



Diyabetik Sıçanların Dalağında CD4 ve CD8 Ekspresyonu Üzerine Zencefil (*Zingiber officinale*) Ekstraktının İmmünmodülatör Etkileri

The Immunomodulatory Effects of Ginger (*Zingiber officinale*) Extract on CD4 and CD8 Expression in Spleen of Diabetic Rats

İD Buket BAKIR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, zencefil ekstrakt uygulaması ile streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan ratların dalak dokusunda CD4 ve CD8 salınımindaki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda toplam kırk adet Wistar albino ırkı rat kullanıldı. Ratlar; kontrol, sham, zencefil, diyabet, diyabet+zencefil olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Dalak doku kesitlerine Crossman'ın üçlü boyama ve streptavidin-biotin peroksidaz kompleks boyama yöntemleri uygulandı. Diyabet ve diyabet+zencefil gruplarına 50 mg/kg streptozotosinin intraperitoneal yolla enjeksiyonu ile diyabet indüklendi. Zencefil ekstraktı, zencefil ve diyabet+zencefil gruplarına 200 mg/kg dozunda 30 gün süreyle uygulandı. Gruplar arasında dalak ağırlığı, CD4 ve CD8 immünopozitif hücre sayısı ve CD4/CD8 oranı istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: Diyabet grubunda çok sayıda lenf folikülünün atrofiye uğradığı ve çoğu folikülün de germinal merkezinin olmadığı görüldü. Ayrıca, zencefil ekstraktının dejeneratif değişiklikleri azalttığı tespit edildi. Diyabet grubunda CD4 ve CD8 salınınının yoğun olduğu gözlenirken, diyabet+zencefil grubunda CD4 ve CD8 salınım yoğunluğunun diyabet grubuna göre azaldığı görüldü. Ayrıca diyabet grubunda azalan dalak ağırlığının diyabet+zencefil grubunda arttığı kontrol ve sham gruplarıyla benzer değerde olduğu tespit edildi.

Sonuç: Zencefil ekstraktının deneysel yolla diyabet oluşturulan modelde immün sistemi uyarıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, zencefil diyabetle ilişkili dalak sorunlarında ve bağışıklık fonksiyon bozukluğunda tedavi edici olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: CD4, CD8, dalak, diyabet, zencefil

ABSTRACT

Aim: This study aims to examine the changes of the ginger extract treatment on CD4 and CD8 expressions in the spleen tissue of rats, in which the experimental diabetes was induced with streptozotocin.

Materials and Methods: Forty Wistar albino rats were divided into 5 groups: control, sham, ginger, diabetes, diabetes+ginger. The spleen tissue sections were stained by Crossman's triple staining and the streptavidin-biotin peroxidase complex method. Diabetes was induced by 50 mg/kg streptozotocin injection intraperitoneally in the diabetes and diabetes+ginger groups. Ginger extract was administered to the ginger and diabetes+ginger groups at dose of 200 mg/kg for 30 days. Statistical measurements were analyzed in order to determine whether there was a difference between the groups in terms of weight of the spleen, the number of immunopositive CD4 and CD8 cells, and ratio of CD4/CD8.

Results: It was observed that the numerous lymph follicles were atrophied and most of the follicles did not have a germinal center in the diabetes group. Also, it was determined that ginger extract reduced degenerative changes. While it was observed that CD4 and CD8 expression was intense in the diabetes group, the intensity of CD4 and CD8 expression was decreased in the diabetes+ginger group compared to the diabetes group. In addition, it was determined that the spleen weight decreased in the diabetes group and increased in the diabetes+ginger group, which was similar to the control and sham groups.

Conclusion: In this study, it was revealed that ginger exerted a protective effect against STZ-induced diabetes in rats and had immunostimulatory effect in diabetic experimental model. Also, it can be used therapeutically in spleen problems and diabetes-related immune dysfunction.

Keywords: CD4, CD8, spleen, diabetes, ginger

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Buket BAKIR, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

Tel.: +90 282 250 47 15 E-posta: buketbakir@nku.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-3637-3688

Geliş tarihi/Received: 09.11.2022 Kabul tarihi/Accepted: 23.01.2023

GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), vücudun insülin üretememesi, insülinin yokluğu veya insülini kullanamaması sonucu kan şekerinin yükselmesi ile ortaya çıkan, ömür boyu süren kronik bir hastalıktır^{1,2}. Daha çok çocukluk çağında ortaya çıkan tip 1 DM (T1DM) ve ileri yaşlarda en sık görülen tip 2 DM (T2DM) olmak üzere 2 tipi vardır². Bağışıklık dengesi diyabetle yakından ilişkilidir³. T2DM, bağışıklık hücrelerinin fonksiyonunu olumsuz etkiler ve enfeksiyon riskini artırır. İnsülin eksikliğinin CD4 ve CD8 fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu da gözlenmiştir⁴.

İmmünomodülatörler, vücudu zarar ve enfeksiyona karşı korumak için immün yetersizliği durumlarında bir immüno stimulant ve anormal derecede artan bağışıklık durumunda bir immüno süpresant olarak işlev görürler^{5,6}. Bağışıklığı artırarak veya azaltarak regülatör görevi gören doğal ürünlerle yapılan çalışmalar artmaktadır^{3,7,8}. Zencefil (*Zingiber officinale*) eski çağlardan beri hem baharat hem de tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Zencefilin terapötik özelliği, başta gingeroller, shogaoller, zingerone ve paradoller olmak üzere yaklaşık 400 farklı bileşene sahip olmasına bağlanabilir^{5,9}.

