

## 1. GİRİŞ

Ağır metabolik yüküne karşın, karaciğer hücre proliferasyonu açısından oldukça istikrarlı bir organdır. Sağlıklı karaciğer dokusundaki bu zayıf hücre döngüsü, toksik karaciğer hasarı sonrası hızla değişmektedir. Karaciğer anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile birçok toksik madde ve ilaçtan sıkça etkilenen bir organdır. Bu etkileşim sonrası gelişen hepatotoksisitenin sonuçları da karşımıza akut, kronik ve fulminan hepatit şeklinde çıkabileceği gibi çok çeşitli klinik durumlarla da, örneğin siroz veya tümör şeklinde de çıkabilmektedir.

Karaciğerde çeşitli patolojik tablolara yol açan 600'den fazla ajandan biri de karbon tetraklorür ( $CCl_4$ )'dür. Karbon tetraklorür deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan bir ksenobiyotiktir. Karbontetraklorür geçmiş yıllardan bu yana kuru temizlemede, boya ve çözücülerde, yangın söndürücülerde ayrıca yağ uzaklaştırıcı maddelerde (deterjan) kullanılmıştır. Veteriner hekimlikte ise helmintlere karşı mücadelede uygulanmaktadır. Dolaşıma geçtikten sonra, vücudu akciğer, böbrek ve özellikle safrayla terk eder. Karbon tetraklorür, yüksek dozlarda kullanıldığında karaciğerde birikerek harabiyete ve hatta siroza neden olabilir. Metabolizması esnasında öncelikle stabil olmayan başlangıç metaboliti triklorometil ( $CCl_3$ ) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklorometil peroksite ( $CCl_3 COO^-$ ) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür. Oluşan bu serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipitlerde bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyetine yol açarlar. İlerleyen süreç sonunda karaciğer fibrozu, hepatit, siroz veya tümör oluşabilir (1, 2).

Fizyolojik ya da birçok stres ve hasar tarafından başlatılan programlı hücre ölümü süreci olan apoptozisin, birçok sistemde uygun fonksiyon ve homeostazın devamı için önemli olduğu bilinmektedir (3). Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Bu işlem hem çok hücreli organizmaların normal gelişim süreci olan embriyogenezis sırasında, hem de erişkinlerde neredeyse bütün dokularda hücresel çoğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin

kararlılığının korunması için gereklidir (4). Çeşitli uyarılar apoptozis mekanizmasını uyarır. Bunlara örnek olarak, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı, glikokortikoidler, reaktif oksijen ürünleri, ultraviyole ışık, radyasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir (5).

Leptin, ağırlıklı olarak adipoz doku tarafından eksprese ve sekrete edilmesinin yanı sıra birçok dokudan salınan, obezite (ob) gen ürünü olup 167 aminoasit içeren, 16 kilo Dalton (kDa) molekül ağırlığında bir polipeptittir. Temel olarak yiyecek alımının azalması ve enerji tüketiminin artması ile beden ağırlığının regüle edilmesinde önemli bir rol oynar. Beden yağ kitlesinin kontrol edilmesine ek olarak leptinin birçok biyolojik fonksiyonu, santral ve periferik birçok etkisi vardır (6,7). Anjiyogenetik özelliğinin yanı sıra endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımını artırarak vazodilatasyon oluşturması gibi etkileri de olduğu saptanmıştır (8). Leptinin anti-oksidan enzimler olan katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz düzeylerini artırarak direkt olmasa da dolaylı yoldan anti-oksidan etkinliği gösterilmiştir (9). Leptin ile ilgili son çalışmalarda leptinin sitokinlerin proliferatif aktivitesini arttırdığı ve apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (10, 11). İnce bağırsak (12), mide (13), böbrek (14), nöron (15) gibi birçok dokuda leptinin doku hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda doku hasarına karşı leptinin koruyucu etkinliği rapor edilmiştir.

Birçok araştırmacı tarafından, hem karaciğer hasarındaki mekanizmaları ortaya koymaya yönelik hem de bu mekanizmaları önlemeye yönelik klinik ve deneysel çalışmalar yapılmıştır, ancak karaciğerdeki akut toksik hasara ve apoptozise karşı leptinin koruyucu etkisinin olup olmadığını gösteren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlayamadık. Bu bilgiler ışığında bizde yaptığımız çalışmada CCl<sub>4</sub> ile karaciğerde oluşturulan akut toksik hasara karşı leptinin etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Leptinin etkisini gösterebilmek için biyokimyasal olarak serumda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalin fosfataz (ALP) ve TNF- $\alpha$  ölçümlerini ve dokuda da TNF- $\alpha$  ve MDA düzey ölçümlerini, histopatolojik olarak ta Hematoksilen-Eozin (H&E) ve TUNEL boyama yöntemlerini kullandık.

## 2. GENEL BİLGİLER

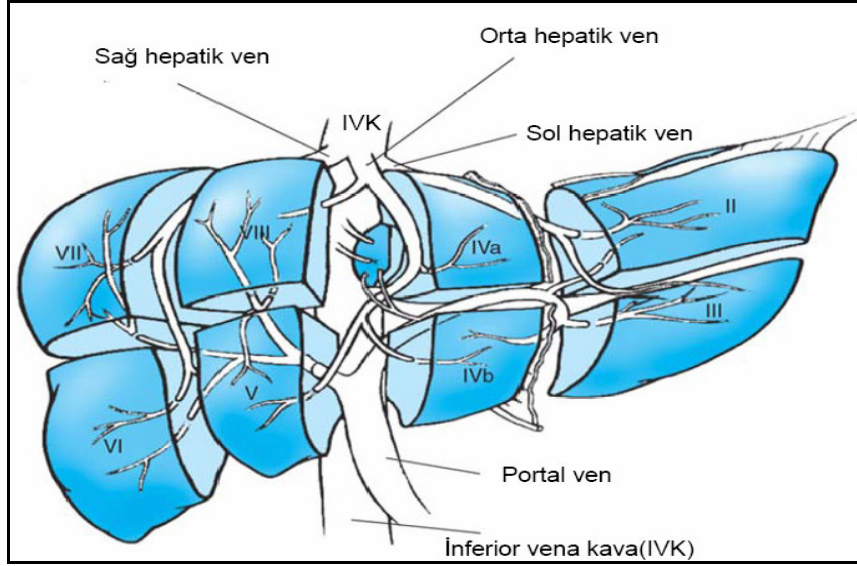
### 2.1. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi

İnsanda karaciğer sağ üst abdomende ve kısmen epigastrik bölgede yer alır, ortalama ağırlığı 1200-1800 gram kadardır. Glisson kapsülü adı verilen peritoneal membran karaciğer yüzeyini sarar ve parankim içerisine doğru uzanan, içerisinde kan damarları ve safra duktusları içeren fibröz septalar verir. Karaciğer falsiform, round ve koroner ligamanlar ile diyafragmanın alt yüzeyine ve batın ön duvarına tutunur (16-18).

Karaciğer hepatik venlerin vena kavadan çıkış noktalarına ve seyirlerine göre longitudinal planlara, ana portal bifurkasyona göre de transvers planlara ayrılır. Karaciğer hepatik arter, portal ven ve hepatik duktusun dağılımına uygun olarak 8 alt segmente ayrılır (19, 20) .

Karaciğer kanlanması 2 kaynaktan olmaktadır. Bu kaynaklar hepatik arter ve portal vendir. Hepatik arter karaciğer kanlanmasının yaklaşık % 25'ni, oksijeninin % 50'sini, portal ven ise kanlanmanın % 75'ini, oksijenin % 50'sini sağlar. Hepatik arter anatomisi intra ve ekstrahepatik olarak değerlendirilmelidir. İntrahepatik seyri portal venle birliktelik gösterirken ekstrahepatik bölümü oldukça değişkendir. Kabaca toplumun %50'sinde ana hepatik arter çölyak trunkustan çıkar ve gastroduodenal ve sağ gastrik arteri verdikten sonra arteria hepatica propria olarak sonlanır. Arteria hepatica propria da sağ ve sol hepatik arterleri verir. Karaciğerin venöz dönüşünün çoğu 3 hepatik venle olur. Sağ hepatik ven segment 5-6-7-8'i drene eder ve direkt olarak vena kavaya dökülür. Orta hepatik ven 4-5-8. segmentleri drene eder ve 2-3. segmentleri drene eden sol hepatik venle birleşerek veya direkt vena kavaya açılır (Şekil-2.1) (19, 20, 21).

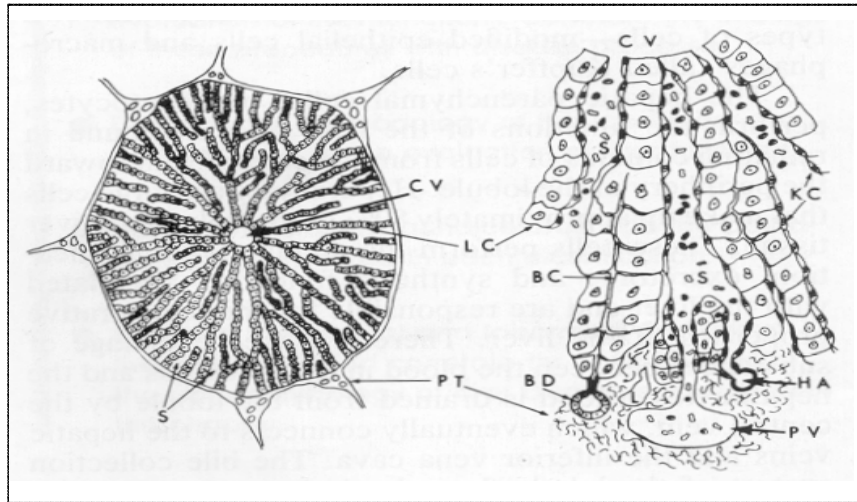
Karaciğer içinde dağılmış olan portal ven, hepatik arter ve safra kanallarından meydana gelmiş üçlü yapıya portal triad adı verilir. Safra, önce intersellüler kanaliküllere sonra, interlobular safra kanallarına dökülür. Bunlar da birleşerek daha büyük kanallar olan sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar. Sağ ve sol hepatik kanallar porta hepatis'e birleşerek ana hepatik kanalı oluştururlar. Ana hepatik kanal da sistik kanal ile birleştikten sonra koledok adını alır. Koledokun uzunluğu 5-15 cm arasında değişir (20, 21).



**Şekil-2.1.** Couinad tarafından dizayn edilmiş karaciğer segmenter anatomisi. (www.ahpb.org'dan adapte edilmiştir).

### Karaciğer Fonksiyonel Anatomisi

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi lobüldür. Bir lobül, horizontal kesitte altı köşeli görülür; merkezde bir santral ven vardır (Şekil-2.2).



**Şekil 2.2.** Karaciğer fonksiyonel anatomisi; CV: Santral Ven, BC: Safra kanalikülü, BD: Safra kanalı, HA: Hepatik arter, PV: portal ven, S: Sinüzoid (22).

Hepatositlerin yaklaşık %25'i çift nukleusludur. Başlıca sitoplazmik organelleri endoplazmik retikulumlar, mitokondriler, lizozomlar, peroksizomlar ve golgi aygıtıdır. Granüllü endoplazmik retikulumda hücrenin yapısal proteinleri ve plazma proteinleri yapılır. Düz endoplazmik retikulum ise ksenobiotiklerin metabolizma yeridir. Mitokondriler oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi oksidasyonunda önemli rol oynarlar. Sitrik asit ve üre döngüsü ile ilgili enzimleri de içerirler. Lizozomlar çeşitli eksojen ve endojen maddelerin katabolizma ve sindirimleri ile ilgili veziküllerdir. Peroksizomlar oksidazlar içerirler ve oksijen molekülünü kullanarak, hidrojen peroksit yaparlar. Yağ asidi ve alkol metabolizmasında da katkıları vardır. Hepatositin iskeletini mikofilamanlar, intermediate filamanlar ve mikrotübüller oluştururlar. Mikofilamanlar aktin ve miyozin içerirler, perikanaliküler ektoplazmada yer alırlar. Safra sekresyonu ve akımının düzenlenmesinde rol oynarlar (22).

Sinüzoidal hücreler denilince endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, perisinüzoidal hücreler ve pit hücreleri anlaşılır. Perisinüzoidal hücreler Disse aralığında, diğerleri ise sinüzoidlerde yer alırlar. Endotel hücreleri sinüzoidleri Disse aralığından ayıran ve aralarında geniş porları olan, bazal membran ve intersellüler birleşmeler içermeyen hücrelerdir. Kupffer hücreleri, mononükleer fagositer sistemin başlıca hücreleridir. Başlıca fonksiyonlarını partiküllerin, immün komplekslerin, lezyonlu eritrositlerin ve endotoksinlerin klirensi oluşturur. Birçok mediatör salgırlar. Başlıcaları IL 1, IL 6, TNF- $\alpha$ , interferonlar ve eikosanoidler'dir. Perisinüzoidal hücreler (hepatik stellat hücreler, yağ depolayan hücreler, ito hücreleri) Disse aralığında yer alırlar. Normal ve hasarlı karaciğerde ekstrasellüler matriksin başlıca kaynağıdırlar. Yine bu hücrelerin, hepatosit büyüme faktörü (HGF) kaynağı olup, sinüzoidal kan akımı kontrolünde rol oynadıkları ileri sürülmektedir. Pit hücreleri doğal ve lenfokinle aktive edilmiş katil hücre aktivitesi gösterirler (22).

### **Karaciğer Fonksiyonları**

Karaciğer, vücudun her türlü gereksinimini karşılamak üzere 24 saat durmaksızın çalışan, oldukça karmaşık bir kimyasal fabrika olarak tanımlanabilir. Yaşamak için gerekli olan birçok kimyasal olay burada meydana gelir (23).

Karaciğerin başlıca fonksiyonları Tablo-2.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Karaciğerin fonksiyonları.

<b>Metabolik fonksiyonları</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karbonhidrat,</li> <li>• Hormonlar,</li> <li>• Yağ,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilirubin,</li> <li>• Aminoasit ve proteinler</li> </ul>
<b>Salgılama fonksiyonları</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Safra asiti,</li> <li>• Bilirubin,</li> <li>• Kolesterol</li> </ul>	
<b>Hematolojik fonksiyonları</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pıhtılaşma faktörlerinin üretimi</li> <li>• Fetustaki kırmızı kan hücrelerin üretimi</li> </ul>	
<b>Detoksifikasyon fonksiyonları</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilirubin,</li> <li>• Alkol,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amonyak,</li> <li>• İlaç</li> </ul>
<b>Depolama fonksiyonları</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glikojen,</li> <li>• Demir,</li> <li>• Bakır,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitaminler,</li> <li>• Yağ,</li> <li>• Aminoasit ve protein</li> </ul>
<b>İmmünolojik fonksiyonları</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakteri ve diğer yabancı maddelerin fagositozu,</li> <li>• IgA sekresyonu,</li> <li>• Humoral savunma mekanizmaları</li> </ul>	

## 2.2. Karaciğer Hastalıklarında Patolojiler

Karaciğer hastalıklarında hücre harabiyeti ve kolestaz iki önemli patolojidir.

### Karaciğer Hücre Harabiyeti

Hepatitler, karaciğer hücrelerinin enflamasyonudur. Hepatitler, viral, bakteriyel, spiroketal, paraziter kökenli olabilirler. Akut viral serum hepatitinden sonra kronik hepatit oluşabilir. Siroz, karaciğerde karaciğer hücrelerinin yerini bağ dokusu almasıyla karakterizedir. Kloroform, CCl<sub>4</sub>, fosfor, civa, kurşun, izoniazid, PAS, etil alkol gibi maddelerin uzun süre alınması karaciğerde kronik yangılara, yağlanmaya ve siroza neden olur. Şok veya sağ kalp yetmezliğine bağlı olarak ortaya çıkan hepatik konjesyon, karaciğer hücre harabiyetine neden olabilir. Kısmen tahrip olan veya bir kısmı çıkartılan karaciğer, kendi kendini rejenere edebilir. Rejenere olmuş karaciğer dokusu da zararlı maddelere karşı daha fazla toleransa sahiptir (24).

### Kolestaz

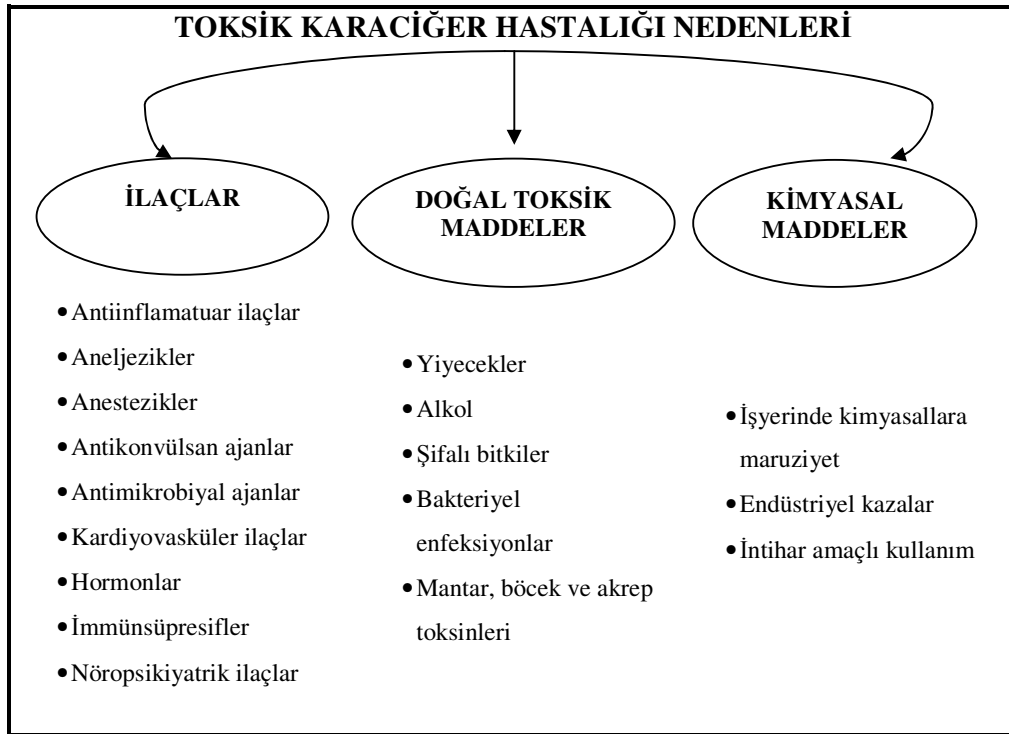
Kolestaz safranın duodenuma dökülememesi durumudur. Kolestaz, intrahepatik veya ekstrahepatik olabilir. İntrahepatik kolestaz; Viral hepatitlerde, klorpromazin ve halotan gibi ilaçların etkisiyle, gebelikte, karaciğer

infiltrasyonlarında, biliyer sirozda görülebilir. İntrahepatik kolestaz sıklıkla hücre harabiyeti ile birlikte dir. Ekstrahepatik kolestaz, karaciğer dışı safra yollarında taş, tümör, kist, parazit ve dıştan basıya bağı olarak oluşur. Kolestazda safra nın ana komponentleri kanda artar. Kanda kolesterol artışıyla ksantomatozis, bilirubin artışıyla sarılık, safra asidi artışıyla kaşıntı meydana gelir. Safra nın duodenuma dökülememesi nedeniyle yağda çözünen vitaminler emilemez. Yağda çözünen vitaminlerin gece körlüğü, kemiklerde demineralizasyon, testiküler atrofi ve ekimoz gibi eksiklik belirtileri ortaya çıkar (24).

### 2.3. Toksik Karaciğer Hasarındaki Mekanizmalar

Karaciğer anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile birçok toksik, zararlı madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan bir organdır. Hepatotoksisite çok çeşitli klinik durumlarla karşımıza çıkabilir ki bunlar akut, kronik ve fulminan hepatit şeklinde olabileceğı gibi siroz veya tümör şeklinde de karşımıza çıkabilir. Karaciğerde toksik hasara neden olan faktörler Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Karaciğerde toksik hasara neden olan faktörler



Toksik olaylarda karaciğer hasarının oluşmasında temel olarak 5 mekanizma söz konusu olabilmektedir. Bunlardan ilki, hücre içi iyon dengesinin bozulması ile açıklanır. Hücre içi kalsiyum dengesi bozulur. Hücrede şişme, zarda parçalanma ve hücre yıkımı gerçekleşir. Diğer mekanizma safra kanaliküler hasarıdır. Safra kanalikül membranındaki transport proteini etkilenerek veya safra sekresyonundan sorumlu bölgedeki aktin liflerinin yıkımına neden olarak safra sekresyonuna engel olup kolestaza neden olur. Safra asitlerinin hücre içindeki birikimi de apoptozise neden olur. Bu durumda üçüncü mekanizma olarak apoptozis söz konusu olmaktadır. Hücre zedelenmesi ile uyarılan immün sistem sitokinleri (TNF gibi) aktifleşip, hücre içi kaspazları tetikleyerek apoptozisi tetikler. Karaciğer hasarına neden olabilen dördüncü mekanizma ise immün mekanizmadır. Biyotransformasyon sonucu p450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimlere bağlanıp “addukt” denilen antijen gibi algılanan bileşikler oluştururlar. Bu bileşiklerin hepatosit yüzeyine taşınması ile antikor oluşumu ve humoral immünite uyarılır. Direkt T hücre cevabı ile sitolize de neden olurlar. Son olarak mitokondriyal disfonksiyonda hasara neden olan mekanizma olarak tanımlanmaktadır ve bu yolla oluşan hasar 3 şekilde gerçekleşir. Yağ asitlerinin beta oksidasyonunun inhibisyonu, solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu veya doğrudan mitokondriyal DNA’nın etkilenmesi şeklinde olabilir. Serbest yağ asitleri metabolize olamayıp, laktat ve reaktif oksijen radikallerinin birikimine yol açar. Bu radikaller mitokondriyal DNA’yı zedeler. Bu üç olay sonucunda hücrede aerobik metabolizmada sıkıntı başlar ve anaerobik metabolizma ile laktik asidoz ve trigliserid birikimi olur. Sonuçta hücre içi yağlanması gerçekleşir (25).

