000-0001-6585-8655; <sup>b</sup>0000-0002-5523-8150

**Sorumlu yazar:** Ayhan AKGÜN; E-posta: ayhan.akgun@igdir.edu.tr

**Atıf yapmak için:** Akgün A, Deprem T. *Rheum ribes* uygulamasının diyabetik ratların karaciğer ve böbreklerinde TLR2 ve TLR4'ün immunohistokimyasal lokalizasyonu üzerine etkisi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2024; 21(3):148-154

**Öz:** Diyabetes mellitus (DM) çeşitli komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bu komplikasyonların en önemlileri hemostazdan sorumlu olan karaciğer ve böbrekte meydana gelen komplikasyonlardır. Işgın (*Rheum ribes*, *R. ribes*) çeşitli hastalıkların yanı sıra DM'de de tedavi amaçlı kullanılmaktadır. TLR aile üyeleri birçok durumda artmaktadır. Ancak diyabetik hastalarda TLR2 ve TLR4'teki ekspresyon artışı dikkat çekmektedir. Çalışmamızda *R. ribes* ekstraktının diyabetteki etkilerinin yanı sıra diyabetik olgularda belirgin olarak artan TLR2 ve TLR4'ün immunohistokimyasal lokalizasyonunu incelemeyi amaçladık. DM deneklerde Streptozotosin (STZ) 50 mg/kg intraperitoneal uygulanarak oluşturuldu. *R. ribes* ve diyabet + *R. ribes* gruplarına 21 gün boyunca oral gavaj ile 200 mg/kg *R. ribes* ekstraktı verildi. Yapılan incelemede karaciğer dokusunda TLR2 immünreaktivitesi hepatositlerde, V. sentralislerde, sinuzoid endotelilerinde; TLR4 immünreaktivitesi V. sentralis, hepatositler ve V. interlobularislerde görüldü. Böbrekte ise TLR2 ve TLR4 immünreaktivite glomerulus hücrelerinde, proksimal tubullerde, distal tubullerde ve medullada gözlemlendi. TLR2 sitoplazmik immünreaktif olduğu halde TLR4 hem sitoplazmik hem de nükleerdi. Hem TLR2 hem de TLR4 için immünreaktivite diyabet grubu karaciğer ve böbrek dokularında yoğun olarak gözlenirken, *R. ribes* ekstraktı uygulanan diyabet grubu karaciğer ve böbrek dokularında immünreaktivitenin önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak diyabetik ratların karaciğer ve böbrek dokularında *R. ribes* bitkisinin pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı çeşitli hastalıklarda da kullanılan *R. ribes* bitkisi DM hastalığı için ilaç endüstrisinde yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağına düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Böbrek, diyabetes mellitus, immunohistokimya, karaciğer, *Rheum ribes*, TLR2, TLR4

**Effect of *Rheum ribes* Application on Immunohistochemical Localizations of TLR2 and TLR4 in the Liver and Kidneys of Diabetic Rats**

**Abstract:** Diabetes mellitus (DM) causes various complications. The most important of these complications are those occurring in the liver and kidney, which are responsible for hemostasis. *Rheum ribes* (*R. ribes*) is used for treatment purposes in DM as well as various diseases. TLR family members are increased in many cases. However, the increased expression of TLR2 and TLR4 in diabetic patients is noteworthy. In our study, we aimed to examine the effects of *R. ribes* extract in diabetes as well as the immunohistochemical localization of TLR2 and TLR4, which are significantly increased in diabetic cases. Streptozotocin (STZ) was administered intraperitoneally 50 mg/kg in DM subjects. *R. ribes* and diabetes + *R. ribes* groups were given 200 mg/kg *R. ribes* extract by oral gavage for 21 days. In the examination, TLR2 immunoreactivity in liver tissue was found in hepatocytes, central veins, and sinusoid endothelium; TLR4 immunoreactivity was seen in V. centralis, hepatocytes and V. interlobularis. In the kidney, TLR2 and TLR4 immunoreactivity was observed in glomerulus cells, proximal tubules, distal tubules, and medulla. While TLR2 was cytoplasmic immunoreactive, TLR4 was both cytoplasmic and nuclear. Immunoreactivity for both TLR2 and TLR4 was observed intensely in the liver and kidney tissues of the diabetes group. But it was observed that immunoreactivity was significantly reduced in the liver and kidney tissues of the diabetic group administered *R. ribes* extract. As a result, it was determined that *R. ribes* plant has a positive effect on the liver and kidney tissues of diabetic rats. Therefore, we think that the *R. ribes* plant, which is also used in various diseases, will contribute to the development of new treatment methods in the pharmaceutical industry for DM disease.

