



Farklı Dozlarda Uygulanan Streptozotocinin Sıçan Karaciğerine Etkilerinin Stereolojik Metotlarla İncelenmesi

Saadet YILDIZ^{1,*}  Murat Çetin RAĞBETLİ²  Yasin TÜLÜCE³ 

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun ODABAŞI Tıp Merkezi, 65080, Van, Türkiye

²Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Anabilim Dalı, 70200, Karaman, Türkiye

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 65090, Van, Türkiye

Geliş Tarihi: 18.09.2023

Kabul Tarihi: 04.12.2023

ÖZ

Diabetes Mellitus, vücudun insülin üretememesinden veya insülin etkisine karşı dirençten veya her ikisinden kaynaklanan yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize edilen bir grup kronik metabolik rahatsızlıktır. İnsülin, vücut dokuları ve organları tarafından glikoz üretimini ve kullanımını düzenleyen ana hormondur. Diyabet, karaciğer de dahil olmak üzere vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Streptozotocin, pankreas β-hücre yıkımı gerçekleştiren bir antibiyotiktir ve deneysel diyabet oluşturmak için yaygın olarak kullanılır. Bu çalışmada, sıçan karaciğerinde streptozotocin kaynaklı diyabetin neden olduğu morfometrik değişikliklerin hacim ve hücre sayılarının stereolojik yöntemler kullanılarak hesaplanması amaçlandı. Çalışmada erişkin 20 adet erkek sıçan kullanıldı. Rastgele dört grup oluşturuldu. Tüm grupların kan glikoz değerleri ölçüldü. Streptozotocinin farklı dozları (55 mg/kg ve 65 mg/kg) verilerek diyabet indüklendi. 48 saat sonra tekrar kan glikoz değerleri ölçüldü. Dört hafta sonra kontrol ve denek gruplarına ait tüm sıçanların anestezi altında karaciğer dokuları çıkarılarak %10'luk formaldehitte tespit edildi. Tespit edilen karaciğer dokuları fiziksel fraksiyonlama ile eşit parçalara ayrıldı. Dehidratasyon aşamalarından geçerek parafinde sabitlendi. Histolojik kesitler hazırlandı. Hematoksilin-Eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı. Cavalieri prensibi ile karaciğerin total hacmi, disektör yönteminin tarafsız sayım çerçevesi ile hepatosit sayıları hesaplandı. Diyabete bağlı gruplarda, kontrol grubuna göre karaciğer hacminde ve hücre sayısındaki artış anlamlıydı ($p < 0.05$). Sonuç olarak, streptozotocin enjeksiyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan diyabet, karaciğer hacminde ve hepatosit sayılarında artışa yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Karaciğer, Sıçan, Streptozotocin.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Streptozotocin Applied in Different Doses on Rat Liver with Stereological Methods

Diabetes mellitus is a group of chronic metabolic conditions, all of which are characterized by elevated blood glucose levels resulting from the body's inability to produce insulin or resistance to insulin action, or both. Insulin is the main hormone that regulates glucose production and use by body tissues and organs. Diabetes affects all systems in the body, including the liver. Streptozotocin is an antibiotic that performs pancreatic β-cell destruction and is widely used to induce experimental diabetes. In this study; It was aimed to calculate the volume and cell numbers of the morphometric changes caused by streptozotocin-induced diabetes in the rat liver using stereological methods. Twenty adult male rats were used in the study. Four groups were created randomly. Blood glucose values of all groups were measured. Diabetes was induced by administering different doses of streptozotocin (55 mg/kg and 65 mg/kg). After 48 hours, blood glucose values were measured again. Four weeks later, liver tissues of all rats from the control and experimental groups were taken under anesthesia and fixed in 10% formaldehyde. The fixed liver tissues were divided into equal parts by physical fractionation. It was fixed in paraffin after passing through dehydration stages. Histological sections were prepared. It was stained with Hematoxylin-Eosin, examined under a light microscope and photographed. The total volume of the liver was calculated using the Cavalieri Principle and the number of hepatocytes was calculated with the unbiased counting frame of the disector method. In the diabetes-related groups, the increase in liver volume and cell number was significant compared to the control group ($p < 0.05$). As a result, streptozotocin injection and the resulting diabetes lead to an increase in liver volume and hepatocyte numbers.