### **Karaciğer Hasarında Morfolojik Değişiklikler**

Yukarda tanımlanan mekanizmalar göz önüne alındığında, toksik karaciğer hastalıkları temel olarak hepatositleri, safra duktuslarını, vasküler sistemi, sinüzoidal hücreleri ve hatta Kupffer hücrelerini etkileyerek karaciğerde çeşitli morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur (26).

### **Hepatosellüler Hasar**

Hepatosellüler hasar akut veya kronik olabilir. Akut hepatosellüler hasarın histolojik karşılığı akut hepatittir. Akut hepatit toksik karaciğer hastalıklarının



%90'ını temsil eder. Akut hepatosellüler hasar sitotoksik, kolestatik ve mikst tip olarak 3 şekilde karşımıza çıkabilir (25). Bu hasar akut hepatit için tanımlanan morfolojik değişiklikler şeklinde olabileceği gibi fulminan hepatite varan tablo şeklinde de karşımıza çıkabilir. Bu nedenle değişen oranlarda hepatosit hasarı, nekroz, lobüller ve portal inflamasyon izlenir. En hafif formunda hepatositlerde balon dejenerasyonu ve apoptotik cisimler ile fokal nekroz odakları ile lobülde ve portal alanda nötrofil ve eozinofilleri de içerebilen inflamatuvar hücreler izlenir (27).

Balon dejenerasyonu hepatositlerde diffüz şişme, soluk boyanma ve sitoplazmanın boş görünümü ile sitoplazmik artıkların nükleus etrafında toplanması ile karakterli değişikliktir. En fazla sentrilobüler bölge etkilenir. Bunun dışında hepatositlerde asidofilik dejenerasyon ve ölüm görülebilir ki bu zedelenme şekli hücrelerde piknotik nükleusa sahip yoğun eozinofilik sitoplazma ile kendini belli eder. Apoptozis ile hücre ölümünü temsil eder (27). Balon dejenerasyonu litik nekroza gidebilir. Zamanla ortadan kalkar ve yerinde stromal kollaps olur ki bu alanda lenfosit ve Kupffer hücrelerinden oluşan hücre topluluğu izlenir. Sitoliz olan hepatosit gözle görülmez ancak bu inflamatuvar hücrelerin varlığı sitolizin göstergesidir. Bu şekilde hepatositlerin fokal kaybı fokal (spoty) nekroz olarak tanımlanır (25). Buraya kadar tanımlanan histopatolojik tablo, akut viral hepatitte tanımlanan değişikliklere çok benzer ve ayırım zordur. Parankimal nekrozun ağırlığına zıt olarak portal inflamasyonun hafif olması yanı sıra hasarın sentrilobüler olması ve az da olsa eozinofil varlığı toksik hepatit olma ihtimalini artırır (28).

En hafif düzeyde fokal nekroz olarak tanımlanan sitotoksik hasar daha ağır hasarda birleşik (konfluent) ve panlobüler ve multilobüler nekroz (submasif ve masif) olarak da karşımıza çıkar. Zon 3'de başlayan sentrilobüler nekroz hepatosit kaybının zon 2'ye kadar uzanması ile birleşik nekrozu oluşturur. En ağır nekroz tipi olarak tanımlanan submasif ve masif nekroz ise lobülün tamamına yakını veya tamamını tutan hepatosit kaybı ile karakterlidir. Submasif nekroz perivenüler zondan başlayan lobülün büyük kısmını tutan ancak periportal zonun korunduğu nekroz olarak tanımlanır (25). Masif hepatic nekroz genellikle yaygın panlobüler ve multilobüler nekroz varlığında kullanılan terimdir. Nekroz ile korunmuş alan birlikteliği harita benzeri görünümüne neden olur. Nekroz olan alanlarda hepatosit kaybı ve retikülün kollapsı olur. Ayrıca yoğunluğu değişken olmakla beraber genelde

az miktarda mikst inflamatuvar hücreler, hipertrofik Kupffer hücreleri, seroid yüklü makrofajlar izlenir (27).

Safra duktal proliferasyonu ve portal alanda ve çevresinde nötrofil infiltrasyonu belirgin olabilir. Canlı kalan hepatositlerde rejeneratif aktivite izlenebilir ve yeterli rejenerasyon sağlanabilirse karaciğer normale dönebilir ancak eğer rejenerasyon yetersiz olup retikülin çatı çok ağır hasarlanmış ise fibrozis gelişimi ve siroz ile sonuçlanan tablo gelişebilir. Histolojik değişikliklerle klinik tablo ve prognoz arasında çok keskin bir ilişki yoktur. Nekrozun yoğunluğunun artması, %65-80'den fazla hepatosit kaybı genellikle ölüm ile sonlanır. Masif ve submasif nekrozda klinik olarak ağır hepatit tablosu olur ve fulminan hepatit ile sonlanır (26).

Nekroz zonal dağılım gösterebilir ve hasarın mekanizması ile ilişkilidir. Zonal nekroz sentrlobüler (zon 3), periportal (zon 1) ve her iki zonun ortasında (zon 2) olabilir. Toksik karaciğer hasarlarında nekroz çoğunlukla sentrlobüler bölgede izlenir (25). İntrinsik toksinler genelde zonal nekroz oluşturur. Sentrlobüler nekroza CCl<sub>4</sub>, parasetamol, mantar zehirlenmesi ve pirozilidin alkoloidleri neden olur. Bu maddelerin hepatotoksik metabolitlere dönüşmesinde sorumlu enzim sisteminin bu lokalizasyonda yoğun şekilde bulunması nedeniyledir (26). Zonal olmayan nekroz genelde idiosenkreatik tip hepatotoksikler tarafından oluşturulur (27).

Hepatoselüler hasar olarak temelde sitotoksik hasar yapan başlıca kimyasal maddeler arasında asetaminofen, izoniyazid, ketokanazol, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, sülfonamidler, antidepresanlar, halotan, antidiabetik ajanlar, psikotropik ve nörotropik ilaçlar, kokain, ekstazi, CCl<sub>4</sub> sayılabilir (26).

Toksik hepatitlerde sitotoksik özellikte hepatoselüler hasar görülebildiği gibi hasar kolestatik tipte de olabilir. Bazı kimyasal maddeler parankimde herhangi bir hasar yapmadan safra akışında bozulma ile karakterli hasara neden olur. Alkalen fosfataz yükselmesi kolestazın belirtisi olarak kabul edilir. Kolestatik hasarın histolojik görünümü sentrlobüler hepatositlerde ve kanaliküllerde belirgin olmak üzere safra tıkaçları ile karakterlidir. Kolestazın uzun sürdüğü durumlarda hepatositlerde tüysü dejenerasyon ve karaciğer hücre rozetleri izlenir. Bu tarzda hasar yapan en önemli kimyasal maddeler; oral kontraseptifler, östrojen androjenler, tamoksifen, azotioprindir (25).

Akut hepatoselüler hasar hem kolestatik hem de sitotoksik hasarın bir arada olabildiği mikst formda da olabilir. Kolestatik değişikliklere hafif balon dejenerasyonu, nekroz ve apoptosis eşlik eder. Bu tarzda hasar yapabilen kimyasal maddeler olarak fenotiazinler, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar, makrolidler, sülfonamidler, trisiklik antidepresanlar, amoksisilin/klavulonik asit sayılabilir (29).

Akut karaciğer hasarı toksik karaciğer hastalıklarının çoğunluğunu oluşturmakla beraber az oranda kronik karaciğer hasarı da görülebilir. Kronik olarak görülebilen lezyonlar kronik hepatit, steatozis, fosfolipidozis, NASH ve siroz olabilir. Viral veya otoimmün nedenleri ekarte edebilmek için serolojik testler mutlaka bilinmelidir. Tanı zordur çünkü kronik ilaç ilişkili hepatit otoimmün hepatite benzer değişiklikler içerebildiği gibi kendisi de otoimmüniteyi tetikleyebilir. Kronik hepatit fibrozis ve hatta siroza da neden olabilir (29).

Kronik hepatoselüler hasar olarak steatozis ve steatohepatit en sık görülen iki bulgudur. Mikro veya makroveziküler yağlanma şeklinde olabilir. Mikroveziküler steatozis intraselüler mitokondriyal oksidatif yolların hasarı ile geliştiğinden akut karaciğer yetmezliği gelişebilir. Bu durum kalıtsal metabolik hastalıklara benzer tablolar yapabilir (28).

Makroveziküler steatozis tek başına steatozis şeklinde olabileceği gibi mikroveziküler steatozisle, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığıyla, nonalkolik steohepatitle ve hatta alkolik steatohepatite benzer tablo ile birlikte karşımıza çıkabilir. Ayırıcı tanıda klinik öykü önemlidir (27).

NASH'de parankimal inflamasyon ve hepatoselüler dejenerasyon orta veya şiddetli steatozise eşlik eder. Alkolik hepatit ve ilaçlara bağlı oluşan steatohepatitte ise yoğun inflamasyon, fibrozis ve hepatoselüler hasar varlığında hepatosit sitoplazmasında izlenen yağlanma kaybolabilir (28).

### **Safra Yolları Hasarı**

Safra yollarındaki hasar karşımıza akut kolanjit, kronik kolanjit şeklinde çıkabilir. Kolestatik ile birlikte inflamasyonlu veya inflamasyonsuz safra duktus harabiyeti izlenir. Akut kolanjit fokal destrüktif safra yolu hasarı ve PMNL infiltrasyonu ile karakterlidir (27). Kronik kolanjit ise genelde primer biliyer siroz benzeri değişiklikler ile görülürler (29).

### **Vasküler Hasar**

Vasküler sistemin her seviyesinde, portal ven, hepatik arter, sinüzoidler ve santral ven düzeyinde hasar oluşabilir. Sinüzoidal dilatasyon, peliozis, venookluzif hastalık, hepatoportal skleroz, hepatik arterde intimal hiperplazi gibi çeşitli lezyonlarla da karşımıza çıkabilir (28).

### **Sinüzoidal Hücre Hasarı**

Toksik ajanlar direkt vasküler yapıları etkileyebilmelerinin yanı sıra sinüzoidal hücrelerden içsi hücreler ve Kupffer hücrelerini etkileyerek de hasara yol açabilir (26). Bu tip hasara örnek olarak granulomatöz reaksiyonlar verilebilir. İlaçlar ve kimyasallar karaciğerde granulomatöz reaksiyon şeklinde tek başına veya sitolitik ve kolestatik hepatit ile birlikte hasar oluşturabilir (29).

### **Tümörler**

Karaciğer tümörlerinden hepatosellüler adenom en sık olmakla birlikte, anjiyosarkom, kolanjiyokarsinom, hepatosellüler karsinoma neden olan toksik hasarlar da vardır. Oral kontraseptifler, anabolik steroidler, östrojenler adenoma yol açarken vinil klorid ve toratorast malign tümör gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (28).

## **2.4. Hepatosellüler Hasarın Değerlendirilmesi**

Hepatosellüler zedelenmeyle ilişkili testler serum transaminazları veya aminotransferazları olarak adlandırılan, aspartat aminotransferaz (AST, serum glutamik-oksaloasetatik asit transferaz [SGOT]), alanin aminotransferaz (ALT, serum glutamik-piruvik transaminaz [SGPT]) ile laktat dehidrogenaz (LDH) enzimleridir. AST karaciğer dışında, iskelet ve kalp kaslarında, böbrekler, beyin, pankreas, akciğerler, lökositler ve eritrositlerde bulunurken ALT esas olarak karaciğerde bulunur. ALT sitozolde, AST ise hem sitozolde hem de mitokondride yer alır. Laktat dehidrogenaz pekçok normal ve malign dokuda bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Enzimin beş izoenzimi (LDH 1-5) olup, elektroforetik olarak en yavaş olanı (LDH-5) karaciğerde bulunan izoenzimidir (30).

Kolestazla ilişkili testler alkalın fosfataz (ALP), gama glutamil trans peptidaz (GGT), 5'-nükleotidaz ve lösin aminopeptidazdır. Serum ALP düzeyi alkalın pH'da

organik fosfat esterlerinin hidrolizini katalize eden bir grup enzimi göstermektedir. ALP hepatobilier sistem (hepatositlerin safra kanaliküler yüzeyi ve biliyer epiteli), kemik, barsaklar, böbrekler ve plesental kaynaqlıdır (30).

Transaminazlar normal hücre döngüsünü yansıtacak şekilde dolaşımında az miktarda bulunur, transaminazlardan zengin dokularda zedelenme durumunda serum düzeyleri yükselir. Serum transaminazlarının hepatosit hasarını göstermede duyarlılığı çok yüksektir, etiyolojik faktörden bağımsız olarak karaciğer zedelenmesi sürdüğü tüm durumlarda serum seviyeleri yükselir. Sadece fulminan seyirli hepatitlerde artık nekroze olacak yeterli miktarda hepatosit kalmadığında düzeyleri normal hatta düşük olabilir ki; bu kötü prognoz belirtisidir (30).

## **2.5. Karbon Tetraklorür ile Karaciğer Hasarı**

Deney hayvanlarında karaciğer hasarı oluşturmak için deneysel çalışmalarda en sık kullanılan maddelerden birisi olan  $CCl_4$  'ün hepatotoksik etkisinin, kısa yaşam süreli reaktif ara ürünlerinin metabolik aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (31). Buna göre  $CCl_4$  ile oluşan hücre hasarı lipid peroksidasyonundaki artışa bağlıdır.  $CCl_4$ 'e bağlı olarak gelişen karaciğer hasarında; redüktif dehalojenasyon, radikallerde kovalent bağlanma, özellikle apolipoproteinlerde olmak üzere protein sentezinde inhibisyon, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptosis ve fibrozis gerçekleşir. Daha ciddi hasarlar,  $CCl_4$  'ün biyoaktivasyonu sonrası oluşan, indüklenmiş sitokrom P450 oksijenaz sistemiyle meydana gelir. İndüksiyon ne kadar güçlü olursa hasar o kadar fazla olur. Radikaller bu olayda ana rolü oynamaktadırlar (32).  $CCl_4$  aynı zamanda sentrilobüler konfluent nekroza da sebep olmaktadır (33). Bruckner ve arkadaşları,  $CCl_4$  verilen ratlarda sentrilobüler hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu, buzlu cam görüntüsü, nükleuslarda pleomorfizm, sentrilobüler alanlarda genişleme ve seyrek olarak nekrotik hücreler gözlemişlerdir (34).

## **2.6. Apoptozis**

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürlür. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozisdir. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş,

düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (35). Apoptozis ve nekrozun başlıca özellikleri Tablo 2.3' te gösterilmiştir (36).

**Tablo 2.3.** Apoptozis ve nekrozun başlıca özellikleri

<b>ÖZELLİKLER</b>	<b>NEKROZ</b>	<b>APOPTOZİS</b>
<b>Uyaran</b>	Toksinler, ciddi hipoksi, ağır yara ve ATP tüketimi	ATP tüketimi olmaksızın fizyolojik ve patolojik koşullar
<b>Enerji gereksinimi</b>	Enerji gereksinimi yok	Enerji gereksinimi var, ATP'ye bağlı
<b>Histoloji</b>	Hücrel şişme, organel bozukluğu, doku parçalarının ölümü	Kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, izole tek hücrenin ölümü
<b>DNA kırık modeli</b>	Düzensiz rastgele kırık şeklinde	185 baz çiftlik kırıklar şeklinde "ip merdiven" görüntüsünde
<b>Hücrelerin fagositozu</b>	Fagositlerin göçüyle	Komşu hücrelerle
<b>Doku reaksiyonu</b>	İnflamasyon	İnflamasyon yok
<b>Plazma zarı</b>	Parçalanmış	Moleküler değişikliklerle birlikte parçalanmamış

Apoptozis rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücrel homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Tablo 2.4' te apoptozisin arttığı ve azaldığı durumlarda oluşan hastalıklar izlenmektedir (37).

Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller, kaspazları aktive eder. Aktive olan kaspazlar hedef proteinlerini yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Sonuçta çeşitli morfolojik ve biyokimyasal

değişikliklerin oluşmasıyla hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler fagositoz yoluyla yok edilirler (35).

**Tablo 2.4.** Hastalıklarda apoptozisin rolü

<b>Apoptozisin artmasıyla ilgili hastalıklar</b>	<b>Apoptozisin azalmasıyla ilgili hastalıklar</b>
<b>1.Nörodejenaratif bozukluklar</b> Alzheimer hastalığı Amyotrofik lateral skleroz Creutzfeld-Jakob hastalığı Huntington hastalığı Parkinson hastalığı Retinitis pigmentosa Spinal muskular atrofi	<b>1. Kanser</b> Blastom Karsinom Lösemi Lenfoma Malign gliom Sarkom Seminom
<b>2. Hematolojik bozukluklar</b> Aplastik anemi Fanconi anemisi Hodgkin hastalığı Myelodisplastik sendromlar Polycythemia vera	<b>2. Premalign hastalıklar</b> Ataxia telangiectasia Paroksimal nokturnal hemoglobinüri Myelodisplastik sendromlar Xeroderma pigmentosum
<b>3. Otoimmün bozukluklar</b> Fulminant hepatit Graft-versus-host hastalığı Hashimoto tiroiditis İnsüline bağımlı diyabet Multipli skleroz Romatoid artrit Skleroderma Sjögren sendromu	<b>3. Otoimmün bozukluklar</b> Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (tip Ive II) Sistemik lupus erythematosus
<b>4.İskemik yaralanma</b> İskemi ve reperfüzyon Böbrek enfarktüsü Miyokardial enfarktüs İnme	<b>4. Ateroskleroz</b>
<b>5. Toksinlere bağlı hastalıklar</b> Alkole bağlı hepatit Pulmonar fibrozis Sepsis	<b>5. Metabolik bozukluklar</b> Niemann-Pick hastalığı Osteoporozis Wilson hastalığı
<b>6. Bakteriyal ve viral enfeksiyon</b> Kazanılmış immün yetersizlik sendromu (AIDS) Ebola virüsü Chlamydia trachomatis Helicobacter pylori Neisseria meningitis Salmonella typhimurium Shigella flexneri	<b>6. Viral enfeksiyonlar</b> Adenoviruses Baculoviruses Epstein-Barr Virus Herpesviruses Poxviruses
<b>7. Diğerleri</b> Travmatik spinal kord yaralanması Tümör karşı-atağı (immün ayrıcalık)	

### **Apoptozisin Önemi**

İnsan vücudunda her saniyede 100 000 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür (38). Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım, yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık  $5 \times 10^{11}$  kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (39). Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır (39,40). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (41). Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesine neden olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların %50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis rol almaktadır (39).

### **Apoptoziste Hücre Morfolojisi**

Apoptozis, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur. Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp. (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. İmmün elektroforez yapıldığında "*ladder patern*" olarak isimlendirilen



merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (42). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler, etrafında açık bir halo ile görülmektedir Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (43).

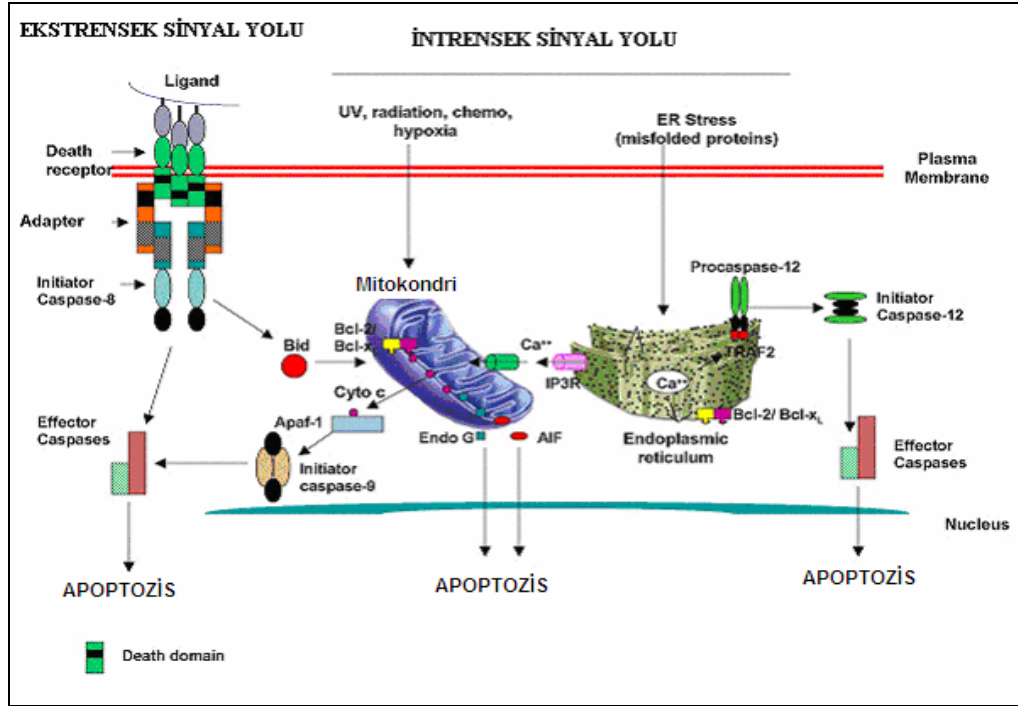
Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (44).