**Keywords:** Diabetes mellitus, immunohistochemistry, kidney, liver, *Rheum ribes*, TLR2, TLR4

Geliş Tarihi/Submission Date : 21.03.2024

Kabul Tarihi/Accepted Date : 12.06.2024

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 2021-TS-32) tarafından desteklenmiş olup doktora tezinden türetilmiştir.

**Giriş**

Diyabetes mellitus (DM), otoimmün bir hastalıktır. DM, vücutta birçok komplikasyona neden olur. Bu komplikasyonlar, vücudun insülin üretememesi veya kullanamamasına bağlı olarak kan şekeri seviyesinin

istem dışı yükselmesiyle oluşmaktadır (Pickup ve Williams, 1991).

Metabolizma ve vücut hemostazının düzenlenmesinden sorumlu olan karaciğer ve böbrek DM'ta önemli rol oynamaktadır (Green ve ark., 2005). Karaciğer, glikoz metabolizmasında önemli bir göreve sahiptir. Bu rol insülin ve glukagon tarafından enerji metabolizmasının düzenlenmesiyle oluşmaktadır. İnsülin karaciğerde glikojen sentezini artırır ve glikoz üretimini engeller. Aksine, glukagon glikoz üretimini indükler ve glikojen sentezini engeller (Kim ve ark., 2011; Kürüm ve ark., 2015). Ayrıca DM, böbrekte de önemli komplikasyonlar oluşturmaktadır. Bu komplikasyonlar böbreklerdeki vasküler dejenerasyonlardan kaynaklanmaktadır. Meydana gelen vasküler dejenerasyonlar vücut hemostazının düzenlenmesinde büyük engel oluşturmaktadır (Kurt ve ark., 2004).

Toll benzeri reseptörler (TLR), deri ve bağırsak mukozası gibi vücut bölümlerinde doğuştan bulunan ve organizmaya giren patojenik yapıları tanıyabilen bir reseptör ailesidir. TLR, patojenik mikroorganizmaları tanıır ve onlara karşı bir immun yanıt oluşturabilir (Müştak ve Esendal, 2007). DM ile artan glikoz seviyesi, enzimatik olmayan glikozilasyonuna neden olur. Glikozilasyon sonucu değiştirilmiş proteinler, bağışıklık sistemi tarafından antijen olarak kabul edilir (Aboonabi ve ark., 2014). Doğal savunma reseptörleri olarak bilinen TLR2 ve TLR4, diyabetik hastalarda oluşan proteinlere karşı sentezlenen önemli TLR olarak bilinirler (Devavaraj ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011; Sevimli ve Özçelik, 2016).

Işkın olarak bilinen *R. ribes*, Polygonaceae familyasına ait tıbbi bitkilerden biridir. Başta Batı Asya olmak üzere dünyanın ılıman ve subtropikal bölgelerinde (Türkiye, Suriye, Lübnan, Irak, İran, Azerbaycan, Ermenistan, Afganistan, Pakistan) yetişmektedir. Hem gıda maddesi hem de çeşitli hastalıklarda kullanılmaktadır (Akkuş ve Şıktar, 2018). Ayrıca hipoglisemik etkiye sahip olması ve içeriğinde bir çok antioksidanları barındırmasıyla diyabet tedavisine önem kazanmıştır (Konak ve Aktar, 2009; Rafaat ve ark., 2014; Meral, 2017).

Bu çalışmanın amacı, diyabetik ve diyabetik olmayan ratlara *R. ribes* bitki ekstraktı uygulandığında karaciğer ve böbrek dokularında meydana gelen değişiklikleri histopatolojik olarak ortaya koymak ve doğal immün reseptörler olarak bilinen TLR2 ve TLR4'ün bu dokulardaki lokalizasyonlarını ve ekspresyon durumlarını belirlemektir.