Bağışıklık, doğuştan gelen doğal ve kazanılmış bağışıklık olarak sınıflandırılmaktadır. Dalak, organizmanın bağışıklığında yer alan en büyük sekonder lenfoid organdır. T ve B lenfositleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler gibi savunmada rol oynayan çok sayıda hücreyi barındırır¹⁰. T lenfositler, hücresel bağışıklıktan sorumludurlar ve CD4 ve CD8 olmak üzere iki alt grubu içerirler¹¹.

CD4 ve CD8 diyabet patogeneğinde çok önemlidirler. Özellikle T1DM'de bu hücrelerin sayısının artması veya fonksiyonlarının bozulması etkili olmaktadır. Aynı zamanda, bu hücreler β -hücreleri adacıklarının yok edilmesine neden olurlar. Disfonksiyonu olan CD4 pozitif hücrelerin sayısındaki artış, pankreastaki β -hücre adacıklarının otoimmün yıkımına neden olur¹². Bu nedenle, CD4 T lenfositleri, T1DM'nin patogeneğinde önemli bir rol oynar¹³. Hiperglisemi ve hiperinsülinemi ile karakterize olan T2DM, viral enfeksiyon, melanom veya diğer farklı hastalıklar açısından artmış riske neden olur. Ayrıca CD8 T lenfositlerinin insülin reseptörü eksprese ettiği, insülinde ve kan şekeri yüksekliğinden olumsuz etkilendiği bildirilmiştir. Ek olarak insülin, CD8 T lenfositlerinin fonksiyonu üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir⁴.

Bu çalışma, deneysel diyabetik ratların dalak dokusunda, zencefilin etanolik ekstraktının CD4 ve CD8 ekspresyonu üzerindeki immünomodülatör etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık ve Deney Merkezi'nden temin edilen 40 adet dişi, 206 ± 6 g, 4 aylık Wistar albino ratlar kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm deneyler Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (toplantı no: 09.11.2022/1153).

Ratlar daha önceden hiçbir çalışmada kullanılmadı ve standart kafeslerde sıcaklık kontrollü odada (22 ± 2 °C), 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu ve standart rat peleti diyeti ve su ile ad libitum beslendi.

Zencefilin Etanolik Özünün Hazırlanması

Zencefil taze rizomları yerel bir mağazadan temin edildi ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Botanik Bölümü'nde onaylandı. Zencefiller önce yıkanıp sonra karanlık bir odada kurutuldu. Kurutulmuş zencefil rizomları, bir porselen havanda mekanik olarak toz haline getirildi. Ortaya çıkan toz karışım %95 alkolde 24 saat bekletildikten sonra karışım süzüldü. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı. Hazırlanan tüm karışımlar bir araya toplandı ve düşük devirli evaporatörde alkol uzaklaştırıldı. Hazırlanan ekstrakt buzdolabında 4 °C'de olarak saklandı. Zencefil ekstraktı 200 mg/kg/bw/gün, daha önce bahsedilen metodolojiye göre 30 gün boyunca deney ratlarına ağızdan verildi¹⁴.

Diyabet İndüksiyonu

50 mg/kg streptozotosin (STZ) (Sigma, st. Louis, MO, ABD), 0.1 M sitrat tamponunda (pH 4.5) çözündürüldü. İntraperitoneal enjeksiyon (i.p.i.) bir gece aç kaldıktan sonra yapıldı. Uygulamadan 3 gün sonra sıçanların kuyruk venlerinden Accu-Chek instant glukometre (Roche) kullanılarak açlık kan glukoz değerleri ölçüldü. Kan şekeri >250 mg/dL diyabet gelişimi için bir gösterge olarak kabul edildi ve ratlar diyabetik gruplara dahil edildi¹⁵.

Deney Hayvanları ve Dizayn

Deney ratları 5 gruba ayrıldılar ve her gruba sekizer rat dahil edildi. Total deney protokolü 30 gün sürdürüldü. Deney grupları şu şekildeydi:

Kontrol (n=8): Uygulama yapılmadı (tedavi edilmeyen grup).

Sham grubu (n=8): Ratlara oral gavaj ile Tween 80 verildi.

Zencefil grubu (n=8): Taze zencefil ekstraktı (günlük hazırlanan) 200 mg/kg dozunda 30 gün oral gavaj ile verildi.

Diyabet grubu (n=8): Bu gruba 50 mg/kg i.p.i. STZ uygulandı.

Diyabet+zencefil grubu (n=8): Bu gruba diyabet geliştikten sonra 30 gün süreyle 200 mg/kg zencefil ekstraktı oral gavaj ile verildi.

Otuz günün sonunda ratlar derin anestezi altında ötenazi yapılarak dalak dokuları çıkarıldı.