Keywords: Diabetes, Liver, Rat, Streptozotocin.



GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), dünya çapında görülen bulaşıcı olmayan bir hastalıktır. DM, tip 1 (DM1) veya tip 2 (DM2) olarak sınıflandırılır. DM1, pankreasın insülin hormonunu üretmeyi bırakması veya β hücrelerinin yok edilmesi nedeniyle ortaya çıkar. DM2 en yaygın tiptir ve diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını temsil eder. İleri yaşta insanlarda ortaya çıkan bu türü, insülin direnci ve insülin salgılanmasındaki eksiklikten dolayı kan şekerinin yükselmesi ile kendini gösteren bir hastalıktır (Maitra ve Abbas 2005; Piya ve ark. 2010; Magalhaes ve ark. 2019). Bu metabolik hastalık, karaciğer de dahil olmak üzere vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Esas olarak insülin direncinin neden olduğu hiperglisemi; lipidlerin, karbonhidratların ve proteinlerin metabolizmasını etkiler ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığına yol açabilir, bu da alkole bağlı olmayan steatohepatit, siroz ve son olarak hepatosellüler karsinomlara ilerleyebilir (Al-Ani ve ark. 2009; Mohamed ve ark. 2016). Karaciğerin yağ metabolizmasını gerçekleştirmesi için uygun bir konsantrasyonda insülin gereklidir. Düşük üretim veya yetersiz eksojen insülin uygulaması yoluyla kandaki insülin konsantrasyonundaki herhangi bir değişiklik, karaciğerde yağ birikmesine neden olur (Lucchesi ve ark. 2015). Epidemiyolojik araştırmalar, dünya çapında 2019 yılında yaklaşık 463 milyon kişinin DM'den muzdarip olduğunu ve bu sayının 2030 yılına kadar 578 milyona çıkacağını göstermiştir (Saeedi ve ark. 2019).

Streptozotosin (STZ) deneysel diyabet oluşturan kimyasaldır. Pankreas β hücrelerinin yok edilmesine yol açar ve yetersiz insülin üretiminin doğrudan bir sonucu olarak hiperglisemiye neden olur (Correia-Santos ve ark. 2012; Kohl ve ark. 2013). 1963'ten beri STZ'in intraperitoneal (ip) veya intravenöz (iv) enjeksiyonun yapıldığı DM1 hayvan modeli yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang-Fischer ve Garyantes 2018). STZ tek doz ip olarak 100 mg/kg uygulamasıyla, insülin bağımsız diyabet ve 40-60 mg/kg iv olarak uygulamasıyla insüline bağımlı diyabet oluşturur (Szkudelski 2001).

Stereoloji metodu, hacim, yüzey alanı ve uzunluk ile doku, hücre veya organel sayısı hakkında tarafsız nicel morfolojik veriler elde etmek için kullanılır. Bunun için de biyolojik nesnelere mikroskopta nicel bir hesaplama ile matematiksel olarak türetilmiş modelleri kullanır. Bu metod çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılır ve sistematik, önyargısız doku örneklemesine izin verir (Ünal ve ark. 2002).

Bu çalışmada; STZ ile oluşturulan diyabetin sıçan karaciğerinde oluşturduğu morfometrik değişikliklerin stereolojik yöntemler kullanılarak hacim ve hücre sayılarının hesaplanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 25.03.2010 tarihinde 2010/03 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Deney Hayvanları

Çalışma için kullanılan hayvanlar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Ağırlıkları 200 ila 300 g arasında değişen sekiz-on iki haftalık erkek sıçanlardan 20 adet kullanıldı. Kafeslerde, ortalama 22 °C sıcaklıkta, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü ile barındırıldılar. Serbest olarak filtrelenmiş musluk suyu ve sıçan yemi ile beslendiler.

Deneyin Uygulanması

Hayvanlar randomize olarak her biri beş sıçandan oluşan dört gruba ayrıldı. Deneyden önce tüm grupların açlık kan glikoz değerleri alınarak kaydedildi. Denek gruplarına sodyum sitrat tamponu (pH:4.5) içinde çözündürülmüş STZ (Sigma- Aldrich, USA) dozları (55 mg/kg, 65 mg/kg) hazırlandı.

