



**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA OBEZİTE İLE OLUŞTURULAN HEPATİK
STEATOZİS VE OKSİDATİF STRESE N-ASETİLSİSTEİN VE
FOLİK ASİTİN ETKİLERİ**

Sümevra KAYAN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Önder ÖZTÜRK**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4675-D2-16 proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No:175**

ISPARTA-2018

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/ 07 /2018

- Tez Danışman : Doç. Dr. Önder ÖZTÜRK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göğüs Hast. A.B.D.
- Üye : Prof. Dr. Recep ASLAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Fizyoloji A.B.D.
- Üye : Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Fizyoloji A.B.D.
- Üye : Doç. Dr. Nurhan GÜMRAL
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B.D.
- Üye : Dr. Öğr. Üyesi Dilek BAYRAM
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

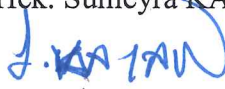
Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Ratlarda Obezite İle Oluşturulan Hepatik Steatozis ve Oksidatif Strese N-Asetilsistein ve Folik Asitin Etkileri” adlı Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Vet. Hek. Sümeyra KAYAN



Danışman

Doç. Dr. Önder ÖZTÜRK





Aileme
Saygılarımla
Isparta, 2018

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda; öncelikle Danışmanım Doç. Dr. Önder Öztürk başta olmak üzere; Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanına, Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nurhan Gümröl, Öğr. Gör. Dr. Rahime Aslankoç'a, tez konumu belirlemedeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ahmet Koyu hocama, jüri ve tez izleme komitesinde destek olan hocalarıma teşekkür ederim.

Araştırma laboratuvarında uzun uğraşlarda destek olan çalışma arkadaşlarım, YL Öğr. Arzu Yalçın, YL. Öğr. Ülker Yağcı'ya teşekkür ederim. İstatistiki değerlendirmelerde destek olan arkadaşlarım, Arş. Gör. Dr. Öznur Sezgin, Arş. Gör. Dr. Hacer Devran, Arş. Gör. Dr. Ayşenur Beyazıt Üçgün'e ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

Her ne olursa olsun yanımda olduklarını bildiğim ailem ve tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Obezite.....	3
2.1.2. Obezitenin Etyolojisi	5
2.1.3. Obezite DNA Hasarı İlişkisi	5
2.2. Karaciğer Anatomisi ve Histopatolojisi	6
2.3. Karaciğer Yağlanması	10
2.3.1. Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hasarı	10
2.3.2. İnsülin Direncinin NAFLD Gelişimine Etkisi	11
2.3.3. NAFLD Fiziopatolojisi: İki vuruşlu (two-hit) alkole bağlı olmayan steatohepatit modeli	14
2.3.4. Alkole Bağlı Olmayan steatoz	15
2.3.5. Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatit	15
2.3.4. Oksidatif Stres	18
2.5. Malon Dialdehit.....	18
2.6. Superoksit Dismutaz.....	19
2.7. Katalaz.....	19
2.8. N-Asetilsistein	19
2.9. Folik Asit	21
2.10. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Deney Grupları ve Obez Yapma Protokolü.....	25
3.1.1. Lee İndeksi.....	25
3.1.2. Materyal Metotta Kullanılan Makine Teçhizat.....	30
3.1.3. Materyal Metotta Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	31
3.1.4. Malondialdehit Tayini	35
3.1.5. Dokuda Protein Tayini.....	35
3.1.6. Katalaz Tayini.....	35
3.1.7. Superoksit Dismutaz Tayini	35
3.2. Biyokimyasal Metod	36
3.3. Comet Assay Metod	36
3.3.1. Comet Assay Değerlendirme	37
3.4. Histokimyasal Metod	39
3.4.1. Doku Örneklerinde Yapılan Histokimyasal Çalışmalar	39
3.5. iNOS İmmunokimyasal Boyama Metodu	41
3.6. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları	44

4.2. Lee İndeks Bulguları	45
4.3. Biyokimyasal Bulgular	48
4.3.1. Aspartat Aminotransferaz, Alanin Amino Transferaz, Total Kolesterol ve Trigliserit Sonuçları	48
4.4. Oksidan-Antioksidan Bulguları	56
4.4.1. Malon dialdehit Bulguları	56
4.4.2. Superoksit dismutaz Bulguları	58
4.4.3. Katalaz Bulguları	60
4.5. Comet Assay Analizi Bulguları	62
4.6. Histokimyasal Bulgular	64
4.7. iNOS Sonuçları	69
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	82
ABSTRACT	85
KAYNAKLAR	87
EKLER	100
ETİK KURUL İZİNİ	100
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFLD	: Alkole bağlı yağlı karaciğer hasarı
ALT	: Alanin aminotransferaz
AU	: Görsel skorlama tekniği
AS	: Alkole bağlı steatoz
ASH	: Alkole bağlı steatohepatit
AST	: Aspartat aminotransferaz
BMI	: Beden kitle indeksi
BDH	: Lityum karbonat
CAT	: Katalaz
CBS	: Sistasyon betasentaz
DCP	: Dikalsiyum fosfat
DAB	: 3-diaminobenzidin kromojen çözeltisi
DDK	: Damar düz kas
DMG	: Dimetilglisin
DMSO	: Dimetil sulfoksit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FFA	: Serbest yağ asidi
GS	: Glutasyon sülfat
GSH-PX	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSH	: Okside glutasyon
HCC	: Hepatosellüler karsinom
HCL	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HFD	: Yüksek yağlı diyet
H-E:	: Hematoksilen-Eozin
HIF1α	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1 α
HO\cdot	: Hidroksil radikali
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
INT	: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)5 fenil tetrazonil klorit
IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LP	: Lipid peroksidasyonu
LVLVD	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
LMA	: Düşük erime noktalı agaroz
MAT	: Metiyonin adenziltransferaz
MDA	: Malon dialdehit
MS	: Metiyonin sentaz

5MTHF	: 5-metiltetrahidrofolat
Mat1a	: Metiyonin adenoziltransferaz
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NAFLD	: Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hasarı
NAS	: Alkole bağlı olmayan steatoz
NASH	: Alkole bağlı olmayan steatohepatit
NMA	: Normal erime noktasına sahip agaroz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
O₂⁻	: Süperoksid anyonu
PABA	: p-aminobenzoik asit
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SAH	: S-adenozilhomosistein
SAHH	: S-adenozilhomosistein hidrolaz
SAM	: S-adenozilmetiyonin
-SH	: Serbest tiyol
SHMT	: Serin hidroksimetiltransferaz
SOD	: Süperoksid dismutaz
TEP	: 1, 1, 3, 3-Tetrathoksiopropan
TG	: Trigliserit
THF	: Tetrahidrofolat
TK	: Total kolesterol
TNF α	: Tümör nekroz faktör -alfa

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Obezite sınıflandırılması	4
Tablo 2. Obezite etyolojisi	5
Tablo 3. Standart ve yüksek yağlı yem içeriği	27
Tablo 4. Lieber DeCarli modeli yüksek yağlı yem içeriği	27
Tablo 5. Kolmogrov-Smirnov test sonuçları	43
Tablo 6. 15 günlük ilk tartım sonuçları	44
Tablo 7. Haftalara göre vücut ağırlığı değişimi	44
Tablo 8. Lee İndeksi hesaplama sonuçları	46
Tablo 9. Tüm grupların Lee İndeksi istatistik analiz sonuçları	47
Tablo 10. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları	48
Tablo 11. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları	50
Tablo 12. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları	52
Tablo 13. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları	54
Tablo 14. Tüm grupların antioksidan sonuçları	56
Tablo 15. Tüm grupların antioksidan sonuçları	58
Tablo 16. Tüm grupların antioksidan sonuçları	60
Tablo 17. Tüm grupların Comet Assay skorları	62
Tablo 18. Tüm grupların pozitif kontrol grubuyla histokimyasal değerlerinin karşılaştırılması	64
Tablo 19. iNOS reaksiyonunun istatistiki sonuçları	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Rat ve insan karaciğer anatomik görünümü .	6
Şekil 2. Karaciğer lobülü ve karaciğer asinüsü	8
Şekil 3. Karaciğerin mikroskopik yapısı	9
Şekil 4. İnsülin direncinin NAFLD gelişimine etkisi	13
Şekil 5. İnsülin direncini oluşturan moleküler nedenler	14
Şekil 6. N-Asetilsistein'in kimyasal formülü	20
Şekil 7. Folat metabolizması	24
Şekil 8. Lee indeksi formülü	25
Şekil 9. Görsel skorlama tekniği ile hücrelerin sınıflandırılması	38
Şekil 10. Vücut ağırlığının 1 -10 haftalar arası değişim grafiği.	45
Şekil 11. Gruplar arası Lee İndeks değerinin ilk ve son vucut ağırlığına göre değişim grafiği.	47
Şekil 12. Tüm deney gruplarının AST karşılaştırması.	48
Şekil 13. Tüm deney gruplarının ALT karşılaştırması.	51
Şekil 14. Tüm deney gruplarının TK karşılaştırması.	53
Şekil 15. Tüm deney gruplarının TG karşılaştırması.	54
Şekil 16. Tüm grupların MDA karşılaştırması	55
Şekil 17. Tüm grupların SOD karşılaştırması.	56
Şekil 18. Tüm grupların CAT karşılaştırması.	57
Şekil 19. Tüm grupların Comet Assay karşılaştırması	64
Şekil 20. Pozitif kontrol grubu karaciğer dokusu.	65
Şekil 21. Folik asit grubu karaciğer dokusu.	66
Şekil 22. N-Asetilsistein grubu karaciğer dokusu.	67
Şekil 23. N-Asetilsistein+folik asit grubu karaciğer dokusu.	68
Şekil 24. Pozitif kontrol grubunda yoğun iNOS pozitif immunoreaksiyon	70
Şekil 25. Pozitif kontrol grubunda damar endotelinde pozitif iNOS immunoreaksiyonu	70
Şekil 26. Folik asit grubunda hepatositlerde azalmış iNOS immunoreaksiyonu, az sayıda pozitif hücre.	71
Şekil 27. Folik asit grubundaki bir ratın safra kanal epitellerinde hafif iNOS pozitif reaksiyon	71
Şekil 28. N-Asetilsistein grubundaki bir ratın safra kanallarında hafif iNOS pozitif immunoreaksiyon.	72

Şekil 29. N-Asetilsistein grubunda negatif iNOS reaksiyonu,	72
Şekil 30. N-Asetilsistein+ folik asit grubundaki bir ratta az sayıda hepatositte çok hafif iNOS pozitif immunoreaksiyon.....	73
Şekil 31. N-Asetilsistein+folik asit grubunda negatif iNOS reaksiyonu,	73



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İntraperitoniyal uygulama.	26
Resim 2. Standart ve yüksek yağlı yemle besleme.	28
Resim 3. Standart ve yüksek yağlı yemle besleme.	28
Resim 4. Yüksek yağlı yem.	29
Resim 5. Sakrifiye edilen ratın karaciğerinin makroskopik görünümü.	29



1. GİRİŞ

Aşırı kilo tarihsel süreç içerisinde tüm toplumlarca zenginlik ve sağlık belirtisi olarak algılansa da günümüz insanının sedanter yaşamı içerisinde enerji alımının fazlalığı ve enerji dengesinin bozulması sonucunda giderek artan prevalansıyla obezite; gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlar arasında sigaradan sonra önlenebilir ölümler arasında ikinci sırada bulunmaktadır (1). Hiç şüphe yok ki obezite tedavisinin en etkin yolu diyet ve spor olarak görülse de obez hastalar yardım almadan günlük yaşam şekillerini ve beslenme alışkanlıklarını değiştirmeden bir takım kimyasal veya bitkisel kaynaklı ürünleri kullanarak zayıflama yolunu seçmektedirler (2).

Kimyasal ve bitkisel ürünlerin yanında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ve piyasaya sürülen günlük kullanımda görebileceğimiz çeşitli ilaçlar vardır. Obezite için kullanılan ilaçların en yaygın olanları sibutramin ve orlistattır. Sempatik sinir sistemi aktivitesini artırarak, termogenezi uyaran bu ilaçlar etkili gibi görünmesine rağmen kardiyovasküler sistem üzerinde oldukça fazla yan etkisi bulunmaktadır (3). Bu yüzden yan etkisi olabildiğince düşük ve obez hastalar tarafından kolaylıkla kullanabilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Serbest radikaller, hücresel metabolizma sırasında veya ekzojen ajanlarla meydana gelen kimyasal ürünlerdir. Bu ürünler hücrelerde DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girmekte ve sonuçta meydana gelen oksidatif DNA hasarı mutajenite, karsinojenite ve yaşlanmaya yol açmaktadır. Bu hasar mekanizması, karbon merkezli şeker radikallerinin ve OH⁻ (Hidroksit) veya H⁺ (Hidrojen) bağlanmış heterosiklik baz radikallerinin oluşumuna yol açan serbest radikallerin ayrılma ve birleşme tepkimelerinden ibarettir. Bu radikallerin daha fazla tepkimeye girmesi ise çok sayıda hasarlı ürünün oluşmasına yol açar. DNA hasarı olası sonuçlar içinde önemli olduğundan doğru ve kesin ölçümleri yapılması gereklidir (4).

İnsülin direnci obezite ile birlikte ortaya çıkan ve birçok hasarın altında yatan sebebi oluşturan önemli bir fizyolojik tanımdır. Hipertansiyon, ateroskleroz ve yağlı karaciğer insülin direnci sebebiyle oluşan yüksek prevalansa sahip hastalıkların başında gelmektedir. İnsülin direncinin sebep olduğu hastalıklardan biri olan yağlı

karaciğer son yıllarda özellikle Batı toplumunda en sık görülen karaciğer hasarıdır. Genel popülasyonun % 2 ile % 20'sini etkileyen alkole bağlı olmayan steatohepatit Birleşmiş Milletler tarafından en yaygın karaciğer hasarı olarak belirtilmiştir. Alkole bağlı olan ve olmayan (NAFLD) olmak üzere iki tipten oluşur. NAFLD, karaciğere zarar verecek miktarda alkol tüketimi olmayan bireylerde histolojik olarak makroveziküler yağlanmanın baskın olduğu geniş bir tabloyu içerir.

Obez hastalar üzerinde yapılan birçok çalışmada vücutta oksidatif stres belirteçlerinin yükselmesiyle birlikte antioksidan savunma enzimlerinde azalma olduğu gösterilmiştir (5). Bu sebeple obezitenin vücutta kronik enflamasyon ve oksidatif stres oluşturduğu belirtilmektedir. Günümüzde antioksidanlar obezite, kalp-damar rahatsızlıkları ve oksidatif stres ile ilişkili olarak büyük ilgi görmektedir (6,7).

Sağlıklı bireylerde serbest radikal üretimi doğal antioksidan savunma sistemi ile denge içinde tutulmaya çalışılır. Bu dengenin reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminin engellenmesi ve yok edilmesiyle bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. ROT protein, lipid ve DNA gibi biyolojik yapılara da zarar verebilmektedir (8).

Çalışmamızda kullandığımız N-Asetilsistein doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-Asetillenmiş türevine verilen isimdir. N-Asetilsistein sahip olduğu nükleofilik serbest tiyol (-SH) grubu aracılığıyla, oksidan radikallerin elektrofilik grubuyla etkileşime girerek glutatyon (GSH) mekanizması üzerinden direkt antioksidan özellik gösterir (9). Çalışmamızda kullandığımız diğer bir antioksidan olan folik asit folatın vücutta kullanılan aktif halidir. Folat eksikliğinin karaciğer lipid dokusunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Fakat obezite ile folat ve folik asit arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır (10). DNA yapımında kullanılan folik asitin antioksidan özelliği ve lipid metabolizmasındaki işlevi göz önünde bulundurularak N-Asetilsisteinle birlikte yağlı karaciğer ve oksidatif stres üzerine olan etkilerini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite

Obezite net bir tedavi ya da korunma yaklaşımı olmayan yirminci yüzyıl itibariyle günümüzün epidemik bir hasarı olarak kabul edilmektedir. İç hastalıklarından kardiyolojiye, gastroenterolojiden ortopediye birçok farklı daldan çok çeşitli uzmanların üzerinde çalıştığı obezite günümüzde prevalansı en hızlı artan önlenebilir ölümlerin başında gelmektedir. Genel anlamda enerji dengesinin bozulmasıyla yağ dokusu artışı olarak tanımlanabilecek olan obezite, en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilmektedir. Yirmi birinci yüzyılda elde edilen veriler, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, obezite prevalansının çok tehlikeli boyutta arttığını göstermektedir. Günümüzde obezite, beslenme yetersizliği ve infeksiyon hastalıkları gibi klasik halk sağlığı sorunlarının yanı sıra önemli bir halk sorunu haline gelmiştir (11).

Obezite davranış, genetik ve çevre gibi birçok faktörün etkisiyle epidemik olan bir sorundur. Obezite genetiğinde 600'ün üzerinde genin etyolojide rol oynadığı bazı genlerdeki mutasyonların obeziteye yol açtığı gösterilmiştir. Bilimsel araştırmalar Praderwill ve Bardet-Biedl Sendromu gibi hastalıkların obeziteyle direkt ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (11-13).

Obezitenin tanımı olabilecek yağ doku artışı vücutta pek çok işleve katılan ve insülin duyarlılığının artmasını sağlayan adiponektinler nedeniyle olur. Obez bireylerde adiponektin hormonunun azalması insülin duyarlılığıyla direkt ilişkilendirilmiş, azalması durumunda insülin direnci olduğu belirtilmiştir (14).

Insülin direncini de içinde bulunduran bir tablo çizen metabolik sendrom obeziteye merkez oluşturur. Artan oksidatif stresle birlikte oldukça etkili bir patolojik mekanizmanın basamaklarını teşkil eder (15).

Yükselen oksidatif stresin metabolik sendromla ilişkili obezitede yağ doku artışının önemli bir belirteci olduğu gösterilmiş, diğer yandan redox potansiyelinin kullanışlı bir ajan olabileceği belirtilmiştir.

İnsanlarda obezite hasarı beden kitle indeksiyle (BMI) belirlenebilmektedir. BMI = Ağırlık (kg) / boy (m²) formülü ile hesaplanır. BMI'ye göre vücut kilosunun boy ölçüsüne oranı 30 kg/m²'den yüksek olması erişkinlerde obez olarak kabul edilmektedir. Quetelet tarafından 1835 yılında tanımlanan BMI'nin bir asırdan fazla süredir kullanılmakta olduğu ve direkt dansitometreyle ölçülmüş vücut yağı miktarıyla korelasyonunun olduğu gösterilmiştir (16,17). BMI'den vücut yağı ölçülebilmektedir.

$$\text{Vücut yağı \% (erkekler)} = [1.33 \times \text{BMI (kg/m}^2\text{)}] + [0.236 \times \text{Yaş (yıl)}] - 20.2$$

$$\text{Vücut yağı \% (kadınlar)} = [1.21 \times \text{BMI (kg/m}^2\text{)}] + [0.262 \times \text{Yaş (yıl)}] - 6.7$$

Hafif ve orta şiddetli şişmanlık ile sağlık sorunları arasındaki ilişkiler tartışılmalı olmasına rağmen şiddetli veya morbid obezite ile mortalite arasındaki ilişki kesindir. BMI ile birçok hastalığın risk faktörü açısından ilişkisi belirlenir. Dünya sağlık örgütüne göre obezite sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir (18).

Tablo 1. Obezite sınıflandırılması (18).

Beden kitle indeksi(kg/m ²)	Temel kesişim noktaları	
	Temel kesişim noktaları	Geliştirilmiş kesişim noktaları
Zayıf (düşük ağırlıklı)	<18.50	<18.50
Aşırı düzeyde zayıflık	<16.00	<16.00
Orta derece zayıflık	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
Hafif düzeyde zayıflık	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49
Normal ağırlık	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99 23.00 - 24.99
Orta kilolu	≥25.00	≥25.00
Obez öncesi	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49 27.50 - 29.99
Obez	≥30.00	≥30.00
Obez sınıf I	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49 32.50 - 34.99
Obez sınıf II	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49 37.50 - 39.99
Obez sınıf III	≥40.00	≥40.00

Fizyolojik anlamda insana en benzer modelleme ratlarda yapılmaktadır (19). Ratlarda obezite tanımı da insanlardakine benzer şekilde yapılmıştır. Uzmanlarca 400 gramın üzeri obez olarak nitelendirilse de bu konuda en net sonuç Lee indeksi ile gösterilmektedir (20,21). Hayvanlarda obez yapma protokolu diyet veya genetik

manipulasyonlarla olmaktadır. Yapılan çalışmalarda yüksek yağlı diyet ve daha az yağlı diyetle beslenen ratlarda obez olma düzeyi daha kısa zamanda ve daha ağır bir yağlanmayla oluştuğu rapor edilmiştir (22).

2.1.1. Obezitenin Etyolojisi

Obezite etyolojisini ana başlıklar halinde Tablo 2'deki gibi gruplandırabiliriz (23,24) :

Tablo 2. Obezitenin etyolojisi (23,24)

Nöroendokrin obezite	Nutrisyonel dengesizlik ve obezite
Hipotalamik sendrom	Yüksek yağlı diyet
Cushing sendromu	Kafeterya diyetleri
Hipotiroidi	
Psödohipoparatiroidi	Fiziksel inaktivite
Postoperatif dönem	Yaşlılık
Hipogonadizm	İş ile ilgili olan
Growt Hormon eksikliği	
İnsulinoma ve hiperinsulinizm	Genetik (Dismorfik) obezite
İlaçlar (psikotropik, kortikosteroid)	Yatrojenik obezite
Leptin yetersizliği veya reseptör defekti	X'e bağlı kromozomal

2.1.2. Obezite DNA Hasarı İlişkisi

Obezite neticesinde ortaya çıkan ROT günümüzde DNA hasarı da başta olmak üzere pek çok hasarın sebebi olarak gösterilmektedir. DNA hasarı genetik materyalde tüm endojen ve eksojen etkilerle meydana gelen değişiklikler olarak ifade edilmekte ve pek çok yöntemle ölçülebilmektedir (25).

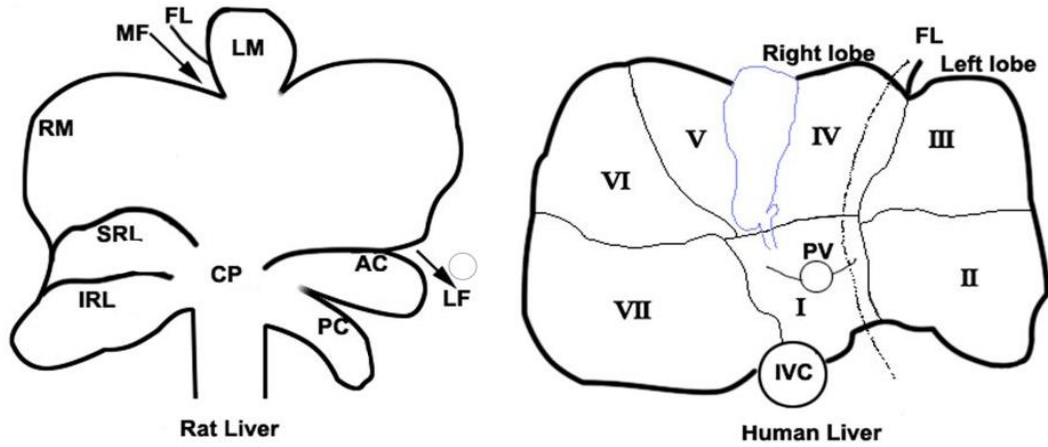
Uzun süreli obezitenin DNA üzerine olan etkileri uzun yıllardır incelenmektedir. Günümüzde DNA kırıklarının kanserin başlangıcını teşkil ettiği ve

hiperglisemi, hipertansiyon ve obezitenin eşlik ettiği metabolik sendromun DNA hasarına yol açtığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (26,27) .

Yüksek tansiyon ve hipergliseminin ROT'la DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir (27). Kadın ve erkeklerin BMI, düşük yopunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol, Alanin Amino Transferaz (ALT), Malondialdehit (MDA) ve total kolesterol(TK), total antioksidanların karşılaştırıldığı bir çalışmada DNA hasarıyla obezite arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir (26).

2.2. Karaciğer Anatomisi ve Histopatolojisi

Karaciğer karın boşluğunun sağ üst ve orta bölümünü dolduran vücudunun en büyük organıdır. Diyaframın hemen altında ve ağırlığı 1500 gr kadardır. Diyafram ile komşu olan yüzü konveks olup facies diaphragmatica ismiyle bilinir. Konkav olan yüz karın organları ile komşudur. Bu yüz facies visceralis olarak adlandırılır. Bazı organların (örn; mide) izleri burda görülür (28). Ligamentum falciforme adı verilen bir yapıyla karaciğer lobus dexter ve sinistere ayrılmıştır. Bu yapı karaciğeri örten periton yaprağının organın büyük kısmını sardıktan sonra kuvvetli bir bağ meydana getirmesiyle oluşmuştur (29).



Şekil 1. Rat ve insan karaciğerinin anatomik görünümü (30)

Karaciğerin alt yüzünde vena porta (v.porta), vena hepatica (v. hepatica), ductus hepaticus, sinirler ve lenf damarlarının girip çıktığı porta hepatis isimli derin bir yarık bulunur. Bunların yanı sıra karaciğerin alt yüzünde safra kesesi ve vena

cava inferiorde kendilerine ait girintilerde bulunur. Karaciğer safra yapımından sorumludur. Safra sağ ve sol karaciğer loblarından gelen ductus hepaticus dexter ve sinister karaciğer kapısında birleşerek *ductus hepaticus communisi* oluşturarak safranın karaciğerden dışarı çıkmasını sağlarlar. Karaciğerin kan damarları ise arteria hepatica(a.hepatica) ve v.porta'dır, a. hepatica sistemik dolaşımdan oksijence zengin kan taşır v. porta ise mide, ince ve kalın barsak, pankreas ve dalaktan gelen kanı karaciğere taşır. Özellikle barsak duvarından gelen kan gıda maddelerinden zengindir (31).

Karaciğerin fibröz bağ dokusundan yapılmış *Glisson köprüsü* adındaki zar bezin içindeki lob ve lobüller arasına sokularak giren çıkan damar ve safra yollarını takip eder.

Lobüller bağ dokusundan yapılmış ince bölmelerle birbirlerinden ayrılmıştır. Birkaç lobül köşesinin bir araya geldiği yerlerde bu bölmeler genişleyerek üçdört köşeli benzeyen aralıklar (*spatia interlobularia*) meydana getirirler. Burda da v.porta, a. hepatica, safra kanalığı ve lenf damarı bulunur (32).

Köşelerinde portal alanların, merkezinde santral venin bulunduğu poligonal ünitelere *Karaciğer Lobül* denmektedir.