## Gereç ve Yöntem

### Deney prosedürü

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (KAÜ-HADYEK/2020-128) alınan onay doğrultusunda yapılmıştır. Ratlar, Kafkas

Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde; 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ritminde ışıklandırılan, 22±2°C'ye ayarlı oda ısısında, standart pelet yem ile beslendi. Ayrıca ratlar, yem ve su alımı serbest olacak şekilde standart plastik kafelerde barındırıldı. Çalışmamızda deney hayvanı olarak 40 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. Deney hayvanları Kontrol (n=8), Sham (n=8), *R. ribes* (n=8), *R. Ribes* + Diyabet (n=8) ve Diyabet (n=8) olmak üzere beş gruba ayrıldı. Streptozotosin (STZ) (Sigma S0130-100 MG) 0.1 M sitrat tamponunda pH 4.5'da eritilerek 50 mg/kg dozunda diyabetik gruplara intraperitoneal olarak uygulandı. STZ uygulanan gruplarda 72 saat sonra ratlar sekiz saat aç bırakıldı ve kan şekeri glukometre ile ölçüldü. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi (Kanitkar ve Bhone, 2004). *R. ribes* ve diyabet + *R.ribes* gruplarına 21 gün boyunca 200 mg/kg/gün *R. ribes* ekstraktı distile su içinde eritilerek (Asgharian ve ark., 2018), Sham grubuna ise sadece aynı miktarda distile su oral gavaj yoluyla verildi. Kontrol grubuna sadece ad libitum beslenme yapıldı.

**Ekstraktın hazırlanması:** Ekstrakt için Van'dan ticari olarak *R. ribes* bitkisi temin edildi. Bitki 10 gün boyunca kurutuldu ve ardından mikserlendi. Toz haline getirilmiş *R. ribes* bitkisi, üç gün süreyle cam bir kapta metil alkol içinde işleme tabi tutuldu. Tortu, karışımdan filtre kağıdı ile ayrıldı. Metil alkolü ekstrakt karışımından uzaklaştırmak için bir evaporatör cihazı kullanıldı. Elde edilen ekstrakt deney başlangıcına kadar oda sıcaklığında saklandı (Gholamhoseinian ve ark., 2009).

### Histolojik analiz

Deney sonunda ratların karaciğer ve böbreklerinden doku örnekleri alındı. Dokular %10'luk formaldehit solüsyonunda en az 48 saat tespit edildi. Daha sonra dokular doku takibi işlemlerinden geçirilerek doku blokları hazırlandı. Kesit için hazır hale gelen karaciğer ve böbrek dokuları mikrotomda 5 µm kalınlığında kesildi. Doku kesitleri histolojik inceleme için triple yöntemi (Crossmann'ın üçlü boyaması) ile boyandı.

### İmmunohistokimyasal analiz

İmmunohistokimyasal yöntem için avidin-biotin-peroksidaz kompleksi (ABC) tekniği uygulandı (Hsu ve ark., 1981). TLR2 ve TLR4 immünreaktivitesini incelemek amacıyla endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. Antijenleri serbest bırakmak için sitrat tamponunda (pH 6.0) mikrodalga uygulaması yapıldı. Dokular, anti-TLR2 antikoruna (ab213676, Poliklonal) (karaciğer dokuları için 1/200, böbrek dokuları için 1/50) ve anti-TLR4 antikoru (sc293072, Monoklonal) (karaciğer dokuları için 1/100, böbrek dokuları için 1/100) ile inkübasyona oda sıcaklığında bir saat bırakıldı. Ardından PBS ile yıkama sonrası kesitlere sekonder antikor

(Biontynlated Goat Anti-Rabbit, Lab Vision 510.991.2800) ilave edilerek 30 dk oda ısısında bekletildi. Kesitlere kromojen uygulaması için DAB (Thermo Scientific) kullanıldı. Son olarak hematoksiyen ile karşı boyama yapıldı. İmmünreaktivite reaksiyon yoğunluğuna göre yarı kantitatif olarak değerlendirildi (Reaksiyon yok: -, Zayıf: +, Orta: ++, Güçlü: +++) (Okihiro ve Hinton, 2000). TLR2 ve TLR4 immünoaktivitelerinin spesifik olup olmadığını belirlemek için negatif kontrol uygulaması da yapıldı.

### Bulgular

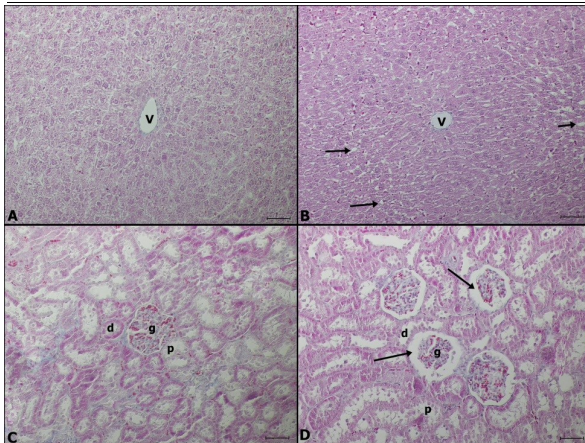
Çalışmamızda kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun normal histolojik yapıya sahip olduğu görüldü (Şekil 1-A). Sham ve *R. ribes* grupları incelendiğinde kontrol grubu ile histolojik olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet grubunun karaciğer dokusunda karaciğer