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, Ultraviyole ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (45).

### **Apoptozis Sinyalinin Oluşumu**

Apoptozisin indüklenmesinde iki majör sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar "ekstresek" hücre dışı ve "intrensek" hücre içi sinyal yollarıdır. Ekstresek yolda hücresel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. İntrensek yolda memeli hücrelerinde majör apoptotik sinyal yolu mitokondrialdir ayrıca son zamanlarda endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (46).

Apoptozis sinyal yolu oluşumunda intrensek ve ekstresek sinyal yolu tetikleyicileri Şekil 2.3' te şematize edilmiştir.

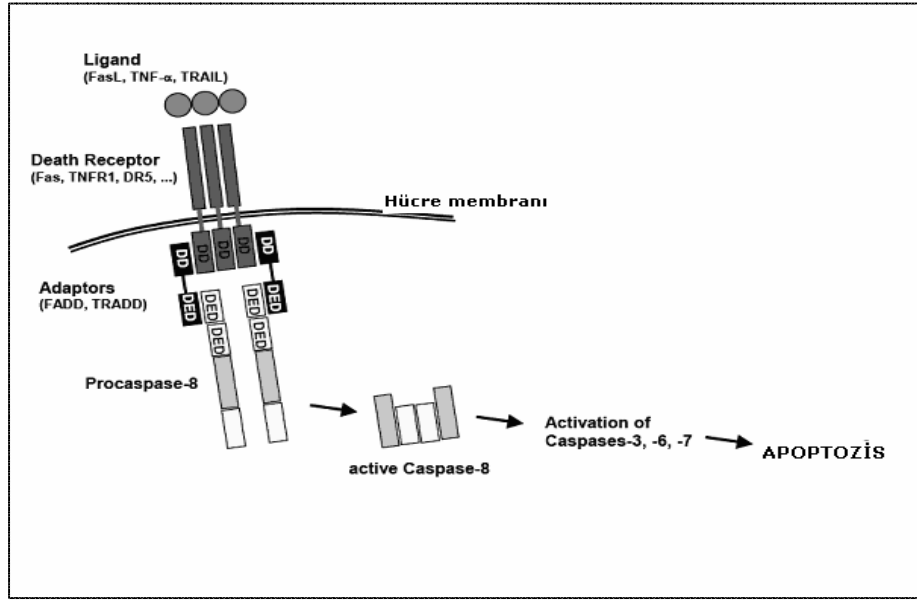


Şekil 2.3. İntrensek ve ekstresek sinyal yolu tetikleyicileri (46).

### Ekstresek Sinyal Yolu

Fas Ligant (FasL) ve TNF; hücresel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Sitokinler protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder. Sitokinler, yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar (47). Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir (48). TNF, hedef hücredeki TNFR-1 (Tümör nekrozis faktör reseptör-1) ve TNFR-2 (Tümör nekrozis faktör reseptör-2) adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve natural killer (NK) hücrelerde bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü Fas ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, Tip-II membran proteini gibi sentezlenir. FasL'nin N terminali sitoplazmadadır, C terminali ise ekstrasellüler alana doğru uzanmaktadır (49). Membrana bağlı TNF ve FasL'nin metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçen

formları mevcuttur. Bu serbest formlarına, solubl TNF ve solubl FasL adı verilmektedir (50). Solubl formda bulunan TNF ve FasL'da apoptozisi aktive etmektedir. Ancak membrana bağlı TNF ve FasL'ın, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır (Şekil-2.4) (51).



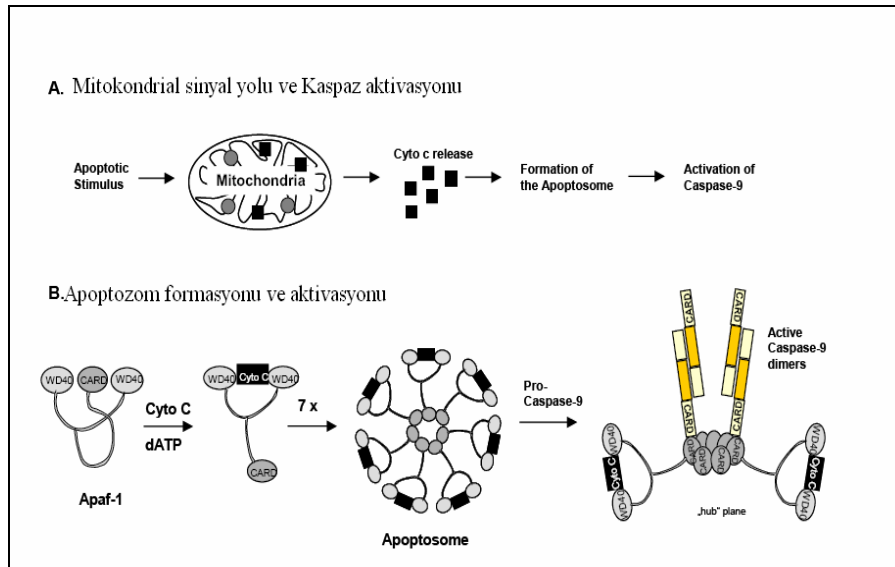
Şekil 2.4. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri (51).

### İntrensek Sinyal Yolu

Mitokondriyal yolak; memeli hücrelerinde majör apoptotik sinyal yolu mitokondrialdir. Radyasyon, toksinler, ısı artışı, çoğu kemoterapötik ajan, tümör supresör genler, DNA hasarı, viral virulans faktör ile intrensek mitokondriyal yolak üzerinden apoptotik sürecin başlamasına neden olurlar (Şekil 2.5) (52).

Sitokrom-C, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom-C mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-C sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından

ATP'nin de katılımıyla Apoptozisom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (*ICAD*) inaktifleştirir, böylece *ICAD*'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (*CAD*) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmantasyonuna neden olur (53).



Şekil 2.5. İntrensek apoptotik sinyal yolu (52) .

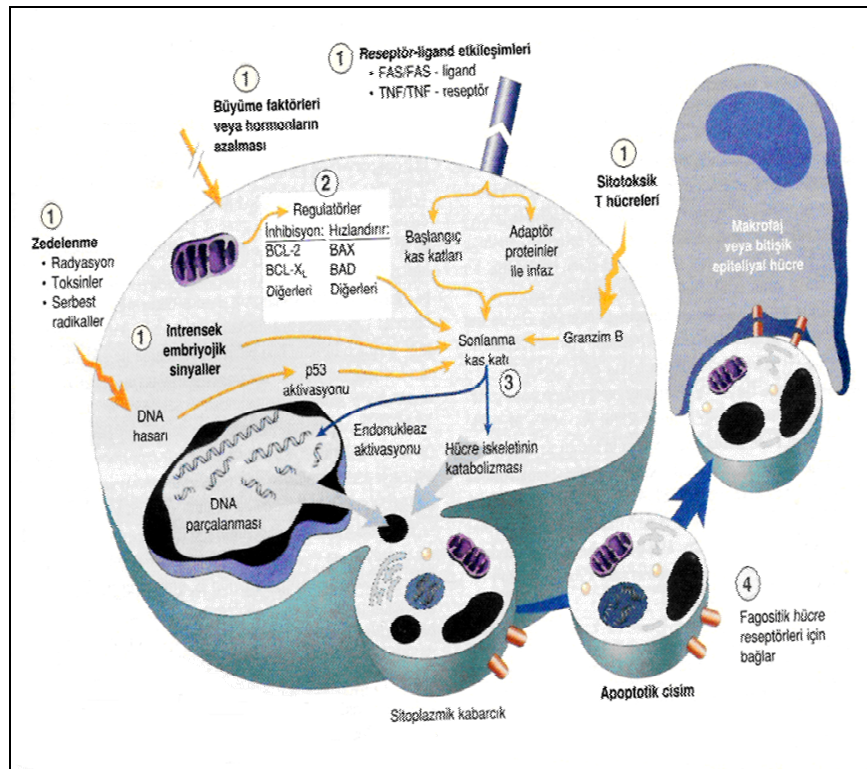
Endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptozis oluşturulması; son zamanlarda amiloid  $\beta$  nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (54). Bu yol mitokondrial/sitokrom-C ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanması içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır.  $Ca^{++}$  seviyesinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik

kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, *in vivo* ve *in vitro* olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (55).

### Apoptozis Sürecini Başlatan Diğer Nedenler

Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53 bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir (56).

Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir (Şekil 2.6) (56).



Şekil 2.6. Apoptozisteki olayların şematik görünümü (56).

Apoptozis büyüme faktörlerinin ortamdaki eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığına (serum starvation)

maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlür. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, bir pro-apoptotik (apoptozis uyarıcı) ve bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom-C'nin sitoplazmaya saliverilmesi yoluyla da gerçekleşir (56).

Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden saliverilen Granzim B'lerin (GrB) hedef hücrede (örneğin virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir. Granzim B bir serin proteaz enzimidir. Sitoplazma içine alınan GrB, hem pro-kaspas 10'u hem de pro-kaspas 3 ve pro-kaspas 7'yi aktive eder. Aktive olmuş pro-kaspas 3 bir yandan doğrudan selüler proteolizi başlatırken bir yandanda pro-kaspas 7 üzerinden selüler proteolizi başlatır (56, 57).

### **Apoptoziste Hücre İçi Sinyal İletiminin Regülasyonu**

$Ca^{++}$  : Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan  $Ca^{++}$  apoptoziste de rol oynar. Hücre içindeki  $Ca^{++}$  iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler (44, 56).

Kaspazlar (*CASPASES-Cysteine dependent Aspartate specific Proteases*); zimojen (inaktif prekürsör) olarak stoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu da apoptoziste rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (Kaspaz 3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan *Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)*'ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- $\beta$  dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom C'nin stoplazmaya

salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom-C'nin salıverilmesine neden olabilirler (58,59).

Kaspazların aktivasyonu; İnaktif (zimojen) formadaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf'nin oligomerize olmak üzere indüklenmesiyle gerçekleşir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom-C'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9 kaspaz-3'ü aktifleştirir. Mitokondriden ayrıca AİF (Apoptozis indükleyici faktör) salıverilir (58,59).

### **Mitokondri**

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu nedenle mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom-C'nin mitokondriden stoplazmaya salıverilmesi) apoptotik süreçte irreversible basamaktır. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir.

### **Bcl- 2 ailesi**

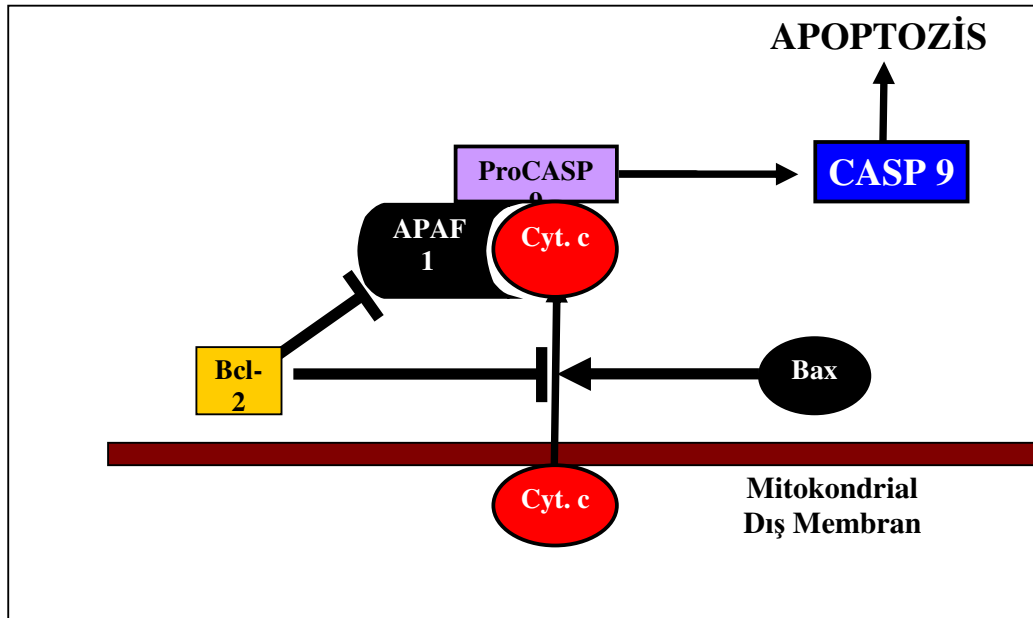
Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur (Tablo 2.5).

**Tablo 2.5.** Bcl-2 ailesi

<b>Bcl-2 Ailesi</b>			
<b>Apoptozisi Baskılayanlar</b>		<b>Apoptozisi İndükleyenler</b>	
• Bcl-2	• Bfl-1	• Bad	• Bcl-xs
• Bcl-xL	• Brag-1	• Bax	• Bik
• BHRL-1	• Mcl 1	• Bak	• Hrk-1
• Bcl-w			

Bu gruplardan biri pro-apoptotik yani apoptozisi indükleyici (Bax, Bad, Bid, v.b.), etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik yani apoptozisi baskılayıcı (Bcl-2, Bcl-X1) etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom-C'nin mitokondriyen sitoplâzmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom-C salıverilmesini baskırlarlar.

Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler "pore" oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçda sitokrom-C ve apoptozis indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriyen sitozole çıkmasını sağlar (Şekil 2.7) (56).



Şekil 2.7. Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması (56).

### Apoptozis ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- $\alpha$ ):

TNF- $\alpha$ , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. TNF- $\alpha$ , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit (NO) salınımını ve inflamasyonu körükler,



prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyarak kollagen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (60).

TNF- $\alpha$  ayrıca, apoptozisin ekstrinsek yolağında, özellikle kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi, intrinsek apoptozis yolağında da başlangıç kaspazlarını aktive etmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- $\alpha$ 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (61).

### **Apoptozisin Genetik Kontrolü**

*Coenorhabditis elegans* isimli bir nematod ile yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki her hücre hayatta kalabilmek için ölümü engelleyici mesaj (Egl-1) yollayabileceği gibi ölümü başlatıcı mesaj da yollayabilir (Ces-1 ve Ces-2). Apoptotik sinyal yandaki hücreden gelebileceği gibi hücrenin kendinden de gelebilir (56,62). Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53, Rb (retinoblastoma) ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (62,63).

### **Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler**

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn: aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktif olduğu bulundu. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler Tablo

2.6' da gösterilmiştir (64).

**Tablo 2.6.** Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Morfolojik görüntüleme yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Işık mikroskobu: H&amp;E, Giemsa</li> <li>• Floresan mikroskobu</li> <li>• Elektron mikroskobu</li> <li>• Faz kontrast mikroskobu</li> </ul>
İmmunohistokimyasal yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anneksin V Yöntemi</li> <li>• TUNEL Yöntemi:</li> <li>• M30 Yöntemi</li> <li>• Kaspaz-3 Yöntemi</li> </ul>
Biyokimyasal yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agaroz Jel Elektroforezi</li> <li>• "Western" Blotting</li> <li>• "Flow" Sitometri</li> </ul>
İmmünolojik yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA</li> <li>• Flourimetrik Yöntem</li> </ul>
Moleküler biyoloji yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA Microarrays</li> </ul>

### **TUNEL Boyama Yöntemi**

TUNEL; *terminal deoxynucleotidyl transferase biotin - dUTP nick end labeling* kelimelerinin kısaltmasıdır.

Apoptotik hücelere ait DNA'lar hızla parçalanarak, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ, bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede terminal deoxynucleotidyl transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelirler. Bu yöntem tek tek hücelerde insitu apoptozisi gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Kan hücreleri gibi sayıca

çok olan hücrelerde kantitatif sonuçlar elde etmek için, aynı TUNEL tekniği flow-Cytometry'ye uygulanabilmektedir. Tek farkı floresans okuma sisteminin flow-Cytometry'de olmasıdır (56).

## 2.7. Leptin

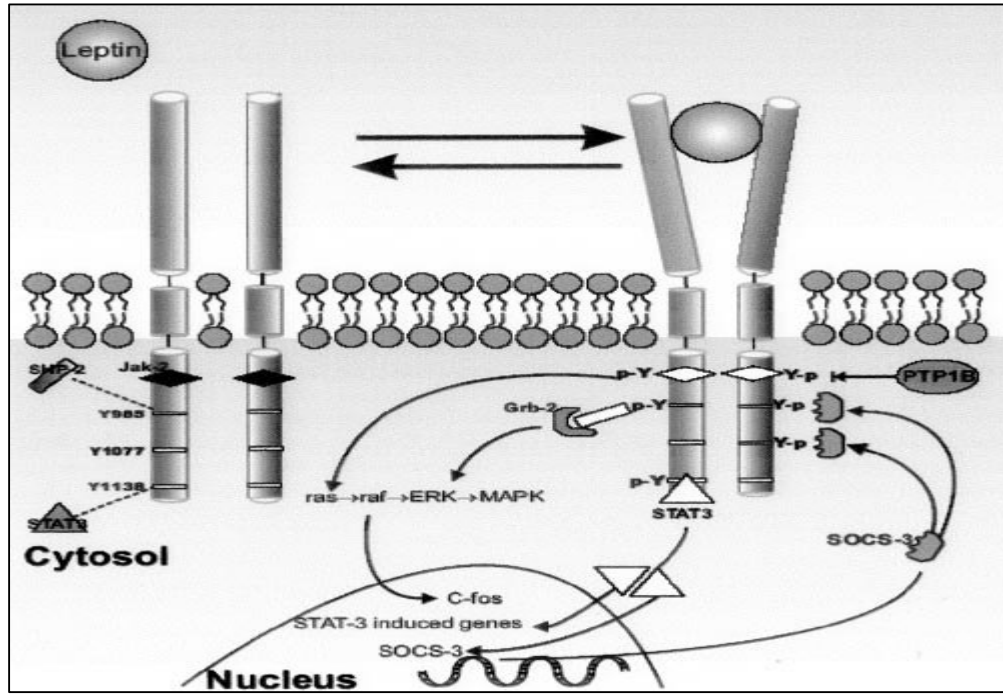
1994 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından keşfedilen leptin, adını Latince leptos (ince) kelimesinden alan, sitokinlere benzeyen ve 167 aminoasit içeren protein yapısında bir hormondur. Molekül ağırlığı 16 kDA'dur ve vücutta birçok alanda fonksiyon gördüğü tespit edilmiştir (65,66).

İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan (7q31) ob/ob geni'nde kodlanmıştır. Leptin ekspresyonu sadece adipöz doku tarafından değil diğer doku ve organlar tarafından da yapılır ve diğer sitokinler gibi çok çeşitli hücre tiplerinde pleiotropik etkiler yapar(67,68). Kanda iki formda bulunur; serbest ve proteine bağlı. Leptin'in aktivitesinden serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir(69,70). Leptinin yarı ömrü insanlarda yaklaşık 25 dakika, sıçanda 3 ile 10 dakika arası (71) farelerde ise 1-3 saat arasındadır (72). Leptin seviyesi öğleden sonra yükselmeye başlar ve gece yarısından sonra pik yaparak gün doğumuna doğru en alt seviyelere iner (73). Sıçan ve insanlarda leptin büyük ölçüde böbrekler ve karaciğer tarafından itrah edilir (74).

### Leptin Reseptörleri

Leptin reseptörleri OB-Rb (uzun reseptörler) ve OB-Ra (kısa reseptörler) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. OB-Rb reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta (nükleus arkuatus) bulunmalarına rağmen vücudun diğer dokularında da (akciğer, böbrek, karaciğer, iskelet kası, kalp, testis, hematopoetik hücreler, yağ dokusu) daha az miktarlarda saptanmışlardır. Yapılan çalışmalarda kısa form reseptörlerin (OB-Ra) intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımadıkları ve bu nedenle sinyal iletiminde rollerinin çok az veya olmadığı görülmüştür. OB-Ra reseptörlerinin bulunduğu başlıca dokular ise böbrek, akciğer, plexus koroideus ve beyin kapillerleridir. Beyin kapillerleri ve plexus koroideus'da OB-Ra reseptörlerinin bol olarak bulunması, kısa form reseptörlerin leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (75).

Leptin reseptörüne bağlandıktan sonra diğer sitokinler gibi JAK-STAT (*Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) sinyal transduserini aktive eder ve daha sonra STAT ve MAP kinaz aktivasyonu yaparak etkisini gösterir (Şekil 2.8). Leptin ayrıca insülin ile beraber arkuat nukleusta fosfatidilinozitol 3 kinazı (PI3K) stimüle ederek etkisini gösterir (76).



Şekil 2.8. Leptin reseptörünün aktivasyonu (75).

### Leptin Sentezi ve Sekresyonunun Regülasyonu

Leptin başlıca adipositlerde sentezlenir, yağ hücresinde ob-gen tarafından mRNA'ya kodlanarak üretilir (76). Leptinin deri altı yağ dokusu hücrelerinde mRNA miktarı visseral yağ dokusuna göre 2 misli fazladır ve yağ hücresinden salgılanması b3 adrenerjik reseptörler aracılığı ile olur.