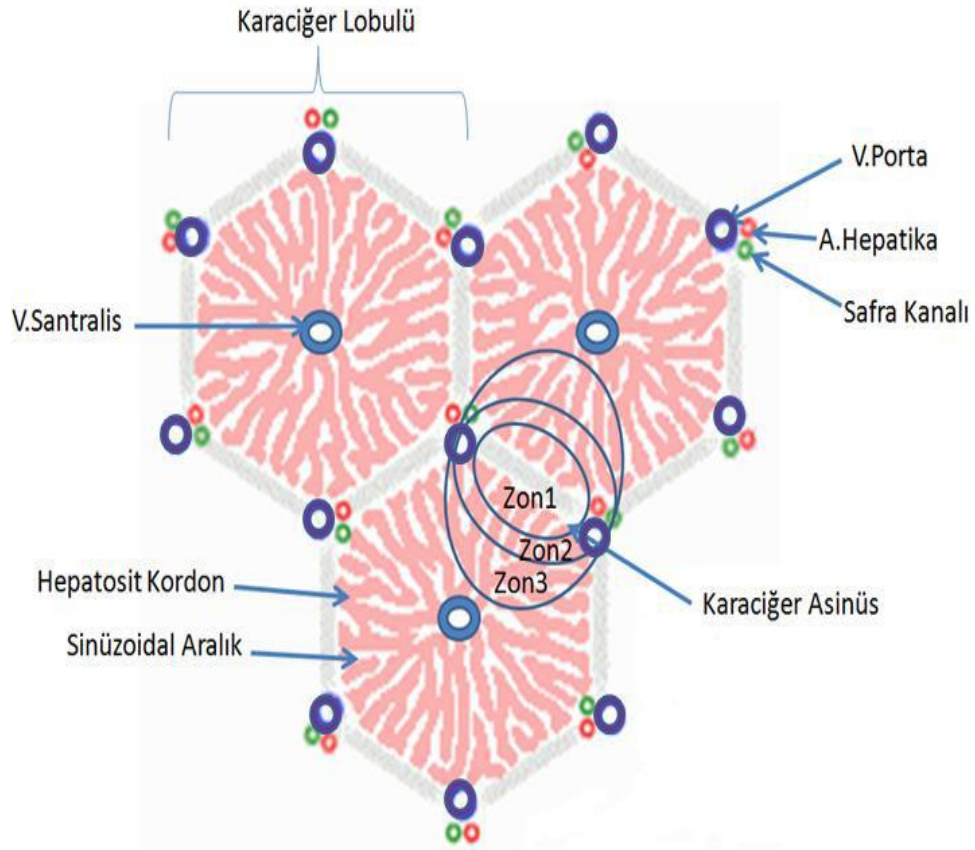
Karaciğer parankimini oluşturan hepatositler, biri diğerinin üzerinde olacak şekilde kordonlar yaparak bir portal mesafeden bir santral vene doğru uzanır. Bu kordonların arasındaki mesafelere *sinüzoid* denilir. Portal alan ile komşu santral ven arasında kalan üçgen şeklindeki alanlara karaciğer asinüsü denir. Karaciğer lobülleri karaciğerin yapısal ve fonksiyonel üniteleridir. Her bir lobül altı adet portal traktüs tarafından çevrilmiştir. Merkezinde hepatik venin terminal uzantısı olan ince dal şeklinde sentrolobüler ven izlenir. Portal ven portal trakt içerisinde ve bitişiğindeki portal trakta dallanarak yayılır. Lobülün merkezine doğru sinüzoidlerle kan drenajını sağlar (32).

Karaciğer parankim hücreleri (hepatositler) poligonal olup, merkezinde santral yerleşimli nükleusları bulunur. Sinüzoidal hücrelerle hepatositler arasında *disse* mesafesi denilen özel bir alan bulunur. Sinüzoidler çevresinde Fenestratalı endotelial hücreler vardır. Kupffer hücreleri mononükleer fagositer sistem

elemanlarıdır ve sinüzoidlerin luminal yüzünde bulunurlar. Hepatik yıldız hücreler de perisinüzoidal peristik hücreler olup disse mesafesinde konumlanırlar.

Asinüslere arteryel ve venöz kan portal alandan birlikte girer (Zon 1) ve terminal hepatik venüle (Zon 3) ilerlerler. Arada kalan hepatositler de Zon 2'yi oluştururlar. Fizyolojik ünite olarak asinüsleri incelemek lobülleri incelemekten daha faydalıdır, asiner yapıyla birçok vasküler ve biliyer hasarın morfolojisi açıklanabilmektedir.

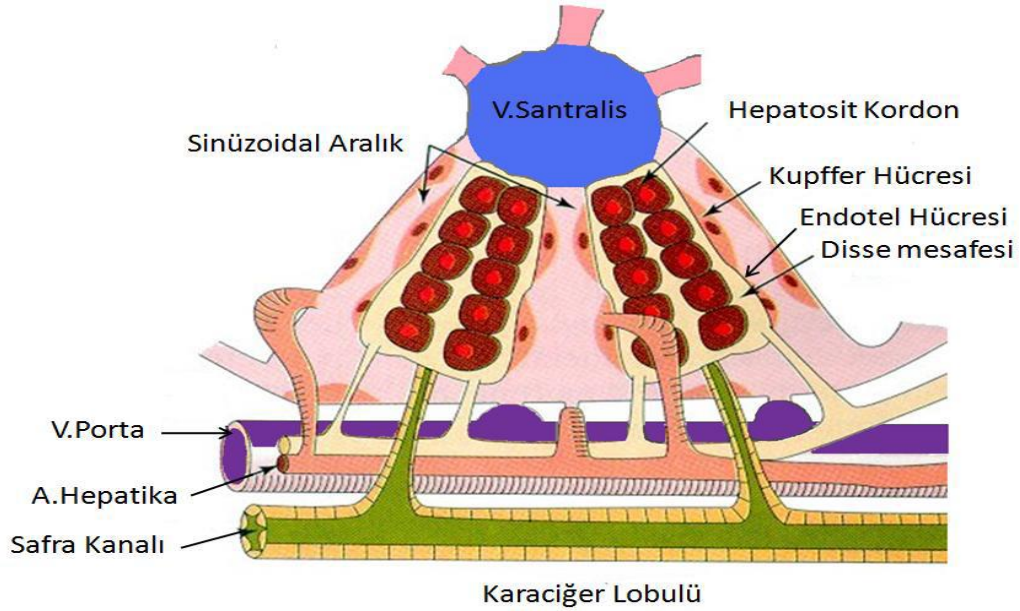
Portal alana yakın olan hücreler (Zon 1) iyi oksijenlenir santral vene yakın olan (Zon 3) ise en az oksijen alan ve zararlı etkenlere en duyarlı olan bölgedir (32).



Şekil 2. Karaciğer lobülü ve karaciğer asinüsü (32)

En küçük safra sekresyon aygıtı olan *safra kanilkülleri* periportal alanlarda bulunan safra duktuluslarına açılıp karaciğer hacminin % 5-10'unu oluştururlar.

Safra akımı kabaca kan akımının tersi yolu izler ve (Zon 3'ten Zon 1'e doğru) karaciğer parankimini portal alanlardaki interlobüler safra kanallarından terk eder. İnterlobüler safra kanalları septal safra kanallarına açılırlar. Bu kanallar da segmenter safra kanallarına açılırlar (33).



Şekil 3. Karaciğerin mikroskopik yapısı (33)

Sinüzoidal hücreler denilince endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve Pit hücreleri (karaciğer ile ilişkili lenfositler) akla gelir. Pit hücreleri doğal ve lenfokin ile aktive edilmiş katil hücre aktivitesi gösterirler. Endotel hücreler sinüzoidleri disse aralığından ayırır ve aralarında geniş porları olan, bazal membran ve intersellüler birleşmeler içermezler. Disse aralığında ise *perisinüzoidal hücreler* yer alır. Normal ve hasarlı karaciğerde ekstrasellüler matriksin başlıca kaynağıdır (34). Kupffer hücreleri, mononükleer fagositer sistemin başlıca hücreleridir. En önemli fonksiyonları partiküllerin, immün komplekslerin, lezyonlu eritrositlerin ve endotoksinlerin klirensini oluşturmaktır. Ayrıca mediatör salgırlar. Bunlardan bazıları interlökin 1, interlökin 6, tümör nekroz faktör α (TNF- α), interferonlar ve eikosanoidlerdir. Bu mediatörler karaciğerde oluşan hasarı gösteren belirteçlerdir.

Rat karaciğerinin de insan karaciğerine benzer anatomik ve fizyolojik fonksiyonları vardır. Rat karaciğerinin insan karaciğeriyle aynı sayıda loba sahip

olması ve insan karaciğerine yakın parametreleri bulunması bu hayvanların deney modellerinde en sık kullanılan çeşit olmasına sebep olmaktadır (35) .

2.3. Karaciğer Yağlanması

Günümüzde obezite, oksidatif stres, metabolik sendrom gibi patolojilerin sonucu olarak oluşabilen karaciğer yağlanması ilk kez 1850’li yıllarda Viyanalı patolog Karl F. Rokitsky tarafından tarif edilmiştir. Histopatolojik olarak hepatositlerin % 5’den fazlasında yağ vakuollerinin oluşumu veya lipid miktarının karaciğer ağırlığının % 5’inden daha fazla olması şeklinde tanımlanmaktadır (36).

Steatohepatit oluş şekline göre; alkole bağlı olan ve alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması şeklinde sınıflandırılır. Klinik tablo gelişimine göre akut veya kronik histopatolojik bulgulara göre ise mikroveziküler yağlanma, makroveziküler yağlanma ve mikst tipte yağlanma şeklinde görülebilir. Alkole bağlı karaciğer yağlanması; alkole bağlı steatoz (AS), alkole bağlı steatohepatit (ASH), alkole bağlı siroz olmak üzere kendi içinde üç alt gruba ayrılır. Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması da kendi içinde alkole bağlı olmayan steatoz (NAS), alkole bağlı olmayan steatohepatit (NASH) ve alkole bağlı olmayan siroz olmak üzere üç alt gruba ayrılır (36,37).

2.3.1. Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hasarı

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer (NAFLD) siroza kadar gelişim gösterebilen ve her geçen gün daha da önemli olan klinik ve patolojik bir durumdur. Patolojik özellikleri alkole bağlı olan karaciğer hasarına benzer olsa da, özellikle alkol kullanmadıklarını ifade eden bireylerde görülmektedir.

Alkole bağlı yağlı karaciğerin histolojik özelliklerini gösteren NAFLD, günlük 20-30 gr alkol alındığı ya da hiç alınmadığı durumlarda da görülebilir (38). NAFLD terimi basit steatozdan steatohepatite, ileri fibröze ve siroza kadar geniş bir karaciğer hasarı spektrumuna karşılık kullanılmaktadır (39).

NAFLD obezite, hiperlipidemi, diyabet ve insülin direnci gibi metabolik sendrom unsurlarına eklenebildiği için önemli bir durumdur (39). Bu hastaların % 90’ı metabolik sendrom kriterlerinden en az birisini taşımaktadır (40). NAFLD

değişmekle birlikte genelde bir ülkenin populasyonun yaklaşık % 10–24'lük kesiminden sorumludur. Batı ve Asya ülkelerinin kıyaslandığı bir çalışmada NAFLD oranının Batı toplumunda % 20-30, Asya da ise Batı'ya nazaran daha düşük % 5-20 civarında olduğu belirtilmiştir. Buna rağmen Batı tarzı beslenmeyle Asya ülkelerinde de oldukça hızlı bir şekilde yükselmektedir. Prevelansı obeziteyle 4-6 kat artarak % 57,5 - % 74'e kadar çıkabilmektedir (41).

Obezite derecesiyle NAFLD prevalansı ve ciddiyeti arasında doğru orantılı bir ilişki her zaman mevcuttur (42).

NAFLD'de en sık rastlanılan laboratuvar bulgusu hafif ya da orta derecede aminotransferaz yüksekliğidir. Aspartat amino transferaz (AST) / Alanin amino transferaz (ALT) oranı NAFLD ile alkole bağlı karaciğerin ayırıcı tanısında yardımcı olur. Birçok NAFLD olgusunda AST /ALT oranı birden küçüktür ancak bu oran karaciğer hasarı siroza ilerledikçe yükselir ve NAFLD'nin sirotik dönemde teşhisi açısından kabul edilebilirliğini kaybeder. NAFLD; NAS, NASH ve siroza kadar geniş spektrumlu bir karaciğer hasarını tanımlamaktadır (43).

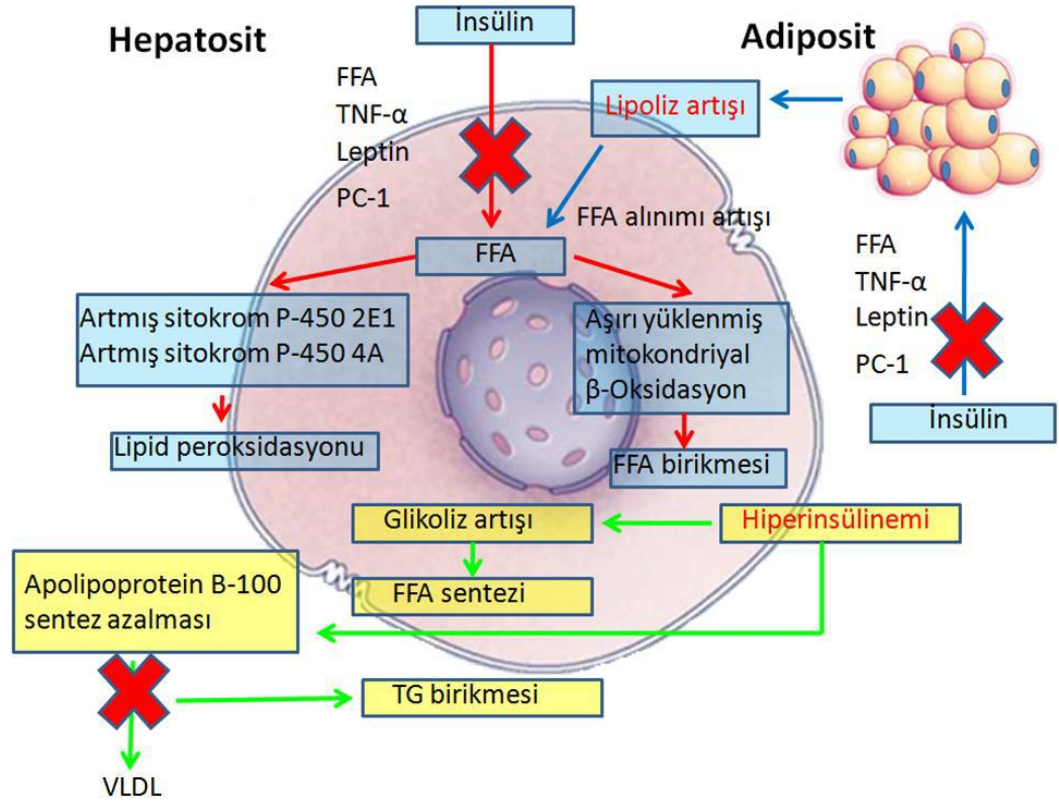
2.3.2. İnsülin Direncinin Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması Gelişimine Etkisi

İnsülin direnci, insülinin vücutta göstermesi gereken etkinliğin azalması olarak tanımlanabilir. Bir konsantrasyonda insülinin glikoz alımını, glikolizi, glikogenezisi, lipogenezisi uyarırken glikoneogenezisi ve lipolizisi inhibe etme etkisinin azalmasıdır. İnsülin direncinde insülinin karaciğer, kas ve yağ dokudaki bu etkilerine karşı direnç oluşarak hepatik glikoz sekresyonu bozulur.

İnsülin aracılı glikoz alımı kas ve yağ dokusunda da azalır. Bunun sonucunda metabolik durumu karşılamak için normal biyolojik yanıtı karşılayacak kadar insülin salgısı artışı olur. Bu da hipergliseminin önlenmesi için beta hücrelerinin sürekli insülin salgısını artırır. Normoglisemi sağlanırken insülin düzeyi arttırılmış olur. İnsülin direncinin hepatositlerde yol açtığı yağ birikimi iki temel mekanizma; artmış lipoliz ve hiperinsülinemiyle açıklanmaktadır. İnsülin direnci sonucu adipozitlerde lipaz enzimi aktive olarak lipoliz oluşmaktadır.

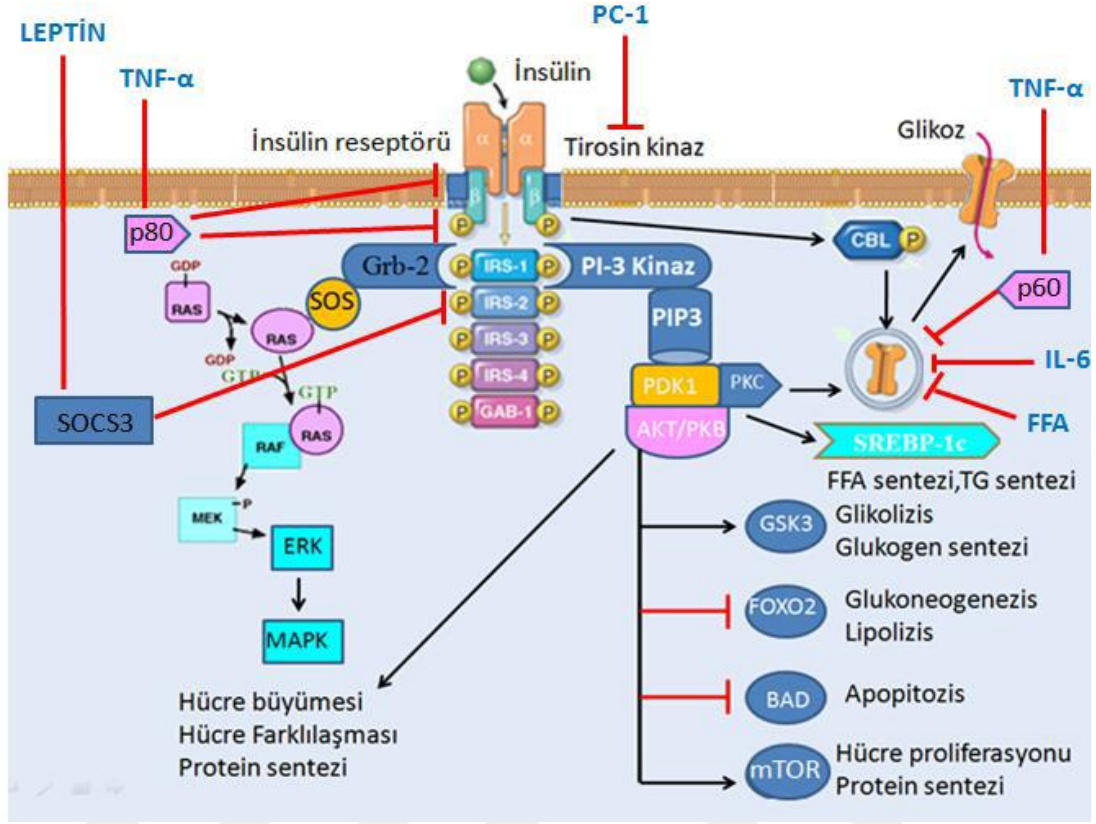
Lipoprotein lipaz trigliserolden lipolizle serbest yağ asidi (FFA) oluşumunu artırır. Yüksek FFA düzeyleri hepatositler tarafından yağ asidi alınımının artmasına, mitokondrial β -oksidasyon yüklenmesine neden olur. Bu da hepatositler içinde yağ asitlerinin birikmesi ile sonlanır. Yüksek FFA düzeyleri mikrozomal lipooksijenazlar olan sitokrom P-450 2E1 ve P-450 4A'nın substratları ve indükleyicileridir (44).

Steatohepatitin geliştiği durumlarda karaciğer sitokrom P-450 2E1 seviyesi mutlaka artar ve hepatosit membranlarında Lipid Peroksidasyonu (LP)'nu indüklemeye yeteneği olan oksijen radikallerinin üretimine neden olur. İnsülinin uyardığı periferik glikoz alımı yüksek FFA düzeyleri tarafından engellenmektedir. Konsantrasyon % 5-6 olduğunda glikojen sentezi azaltılmaya başlanır. Bu şekilde gelen glikoz yağ oluşumu için hazırlanır. Yağ asidi sentezi iki yolla gerçekleşmektedir: Birincisi hiperinsülinemi fosfofruktokinaz-1, glukokinaz, pirüvat kinaz enzimlerini stimüle ederek glikoliz artırılır. Glikoz önce, glikolitik yolla piruvata yıkılır, sonrada piruvat dehidrogenaz enzimi ile asetil-CoA'ya çevrilir. Böylelikle yağ asitlerinin sentez edildiği substrat ortaya çıkmış olur. İkinci yol ise hiperinsülinemi ile aşırı miktarda glukoz enerji için kullanılmakta, fazla miktarda sitrat ve izositrat iyonları ortaya çıkmaktadır. Bu iyonlar yağ asidi sentezinin ilk aşamasında asetil-CoA'yı malonil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli olan asetil-CoA karboksilaz enziminin aktivasyonunda direkt görev alırlar. Hiperinsülinemi, karaciğerde apolipoprotein B-100 ve bununla ilişkili lipoprotein çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) üretimini azaltır. Buna bağlı olarak da hepatositler içinden trigliseritler uzaklaştırılmadığından birikimler oluşur (44).



Şekil 4. İnsülin direncinin NAFLD gelişimine etkisi (44)

İnsülin direncini oluşturan moleküler, çevresel ve genetik nedenler şu şekilde sıralanabilir: Moleküler nedenler: TNF- α , interlökin-6 (IL-6), membran glikoprotein plazma hücre antijen 1 (PC-1) ve leptindir. Yağlı diyet ve sedanter yaşam çevresel insülin reseptörlerinde, insülin reseptör substrat-1 ve glikojen sentaz genlerinde gerçekleşen mutasyonlar ise genetik nedenleri oluşturmaktadır (45).



Şekil 5. İnsülin direncini oluşturan moleküler nedenler (49)

2.3.3. İki Vuruşlu (two-hit) Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatit Modeli

Patogeneizde en çok kullanılan yöntem Day metodudur (46). Buna göre NAFLD gelişiminde ilk etapta hepatositlerde yağlanma oluşur ve yağlı hepatositler hasar yapabilecek diğer etkenlere karşı duyarlı hale gelir. Sonrasında hepatosit hasarı ve enflamasyon sonucunda karaciğerde fibrözis gelişir.

NASH patogenezinde ilk vuruş (Karaciğer yağlanması): Karaciğer yağlanması histopatolojik incelemede hepatositlerin % 5'den fazlasında yağ vakuollerinin görülmesi veya lipid miktarının karaciğer ağırlığının % 5'inden daha fazla olması şeklinde tanımlanmaktadır. Normalde karaciğerdeki lipidlerin % 15'ini oluşturan trigliseritler (TG) yağlanma ile beraber % 50'ye çıkar. Kolesterol, kolesterol esterleri ve fosfolipitlerdeki artış daha geridir (47).

İkinci vuruş: inflamatuvar sitokinler tarafından hazırlanan mitokondriyal bozukluklar ve oksidatif stresin sebep olduğu karaciğer hücrelerinde hasar, enflamasyon ve fibrozis gelişimidir. Bu eski modelin temelinde önümüzdeki yıllarda yeni modeller geliştirilebilir. Buna göre NAFLD patogenezi hepatositlerde yağlanma, hücre içi yağ moleküllerinde artış, mitokondrilerdeki oksidatif strese bağlı endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres ve hepatositlerde hücre ölümüne kadar gidebilmektedir (47).

2.3.4. Alkole Bağlı Olmayan Steatoz

Toplumda sıklıkla görülen karaciğerde iltihabi infiltrasyonun olmadığı uygun diyet ve uygulamaya yanıt veren bir tablodur. İlerleyici olmayan steatoz görülebilir.

Genel popülasyondaki oranı % 20'dir (48). Obezite, hiperlipidemi ve diyabet önemli risk faktörleridir. Karaciğerde ekojenite artışına rağmen fonksiyon testleri normal olabilir.

2.3.5. Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatit

NASH ise nekroinflamatuvar hasarın geliştiği evredir. Karaciğerde yağlanma ile birlikte alkole bağlı karaciğer hasarında olduğu gibi hepatositlerde balonlaşma, iltihabi infiltrasyon ve bazen Mallory cisimcikleri, megamitokondria ve fibrozis gibi bulgular da görülür (49).

Etyopatogenesizinde ise ilk olarak metabolik faktörlere bağlı basit bir yağlanma sonrasında lipit peroksidasyonunun sonucu sitokinler, endotoksinler, mitokondrial değişiklikler, insülin rezistansı gibi faktörlerin etkisi ile steatohepatit geliştiği düşünülmektedir.

NASH sıklıkla hipertansiyon, diyabet, insülin direnci, obezite, karaciğerde demir birikimi gibi fizyopatolojilerle anılmaktadır. Bu sebeple etyolojide NASH kliniğinin sistemik bir hasarın karaciğerle ilgili kısmını oluşturduğu görüşü ve karaciğerde yağlanma ile yola çıkarak, risk ve prognostik faktörler bulunmaya çalışılmıştır (50).

2.3.5.1. Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatit Patogenezi

1980 yılında tanımlanan steatohepatit'in o günden bugüne net bir patogenezi ortaya konulmamıştır. Mekanizma hala araştırıldığı için görüşlerin çoğu varsayımlar üzerinedir. Basit steatoz ve steohepatik siroz gelişiminin neye dayandığı, neden farklılık gösterdiği hala net değildir. Bununla beraber iki aşamalı olarak isimlendirilen teori patogenezi açıklamak için kullanılan en makul teoridir (46,47). NASH en sık obezite ile görülmesine rağmen, diyabet ve hipertansiyon gibi metabolik durumlarla birlikte görülmektedir. Obeziteden sonra ise en çok sebep olan faktör insülin direncidir (51).

2.3.5.2. Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatitis'te Derecelendirme

Karaciğer doku kesitleri Hematoksilen-Eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendiğinde: Hematoksilen genellikle nükleusu mavi-siyah renkte boyayarak intranükleer detayı iyi gösterir. Eosin ise hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar. Aynı kesitler Masson Trikromla'da boyanarak ışık mikroskopunda incelenir. Masson Trikom kollagen lifleri boyayarak fibröz doku artımının değerlendirilmesini sağlar. NASH'te görülen histopatolojik bulgular steatoz, polimorf nüveli lökositlerden oluşan lobüler enflamasyon ve santral ven etrafında görülen perisinüzoidal fibrözür. NASH'te görülen diğer bulgular hepatosellüler balonlaşma, Mallory cisimciği ve nükleusda glikojen birikimidir (52). NAFLD'de histopatolojik bulgular ve sınıflandırmayla ilgili kavramlar üzerinde tartışmalar devam etmektedir. Brunt ve arkadaşlarının önerdikleri Grade ve Stage kriterleri çok kabul görmektedir (53). Buna göre: Steatoz, lobüler enflamasyon ve balonlaşmanın sayısal değerleri toplanarak elde edilen total skorla oluşturulur.

Steatozun derecelendirilmesi:

Derece 1: Hepatositlerin % 33'ünden azı etkilenmiştir.

Derece 2: Hepatositlerin % 33-66'sı etkilenmiştir.

Derece 3: Hepatositlerin % 66'sından fazlası etkilenmiştir.

Steatohepatitin derecelendirilmesi:

- Derece 1: hafif

Steatoz: Daha çok makrovezikuler, lobüllerin % 66'ya varabilen bölümünü etkilemiş

Balonlaşma: Zon 3 hepatositlerde zaman zaman görülür.

Lobüler enflamasyon: Dağınık ve hafif akut enflamasyon (polimorfonükleer hücreler) ve kronik enflamasyon (mononükleer hücreler),

Portal enflamasyon: Yok veya hafiftir.

- Derece 2: orta

Steatoz: Her şiddette olabilir, genellikle karışık makroveziküler ve mikroveziküler

Balonlaşma: Belirgin ve Zon 3'te belirgin.

Lobüler enflamasyon: Balonlaşmış hepatositlerle polimorfonükleer hücreler görülebilir, periselüler fibroz, hafif kronik enflamasyon görülebilir.