loblarının bazı bölgelerinde yaygın olmayan fakat belirgin lipidoz izlendi (Şekil 1-B). Diyabet + *R. ribes* grubunun bulguları, diyabet grubunun bulgularına benzerdi. Kontrol grubu böbrek dokularında ise histolojik görünüm normaldi (Şekil 1-C). Sham ve *R. ribes* grupları için histolojik bulgular kontrol grubundan farklı değildi. Diyabet grubunun böbrek dokularında nefron yapısını oluşturan Bowman aralığında genişlemeler ve glomerüllerde atrofi mevcuttu (Şekil 1-D). Diyabet + *R. ribes* grubu böbrek dokularındaki histolojik bulgular, Diyabet grubu dokularının bulguları ile benzerlik göstermekteydi.

Kontrol, Sham, *R. ribes*, diyabet ve Diyabet + *R. ribes* gruplarına ait karaciğer ve böbrek dokuları TLR2 immünohistokimyasal bulguları açısından incelendi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Gruplara göre TLR2 immünoreaktivite skor tablosu

KARACİĞER	Kontrol Grubu	Sham Grubu	<i>R. ribes</i> Grubu	Diyabet Grubu	Diyabet + <i>R. ribes</i> Grubu
V. sentralis	+	+	+	+++	++
Hepatositler	-	-	-	+++	++
Sinuzoid endotelleri	+	+	+	+++	++
V. inter lobularis	+	+	+	++	+
A. hepatika	-	-	-	++	+
Duktus biliferus	+	+	+	++	+
<b>BÖBREK</b>					
Glomerulus hücreleri	++	++	++	+++	++
Bowman kapsülü	++	++	++	+++	++
Proksimal tubul	+	+	+	+++	++
Distal tubul	+	+	+	+++	++
İnen henle	++	++	++	+++	++
Çıkan henle	++	++	++	+++	++
Tubulus kolektivus	++	++	++	+++	++



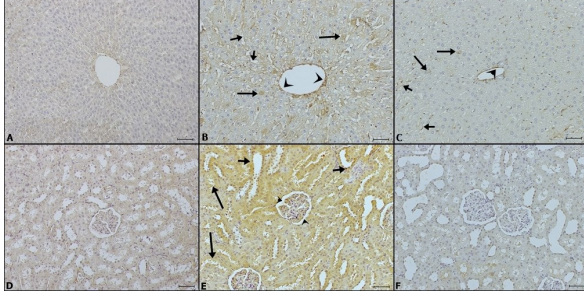
**Şekil 1.** Kontrol grubu karaciğer dokusu (A). Diyabet grubu karaciğer dokusu (B), Kontrol grubu böbrek dokusu (C), Diyabet grubu böbrek dokusu (D). V. sentralis (V), lipidoz (kısa oklar), glomerulus (g), proksimal tubuller (p), distal tubuller (d), Bowman aralığı (uzun oklar). A,B,C,D Triple Boyama, Bar: 50 µm.

TLR2'nin karaciğerdeki lokalizasyonu V. sentralisler, hepatositler, sinuzoid endotelleri, V. interlobularis, A. hepatikalar ve duktus biliferuslarda gözlemlendi. Karaciğer dokularında TLR2 immünoaktivitesinin sitoplazmik olduğu gözlemlendi. Kontrol, Sham ve *R. ribes* grubu karaciğer dokularında TLR2 immünoaktivitesi düşüktü (Şekil 2-A). Diyabetik karaciğer dokularında kontrol grubuna kıyasla yüksek immünoaktivite tespit edildi (Şekil 2-B). Diyabet + *R. ribes* grubunda ise diyabetik karaciğer dokularına göre TLR2 ekspresyonu düşüktü (Şekil 2-C).

TLR2'nin böbrekteki lokalizasyonu glomerulus hücreleri, bowman kapsülleri, proksimal tubuller, distal tubuller, inen henle, çıkan henle ve tubulus kolektivuslarda gözlemlendi. Böbrek dokularında sitoplazmik TLR2 immünoaktivitesine rastlandı.