Kontrol: Herhangi bir işlem uygulanmadı.

Sham: 0.5 ml serum fizyolojik (SF)

Denek 1: 0.5 ml 55 mg/kg STZ (Szkudelski 2001; Al-Ani ve ark. 2009)

Denek 2: 0.5 ml 65 mg/kg STZ (Szkudelski 2001; Al-Ani ve ark. 2009)

STZ'nin ip enjeksiyonundan 48 saat sonra tüm hayvanların açlık kan glikoz değerleri tekrar ölçüldü. Glikoz değeri \geq 200 mg/dl olanlar diyabetik olarak kabul edildiler.

Dokuların Hazırlanması

Deney başladıktan dört hafta sonra tüm sıçanlara anestezi (ketalar, 50 mg/kg) altında perfüzyon uygulanarak, karaciğerleri alındı. Karaciğer dokuları 24 saat boyunca %10'luk nötr tamponlu formaldehitte sabitlendi.

Stereolojik İşlemler

Tespit edilen karaciğer dokuları eşit parçalara ayrıldı. (Şekil 1).



Şekil 1: Sıçan karaciğerinin lobları ve fiziksel fraksiyonlama.

Figure 1: Lobes of rat liver and physical fractionation.

Sistematik ve rastgele olarak seçilen her bir karaciğer parçası 1/12 oranında örneklendi (f1). Örneklenen her bir parça doku takip prosedürleri izlenerek parafin bloklara gömüldü. Bloklanan dokularda mikrotom yardımıyla 5 μ m kalınlığında kesitler alınarak 1/400 (f2) oranında ardışık olarak çiftler halinde alındı. Alınan kesitler Hematoksilin-Eozin boyası ile boyandı ve mikroskop altında fotoğrafları çekildi. Karaciğer dokusunun hacim ölçümü için Cavalieri Prensipli (CP) metodu kullanılarak volüm hesaplandı.

$$V = t \times a/p \times P \quad (1)$$

V: Volüm, **t:** Kesit kalınlığı, **a/p:** Nokta sayma tablosundaki her noktanın temsil alanıdır, **P:** Bölümlerin yüzey alanlarına temas eden noktaların toplam sayısı.

$$\text{Total Volüm} = V_1 + V_2 + \dots + V_n \quad (2) \quad (\text{Mazonakis ve ark. 2002}).$$

Her kesit için ayrı ayrı hesaplanan hacimler toplanarak karaciğerin total hacmi bulundu.

Işık mikroskobunda 100'lük büyütmede fotoğraflar çekilerek sayısal yoğunluk hesaplama formülü yardımıyla karaciğer hücreleri hesaplandı. Burada ise Alan Örnekleme Payı, 1/800 (f3) oranında yapıldı (Gundersen 1986).

Böylece elde edilen disektör taneciklerinin sayısı (Q), önceki taneciklerin ters orantısıyla çarpılarak toplam sayı (N) hesaplandı (Gundersen ve Jensen 1987; Ünal ve ark. 2002).

$$N = \frac{1}{f_1} \cdot \frac{1}{f_2} \cdot \frac{1}{f_3} \dots \frac{1}{f_n} \cdot \Sigma Q$$

İstatistiksel Analiz

İstatistik hesaplamalar SPSS (ver: 13) paket programında yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi. Tüm veriler minimum, maksimum, standart sapma ve ortalama değerler olarak hesaplandı. Bu değişkenler için Normallik testi, Shapiro Wilk testi kullanılarak yapıldı. Normallik varsayımı sağlanmadığından, grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farklı grupları belirlemede, Dunn testi kullanıldı.

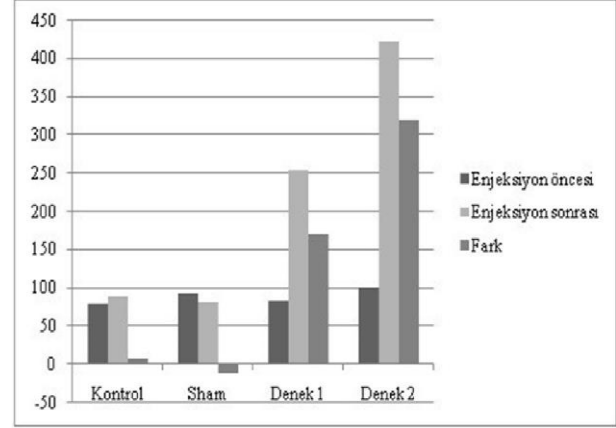
BULGULAR

STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra denek gruplarında ölçülen kan glikoz değerlerinde yükselme görüldü (Şekil 2).