Portal enflamasyon: Hafif ile orta şekildedir.

- Derece 3: şiddetli

Steatoz: Tipik olarak lobüllerin % 66'sından fazlasını tutar (pansiner); Yaygın miks steatoz vardır.

Balonlaşma: Baskın olarak Zon 3 belirgindir.

Lobüler enflamasyon: Dağınık akut ve kronik enflamasyon; polimorfonükleer hücreler, Zon 3'te balonlaşma ve fibroz alanlarında yoğunlaşmış olabilir.

Portal enflamasyon: Hafif ile şiddetli şekildedir.

Fibrozun evrelemesi:

Evre 1: Zon 3 perivenüler, perisinüzoidal veya periselüler fibroz; fokal veya yaygındır.

Evre 2: Yukarıdaki gibi, ayrıca fokal veya yaygın periportal fibroz.

Evre 3: Bridging fibroz, fokal veya yaygın.

Evre 4: Siroz.

2.3.4. Oksidatif Stres

ROT vücuttaki moleküler oksijene elektron eklenmesiyle oluşmaktadır (54). Oksijenden oluşan serbest radikaller [süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (HO^{\cdot})] veya metabolitleri [hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloro asit ($HOCl$)] genel olarak serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılır (55). Oksijen radikallerine hem endojen örn: ksantin oksidaz (XO) hem de ekzojen kaynaklar örn: X ışınları, sigara sebep olmaktadır.

O_2^- radikali; hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir. Süper oksit, bir serbest radikal olmakla kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. O_2^- fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

H_2O_2 ; Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksit bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek H_2O_2 'yi meydana getirir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır (56).

Canlı sisteminde biyomoleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından hasara uğratılsa da en çok etkilenen lipidlerdir (57). Lipid peroksidasyon (LP) denilen bu olay direkt olarak membran yapısını indirekt olarak reaktif aldehytlerle hücrenin diğer bileşenlerine zarar verdiği gösterilmiştir. Membran yapısındaki poliansatüre yağ zincirinden bir molekül uzaklaştırılır. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı geçiş metallerinin iyon kataliziyle gerçekleşir. Sonucunda aldehytler oluşur ve hücre yüzeyinde katalizlenen ya da diffüze olarak hücrenin diğer bölümlerine yayılarak hücreye zarar verirler.

2.5. Malonil Dialdehit

Malonil Dialdehit (MDA), enzimatik olmayan oksidatif LP sonucu oluşur. İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoit sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağıdır.

MDA miktarının ölçümü, lipit peroksit düzeyleri tayin eder. LP ürünlerinden MDA, tiobarbitirik asit reaktivitesi yöntemi kullanılarak ölçülür. Ölçülen MDA LP'nin seviyesi ile korelasyon gösterir (58). Son ürün olan MDA stellat hücrelerini etkileyerek kollajen üretirir, fibrogenezisi de artırır (59).

LP sonrasında ortaya çıkan ürünler mtDNA'yı etkiler ve solunum zincirindeki elektron transferinde rol oynayan proteinlerin yapısını bozar. Artan mitokondriyal kökenli ROT ise yağ depolarını oksitleyerek ve LP'yi arttırarak hücreye zarar verir. LP hücre ölümüne ve hepatosit nekrozuna sebep olur. LP ürünleri olan MDA ve 4-hidroksinoneal gibi maddeler otoimmün hepatit ve Mallory cisimciği oluşumuna neden olabilirler (60). Yağlanma ve LP ayrıca glutatyon sulfat (GS) ve vitamin-E gibi antioksidan maddelerin vücutta tüketilerek eksilmesine de neden olabilirler.

2.6. Superoksit Dismutaz

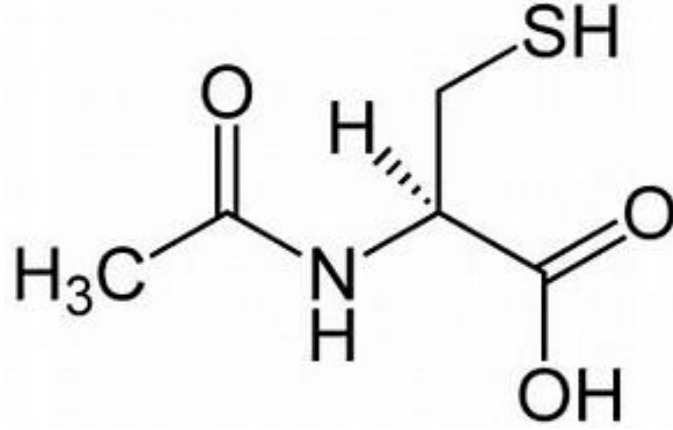
Superoksit dismutaz (SOD) endojen antioksidanlardandır. Dokuda direkt etki ile antioksidan aktivite gösterir. Superoksit ilk olarak süperoksit dismutaz ardından katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-PX) gibi enzimlerle dönüştürülür (61).

2.7. Katalaz

Katalaz (CAT) birinci derece enzimatik endojen antioksidanlardandır. H_2O_2 suya dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir. Dokulardaki CAT aktivitesi büyük oranda değişiklik gösterir. Enzim aktivitesi karaciğer ve böbrek dokularında yüksek düzeyde iken, bağ dokusunda düşüktür. Normalde insan eritrositleri CAT bakımından zengindir (62).

2.8. N-Asetilsistein

L-sisteinin N-asetilenmiş türevi olan N-Asetilsistein mukolitik ajan olmasının yanı sıra sahip olduğu serbest tiyol grubu neticesinde oksidan elektrofilik etkileşimlere girerek, antioksidan özellik göstermesi nedeniyle oldukça sık kullanılan bir antioksidandır. Kimyasal formülü $C_5H_9NO_3S$ olup (Şekil 6), molekül ağırlığı 163,2 gr/mol'dür. Moleküler yapısı hücreye kolayca girebilmesini sağlamaktadır (63). L-sistein bir GSH prekürsörüdür ve GSH sentezini artırır.



Şekil 6. N-Asetil Sistein'nin kimyasal formülü (64)

GSH ise bir tripeptit olmakla ekzojen veya endojen sitotoksik maddelerin ve oksidan radikallerin hücreye zarar vermesini önleyen hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin devamı için çok önemlidir. Bu yüzden N-Asetilsistein hücreleri hasardan koruyacak düzeyde GSH yapımı için birincil derecede önem taşımaktadır (64). N-Asetilsistein fazla yan etkiye neden olmadan GSH depolarını yenileyen bir kimyasaldır. İndirgenmiş GSH okside hale dönüşürken H_2O_2 suya çevirir. Ancak ROT miktarının artması durumunda GSH yetersiz kalır. Oluşan fazla miktardaki okside glutatyonsa (GSSH) hücre hasarından sorumlu tutulan moleküldür. N-Asetilsistein uygulamasının GSH depolarını düzeltmesinin yanı sıra antiinflamatuvar, antioksidan, inotropik ve vazodilatasyon etkileri olduğu, vital organlarda mikrovasküler dolaşımı düzelttiği de bilinmektedir. N-Asetilsisteinin sülfidril grubundan dolayı biyolojik aktivitesi de vardır. Farmakokinetiği mukusun yapısındaki disülfid bağları ile reaksiyona girerek sülfidril-disülfid reaksiyonu gösterir. Kalan miktar karaciğerde sistein olarak tespit edilebilir. Kana geçen asetilsistein karaciğerde metabolize edilir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı % 50'dir. Başlıca akciğer dokusu ve bronşial sekresyon olmak üzere karaciğer ve böbreklere dağılımı iyidir. N-Asetilsistein başlıca böbrekler ve karaciğer yolu ile atılır.

N-Asetilsistein ayrıca, sahip olduğu nükleofilik serbest tiyol (-SH) grubu aracılığıyla oksidan radikallerin elektrofilik grubuyla etkileşime girerek direkt antioksidan özellik gösterir(65).

N-Asetilsistein glutasyon S-transferaz aktivitesi, GSH sentezini ve detoksifikasyonu artırarak işlev görür. Ayrıca N-Asetilsistein çeşitli proeinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre yaşamını uzatarak apoptozisi önleyebilmektedir (66). DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücrel fonksiyonlarında görev alır. N-Asetilsistein sadece bir GSH prekürsörü değildir, ROT'ları direk temizleme kabiliyetine de sahiptir.

N-Asetilsistein kullanımında karaciğerde oksidatif stres durumlarında transplantasyon hasarı, alkolizm, metal toksisitesi ve fibrozda kullanışlı olabilir.

N-Asetilsistein asetaminofen ve alkol toksisitesinde ilk sekiz saat içinde verildiği takdirde karaciğeri hasardan koruyup mortaliteyi azaltabilmektedir. Anti toksisitesindeki muhtemel mekanizmalar karaciğer kan akımını artırması, GSH artışı ve ROT'ları temizlemesi sayılabilir. N-Asetilsistein'in ratlarda toksik kadmiyumla kullanıldığında LP'yi önleyerek karaciğer toksisitesini azaltabilmektedir. Kokain sebebiyle gelişen karaciğer hasarına karşı transplantasyon işlemi yapıldığında reperfüzyonla gelişen oksidan hasar N-Asetilsistein ile anlamlı derecede azaltılabilmektedir (67). N-Asetilsistein'in koruyucu etkisi hakkında üç farklı mekanizma düşünülmektedir:

- 1) N-Asetilsistein'in kendi potansiyel antioksidan etkisi,
- 2) Toksik metabolitlere karşı detoksifiye edici mekanizma için çok önemli olan olan intrasellüler GSH konsantrasyonunun idamesi,
- 3) İntrasellüler sülfidril havuzunun onarımı (68).

2.9. Folik Asit

Pteroik asit ile ilişkili ve birbirine benzer vitamin aktivitesine sahip bileşiklere folat veya folik asit denilmiştir. Doğada folat olarak bulunan folik asit biyolojik formun daha dayanıksız olması dolayısıyla sentetik bir formdur. 1930'larda bira mayası içinde tespit edilmiştir. Gebelerde anemiyi ve diğer defektleri önleyici olarak tanımlanmıştır. Folat suda çözünen bir vitamindir fazlası genellikle idrarla atılır. Folik asit pteridin halkasına p-aminobenzoik asit (PABA) bağlanması sonucu oluşan pteroik aside ilave bir veya daha fazla glutamik asit kalıntısından oluşur. *Pteroilmonoglutamik asit* adıyla da bilinir. Bitki ve bakteriler tarafından

sentezlenebilmektedir. İnsanlarda serum veya diğer vücut sıvılarında çeşitli folik asit şekilleri bulunmasına karşın başlıca bulunan form N5-metil tetrahidrofolat (THF)'tir (69). Memelilerin karaciğerinde, eritrositlerinde, lenfositlerinde ve bitkilerde bulunan poliglutamatlar, folatların % 90'nını oluşturur (70). Folik asit, hücre bölünmesi ve protein sentezi için kritik öneme sahiptir (71,72)

Folik asit ve kobalaminler metabolik açıdan birbirleri ile yakından ilişkilidir (73). Folat koenzimleri tek karbonlu yapıların değişik organik bileşiklere taşınmasında gereklidirler. Tek karbon bileşiklerin kaynağı genellikle glisin, N5-N10 metilen THF oluşturmak üzere THF ile tepkimeye giren serin ve histidin katabolizmasında yer alan N5-formimino THF ve glutamik asit oluşturmak üzere THF'ye formimino grubu veren formiminoglutamik asittir (74). Bu türevler değişik tek karbon yapılar içeren THF türevlerinin oluşturduğu dönüştürülebilir donör havuzuna girişi sağlar. Bu havuzun içerdiği maddeler, tek karbon yapılarını, sonuçta makromolekül sentezinde kullanılan yapım bloklarına dönüşen metabolik ara ürünleri oluşturan bileşikleri verebilmektedir. Bu gruplar metil (-CH₃), metilen (-CH₂-), formimino (-CH=NH), formil (-CH=O) ve metenil (-CH=)'dir (74,75). Aktarılan tek karbonlu birimin kimyasal yapısına bağlı olarak farklı folatlar kullanılır (76,77).

Esansiyel bir vitamin olan folik asitin ihtiyaç olan miktarı besinlerle alınabilmektedir. Tamamına yakını gastrointestinal kanaldan (başlıca ince barsakların proksimal kısmından) emilir ve vücut dokularına dağılır. Diyetle alınan folatların kristalin folik asidinkinin yaklaşık yarısı kadar biyo yararlanıma sahip olduğu bildirilmektedir. Doğal olarak bulunan folat poliglutamatlar bağırsakta büyük oranda dekonjuge edilmekte ve 5-metiltetrahidrofolat (5MTHF) oluşturmak üzere dihidrofolat redüktaz enzimi ile indirgenmektedir. Terapötik olarak verilen folik asit, dihidrofolat redüktazlar tarafından indirgenme açısından zayıf substrat olduğundan, büyük oranda değişmeden portal dolaşıma girmektedir. Folik asit portal dolaşım ile dağılmaktadır. Doğal olarak bulunan folattan türeyen 5MTHF geniş oranda plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Folat başlıca karaciğerde depolanır. Ayrıca, serebrospinal sıvıda da aktif olarak yoğunlaşmıştır. Anne sütüne geçmektedir. Folik asit (askorbik asit mevcudiyetinde), karaciğerde ve plazmada dihidrofolat redüktazla aktif metaboliti haline (tetrahidrofolik asit) dönüşür. Folat için enterohepatik dolaşım söz konusudur. Folik asit hemodiyaliz ile uzaklaştırılmaktadır.

Günlük ihtiyacımız olan folik asit miktarı 400 µ/gün olarak belirlenmiştir. Folat DNA metilasyonu, mutasyonlar ve gen ekspresyonu olaylarına katılmaktadır. Folat metabolizmasında en önemli nokta N5, N10–metilen-tetrahidrofolat basamağıdır. N5, N10–metilen-THF, DNA sentezi için mutlak suretle gereklidir. Kemik iliği hücreleri, kıl folikülleri, barsak mukoza hücreleri ve kanser hücreleri gibi hızlı bölünen hücrelerde önemlidir (78). Ayrıca hamilelik döneminde bebeğin merkezi sinir sistemi gelişiminde oldukça önemli bir role sahiptir.

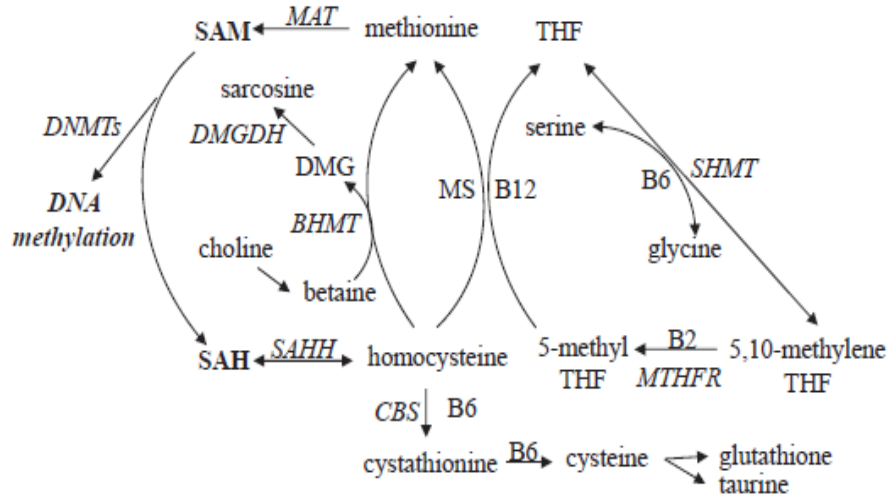
Folik asitin başlıca fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir:

1. Pürin bazlarının sentezi.
2. Timidilat sentezi.
3. Metiyonin sentezi.
4. Serin - Glisin dönüşümü.
5. Bakteri protein sentezinde formil met oluşumu.
6. Histidin metabolizması.

Folat eksikliğinde s-adenosilmetiyonin (SAM), adenosilhomosisteine (SAH) çevrilemez (79). Folat eksikliği ve homosistein metabolizması sıklıkla NAFLD ile ilişkilendirilmiş olup araştırılmaya devam edilmektedir (80).

DNA metilasyonunda kullanılan folik asit eksikliği tek-karbon metabolizmasında metioninin remetilizasyonunda rol oynar (Şekil 7).

SAM üretimindeki eksiklik novo fosfatidil kolin sentezini azaltarak karaciğerde TG birikimine yol açar (81).



Şekil 7. Folat metabolizması (8)

Fosfatidilkolin azalması NAFLD ile ilişkili olan düşük yoğunluklu lipoprotein sekresyonunu azaltır (83).

Methiyonin adenosiltransferaz 1A (Mat1a) eksikliği oluşturulan bir hayvan modelinde hepatik SAM üretiminin azalması, lipogenesisi ve oksidatif stresi artırarak hızlı gelişen karaciğer kanseri oluşumunu artırmıştır (84,85) karaciğer SAM düzeyinin karaciğer yağ metabolizması ve karaciğer kanserleri için kritik bir önemi olduğu bildirilmiştir (86).

2.10. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi L-arginin aminoasidinden nitrik oksit sentezinden sorumludur. Birkaç farklı formu bulunur. Örneğin nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS). Dokular için nitrik oksit (NO) üretimini artıran nitrik oksit sentaz enzimi içermesi hasarlı dokunun belirteci olarak kabul edilen bir göstergedir (87).

NO birçok fizyolojik olayda (kan basıncı düzenlenmesi, yara iyileşmesi ve patofizyolojik olayda diyabet, enflamasyon, siroz) önemli bir rol oynar. Endojen kaynaklı iNOS tarafından üretilen NO reaktif oksijen radikallerinin ve reaktif nitrojen radikallerinin formasyonuna yol açar. Bu oksijenlenme işlemi için NADPH gibi kofaktörler gereklidir. NO proteinlerin nitrasyonuna yol açan superoksit anyonu ve peroksinitrit üretimi tepkimesini hızlandırır (88).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 03.12.2015 tarih ve 21 /10 sayılı karar ile etik kurul izni alındı.

3.1. Deney Grupları ve Obez Yapma Protokolü

3.1.1. Lee İndeksi

Lee indeksi; hayvanların vücut ağırlığı ve naso-anal boyunun esas alındığı, beşeri hekimlikte beden kitle indeksine oldukça benzeyen ve hayvanlarla yapılan obezite çalışmalarında kullanılan bir indekstir.

Lee indeksi deney hayvanlarında obezite tanısı için kullanılmış bilimsel çalışabilirliği kanıtlanmış bir indekstir. Formülün esası kullanılacak deney hayvanının kilosu ve boyunun kıyaslanmasına dayanmaktadır. Lee indeksi= hayvanın kilosu (gr) / boyu (mm) cinsinden ağırlığın küp kökü alınarak uzunluğa bölünür ve 10^4 ile çarpılır. Elde edilen sonucun 300'ün üzerinde bulunup bulunmamasıyla hayvanın obez olup olmaması değerlendirilir. Çıkan rakam 300'ün üzerindeyse hayvan obez olarak nitelendirilirken, 300'ün altı rakamlar obez olarak kabul edilmez. Formül aşağıdada görsel olarak gösterilmiştir (20,21,89).

$$\text{Lee's Index} : \frac{\sqrt[3]{W(\text{gr})}}{L(\text{mm})} \times 10^4$$

Şekil 8. Lee indeksi formülü (20,21)

Obezite ve karaciğer yağlanması yapma üzere (9±11 haftalık 250±30 gr ağırlığında) 35 adet Wistar Albino rat Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 22±0,5°C ve 12:12 saat gündüz gece periyoduyla bakıma alındı.

Hayvanların haftada bir yapılan ağırlık ölçümleriyle birlikte 12 hafta sonunda Lee indeks metodu (20,21,89) ile obez oldukları kesinleştirildi. Obez olan ratlar kuyruklarından numaralandırılarak gruplara ayrıldı.

Gruplar

Folik Asit Grubu (N=8): yüksek yağlı yem + folik asit 10 mg/kg,

N-Asetilsistein Grubu (N=8): yüksek yağlı yem + N-Asetilsistein 100 mg/kg,

N-Asetilsistein+Folik asit Grubu (N=8): yüksek yağlı yem + N-Asetilsistein 100 mg/kg + folik asit 10 mg/kg

Pozitif Kontrol Grubu(PKG) (N=10): yüksek yağlı yemle beslenen hayvanlar şeklinde düzenlendi.

Folik asit 10 mg/kg (90) ve N-Asetilsistein 100 mg/kg (9) her gruba vücut ağırlıkları ile orantılı olacak şekilde intraperitoniyal olarak uygulandı (Resim 1). 28 günlük (4 hafta) uygulamanın ardından ratlar ketamin ve xylazine anestezisi altında sakrifiye edildi. Karaciğer ve kanları alınarak yapılacak işlemler için ayrıldı.



Resim 1. İntraperitonel uygulama

Tablo 3. Standart ve yüksek yağlı yem içeriği

Standart yem içeriği		Yüksek yağlı yem içeriği	
İçerik	%	İçerik	%
Ham yağ	4,90	Kazein	20,3
Ham kül	6,30	Nişasta	2
Ham selüloz	6,71	Selüloz	1
Lisin	1,37	Pelet bağlayıcı	2
Fosfor	0,66	Bitkisel margarin	64,2
Ham protein	24	Sakkaroz	1
Metiyonin	0,46	Kakao yağı	6
Kalsiyum	0,9	Mermer tozu	1,6
Sodyum	0,05	Vitamin premiksi	0,70
		Dikalsiyum fosfat	1,25

Yağlı yem özel olarak Arden Araştırma Deney Laboratuvar Yemleri /Ankara firması tarafından hazırlandı. Yem içeriği Lieber DeCarli modeline göre Tablo 4'e uygun olarak hazırlandı (91). Lieber DeCarli modeline göre hazırlanan yem Resim 4'te gösterilmiştir. Yağlı yeme alışmaları açısından ilk yemleri standart yemle karıştırılarak verildi. Standart Yem Korkuteli Yem Fabrikasından alındı. Standart yem ve yüksek yağlı yem içeriği Tablo 4'te gösterilmiştir. Standart ve yüksek yağlı yemle beslenen hayvanlar Resim 2 ve 3'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Lieber DeCarli modeli yüksek yağlı yem içeriği

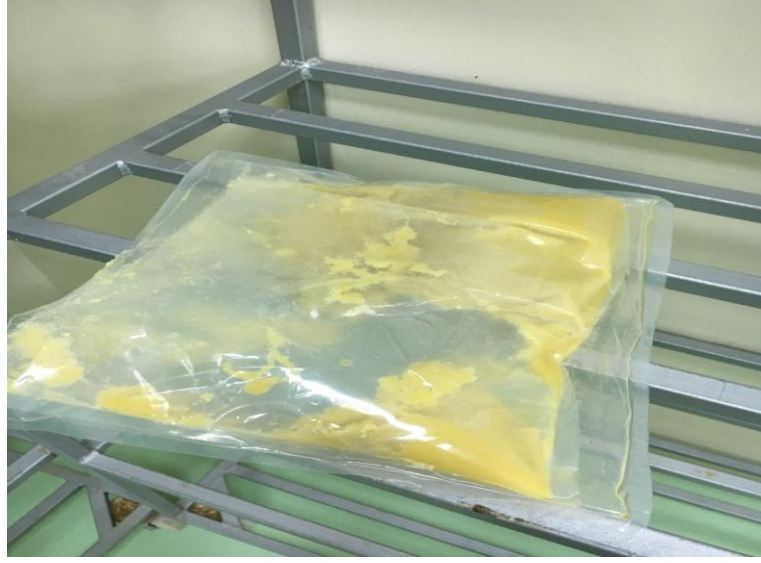
İçerik	Standart diyet (g/L)	Yüksek yağlı diyet (g/L)
Kazein	41,4	41,4
L-Sistein	0,5	0,5
DL- Metionin	0,3	0,3
Mısır Yağı	8,5	48,5
Zeytin Yağı	28,4	28,4
Aspur Yağı	2,7	2,7
Dekstrin Maltozu	115,2	25,6
Kolin Bitartat	0,53	0,53
Lif	10,0	10,0
Ksantan Sakız	3,0	3,0



Resim 2. Standart ve yüksek yağlı yemle besleme.

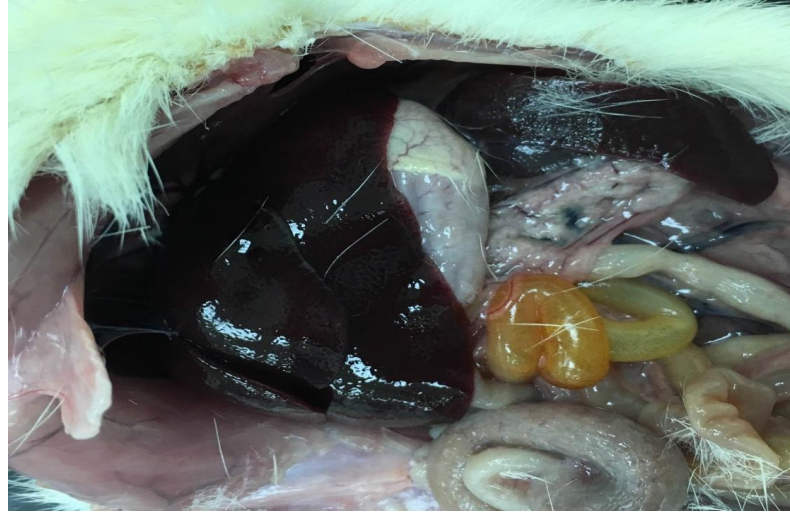


Resim 3. Standart ve yüksek yağlı yemle besleme.



Resim 4. Yüksek yağlı yem.

35 adet hayvan toplamda 3 kafese bölünerek besleme periyoduna alındı. Lieber DeCarli (91) metoduna göre 4 hafta sonunda yağlanma olup olmadığını belirlemek için alınan iki rattan ortalama ağırlıktaki bir rat besleme periyodunun ardından sakrifiye edildi. Histolojik ve makroskopik inceleme yapıldı. Makroskopik olarak hayvanın karaciğeri Resim 5’te gösterilmiştir.



Resim 5. Sakrifiye edilen ratın karaciğेरinin makroskopik görünümü.

Histolojik incelemede karaciğेर yağlanması saptanamadığı için besleme periyoduna devam edildi.

12 hafta boyunca yüksek yağlı yemle beslenen ratların Lee indeksine göre boy uzunlukları alınarak gram ağırlıklarına oranıyla obez olup olmadıkları Excel programında hesaplandı (20,21) ve tüm hayvanların obez olduğu saptandı. Obez olan hayvanlara N-Asetilsistein ve folik asit uygulaması başlandı.