Kontrol, Sham ve *R. ribes* grubu böbrek dokularında TLR2 immünoaktivitesi düşüktü (Şekil 2-D). Diyabetik böbrek dokularında kontrol grubuna kıyasla yüksek immünoaktivite gözlemlendi (Şekil 2-E). Diyabet +

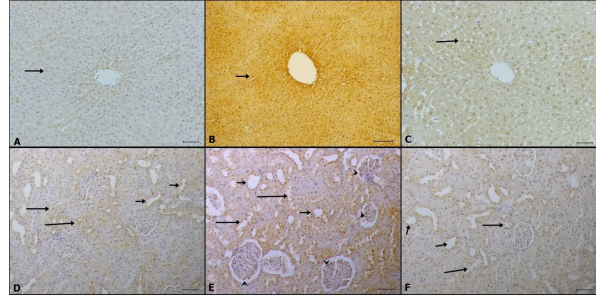
*R. ribes* grubunda ise diyabetik böbrek dokularına göre ekspresyon düşüktü (Şekil 2-F).



**Şekil 2.** Kontrol grubunun karaciğer dokusunun TLR2 immünoaktivitesi (A), Diyabet grubu karaciğer dokusunun TLR2 immünoaktivitesi (B), *R. ribes* + Diyabet grubu karaciğer dokusunun TLR2 immünoaktivitesi (C), Kontrol grubunun böbrek dokusu korteks bölgesinin TLR2 immünoaktivitesi (D), Diyabet grubunun böbrek dokusu korteks bölgesinin TLR2 immünoaktivitesi (E), *R. ribes* + Diyabet grubunun böbrek dokusu korteks bölgesinin TLR2 immünoaktivitesi (F). V. sentralis endoteli (ok başları), sinüzoid endoteli (kısa oklar), hepatositler (uzun oklar), proksimal tubul (uzun oklar), distal tubul (kısa oklar), glomerüler ağ (ok başları). A-F Bar: 50 µm.

Kontrol, Sham, *R. ribes*, diyabet + *R. ribes* ve diyabet gruplarına ait karaciğer ve böbrek dokularında TLR4 immünohistokimyasal bulguları incelendi (Tablo 2).

Kontrol, Sham ve *R. ribes* grubu karaciğer dokularında TLR4 immünoaktivitesi düşüktü (Şekil 3-A). Diyabetik karaciğer dokularında Kontrol grubuna kıyasla yüksek immünoaktivite gözlemlendi (Şekil 3-B). Diyabet + *R. ribes* grubunda ise diyabetik karaciğer dokularına göre ekspresyon düşüktü (Şekil 3-C).



**Şekil 3.** Kontrol grubu karaciğer dokusunun TLR4 immünoaktivitesi (A), Diyabet grubu karaciğer dokusunun TLR4 immünoaktivitesi (B), *R. ribes* + Diyabet grubu karaciğer dokusunun TLR4 immünoaktivitesi (C), Kontrol grubu böbrek dokusunun TLR4 immünoaktivitesi (D), Diyabetik böbrek dokusunun TLR4 immünoaktivitesi (E), *R. ribes* + Diyabet grubu böbrek dokusunun TLR4 immünoaktivitesi (F). Hepatositler (ok), proksimal tubul (uzun oklar), distal tubul (kısa oklar), glomerüler ağ (ok başları). (A-F Bar: 50µm).

**Tablo 2.** Gruplara göre TLR4 immünoaktivite skor tablosu

KARACİĞER	Kontrol Grubu	Sham Grubu	<i>R. ribes</i> Grubu	Diyabet Grubu	Diyabet + <i>R.ribes</i> Grubu
V. sentralis	+	+	+	+++	++
Hepatositler	+	+	+	+++	++
Sinüzoid endotelleri	-	-	-	-	-
V. inter lobularis	+	+	+	+++	++
A. hepatica	-	-	-	+++	++
Duktus biliferus	+	+	+	+++	++
<b>BÖBREK</b>					
Glomerulus hücreleri	+	+	+	+++	++
Bowman kapsülü	+	+	+	++	+
Proksimal tubul	++	++	++	+++	++
Distal tubul	++	++	++	+++	++
İnen henle	++	++	++	+++	++
Çıkan henle	++	++	++	+++	++
Tubulus kolektivus	++	++	++	+++	++

TLR4'ün karaciğerdeki lokalizasyonu V. sentralisler, hepatositler, V. inter lobularisler, A. hepatikalar ve duktus biliferuslarda gözlemlendi. Karaciğer dokularında TLR4 immünoaktivite hem sitoplazmik hem de nükleerdi.