Leptin düzeyinin ana belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) olsa da bir çok faktör leptinin regülasyonunda rol almaktadır (77). Yemek esnasındaki insülin sekresyon piki sonrası leptin ekspresyonu artar. Bununla beraber insülin adiposit kültürlerinde leptin ekspresyonunu direkt olarak stimüle eder. İnsülin eksikliğinde leptin düzeyi düşük olup insülin tedavisiyle leptin düzeyi yükselir (78, 79) (Tablo 2.7).

**Tablo 2.7.** Leptin sentezini etkileyen faktörler.

Sitümüle Edenler	İnhibe Edenler
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Besin alınımı</li> <li>▪ İnsülin</li> <li>▪ Glukokortikoidler</li> <li>▪ Prolaktin</li> <li>▪ Östrojenik hormonlar</li> <li>▪ TNF alfa (akut)</li> <li>▪ Ateş</li> <li>▪ Endotoksemi</li> <li>▪ Metil p tirozin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tiroid hormonları</li> <li>▪ Büyüme hormonu</li> <li>▪ Somatostatin</li> <li>▪ Yağ asitleri</li> <li>▪ Katekolaminler</li> <li>▪ Androjenik hormonlar</li> <li>▪ TNF alfa kronik</li> <li>▪ Açlık</li> <li>▪ Egzersiz</li> <li>▪ Uzun süre soğuğa maruz kalma</li> </ul>

Leptin kadınlarda erkeklerden daha yüksek bulunur. Kadınlarda yağ dokusunun fazla olması ve erkeklerde testosteronun leptin sekresyonunu inhibe etmesi bu seks farklılığının nedenleri olarak düşünülmektedir. Yarı ömrü 25 dakikadır ve obezlerde yarı ömrü değişmez (80,81). Leptin sekresyonu menstrual siklus süresince değişikliğe uğrar. Folliküler fazda düşük iken ovulasyonda pik yapar ve luteal faz boyunca yüksek seyrederek ve menstruasyonun başlamasıyla birden plazma düzeyleri düşer (82,83).

#### **Leptinin etki mekanizması**

Leptin vücut yağ kitlesi ile orantılı olarak dolaşımda bulunur ve santral sinir sistemine de plazma seviyeleri ile orantılı olarak geçer. Leptinin ana etki mekanizması birçok hipofizer hormonun regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi iştahı artırmak olan nöropeptid-Y'nin arkuat nükleus'dan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (84). Bununla birlikte yapılan çalışmalar leptinin diğer birtakım mediyatörler ile de etkileşim içinde olduğunu ve kompleks bir iletişim ağı olduğunu göstermiştir. Bu mediyatörler başlıca anabolik ve katabolik olarak ikiye ayrılabilirler. Anabolik olanlar (nöropeptid-Y gibi) günlük gıda alımını arttırdığı gibi enerji

harcanmasını da azaltarak pozitif enerji dengesine neden olurlar. Katabolik olanlar ise gıda alımını azaltırlar ve enerji harcanmasını arttırlar. Katabolik mediyatörlerden ilk tanımlanan ve en önemli olanı bir melanokortin ailesi üyesi olan melanosit stimülan hormon (MSH)'dur. Pro-opiomelanokortin (POMC) prekürsöründen oluşan bir molekül olan MSH, melanokortin reseptör ailesinin birçok üyesi için ligandır. Bu üyelerden en önemlileri primer olarak beyinde sentezlenen melanokortin 3 reseptörü (MC3R) ve melanokortin 4 reseptörü (MC4R)'dür. Genetik olarak MC4R defektli farelerin obez olduğu ve bu reseptörün sentetik agonistinin verilmesi ile gıda alımının baskılandığının gösterilmesi, MC4R üzerinden sinyallerin gıda alımını ve yağ dokusundaki artışı sınırladığını göstermiştir. MC3R'deki genetik eksiklik vücutta fazla yağ depolanmasına neden olsa da bu etki ılımlı bir etkidir ve artmış gıda alımı söz konusu değildir. POMC nöronları nükleus arkuatus'da nöropeptid-Y'ye oldukça yakın bulunurlar ve leptin tarafından regüle edilirler (85).

### **Leptinin Etkileri**

#### **Besin Alımını ve Enerji Metabolizmasına Etkileri**

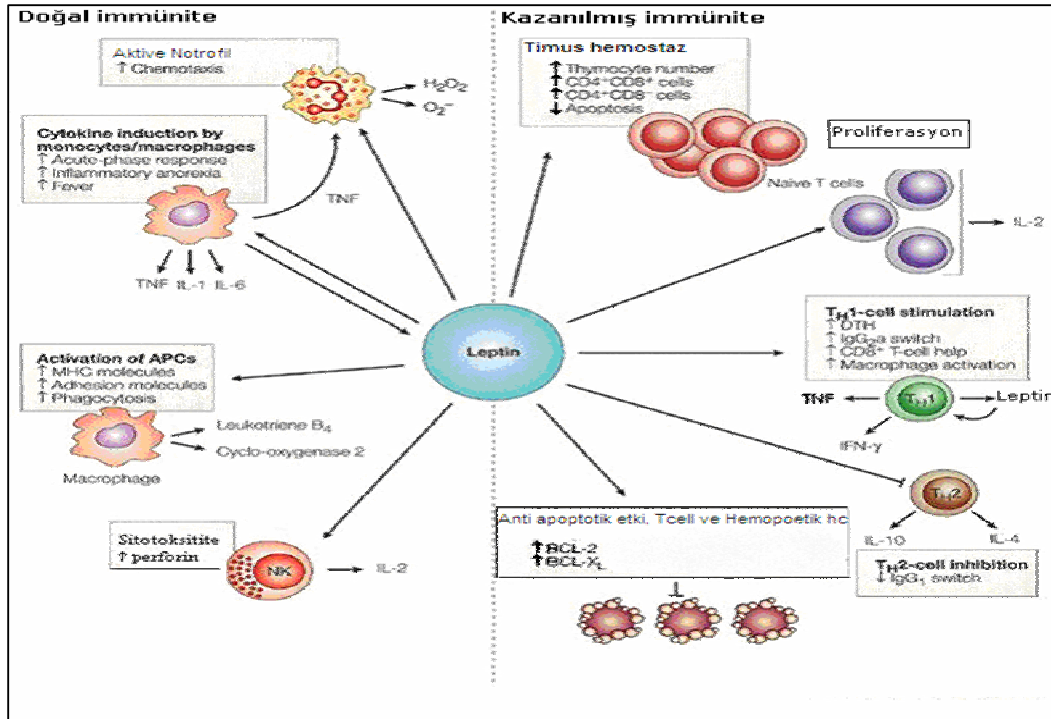
Leptin, beyinde kilo alımına neden olan anabolik sinyal iletimini inhibe ederek, enerji harcanmasını arttıran katabolik sinyal iletimini de aktive ederek fazla kilo alımına engel olur. Leptinden başka gastrointestinal sistemden de öğün boyutunu ve sıklığını düzenlemek için beyine sinyaller gelir. Bunların bir kısmı direkt olarak gastrointestinal traktusun gerilmesi sonucu mekanik impulslarla gelirken, büyük çoğunluğu vagus sinirinin afferent dalları ile ulaşır. Vagusla ulaşan hormonal doygunluk sinyalinden ilk bulunanı ve en önemlisi kolesistokinin'dir. Leptin aynı zamanda kolesistokinin ile uyum içinde çalışmaktadır. Leptin kolesistokinine olan duyarlılığı da artırır ve böylece öğün hacmi azaltılmış olur (85). Leptin yemek yemeyi azaltarak kilo kaybettirir ve enerji harcanmasını arttırır. Bu nedenle leptine anti-obesite hormonuda denilmektedir (86).

Plazma insülin seviyesiyle leptin konsantrasyonu arasında bir korelasyon vardır. Yapılan çalışmalarda uzun süreli hiperinsülinemide plazma leptininin arttığı bulunmuştur. İnsülinin leptin üretimini yağ hücresinde ob-genini stimüle ederek indirekt yolla arttırdığı söylenebilir (87,88). Leptin yokluğunda hayvanlarda ve

insanda obezite ve tip-II diyabet geliştiği bilinmektedir. Leptinin tip-II diabetes mellitusta insüline direnç gelişiminde rolü vardır (89).

### Hematopoez ve İmmün Sisteme Etkileri

Hematopoetik dokularda ve embriyonik gelişim dönemlerindeki “stem” hücrelerinde leptin reseptörlerinin gösterilmesi leptinin hematopoezde rolü olabileceğini düşündürmüştür (90). Kemik iliğindeki adipositlerde leptin sekresyonu gösterilmiş ve leptinin hematopoezde önemli rol oynadığı saptanmıştır. Kök hücrelerin diferansiyasyonunda ve osteoblast oluşumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Leptin, lökosit sentezini uyarır ve eritropoetin hormonunun eritrositlere olan etkisini artırır (91). Tıpkı bakteriler gibi leptin de makrofajları aktive ederek fagositozu güçlendirir ve onlardan pro ve anti-inflamatuar sitokin salınımını uyarır (92). Leptin, çeşitli hücre tiplerinde proliferatif ve anti-apoptotik etkiler gösterir (93). Leptinin CD4+ helper T hücrelerinde stimülasyon etkisi ile proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir. Leptin, Th2 yanıtını inhibe ederken Th1 yanıtını destekler (Şekil 2.9) (94).



Şekil 2.9. Leptinin hematopoez ve immün sisteme etkileri (92).

Leptin, enfeksiyon ve otoimmuniteye duyarlılığın dengelenmesinde önemli role sahiptir (94). Leptin yetmezlikli hastalarda immün sistemde değişiklikler olduğu saptanmış olup, ayrıca bu hastalarda antioksidan koruma sisteminin bozuk olduğu da gösterilmiştir. Ekzojen leptin verilmesinin, leptin yetmezliği veya düşük leptin düzeyi ile ilişkili immunolojik bozuklukları düzelttiği bildirilmiştir (93).

### **Anjiyogenez**

Obezitenin gelişme ve düzelme (zayıflama) fazlarında, leptindeki artma ve azalmalara paralel olarak yağ dokusunun vaskülaritesinde de fizyolojik olarak artmalar ve azalmalar olduğu saptanmıştır. Bu da leptinin anjiyogenezde bir lokal regülatör olarak davrandığını düşündürmüştür (95). Leptin reseptörleri damar endotel hücrelerinde mevcuttur ve anjiyogenezisi artırır. Leptin, normal rat korneasında yeni damar oluşumuna neden olurken leptin reseptörü yetersiz olan *Zucker* fa/fa rat korneası için etkisiz olmuştur (96). Hem in vitro hem in vivo çalışmalar, leptinin anjiyogenezisi ilerletici aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bununla beraber ob/ob farelere sistemik veya topikal olarak leptin verilmesi anjiyogenezisi etkilemeden yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (97).

### **Metabolizma**

Leptinin metabolizma üzerine iyi bilinmeyen ve olasılıkla oldukça kompleks etkileri vardır. Az gıda alımı hem yağ kitlesi hem yağsız kitlede kayba neden olur. Leptin tedavisi ise adipoz dokuda lipolizi artırır fakat yağsız dokuya etki belirgin değildir (98). Leptin, yağ asidi sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan Asetil Ko-A karboksilaz aktivitesini inhibe ederek yağ asidi ve trigliserid sentezini azaltıp lipid oksidasyonunu artırır (99). Yüksek doz leptin pankreasın  $\beta$  hücrelerinden insülin salınımı üzerine inhibitör etki göstermektedir (100). Leptin, tiroid hormonlarının seviyesini ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu artırarak kenetlenmeyi bozucu protein (UCP) oluşumunu ve sonuçta termogenezi (ATP sentezi yerine ısı açığa çıkmasını) artırır (96).

### **Obezite**

Leptin eksikliğinin obezite ile sonuçlandığı günümüzde artık oldukça iyi bilinen ve kabul edilmiş bir gerçektir. Ob/ob farelerdeki “nonsense” bir mutasyon



obezite, artmış gıda alımı (iştah) ve diyabet gelişmesi ile sonuçlanmaktadır ve aynı farelerde adipositlerden leptinin sentez ve sekresyonunun bozuk ve yetersiz olduğu da saptanmıştır (95). Benzer şekilde leptine direnç gösteren db/db fareler de obezdirler (101) ve tıpkı ob/ob fareleri gibi bunlarda da leptin yeterli fonksiyon gösterememektedir. Obez insanlarda leptin geninde henüz farelerdeki gibi bir mutasyon saptanamasa da serum leptin konsantrasyonları obezite göstergeleri olan vücut kitle indeksi (VKİ) ve vücut yağ kitlesi oranı ile pozitif bir korelasyon göstermektedir (102). Ob/ob farelere rekombinant leptin verilmesi ile gıda alımı (iştah), vücut kilosu, insülin ve glukoz konsantrasyonlarının azalması görülür, oysa db/db farelere (leptin rezistansı) leptin verilmesi ile herhangi bir etkinin görülmemesi obezitede asıl sorunun leptin eksikliğinden çok leptin rezistansı olduğunu düşündürmektedir. Obez insanların büyük çoğunluğunda serum leptin konsantrasyonları yüksektir ve kilo verimi ile tekrar azalır (103). Ayrıca obez insanlardaki plazma leptin konsantrasyonları her ne kadar obez olmayanlara göre 5 kat kadar yüksek olsa da serebral sıvıdaki leptin konsantrasyonlarının sadece çok az yüksek olması leptin rezistansını kolaylaştıran hız sınırlayıcı faktörün santral sinir sistemine leptin transportundaki defekt olduğunu göstermektedir (104,105).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi T.I.C.A.M. (Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi) laboratuvarında 21.01.2009 tarihli 81-1 sayılı etik kurul kararıyla yapıldı.

#### 3.1. Hayvanlar ve Diyet

Çalışmada TICAM'dan temin edilen 5–6 aylık, ağırlıkları 250–300 gr. arasında değişen her iki cinse ait *Sprague-Dawley* türü sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart sanayi yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Çalışma 3 gruptan oluşmuştur ve her bir grupta 6 adet sıçan olacak şekilde toplam 18 adet sıçan kullanılmıştır.

Grup I. Kontrol Grubu (n=6)

Grup II. CCl<sub>4</sub> Grubu (n=6)

Grup III. Leptin + CCl<sub>4</sub> Grubu (n=6)

Sıçanlar yeni ortam ve koşullarına uyum sağlamaları için kafeslere yerleştirildikten bir hafta sonra deneye başlanmıştır.

#### 3.2. Deney Protokolü

1. gruptaki (kontrol grubu) sıçanlara 0,8 ml/kg, i.p. (intraperitoneal) yolla zeytinyağı, 2. gruptaki (CCl<sub>4</sub> grubu) sıçanlara 0,8 ml/kg, i.p. yolla CCl<sub>4</sub>: zeytinyağı karışımı (1:1 hacminde) ve 3. gruptaki (Leptin + CCl<sub>4</sub> grubu) sıçanlara 0,8 ml/kg, i.p. yolla CCl<sub>4</sub>: zeytinyağı karışımı (1:1 hacminde) uygulanmasından 6 saat sonra Leptin (10 µg/kg; *Sigma L-4146, Chemical Co. St. Louis, MO, USA.*) i.p. olarak uygulandı. Daha sonra sıçanlar kendi kafeslerine konarak beslenmelerine devam edildi.

24 saat sonra, 8 saatlik açlığı takiben subkutan (sc) olarak 50 mg/kg Sodyum Pentotal anestezisi altında bütün sıçanlara laparotomi yapılarak intrakardiyak girişimle yaklaşık 3 ml kan örneği alındı ardından ratların karaciğerleri çıkarılarak sıçanlar dekapite edildi.

Çıkarılan karaciğer dokusunun bir kısmı soğuk %0,09 NaCl ile yıkayıp alüminyum folyo içine sarılarak -80 C° 'de muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra doku MDA ve TNF-α düzeyleri saptandı. Alınan kan örneği 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan plazma -80 C° 'de

muhafaza edildi. Dondurulan serum örnekleri oda ısısında çözüldükten sonra serum AST, ALT, ALP ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçüldü.

### **3.3. Biyokimyasal Değerlendirme:**

Doku örneklerinin homojenizasyonu 1/10 oranında 0.1 M, fosfat tamponu (pH: 7,4) ile IKA T18 Basic marka (Wilmington NC, USA) homojenizatör ile yapıldı. Homojenatlar 8000 rpm, +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar nümune olarak kullanıldı.

Serum ve dokuda TNF- $\alpha$ , Biosource firmasına ait ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. Doku MDA düzeyleri ise Agilent 1100 Series marka HPLC sisteminde Chromsystems Diagnostics (Munich, Germany) firmasına ait kolon ve kitler kullanılarak ölçüldü. Tüm doku örneklerinde sonuçlar gram doku proteini başına verilmiştir. Doku proteinleri Fluka marka kit ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Serum ALT, AST ve ALP düzeyleri Hithachi Modular P Otoanalizöründe Roche Diagnostic Firmasına ait kitler ile çalışıldı.

### **3.4. Histopatolojik Değerlendirme**

İncelenecek olan karaciğer dokuları, nötral formalinde 24 saat fikse edildikten sonra, doku takip cihazı ile rutin histolojik takipleri yapıldı. Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden 4  $\mu$ m kalınlığındaki seri kesitler, poly-L-lysin kaplı lamlara alındı. Parafin bloklardan elde edilen kesitlere iki değişik histolojik boyama yöntemi uygulandı.

Karaciğerlerin genel yapı özelliklerini ortaya koymak için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama yöntemi kullanıldı. Karaciğerin histolojik değerlendirilmesinde skorlama kullanıldı. Bu skorlamada hepatik hasar; (-): yok, (+): hafif, (++) : orta ve (+++) : şiddetli olarak değerlendirildi. Hepatik hasarın incelenmesinde; vena centralis, portal alan ve sinuzoidlerdeki konjesyon, hepatositlerdeki balonlaşma dejenerasyonu ve yeri, parenkimdeki fokal nekrozun varlığı, PMNL ve MNL infiltrasyonu, hepatosit nükleuslarında karyoliz, piknoz varlığı, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlardaki bozulma skorlanarak değerlendirildi.

Apoptozis gösteren hücreleri belirlemeye yönelik TUNEL boyaması yapıldı.

### **TUNEL Boyama Tekniği**

Kullanılan kit: ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101- Chemicon International. USA & Canada.

**a.** Kesitler önce 3 kez değiştirilen ksilollerde 15'er dk. bekletildiler ve deparafinize edildiler. Daha sonra sırasıyla;

**b.** 2 kez %100 alkolde 5'er dk. tutuldular.

**c.** %95'lik alkolde 3 dk. tutuldular.

**d.** %70'lik alkolde 3 dk. tutuldular.

**e.** PBS solüsyonunda 5 dk. yıkandılar.

**f.** Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dk. tutuldular.

**g.** 2 kez değiştirilmiş distile suda 2'şer dk. yıkandılar.

**h.** %3'lük Hidrojen Peroksidaz içerisinde oda ısısında 5 dk. tutuldular.

**i.** PBS içerisinde 5–10 dk. çalkalandılar.

**j.** Equilibration Buffer içinde oda ısısında 5 dk. inkübe edildiler.

**k.** Kesitlere TdT enzimi uygulanarak etüvde 37 derecede nemli ortamda 1 saat tutuldular.

**l.** 3 kez deđiřtirilmiş PBS solüsyonunda 1'er dk. olmak üzere bekletildiler.

**m.** Oda ısısındaki kesitlere anti-digoxigenin peroksidaz damlatılarak üzerleri plastik coverslip ile kaplandı ve oda ısısında nemli ortamda 30 dk. bekletildiler.

**n.** 4 kez değiştirilen PBS solüsyonunda oda ısısında 2'şer dk. yıkandılar.

**o.** Kesitler üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildiler.

**p.** Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1'er dk. yıkandı ve son distile suda 5 dk. tutuldular.

**q.** Metil Green'de 10 dk. boyandılar.

**r.** 3 kez değiştirilmiş distile suda 30'ar saniye çalkalandılar.

**s.** Kesitler 3 kez değiştirilmiş %100 lük butanolden hızlı bir şekilde çalkalanarak geçirildiler.

**t.** Xylol I'de 2 dk. , Xylol II'de 2 dk. ve Xylol III'de - 5 dk. bekletildiler.

**u.** Kesitler en son olarak üzerlerine kapatma mediumu damlatılarak kapatıldılar.

Kesitler DP70 dijital kamera ekli Olympus marka fotomikroskop ile görüntülendi. Her bir sıçana ait rasgele seçilmiş 25 parafin kesitte X40 objektif ile 50

alandaki, oküler mikrometresi yardımıyla, kahverengi boyanmış apoptotik hücreler sayıldı. Her bir sıçana ve daha sonra da her bir gruba ait apoptotik indeks aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Apoptotik İndeks (AI)} = \frac{\text{Apoptotik Hücre Sayısı}}{50}$$

Daha sonra elde edilen bulgular, istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

### 3.5. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 13,0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanıldı.

Karaciğer örneklerinde ölçülen serum ALT, AST, ALP ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin ve doku MDA ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel yönden  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Histopatolojik inceleme sonucunda her sıçanın karaciğer spesmenlerinde apoptozis gösteren hücreler sayılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi.

Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel yönden  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

#### Serum AST, ALT, ALP, TNF- $\alpha$ Düzeyleri

Kontrol grubunun, CCl<sub>4</sub> ile toksik karaciğer hasarı oluşturulan grubun ve hasar sonrası leptin tedavisi yapılan grubun serum AST, ALT, ALP, TNF- $\alpha$  değerleri Tablo-4.1’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.1.** Gruplara göre serum AST, ALT, ALP ve TNF- $\alpha$  değerleri

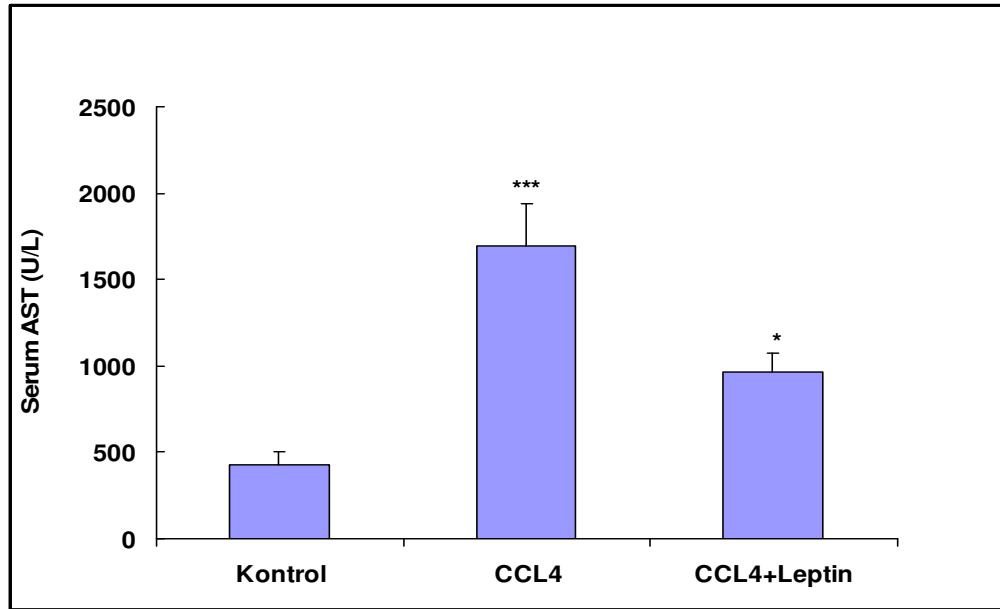
SERUM	Sıçan No	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
K O N T R O L	1	567	313	260	5,51
	2	207	280	264	7,32
	3	221	109	303	7,23
	4	491	302	547	4,8
	5	360	139	562	4,77
	6	701	341	311	4,99
CCl <sub>4</sub>	1	1695	762	874	8,3
	2	2662	644	695	11,73
	3	1789	873	665	8,34
	4	775	651	666	9,27
	5	1552	880	780	19,73
	6	1695	762	661	13
CCl <sub>4</sub> + LEPTİN	1	1127	378	427	7,76
	2	1313	483	257	5,15
	3	705	268	482	5,54
	4	1007	429	253	7,54
	5	636	463	540	6,84
	6	1016	584	363	4,86

Kontrol grubunun, CCl<sub>4</sub> ile toksik karaciğer hasarı oluşturulan grubun ve hasar sonrası Leptin tedavisi yapılan grubun serum AST, ALT, ALP, TNF- $\alpha$  ortalama değerleri Tablo 4.2’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.2.** Gruplara göre serum AST, ALT, ALP ve TNF- $\alpha$  ortalama değerleri

SERUM	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
<b>Kontrol</b> (n=6)	424.5 ±80.4	247.3 ±40	374.5 ±57.5	5.77 ±0.48
<b>CCl<sub>4</sub></b> (n=6)	1694.6 ±245.6	762 ±41.8	723.5 ±35.25	11.72 ±1.77
<b>CCl<sub>4</sub> + Leptin</b> (n=6)	255 ±104.4	434.16 ±43.3	387 ±48.11	6.28 ±0.51

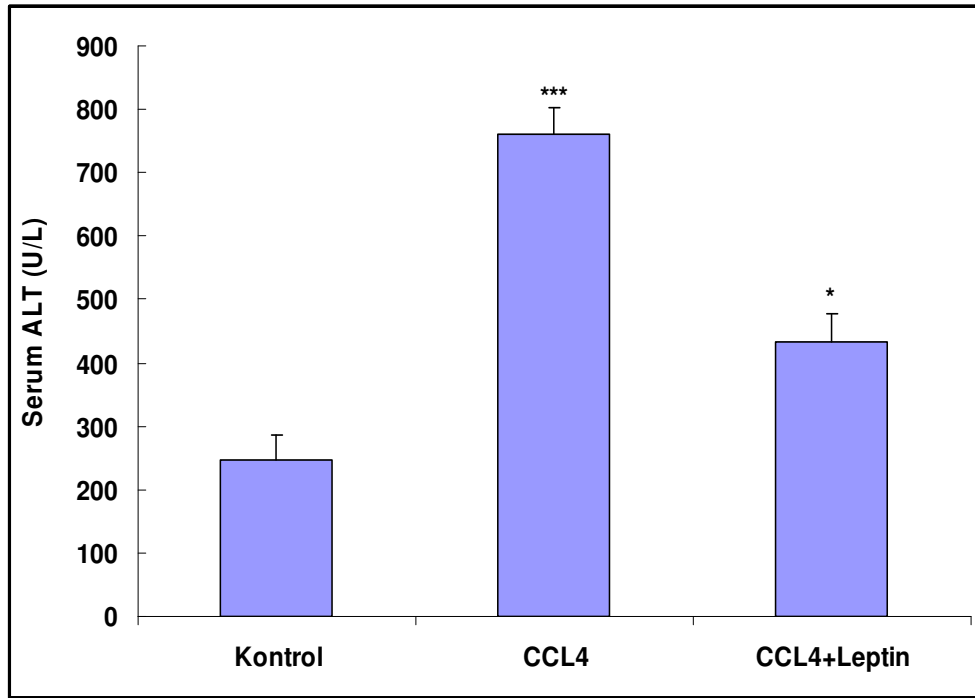
Leptinin serum AST düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Leptinin serum AST düzeyi üzerine etkisi; \* $p < 0,05$ ; CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubu, CCL<sub>4</sub> grubundan anlamlı düzeyde farklıdır. \*\*\* $p < 0,001$ ; CCL<sub>4</sub> grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Kontrol grubunda serum AST düzeyi  $424,5 \pm 80,4$  (U/L) iken,  $CCl_4$  grubunda yükselerek  $1694,6 \pm 245,6$  (U/L)'ya çıktı.  $CCl_4$ -Leptin verilen grupta ise  $967,3 \pm 104,4$  (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber,  $CCl_4$  grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ( $p < 0,001$ ) saptandı.

Leptinin serum ALT düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



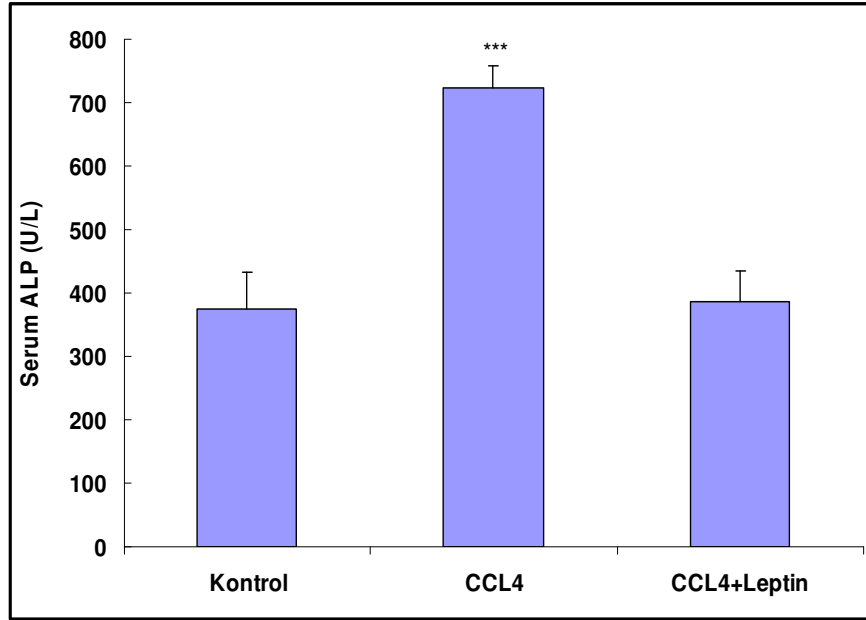
**Şekil 4.2.** Leptinin serum ALT düzeyi üzerine etkisi; \* $p < 0,05$ ; kontrol ve  $CCl_4$  + Leptin tedavi grubu arasında anlamlı düzeyde fark vardır. \*\*\* $p < 0,001$ ;  $CCl_4$ , grubu kontrol ve  $CCl_4$ +Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Kontrol grubunda serum ALT düzeyi  $247,3 \pm 40$  (U/L) iken,  $CCl_4$  grubunda yükselerek  $762 \pm 41,8$  (U/L) 'ye çıktı.  $CCl_4$ -Leptin verilen grupta ise  $434,16 \pm 43,3$  (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber,  $CCl_4$  grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ( $p < 0,001$ ) saptandı.

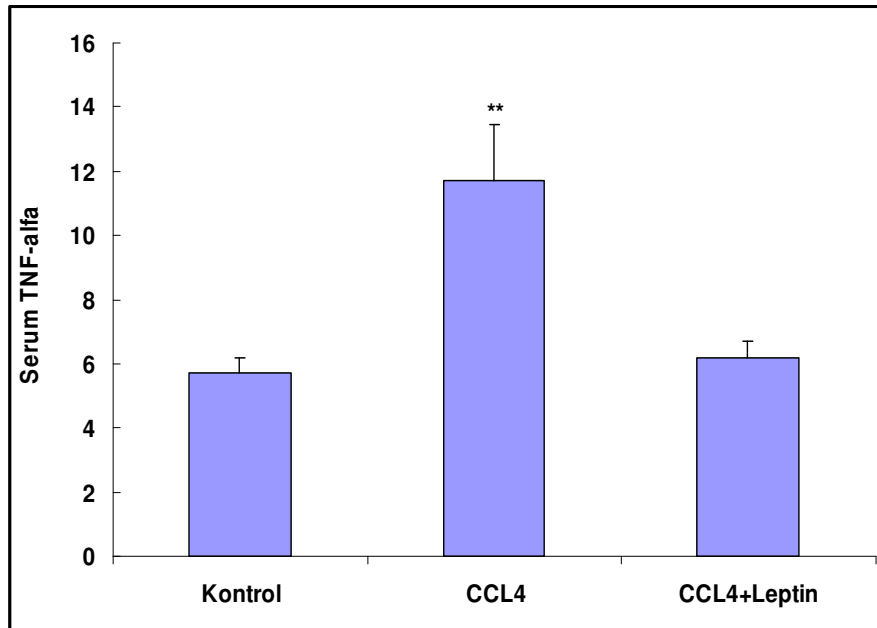
Leptinin serum ALP ve serum TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine etkisi Şekil 4.3 ve



Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Leptinin serum ALP düzeyi üzerine etkisi; \*\*\* $p < 0,001$ ; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.



Şekil 4.4. Leptinin serum TNF- $\alpha$  düzeyi üzerine etkisi; \*\* $p < 0,01$ ; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Kontrol grubunda serum ALP düzeyi  $374,5 \pm 57,5$  (U/L) iken, CCl<sub>4</sub> grubunda yükselerek  $723,5 \pm 35,25$  (U/L)'ye çıktı. CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta ise  $387 \pm 48,11$  (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, CCl<sub>4</sub> grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ( $p<0,001$ ) saptandı.

Kontrol grubunda serum TNF- $\alpha$  düzeyi  $5,77 \pm 0,48$ (pg/ml) iken, CCl<sub>4</sub> grubunda yükselerek  $11,72 \pm 1,77$ (pg/ml) 'ye çıktı. CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta ise  $6,28 \pm 0,51$  (pg/ml) ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, CCl<sub>4</sub> grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak ( $p<0,01$ ) daha düşük saptandı.

### Doku TNF- $\alpha$ ve MDA Düzeyleri

Kontrol, CCl<sub>4</sub> ve CCl<sub>4</sub>+Leptin gruplarının doku TNF- $\alpha$  ve MDA değerleri Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

**Tablo 4.3.** Gruplara göre doku TNF- $\alpha$  ve MDA değerleri

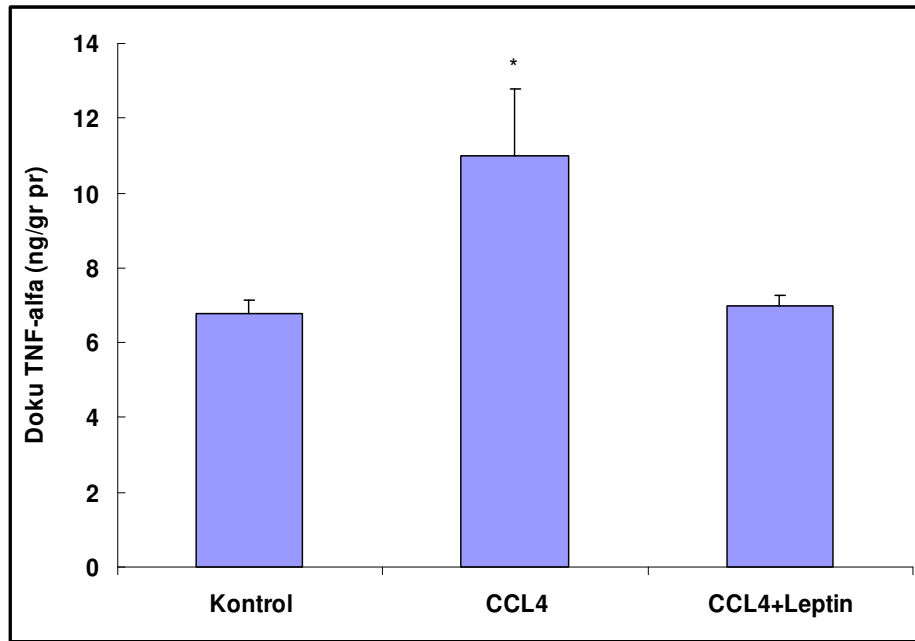
SERUM	Sıçan No	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	MDA (nmol/g pr)
K O N T R O L	1	5,76	27,14
	2	7,28	45,74
	3	5,86	37,9
	4	7,28	37,9
	5	6,54	32,49
	6	7,96	36,65
CCl <sub>4</sub>	1	6,29	65,62
	2	15,56	41,09
	3	15,25	44,68
	4	8,43	49,47
	5	6,86	49,47
	6	14,08	58,08
CCl <sub>4</sub> + LEPTİN	1	6,12	36,71
	2	7,6	19,11
	3	7,8	27,77
	4	7,04	37,78
	5	6,37	47,97
	6	7,08	50,9

Kontrol grubunun, CCl<sub>4</sub> ile toksik karaciğer hasarı oluşturulan grubun ve hasar sonrası Leptin tedavisi yapılan grubun doku TNF- $\alpha$  ve MDA ortalama değerleri Tablo 4.4’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.4.** Gruplara göre doku TNF- $\alpha$  ve MDA ortalama değerleri

Doku	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	MDA (nmol/g pr)
Kontrol (n=6)	6,78 $\pm$ 0,35	36.30 $\pm$ 2,53
CCl <sub>4</sub> (n=6)	11,07 $\pm$ 1,77	51,40 $\pm$ 3,67
CCl <sub>4</sub> + Leptin (n=6)	7,0 $\pm$ 0,26	36,70 $\pm$ 4,89

Leptinin doku TNF- $\alpha$  düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.5’te gösterilmiştir.

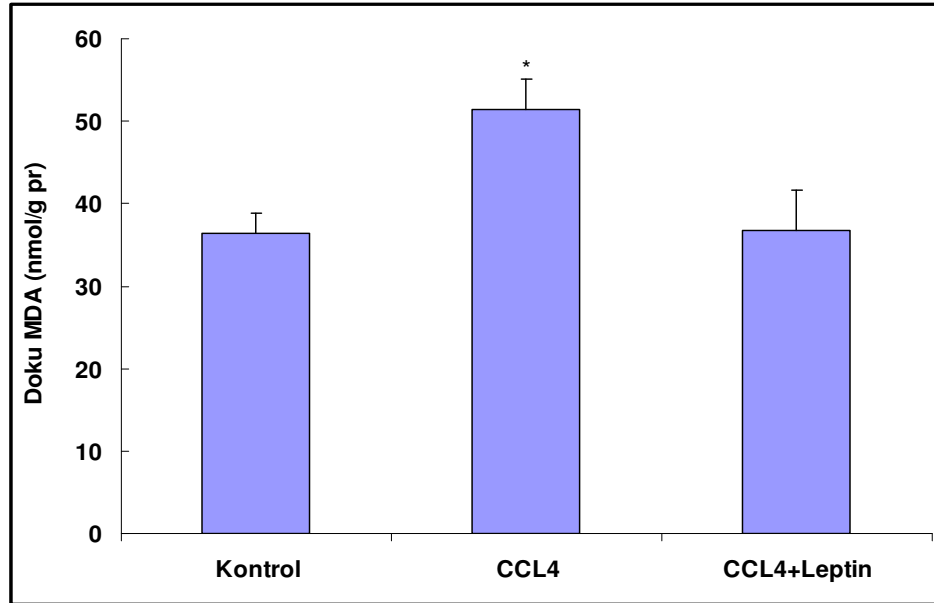


**Şekil 4.5.** Leptinin doku TNF- $\alpha$  düzeyi üzerine etkisi; \*p< 0,05; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklıdır,

Kontrol grubunda doku TNF- $\alpha$  düzeyi 6,78  $\pm$  0,35 (pg/ml) iken, CCl<sub>4</sub> grubunda yükselerek 11,07  $\pm$  1.77 (pg/ml) ’ye çıktı. CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta ise 77,0  $\pm$  0.26 (pg/ml) ya kadar düştü. Bu sonuçlar istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında

CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubundan anlamlı (\*p< 0,05) düzeyde farklı olarak saptandı.

Leptinin doku MDA düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

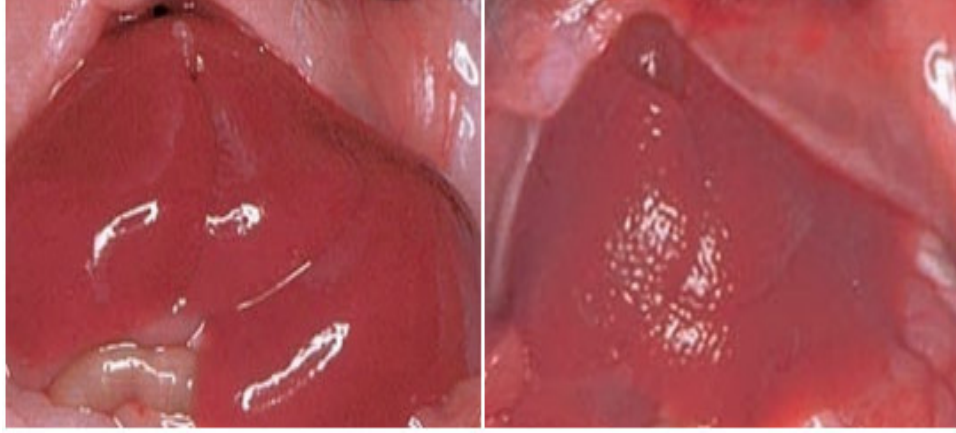


**Şekil 4.6.** Leptinin doku MDA düzeyi üzerine etkisi; \*p< 0,05; CCL<sub>4</sub> grubu kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklıdır

Kontrol grubunda doku MDA düzeyi  $36,30 \pm 2,53$  (pg/ml) iken, CCL<sub>4</sub> grubunda yükselerek  $51,40 \pm 3,67$  (pg/ml) 'ye çıktı. CCL<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta ise  $36,70 \pm 4,89$  (pg/ml) 'a kadar düştü. Bu sonuçlar istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin tedavi grubundan anlamlı (\*p< 0,05) düzeyde farklı olarak saptandı.

#### 4.1. Histopatolojik Bulgular

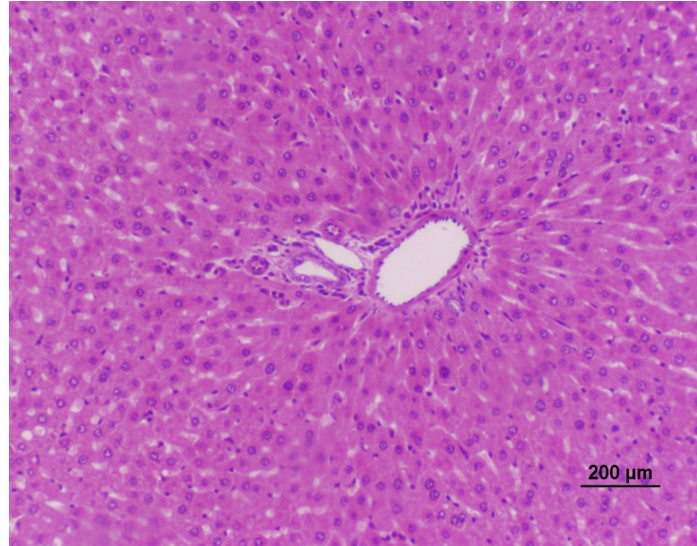
İntraperitoneal yolla CCL<sub>4</sub> uygulanmış ratların karaciğer makroskopik görünümünde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında toksik hasarla ilişkili olarak nodüler bir görünüm gelişmişti ve bu görünüm Leptinle tedavi edilen gruptaki ratların karaciğerlerinde de azalmakla birlikte devam ediyordu (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Kontrol ve CCl<sub>4</sub> grubunda makroskopik görünüm

### **Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Bulguları**

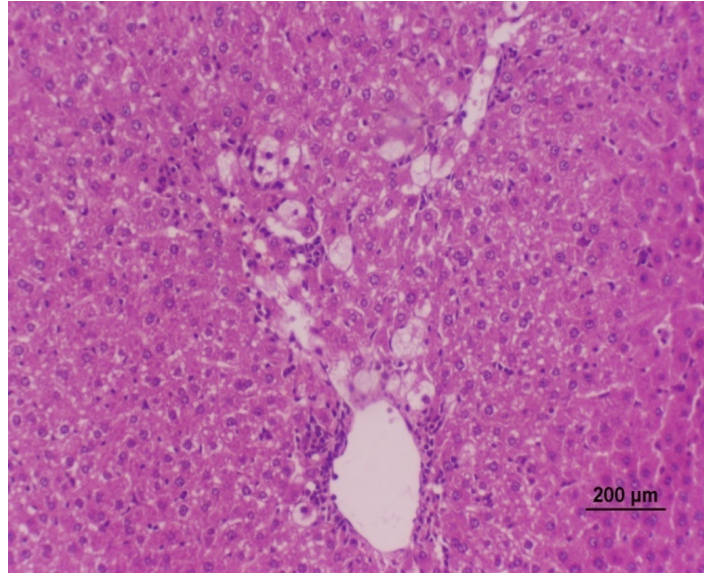
Kontrol grubunda konjesyon gözlenmedi. Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve fokal nekroz alanları görülmemiştir. PMNL ve MNL infiltrasyonları görülmemiştir. Hücre nükleuslarında karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma görülmemiştir (Şekil 4.8).