3.1.2. Materyal Metotta Kullanılan Makine Teçhizat

- Velp Scientifica ZX 3 vorteks cihazı (İtalya)
- İsolab ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Türkiye)
- Shimadzu AY220 hassas terazi (Japan)
- BM402 nüve marka su banyosu (Türkiye)
- Shimadzu UV-1601 shimadzu spektrofotometre (Japan)
- Hanna Instruments pH 301 pH metre cihazı (ABD)
- Nüve NF 800 R soğutmalı mikro santrifuj (Türkiye)
- Hettich Rotina 35 R marka makro santrifuj (Almanya)
- İka ultra turrax t25 doku parçalayıcı (Almanya)
- Bandelin HD2070 sonikatör (Almanya)
- Bosch -20 °C derin dondurucu (Almanya)
- Olympus BX 50 floresan mikroskobu (Japan)
- Elektroforez cihazı yatay: Cleaver scientific CSL-COM40 (UK)
- Abbott clinical chemistry (ABD)
- Floresan mikroskop: Olympus BM50 floresan mikroskop (Japan)
- Benmari: Nüve TGR667 (Türkiye)
- Soğutmalı mikro santrifuj: Nüve MR5415 (Türkiye)
- Hassas terazi: Shimadzu SPB 33 (Japan)

- Vorteks: Iso Lab NM 100 (Almanya)
- pH metre: Iso Lab NY78 (Almanya)
- Otomatik pipetler: Brand Iso Lab (Almanya)
- Manyetik karıştırıcı: Iso Lab ngg660 (Almanya)
- Elektroforez güç kaynağı: Cleaver scientific Omnipac mid Cs300V (İngiltere)
- Spektrofotometre: Shimadzu U5800 (Japan)
- Kristal spektro küveti: Iso Lab (Almanya)
- Mikrodalga fırın: Beko GFG778 (Türkiye)
- Soğutmalı santrifuj: Hettich numarası MR5415 (Almanya)
- Hassas terazi Shimadzu AX200 (Japan)
- Su banyosu termal laboratuvar aletleri 820-3 (Türkiye)
- Kızaklı mikrotom Leica SM2000R (Almanya)
- Binoküler mikroskop Olympus CX21FS (Japan)
- Etüv Heraeus D63450 (Almanya)

3.1.3. Materyal Metotta Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Lizis solüsyonu (500 ml stok solüsyon) Comet Assay için
- 2,5 M NaCl Comet Assay için
- 100 mM EDTA Comet Assay için
- 10 mM trizma base tartılıp distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
- 100 ml çalışma solüsyonu:

- % 1 Triton X-100 1ml Comet Assay için
- % 10 DMSO 10 ml Comet Assay için

Analiz için malzemeler balon jofeye alındı. Üzeri stok solüsyon ile 100 ml'ye tamamlandı. +4 derecede soğutuldu. Bahsedilen solüsyon her çalışmadan önce taze olarak hazırlandı.

- Alkali elektroforez tamponu (300 mM NaOH/1mM EDTA)
- 500 ml elektroforez tamponu:
 - ✓ 300 mM NaOH 1 mM Na² EDTA karıştırıldı. Distile su ile hacim 500 ml'ye tamamlandı. pH > 13 olmasına dikkat edildi ve soğuk kullanıldı.
- Nötralizasyon tamponu
- 100 ml Nötralizasyon tamponu:
 - ✓ 400 mM Tris HCL'in distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı. pH HCl ile 7,4'e ayarlandı.
- Boyama solüsyonu:
 - ✓ Stok etidyum bromür; 10 mg etidyum bromür 50 ml distile suda eritildi. Seyreltik etidyum bromür; stok boyama solüsyonundan 100 µl alınarak distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Ependorflara porsiyonlanıp çalışma esnasında preparatlara uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirildi.
- STOK fosfat buffer tampon solüsyon (PBS) (1 litre):
- Na²HPO⁴ Comet Assay için
- KCl Comet Assay için
- KH²PO⁴ Comet Assay için

- NaCl Comet Assay için
- Tris HCl Comet Assay için
- Stok PBS için uygun oranlarda karıştırılıp hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı. 10 kat dilüe edilerek kullanılmıştır.
- Lamların Hazırlanması

Lamlar sıcak zeminde ısıtıldı ve sıcak kalması sağlandı.

- 50 mg (0,05 gr) normal erime noktasına sahip agaroz (NMA) + 5 ml 1/10 dilüe edilmiş PBS de eritilir. Kabarcık kalmayıncaya kadar kaynatıldı ve 60 °C suda bekletildi.
- NMA'dan her bir lama 100 µl dökülerek lama froti şeklinde yayıldı ve donması için soğuk yüzeyde bekletildi.

NMA:

- % 1,5 NMA (75 mg NMA, 5 ml 10X PBS içinde)

Düşük erime noktalı agoroz (LMA) Comet Assay için

- % 0,75 LMA (37,5 mg LMA, 5ml 10X PBS içinde)
- Kat: % 1,5 NMA
- Kat: 75 µl hücre + LMA karışımı
- Kat: 75 µl LMA
- PBS pH 7,5 olmalı
- Hücreler mutlaka 1X PBS ile yıkanmalı, aksi takdirde hücrelerde kalan protein ve serum agarozun düşmesine neden olabilir.
- LMA ve hücre oranı ayarlandı ve 15 µl hücre, 100 µl LMA ile karıştırıldı.

- LMA'nın donduğundan emin olundu.
- Hazırlık aşamasında nemli kutular kullanıldı.
- Lizis solüsyonu mutlaka buz soğukluğundaydı. Lizis için yaklaşık 1 saat +4 °C'de bekletildi.
- Ksilen, Merck histokimyasal boyama için
- Parafin, lityum karbonat (BDH) histokimyasal boyama için
- Etanol, Carloerba histokimyasal boyama için
- Formaldehit, Roth histokimyasal boyama için
- Hematoksilen boyası, Degommier decolorizer (DDK) histokimyasal boyama için
- Eozin boyası, DDK histokimyasal boyama için
- Asetik asit, Fluka histokimyasal boyama için
- Primer ve sekonder antikorlar Abcam iNOS immunkimyasal boyama için
- Anti-iNOS antibody (ab15323), 1/100 dilüsyon iNOS immunkimyasal boyama için
- PBS iNOS immunkimyasal boyama için
- Metanol hidrojen peroksit iNOS immunkimyasal boyama için
- Sitrat buffer solüsyon iNOS immunkimyasal boyama için
- Biotin iNOS immunkimyasal boyama için
- Streptoavidin iNOS immunkimyasal boyama için
- (3,3'diaminobenzidine) DAB Kromojen iNOS immunkimyasal boyama için

- Harris hematoksilen iNOS immunkimyasal boyama için

3.1.4. Malondialdehit Tayini

LP ürünlerinden olan MDA ölçümü için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı (92). Bu yöntem, MDA ile thiobarbitürik asit reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumunun spektrofotometrik ölçümle değerlendirilmesinden oluşur. MDA-thiobarbitürik asit kompleksinin emilim katsayısı ile hesaplanarak ve sonuç proteinin miligramındaki nanomol olarak ifade edildi.

3.1.5. Dokuda Protein Tayini

Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında mikroprotein düzeyleri Bradford Yöntemi ile manuel spektrofotometre ile ölçüldü (93). Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşan renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansı ölçülerek değerlendirildi.

3.1.6. Katalaz Tayini

CAT aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışıldı. Yöntem, H₂O₂ CAT varlığında su ve moleküler oksijene dönüşmesi sırasında harcanan H₂O₂'nin absorbansının 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (94). Sonuçlar k/mg protein olarak ifade edildi.

3.1.7. Superoksit Dismutaz Tayini

SOD aktivitesi, Olympus AU 2700 (Japonya) marka otoanalizöre applike, Randox marka ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür. Yöntemin prensibi, ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon sonucunda ksantinden ürik asit ve O₂⁻ radikali oluşumuna ve bunu takiben oluşan O₂⁻ radikalinin de kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5 fenil tetraliyum klorit (INT) ile reaksiyona girmesine dayanır. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür (95,96).

3.2. Biyokimyasal Metod

Biyokimyasal çalışmalar Isparta Özel Davraz hastanesi laboratuvarında yaptırılmıştır.

- Spektrofotometrik metotla Architect alanin aminotransferaz kiti ile alanin aminotransferaz (Architect/Aeroset Aspartate Aminotransferase Reagent Kit) ,
- Architect aspartat aminotransferaz kiti ile aspartat aminotransferaz (Architect/Aeroset Alanine Aminotransferase Reagent Kit),
- Architect Trigliserit kiti ile trigliserit (Architect Trigliserit Kit),
- Architect kolesterol kiti ile total kolesterol (Architect Kolesterol Kit) numune ve reaktifleri uygun ölçülerde alıp karıştıran belirli bir süre ve ısıda inkübe eden gerekli sürelerde optik okumaları yapıp sonunda ilgili analiz sonucunu hesaplamış olarak kullanıcıya sunan cihaz olan otoanalizatörde yapıldı.

3.3. Comet Assay Metod

Comet Assay analiz basamakları

- 0,5 ml histopaque 1077 + 0,5 ml tam kan ilave edildi (kan ilavesi sızdırma şeklinde yapıldı)
- 2100 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifuj edildi.
- Tüpte oluşan iki tabaka arasındaki bulanık kısımdan 500 µl çekildi.
- Çekilen hücre kısmı 500 µl 1/10 dilüe PBS ilave edilerek 1 kez yıkandı (1600 rpm 10 dk)
- Süpernatant atıldı, kalan pelette hücreler vardır, hücreler çok yoğun 1/10 PBS ile sulandırıldı.

- 40 mg (0,04 gr) LMA + 4 ml 1/10 dilüe PBS de eritildi, kaynatıldı, 37°C su içine alındı.
- Hücreler 80 µl LMA ile karıştırıldı.
- Karışımdan 80 µl çekilir ve NMA olan lamlara dökülerek üzeri lamelle kapatıldı, 5 dakika +4 °C de bekletildikten sonra lamel çıkarıldı.
- Lamlar bir kutu içine alındı. Üzerine lisiz solüsyonu dökülerek 50 dk lizis için beklendi.
- 50 dk sonra lisiz solüsyonundan çıkarıldı ve distile su ile yavaşça yıkandı.
- Lamlar soğuk elektroforez tamponu olan tanka alındı. 30 dk adaptasyon için tankta bekletildi.
- Daha sonra 300 mA-25 V da 25 dk elektroforez tankında yürütüldü.
- Elektroforezden sonra lamlar çıkarıldı, kağıt havlu üzerine alındı ve nötralizasyon tamponundan her lama 5'er ml dökülerek nötralizasyonu için beklendi.
- Uygulama çift olarak yapıldı.
- Lamel kapatılarak floresan mikroskopta okundu.
- Okuma 3 saat içinde yapıldı.

3.3.1. Comet Assay Analizi Değerlendirilmesi

- Numune başına 100 adet hücre değerlendirildi (her slaytta 50 hücre). 40X'de skorlama yapıldı. (Etidyum bromür için floresan mikroskop, 488 nm dalga boyunda)
- Değerlendirilen her slayt kodlandı.

- DNA kırıkları 5 kategoride değerlendirildi:

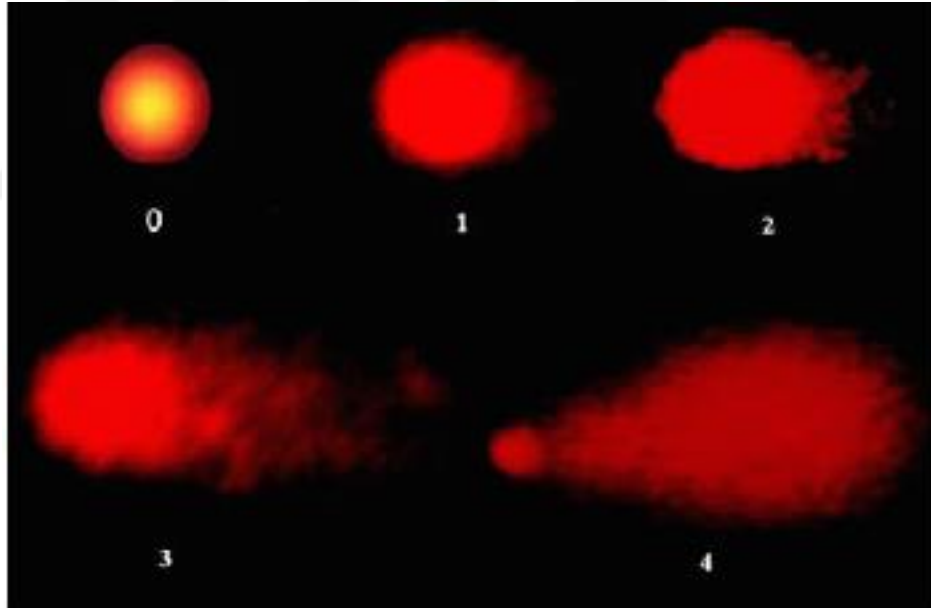
0= Hasarlanmamış hücreler,

1= En az hasarlanmış hücre,

2= Orta hasarlanmış hücre,

3= Maksimumda az hasarlanmış hücre,

4= Maksimum kuyruk uzunluğuna sahip olan hücreler ve maksimum hasara uğramış hücreler. Bunun için her numunede hücre sayımı yapılırken (toplam 100 hücre sayıldı) hasarlanma derecesine göre hücreler 0-4 arası skorlandırılıp, numunedeki her bir skora ait hücre sayısı kaydedildi. Hasarlı hücrelerin lamdaki görüntüleri Şekil 9'da gösterilmiştir (97).



Şekil 9. Görsel skortlama tekniği (AU) ile hücrelerin sınıflandırılması

(0: Hasarsız DNA görüntüsü, 1-4: Hasarlı DNA'ları hasarın derecesine göre puanlanması).

3.4. Histokimyasal Metod

3.4.1. Doku Örneklerinde Yapılan Histokimyasal Çalışmalar

3.4.1.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi

48 saat % 10 nötral formalin solüsyonu içerisinde fiksasyonu sağlanan doku örnekleri, bir gece akan suda yıkama işlemine tâbi tutulduktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

Suyun dokulardan uzaklaştırılması (Dehidratasyon)

Dokular dereceli alkollerde sırasıyla belirtilen sürelerde bekletildi.

Alkol derecesi

Süre

- % 50 1 saat bekletildi.
- % 70 1 saat bekletildi.
- % 80 1 saat bekletildi.
- % 90 1 saat bekletildi.
- % 96 1 saat bekletildi.
- % 100 1 saat bekletildi.
- % 100 1 saat bekletildi.
- % 100 1 saat bekletildi.
- Şeffaflandırma
- Ksilolde 10-15 dk (Her 5 dk da bir kontrol edilerek işlem sonlandırıldı).

- Parafin emdirme
- Sıvı parafin 30 dk bekletildi.
- Katı parafin 1 gece bekletildi.
- Gömme
- Sert parafin, içerisine gömülen dokularla parafin bloklar hazırlandı.
- Kesit alma
- Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotom kullanılarak rodajlı lamlara 3 mikron kalınlığında kesitler alındı.

3.4.1.2. Kesitlerin Rutin Boyanması

Histokimyasal değerlendirme için preparatlara Hematoksilen-Eozin (H-E) ile rutin boyama işlemi uygulandı. Rutin boyama protokolü aşağıda belirtilen sırayla yapıldı.

Yapılan işlem	Süre
• Deparafinizasyon	
• 60°C etüv	45 dk bekletildi.
• Ksilol I	20 dk bekletildi.
• Ksilol II	20 dk bekletildi.
• Dehidratasyon (alkol serisi)	
A) % 96	10 dk bekletildi.
B) % 90	10 dk bekletildi.
C) % 80	10 dk bekletildi.
D) % 70	10 dk bekletildi.
• Distile su	5 dk bekletildi.
• Hematoksilen	2 dk bekletildi.
• Çeşme suyu	5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
• Asit alkol	3-4 sn
• Çeşme suyu	5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
• Eozin	1 dk bekletildi.
• Çeşme suyu	5 dk sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
• % 70- % 80- % 90 alkol serisinden sırasıyla batır çıkar yaparak geçirildi.	
• Ksilol	1 gece bekletildi. Kapatma (Entellan)

3.4.1.3. Histokimyasal Değerlendirme

Deney gruplarına ait H-E ile boyanan karaciğer dokusunda gözlenen histokimyasal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (98) yapmış oldukları skorlamaya göre binoküler mikroskop yardımıyla değerlendirildi ve kameralı mikroskop ile görüntüler elde edildi.

(-) skor (negatif skor) : hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

(+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,
(++) skor (2 pozitif skor): orta derecede,
(+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

3.5. İNOS İmmunokimyasal Boyama Metod

- Immunohistokimyasal incelemeler için parafine gömülmüş karaciğer dokularından 5µm kalınlığında kesit alınarak iNOS antiserumu kullanılarak boyandı.
- İmmunhistokimyasal incelemeler için primer ve sekonder antikorlar Abcam firmasından temin edildi. iNOS için [Anti-iNOS antibody (ab15323), 1/100 dilüsyon] kullanıldı.
- İmmunoperoksidaz yöntem için streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi uygulandı.
- Kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi.
- Dokular 10 dakika süreyle PBS'de yıkandı.
- Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla % 3'lük metanoldeki H₂O₂ ile 20 dakika muamele edildi.
- Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle PBS'de yıkandı.
- Takiben mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonunda (pH 6) 700 °C'de 5 dakika süreyle iki defa ile kaynatıldı.
- Dokular 10'ar dakika 2 defa PBS'de yıkandı.
- Dokularda non spesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika tutuldu.

- Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan dokulara iNOS antikoru uygulandı ve 2 saat bekletildi.
- Daha sonra dokular aynı şekil ve süreyle PBS’de yıkandı, takiben biotin ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS’de 2 defa 10’ar dakika yıkandı.
- Bu işlemde sonra dokular streptoavidin ile 30 dakika muamele edildi.
- Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı ve hazırlanmış olan DAB kromojen ile boyandı.
- Karşıt boyama için Harris hematoksilen kullanıldı ve lamel ile kapatılan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.
- iNOS immunohistokimyasal boyaması doku reaksiyonu için rastgele seçilmiş 5 alanda 20’şer hücre olmak üzere her 100 hücre sayılarak pozitif hücre sayıları belirlendi.
- Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Oneway Anova Bonferroni testi ile değerlendirildi ve tablollaştırıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 22 yazılımı kullanılarak yapıldı. Verilerin homojen dağılıp dağılmadıkları Kolmogrov Smirnov testi ile kontrol edildi. Sonuçlar Tablo 5’de gösterilmiştir. Homojen dağılan veriler için parametrik testler, homojen dağılmayan veriler için ise nonparametrik testler kullanıldı. Nonparametrik veriler için Kruskal Wallis, parametrik veriler için ise one-way ANOVA testleri yapıldı. Gruplar arası anlamlı fark bulunan değişkenlerde Post Hoc test olarak One-Way ANOVA’da Tukey, Kruskal-Wallis testinde SPSS 22 aracılığıyla post-hoc test kullanıldı ve $p < 0,05$ ’ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 5. Kolmogrov-Smirnov test sonuçları:

	Sig.
AST	0,200*
ALT	0,200*
TK	0,019
TG	0,200*
COMMET	0,126
MDA	0,153
SOD	0,015
CAT	0,000

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

15 günlük ilk tartım Tablo 6'da gösterilmiştir. Besleme periyodu boyunca elde edilen vücut ağırlıkları (VA) Tablo 7 ve Şekil 10'da gösterilmiştir:

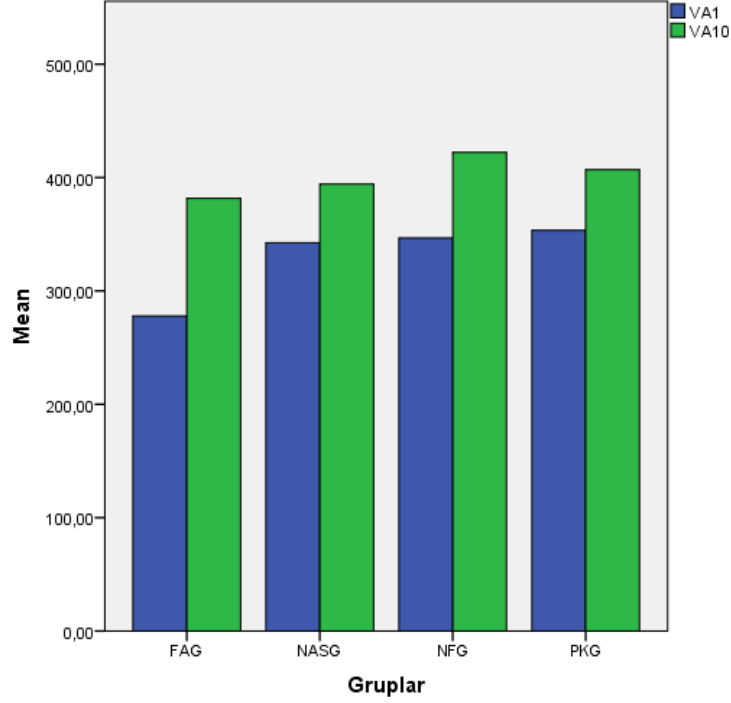
Tablo 6. 15 günlük ilk tartım sonuçları

Rat	Kafes 1(gr)	Kafes 2(gr)	Kafes 3(gr)
1	308	327	422
2	283	413	331
3	191	368	256
4	402	381	308
5	310	316	347
6	298	365	326
7	234	395	343
8	418	364	360
9	314	386	370
10	305	347	420
11	294	414	375
12	308	-	391
Toplam	3665	4076	4249

Tablo 7. Haftalara göre vücut ağırlığı değişimi

Gruplar Haftalar	FAG (ort±std)	NASG (ort±std)	NFG (ort±std)	PKG (ort±std)
1VA	277,87±42,82	342,50±40,41	346,75±47,41	353,50±18,36
2VA	318,37±29,98	264,00±56,30	304,87±39,17	337,00±22,33
3VA	288,30±40,84	308,62±63,59	355,75±43,20	335,50±38,36
4VA	328,25±63,99	322,37±53,92	376,37±25,93	295,00±42,82
5VA	280,87±62,41	334,62±46,25	327,25±63,89	305,83±51,10
6VA	327,00±65,89	358,37±64,01	349,25±50,67	328,50±68,91
7VA	351,75±53,76	354,00±52,16	361,75±61,65	310,50±32,64
8VA	340,25±46,20	375,62±32,10	343,75±22,56	280,33±91,32
9VA	371,37±62,09	416,75±38,64	398,75±48,59	360,50±31,86
10VA	381,62±61,53	394,25±44,96	422,25±35,04	407,00±42,74

FA: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, Ort: Ortalama, Std: Standart Sapma, VA: Vücut ağırlığı değerlerini ifade etmektedir



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu,PKG: Pozitif kontrol grubu , Mean: ortalama VA: vücut ağırlığını ifade etmektedir.

Şekil 10. Vücut ağırlığının 1 -10 haftalar arası ortalama değişimi grafiği

VA'nın haftalara göre karşılaştırılmasında (VA1 ile VA10 arasında) tüm gruplarda anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

4.2. Lee İndeks Bulguları

Beslenme periyodunun ardından tüm ratların Lee indeksi değerleri hesaplanarak elde edilen veriler Tablo 8 ve Şekil 11'de gösterilmiştir. Tüm gruplar Lee indeks metoduna göre obez olmuştur. Hesaplama $excelle = ((x^{(1/3)})/y) * (10^4)$ şeklinde formülle yapılmıştır.

Örnek; Tablo 8, FAG 1. rat için;

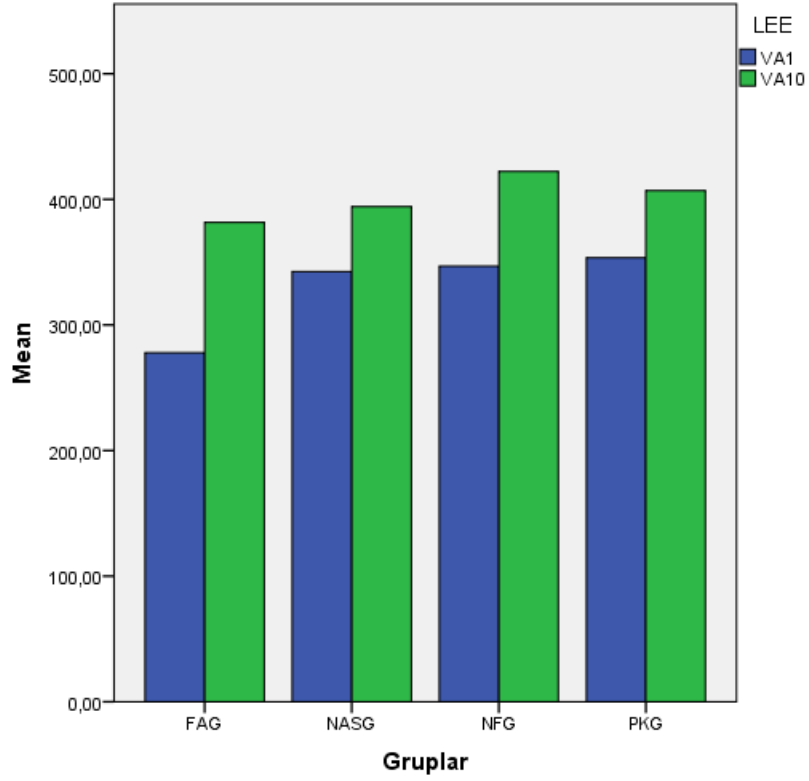
$$\sqrt[3]{356} / 200 * 10000 =$$

$$7.0873 / 200 = 0,035436 * 10000 = 354,365$$

Tablo 8. Lee indeksi hesaplama sonuçları.

Gruplar	Parametreler	Gram (g)	Uzunluk (mm)	Lee indeksi
FAG		356	200	354,36
		411	210	354,04
		280	180	363,45
		281	190	357,32
		324	190	361,48
		404	210	352,02
		407	210	352,89
		351	210	335,90
NASG		442	220	346,24
		324	200	343,41
		320	210	325,70
		308	200	337,66
		328	200	344,82
		388	210	347,31
		310	200	338,39
		412	230	323,52
NFG		371	220	326,61
		238	180	344,28
		410	220	337,67
		350	190	370,91
		410	220	337,67
		430	200	377,39
		320	200	341,99
		365	200	357,32
PKG		356	200	354,36
		320	190	359,99
		300	180	371,90
		250	180	349,97
		340	200	348,97
		333	210	330,06
		320	200	341,99

Lee indeksine göre değerlendirildiğinde tüm gruplardaki ratlar 300 değerini aştığından obez tanısı konuldu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Grup ortalamaları değerlendirildiğinde PKG ve FAG ortalamalarının yüksek değerler gösterirken en düşük ortalamanın NASG 'de olduğu görüldü. Grupların Lee indeks istatistik analiz sonuçları Tablo 9'da gösterilmiştir.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu Mean: ortalama değerlerini ifade etmektedir. İstatistik bulgular KruskalWallis testi kullanılarak değerlendirildi.

Şekil 11. Gruplar arası Lee indeksi değerinin ilk ve son vücut ağırlığına göre değişim ortalaması grafiği.

Tablo 9. Tüm grupların Lee indeksi istatistik analiz sonuçları

Gruplar	Lee indeksi (Ort±Std)
FAG	353,93±8,35
NASG	338,38±9,18
NFG	349,23±17,66
PKG	352,54±13,84

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu Ort: Ortalama, Std: Standart sapma değerlerini ifade etmektedir.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

On altı hafta sonunda deneydeki bütün rat gruplarının serumlarından ALT, AST, TG, TK değerleri ölçüldü ve istatistiki değerlendirmesi yapıldı.