Histopatolojik Bulgular

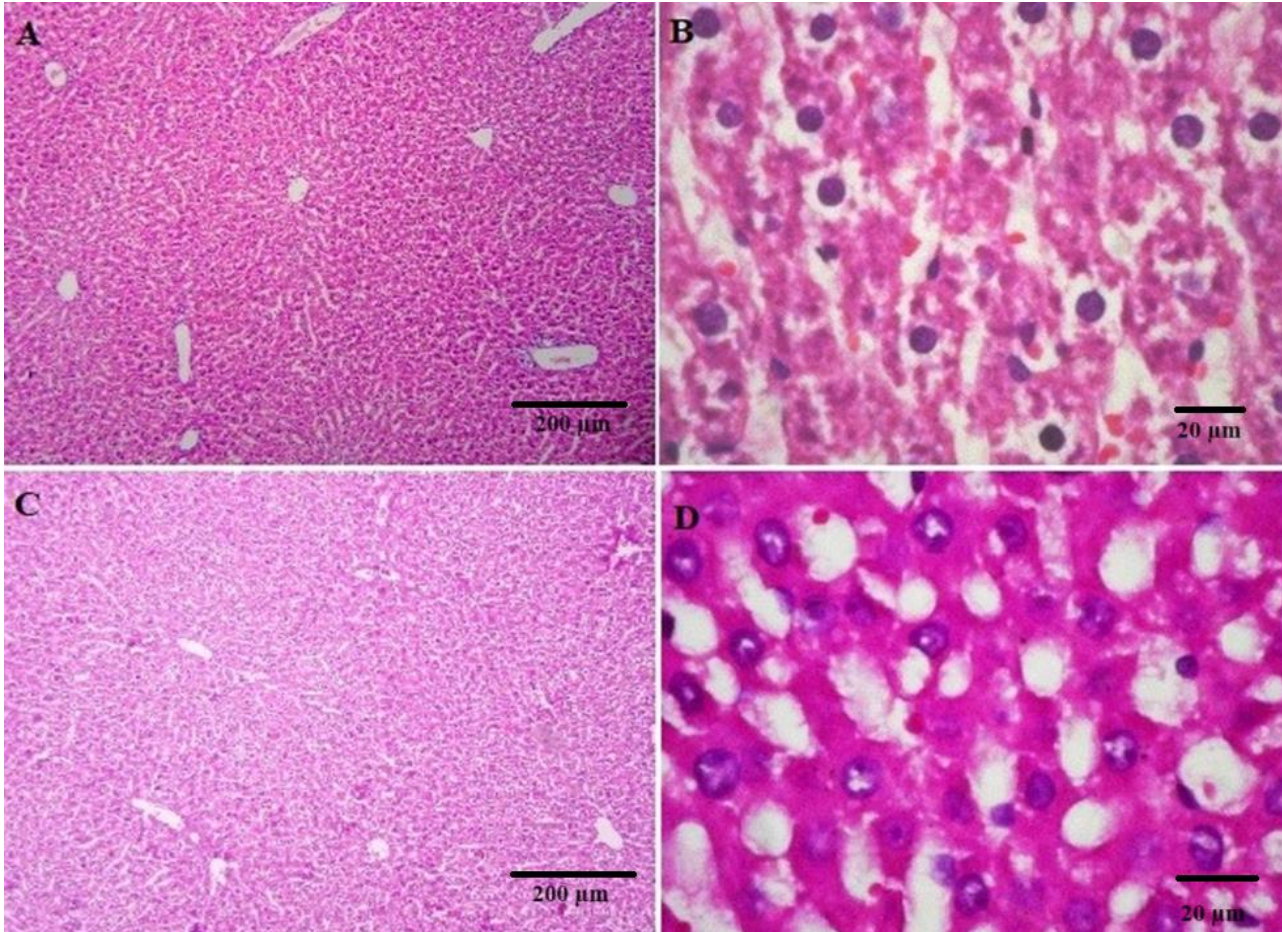
Kontrol ve sham grubu sıçanlarının HE ile boyanmış karaciğer bölümleri, hepatik lobüllerden oluşan normal hepatik yapıya sahipti. Buna karşılık STZ'in neden olduğu