Histolojik Prosedür

Dalak dokuları %10 formalinde 48 saat fikse edildi. Fiksasyondan sonra numuneler rutin histolojik protokoller için işlendi ve parafine gömüldü. 5 µm olarak alınan kesitler, ksilen içinde deparafinize edildi, azalan etanol konsantrasyonları ile rehidrate edildi ve histolojik inceleme için Crossman'ın üçlü boyama yöntemiyle boyandı¹⁶.

İmmünohistokimyasal Boyama

Dalakta CD4 ve CD8 T lenfosit immünreaktivitesini araştırmak için streptavidin biotin peroksidaz kompleksi (strepABC) yöntemi uygulandı. 5 µm kalınlığındaki kesitler, yapışkan lamalar üzerinde toplandı. Kesitler, sitrat tampon solüsyonunda (pH 6.0) 700 Watt'ta bir mikrodalga fırında 10 dakika süreyle işlendi. Daha sonra dokular %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisinde 10 dakika bekletildi. Kesitler, anti-CD4 antikoru (ab237722, 1:150 seyreltilmiş) ve anti-CD8 antikoru (OX-8) (ab33786, 1:150 seyreltilmiş) ile inkübe edildi. Kesitler, biyotinlenmiş goat anti-rabbit ve rabbit anti-goat IgG ile 30 dakika ve peroksidaz konjuge streptavidin (1:200) (P0397; Dako Corp., Carpinteria, CA, ABD) ile 10 dakika inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3'-Diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB, 0,5 mg/mL; Dako Corp.) kullanıldıktan sonra karşıt boyama olarak Gill III hematoksin kullanıldı. Kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) kullanılarak değerlendirildi. Primer antikor içermeyen tavşan serumu, negatif kontrol olarak kullanıldı. CD4 ve CD8'in immünoreaktivitesinin değerlendirilmesi puanlandı. İmmünoreaktif hücreler negatif, hafif, orta ve yoğun olarak kategorize edildi.

İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi

CD4 ve CD8'in immünohistokimyasal boyama sayısı, x400 büyütmede ışık mikroskobu kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı. Her rattan toplam on beş temsili görüntü seçildi. Birim alandaki CD4 ve CD8 pozitif ve negatif hücre sayısı şu formüle göre hesaplandı: (Pozitif hücre sayısı/alanda sayılan toplam hücre sayısı) x100. CD4 ve CD8 pozitif hücre sayısı ve CD8/CD8 oranı istatistiksel olarak analiz edildi^{3,17,18}.

Rölatif Dalak Ağırlığı

Ratlara ötenazi yapıldıktan hemen sonra taze dalaklar tartıldı. Gruplar arasında dalak ağırlığındaki değişikliği karşılaştırmak için istatistiksel yöntem kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (versiyon 20.0, IBM, SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak

yapıldı. Veriler normallik dağılımı ve varyans homojenliği açısından Shapiro-Wilk's testi ile incelendi. Normal dağılıyorsa one-way ANOVA testi uygulandı ve gruplar arasındaki farklar post-hoc Tukey testi ile analiz edildi. Farklılıklar p<0,05'te anlamlı kabul edildi ve ortalamalar ve standart hatalar hesaplandı. Çalışmada veriler normal varsayımları sağlamadığından parametrik olmayan testler kullanıldı. Bu nedenle gruplar arasındaki farklar Kruskal-Wallis ile analiz edildi ve gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca farklar p<0,05'te anlamlı kabul edildi ve medyan değerler (minimum-maksimum) hesaplandı.

BULGULAR

Histolojik Bulgular

Kontrol, sham ve zencefil grupları, dalağın normal histolojik yapısına sahipti. Doku dışarıdan bir kapsülle çevriliydi. Kapsülden ayrılan trabeküller dalak parankimine kadar uzanıyordu. Dalak, ayrılmış lenfoid foliküllerden (beyaz pulpa) oluşuyordu ve oldukça vasküler matris (kırmızı pulpa) ile çevriliydi. Beyaz pulpa, periarteriyolar lenfatik kılıf ve marjinal bölgelerden oluşuyordu. Lenfoid foliküllerin germinal merkezleri ve merkezi arteriyoller vardı. Kırmızı pulpa, kan hücreleri kordonlarından oluşan bir ağdan oluşuyordu (Şekil 1a-c). Diyabet grubunun lenfoid foliküllerinin atrofik olduğu görüldü. Foliküllerin çoğunda germinal merkez yoktu (Şekil 1d). Diyabet+zencefil grubu, kontrol, sham veya zencefil gruplarındakine benzer şekilde beyaz ve kırmızı pulpa olarak gözlemlendi. Foliküllerin çoğu germinal merkeze sahipti (Şekil 1e).

İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm gruplarda spesifik CD4 ve CD8 immünreaksiyonları görüldü. Ancak immünreaksiyon pozitif hücrelerin şiddeti açısından gruplar arasında fark vardı.

CD4 ve CD8 T lenfositleri çoğunlukla kırmızı pulpada ve birkaç pozitif hücre beyaz pulpada lokalize idi. Kırmızı pulpada kontrol ve sham gruplarında hafif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 2a, 2b, 3a, 3b). Zencefil grubunun hücrelerde orta derecede reaksiyona ve birkaç hafif reaksiyona sahip olduğu görüldü (Şekil 2c, 3c). Diyabet grubunda yoğun reaksiyon dikkat çekerken (Şekil 2d, 3d), diyabet+zencefil grubunda orta düzeyde reaksiyon görüldü (Şekil 2e, 3e).

İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

Bulgularımıza göre diyabet grubunda CD4 ve CD8 immünopozitif hücre sayısının kontrol, sham ve zencefil gruplarına göre anlamlı artış gösterdiği gözlemlendi (p<0,0001). Zencefil ile tedavi edildikten sonra diyabet+zencefil grubunun diyabet grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği gözlemlendi (CD4 ve CD8 için p<0,0001). CD4 ve CD8'in tüm verileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada CD4/CD8 oranında oldukça anlamlı bir artış saptandı ($p=0,002$). Kontrol ($p=0,002$) ve sham grubuna göre ($p=0,001$) diyabet grubunda anlamlı azalma olurken, diyabet+zencefil grubunda anlamlı olmayan bir artış oldu ($p>0,05$) (Tablo 1).

Dalak Ağırlığı Bulguları

Tüm gruplar dalak ağırlığı açısından karşılaştırıldığında diyabetli grupta anlamlı azalma saptandı. Ayrıca diyabet+zencefil grubu diyabet grubu ile karşılaştırıldığında dalak ağırlığında anlamlı artış saptandı ($p<0,05$). Gruplar arasında ortalama dalak ağırlığı değerlerinin karşılaştırılması Şekil 4'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

İmmünolojik kaynaklar konusunda yapılan çalışmalara her geçen gün bir yenisi eklenmektedir. Toksik yan etkilere sahip

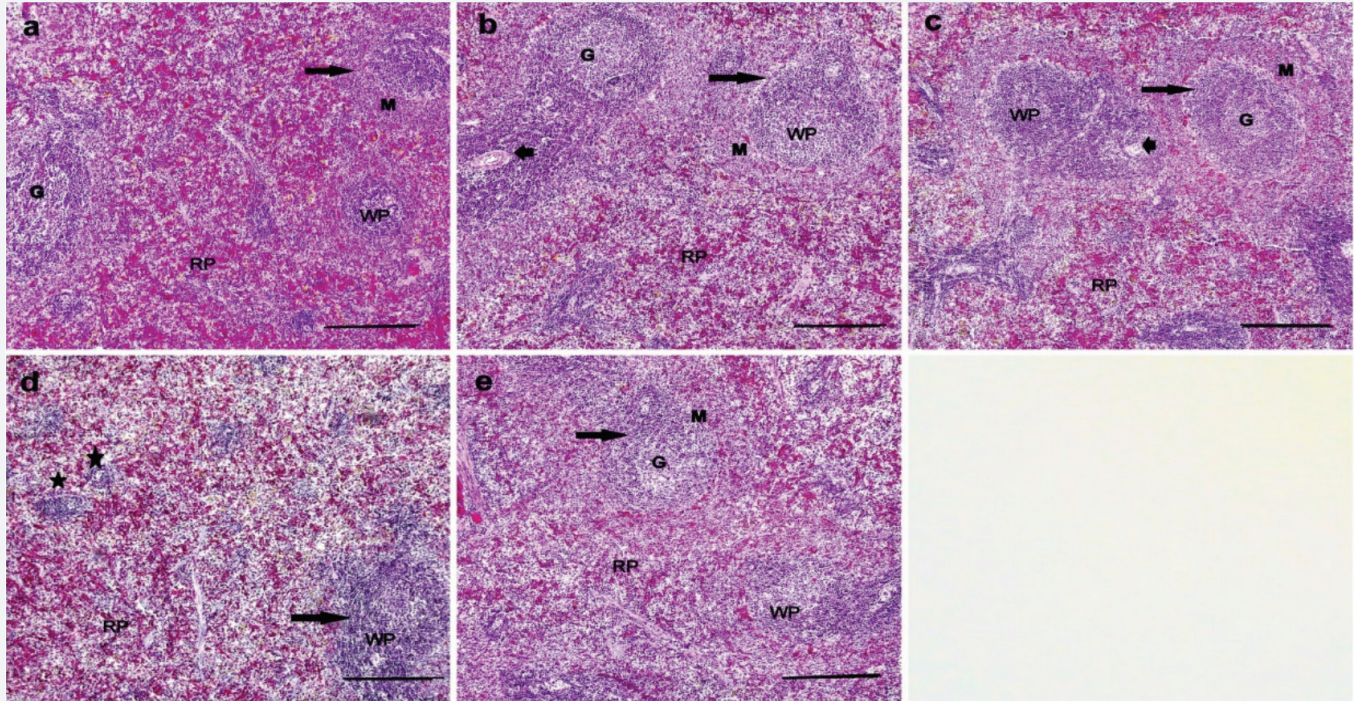
olmayan yüksek düzeyde biyostabil immünomodülatörlerin keşfi büyük önem taşımaktadır. Özellikle son yıllarda biyogüvenliği kanıtlanmış bitkilerin immünomodülatör etkileri merak konusu olmuştur¹⁹. Bu çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik ratlarda bağışıklık üzerinde önemli bir işlevi olan dalak dokusu üzerinde zencefilin koruyucu bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için yola çıktık.