4.3.1. Aspartat Aminotransferaz, Alanin Aminotransferaz, Total Kolesterol ve Trigliserit Sonuçları

4.3.1.1. Aspartat Aminotransferaz Sonuçları

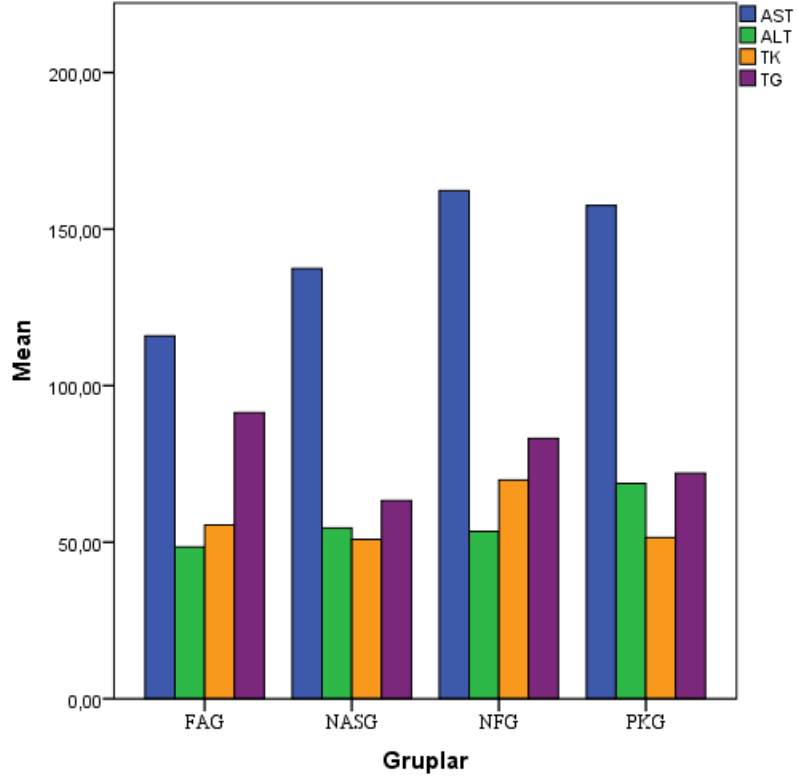
Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında AST değerleri için anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Grupların ortalamalarına bakıldığında FAG'nin düşük değerler göstermesine karşın PKG ile karşılaştırmasında anlamlı sonuç vermemiştir. PKG ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 10 ve Şekil 12'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları.

Gruplar	AST Ort±Std	ALT Ort±Std	TK Ort±Std	TG Ort±Std
FAG	115,88±32,51	48,48±14,76	55,50 ^a ±20,26	91,37±33,69
NASG	137,40±28,04	54,51±10,38	50,87 ^b ±5,69	63,25 ±24,50
NFG	162,28±42,83	53,47±9,55	69,87 ^a ±11,03	83,12±17,47
PKG	157,70±7,52	68,76±18,58	51,50 ^a ±8,21	72,00±34,16
p	0,031	0,250	0,025	0,226

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Ort: Ortalama, Std: standart sapma değerlerini ifade etmektedir. p: Kruskal wallis testi önem düzeyidir.

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Mean: Ortalama değerlerini ifade etmektedir.

4.3.1.2. Alanin Aminotransferaz Sonuçları

Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında ALT değerleri için anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Grupların ortalamalarına bakıldığında FAG düşük değerler göstermesine karşın PKG ile karşılaştırmasında anlamlı sonuç saptanmamıştır.

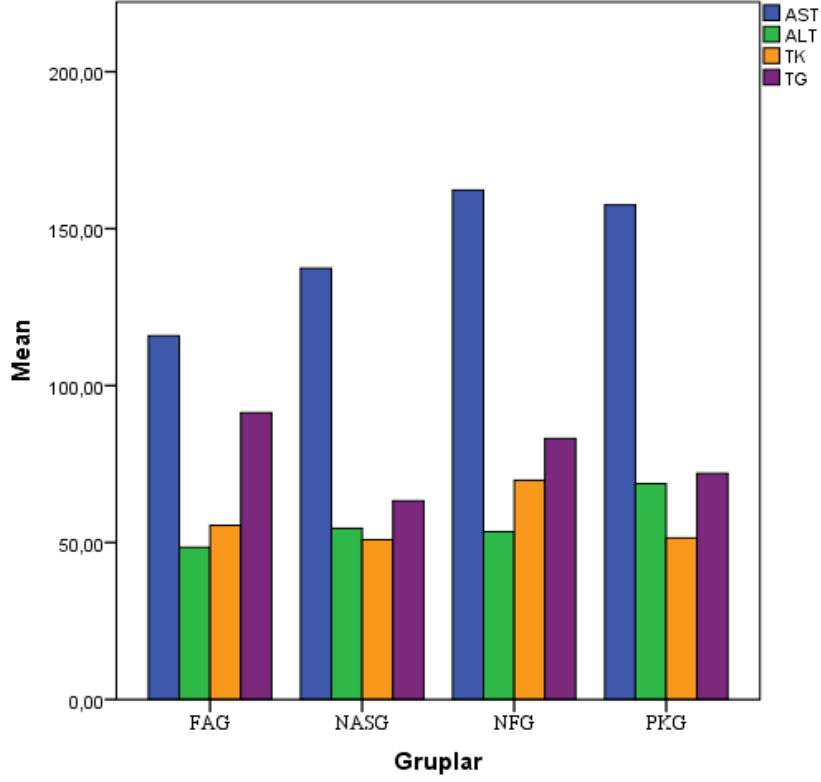
Kontrol grubu ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 11 ve Şekil 13 de gösterilmiştir.

Tablo 11. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları.

Gruplar	AST Ort±Std	ALT Ort±Std	TK Ort±Std	TG Ort±Std
FAG	115,88±32,51	48,48±14,76	55,50 ^a ±20,26	91,37±33,69
NASG	137,40±28,04	54,51±10,38	50,87 ^b ±5,69	63,25 ±24,50
NFG	162,28±42,83	53,47±9,55	69,87 ^a ±11,03	83,12±17,47
PKG	157,70±7,52	68,76±18,58	51,50 ^a ±8,21	72,00±34,16
p	0,031	0,250	0,025	0,226

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Ort: Ortalama, Std: Standart sapma değerlerini ifade etmektedir. p: Kruskal wallis testi önem düzeyidir.

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Mean: Ortalama değerlerini ifade etmektedir.

Şekil 13. Tüm deney gruplarının ALT ortalaması.

4.3.1.3. Total Kolesterol

Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında TK değerleri için anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). NFG'nin PKG ve diğer gruplarla karşılaştırılması sonucu TK değerleri NFG'de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

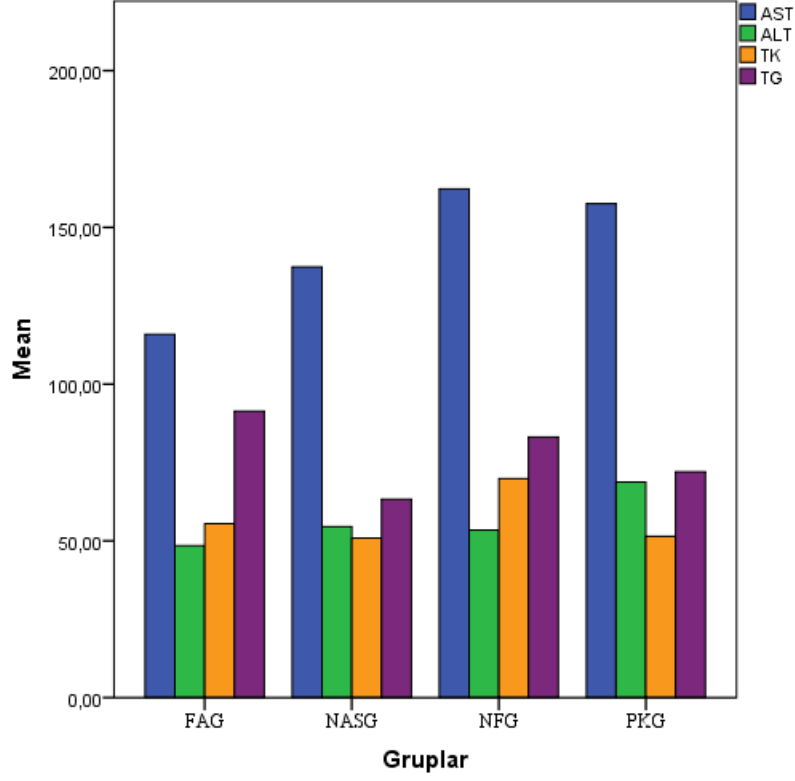
Kontrol grubu ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 12 ve Şekil 14' de gösterilmiştir.

Tablo 12. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları

Gruplar	AST Ort±Std	ALT Ort±Std	TK Ort±Std	TG Ort±Std
FAG	115,88±32,51	48,48±14,76	55,50^a±20,26	91,37±33,69
NASG	137,40±28,04	54,51±10,38	50,87^b±5,69	63,25 ±24,50
NFG	162,28±42,83	53,47±9,55	69,87^a±11,03	83,12±17,47
PKG	157,70±7,52	68,76±18,58	51,50^a±8,21	72,00±34,16
p	0,031	0,250	0,025	0,226

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Ort: Ortalama, Std: standart sapma değerlerini ifade etmektedir. p: Kruskal wallis testi önem düzeyidir.

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit+N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Mean: Ortalama değerlerini ifade etmektedir.

Şekil 14. Tüm deney gruplarının TK ortalaması karşılaştırması.

4.3.1.4. Trigliserit Sonuçları

Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında TG değerleri için anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Grupların ortalamalarına bakıldığında FAG'nin yüksek değerler göstermesine karşın PKG ile karşılaştırmasında anlamlı sonuç vermemiştir.

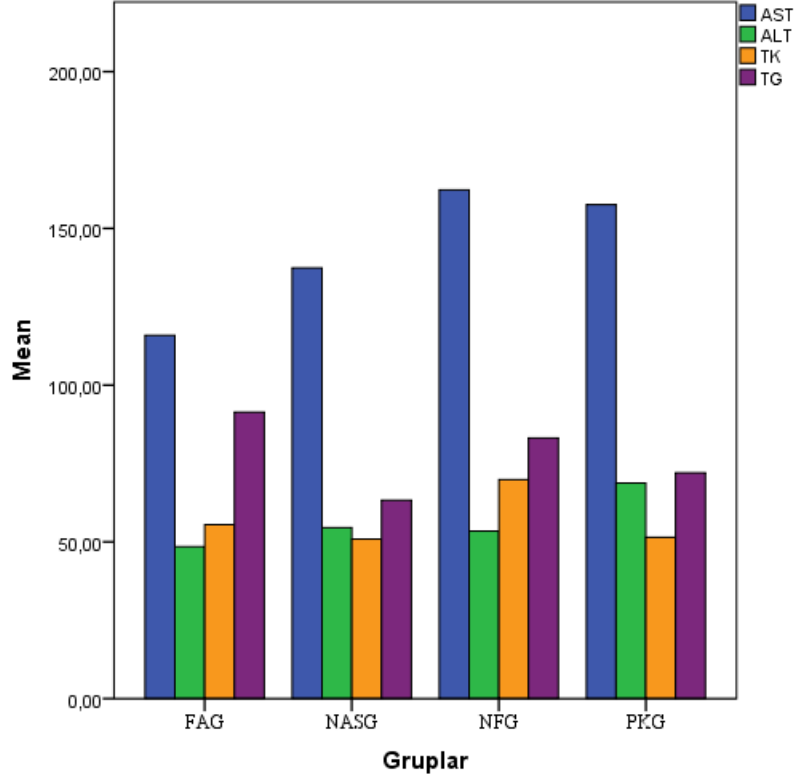
Kontrol grubu ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 13 ve Şekil 15' de gösterilmiştir.

Tablo 13. Tüm grupların biyokimyasal analiz sonuçları.

Gruplar	AST Ort±Std	ALT Ort±Std	TK Ort±Std	TG Ort±Std
FAG	115,88±32,51	48,48±14,76	55,50 ^a ±20,26	91,37±33,69
NASG	137,40±28,04	54,51±10,38	50,87 ^b ±5,69	63,25 ±24,50
NFG	162,28±42,83	53,47±9,55	69,87 ^a ±11,03	83,12±17,47
PKG	157,70±7,52	68,76±18,58	51,50 ^a ±8,21	72,00±34,16
p	0,031	0,250	0,025	0,226

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Ort: Ortalama, Std: standart sapma değerlerini ifade etmektedir. p: Kruskal wallis testi önem düzeyidir.

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit+N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, TK: Total kolesterol, TG: Trigliserit, AST: Aspartat aminotransferaz. ALT: Alanin aminotransferaz, Mean: Ortalama değerlerini ifade etmektedir.

Şekil 15. Tüm deney gruplarının TG ortalaması karşılaştırması.

4.4. Oksidan-Antioksidan Bulguları

On altı hafta sonunda deneydeki bütün rat gruplarının oksidan antioksidan MDA, SOD ve CAT aktiviteleri ölçülerek, sonuçlar istatistiki olarak karşılaştırıldı..

4.4.1. Malondialdehit Bulguları

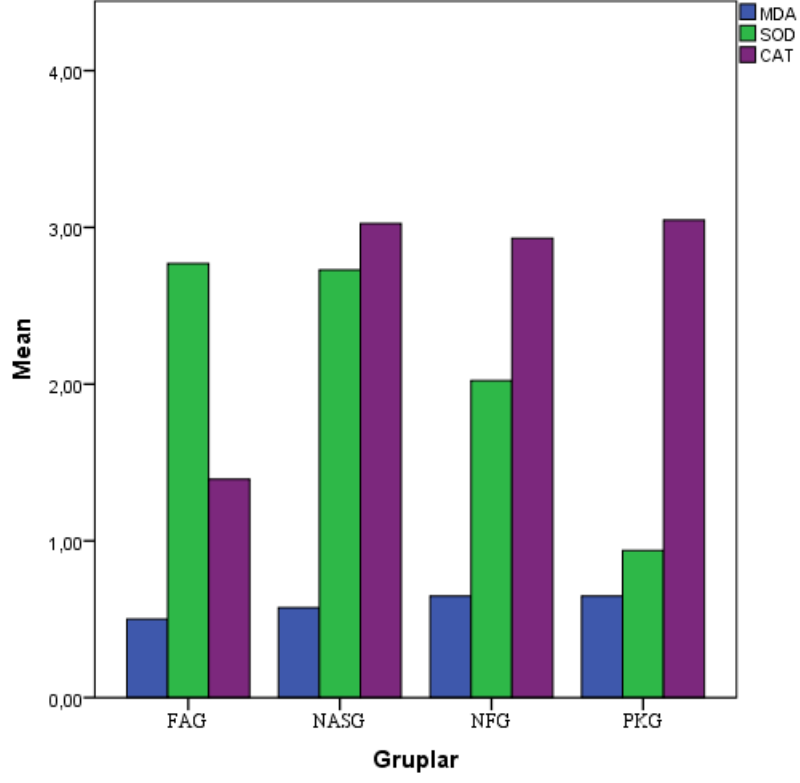
Beslenme periyodunun sonunda MDA değerleri açısından grupların karşılaştırılması sonucu PKG ve NFG'ye göre FAG'de MDA değerleri anlamlı derecede düşük bulunmuş olup Tablo 14 ve Şekil 16'da gösterilmiştir (p<0,05).

Tablo 14. Tüm grupların oksidan- antioksidan MDA sonuçları.

Gruplar	MDA Ort±Std	SOD Ort±Std	CAT Ort±Std
FAG	0,50 ^a -±0,11	2,76 ^a -±1,7	1,39-±0,58
NASG	0,57 ^b -±0,059	2,72 ^a -±1,19	3,02-±2,51
NFG	0,64 ^b -±0,10	2,02 ^a -±1,07	2,93-±3,18
PKG	0,64 ^b -±0,14	0,93 ^b -±0,39	3,04-±1,65
p	0,036	0,020	0,170

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: Superoksit dismutaz, CAT: Katalaz. Ort: Ortalama, Std: Standart sapma değerlerini ifade etmektedir. p: Kruskal Wallis testi önem düzeyidir.

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (p>0,05). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit+N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: Superoksit dismutaz, CAT: Katalaz. Mean: Ortalama, değerlerini ifade etmektedir.

Şekil 16. Tüm grupların MDA ortalaması karşılaştırması.

4.4.2. Superoksit Dismutaz Bulguları

Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında Superoksitdismutaz (SOD) değerlerine bakıldığında PKG verilerine göre NASG ve FAG 'de daha yüksek değerlere sahip oldukları görülmüştür ($p<0,05$). NFG değerleri de istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir.

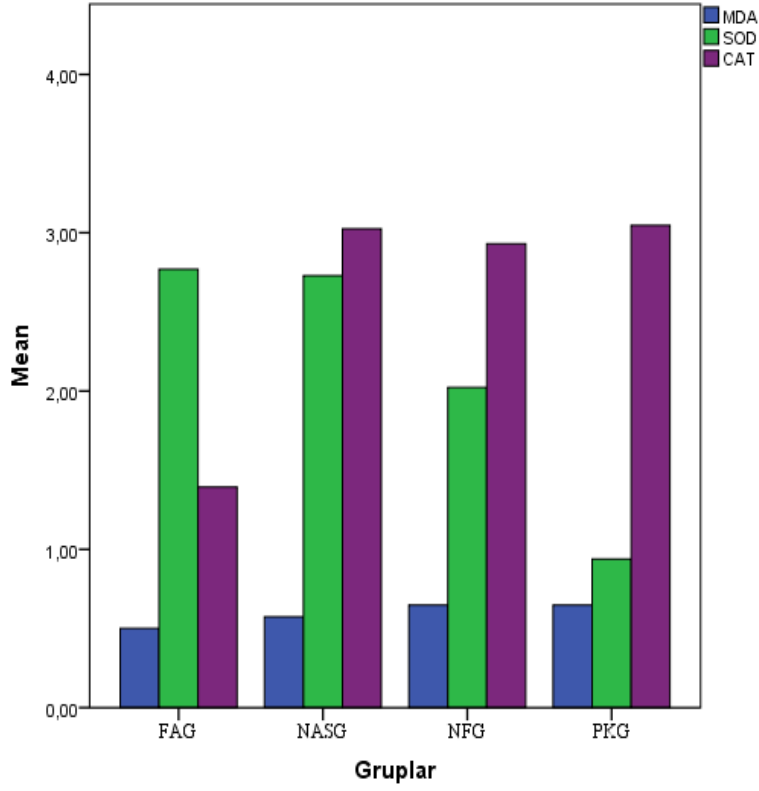
Kontrol grubu ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 15 ve Şekil 17' de gösterilmiştir.

Tablo 15. Tüm grupların oksidan- antioksidan SOD sonuçları.

Gruplar	MDA Ort±Std	SOD Ort±Std	CAT Ort±Std
FAG	0,50 ^a ±0,11	2,76 ^a ±1,7	1,39±0,58
NASG	0,57 ^b ±0,59	2,72 ^a ±1,19	3,02±2,51
NFG	0,64 ^b ±0,10	2,02 ^a ±1,07	2,93±3,18
PKG	0,64 ^b ±0,14	0,93 ^b ±0,39	3,04±1,65
p	0,019	0,020	0,170

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: Superoksit dismutaz, CAT: Katalaz. Ort: Ortalama, Std: Standart sapma değerlerini ifade etmektedir. p: Kruskal Wallis testi önem düzeyi

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit +N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: superoksit dismutaz, CAT: Katalaz. Mean: Ortalama, değerlerini ifade etmektedir.

Şekil 17. Tüm grupların SOD ortalaması karşılaştırması.

4.4.3. Katalaz Bulgular

Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında CAT değerleri için anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). FAG CAT değerleri diğer tüm gruplardan düşük bulunmuşsa da istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

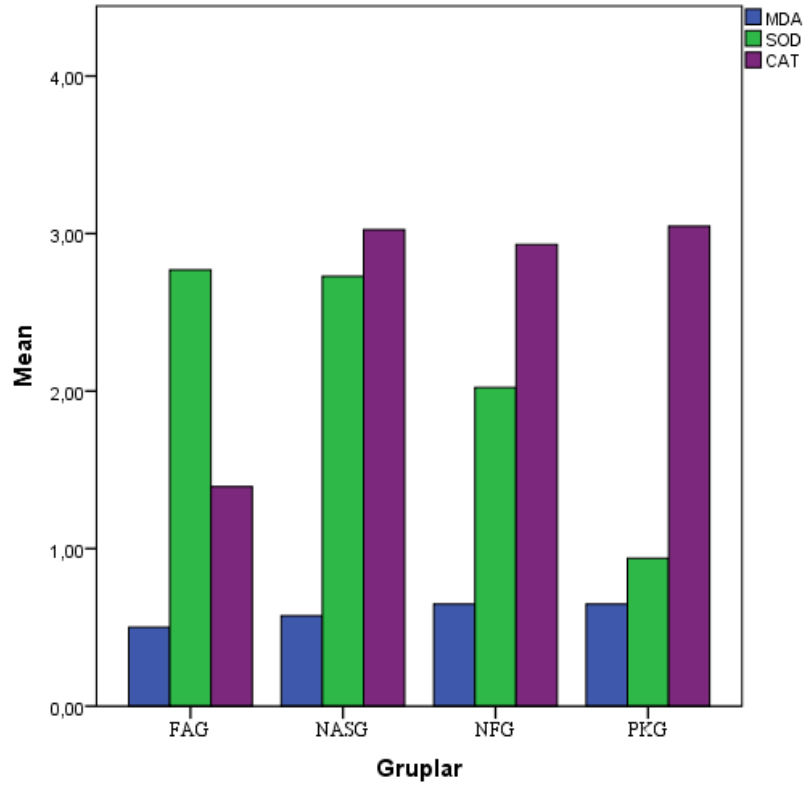
Kontrol grubu ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 16 ve Şekil 18’de gösterilmiştir.

Tablo 16. Tüm grupların oksidan- antioksidan CAT sonuçları.

Gruplar	MDA Ort±Std	SOD Ort±Std	CAT Ort±Std
FAG	0,50 ^a ±0,11	2,76 ^a ±1,7	1,39±0,58
NASG	0,57 ^b ±0,09	2,72 ^a ±1,19	3,02±2,51
NFG	0,64 ^b ±0,10	2,02 ^a ±1,07	2,93±3,18
PKG	0,64 ^b ±0,14	0,93 ^b ±0,39	3,04±1,65
p	0,019	0,020	0,170

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit +N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: superoksit dismutaz, CAT: Katalaz. Ort: Ortalama, Std: Standart sapma değerlernii ifade etmektedir. p: Kruskal Wallis testi önem düzeyi

a, b: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). İstatistiki bulgular Kruskal Wallis ve ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit +N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: superoksit dismutaz, CAT: Katalaz. Mean: Ortalama, değerlerini ifade etmektedir.

Şekil 18. Tüm grupların CAT ortalaması karşılaştırması.

4.5. Comet Assay Analizi Bulgular

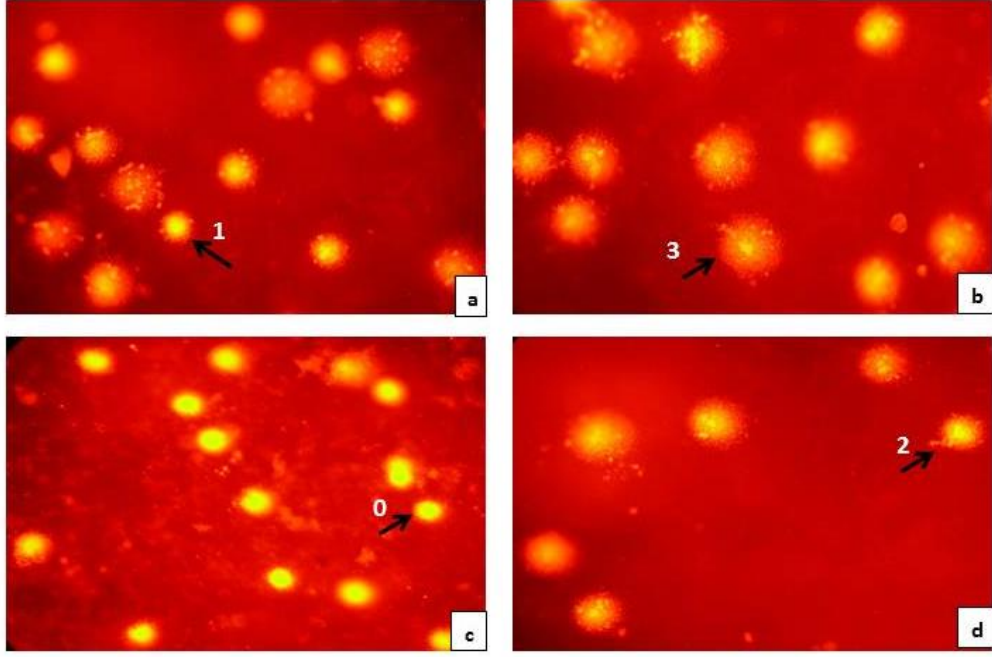
Beslenme periyodunun sonunda gruplar arasında Comet Assay değerleri için anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). PKG'ye kıyasla en anlamlı düşük sonuç FAG'dedir. Folik asitin DNA kırığı oluşumuna karşı güçlü koruyucu bir kimyasal madde olduğu görülmüştür. PKG ile diğer grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 17 ve Şekil 19' da gösterilmiştir.

Tablo 17. Tüm grupların Comet Assay skoru sonuçları.

Gruplar	Comet Assay sonucu Ort \pm Std	p
FAG	64,25 ^a \pm 22,00	
NASG	101,91 \pm 49,31	
NFG	118,62 \pm 43,51	,009*
PKG	180,33 \pm 80,05	

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, Ort: Ortalama Std: Standart sapma değerlerini ifade etmektedir

*a: $p < 0,05$. (PKG) PKG ile karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlıdır.. İstatistiki bulgular Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi



(a) PKG 'ye ait Comet Assay görüntüsü, (b) NASG 'ye ait Comet Assay görüntüsü, (c) FAG'ye ait Comet Assay görüntüsü, (d) NFG'ye ait Comet Assay görüntüsü. Hasar derecesine göre hücreler hasarsız (göç etmemiş) ile ağır hasar gören (DNA göçü) olmak üzere beş katogaride (0, 1, 2, 3, 4) sınıflandırıldı.

Şekil 19. Tüm grupların Comet Assay sonuçlarının karşılaştırılması.

4.6. Histokimyasal Bulgular

4.6.1. Karaciğer Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular

Beslenme periyodunun sonunda tüm grupların karaciğer dokularında histokimyasal değerlendirme sonucunda en hasarlı grubun PKG olduğu görüldü. Bu grupta karaciğerde yağlı dejenerasyon, portal alan ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonlarına, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon oldukça sık gözlemlendi.

Karaciğer histokimyasal bulgularına göre normal karaciğere en yakın grubun ise NFG grubu olduğu belirlendi. Grupların sonuçları Tablo 18 ve Şekil (20-23)' te gösterilmiştir.

Tablo 18. Tüm grupların yağlı PKG ile histokimyasal değerlerinin karşılaştırılması.