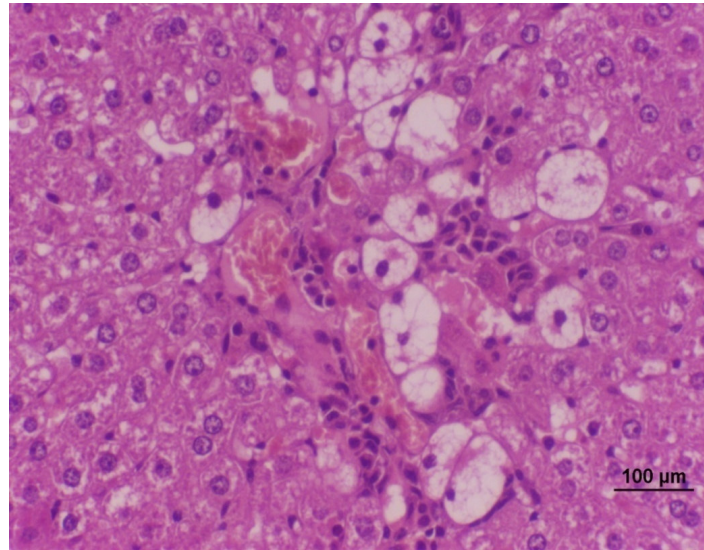
**Şekil 4.8.** Kontrol grubuna ait panoramik görüntü. H-E. Bar 200 µm.

CCl<sub>4</sub> grubundaki incelemede konjesyonun sentral vende orta düzeyde, portal alan ve sinuzoidlerde şiddetli olduğunu ve kontrol grubuna göre arttığını gözledik.

Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu makroveziküler olup; sentrilobüler alanda (Zon-3'te) şiddetli, midzonal alanda (Zon-2'de) orta düzeyde idi. Parankimde fokal nekroz alanlarına rastlanmadı (Şekil 4.9, 4.10).



**Şekil 4.9.** CCl<sub>4</sub> grubuna ait balonlaşma dejenerasyonu. H-E. Bar 200 µm.

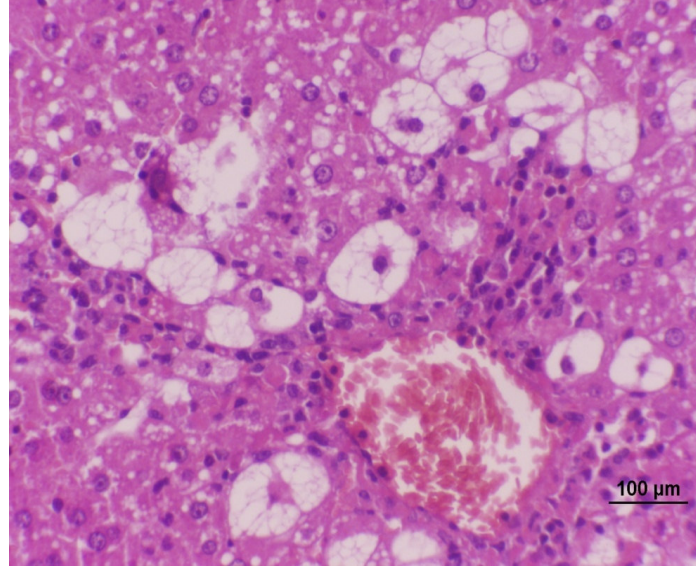


**Şekil 4.10.** CCl<sub>4</sub> grubuna ait balonlaşma dejenerasyonu. H-E. Bar 100 µm.

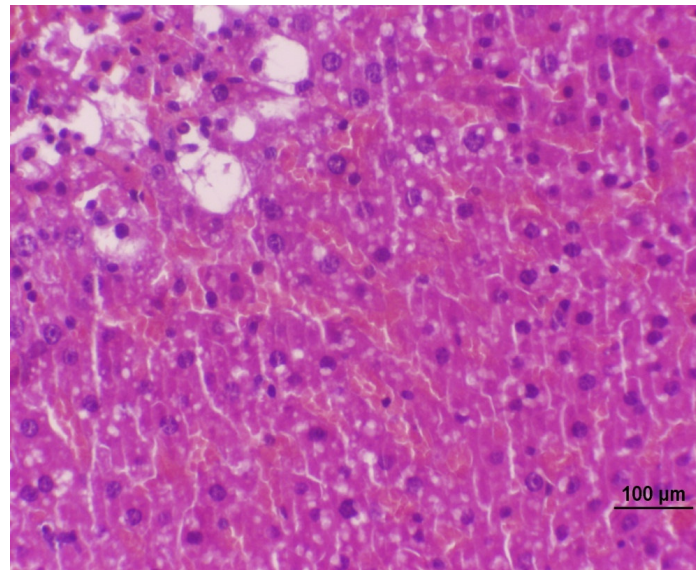
PMNL infiltrasyonu hafif, MNL infiltrasyonu sentral vende hafif, portal

alandaki şiddetli, sinizoidlerde orta düzeydeydi. Hücrelerde karyoliz ve piknoz orta düzeyde, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma şiddetliydi.

CCl<sub>4</sub>+Leptin grubunda balonlaşma dejenerasyonu Şekil 4.11 ve 4.12’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11.** CCl<sub>4</sub>+Leptin grubunda balonlaşma dejenerasyonu, konjesyon ve MNL infiltrasyonu. H-E. Bar 100 µm.



**Şekil 4.12.** CCl<sub>4</sub>+Leptin grubunda balonlaşma dejenerasyonu. H-E. Bar 100 µm.

CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta ise sentral vende ve sinuzoidlerde orta, portal alanda şiddetli düzeyde konjesyon görüldü. Hepatositlerdeki balonlaşma dejenerasyonu mikroveziküler, az miktarda makroveziküler olup; sentrilobüler alanda (Zon-3'te) orta düzeyde idi. Fokal nekroz alanları görülmedi. PMNL infiltrasyonu görülmezken, MNL infiltrasyonu sentral vende hafif, portal alan ve sinuzoidlerde orta düzeyde görülmüştür. Hücre nükleuslarındaki karyoliz ve piknoz hafif düzeyde idi. İntersellüler sınır kaybı hafif ve hepatik kordlardaki bozulma orta olarak skorlandı.

Tüm gruplar karşılaştırıldığında; parenkimde fokal nekroz alanları hiçbir grupta gözlenmedi. Sentral ven ve portal alandaki konjesyon açısından CCl<sub>4</sub> grubu ve CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grup arasında bir fark gözlenmezken, CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta sinüzoidal konjesyonda CCl<sub>4</sub> grubundakine göre bir azalma gözlenmiştir. MNL infiltrasyonu açısından sentral ven ve sinuzoidlerde bir farklılık gözlenmezken, portal alandaki MNL infiltrasyonunda CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiştir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Gruplarda H&E İncelemelerinin Karşılaştırılması I

GRUPLAR	Konjesyon			PMNL			MNL			Fokal Nekroz
	CV	PA	SİN	CV	PA	SİN	CV	PA	SİN	
<b>Kontrol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CCl<sub>4</sub></b>	++	+++	+++	+	+	+	+	+++	++	-
<b>CCl<sub>4</sub>+Leptin</b>	++	+++	++	-	-	-	+	++	++	-

Yine tüm gruplar karşılaştırıldığında; balonlaşma dejenerasyonunda CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiş olup, sadece sentrilobüler zonda (Zon-3) balonlaşma dejenerasyonuna rastlanmıştır. PMNL infiltrasyonunda CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiştir. CCl<sub>4</sub> grubundaki balon dejenerasyonu makroveziküler, CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen gruptaki balon dejenerasyonu ise mikroveziküler, az miktarda makroveziküler idi. Karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma açısından CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiştir (Tablo 4.6). Bu gözlemler ışığında leptinin varlığında skorların



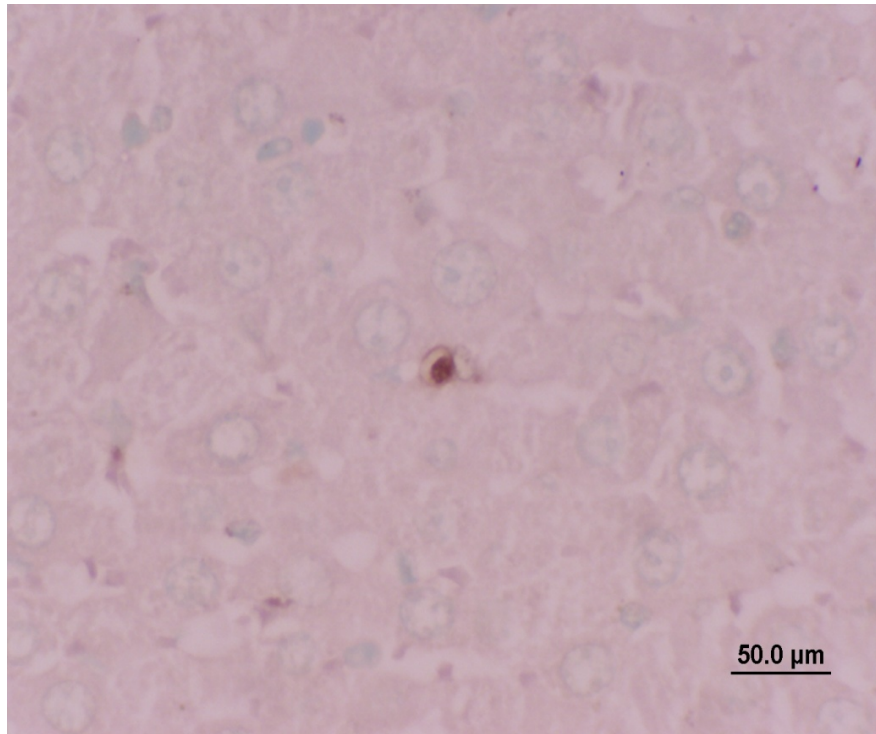
azalmaya yönelik olduğu gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.6.** Gruplarda H&E İncelemelerinin Karşılaştırılması II

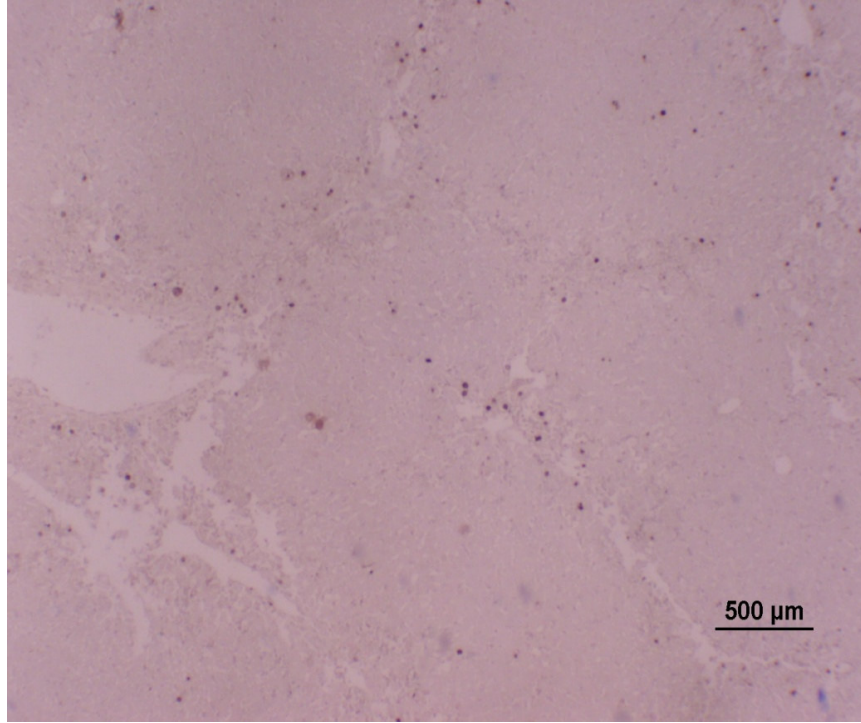
GRUPLAR	Balon Dejenerasyonu Ve Yeri	Karyoliz, Piknoz	İntersellüler Sınır Kaybı	Hepatik Kord Bozukluğu
Kontrol	-	-	-	-
CCl <sub>4</sub>	+++ Z3,SL	++	+++	+++
	++ Z2,MZ			
CCl <sub>4</sub> +Leptin	++ Z3,SL	+	+	++

### TUNEL Boyama Bulguları

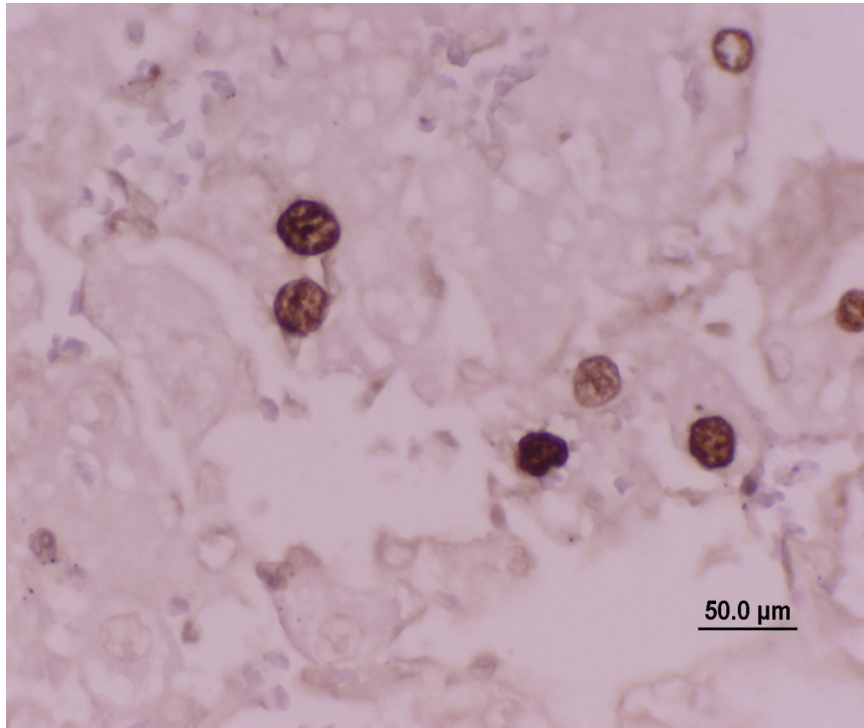
Işık mikroskobu ile her bir hayvana ait rastgele seçilmiş 25 parafin kesitte x40 objektif ile 50 alanda oküler mikrometresi yardımıyla kahverengi boyanmış apoptotik hücreler ve boyanmamış hücreler sayılmıştır. Gruplarda TUNEL boyama ile boyanan apoptotik hücreler aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. (Şekil 4.13-4.17).



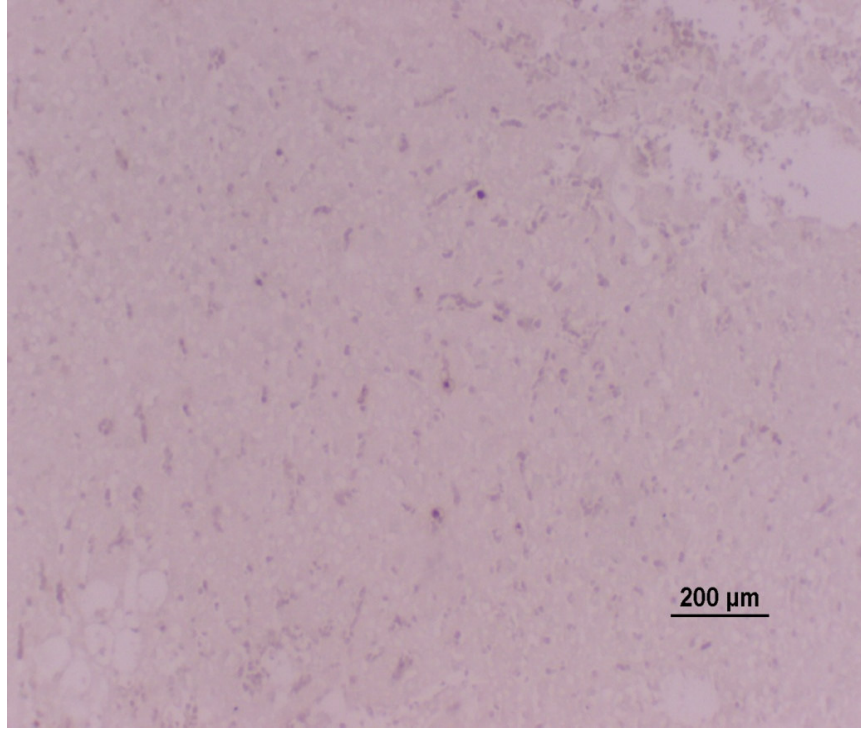
**Şekil 4.13.** Kontrol grubunda apoptotik bir hücrenin görünümü. TUNEL. Bar 50 μm.



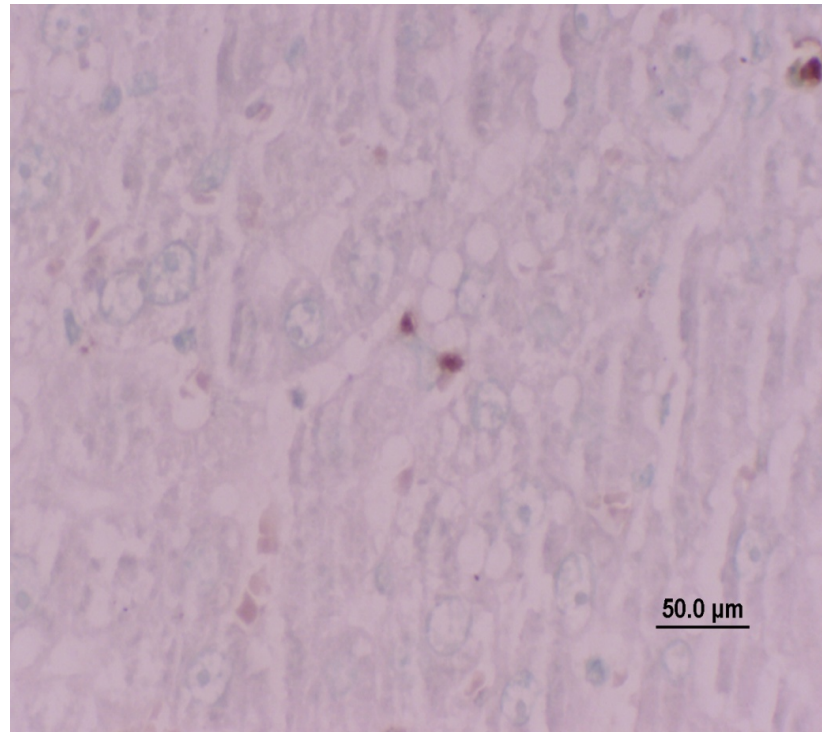
Şekil 4.14. CCl<sub>4</sub> grubunda apoptotik hücreler I. TUNEL. Bar 500 μm.



Şekil 4.15. CCl<sub>4</sub> grubunda apoptotik hücreler II. TUNEL. Bar 50 μm.