TLR4'ün böbrekteki lokalizasyonu glomerulus hücreleri, bowman kapsülleri, proksimal tubuller, distal tubuller, inen henle, çıkan henle ve tubulus kolektivuslarda gözlemlendi. Böbrek dokuları için TLR4 immünoaktivite hem sitoplazmik hemde nükleerdi.

Kontrol, Sham ve *R. ribes* grubu böbrek dokularında TLR4 immünreaktivitesi düşüktü (Şekil 3-D). Diyabetik böbrek dokularında Kontrol grubuna kıyasla yüksek immünreaktivite gözlemlendi (Şekil 3-E). Diyabet + *R. ribes* grubunda ise diyabetik böbrek dokularına göre ekspresyon düşüktü (Şekil 3-F).

### Tartışma ve Sonuç

DM'de hiperglisemi lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasının düzensiz çalışmasına neden olur. DM'tan kaynaklı kandaki sürekli yüksek seyreden glikoz seviyesi, enzimatik olmayan glikozilasyona sebep olmasıyla glikozun yabancı proteinlere dönüşümüne sebep olur. Değiştirilmiş proteinler, bağışıklık sistemi tarafından yabancı yapılar olarak algılanır (Aboonabi ve ark., 2014). Doğal savunma reseptörleri içinde yer alan TLR2 ve TLR4 bu yabancı proteinler ile etkileşime girerek ekspresyona uğrarlar (Devaraj ve ark., 2008; Kim ve ark., 2011; Sevimli ve Özçelik, 2016)

TLR2 ile DM arasında ilişkiyi ortaya koyan birçok çalışma (Dasu ve ark., 2010; Ehses ve ark., 2010; Karaali ve ark., 2019) olmasına rağmen, yapılan literatür taramalarında TLR2'nin karaciğerde immünlokalizasyonunu araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Karaali ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada DM hastalarında TLR2 ekspresyonunun kontrol bireylere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Dasu ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada diyabetik bireylerde TLR2'nin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda karaciğer dokularının TLR2 ekspresyonuna bakıldığında diyabet gruplarının kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek immünreaktif olduğu gözlemlendi. Bu bulguya dayalı olarak, çalışmamızda diyabetik olgularda TLR2'nin ekspresyonunda artış gözlemlenmesiyle adı geçen çalışmalarla (Dasu ve ark., 2010; Karaali ve ark., 2019) bizim araştırmamız arasında paralellik olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmada V. sentralis endotel, sinüzoidal endotel hücreleri, hepatositler, V. interlobularis ve A. hepatika epitellerinde TLR2 immünreaktivite gözlemlendi. Ayrıca ekstrakt uygulanan diyabetik ratların karaciğerlerinde TLR2 immünreaktivitesinde azalma vardı.

Sawa ve ark. (2014) TLR2'nin diyabetik nefropati için önemli olduğunu öne sürmüşlerdir. TLR2'nin glomerüler endotel ve proksimal tubul epitelleri üzerinde lokalize olduğunu bildirdiler. Ayrıca diyabetik farelerde TLR2 ekspresyonunun diyabetik olmayan farelere göre daha yüksek olduğunu gözlemladiler. Devaraj ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada TLR2 lokalizasyonunun glomerulusta olduğunu saptamışlardır. Ayrıca diyabetik farelerin böbreklerinde TLR2 ekspresyonunun, kontrol grubundaki TLR2 reaktivitesine kıyasla daha yüksek olduğunu bildirdiler. Mudaliar ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada TLR2 ekspresyonunun hem kontrol hem de diyabetik böbrek dokularında görüldüğünü bildirmişlerdir. Ancak diyabetik farelerin

böbrek dokularında TLR2 ekspresyonunun, özellikle hasarlı tubullerde daha yoğun immünreaktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda diyabetik böbrek dokusunda glomerulus, Bowman kapsülü, proksimal tubuller, distal tubuller, inen ve çıkan henle ve tubulus kollektivusu oluşturan bazı hücrelerde daha yoğun immünreaktivite gözlemlendi. Ayrıca diyabet + *R. ribes* grubunda TLR2 ekspresyonunun diyabetik dokulara göre azaldığını gözlemledik.