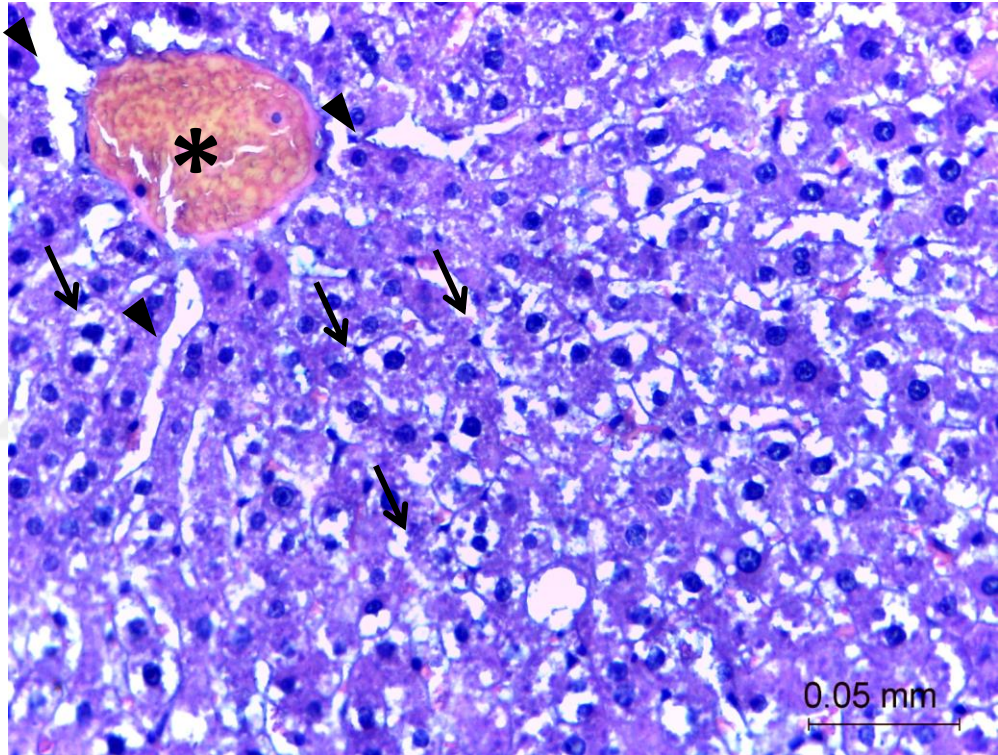
Gruplar	FAG (Ortalama)	NASG (Ortalama)	NFG (Ortalama)	PKG (Ortalama)
Histopatolojik değişiklikler				
Hepatositlerde yağlı dejenerasyon	++	+	-	+++
Portal alan ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu	++	+	-	+++
Sinüzoidal dilatasyon	+++	++	+	+++
Vasküler konjesyon	+++	++	+	+++

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, Ort: Ortalama değerlerini ifade etmektedir.

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, (+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede, (++) skor (2 pozitif skor): orta derecede, (+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitlerdeki yapısal değerlendirmelerde;

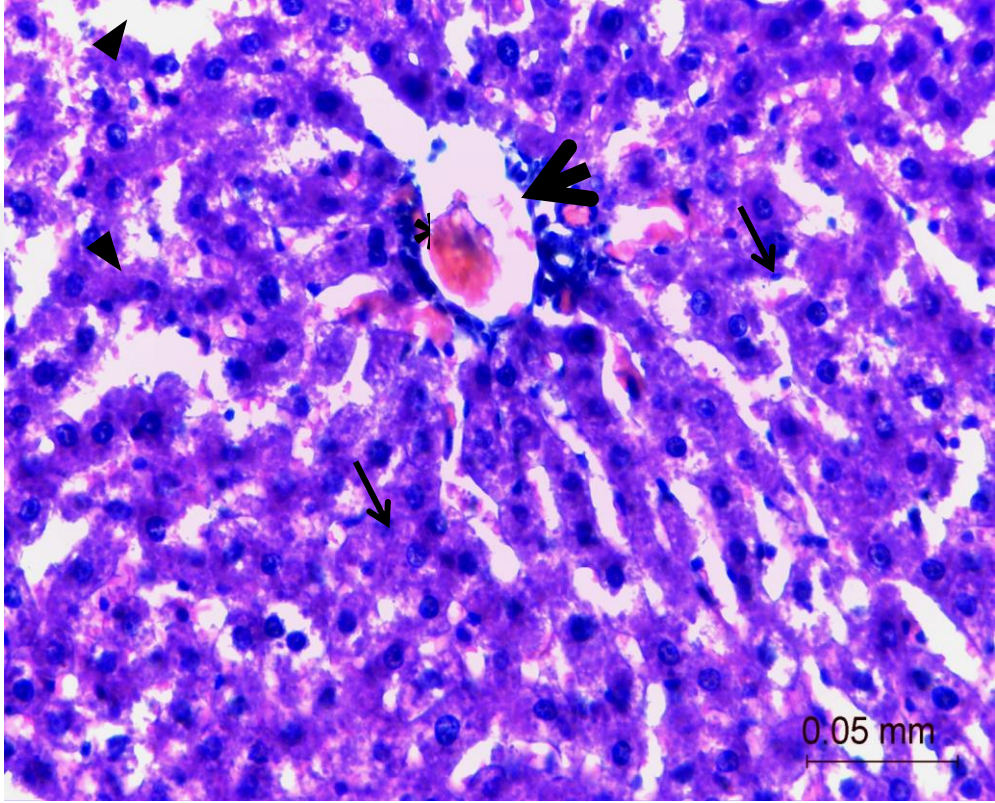
PKG'de hepatositlerde yağlı dejenerasyon, portal alan ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon belirgin gözlendi (+++) (Şekil 20).



Hepatositlerde yağlı dejenerasyon (ok), sinüzoidal dilatasyon (ok başı), vasküler konjesyon (asteriks) belirgin bir şekilde gözlenmekte (H-E, x400)

Şekil 20. PKG karaciğer dokusu.

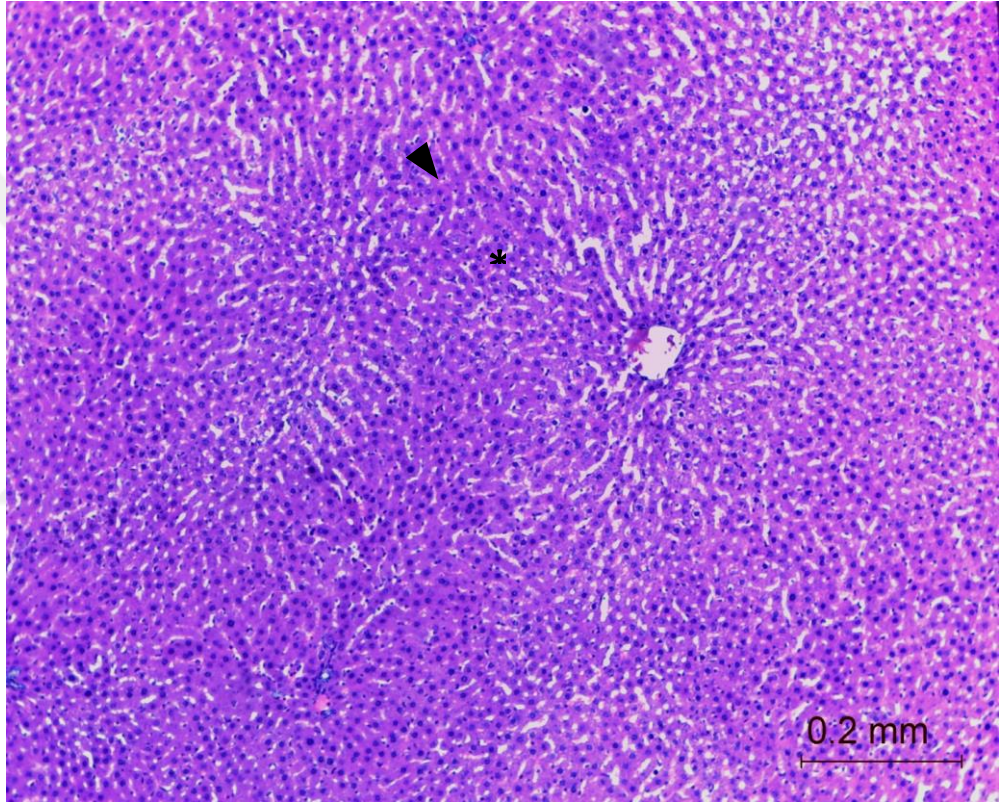
PKG'ye göre FAG'de hepatositlerde yağlı dejenerasyonda ve portal alan ve parankimde bulunan mononükleer hücre infiltrasyonunda minimal düzelme görülürken (++) , sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyonda düzelme gözlenmedi (+++) (Şekil 21).



Hepatositlerde yağlı dejenerasyon (ok), mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon (ok başı) ve vasküler konjesyon (asteriks) gözlenmekte (H-E, x400).

Şekil 21. FAG karaciğer dokusu.

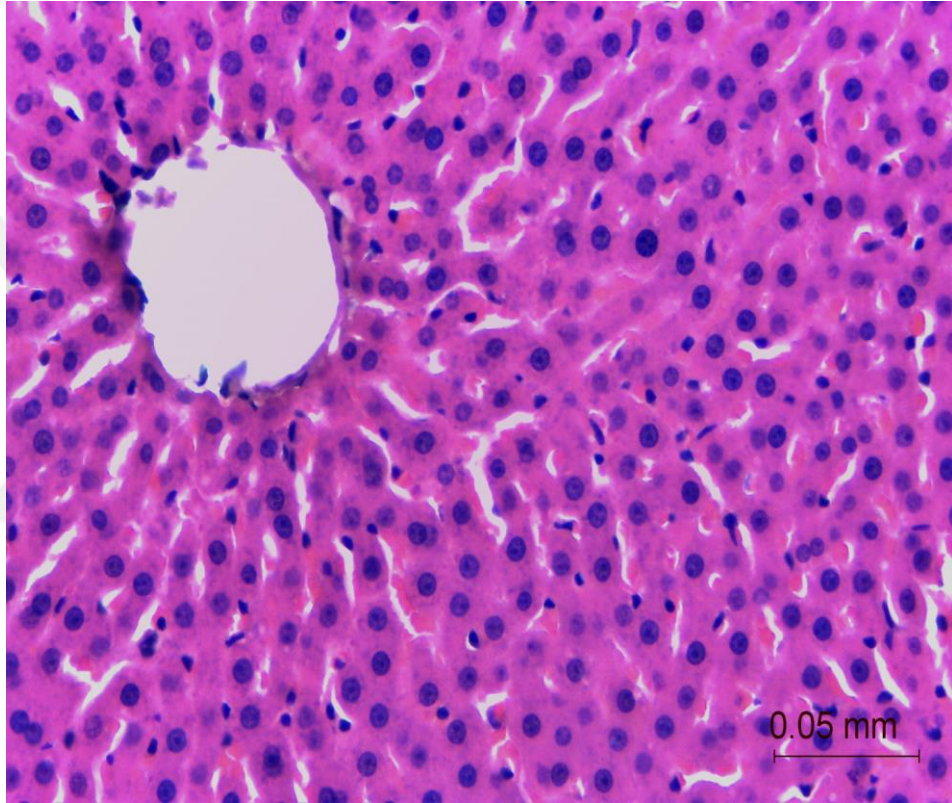
PKG'ye göre NASG'de hepatositlerde yağlı dejenerasyonda ve portal alan ve parankimde bulunan mononükleer hücre infiltrasyonunda belirgin düzelme gözlenirken (+), sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyonda minimal düzelme gözlemlendi (++) (Şekil 22).



Histopatolojik bulgular gerilemekle birlikte normal karaciğer histolojisine yakın görünüm izlenmekte (H-E, x400).

Şekil 22. NASG karaciğer dokusu.

PKG'ye göre NFG'de; normal karaciğer histolojisine yakın bir görünüm izlenmekteydi. Hepatositlerde yağlı dejenerasyon ve portal alan ve parankimde bulunan mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmezken (-), sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyona çok nadir rastlanmaktaydı (+) (Şekil 23).



Histopatolojik bulgular gerilemekte olup normal karaciğer histolojisine yakın görünüm izlenmekte (H-E, x400).

Şekil 23. NFG karaciğer dokusu.

4.7. iNOS Sonuçları

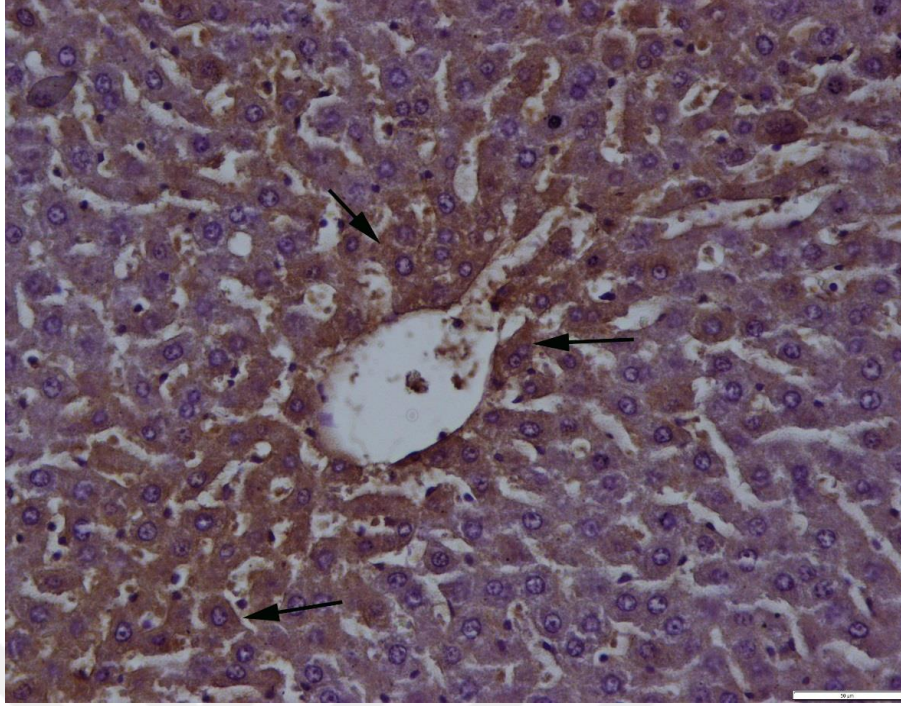
En şiddetli iNOS reaksiyonun PKG’de gözlemlendi, bu grupta başta hepatositler olmak üzere, safra kanallarında ve damar endotelinde iNOS pozitif immunoreaksiyon gözlemlendi. FAG, NASG ve NFG gruplarında iNOS pozitif reaksiyonun belirgin şekilde azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 24-31). iNOS immunoreaksiyonunun istatistik analizi Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19. İNOS reaksiyonu istatistiksel sonuçları.

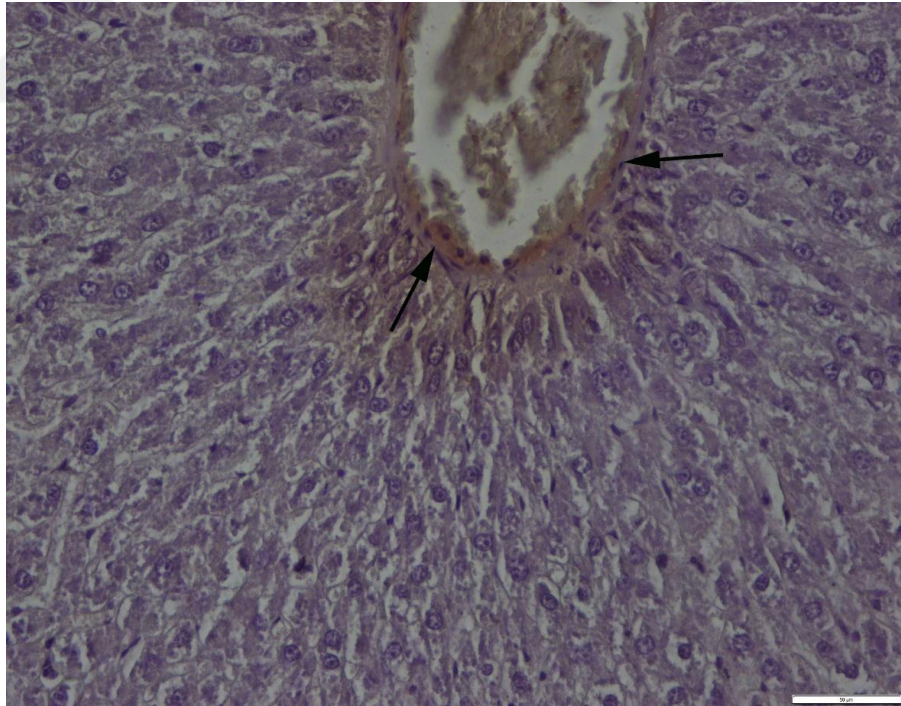
iNOS	Ort.±Std	p
FAG	7,00±0,77 ^b	,05
NASG	7,37±0,49 ^b	
NFG	3,75±0,97 ^c	
PKG	16,37±1,17 ^a	

FAG: Folik asit grubu, NASG: N-Asetilsistein grubu, NFG: Folik asit + N-Asetilsistein grubu, PKG: Pozitif kontrol grubu, Ort: Ortalama, Std: Standart sapma değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel bulgular Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi.

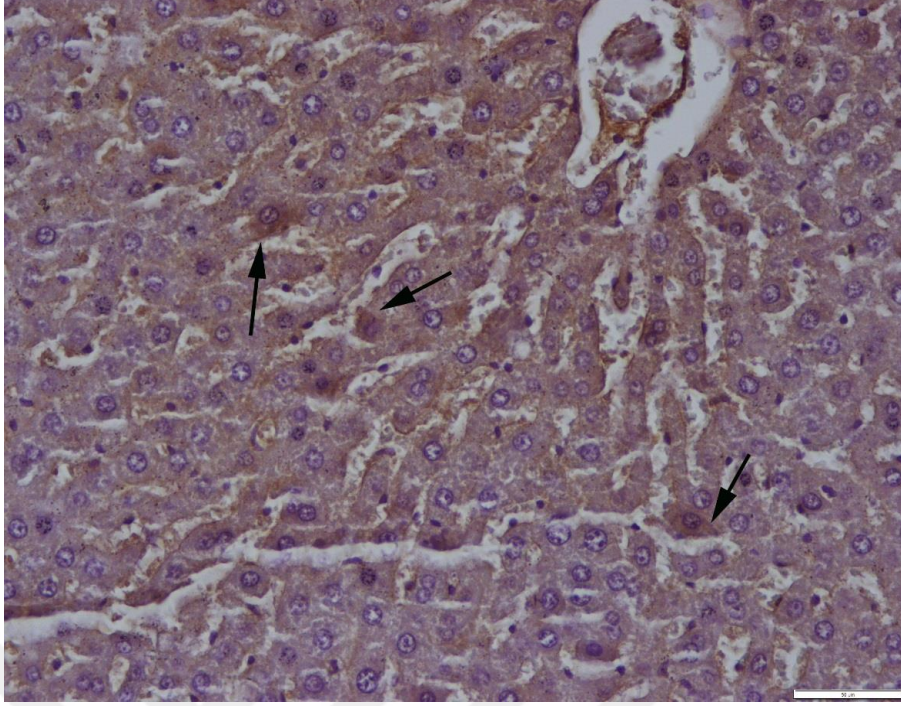
a,b,c: Her bir özellik için aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). Gruplar arası karşılaştırma SPSS 22.0 aracılığıyla Post- Hoc test yapılarak değerlendirildi.



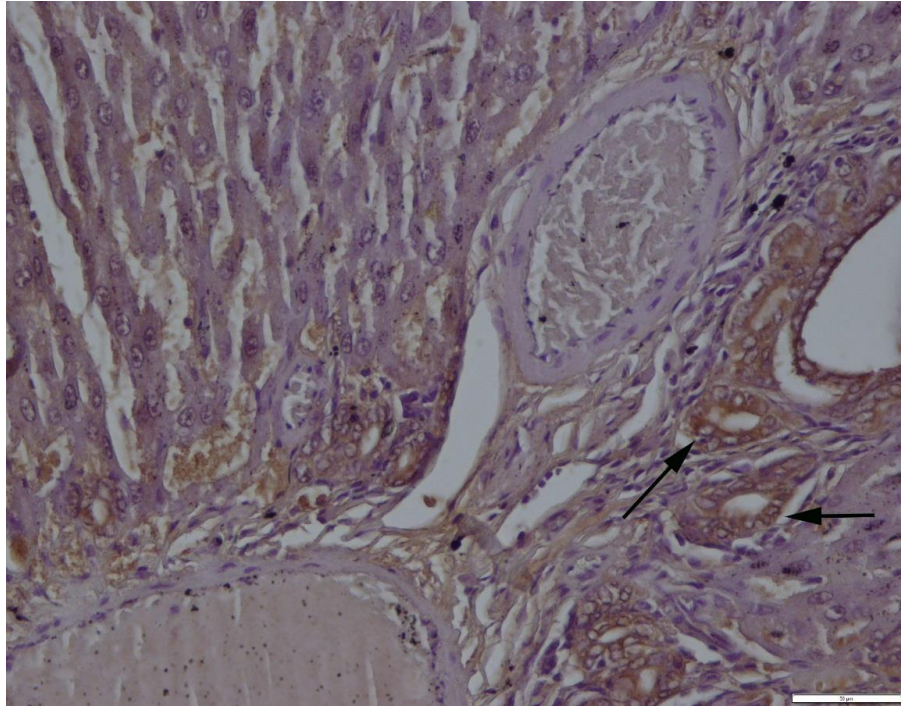
Şekil 24. PKG'de yoğun iNOS pozitif immunoreaksiyon (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



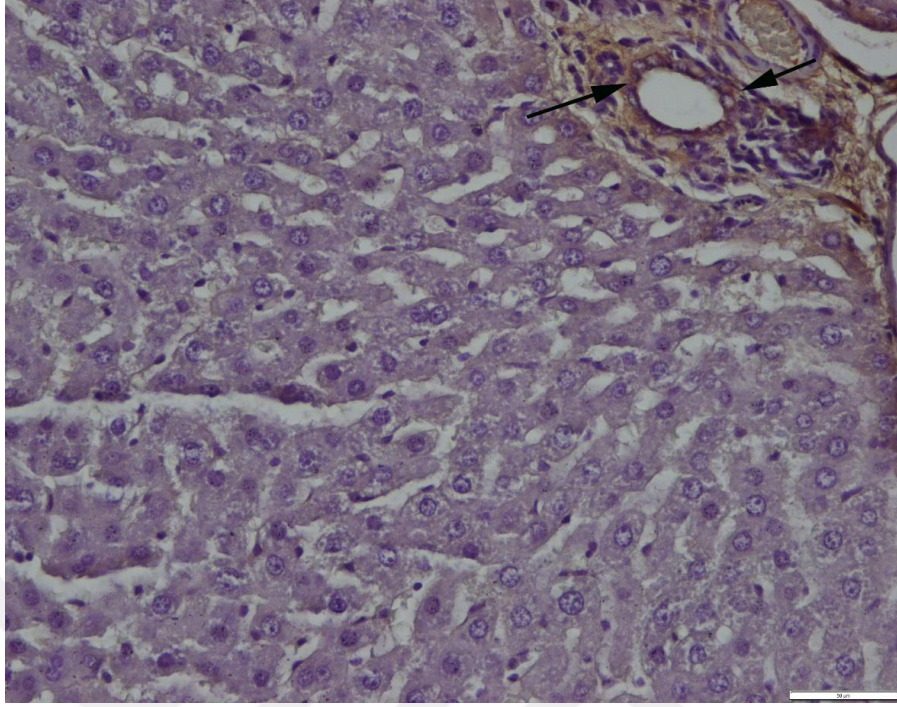
Şekil 25. PKG'de damar endotelinde pozitif iNOS immunoreaksiyonu (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



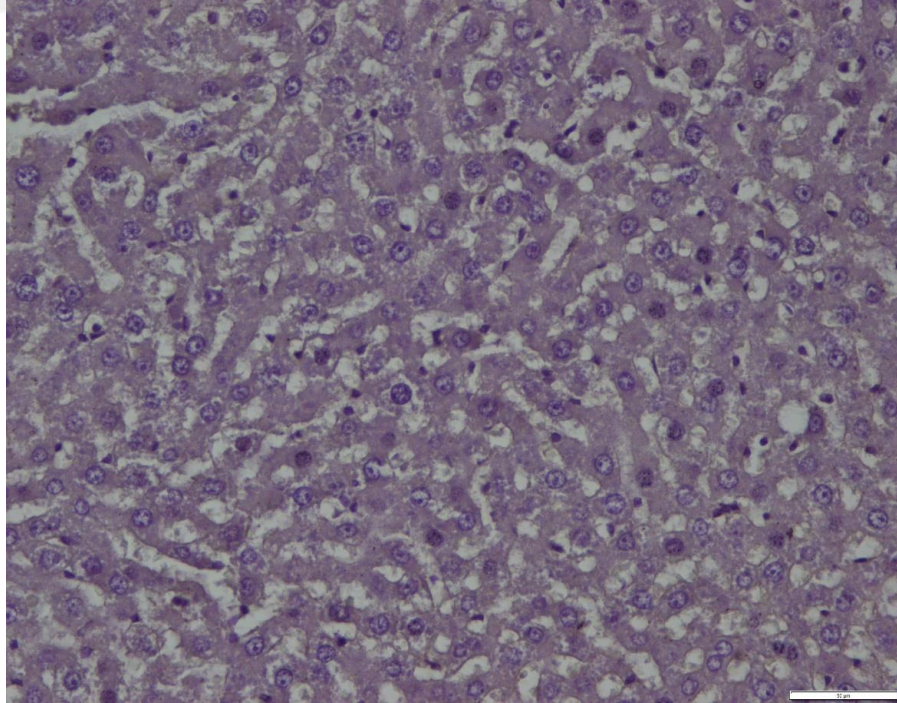
Şekil 26. FAG'de hepatositlerde azalmış iNOS immunoreaksiyonu, az sayıda pozitif hücre (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



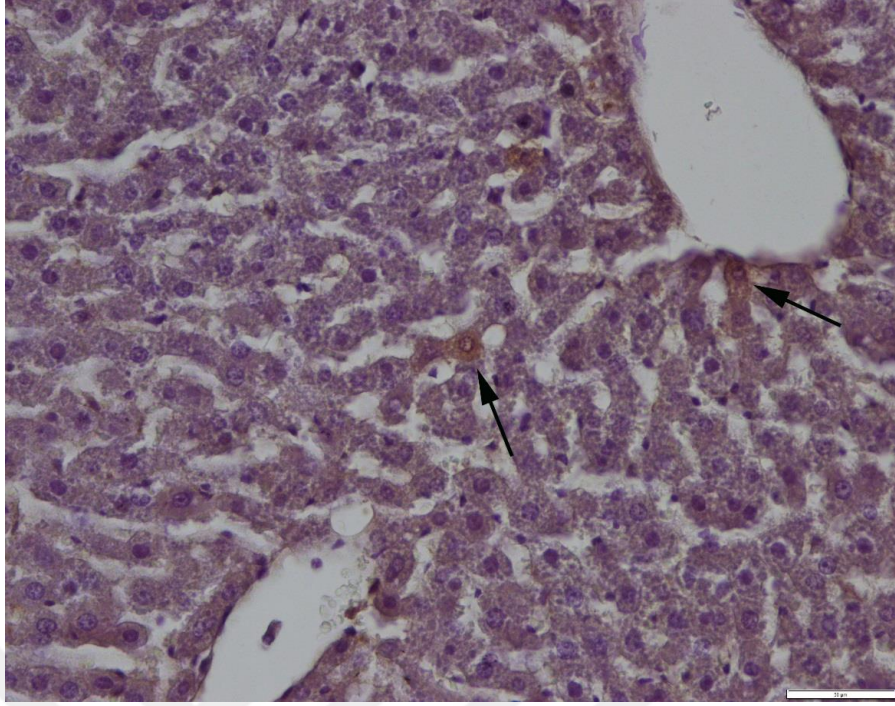
Şekil 27. FAG'de bir ratın safra kanal epitellerinde hafif iNOS pozitif reaksiyon (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



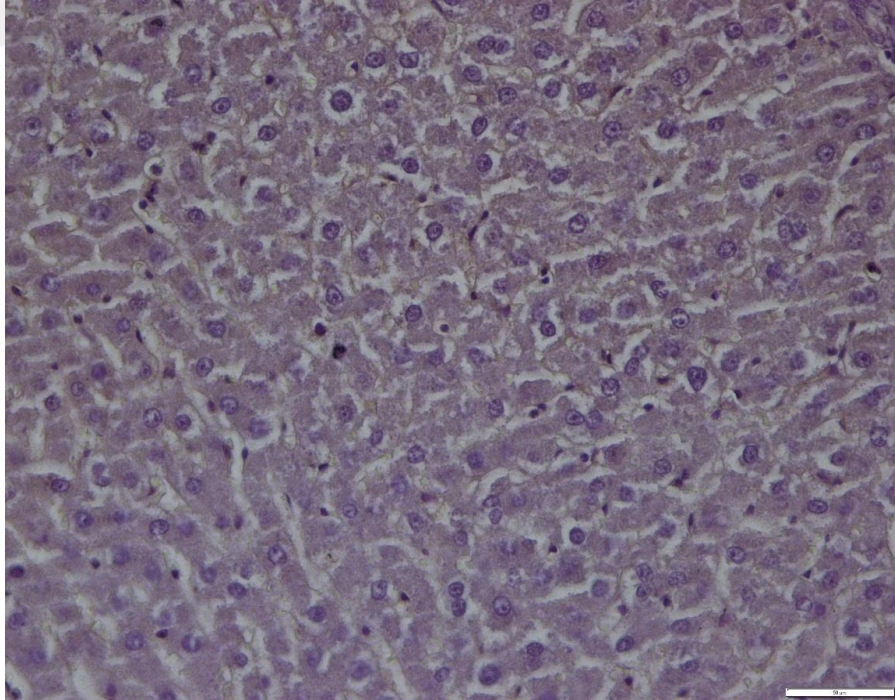
Şekil 28. NASG'de bir ratın safra kanallarında hafif iNOS pozitif immunoreaksiyon (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μm.