**Şekil 4.16.** CCl<sub>4</sub>+Leptin grubunda apoptotik hücreler I. TUNEL. Bar 200 μm.



**Şekil 4.17.** CCl<sub>4</sub>+Leptin grubunda apoptotik hücreler II. TUNEL. Bar 50 μm.

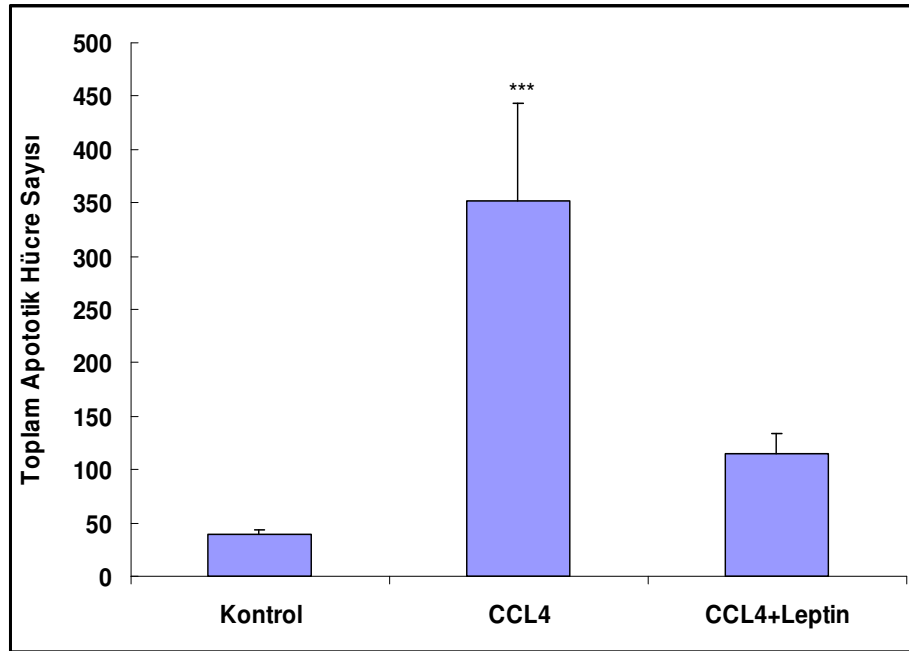
Ardından her bir sıçana ve daha sonra da her bir gruba ait apoptotik indeks aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve bulgular Tablo 4.7 'de gösterilmiştir.

$$\text{Apoptotik İndeks (AI)} = \text{Apoptotik Hücre Sayısı} / 50$$

**Tablo 4.7.** Grupların Apoptotik Hücre Sayısı ve Apoptotik İndeks.

	Sıçan No.	Toplam Apoptotik Hücre Sayısı	Apoptotik İndeks (AI)	Grubun Ortalama Apoptotik İndeksi
<b>KONTROL</b>	1	31	0.62	0.78
	2	25	0.50	
	3	42	0.84	
	4	60	1.20	
	5	45	0.90	
	6	30	0.60	
<b>CCl<sub>4</sub></b>	1	331	6.62	7.05
	2	782	15.64	
	3	350	7.00	
	4	209	4.18	
	5	276	5.52	
	6	166	3.32	
<b>CCl<sub>4</sub>+Leptin</b>	1	71	1.42	2.29
	2	83	1.66	
	3	151	3.02	
	4	122	2.44	
	5	77	1.54	
	6	183	3.66	

Elde edilen bulgulara göre; CCl<sub>4</sub> grubunda apoptotik indeks oldukça belirgin bir düzeyde gözlenmiştir. Buna karşılık; CCl<sub>4</sub>+Leptin grubunun apoptotik indeksinin azaldığı ve kontrol grubunun apoptotik indeks değerine yaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Leptinin toplam apoptotik hücre sayısı üzerine etkisi.

\*\*\* $p < 0,05$ ; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+Leptin grubundan anlamlı düzeyde farklıdır

## 5. TARTIŞMA

Karaciğer hastalıklarının görülme sıklığı her geçen gün daha da artmaktadır ve bu hastalıkların tedavisi için yeni çalışmalar da buna paralel olarak devam etmektedir. Birçok araştırmacı tarafından, hem karaciğer hasarındaki mekanizmaları ortaya koymaya yönelik hem de bu mekanizmaları önlemeye yönelik klinik ve deneysel çalışmalar yapılmaktadır.

Fizyolojik ya da birçok stres ve hasar tarafından başlatılan programlı hücre ölümü süreci olan apoptozisin, birçok sistemde uygun fonksiyon ve homeostazın devamı için önemli olduğu bilinmektedir (3). Apoptozis ile diğer dokularda olduğu gibi karaciğerde de hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Apoptozisin klasik tanımlaması otonomik ve programlı hücre intiharı olarak ifade edilebilir. Apoptozis, hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (46). Apoptozis büyüme faktör ya da hormon eksikliği, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, ekzotoksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir (47).

Deneysel karaciğer hasarı oluşturabilmek için günümüze kadar birçok model üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu modellerden birisi olan CCl<sub>4</sub> deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan bir ksenobiyotiktir ve karaciğerde ilerleyen süreç sonunda fibroz, hepatit, siroz veya tümör gibi çeşitli patolojik tablolara yol açabilmektedir (1, 106-109).

Sert ve arkadaşları CCl<sub>4</sub>'ün karaciğer üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, sıçanlara tek doz halinde i.p. yolla CCl<sub>4</sub> enjekte etmişler ve uygulamadan sonraki 24. saatte yaptıkları değerlendirme sonucunda GGT, LDH, AST ve ALT gibi karaciğerin hücre harabiyetini gösteren hepatosellüler enzimlerin düzeyindeki artışı göstermişlerdir (2).

Erdoğan ve arkadaşlarının anason (*pimpinella anisum*) ekstresinin deneysel akut karaciğer hasarında karaciğer koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında sıçanlara CCl<sub>4</sub> (0,8 ml/kg, i.p. yolla, 1/1 zeytinyağı karışımı ile) enjeksiyonu sonrasında kontrol grubu (0,8 ml/kg, ip yolla zeytinyağı uygulanmış) ile karşılaştırdıklarında serum ALP, AST, ALT ve LDH düzeylerindeki artış ve histopatolojik bulgulardaki değişiklikler ile karaciğer hasarını göstermişlerdir (110).

Bayram ve arkadaşlarının askorbik asit ve alfa- tokoferolün karaciğer hasarına etkilerini araştırdıkları deneysel çalışmada hasar oluşturulan gruba CCl<sub>4</sub> - zeytinyağı karışımı (0,8 ml/kg, i.p. yolla, 1:1 hacimde), kontrol grubuna ise zeytinyağı (0,8 ml/kg, i.p. yolla) verildikten 24 saat sonra serum AST, ALT düzeyleri ve histopatolojik bulguları karşılaştırarak karaciğer hasarını göstermişlerdir (111).

Bizde bu bilgiler ışığında hazırladığımız deneysel modelde, CCl<sub>4</sub> ile deneysel karaciğer hasarı oluşturarak apoptozisi indükledik ve leptinin akut karaciğer hasarına ve apoptozise etkisini araştırdık.

Leptinin vücuttaki başlıca rolü, beyin (özellikle hipotalamus) üzerine negatif “feedback” etki ile gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemektir. Ayrıca, metabolizmanın düzenlenmesi, cinsel gelişim, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiyogenez ve osteogenezis’de de çok önemli rolleri olduğu saptanmıştır (6, 7, 8). İnce bağırsak (12), mide (13), böbrek (14), nöron (15) gibi birçok dokuda leptinin doku hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda doku hasarına karşı leptinin koruyucu etkinliği rapor edilmiştir.

Fausto ve arkadaşları leptin sentezinin enfeksiyon, endotoksin, TNF- $\alpha$ , ve IL-1 gibi sitokinler tarafından stimüle edildiğini, beslenme davranışı ve enerji balansını regüle etmesine ilaveten, leptin’in sitokin düzeylerinin artışı sonucunda yükselerek aynı zamanda inflamatuvar durumlarda anoreksi ve kilo kaybına katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir (112). Frank ve arkadaşları sistemik veya topikal leptin kullanılmasının, leptin yetmezliği olan ob/ob sıçanlarda yara iyileşmesini arttırdığını bildirmişlerdir (113). Benzer başka bir çalışmada da leptinin, yara iyileşmesini, diyabetik ob/ob farelerde leptin reseptörleriyle etkileşimi sonucu sağladığını ancak leptin reseptör defekti olan db/db sıçanlarda yara iyileşmesine etkili olmadığını belirtmiştir (114).

Yapılan bir çalışmada alkolle indüklenen toksik karaciğer hasarında, leptin reseptöründen yoksun sıçanlar leptin reseptörü bulunan sıçanlarla mukayese edilmiş, leptin reseptörü defekti olan sıçanların kuppfer hücre disfonksiyonu nedeniyle karaciğer hasarına karşı savunmasız kaldıkları gösterilmiştir (115).

Amir ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, hem in-vivo hemde in-vitro

ortamda leptinin fibrojenik miyofibroblast hücrelerini (*Hepatic stellate cells*) apoptozisten koruduğunu göstermişlerdir (116).

Çakır ve arkadaşlarının sıçanlarda termal hasar yaparak leptinin çoklu organ yetmezliği ve sepsise etkilerini araştırdıkları deneysel çalışmalarında, termal hasardan sonra leptin (10 µg/kg, i.p. yolla) enjeksiyonu yapılmış ve 24 saat sonra elde edilen serumda lökosit ve nötrofil apoptozisi, karaciğer, mide, kolon ve böbrek dokuları üzerinde ise histopatolojik etkilerini incelemişlerdir. Yanık hasarı sonucunda sıçanlarda karaciğer hasar skorunun arttığını, leptin tedavisi yapılan sıçanlarda ise artan hasar skorlarının anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca leptin tedavisinin mononükleer hücre ve granülosit sayılarının oranını da anlamlı düzeyde düşürdüğünü göstermişlerdir (117).

Yapılan klinik bir çalışmada da alkolik olmayan karaciğer hastalığı olan hastaların serum leptin seviyelerindeki yüksekliğin, bu hastaları progresif karaciğer hastalığından koruduğu gösterilmiştir (118).

Yaptığımız literatür taramasında antiapoptotik etkileri birçok kez gösterilen leptinin, karaciğerdeki toksik hasar sonucu gelişen apoptozise etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. Bu bilgiler ışığında, biz de çalışmamızda i.p. olarak tek doz CCl<sub>4</sub> enjeksiyonu ile akut karaciğer toksik hasarı oluşturduğumuz ve apoptozisi indüklediğimiz sıçanlarda yine i.p. olarak tek doz leptin (10 µg/kg) uygulamasının karaciğer hasarına ve apoptozise etkilerini ilk kez araştırdık. Karaciğerde oluşan hasarı belirlemek amacıyla, serumda AST, ALT, ALP ve TNF-α düzeylerini, doku örneklerinde ise TNF-α, MDA düzeylerini, histopatolojik bulguları ve TUNEL boyama bulgularını inceledik.

Karaciğer hasarı oluşturulan diğer modellerde izlendiği gibi, serum transaminazlarının hepatosit hasarını göstermede duyarlılığı çok yüksektir. Transaminazlar normal hücre döngüsünü yansıtacak şekilde dolaşımında az miktarda bulunurken, transaminazlardan zengin dokuların etiyolojik faktörden bağımsız olarak zedelenmesinin sürdüğü tüm durumlarda serum seviyeleri yükselmiştir (2, 106-11).

Soya bitkisinin, sıçanlarda CCl<sub>4</sub> ile deneysel olarak oluşturulmuş kronik karaciğer hasarı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hasar uygulanmasından sonraki 24. saatte elde edilen serum, ALT, AST, ALP ve dokuda da MDA düzeylerindeki artışla karaciğer hasarı değerlendirilmiştir (119). Benzer



şekilde Chen ve arkadaşları da yaptıkları deneysel karaciğer hasarının etkilerini serum AST, ALT, TNF- $\alpha$  ve doku MDA düzeylerindeki artışla değerlendirmişlerdir (120).

Bizim çalışmamızda da karaciğerde inflamatuvar süreci ve hücre yıkımını gösteren en güvenilir parametrelerden olan, serum ALT, AST ve ALP düzeylerinin her biri serumda karaciğer toksik hasarı ile birlikte kontrol grubuna göre anlamlı olacak düzeyde artmıştır ve leptin tedavisi ile birlikte gerileyerek CCl<sub>4</sub> grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Bu durum leptinin karaciğer hasarını azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

Toksinlerden kaynaklanan hepatosellüler hasarın anlaşılmasının merkezinde inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler ve reaktif oksijen ürünleri yer alır. Günümüze dek karaciğer hasarının, hepatositlerdeki biyolojik ajan veya toksinlerin direkt biyokimyasal etkilerinden kaynaklandığı düşünülmekteydi, artık karaciğer hasarının çok büyük kısmının inflamatuvar hücrelerin ürünleriyle tetiklendiği bilinmektedir. Hücresel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve Tümör Nekrozis Faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir (47). Proapoptotik sitokinler arasında, toksikasyon ile indüklenen karaciğer hasarının ve apoptozisin baskın medyatörü TNF- $\alpha$ 'dır (121). Birçok çalışmada artan TNF- $\alpha$  stimülasyonunun hücre ölümünden sorumlu olduğu gösterilmiştir (122). TNF- $\alpha$ 'nın proapoptotik etkileri ve dolayısıyla hücre ölümünü arttıran etkileri nedeniyle geçmişte sistemik antikanser kemoterapi tedavisi denenmiş ancak teropatik doza ulaşılmadan ortaya çıkan ciddi yan etkilerinden dolayı bu tedavi yönteminden vazgeçilmiştir. En önemli yan etkilerinden birinin karaciğer hücre hasarına bağlı serum transaminazları ve bilirubin düzeylerindeki artış olduğu görülmüştür (123).

Osawa ve arkadaşları X- ray ile indüklenen ve *immediate early response factor-1* (IEX-1) olarak isimlendirilen proapoptotik bir geni tariflemişlerdir. Hepatik hasarla birlikte TNF- $\alpha$  düzeyindeki artışın bu geni indüklediğini ve böylece apoptotik yolların aktive olarak hepatik hücrelerde apoptozisin arttığını göstermişlerdir (124).

Birçok çalışmada, TNF- $\alpha$  düzeylerindeki artış viral hepatitler, alkolik

karaciğer hastalığı ve fulminan hepatik yetmezlikle ilişkilendirilmiştir (125). Sheron ve ark, yaptıkları bir çalışmada bu hastalıklardan ölen kişilerin TNF- $\alpha$  düzeylerinin, iyileşen hastaların TNF- $\alpha$  düzeylerinden daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (126).

TNF- $\alpha$ 'nın kronik hepatit B ve C infeksiyonlarında da rol sahibi olduğu düşünülmektedir. Her iki virüs te karaciğerde TNF- $\alpha$  salınımını arttırmaktadır (127). Artan TNF- $\alpha$  düzeyleri alkolik ve nonalkolik steatohepatitle de ilişkilendirilmektedir, toksik hasar TNF- $\alpha$ 'nın hepatik sentezini arttırarak etkili olurken; TNF- $\alpha$ 'da diğer sitokinlerin hepatik sentezini artırarak etki eder (128). Yapılan bir çalışmaya göre alkolik hepatitli hastalarda serum TNF- $\alpha$  düzeyleri artmaktadır ve bu artış hastanın sağkalımı ile ters orantılı olarak seyretmektedir (127).

Feldstein ve ark, alkolik olmayan steohepatitli hastalarla yaptığı klinik çalışmalarında TNF- $\alpha$  reseptörlerinin ekspresyonun arttığını ve buna bağlı olarak oksidatif stres ve artmış apoptozis reseptör aktivasyonun bu hastalıktaki hepatosellüler hasara neden olduğunu göstermişlerdir (129).

Schattenberg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TNF- $\alpha$ 'nın karaciğerin CCl<sub>4</sub> ya da galaktozamin gibi hepatotoksinlere yanıtının bir parçası olarak üretildiğini ve bu hasar tipinin TNF- $\alpha$ 'ya karşı nötralizan antikorların verilmesiyle önlenebileceğini göstermiştir (123). Streetz ve arkadaşları yaptıkları in-vitro bir çalışma ile TNF- $\alpha$  reseptörlerinin TNF- $\alpha$  sinyal yolları ile etkileşiminin inhibe edilmesiyle apoptozisin engellenebileceğini ve böylece karaciğer hasarının azaltılabileceğini göstermişlerdir (130).

Robert ve ark, in-vitro çalışmalarında yaptıkları karaciğer hücre hasarıyla apoptozisi indüklemişler ve buna paralel olarak TNF- $\alpha$  düzeylerindeki artışı göstermişlerdir. Ardından farmakolojik Lityum Klorür (LiCl) tedavisi ile karaciğer hücrelerindeki apoptozisin azaldığını ve TNF- $\alpha$  düzeylerindeki buna paralel olarak gerilediğini immünhistokimyasal yöntemlerle göstermişlerdir (131).

Veal ve ark, lipopolisakkaritlerle TNF- $\alpha$  stimülasyonunu arttırarak oluşturdukları in-vitro karaciğer hasarında, karaciğeri koruyucu birçok özelliği olduğu bilinen *S-adenosylmethionine* (SAM)'in hepatik makrofajlardan TNF- $\alpha$  salınımını azaltarak bu etkiyi sağladığını göstermişlerdir (132).

Karaciğer hasarı oluşturulan diğer modellerde olduğu gibi bizim çalışmamızda da serum ve dokuda inflamatuvar sürecin ve apoptozisin parametresi olan TNF- $\alpha$

düzeinin kontrol grubuna göre artmış olması oluşturulan toksik karaciğer hasarından dokunun etkilendiğini göstermektedir. Artan TNF- $\alpha$  düzeyleri leptin tedavisi ile birlikte, leptin verilmeyen CCl<sub>4</sub> grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Bu durum leptinin apoptozisi ve dolayısıyla karaciğer hasarını azalttığı şeklinde açıklanabilir.

Karbon tetraklorür toksikasyonu sonucu oluşan serbest radikallerin en önemli hedef yapılarından biri de lipidlerdir (1,2). Lipid peroksidasyonun karaciğer toksik hasarında anahtar faktörlerden biri olduğu araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir (133). Serbest oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu alarak lipid peroksidasyonunu başlatır ve sonuçta hidroperoksitler oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda hücre membranı akışkanlığını yitirir ve membran bütünlüğü bozulur. Bu durum hücre fraksiyonlarının çevreye salıverilmesine ve hücre ölümüne yol açar. Diğer taraftan çevreye salıverilen bu subsellüler yapılar inflamatuvar olayları tetikler ve hasarı daha da kötüleştirir (134). Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak farklı metodlar kullanılmaktadır. Bu metodların en çok kullanılanlardan biri de dien konjugatları olan malondialdehit tayinidir (135-138). Bizim çalışmamızda da oksidan hasarın parametresi ve lipid peroksidazın bir ürünü olan MDA konsantrasyonu karaciğer dokusunda CCl<sub>4</sub> ile toksik hasar oluşturulan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiş ve bu da dokuda toksik hasarın oluştuğunu açık olarak göstermiştir.

Karaciğerdeki toksik hasarla birlikte serbest oksijen radikalleri dokuda birikmeye başladığında, hücreler çeşitli antioksidan enzimleri kullanarak bir savunma mekanizması oluşturur. Yapılan çalışmalarda leptinin, anti-oksidan enzimler olan katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın ekspresyonunu ya da aktivitelerini arttırarak, direkt olmasa da dolaylı yoldan anti-oksidan etkinliği gösterilmiştir. (9, 12, 139, 140). Özer ve arkadaşları, hareketsizlik ve soğuk stresi ile akut gastrik mukozal hasar oluşturulan sıçanlarda NO düzeylerinin azaldığını, leptin uygulamasının ise NO düzeylerindeki artışla uyumlu olarak oksidan olayları azalttığını, antioksidan enzimleri ise arttırdığını göstermiştir (141). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, leptin tedavisi verilen grupta doku MDA düzeylerinin leptin almayan CCl<sub>4</sub> grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum leptinin oksidatif stresi ve

dolayısıyla lipid peroksidasyonu azalttığı şeklinde açıklanabilir.

Çalışmamızda i.p. yolla CCl<sub>4</sub> uygulanmış sıçanların karaciğer makroskopik görünümünde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında toksik hasarla ilişkili olarak nodüler bir görünüm gelişmiştir ve bu görünümün leptinle tedavi edilen gruptaki sıçanların karaciğerlerinde gerilemiştir. Bu bulgular CCl<sub>4</sub>'ün karaciğerde toksik bir hasar oluşturduğunu ve leptin uygulamasının da toksik zararları gerilettiğini göstermektedir.

Gruplar H&E boyama sonrası mikroskopik olarak incelendiğinde CCl<sub>4</sub> grubundaki incelemede konjesyonun sentral vende orta düzeyde, portal alan ve sinuzoidlerde şiddetli olduğunu ve kontrol grubuna göre arttığını gözledik. Yine kontrol grubundaki hepatositlerde rastlamadığımız balonlaşma dejenerasyonunu, PMNL ve MNL infiltrasyonunun toksik hasar yapılan grupta arttığını izledik. Ayrıca kontrol grubunda göremediğimiz hücre nükleuslarındaki karyoliz ve piknozu, intersellüler sınır kaybını ve hepatik kordlarda bozulmayı toksik hasar yaptığımız grupta izledik.

Tagami ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, alkolik steatohepatit hastalarında apoptozis reseptör ekspresyonunun ve dolaşan apoptozis ligand miktarının arttığını göstermiş ayrıca karaciğer hastalığının ciddiyetinin bu hastalardan yapılan karaciğer biopsilerinde apoptotik hücre miktarı ile korele edilebileceğini belirtmiştir (142). Bizde yaptığımız TUNEL boyaması sonrası apoptozisi değerlendirdiğimizde toksik hasar yapılan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış apoptotik hücre gözledik. Toksik hasar yapılan grupta artan TNF- $\alpha$  düzeyine paralel olarak apoptotik indeksinde kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğunu hesapladık. Tüm bu bulgular bizim tek doz i.p. yolla uyguladığımız CCl<sub>4</sub>'ün karaciğerde toksik bir hasar başlattığını ve apoptozisi arttırdığını göstermektedir.