Dalak gibi lenfoid organlar çeşitli streslere karşı oldukça hassastır ve hastalığa maruz kalmak dalak atrofisine neden olur^{18,20}. Diyabetik ratlarda lenfoid foliküllerin germinal merkezinin de önemli ölçüde küçüldüğü bildirilmiştir^{20,21}. Said ve ark.³ (2020), çoğu folikülün, hücrelerin çoğunda piknotik çekirdeklerle atrofiye olduğunu bildirmişlerdir. Çoğunda germinal merkez görülmemiştir. Hayvan modellerinde^{3,22,23} ve klinik çalışmalarda²⁴ zencefilin diyabet kaynaklı hasara karşı onarıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada, 30 gün boyunca diyabetik ratlara oral gavaj ile zencefil ekstraktı

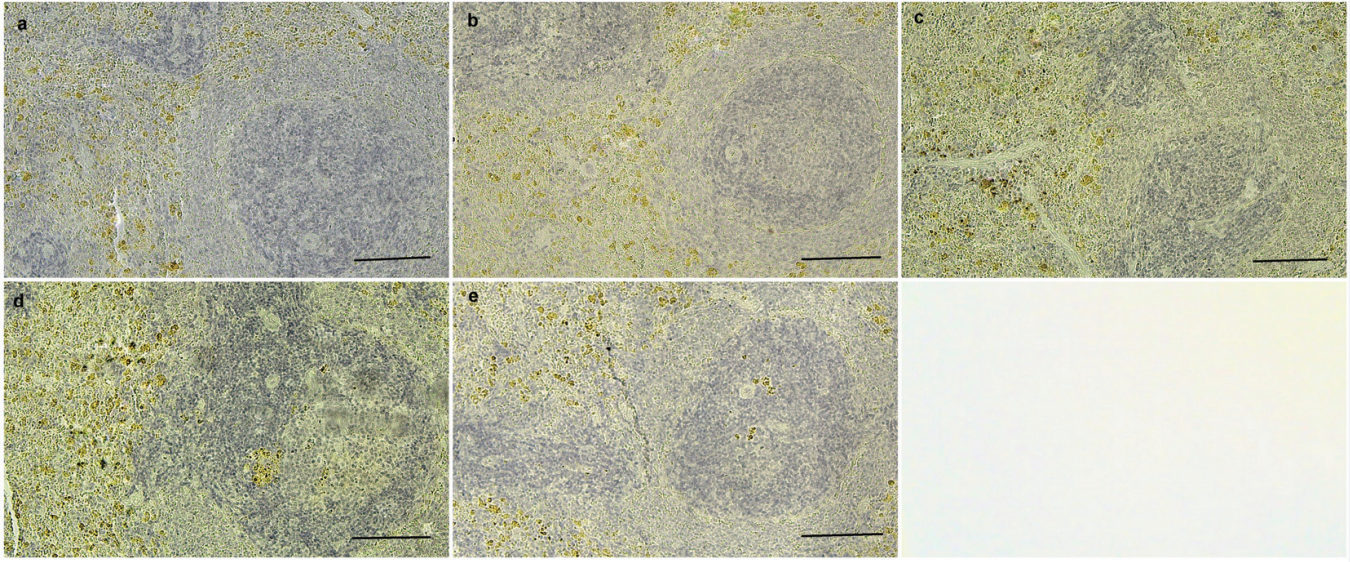
Tablo 1. Tüm gruplarda birim alandaki CD4 ve CD8 pozitif hücre sayısı

	Kontrol	Sham	Zencefil	Diyabet	Diyabet+zencefil
CD4	19,00	19,00	18,00	83,50 ^a	21,00 ^{bc}
CD8	15,50	16,00	16,00	80,00 ^a	19,00 ^{bc}
CD4/CD8	1,12	1,20	1,20	1,04 ^a	1,12