Şekil 29. NASG negatif İNOS reaksiyonu, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μm.



Şekil 30. NFG’de bir ratta az sayıda hepatositte çok hafif iNOS pozitif İmmunoreaksiyon, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



Şekil 31. NFG negatif iNOS reaksiyonu, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.

5. TARTIŞMA

Günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda obezite önemli bir sağlık problemi olarak görülmektedir. Vücutta aşırı yağ dokusunun birikimi olarak tanımlanan obezitenin karaciğer hücrelerinde yağ asidi artışından dolayı yağlı karaciğere sebep olduğu bilinmektedir. Yapılmış olan birçok çalışmada obezite ve yağlı karaciğer oluşumunun birbiri ile pozitif korelasyon gösterdiği düşünülmektedir (99).

Çalışmamızda kullandığımız mukolitik olarak bilinen N-Asetilsistein steatohepatite karşı çok defa araştırılsa da sonuçlar birbirinden farklı rapor edilmiştir (9,100,101). Kullanılan bir diğer kimyasal madde olan folik asite dair ise literatürde az bilgi bulunmaktadır (102). Çalışmamızda N-Asetilsistein ile yapılan uygulamanın karaciğer yağlanmasıdaki biyokimyasal değerler(AST, ALT, TK, TG) üzerine etkili olmadığı fakat antioksidan SOD parametresine etkili olduğu görüldü. Literatür bakımından daha az çalışılan folik asitin DNA kırıklarımı ve oksidan MDA oluşumunu engelleyerek karaciğeri hasardan koruduğu düşünüldü. Çalışmamızda bu iki ilacın bir arada kullanımının karaciğer hasarında antioksidan, iNOS düzeylerinde ve histopatolojik yapıda düzelmeye sağlasa bile folik asitin etkili olduğu mekanizmalardan dolayı TK değerlerini yükseltebileceği saptandı.

Yapılan çalışmalarda dört-sekiz hafta boyunca yüksek yağlı diyetle (High Fat Diet, HFD) (100 mg/kg yağ, 20 mg/kg kolesterol) beslenen rat gruplarında karaciğer enzim seviyelerinin arttığı ve histopatolojilerinde NAFLD olduğu gösterilmiştir (103,104). Lieber ve ark. (91) 3 hafta boyunca % 70 yağlı diyetle besledikleri ratlar da karaciğer enzimlerinde yükselme ve NAFLD geliştiği sonucunu elde etmişlerdir. Bu modeli uyarlayarak yaptığımız çalışmamızda ancak 12. hafta sonunda benzer sonuçlar elde edildi. % 70 yağlı diyet uyguladığımız çalışmamızda 12. hafta sonunda ulaşılan karaciğer enzim seviyelerindeki artış NAFLD geliştiğini doğrulamakta ve elde edilen histopatolojik bulgular ile desteklenmektedir. Çalışmamız sonucunda PKG karaciğer enzim seviyelerinde artış gözlenmesi Lieber ve arkadaşlarının çalışmalarıyla uyum göstererek beklenildiği gibi NAFLD olgularında enzim seviyesi artışını desteklemektedir. Ayrıca yaptığımız vücut ağırlığı artışı ve Lee indeks

ölçümlerinin beklenen değerlerde yüksek çıkması obezite modeli ile uyum göstermektedir. Çalışmamız sonunda elde ettiğimiz bulgular obezitenin yağlı karaciğerle ilişkili vücut ağırlığını ve yağlanmayı artırdığı yönünde gözlemlenmiştir.

Xie Bin ve ark.'ları yağlanma ve obezite üzerine yaptıkları çalışmanın sonucunda HFD beslenen ratlarda Nelumbo Nucifera alkaloidinin vücut ağırlığını, Lee indeksini, adipoz doku ağırlığını ve plazma lipid değerlerini azalttığını bildirmişlerdir (20). Shigetada Furukawa ve ark.'larının yaptıkları çalışmada NADPH oksidaz inhibitorün adipoz dokuda ROT ve adipokinlerde düzensizliği azalttığı, diyabet gelişimi, hiperlipidemi ve hepatik steatozu önlediği rapor edilmiştir (15). Bir başka çalışmada HFD ile beslenen farelerde vücut ağırlığı, hepatik yağlanma, insülin direnci, lipid birikimi, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtın yüksek olduğu bildirilmiştir (105). Çalışmamızda Lee indeks değerlerindeki artış ve obezite bulgularının literatürle uyumlu olarak yüksek oluşu obezite modelinin uygunluğunu doğrulamıştır.

Karaciğer enzimleri AST, ALT, TK ve TG karaciğer hasarının belirlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Yapılan pek çok çalışmada AST, ALT değerleri HFD ile beslenen grupta artış göstermiştir. Yapılan beşeri bir çalışmada NASH olan hastalardan bir gruba 3 ay süre ile N-Asetilsistein, diğer gruba ise vitamin C verilerek üç ay takip edilmiştir. Takip süresi boyunca N-Asetilsistein alan grupta ALT değerinde anlamlı düşüş saptanırken, AST ve alkalın fosfataz (ALP) değerlerinde düşüş saptanmadığı görülmüştür. Takip süresince yapılan aylık ultrasonografi incelemelerinde karaciğer boyutu ve ekojenitesinde ve portal ven çapında anlamlı değişiklik izlenmemesine karşın, dalak boyutunda 3 ay sonunda anlamlı küçülme rapor edilmiştir. Vitamin C verilen grupta bu değişiklikler izlenmediğinden ALT'deki düşüş ve dalak boyutundaki azalmanın N-Asetilsistein kullanımına bağlı olduğu düşünülmüştür (101). Pamuk ve ark.'ları yaptıkları otuz hastalı kontrollü beşeri bir klinik çalışmada 4 hafta N-Asetilsistein uygulamasının NASH olan hastaların AST ve gamaglutamil transferaz (GGT) değerlerini düzeltmesine rağmen bu düzelmenin kontrol grubunda da saptanmasından dolayı iki grup arasında anlamlı fark olmadığını saptamışlardır. N-Asetilsistein uygulamasının NASH'da faydalı olmadığını düşündüklerini bildirmişlerdir (106). NASH'ın geliştiği durumlarda diyet uygulamasına eklenen N-Asetilsistein'in faydalı olmadığını

gösteren karaciğer enzim sonuçlarının gösterildiği rat çalışmaları da mevcuttur (9,101). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada HFD ile beslenen ratlarda meretrix oligopeptidine karşı HFD grubunda vücut ağırlığı, ALT, AST düzeylerinin önemli ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir (107).

Çalışmamızda 4 hafta boyunca N-Asetilsistein uygulamasıyla karaciğer enzimlerinden AST, ALT ve TG'de PKG'ye kıyasla tüm gruplarda düzelme gözlemlenirken TK değerlerinde gözlenen düzelme daha azdır. Çalışmamızda yağlı beslemeye karşı kullandığımız N-Asetilsistein uygulamasında enzimlerde gözlemlenen düzelmeye rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Literatürde folik asit eksikliğinde karaciğerde TG birikimi ve yağ asidi sentezi içeren gen ekspresyonunun arttığını gösteren çalışma mevcuttur (108). Buna karşılık çalışmamızda 4 hafta boyunca uygulanan folik asit uygulamasının karaciğer enzimlerinden AST ve ALT değerlerini PKG'ye kıyasla düşürmüş olsa bile anlamlı bir düzelme sağlamadığı görülmüştür. Diğer yandan TK ve TG değerleriye folik asit uygulamasından sonra PKG'ye kıyasla yükselmiştir.

Çalışmamızda NFG'si TK değerlerinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunması folik asit ve N-Asetilsisteinin GSH mekanizmasını metil döngüsü üzerinden potansiyelize edebileceğini düşündürmüştür. FAG'de yüksek TK değerleri mevcut olması potansiyalizasyonun folik asit kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür.

Yükselen oksidatif stres, metabolik sendromla ilişkili obezitede yağ dokusu azalışının önemli bir belirteçidir. Yüksek MDA değerleri HFD ile beslenmenin hasar oluşturduğunu gösterir. Yapılan bir çalışmada HFD ile beslenen kontrol grubunda MDA düzeylerinin önemli ölçüde yüksek olduğu rapor edilmiştir (107). Yapılan birçok çalışmada N-Asetilsistein uygulamasının MDA düzeyinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (9,109,110). N-Asetilsistein uygulaması LP'yi artırarak NASH gelişimini engellemektedir (110). Çalışmamızda ise folik asit uygulamasının MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düzelme sağladığı, N-Asetilsistein uygulamasınınsa PKG'ye göre düşük değer ifade etse de yapılan pek çok çalışmanın aksine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı. Çalışmamızda NFG grubu MDA değerlerini PKG'ye yakın saptamamız folik asitin tek başına MDA değerleri anlamında daha etkili olabileceğini düşündürmüştür.

HFD ile beslenen hayvanların karaciğerlerinde SOD enzim aktivitesi önemli ölçüde düşük rapor edilmiştir (107, 111). Çalışmamızda edindiğimiz sonuca göre PKG’de diğer gruplara nazaran yüksek değerler saptanmış yapılan çalışmalara uyumlu görülmüştür. PKG hayvanlarına göre NASG, FAG ve NFG’nin tümünde istatistiksel olarak anlamlı yüksek SOD seviyeleri saptandığından, N-Asetilsistein ve folik asitin oksidatif strese karşı SOD antioksidan enzim aktivitesini yükseltmesi dolayısıyla etkili kimyasal maddeler olabileceği düşünülmüştür.

HFD tarafından indüklenen ve önceden varolan hepatik yağlanmaya antioksidan olarak kullanılan myricetin etkisini inceleyen bir çalışmada uygulamanın HFD kaynaklı yağlanmayı hafiflettiği ve antioksidatif enzim aktivitelerini, CAT dahil olmak üzere SOD ve GPx faaliyetlerini arttırdığı rapor edilmiştir (111). Folik asitin çeşitli dozlarının uygulandığı bir çalışmada 2 mg/kg folik asitin MDA yı düşürerek SOD’u artırırken CAT’ı azaltan miktarın 3 mg/kg olması folik asitin dozunun antioksidan etkileri bakımından çeşitlilik gösterebileceğini düşündürmüştür (112). Çalışmamızda NASG’nin diğer gruplara kıyasla yüksek ortalma vermesi CAT aktivitesi üzerinde kısmi etkili olabileceğini düşündürmüştür. Yine kullandığımız NASG’nin antioksidan olarak SOD ve CAT mekanizmalarında folik asitten daha etkili olabileceği kanaatine ulaşmamızı sağlamıştır.

Oksidatif stress altında replikasyon ve onarım mekanizmaları da bozulmakta, özellikle DNA polimeraz enzimi, H₂O₂ etkilenmektedir (113-115). Karaciğer yağlanmasının tek karbon metabolizmasındaki dengesizlikle uyarılabileceği, metilden yoksun beslenmenin karaciğer hücresinde DNA metilasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir (108). Folat, metionin, serin, betain ve kolin gibi metil verici besinler tek karbon metabolizmasında S-adenosilmetiyonin SAM-SAH döngüsünde değerlendirilir (116). Tek karbon metabolizmasındaki dengesizliğin SAM ve SAH’ı hücresel düzeyde etkileyerek yağlı karaciğer gelişiminde etkili olduğunu gösteren çalışma mevcuttur (117).

NASH’a karşı kullanılan quercetin’in karaciğer enzimleri, oksidatif stres ve DNA hasarına karşı değerlendirildiği bir çalışmada ratlar metionin ve kolinden zengin beslenerek karaciğerlerinde steatohepatit oluşturulmuştur. Metionin, kolin diyetiyle beslenen ratlarda % 100 NASH geliştiği ve DNA hasarında önemli bir artış olduğu rapor edilmiştir (30). Çalışmamızda 4 hafta boyunca folik asit uygulanan

grubun DNA hasarını ortaya koyan Comet Assay skorlarının anlamlı derecede düşük çıkması folik asitin DNA'yı koruyucu etkisini göstermiştir. Comet Assay skorları PKG'ye göre NASG ve NFG'de kısmi düzelme sağlasa da en anlamlı düzelme FAG'dedir. Folik asit uygulanan grubun NFG'ye göre de Comet Assay testlerinde anlamlı derecede düzelme sağlaması folik asitin kuvvetli bir DNA koruyucu kimyasal madde olduğunu göstermiştir. NASG'de kısmi düzelme olmuşsa da N-Asetilsistein'in DNA kırıklarına etkili bir kimyasal olmadığı saptanmıştır.

HFD ile beslenmenin karaciğer fonksiyonlarını ve histopatolojisini bozarak fibrozis geliştirdiği gösterilmiştir (119). Thong-Ngam ve ark. (100) ratlarda yapılan çalışmalarında NASH gelişimini takiben 6 hafta boyunca 20 mg/kg/gün dozda N-Asetilsistein tedavisinin karaciğer histopatolojisinde düzelme sağladığını rapor etmişlerdir. SAM düzeyi karaciğer lipid metabolizması ve karaciğer kanseri önlenmesinde kritik bir belirteçtir, karaciğerde SAM üretiminin azalmasının lipogenezisi ve oksidatif stresi yükselterek karaciğer karsinomuna basamak teşkil ettiği rapor edilmiştir (84,85). Çalışmamızda 4 hafta boyunca NASG ve folik asit uygulamasının karaciğer histolojisinde genel anlamda iyileşme sağladığı, NASG grubunun karaciğerde hepatositlerde yağlı dejenerasyon, portal alan ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu, sinozoidal dilatasyon ve vasküler konjesyonu kısmi düzelttiği gösterilmiştir. NFG'de karaciğer dejenerasyon, infiltrasyon, dilatasyon ve vasküler konjesyonda istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelme gözlemlenmiştir. Çalışmamızda uyguladığımız folik asitin karaciğerde portal alan ve parankimde mononükleer infiltrasyonu ve hepatositlerde yağlı dejenerasyonda bir miktar iyileşme sağlasa da, sinozoidal dilatasyon ve vasküler konjesyonda PKG ile aynı derecede yapısal değişiklikler oluşturmuştur. Folik asit karaciğer histolojisinde kısmi düzelme sağlasa da anlamlılık ifade etmediği saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar Thong-Ngam ve ark.'nın yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Evcimen ve ark.'nın yapmış oldukları kadmiyum klorür hasarına karşı üzüm çekirdeği özütü ve polydatin'in koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında elde ettikleri sonuçta histolojik değişimlerin başlamış olmasına rağmen oksidatif stres sonuçlarının kan ve karaciğer dokusunun dışında aynı etkinliği göstermediği rapor edilmiştir (118). Çalışmamızda da biyokimyasal ve histolojik değişimlerin birbiriyle örtüşmemesi bu parametrelerin güvenilirliğinin yeni bir tartışma konusu olabileceği,

histolojik gözlemin net sonuçları görsel olarak ifade ettiği ve yeni yapılacak çalışmalarda bu sonuçların dikkate alınması gerekliliği düşünülmüştür.

NO dokularda hücre içi mekanizmada süreçleri düzenleyen oldukça sık kullanılan bir hücre molekülüdür. iNOS dokularda NO üretimini artıran bir enzimdir. Nitrik oksit sentaz enzimini içermesi hasarlı dokunun belirteci olarak kabul edilmiştir (87). Yapılan bir çalışmada yüksek kolesterol diyetiyle beslenen ratlarda NO seviyelerinin azaldığını ve yüksek kolesterol diyetle beraber N-Asetilsistein kullanıldığında NO seviyelerinin kontrol grubuna yakın düzelme sağladığı rapor edilmiştir (122). Buna ek olarak HFD beslenen tavşanlarda NO seviyelerinin azalmış olduğu da rapor edilmiştir (123). NO'yu karaciğer mikro çevresi için toksik ve koruyucu olabileceğini kabul eden görüş bildirilmiştir (126). Çalışmamızda PKG değerlerinin diğer tüm gruplara göre yüksek iNOS pozitif immunreaksiyon göstermesi yağlı diyetle beslenmenin NO değerlerini yükseltebileceğini düşündürdü. Sonuçlar göz önüne alındığında mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi farklı sonuçların farklı yorumlara sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Azalan eNOS üretimi kanda TG miktarının artmasından önce karaciğer hasarını gösteren önemli bir belirteç olarak kabul edilmiştir (124). Kolesterol birikimi HIF1 α aktivitesinin artışına sebep olarak oksijene ulaşımı azaltır ve NO mitokondrilerde ROT üretimine sebep olmaktadır. Yüksek kolesterol diyetiyle hasara uğratarak iskemi yapılan karaciğerde folatın endotel bağımlı vazodilatasyonu artırarak endotelial fonksiyonu etkileyebileceği ve endojen NO yapımı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (125). iNOS'un bulunmadığı iNOS nakavt farelerde TK değerlerinin yüksek çıktığı bir çalışmada iNOS'un düşük ya da olmaması TK değerlerinin yüksek olabileceğini desteklemiştir (126).

0.03 g/L folik asit ile desteklenmiş sistoin beta sentaz (CBS) + /-farelerde, iNOS'da belirgin bir azalma ve eNOS protein seviyesinde artış gösterilmiştir. Sonuçlar, homosistein mekanizmasında folik asitin antagonize rol oynayarak NO biyo yararlanımını düşürdüğü yönünde yorumlanmıştır (127). Yapılan bir çalışmada folik asit ve B12 vitamininin nikotin tarafından üretilen TNF- α , iNOS protein ve mRNA içeriğinin artmış ekspresyonunu önlediğine dair görüşte bildirilmiştir (128). Karaciğerde fibrozis oluşumunda iNOS'un rolü net olarak anlaşılmamıştır. iNOS'un

NASH ile ilişkili karaciğer fibrozu oluşturulan hayvan modellerinde hem yararlı hem de zararlı etkileri olduğu rapor edilmiştir (129). Diğer yandan yapılan klinik bir çalışmada düşük doz (0,4 mg/gün) folik asitin TK ve LDL konsantrasyonlarının azalması ve artan apoAI konsantrasyonları yoluyla kan lipitleri üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (130). Literatürdeki veriler dikkate alındığında çalışmamızda kullandığımız folik asit miktarının (10 mg/kg) kolesterol mekanizması metabolik biyo yararlanımı için fazla olabileceği de düşünülmüştür. Folik asitin homosistein mekanizması tarafından antagonist etkiyle NO biyoyararlanımı düşürerek iNOS sonuçlarını etkilemiş olabileceği de düşünülmüştür. Histopatolojik bulgularla iNOS sonuçlarımız birbirine uyumlu olarak görülmüştür.

Çalışmamızda 4 hafta boyunca N-Asetilsistein ve folik asit uygulaması tüm gruplarda iNOS reaksiyonunu belirgin derecede azaltmıştır. NFG sonuçlarının PKG'ye göre oldukça düşük bulunması folik asit ile ilişkilendirilmiş, folik asit kullanımının N-Asetilsistein biyoyararlanımında agonist etki oluşturarak hem metil döngüsü üzerinden kolesterolü yükseltip hemde iNOS seviyesinde kolesterol yüksekliğine bağlı azalmaya sebep olabileceği düşünülmüştür. Sonuçlarımız yapılan çalışmalarla uyumluluk taşımaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada kullandığımız N-Asetilsistein ve folik asitin karaciğer dokusu ve kan üzerinde yaptığımız; biyokimyasal parametreler, antioksidan enzimleri, histolojik yapı, Comet Assay ve iNOS immunreaksiyon analiz sonuçlarını göz önüne aldığımızda; N-Asetilsistein'in karaciğer histokimyasal yapısında antioksidan enzim aktivitelerinde ve iNOS immunreaksiyon analizlerinde düzelme sağlayabileceği kanaatine vardık. Comet Assay ile incelediğimiz DNA kırıkları üzerine ve biyokimyasal parametreler olan AST, ALT, TK ve TG düzeyleri üzerine etkili bir kimyasal olmadığı kanaatine vardık.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir kimyasal madde olan folik asitin ise karaciğer doku ve kan örnekleri incelendiğinde; biyokimyasal parametreler, antioksidan enzimler, histolojik yapı, Comet Assay ve iNOS immunreaksiyon analiz sonuçlarına göre antioksidan enzim aktivitelerinde, iNOS immunreaksiyon ve Comet Assay analizlerinde karaciğeri koruyucu olarak etkili olabileceği kanaatine vardık.

Biyokimyasal ve histolojik incelemelerde ise koruyucu etkili bir kimyasal madde olmadığı kanaatine vardık.

Çalışmamızda N-Asetilsistein ve folik asiti birlikte kullanarak agonist ve antagonist etkilerini incelediğimizde ise; iki kimyasalın birlikte kullanımının biyokimyasal değerlerden TK değerlerini antagonist etkiyle yükseltebileceğini, histokimyasal ve iNOS immunokimyasal boyama anlizlerine göre agonist etkiyle karaciğeri hasardan koruyabileceğini düşündük.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma HFD ile beslenmenin obeziteye ve karaciğer yağlanmasına yol açabileceğinin araştırılması ve N-Asetilsistein ve folik asit kimyasal maddelerinin etkilerinin incelenerek yeni ilaç geliştirmelerinin bulgularına ulaşılabilecek olması dolayısıyla disiplinler arasıdır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz biyokimyasal sonuçlara baktığımızda;

- Folik asit uygulamasının NASH'da TK ve TG değerlerini yükselterek yararlı etkiden ziyade zararlı olabileceği düşünüldü. Biyokimyasal parametrelerden AST ve ALT değerlerinde kısmi düzelme sağladı
- N-Asetilsistein uygulamasının biyokimyasal parametrelerde karaciğer enzimler üzerine AST, ALT, TK ve TG incelendiğinde etkili olması beklenmesine rağmen etkili olmadığı saptandı,
- N-Asetilsistein ve folik asiti beraber kullandığımız NFG grubunun TK değerlerinin beklenilenden ve hatta PKG'den yüksek sonuçta bulunması, bu iki kimyasalın birlikte kullanımının gerek gebelikte gerekse çeşitli patolojilerde kolesterol mekanizmasına zararlı etkiye olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda etkisine baktığımız diğer bir parametre olan oksidan - antioksidan analiz bulgularında:

- N-Asetilsistein uygulamasının artan MDA düzeyinde azalmaya sebep olarak oksidatif stresi azalttığı, SOD enzim seviyelerini ise anlamlı yükselterek karaciğeri oksidatif stresin hasarlarından koruduğunu,
- Folik asit uygulamasının yağlanmayla artan oksidatif streste MDA değerlerini anlamlı düşürerek SOD enzim değerlerini anlamlı yükselttiğini gösterdik.

Çalışmamızda yaptığımız Comet Assay analizi sonuçlarında: Yağlı beslenmenin DNA da kırıklar oluşturabileceğini,

- Folik asitin oluşan DNA kırıklarına karşı anlamlı derecede onarıcı etkisi olduğunu,

- N-Asetilsistein uygulamasının DNA kırıklarında kısmı düzelme sağlasa da anlamlı bir etki oluşturmadığını,
- N-Asetilsistein ve folik asit'in birlikte kullanımının DNA kırıkları üzerine kısmi düzelme sağlayabilse de anlamlı etki oluşturmadığını gözlemledik.

Çalışmamızda uyguladığımız kimyasalların karaciğer histopatolojisi üzerine etkilere baktığımızda:

- N-Asetilsistein uygulamasının karaciğer histopatolojisinde anlamlı derecede iyileşme sağlayabileceğini,
- Folik asit uygulamasının karaciğer histopatolojisinde bir miktar düzelme sağlasada istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığını,
- N-Asetilsistein ve folik asitin birlikte kullanılmasının yağlı karaciğer histopatolojisinde anlamlı derecede düzelme sağlayabileceğini gözlemledik.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz iNOS immunokimya boyama metodu parametresine göre ise;

- N-Asetilsistein uygulamasının iNOS değerleri açısından anlamlı düzelme sağladığını
- Folik asit uygulamasının yine iNOS aktivitesi bakımından anlamlı düzelme sağlayabileceğini
- N-Asetilsistein ve folik asitin beraber uygulanmasının ise iNOS değerleri bakımından en anlamlı iyileşmeyi sağlayabileceğini gördük.
- Elde ettiğimiz sonuçlar bize histopatolojik analiz ve immunokimyasal boyama olan iNOS bulgularının görsel sonuç vermeleri dolayısıyla biyokimyasal parametrelerden daha güvenli olabileceği ve ilerde yapılacak araştırmalarda buna dikkat edilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz bulgular sonucunda yağlı karaciğerde hasar oluşumuna karşı folik asitin etkili bir kimyasal madde olabileceği düşünülmüştür.

ÖZET

RATLARDA OBEZİTE İLE OLUŞTURULAN HEPATİK STEATOZİS VE OKSİDATİF STRESE N-ASETİLSİSTEİN VE FOLİK ASİTİN ETKİLERİ

Amaç: Çalışmamızda yüksek yağlı beslenme ile obezite oluşturulan ratlarda karaciğer yağlanması üzerine N-Asetilsistein ve folik asitin hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanım etkilerini araştırmak istedik.

Materyal: Çalışmada kullanılan 35 adet Wistar Albino rat dört gruba ayrıldı. Gruplar sırasıyla: FAG (N=8) yüksek yağlı yem + folik asit 10 mg/kg, NASG (N=8) yüksek yağlı yem + N-Asetilsistein 100 mg/kg, NFG (N=8) yüksek yağlı yem + N-Asetilsistein 100 mg/kg + folik asit 10 mg/kg, PKG (N=10) yüksek yağlı yemle beslenen hayvanlar şeklinde düzenlendi. Ratlar 12 hafta boyunca yüksek yağlı yemle beslendi. Beslenme periyodunun sonunda Lee indekse göre obez oldukları kesinleştirildikten sonra folik asit ve N-Asetilsistein uygulamaları yapıldı. 4 haftalık uygulamanın ardından anestezi altında karaciğer dokusu ve kanları alınarak biyokimya, oksidan-antioksidan, histoloji, Comet Assay ve iNOS boyama laboratuvar çalışmaları yapıldı.