diyabetik sıçanların karaciğer yapısında portal triad çevresinde inflamasyonun yanı sıra nekrotik değişiklikler ve karaciğer parankiminde kan sinüzoidlerinde hafif genişleme görüldü. Ayrıca hepatositlerde mikrovaziküler yağlanma belirgindi. Bazı nukleuslar olduğundan büyük, deforme olmuş, bazılarının da çekirdek zarı sınırlarının düzensiz görünümü hakimdi (Şekil 3).



Şekil 2: Grupların ortalama glikoz düzeyleri (mg/dl).

Figure 2: Mean glucose levels of the groups (mg/dl).

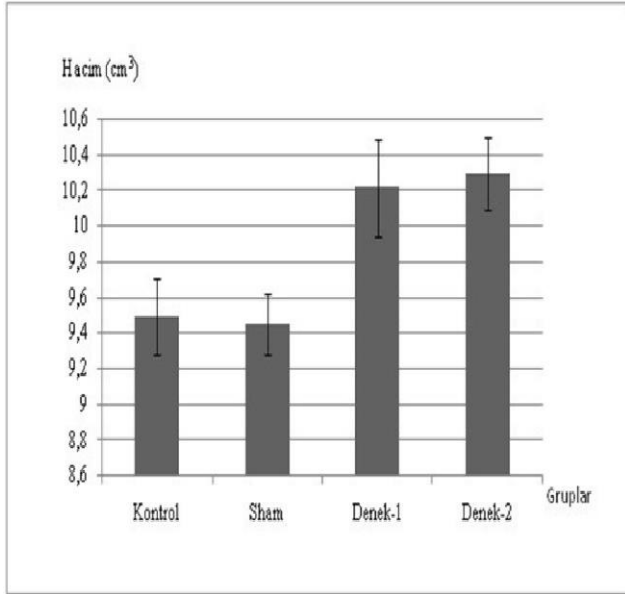


Şekil 3: A: Kontrol, HEx10, B: Kontrol, HEx100, C: Denek 2, HEx10, D: Denek 2, HEx100 gruplarının mikroskopik görüntüleri.

Figure 3: A: Control, HEx10, B: Control, HEx100, C: Subject 2, HEx10, D: Subject 2, HEx100. microscopic images of groups.

Stereolojik ve İstatistikî Bulgular

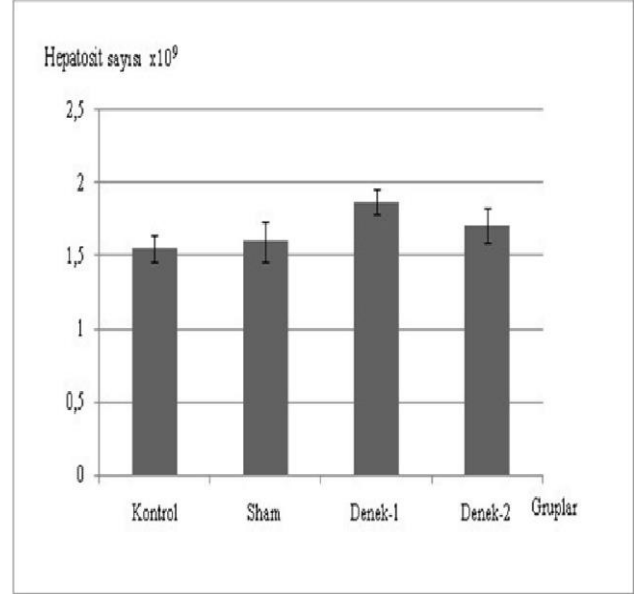
CP göre diyabet gruplarının karaciğer volumü kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı bir fark gösterdi ($p<0.05$) (Tablo 1, Şekil 4).



Şekil 4: CP ile karaciğer hacimleri.

Figure 4: Liver volumes with CP.