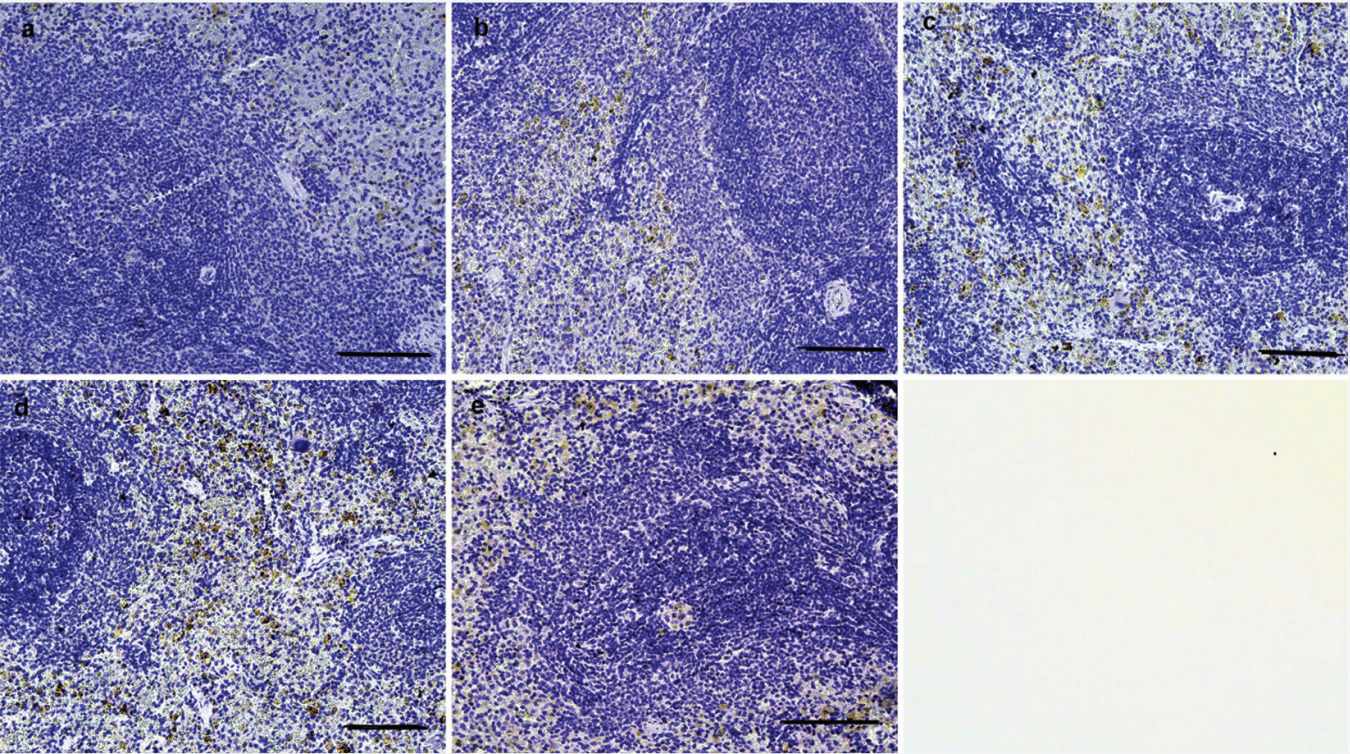
^a: $p<0,05$ diyabet grubu ile kontrol grubu/diyabet grubu ile sham grubu, ^b: $p<0,05$ diyabet+zencefil grubu ile diyabet grubu, ^c: $p<0,05$, diyabet+zencefil grubu ile zencefil grubu



Şekil 1. Dalak dokusunun histolojik yapısı. Kontrol (a), sham (b), zencefil (c), diyabet (d), diyabet+zencefil grupları (e). Kırmızı pulpa (RP), beyaz pulpa (WP), lenfoid foliküller (ok), germinal merkez (G), marjinal bölge (M), atrofiye lenfoid foliküller (yıldız), periarteriolar lenfatik kılıf (küçük ok). Üçlü boyama. Bar=100 µm



Şekil 2. Dalak dokusunda CD4 ekspresyonu. Kontrol (a), sham (b), zencefil (c), diyabet grubu (d), diyabet+zencefil grupları (e). İmmünohistokimyasal boyama. Bar=100 µm

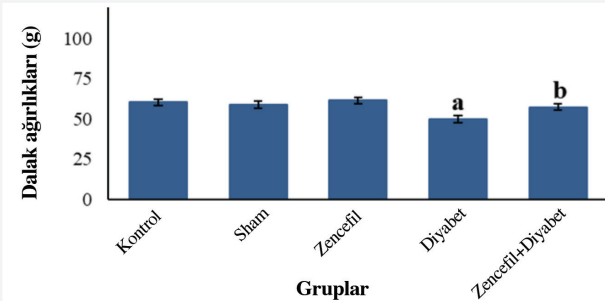


Şekil 3. Dalak dokusunda CD8 ekspresyonu. Kontrol (a), sham (b), zencefil (c), diyabet grubu (d), diyabet+zencefil grupları (e). İmmünohistokimyasal boyama. Bar=100 µm

verildi. Zencefil uygulamasının diyabetik grupta histolojik ve ultrastrüktürel dejeneratifini iyileştirdiği görüldü. Bu gelişme beyaz pulpada lenf foliküllerinin sayısında artış ve centrum germinativum görünümü olarak görülebilir.

Zencefil, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından güvenli şifalı bitkiler listesine dahil edilmiştir. Günde 4 grama kadar kullanımının patolojik bir soruna neden olmayacağı bildirilmiştir⁹. T2DM hastalarında yapılan bir çalışmada zencefil tozunun 6-12 hafta süreyle günde 3 grama varan dozlarda kullanımının ciddi yan etkilere yol açmadığı bildirilmiştir²². Zencefil ekstraktının 200 ila 500 mg/kg/gün dozlarının anti-enflamatuvar ve antioksidatif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir⁹. Ayrıca, oral uygulama ile 1000 mg/kg dozunda zencefil ekstraktı gebe sıçanlarda tolere edilmektedir. Hamilelik veya fetüslerin gelişimi üzerinde herhangi bir yan etkisi olmadığı da eklenmiştir²⁵. Deneysel çalışmamıza başlamadan önce deneysel prosedürümüzü tasarlamak için birçok makaleyi inceledik ve böylece uygun ve etkili dozda (200 mg/kg) ve sürede (30 gün) çalışmamızı tamamladık¹⁴. Ayrıca çalışmamızda zencefil ile tedavi edilen ratlarda dozun ve sürenin ciddi yan etki ve komplikasyonları olmadığını saptadık.