Bulgular: Yüksek yağlı diyet ile beslenmenin obezite ve karaciğer yağlanmasına ve oksidatif strese yol açtığı görüldü. Alkole bağlı olmayan steatohepatit tedavisinde N-Asetilsistein ve folik asitin oksidatif streste kısmi düzelme oluşturduğu saptandı. Fakat NASG ve FAG'de karaciğer enzimlerinde anlamlı derecede bir farklılık yapmadığı, NFG'de ise total kolesterol ortalamalarının anlamlı derecede yüksek bulunması, bu iki ilaçın birlikte kullanılmasının glutatyon mekanizması üzerinden kolesterol düzeylerini yükseltebileceği sonucuna varıldı. Folik asitin Malondialdehit değerlerini düşürerek ve Superoksit dismutaz değerlerini yükselterek karaciğeri oksidatif stresten korduğu, N-Asetil Sistein'in Superoksit dismutaz değerlerini istatistiki olarak anlamlı derecede yükselttiği görüldü. Folik asitin oksidatif stres sonucunda oluşan DNA kırıklarını onardığı, N-Asetilsistein uygulamasının DNA kırıklarında kısmi düzelme yaptığı saptandı. Yağlı karaciğerde hasarı gösteren iNOS immunohistokimyasal boyamada en etkili sonucun NFG'de olduğu görüldü. Karaciğer histokimyasında iyileşmeyi sağlayan ilacın N-

Asetilsistein olduğu, folik asidin karaciğer histokimyasında bir miktar iyileşme sağlasa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığını gözlendi.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular sonucunda yağlı karaciğerde hasar oluşumuna karşı folik asitin etkili bir kimyasal madde olabileceği düşünölmüştür. Karaciğer yağlanması karşı folik asit uygulamasında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. N-Asetilsistein ve folik asidin birlikte kullanımının folik asit kaynaklı olarak kolesterolü yükseltebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Obezite, yağlı karaciğer hasarı, N-Asetilsistein, folik asit



SUMMARY

HEPATIC STEATOSIS AND OXIDATIVE STRESS N-ACETYLCYSTEINE AND FOLIC ACID EFFECTS OF RATS OBESITY

Objective: We wanted to investigate the effects of both N-acetylcysteine and folic acid on liver fat accumulation in rats with high fat diet and obesity.

Material: 35 Wistar Albino rats used in the study were divided into four groups. Groups were as follows: FAG (N = 8) high fat feed + folic acid 10 mg / kg, NASG (N = 8) high fat feed + N-acetylcysteine 100 mg / kg, NFG Acetylcysteine 100 mg / kg + folic acid 10 mg / kg, PKG (N = 10) animals were fed with high fat diet. The rats were fed high fat diet for 12 weeks. At the end of the feeding period, folic acid and N-acetylcysteine were applied after they were confirmed to be obese according to Lee indeksa. After 4 weeks of application, liver tissue and blood were taken under anesthesia and biochemistry, oxidant-antioxidant, histology, Comet Assay and iNOS staining laboratory studies were performed.

Results: It was seen that feeding with high fat diet led to obesity and fatty liver and oxidative stress. N-Acetylcysteine and oxidative stress of folic acid were found to be partially improved in non-alcoholic steatohepatitis treatment. However, NASG and FAG did not make a significant difference in liver enzymes, whereas NFG had a higher mean total cholesterol level, and concurrent use of these two drugs resulted in increased cholesterol levels through glutathione mechanism. It was observed that N-Acetylcysteine increased the superoxide dismutase levels at a statistically significant level by decreasing the malondialdehyde levels of folic acid and increasing the superoxide dismutase levels. It was found that folic acid inhibits DNA breaks resulting from oxidative stress and that N-Acetylcysteine treatment partially corrects DNA breaks. It was found that iNOS immunohistochemistry showing damage to the oily liver was the most effective result in NFG. It was observed that the drug that improves hepatic histochemistry is N-Acetylcysteine and that folic acid did not make

a statistically significant difference in hepatic histochemistry even though it provided some improvement

Conclusion: As a result of our findings, folic acid was thought to be an effective chemical against the damage of fatty liver. We think that more research should be done on the application of folic acid to liver fattening. We believe that the combined use of N-Acetylcysteine and folic acid may increase cholesterol from folic acid.

Key words: Obesity, fatty liver damage, N-Acetylcysteine, folic acid



KAYNAKLAR

1. Türkiye endokrinoloji ve metabolizma derneği, Obezite tanı ve tedavi kılavuzu. 5. Baskı 2017,Ankara. Miki Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti.
2. Aslan M, Orhan N.Obezite tedavisine yardımcı olarak kullanılan doğal ürünler. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi. 2010; 23-24: 91-105.
3. Shukla P, Buniak WI, Aronne LJ.Treatment of obesity in 2015. Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention. 2015; 35 (2): 81–92.
4. Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromatograf yöntemlerle tespit edilmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2009; 20(2):79.
5. Avşaroğlu AB. Obez hastalarda diyet, egzersiz ve antiobezite ilaç uygulamalarının oksidan stres ve antioksidan savunma mekanizmaları üzerindeki etkileri. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, Ankara, (Prof. Dr. Çimen KARASU) 2009: 20-25.
6. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martinez JA.Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2011; 21: B1-B15.
7. Valdecantos MP, Perez-Matute P, Martinez JA. Obesity and oxidative stres: role of antioxidant supplementation. Rev Invest Clin. 2009; 61(2): 127-39.
8. Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry. 2008; 107: 1106-1113.
9. Yılmaz S. Nonalkolik steohepatitli ratlarda metformin rosiglitazon nasetilsistein ve etodolakın tedavi edici etkilerinin değerlendirilmesi. Dicle Üniversitesi Uzmanlık Tezi, Diyarbakır, (Prof. Dr. Naime CANORUÇ) 2010; 3-28.
10. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. J. Nutrition. 2006; 136: 1636–1640.
11. World Health Organisation. Obesity: Preventing and managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva.1997; 3-5.
12. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. Recent Programme Hormon Research. 2004; 59: 409-24 Review.

13. Sözen MA. Obezite ve obezitenin genetiği. The Medical Journal of Kocatepe. 2006; 7: I-II .
14. Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2006; 188: 231-244.
15. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakayama YNO, Makishima M, Matsuda M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *The Journal of Clinical Investigation*, 2004; 114 (12) : 1752-61.
16. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current. *Arch Intern Med* 2002; 162(18): 2074-9.
17. Am J. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. *Clinical Nutrition*. 1998; 68(4): 899-917.
18. Dünya Sağlık Örgütü BMI İndeksi Erişim adresi : http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html son erişim tarihi : 26.05.2018.
19. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutritional Research Reviews* 2010; 23: 270–299.
20. Bin X, Jin W, Wenqing W, Chunyang S, Xiaolong H ,Nelumbo F. Nucifera alkaloid inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation and improves high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation in rats, *Jianguo Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2011; 5(10): 2021-2028.
21. Adejuwon A. A. Olufunmilayo OA, Esther OA. Haematopoietic activity of the seed aqueous extract of *Hunteria umbellata* (K. schum) Hallier f. in experimental anaemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 130: 307-314.
22. Scalfani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology & Behavior* 1976; 17: 461–471.
23. Champe PC, Harvey RA. *Lippincott's illustrated reviews*. 1997.
24. Wadden AT, Stunkard JA. Obezite tedavisi el kitabı. Türkçe, 1. Baskı, İstanbul: And Yayıncılık, 2003.

25. C. Vassalle, L. Pratali, C. Boni, A. Mercuri, R. Ndreu. Agerelated oxidative stressmodulation by smoking habit and obesity, *Clinical Biochemistry* 2008; 41: 1162–1167.
26. R. Demirbag, R. Yilmaz, M. Gur, H. Celik, S. Guzel, S. Selek, A. Kocyigit. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *International Journal of Clinical Practice* 2006; 60: 1187–1193.
27. S.A. Bukhari, M.I. Rajoka, S.A. Nagra, Z.U. Rehman. Plasma homocysteine and DNA damage profiles in normal and obese subjects in the Pakistani population. *Molecular Biology Reports* 2010; 37: 289–295.
28. www.expertconsultbook.com/expertconsult/ob/book. Federative Comittee of Anatomical Terminology (FCAT). *Terminologia anatomica*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1998; 55.
29. Odar İV. *Anatomi Ders Kitabı 2. cilt 1. baskı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1986.
30. <https://www.nature.com/articles/srep17567/figures/1> Erişim Tarihi: 26.05.2018.
31. Brito-Gitirana L, Storch V. Effect of starvation on the ultrastructure of hepatocytes of *Hemidactylus frenatus* (Lacertilia: Gekkonidae) with special emphasis on peroxisomes. *German Anat Anz*. 1998; 180: 193-202.
32. Akbulut G, Çiftci H, Yıldız E. *Sindirim sistemi hastalıkları ve beslenme tedavisi*. Ankara Klasmat Matbaacılık. 2008.
33. Sherlock S, Dooley J. *Disease of the liver and biliary sysstem*. 11th ed, Oxford Blackwell Science Ltd. 2002: 2-14.
34. Feldman M, Lawrence S. Freidman, Lawrence J. Brandt; Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver disease Pathophysiology/ Diagnosis/ 70. Menagement*. 8. basım Philederphia. Saunders Elsevier. 2, 2006; 1543-1549.
35. https://www.turkcer.org.tr/files/files/anatomi_hayvan_modelleri_Tayfun_IDE_o.pdf Erişim tarihi: 26.05.2018
36. Satman İ, Kocabay G. Diabetes Mellitus and fatty liver. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26: 176-188.
37. Bayan K, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde nonalkolik karaciğer yağlanması vakalarının özellikleri. *Uzmanlık tezi, Diyarbakır (Prof.Dr.Halil Değertekin)* 2002; 25-27.

38. Becker U, Deis A, Sorenson TL et al. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. *Hepatology*. 1996; 23: 1025-29.
39. Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Lango D, Jameson JL. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Harrison 's Principles of Internal Medicine*. 2005; 1869-1870.
40. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in nonalcoholic fatty liver disease. *Diabet. Med*. 2005; 22: 1129-33.
41. Angulo P, Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172(7): 899-905.
42. Sheth SG, Gordon F, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of Internal Medicine*. 1997; 126(2): 137-145.
43. Altındal M. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında yağlanma derecesinin metabolik sendrom ve insülin direnci ile ilişkisi. T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 4. İç Hastalıkları Kliniği. İstanbul, (Doç. Dr. Laika Döküm Karabulut) Uzmanlık tezi – 2008; 5-9.
44. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1998; 27:128.
45. Bikhazi AB, Azar ST, Birbari AE, et al. Characterization of insulin- resistance: role of receptor alteration in insulindependent diabetes mellitus, essential hypertension and cardiac hypertrophy. *Eur J Pharm Sci* .2000; 11: 299-306.
46. C.P. Day. Pathogenesis of steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology*. 2002; 16(5): 663-678.
47. Gören B, Fen T. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2005, 25: 841-850.
48. Freeman H.J. Hepatobiliary and pancreatic disorders in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12(10): 1503-1508.
49. Sonsuz A. Karaciğer yağlanması. *Cerrahpaşa İç Hastalıkları, İstanbul; Medikal Yayıncılık, Sempozyum Dizisi No:58*. 2007: 91-98.
50. Younossi ZM, Matteoni CA, Gramlich T. et. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*.1999; 116(6): 1413-9.

51. Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, M. Cavallo G, Zalunardo B, Lirussi F, Alessandri C, Violi F. Insulin Resistance, the Metabolic Syndrome, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90(3): 1578–1582.
52. Erdoğan F. Clinicopathologic correlation. *MJAU* 2001; 33: 87-90.
53. Mendler MH, Kanel G, Govindarajan S. Proposal for a histological scoring and grading system for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*. 2005; 25: 294–304.
54. Öztop A, Demir A, Saydam N, Öztop İ, Çelikten E. Astım Bronşiyale Olgularında Serum Glutatyon Peroksidaz, Süperoksid Dismutaz ve Malonil Dialdehid Düzeyleri ve Astım Şiddeti ile İlişkisi. *Solunum Hastalıkları*. 2002; 13: 239-245.
55. Fitzpatrick AM, Teague WG, Holguin F, Yeh M, Brown L.A.S, Barnes PJ. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: Evidence for oxidant stres. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(1): 146–152.
56. Gümrükçüoğlu A. Serbest radikaller, http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm. Erisim tarihi: 06.06.2018.
57. Mantena SK, Vaughn DP, Andriaga KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo *Biochem. J*. 2009; 417: 183–193.
58. Erden M. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi*. 1992; 12: 201-207.
59. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Acute and chronic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol*. 1996; 24: 200-208.
60. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdia JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*.2008; 14(2): 193-199.
61. D’Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: Mechanismsthat generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 813-824.
62. Holmes RS, Masters CJ. Species specific feature of the distribution and multiplicity of mammalian liver catalases. *Arch. Biochem. Biophys*. 1972; 148: 217-233.
63. Tekeli H. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında glutatyon (gsh) ve glutatyon stransferaz (gst) aktivitesi üzerine n-asetil sisteinin etkisi. *Adnan*

Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.
AYDIN (Prof. Dr. Ayşegül Bildik) 2012; 32-35.

64. RxMediaPharma® N-Asetilsistein 2010 İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, www.rxmediapharma.com. Erişim tarihi: 26.05.2018.
65. Bilimilac.com.tr/N-Asetilsistein Erişim tarihi: 26.05.2018.
66. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ et al. Peroxynitrite induces heme oxygenase-1 in vascular endothelial cells. *Biochem J.* 1999; 339: 729–36.
67. Zaragoza A, Diez-Fernandez C, Alvarez AM, Andres D et al. Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: effect of Nacetylcysteine and deferoxamine. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 1063–70.
68. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-Acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 2: 130-139.
69. Güngören Dr. MS, Mersin bölgesinde vitamin b12 ve folik asit düzeylerine ait referans aralıklarının belirlenmesi. T.C. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. MERSİN uzmanlık tezi danışman (Prof. Dr. Lülüfer Tamer) -2008: 23-25.
70. Üstdal M, Karaca L, Testereci H, Kuş S, Paşaoğlu H, Türköz Y. *Biyokimya*, 1. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2005: 841-898.
71. Miller SM, Mears M. Nutritional Status Assessment. In: Anderson SC, Cockayne S (eds). *Clinical Chemistry Concept and Applications*. New York: Mc Graw Hill; 2003: 579-611.
72. Haslam N, Probert CS. An audit of the investigation and treatment of folic acid deficiency. *J R Soc Med* 1998; 91: 72-3.
73. Miller SM Vitamins. In: Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP. *Clinical Chemistry Principles, Procedures, Correlations*. 3th Ed. Philadelphia: Lippincott. 1996: 581-635.
74. Çağatay Ü, Güvenç B. Megaloblastik Anemiler. Çeviri Editörü: Sağlık Y. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. 15. Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: 674-680.
75. Aksoy A. Beslenme Biyokimyası, 1. Baskı, Ankara: Hatipoğlu Basım ve Yayım, 2000: 315-462.

76. McCormick DB, Greene HL. Vitamins. In: Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook Of Clinical Chemistry. 3th ed. Philadelphia: Saunders.1999; 999-1028.
77. Miller SM, Mears M. Nutritional Status Assesment. In: Anderson SC,Cockayne S. Clinical Chemistry Concept and Applications. New York: Mc GrawHill, 2003: 579-611.
78. Dr. Barslan G. Üreme çağındaki kadınların serum folik asit seviyelerinin değerlendirilmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği İstanbul (Opr. Dr. Ahmet Kılıçkaya) 2009: 25-26
79. Susan J, Duthie J. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *Inherit Metab Dis.* 2011; 34: 101–109.
80. Kožich V, Krijt J, Sokolova J, Zidek V, Vladimír Landa V, Šimaková M, Mlejnek P, Šilhavý J, Oliyarnyk O, Kazdová L, Kurtz W. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats *american journal of hypertension.* 2011; 26(1): 135-40.
81. Chew TW, Jiang X, Yan J, Wang W, Lusa AL, Carrier BJ, West AA, Malysheva OV, Brenna JT, Gregory JF, Caudill MA. Folate intake ,MTHFR genotype, and sex modulate choline metabolism in mice. *J. Nutr.* 2011; 141 (8): 1475-1481.
82. Lee J, Kim Y, Friso S, Choi SW. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease *Molecular Aspects of Medicine* 2016; 54:78-88.
83. Jacobs RL, Lingrell S, Zhao Y, Francis GA, Vance DE Hepatic CTP: phosphocholine cytidyltransferase- α is a critical predictor of plasma high density lipoprotein and very low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (4): 2147-2155.
84. Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98 (10): 5560-5565.
85. Martinez-Chantar, ML, Corrales FJ, MartinezCruz, LA, Garcia-Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L, Kanel G, Avila MA, Mato JM, Lu SC. Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J.* 2002; 16 (10): 1292-1294.
86. Lu SC, Mato JM, S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol. Rev.* 2012; 92 (4): 1515-1542.

87. Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Tomeno W, Watanabe S, et al. (2009) Influence of inducible nitric oxide synthase polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *HepatoRes* 2009; 39: 963–971.
88. Erişim adresi https://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide_synthase. Erişim tarihi: 26.05.2018.
89. Jordan Journal of Biological Sciences Effect of Hiptage madablota Gaertn. on High Fat Diet – Induced Obese Rats Retnasamy G, Adikay S. Institute of Pharmaceutical Technology. 2014; 7 (2);113 – 118.
90. Mohammadian Z, Eidi A, Mortazavi P, Tavangar SM, Asghari A P ol Original paper Effects of folic acid on dyslipidemia and serum homocysteine in a rat model of cholestasis and hepatic fibrosis. *J Pathol* 2015; 66 (1): 49-56.
91. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(3):502-9.
92. Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymology* 1990; 186: 421–431.
93. Bradford MM. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
94. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 1984; 105: 121–26.
95. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood various breed crosses of sheep. *Research Veterinary Science.* 1983; 34: 69–77.
96. Sun Yi, Larry W. Oberley, Ying Li. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry.* 1988; 34(3): 497-500.
97. Chen CY, Wang YF, Huang WR, Huang YT. Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003; 189(3): 153-159.
98. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicit by L-methionine in rats. *Journal of applied toxicology JAT.* 1999; 19(1): 7-12.
99. Bray GA. Classification and evaluation of the obesities. *Med Clin North Am* 1989; 73:161-184.

100. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(38): 5127-5132.
101. Samuhasaneeto S, Thong-Ngam D, Kulaputana O, et al. Effects of Nacetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Med Assoc Thai*. 2007; 90: 788-97.
102. Sid V, Wu N, Sarna LK, Siow YL, House JD, Karmin O. Folic acid supplementation during high-fat diet feeding restores AMPK activation via an AMP-LKB1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp. the American Physiological Society. Physiol*. 2015; 309(10): 1215-25
103. Fan JG, Zhong L, Xu Z-J, Tia L-Y, Ding X-D, Li M-S, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9(9): 2045-2049.
104. Raso GM, Esposito E, Iacono A, Pacilio M, Cuzzocrea S, Canani RB, Calignano A, Meli R. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. *European Journal of Pharmacology* 2008; 604(1-3): 125-131.
105. Ma XJ, Xing HZ, Ren GF, Rao XJ, Li ZZ. JIP3 knockout protects mice against high fat diet-induced liver injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 11;497(3): 819-826.
106. Pamuk GE, Sonsuz A. N-acetylcysteine in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 18: 1220-1.
107. Huang F, Wang J, Yu F, Tang Y, G Ding, Yang Z, Güneş Y. Protective Effects and Mechanism of Meretrix meretrix Oligopeptides against Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mar. Drugs*. 2017, 15(2), 31.
108. Da Silva RP, Kelly KB, Al Rajabi A, Jacobs RL. Novel insights on interactions between folate and lipid metabolism. *Biofactors*. 2014; 40 (3), 277-283.
109. Bayır S, Eskiocak S, Altaner Ş, Çakır E. The Anti-oxidant/Pro-oxidant Effects of N-Acetylcysteine in Rats Fed with Cholesterol-rich Diet. *Türk Klinik Biyokimya Derg*. 2006; 4(1): 15-23.
110. PMS de Oliveira C, F Simplicio V. MR de Limma et al. Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(12): 1905-1911.

111. Xia SF, Le GW, Wang P, Qiu YY, Jiang YY, Tang X. Regressive Effect of Myricetin on Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*. 2016; 11; 8(12). pii: E799.
112. Ajeigbe K, Oladejo E, Emikpe B, Asuk A, Olaleye S. The dual modulatory effect of folic acid supplementation on indomethacin- induced gastropathy in the rat *Turk J Gastroenterol*. 2012; 23 (6): 639-645.
113. Braithwaite EK, Kedar PS, Stumpo DJ, et al. DNA polymerases beta and lambda mediate overlapping and independent roles in base excision repair in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 2010; 5: 12229.
114. Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, Alfano P, Dondero F. Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 1993; 16(9): 683–6.
115. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 164(2): 542–51.
116. Lee, J.H., Friso, S., Choi, S.W., 2014. Epigenetic mechanisms underlying the link between non-alcoholic fatty liver diseases and nutrition. *Nutrients*. 2014; 6 (8): 3303-3325.
117. Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology*. 2007; 45 (5): 1306-1312.
118. Evcimen M, Aslan R, Gulay M.S. Protective effects of polydatin and grape seed extract in rats exposed to cadmium *Drug And Chemical Toxicology*. 2018; 1525-6014 Online.
119. Silva A, Doc T, Fos G, Bss S , El R, Oliveira Ac, Lam S, Mca L, Ir P, Ca P. LPSF/GQ-02 inhibits the development of hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease *PLoS One*. 2015; 10(4): e0123787.
120. Nozaki Y, Koji Fujita K, Wada K, Yoneda M, Kessoku T, Shinohara Y, Imaj K, Ogawa Y, Nakamuta M, Saito S, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y ,Nakajima A. Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid Accumulation-independent liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis mouse model *BMC Gastroenterology*. 2015: 15:42.
121. Duan Y, Sun D, Chen J, Zhu F, An Y. MicroRNA-29a/b/c targets iNOS and is involved in protective remote ischemic preconditioning in an

- ischemia-reperfusion rat model of non-alcoholic fatty liver disease *Oncol Lett.* 2017; 13(3): 1775-1782.
122. Korou L, Agrogiannis G, Pantopoulou A, Vlachos I, Iliopoulos D, Karatzas T, Perrea D. Comparative antilipidemic effect of N-acetylcysteine and sesame oil administration in diet-induced hypercholesterolemic mice Korou et al. *Lipids in Health and Disease.* 2010; 9: 23.
123. Hu MY, Li YL, Jiang CH, Liu ZQ, Qu SL, Huang YM. Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition.* 2008; 24: 1030-1038.
124. O Tirosh, E. Ilan, N. Budick-Harmelin, G. Ramadori, Z. Madar, Downregulation of eNOS in a nutritional model of fatty liver, e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism. 2009; 4 (2) : e101–e104.
125. Sasaki K, Duan J, Murohara T, Ikeda H, Shintani S, Shimada T, Akita T, Egami K, Imaizumi T. Rescue of Hypercholesterolemia-Related Impairment of Angiogenesis by Oral Folate Supplementation. Kurume and Nagoya, Japan. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003; 42 (2) : 1097(03)00629-6
126. Y. Mei and S. Thevananther, Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice. *Hepatology.* 2011; 54(5): 1777–1789.
127. Neetu Tyagi, Madhavi Kandel, Charu Munjal, Jonathan C. Vacek, Natia Qipshidze, Pushpakumar SB, Naria Metreveli, and Suresh C. Tyagi Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: Role of Folic Acid National Institutes Of Health Public J Orthop Res. 2011; 29(10): 1511–1516.
128. Bhattacharjee A, Prasad SK, Pal S, Maji B, Banerjee A, Das D, Bose A, Chatterjee N, Mukherjee S. *Biomed Pharmacother.* Possible involvement of iNOS and TNF- α in nutritional intervention against nicotine-induced pancreatic islet cell damage. 2016; 84: 1727-1738.
129. Sarit Anavi, Michal Eisenberg-Bord, Michal Hahn-Obercyger, Olga Genin, Mark Pines and Oren Tirosh. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis. *Laboratory Investigation.* 2015; 95: 914–924.
130. Mierzecki A, Kłoda K, Bukowska H, Chelstowski K, Wujec MM, Kozłowska M, Wojciechowska. Association between low-dose folic acid supplementation and blood lipids concentrations in male and female subjects with atherosclerosis risk factors *Med Sci Monit.* 2013; 19: 733-739.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Vet. Hek. Sümeyra KAYAN

Danışman

Doç. Dr. Önder ÖZTÜRK

EKLER

ETİK KURUL İZİNİ

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı







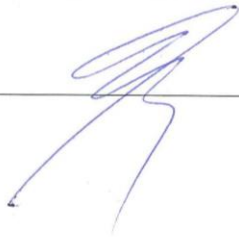

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
03.12.2015	21	10

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 03 ARALIK 2015 tarihinde Saat 09:30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nurhan GÜMRAL'ın yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Ahmet KOYU, Uzman Dr. İlkey ARMAĞAN, Arş. Gör. Nilüfer GENÇ ÖZDAMAR, Arş. Gör. Sümeyra KAYAN, Arş. Gör. Rahime ASLANKOÇ, Arş. Gör. Meltem ÖZGÖÇMEN'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Ratlarda obezite ile oluşturulmuş hepatik steatozis ve oksidatif strese N-asetil sistein ve folik asitin etkileri" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Wistar Albino)	Erkek	34	8 Hafta 200 gr+-50 gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof. Dr. İbrahim BARUT BAŞKAN	Prof. Dr. Mustafa Çağrı SAVAŞ BAŞKAN YARDIMCISI	Prof. Dr. Ersin USKUN ÜYE
		
Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN ÜYE	Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
		
Arş. Gör. Sümeyra KAYAN ÜYE	Vet. Hekim Yaşar GÜNAYDIN ÜYE	Öğretmen Hasan Ali ÇETİN ÜYE
KATILMADI		

ÖZGEÇMİŞ

SÜMEYRA KAYAN

Tel 0 507 082 1919
Adres Pirimehmet mah. 118. Cad no: 43 kat:2 Isparta /Merkez
E-Posta sumeyrakyn@gmail.com

Doğum Tarihi : 07.13.1987
Doğum Yeri : Isparta / Merkez
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

2007 - 2012 Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner fakültesi
2002 – 2006 Isparta Anadolu Lisesi
Sayısal

Yabancı Diller :

İngilizce

ÜDS: 57,5
ALES: 76
Yök Dil: 71,25

Bilgisayar Bilgisi :

Microsoft Office Word – Excel – Powerpoint

İş Deneyimleri :

Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı Veteriner Hekimliği
2 yıl

Sahip Olduğu Sertifikalar :

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Üyelik Belgesi
Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Fizyoloji Okulu Katılım Sertifikası
SdÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü I. Bilimsel Araştırmalar Kursu Katılım Belgesi
SdÜ Uyku Bozuklukları Tanı, Tedavi, Uygulama ve Araştırma Merkezi ‘Dünya Uyku Günü Sempozyumu’ Katılım Belgesi