Tüm gruplardaki hepatosit sayısına bakıldığında, gruplar arasında fark anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 1). Diyabet grubu hepatosit sayısında artış görüldü (Şekil 5).



Şekil 5: Hepatositlerin sayısı.

Figure 5: The number of hepatocytes.

Tablo 1: Hacim ve hücre sayısının gruplara göre istatistik analizi.

Table 1: Statistical analysis of volume and cell number according to groups.

	Gruplar	Sayı	Ortalama	Std. Sapma	Min.	Mak.	p
Karaciğer hacmi (cm³)	Kontrol	5	9.49 ^b	0.210	9E+012	1E+013	0.001
	Sham	5	9.45 ^b	0.176	9E+012	1E+013	
	Denek-1	5	10.21 ^a	0.274	1E+013	1E+013	
	Denek-2	5	10.29 ^a	0.209	1E+013	1E+013	
Hepatosit Sayısı (10 ⁹)	Kontrol	5	1.55 ^c	0.092	1E+009	2E+009	0.002
	Sham	5	1.60 ^{bc}	0.144	1E+009	2E+009	
	Denek 1	5	1.87 ^a	0.097	2E+009	2E+009	
	Denek 2	5	1.71 ^b	0.120	2E+009	2E+009	

a, b, c: Gruplardaki harfler anlamlılık düzeyini göstermektedir ($p<0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

STZ ile indüklenen DM, kemirgenlerin çoğu türünde kullanılabilen çok uygun maliyetli ve hızlı bir teknik sunarak, DM'un araştırma alanını başka türlü erişilemeyecek bir dizi genotipik ve fenotipik seçeneğe açar. Sıklıkla tek bir yüksek dozda STZ uygulanarak 48 saat içinde tam β -hüresi nekrozu ve Tip-1 diyabete, çoklu düşük dozlu STZ yaklaşımı ise pankreas adacıklarına kısmen zarar verdiği ve sonuçta insülin eksikliği ve hiperglisemiyle sonuçlanan β hüresi aktivitesinin daha da kaybolmasına neden olan inflamatuvar bir süreci tetiklediği bildirilmiştir. Spesifik deneysel protokol için amaçlanan diyabetin tipine ve ciddiyetine bağlı olarak literatürde birden fazla STZ dozlama yöntemi mevcuttur (Alberti 2010; Deeds ve ark. 2011; Furman 2021). DM sıçanlarda kan glikozu, su alımı, gıda alımı ve glikat hemoglobinde anlamlı artış, plazma insülini, toplam hemoglobin, vücut

ağırlığı ve karaciğer glikojenin de belirgin azalma görüldüğü bildirilmiştir (Punithavathi ve ark. 2008). 50 mg/kg STZ ile oluşturulan DM grubu sıçan hepatositlerde yaygın dejenerasyon ve nekroz ile periasiner bölgede hepatositlerin sitoplazmasındaki değişiklikler bildirilmektedir (Yaman ve Doğan 2016). 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulan sıçan karaciğerinde, nekroz, şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yağ değişimi, sinüzoidal dilatasyon ve tıkanıklık gibi birçok geniş alan saptanmıştır (Balasubramanian ve ark. 2013). Alshathly (2019)'nin yaptığı çalışmada da diyabetik sıçanlarda kan sinüzoidlerinde hafif genişleme görüldüğü, santral damara yakın hepatositlerde mikrostatlarda gözlendiği, hepatosit çekirdeklerinin deforme olduğu ve koyu lekelenildiği ayrıca artan fibröz doku ile portal damarlar genişlediği ve hücre infiltratları ile çevrelediği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada (STZ 40 mg/kg) diyabetik kontrol sıçan karaciğerinde, hücreler arası sinüzoidlerin genişlemesi ve merkezi damarda tıkanıklık ile birlikte hipertrofik hücreler, ilthaplanma sergilenmiştir