Hücrel bağışıklıktan sorumlu CD4 ve CD8 T lenfositleri doğrudan zararlı hücreleri yok eder²⁶. Birçok çalışma, CD4 ve CD8 T lenfosit alt tiplerinin hem T1DM hem de T2DM'de etkili olduğunu vurgulamıştır^{27,28}. Miya ve ark.²⁷ (2018), T2DM'li ve diyabetsiz Japon hastalarda glikoz yüklemesinin T lenfositleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Katılımcılara 75 gr OGTT uygulanmış ve açlıktan 60 ve 120 dakika sonra (12 saat, gece boyunca) T lenfositleri hesaplanmıştır. Çalışmada, glukoz yüklemesinden önce gruplar arasında CD4 pozitif hücre sayılarında fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, CD4 pozitif hücre sayılarının hem T2DM hem de diyabetik olmayan gruplarda 120 dakikalık glukoz yüklemesinden sonra hızla arttığını bulmuşlardır.



Şekil 4. Gruplar arasında ortalama dalak ağırlığı değerlerinin karşılaştırılması. Kontrol grubu-diyabet grubu p=0,007 (a), sham grubu-diyabet grubu p=0,05 (a), diyabet grubu-diyabet+zencefil grubu p=0,021 (b)

CD4 hücrelerinin sayısı, CD8 hücre yanıtında önemlidir. CD8 sayısındaki artış, CD4 sayısında artışa neden olur²⁹. Li ve ark.³⁰ (2022), diyabetik ve normal farelerde CD4 ekspresyonunu araştırmışlardır. Sağlıklı farelerde dalak, pankreas ve böbrek dokularındaki CD4 pozitif hücreler düşükken, DM'li farelerin organlarında CD4 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını ortaya koymuşlardır. Çalışmada diyabetik grubun CD ve CD8 pozitif hücre sayıları kontrol, sham ve zencefil gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur.

Bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların birçok ciddi yan etkisi tüketicilerin dikkatini çekmektedir. Bu nedenle, daha az yan etkisi olan veya hiç yan etkisi olmayan terapötik ajanlara artan bir ilgi vardır³¹. Zencefil bu konuda ümit vericidir. Bu çalışmanın bulguları, zencefilin etanol ekstraktının CD4 ve CD8 ekspresyonu açısından T lenfosit alt tiplerini aktive ettiğini göstermiştir. Zencefilin bu immünomodülatör aktivitesi, diyabette immün düzenleyici bir madde kaynağı olarak bu bitkinin gelişimi için bir temel oluşturabilir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmada deneysel diyabet oluşturuldu. Zencefil ile tedavi edildikten sonra dalak dokusunda hem diyabetin verdiği hasar hem de zencefilin anti-enflamatuvar etkisi araştırıldı. Bu çalışmanın bir sınırlılığı vardır. Bu çalışmada sadece immünohistokimyasal yöntem kullanıldı. Western blot veya polimeraz zincir reaksiyonu gibi diğer yöntemler kullanılarak daha detaylı bir değerlendirme yapılabilir.

SONUÇ

Çalışmada deneysel diyabetli ratlarda CD4 ve CD8 ekspresyonunun arttığı belirlendi. Otuz gün süreyle 200 mg/kg zencefil uygulaması ile CD4 ve CD8 ekspresyonlarının kontrol grubu ile eşdeğer olduğu gözlemlendi. Zencefilin diyabetin neden olduğu olumsuz etkileri ortadan kaldırmada etkisi olduğu ve immünomodülatör olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Teşekkür

Doç. Dr. Nilay SEYİDOĞLU'na çalışmanın istatistiksel analizlerine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Etik

Etik Kurul Onayı: Tüm deneyler Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (toplantı no: 09.11.2022/1153).