Han ve ark. (2016) selastrolün diyabetik ratlarda karaciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini ve olası mekanizmalarını araştırmayı amaçlamışlardır. Kontrol grubunda birkaç hepatositte TLR4 reseptör ekspresyonu reaktif iken, diyabetik karaciğer dokularında hepatositlerde ve Kupffer yıldız hücrelerinde daha yüksek TLR4 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Tedavi grubunda bu immünreaktivitenin azaldığını belirtmişlerdir. Buna göre selastrolün diyabetik sıçanların hepatik dokularında organ hasarına karşı koruyucu bir etki sağladığını bildirmişlerdir. Zhao ve ark. (2021), karvakrolün diyabetik farelerde karaciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkisini araştırmayı ve potansiyel moleküler mekanizmasını değerlendirmeyi amaçladıklarını bildirmişlerdir. İmmünohistokimyasal olarak, diyabetik farelerin karaciğer dokularında TLR4 ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu ve bu proteinin ekspresyon seviyelerinin karvakrol ile tedavi edilen grupta önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda diyabetli farelerde karvakrolün hepatik organ hasarına karşı koruyucu etki sağladığını gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışmada diyabetik ratlara oral gavaj ile *R. ribes* ekstraktı vererek TLR4 immünolokasyon ve ekspresyon durumunu değerlendirmeyi amaçladık. İncelemelerimize göre diyabet grubundan hepatositler, V. sentralis, V. interlobularis endotel, duktus biliiferus epiteli ve A. hepatikada TLR4 ekspresyonu daha yüksek bulundu. Ekstrakt uygulanan diyabetik ratların karaciğerlerinde immünreaktivitede azalma gözlemledik.

Yuan ve ark. (2018) çalışmasında diyabetik grubun böbrek dokularında TLR4 ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirmektedirler. TLR4 immünreaktivite böbrek tubullerinde olduğunu gözlemladiler. Lin ve ark. (2012) çalışmalarında diyabetik böbreklerde ağırlıklı olarak proksimal tubuller, distal tubuller ve peritubuler kapillerlerde TLR4 için önemli immünreaktivite gözlemlendiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte, diyabetik nefropati olmayan kişilerde çok az reaksiyon gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada diyabetik böbrek dokularında glomerulus, proksimal tubuller, distal tubuller, inen ve çıkan henle, tubulus kollektivus epitelinin bazı hücrelerinde ve Bowman kapsülünde immünreaktivite tespit edildi. Ekstrakt ile tedavi edilen diyabetik ratların böbreklerinde TLR4 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Çalışmamız bahsedilen çalışmalarla diyabetik olgularda TLR4 ekspresyonunun

artışı hakkında paralellik göstermektedir (Lin ve ark., 2012; Yuan ve ark., 2018).

Sonuç olarak, DM'un birçok komplikasyona neden olduğu bilinmektedir. Komplikasyonlar sonucunda dokularda hücrel değişiklikler meydana gelir. Yapılan incelemeler ışığında hücrel değişikliklerin ortaya konması DM'nin mekanizmasının anlaşılmasını sağlayacaktır. Buna göre, çalışmamızda *R. ribes* bitkisinin ekstraktını kullanarak diyabetteki etkisini inceledik. Deneysel olarak oluşturulan DM'lu ratların karaciğer ve böbrek dokuları incelendi. Dokularda TLR2 ve TLR4 ekspresyon farkı belirlenerek çalışmanın önemi ortaya konuldu. DM'ta TLR2 ve TLR4'ün yüksek ekspresyon düzeylerine ulaştığı tespit edilirken, *R. ribes* ekstraktı kullanılan diyabetli deneklerde bu ekspresyonların önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Deneysel olarak oluşturduğumuz diyabetik dokularda doğal bağışıklıkta görevli alan TLR2 ve TLR4'ün ekspresyonları, DM'nin mekanizmasının ve komplikasyonlarının daha iyi anlaşılmasında önemli bir role sahip olabileceği düşüncesini oluşturmuştur.

**Teşekkür:** 2021-TS-32 no'lu proje ile çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi'ne teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