(Chandrasegaran ve ark. 2018). 60 mg/kg STZ ile indüklenen ve kontrol grubuna kıyasla tedavi edilmemiş diyabetik farelerde hepatositler, merkezi damarlar, sinüzoidler, portal damarlar, hepatik arterler ve safra kanallarının hacimlerinin arttığı ve dolayısıyla karaciğerin ağırlığında ve hacminde artışa yol açan önemli bir hipertrofiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Zangeneh ve ark. 2018). Zheng ve ark. (2021), 60 mg/kg STZ verdikleri ve tedavi etmedikleri diyabetik sıçanlarda karaciğer ağırlığı ve hacminin yanı sıra hepatositlerin ve sinüzoidlerin toplam hacminin önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Ayrıca patolojik olarak, hepatoselüler steatoz, lobüler inflamasyon ve siroz dahil olmak üzere değişen derecelerde periselüler, perisinüzoidal ve periporta fibrozis varlığını teşhis etmişlerdir. STZ ile indüklenen diyabet modelinde sıçan kan ve karaciğerinde biyokimyasal değişikliklere neden olduğu, bu değişikliklerin insan karaciğerindeki benzer modifikasyonlar gibi steatozdan steatohepatite ve karaciğer fibrozuna kadar değişebilen etkiler gösterebildiği bildirilmiştir (Bilal ve ark. 2016). Tek bir doz STZ (150 mg/kg, ip) uygulandığında karaciğer ağırlığının yüzdesinde artış, glikojen azalması, lipid birikimi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kupffer hücre hiperplazisi görülmüştür (Al-Ani ve ark. 2009).

Optik dissektör sayma yöntemi kullanılarak hepatositlerin sayısının değerlendirildiği bir çalışmada diyabetik olmayan sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında diyabetik kontrol grubunun hepatosit sayılarında artış olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni, daha yüksek bir hepatosit sayısının diyabetik karaciğerlerde aşırı glikoz üretimine neden olması ve fazla glikozun diğer organlar tarafından verimsiz bir şekilde metabolize edilmesi olabileceğini vurgulamışlardır (Sipal ve ark. 2012). Aynı şekilde Ünal ve ark. (2011) diyabetik grupta hepatositlerin sayısında %21'lik bir artış tespit etmişlerdir. Yine başka bir çalışmada DM, hepatositlerin hem sayısında hem de hacminde artışa neden olmuştur. Enerji dengesizliğini düzenlemek için DM'un insüline dirençli durumlarda, hepatik hiperplazi olarak bilinen bir durumda hepatosit sayısının arttığı iddia edilmiştir. Artan hücre sayısının sadece apoptoz yüklü olabilen trofik faktörü azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda ana oksidan kaynakları olan mitokondri sayısında da artışa neden olduğu vurgulanmıştır (Halici ve ark. 2009).

Sonuç olarak, streptozotosin enjeksiyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan diyabet, karaciğer hacminde ve hepatosit sayılarında artışa yol açmaktadır. Bu değişiklikler diyabetli hastalarda karaciğerde meydana gelen değişikliklerin anlaşılmasına yardımcı olur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışmada herhangi bir finansal destek alınmamıştır. Bu çalışma Saadet YILDIZ isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Bu çalışma 5. Uluslararası Tıp Bilimleri ve Multidisipliner Yaklaşımlar isimli kongrede sözlü sunu olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır (8-9 Ekim 2022. Online, İstanbul, Türkiye. Özet Kitabı: ss: 486).

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MÇR, SY
Denetleme/Danışmanlık: MÇR, YT
Veri Toplama ve/veya İşleme: MÇR, SY, YT
Analiz ve/veya Yorum: MÇR, SY, YT
Makalenin Yazımı: SY, YT
Eleştirel İnceleme: MÇR, SY, YT