Toksik hasar yapılan gruba leptin verilmesiyle birlikte sentral ven ve portal alandaki konjesyon açısından CCl<sub>4</sub> grubu ve CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grup arasında bir fark gözlenmezken, CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta sinüzoidal konjesyonda CCl<sub>4</sub> grubundakine göre bir azalma gözlenmiştir. MNL infiltrasyonu açısından sentral ven ve sinuzoidlerde bir farklılık gözlenmezken, portal alandaki MNL infiltrasyonunda CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiştir. Balonlaşma

dejenerasyonunda ise CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiş olup, sadece sentrilobüler zonda (Zon-3) balonlaşma dejenerasyonuna rastlanmıştır. PMNL infiltrasyonunda CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiştir. Karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma açısından CCl<sub>4</sub>-Leptin verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre bir azalma gözlenmiştir.

Yaptığımız TUNEL boyama sonucunda elde ettiğimiz bulgularda aynı doğrultuda olup toksik hasar yapılan CCl<sub>4</sub> grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olan apoptotik indeks, leptin tedavisi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı oranda gerileyerek kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bu gözlemler ışığında, leptinin varlığında karaciğerde toksik hasar sonucu oluşan tüm histopatolojik skorların ve apoptotik indeksin azalmaya başladığı gösterilmiştir.

Balasubramaniyan ve arkadaşlarının insan karaciğer biyopsisinden elde ettikleri hücre serileri üzerinde etanol ile deneysel karaciğer hücre hasarı yaptıkları bir çalışmada leptinin oksidatif stresi, TNF- $\alpha$  salınımını ve apoptozisi azaltarak hücrenin yaşayabilme yeteneğini arttırdığını göstermişlerdir (143). Takahashi ve ark. yaptıkları çalışmada endojen leptinin TNF- $\alpha$  salınımını azalttığını göstermişlerdir (144).

Bizim çalışmamızın sonuçlarından da anlaşılacağı üzere apoptotik sürecin CCl<sub>4</sub> ile aşırı aktivasyonu, hem serum ve karaciğer dokusundaki ALT, AST, ALP, TNF- $\alpha$  ve MDA düzeylerinin artışına hem de karaciğer dokusundaki apoptotik indeksin artışına paralel olarak belirgin hepatosellüler hasara neden olmuştur. Yapılan çalışmalarda, apoptotik sinyal yollarının aşırı aktivasyonu ve oksidan hasarın artması nedeni akut karaciğer hasarının tedavisi apoptozis sinyal yollarının inhibisyonuna ve antioksidan etkinliğe dayandırılmıştır. Bizim de bu nedenle, antiapoptotik ve antioksidan etkilerini bildiğimiz leptini tedavi amacıyla kullandığımız çalışmamızda; Leptin, serum ve karaciğer dokusundaki TNF- $\alpha$  düzeylerinin artışını ve karaciğer dokusundaki apoptotik indeksin artışını gerileyerek antiapoptotik etkinliğini ayrıca karaciğer dokusundaki MDA düzeylerinin artışını gerileyerek te antioksidan etkinliğini göstermiştir. Bu modelde oluşturduğumuz toksik karaciğer hasarında ilk kez leptinin anti-apoptotik ve antioksidan etkinliği gösterilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

**a.** Çalışmamızda serum AST düzeylerine bakıldığında; CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubu, CCL<sub>4</sub> grubundan anlamlı düzeyde farklıdır (p< 0,05). CCL<sub>4</sub> grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu (p<0,001).

**b.** Serum ALT düzeylerine bakıldığında; Kontrol ve CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubu arasında anlamlı düzeyde fark vardır (p<0,05). CCL<sub>4</sub>, grubu kontrol ve CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu (p<0,001).

**c.** Serum ALP düzeylerine bakıldığında; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu (p<0,001).

**d.** Çalışmamızda serum TNF- $\alpha$  düzeylerine bakıldığında; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub>+ Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu (p<0,01).

**e.** Doku TNF- $\alpha$  düzeylerine bakıldığında; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ( p< 0,05).

**f.** Çalışmamızda doku MDA düzeylerine bakıldığında; CCL<sub>4</sub> grubu kontrol ve CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ( p< 0,05).

**g.** H&E boyamada toksik karaciğer hasarının patolojik bulguları olan ve CCl<sub>4</sub> grubunda izlenen sentral ven, portal alan ve sinuzoidlerde konjesyon, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu, PMNL ve MNL infiltrasyonu, hücre nükleuslarındaki karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma leptin tedavisi ile birlikte CCl<sub>4</sub>+ Leptin grubunda gerilemiştir.

**h.** Çalışmamızda TUNEL boyama sonucu elde ettiğimiz doku apoptotik hücre sayılarına bakıldığında; CCL<sub>4</sub> grubu, kontrol ve CCL<sub>4</sub> + Leptin tedavi grubundanda anlamlı düzeyde farklı bulundu (p<0,05).

**i.** Çalışmamızda TUNEL boyama sonucu elde ettiğimiz doku apoptotik hücre indeksine bakıldığında; Kontrol grubunun ortalaması 0.78, CCl<sub>4</sub> grubunun ortalaması 7.05, CCl<sub>4</sub> + Leptin grubunun ortalaması 2.29 olarak hesaplandı.

Apoptozis sinyal yollarının inhibisyonu veya aktivasyonu için hücre tipine spesifik stratejilerle karaciğer hastalıklarının tedavisinde ileri aşamalar kaydedilebilir.

Apoptozis yollarının modülasyonunu hedefleyen yeni ilaçlar, çevreleyen sağlıklı dokuları yan etkilerden korumak için bir hücre popülasyonuna

yönlendirilebilir.

Kanser ve infeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilaç karaciğerdeki toksik etkileri nedeniyle kısıtlı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Karaciğerde hasar oluşturabilecek bu ilaçlar verilmeden önce veya ilaçlarla beraber leptin kullanılabilir. Bu ilaçlarla beraber leptin uygulanması, hepatosit hasarını engelleyerek ilaçların terapötik seviyelerini de arttıracak umut verici bir gelişme olabilir. Ancak leptinin aynı zamanda kanser hücrelerine karşı da olası antiapoptotik ve antioksidan etkisi nedeniyle sağlıklı hücreleri hedef alan, hücre tipine spesifik etkisini arttıracak geniş çalışmalara gereksinim vardır.

Yapılacak daha geniş çalışmalarla leptin, proflaktik amaçlı veya tedavi amacıyla karaciğer hastalıklarında kullanılacak umut verici bir ajan olabilir.

## KAYNAKLAR

1. Boll M, Weber LWD, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch.* 2001; 56:649- 659.
2. Sert N, Altınsaat Ç. Gebe ve Gebe Olmayan Sıçanlarda Karbontetraklorürün (CCl<sub>4</sub>) Bazı Biyokimyasal Değerler Üzerine Etkileri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 2008; 14: 237-242.
3. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999; 13:155–68.
4. Alison M, Sarraf E . Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 1994; 35; 577-581.
5. Torre F, Bellis L, Delfino A. Peripheral blood serum markers for apoptosis and liver fibrosis: Are they trustworthy indicators of liver realness. *Digestive and Liver Disease.* 2008; 441–445.
6. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425–32.
7. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995; 269:540–3.
8. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic and angiogenic perspectives. *Microcirculation.* 1997; 4:211–32.
9. Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27: 695–700.
10. Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy



and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice. *J Clin Invest.* 1999;104:1051–1059.

11. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68: 437–446.
12. Hacıoglu A, Algin C, Pasaoglu O, Pasaoglu E, Kanbak G. Protective effect of leptin against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *BMC Gastroenterol.* 2005; 5: 37.
13. Erkasap N, Uzuner K, Serteser M, Köken T, Yenilmez A. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides.* 2003; 24:1181–7.
14. Erkasap S, Erkasap N, Koken T, Kahraman A, Uzuner K, Yazihan N and Ates E. Effect of leptin on renal ischemia-reperfusion damage in rats. *J Physiol Biochem.* 2004; 60 :79–84.
15. RUSSO V, METAXAS S. K. Antiapoptotic Effects of Leptin in Human Neuroblastoma Cells. *Endocrinology.* 2004; 145:4103–4112
16. John L. Cameron: Liver, anatomy. *Current surgery.* 2001;309
17. Ratych ER, SmithWG: Anatomy and physiology of the liver. (Ed) George D. Zuidema GE : *Surgery of the Alimentary Tract, Fourth Edition, Philadelphia, W.B Saunders Company.* 1996; 357-374.
18. Timothy DS, Steven AC, Liver . In: *Schwartz's Principles of Surgery* (Brunnicardi CF, Andersen DK editors), 8th.Edition McGraw-Hill, New York. 2005: 1139-1142
19. Zollinger RM: *Zollinger's Atlas of Surgical Operations, Eighth Edition, McGraw Hill,* 2003:218-219.
20. Arıncı K, Elhan A: *Anatomi 1. Cilt, Güneş Kitabevi,* 1995: 335-345.
21. Kimitaka K, Masatoshi I, Masaaki N, Hiroyuki K and Masatoshi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1999; 6:171-175

22. Ökten A. Karaciğer Fonksiyonel Anatomisi. Gastroenterohepatoloji (Editör Ökten A.). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2001: 311-327
23. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji (Editör Çavuşoğlu H.). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 1996; 883-888
24. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji (Editör Çevikbaş U). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 1995: 523-567
25. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI et al. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002; 65: 166-76.
26. Broulac-Sage P, Balabaud C. Toxic and drug induced disorders of the liver. In Odze R, Goldblum J, Crawford J eds. *Surgical Pathology of the GI tract, Liver, Biliary tract and Pancreas.* Philadelphia Saunders; 2004; 833–61.
27. Lee R. *Diagnostic liver pathology.* First ed. St Louis: Mosby. 1994; 342–78.
28. Goodman Z, Ihsak K. Medical diseases of the liver. In Silverberg's *Principles and practice of Surgical Pathology and Cytopathology.* 4th ed. Elsevier: Churchill Livingstone. 2006; 1475–1500.
29. Ioannis S. Elefsiniotis, George D. et al. Mixed Cholestatic/Hepatocellular Liver Injury Induced by the Herbicide Quizalofop-p-ethyl. *Environ Health Perspect.* 2007; 115:1479-81.
30. Batman F, Arslan S. Karaciğer fizyolojisi ve fonksiyon testleri. *Sayek Temel Cerrahi 2.* Baskı, Ankara Güneş Yayınevi. 1996:1205-17.
31. Halliwell B, Gutteridge J: Oxygen toxicity oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984. 219:1-14.
32. Boll M, Weber LWD, Becker E, Stampfl A: Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch.* 2001; 56:649- 659.
33. Peters RL, Edmondson HA, Mikkelsen WP: Tetracycline-induced fatty liver in non-pregnant patients. *Am J Surg.* 1967; 113:622-632.
34. Bruckner JV, Mackenzie WF, Muralidhara S: Oral toxicity of carbon

- tetrachloride: acut, subacut, and subchronic studies in rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1986; 6:16-34.
35. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 1999; 342-346.
  36. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993; 14:126–130.
  37. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 266:699-717.
  38. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999; 96:245–254.
  39. Cooper GM. Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM ed. Washington: ASM Pres;1994; 14:592–596.
  40. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88: 355–65.
  41. Perkins AS, Stern DF. Apoptosis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principle and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997:96–100.
  42. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology.* 1992; 119: 493–501.
  43. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology.* 1986; 10: 995–998.
  44. Kam PC, Ferch N. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia,* 2000;15: 1081-1093
  45. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual.* 1982;17: 229–259.
  46. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267:1456–1462.
  47. Lewin B. Apoptosis. In: Lewin B (ed). *Genes VI*, New York: Oxford Universty Press. 1997; 36:1122–1129.
  48. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995; 267:1449–1456.

49. Renehan G, Booth C. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*. 2001; 322:1536-1538.
50. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994; 263:1759-62.
51. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of the tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995; 83:793-802.
52. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304:433-5.
53. Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3:1051-7.
54. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*. 2000; 150:731-740.
55. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 869-874.
56. Ulukaya E. 11/04/2003. Apoptozis Ders Notlari. [http://www.uludag.edu.tr/~biokimya/Apoptozis\\_ders\\_notu.pdf](http://www.uludag.edu.tr/~biokimya/Apoptozis_ders_notu.pdf). 08/05/2008
57. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:14486-14491.
58. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*.

1998; 187:587–600.

59. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22: 299–306.
60. Ferraz J, Tgley A. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol.* 1997; 272:809-14.
61. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005; 258:479-517.
62. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5:97–104.
63. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8: 68–75.
64. Özgen Ü. Laboratory Studies In Apoptosis. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci.* 2005; 1:106-114.
65. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425-32.
66. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995; 269: 540-543.
67. Sinha MK. Human leptin: the hormone of adipose tissue. *Eur J Endocrinol.* 1997; 136:461–464.
68. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94:11073- 11078.
69. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J. Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1277–1282.
70. Brabant G, Horn R, Mayr M, Wurster U, Schnabel D, Heidenreich F. Free and

protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia*. 2000; 43: 438-42.

71. Vila R, Adan C, Rafecas I, et al. Plasma leptin turnover rates in lean and obese Zucker rats. *Endocrinology*. 1998; 139: 4466–4469.
72. Harris RBS, Zhou J, Weigle DS, et al. Recombinant leptin exchanges between parabiosed mice but does not reach equilibrium. *Am J Physiol*. 1997; 272: 1800–1808.
73. Van Aggel-Leijssen DPC, van Baak MA, Tenenbaum R, et al. Regulation of average 24h human plasma leptin level; the influence of exercise and physiological changes in energy balance. *Int J Obesity*. 1999; 23: 151–158.
74. Zeng J, Patterson BW, Klein S, et al. Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am J Physiol*. 1997; 273: 1102–1106.
75. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272: 6093 - 6.
76. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes*. 1997; 46:2035–2039.
77. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995; 1:1311–1314.
78. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 1995; 377:527–529.
79. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:9034–7.
80. Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:4140–7.

81. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*. 1996; 45:984–987.
82. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol*. 1997; 47:101–106.
83. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999; 130:671–80.
84. Spitzweg C, Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol*. 1997;136:590–1.
85. Daniel P, Denis G, Baskin D, Michael WS. Leptin and Insulin Action in the Central Nervous System. *Nutr Rev*. 2002; 60:20–9.
86. Qian H, Azain MJ, Compton MM, Hartzell DL, Hausman GJ, Baile CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology*. 1998; 139:791–4.
87. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and Chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes*. 1996;45:699–701.
88. Segal RK, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plazma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes*. 1996;45: 988–91.
89. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. The ob gene and insulin, a relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 1995;44: 1467–70.
90. Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, Thomas GR. A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol*. 1996;6:1170–80.
91. Graham M. Lord, Giuseppe Matarese, Jane K. Howard, Richard J. Baker, Stephen R. Bloom and Robert I. Lechler. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394:897–901.
92. Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-

- deficient obese mice. *Am J Physiol.* 1999; 276:386–94.
93. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68:437–46.
  94. Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol.* 2002; 23:182–187.
  95. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic and angiogenic perspectives. *Microcirculation.* 1997; 4:211–32.
  96. M. Rocío Sierra-Honigmann, Anjali K. Nath, Chiaki Murakami, Guillermo García-Cardena, Andreas Papadopoulos, William C. Sessa, Lisa A. Madge, Jeffrey S. Schechner, Michael B. Schwabb, Peter J. Polverini, and Jaime R. Flores-Riveros. Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. *Science.* 1998; 281:1683–1686.
  97. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.* 1998; 83:1059–66.
  98. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol & Behavior.* 2004; 81:223–241.
  99. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet.* 1998; 351:737–42.
  100. Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res.* 2000; 10:81–92.
  101. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia.* 1978; 14:141–8.
  102. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med.* 1995; 1:1155–61.
  103. McConway MG, Johnson D, Kelly A, Griffin D, Smith J, Wallace AM. Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann Clin Biochem.* 2000; 37:717–23.



- 104.** Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996; 17:305–311.
- 105.** Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395:763–70.
- 106.** K m roglu U, Noyan T, Őekeroglu R: Karbon Tetraklor r İle Karaciğer Toksikitesi Oluşturulan Farelerde Melatonin ve Pentoksifilinin Serum Lipidleri  zerine Etkilerinin Karşılaştırılması. *Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci*. 2007; 19:21-26.
- 107.** Wu Y, Wang F, Zheng Q: Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *Journal of Biomedical Science*. 2006; 13:569–578.
- 108.** Lee K, Choi J, Jeong H: Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45 : 2118–2125.
- 109.** Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J. Pineal Res*. 2000; 28:119–126.
- 110.** Erdoğan E , Kaya A, Raębetli M. Anason Ekstresinin Deneysel Akut Karaciğer Hasarında Karaciğer Koruyucu Etkisi Var mı. *Van Tıp Dergisi*. 2004; 11:69-74.
- 111.** Bayram İ,  zbek H, UęraŐ S, Tuncer İ. Askorbik Asit ve Alfa-Tokoferol' n Karbon Tetraklor rle Oluşturulmuş Akut Karaciğer Toksikitesi Modelinde Karaciğeri Koruyucu Etkisi *Van Tıp Dergisi*. 2004; 11:32-38.
- 112.** Nelson Fausto. Liver regeneration. *Journal of Hepatology*. 2000; 32: 19-31.
- 113.** Frank S, Stallmeyer B, K mpfer H, Kolb N. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J. Clin. Invest*. 2000; 106: 501-509.
- 114.** Brian D. Ring, Sheila Scully, Corrine R. Davis, Mary Beth Baker, Mary Jane

- Cullen, Mary Ann Pelleymounter, and Dimitry M. Danilenko. Systemically and Topically Administered Leptin Both Accelerate Wound Healing in Diabetic ob/ob Mice. *Endocrinology*. 2000; 141: 446-449.
- 115.** Azuma T, Kitamura N, Tamiya G. Leptin deficiency enhances sensitivity of rats to alcoholic steatohepatitis through suppression of metallothionein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287: 1078–1085.
- 116.** Amir Q, Shehzad S, Masud A, Irteza I. In Vitro and In Vivo Protection of Stellate Cells from Apoptosis by Leptin. *Digestive Diseases and Sciences*. 2006; 10 :1697-1705.
- 117.** Çakır B, Çevik H, Contuk G, Ercan F, Ekşioğlu E. Leptin ameliorates burn-induced multiple organ damage and modulates postburn immune response in rats. *Regulatory Peptides*. 2005; 125: 135– 144.
- 118.** Canbakan B, Tahan V, Balci H, Hatemi I. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology* 2008; 7: 249-254.
- 119.** Wu Y, Wang F, Zheng Q: Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *Journal of Biomedical Science*. 2006; 13:569–578.
- 120.** Chen L, Pan DD, Zhou J, Jiang YZ. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 5795-5800.
- 121.** Robert F, David A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$  Induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: 583–589.
- 122.** Nathan W, Guicciardi M, Steven F and Gregory J. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283: 947–956.
- 123.** Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver International* 2006; 26: 904-911.

124. Expression of the NF- $\kappa$ B Target Gene X-Ray-Inducible Immediate Early Response Factor-1 Short Enhances TNF- $\alpha$  Induced Hepatocyte Apoptosis by Inhibiting Akt Activation. Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner A, Nozawa Y, Moriwaki H. *J. Immunol.* 2003; 170: 4053-4060.
125. Muto Y, Nouri-Aria T, Meager A, et al. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet.* 1998; 8602: 72-74.
126. Sheron N, Goka J and Williams R. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1990; 112: 917-920.
127. Cynthia A, Michael P, David A. Brenner, and Christian Trautwein. Mechanisms of Hepatic Toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: 387-392.
128. Diehl A et al. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Seminars in Liver Diseases.* 1999; 19:221-229.
129. Feldstein A, Canbay A, Angulo P. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2003; 125: 437-43.
130. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology.* 2000; 119:446-60.
131. Robert F, David A. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283: 204-211.
132. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF- $\alpha$  promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. N. Veal, L. Hsieh, S. Xiong, J. Mato, S. Lu and H. Tsukamoto. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287:352-362.
133. Jaeschke H., Smith C. W., Clemens M.G., Ganey P. A., Roth R. A.: Mechanism of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 139: 213-226.

134. Tappel A. L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 1973; 32: 1870-1874.
135. Tandon S, Singh S, Prasad S, Khandekar K, Dwivedi V. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicology Letters.* 2003; 145: 211–217.
136. Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, Urkia G. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterology.* 2008; 8:40.
137. Oxidative Stress of Liver in Hamsters Infected with *Leishmania Chagasi* Oliveira A, Cecchini R. *Journal of Parasitology.* 2000; 86:1067-1072.
138. Murray R.K, Dropper H.H.: Comparative studies on different methods of monoaldehyde determination. *Meth. Enzymol.* 1984; 105:299-305.
139. Gülen S, Dinçer S. Effects of leptin on oxidative stress in healthy and Streptozotocin - induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2007; 302:59–65.
140. Motawi T, Elgawad H, Shahin N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. *J Biomed Sci.* 2008; 15: 405–412.
141. Özer Ç, Ercan S, Babül A. Effects of systemic leptin administration on liver and plasma lipid peroxidation in cold restraint stress. *Turk J Biochem J.* 2009; 34:32–38.
142. Tagami A, Ohnishi H, Moriwaki H, et al. Fas-mediated apoptosis in acute alcoholic hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 443–8.
143. Sheron N, Goka J and Williams R. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1990; 112: 917–920.
144. Takahashi N, Waelput W, Guisez Y. Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity exerted by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1999; 189:207-212.