Hasta Onayı: Hayvanlar üzerinde yapılmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'ndan alınan hibe (hibe numarası: NKUBAP.10.GA.18.147) tarafından mali olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- George B, Cebioglu M, Yeghiazaryan K. Inadequate diabetic care: global figures cry for preventive measures and personalized treatment. *EPMA J*. 2010;1:13-8.
- Alshathly MR. Efficacy of Ginger (*Zingiber officinale*) in Ameliorating Streptozotocin-Induced Diabetic Liver Injury in Rats: Histological and Biochemical Studies. *J Microsc Ultrastruct*. 2019;7:91-101.
- Said HM, Abdelaziz HO, Abd Elhaliem NG, Mohammed SA. A Comparative Study between Ginger and Echinacea Possible Effect on the Albino Rat Spleen of Experimentally Induced Diabetes. *Egypt J Histol*. 2020;43:763-76.
- Kavazović I, Krapić M, Beumer-Chuwonpad A, Polić B, Turk Wensveen T, Lemmermann NA, et al. Hyperglycemia and Not Hyperinsulinemia Mediates Diabetes-Induced Memory CD8 T-Cell Dysfunction. *Diabetes*. 2022;71:706-21.
- Widyaningsih TD, Martati E, Lukitasari DM. Immunomodulatory effects of black cincau (*Mesona palustris* bl.) Supplement on *Escherichia coli* Strain O157-Infected Mice. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10:326-30.
- Sasmito E, Nunung Y, Soegihardjo CJ. The immunomodulatory mechanism extract of mengkudu (*Morinda Citrifolia*, L.) fruit on mice Balb/C induced by hepatitis b vaccine. *Tradit Med J*. 2008;13:1-8.
- Krifa M, Bouhlel I, Ghedira-Chekir L, Ghedira K. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *J Ethnopharmacol*. 2013;146:243-9.
- Boothapandi M, Ramanibai R. Immunomodulatory activity of *Indigofera tinctoria* leaf extract on in vitro macrophage responses and lymphocyte proliferation. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2016;8:58-63.
- Jafarzadeh A, Nemati M. Therapeutic potentials of ginger for treatment of Multiple sclerosis: A review with emphasis on its immunomodulatory, anti-inflammatory and anti-oxidative properties. *J Neuroimmunol*. 2018;324:54-75.
- Lee S, Khang D, Kim SH. High dispersity of carbon nanotubes diminishes immunotoxicity in spleen. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2697-710.
- Zhao H, Han H, Hou H, Chen J, Lang X, Yue Y, et al. Effect of ginkgo biloba extract on splenic immune function of chronic ulcerative colitis in mice. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10:7611-23.
- Kakoola DN, Lenchik NI, Curcio-Brint A, Gerling IC. Transcriptional profiling of CD4 T-lymphocytes reveals abnormal gene expression in young prediabetic NOD mice. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(Suppl 7):15.
- Arnush M, Scarim AL, Heitmeier MR, Kelly CB, Corbett JA. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol*. 1998;160:2684-91.
- Shanmugam KR, Ramakrishna CH, Mallikarjunaa K, Reddy KS. Protective effect of ginger against alcohol-induced renal damage and antioxidant enzymes in male albino rats. *Indian J Exp Biol*. 2010;48:143-9.
- Francis BT, Sudha S. Histopathological changes on streptozotocin induced diabetic rats following administration of polyherbal extract: A study on pancreas and kidney. *World J Pharm Pharm Sci*. 2016;5:1188-200.
- Crossman G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*. 1937;6:33-8.
- Hashem MM, Abo-El-Sooud K, Abd-Elhakim YM, Badr YA, El-Metwally AE, Bahy-El-Dien A. The long-term oral exposure to titanium dioxide impaired immune functions and triggered cytotoxic and genotoxic impacts in rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2020;60:126473.
- Khayal EE, Alabiad MA, Elkholy MR, Shalaby AM, Nosery Y, El-Sheikh AA. The immune modulatory role of marjoram extract on imidacloprid induced toxic effects in thymus and spleen of adult rats. *Toxicology*. 2022;471:153174.
- Grigore A. Phenolic Compounds – Biological Activity. In: Hernandez MS, Tenango MP (eds). *Plant Phenolic Compounds as Immunomodulatory Agents*. London: Intechopen, 2017.
- Ebaid H, Al-Tamimi J, Metwalli A, Allam A, Zohir K, Ajarem K, et al. Effect of STZ-Induced Diabetes on Spleen of Rats: Improvement by Camel Whey Proteins. *Pakistan J Zool*. 2015;47:1109-16.
- Ozdemir O, Akalin PP, Baspinar N, Hatipoğlu F. Pathological changes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2009;53:783-90.
- Madkor HR, Mansour SW, Ramadan G. Modulatory effects of garlic, ginger, turmeric and their mixture on hyperglycaemia, dyslipidaemia and oxidative stress in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Br J Nutr*. 2011;105:210-7.
- Al-Amin ZM, Thomson M, Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brit J Nutr*. 2006;96:660-6.
- Zhu J, Chen H, Song Z, Wang X, Sun Z. Effects of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on Type 2 Diabetes Mellitus and Components of the Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;5692962.
- Weidner MS, Sigwart K. Investigation of the teratogenic potential of a zingiber officinale extract in the rat. *Reprod Toxicol*. 2001;15:75-80.
- Kumari J, Selvan SR, Becart S, Chattopadhyay S, Dalmo RA. Cell-mediated immunity and vaccines. *J Immunol Res*. 2014;2014:632632.
- Miya A, Nakamura A, Miyoshi H, Takano Y, Sunagoya K, Hayasaka K, et al. Impact of Glucose Loading on Variations in CD4+ and CD8+ T Cells in Japanese Participants with or without Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:81.
- Hedman M, Faresjö M, Axelsson S, Ludvigsson J, Casas R. Impaired CD4+ and CD8+ T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children. *Clin Exp Immunol*. 2008;153:360-8.
- Shieh SJ, Varkey P, Chen PY, Chang SY, Huang LL. Counting CD4(+) and CD8(+) T cells in the spleen: a novel in vivo method for assessing biomaterial immunotoxicity. *Regen Biomater*. 2014;1:11-6.
- Li C, Gao Q, Jiang H, Liu C, Du Y, Li L. Changes of macrophage and CD4+ T cell in inflammatory response in type 1 diabetic mice. *Sci Rep*. 2022;12:14929.
- Jafarzadeh A, Nemati M. Therapeutic potentials of ginger for treatment of Multiple sclerosis: A review with emphasis on its immunomodulatory, anti-inflammatory and anti-oxidative properties. *J Neuroimmunol*. 2018;324:54-75.