KAYNAKLAR

- Al-Ani IMD, Al-Mishadani NMS, Muslih RK, Hamoodi SR (2009).** Histological liver changes in streptozotocin induced diabetic mice. *Med J Malaysia*, 8 (1).
- Alberti KGMM (2010).** The classification and diagnosis of diabetes mellitus. Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A and Goldstein B (Ed). *Endocrinology and Metabolism* (pp. 24-30). Blackwell Publishing, London, UK.
- Alshathly MR (2019).** Efficacy of Ginger (*Zingiber officinale*) in ameliorating streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats: Histological and biochemical studies. *J Microsc Ultrastruct*, 7 (2), 91-101.
- Balasubramanian T, Senthilkumar GP, Karthikeyan M, Chatterjee TK (2013).** Protective effect of ethyl acetate fraction of stereo spermum suaveolens against the hepatic oxidative stress in STZ diabetic rats. *J Tradit Complement Med*, 3 (3), 175-181.
- Bilal HM, Riaz F, Munir K, Saqib A, Sarwar MR (2016).** Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Medicine*, 3 (1), 1275415.
- Chandrasegaran G, Elanchezhian C, Ghosh K (2018).** Effects of Berberine chloride on the liver of streptozotocin-induced diabetes in albino Wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 99, 227-236.
- Correia-Santos AM, Suzuki A, Anjos JS et al. (2012).** Induction of Type 2 Diabetes by low dose of streptozotocin and high-fat-diet-fed in wistar rats. *Medicina (Ribeirao Preto)*, 45 (4), 436-444.
- Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS et al. (2011).** Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*, 45 (3), 131-140.
- Furman, BL (2021).** Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc.*, 1 (4), e78.
- Gundersen HJG (1986).** Stereology of arbitrary particles a review of un biased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of william r. thompson. *J Microsc*, 143 (1), 3-45.
- Gundersen HJG, Jensen EB (1987).** The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147 (3), 229-263.
- Halici Z, Bilen H, Albayrak F et al. (2009).** Does telmisartan prevent hepatic fibrosis in rats with alloxan-induced diabetes? *Eur J Pharmacol*, 614 (1-3), 146-152.
- Kohl T, Gehrke N, Schad A et al. (2013).** Diabetic liver injury from streptozotocin is regulated through the caspase-8 homolog CFLIP involving activation of JNK2 and intrahepatic immunocompetent cells. *Cell Death Dis*, 4 (7), e712.
- Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT (2015).** Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. *J Diabetes Res*, 2015, 494578.
- Magalhaes DA, Kume WT, Correia FS et al. (2019).** High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc*, 91 (1), e20180314.
- Maitra A, Abbas AK (2005).** The endocrine pancreas. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, 7th edn. Elsevier Saunders, Philadelphia. 1190-1205.
- Mazonakis M, Damilakis J, Maris T, Prassopoulos P, Gourtsoyannis N (2002).** Comparison of two volumetric techniques for estimating liver volume using magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging*, 15 (5), 557-563.
- Mohamed J, Nafzah AN, Zariyantey AH, Budin S (2016).** Mechanisms of diabetes-induced liver damage: the role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 16 (2), e132.
- Piya MK, Tahrani AA, Barnett AH (2010).** Emerging Treatment Options for Type 2 Diabetes. *Brit J Clinical Pharma*, 70 (5), 631-644.
- Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PSM (2008).** Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male wistar rats. *J Appl Toxicol*, 28 (6), 806-813.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P et al. (2019).** Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and

- projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract*, 157, 107843.
- Sipal S, Halici Z, Kiki I et al. (2012).** Comparative study of three angiotensin II type 1 receptor antagonists in preventing liver fibrosis in diabetic rats: stereology, histopathology, and electron microscopy. *J Mol Histol*, 43 (6), 723-735.
- Szkudelski T (2001).** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50 (6), 537-546.
- Unal D, Aksak S, Halici Z et al. (2011)** Effects of diabetes mellitus on the rat liver during the postmenopausal period. *J Mol Histol* 42 (3), 273-287.
- Ünal B, Canan S, Aslan H, ve ark. (2002).** Doku örneklerindeki objelerin sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metodlar: Fiziksel disektör. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 15-24.
- Wang-Fischer Y, Garyantes T (2018).** Improving there liability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model. *J Diabetes Res*, 2018, 8054073, 14 pages.
- Yaman T, Doğan A (2016).** Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda meşe palamudu (*quercus brantili*ndl.) ekstraktların karaciğer ve pankreası koruyucu etkileri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1, 7-15.
- Zangeneh MM, Zangeneh A, Bahrami E et al. (2018).** Evaluation of hematoprotective and hepatoprotective properties of aqueous extract of *Ceterach officinarum* DC against streptozotocin-induced hepatic injury in male mice. *Comp Clin Pathol*, 27 (6), 1427-1436.
- Zheng Y, El-kott AF, Shaldoum F et al. (2021).** Alleviation of Diabetes-Induced Hepatotoxicity by Date Palm Hydroalcoholic Extract in Rat Model; A Biochemical, Immunohistochemical and Stereological Study. *Int J Morphol*, 39 (3), 876-885.