- Aboonabi A, Rahmat A, Orthman F. Effect of pomegranate on histopathology of liver and kidney on generated oxidative stress diabetic induced rats. *J Cytol Histol* 2014; 6(1): 1-5.
- Akkuş Y, Şıktar E. *Rheum ribes* (ışkın otu)'in metanol ekstresinin düzenli aerobik yüzme egzersizi uygulanan rat dokularında antioksidan ve histopatolojik etkileri, Doktora tezi, Atatürk Üniver Kış Sporları ve Spor Bil Enst, Erzurum 2018.
- Asgharian S, Hoseinkhan, H, Bijad E, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei, M. Protective effect of hydroalcoholic *Rheum ribes L.* extract in male rat model of lead acetate-induced nephrotoxicity. *J Nephropathol* 2018; 7(2): 83-7.
- Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2010; 33(4): 861-8.
- Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(2): 578-83.
- Devaraj S, Tobias P, Kasinath BS, Ramsamooj R, Afify A, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(8): 1796-804.
- Ehses JA, Meier DT, Wueest S, Rytka J, Boller S, Wielinga PY, Donath MY. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 2010; 53(8):1795-806.
- Gholamhoseinian A, Moradi MN, Sharifi-far F. Screening the methanol extracts of some Iranian plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Res Pharm Sci* 2009; 4(2): 105-12.
- Green TJ, Venn BJ, Skeaff CM, Williams SM. Serum vitamin B-12 concentrations and atrophic gastritis in older New Zealanders. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(2): 205-10.
- Han LP, Li CJ, Sun B, Xie Y, Guan Y, Ma, ZJ, Chen LM. Protective effects of celastrol on diabetic liver injury via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in type 2 diabetic rats. *J Diabetes Res* 2016; 2641248.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(4): 577-80.
- Kanitkar M, Bhonde R. Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *Rev Diabet Stud* 2004; 1(4): 185-92.
- Karaali ZE, Candan G, Aktuğlu MB, Velet M, Ergen A. Toll-like receptor 2 (TLR-2) gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus. *Cell J* 2019; 20(4): 559-63.
- Kim DH, Lee JC, Kim S, Oh SH, Lee MK, Kim KW, Lee MS. Inhibition of autoimmune diabetes by TLR2 tolerance. *J Immunol* 2011; 187(10): 5211-20.
- Konak A, Aktar O. Medikal antropoloji çerçevesinde Tunceli/Ovacık'ta geleneksel sağaltma yöntemleri. *CÜ Sosyal Bilimler Dergisi* 2009; 35(2): 156-87.
- Kurt M, Atmaca A, Gürlek A. Diyabetik nefropati. *Haçettepe Med J* 2004; 35: 12-7.
- Kürüm A, Kocamış H, Deprem T, ÇINAR M. Determining gene expression profile of GPX 1 in the liver of diabetic rats treated with capsaicin by real-time PCR. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2015; 21(2): 259-63.
- Lin M, Yiu WH, Wu HJ, Chan LY, Leung JC, Au WS, Tang SC. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J Am Soc*

Nephrol 2012; 23(1):86-102.

Meral N. Farklı sıcaklık derecelerinin uşkun bitkisinin antioksidan aktivitesi ve fenolik profili üzerine etkisi. YYÜ Tar Bil Derg 2017; 27(1): 88-94.

Mudaliar H, Pollock C, Komala MG, Chadban S, Wu H, Panchapakesan U. The role of toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. Am J Physiol Renal Physiol 2013; 305(2): 143-54.

Müştak HK, Esendal ÖM. Toll benzeri reseptörler. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2007; 18: 33-8.

Okihiro MS, Hinton DE. Partial hepatectomy and bile duct ligation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Histologic, immunohistochemical and enzyme histochemical characterization of hepatic regeneration and biliary hyperplasia. Toxicol Pathol 2000; 28 (2): 342-56.

Pickup JC, Williams G. Textbook of Diabetes. Second edition. Wiley-Blackwell 1997; pp. 151-5.

Rafaat K, Aboul-Ela M, El-Lakany A. Alloxan-induced diabetic thermal hyperalgesia, prophylaxis and phytotherapeutic effects of *Rheum ribes L.* in mouse model. Arch Pharm Res 2014; 44(8): 1-10.

Sawa Y, Takata S, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Tsuruga E. Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. PloS one 2014; 9(5): e97165.

Sevimli T, Özçelik N. Stz (streptozotosin) ile diyabet oluşturulmuş ratların böbrek dokusunda silibinin'in HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 alpha) ve TLR-2 (toll like receptor 2) genlerinin mRNA düzeylerine etkisi, Doktora Tezi, SDÜ Sağlık Bil Enst, Isparta 2016.

Yuan S, Liu X, Zhu X, Qu Z, Gong Z, Li J, Liu F. The role of TLR4 on PGC-1 $\alpha$ -mediated oxidative stress in tubular cell in diabetic kidney disease. Oxid Med Cell Longev 2018; 2018: 6296802.

Zhao W, Chen L, Zhou H, Deng C, Han Q, Chen Y, Li S. Protective effect of carvacrol on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. Mol Med Rep 2021; 24 (5): 741.

