



**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
THE- YL – 2015- 0001**

## **Kateşin ve Gallik Asitin Sıçan Karaciğer Yağlanmasına Etkisi**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tuğba ÇELİK SAMANCI**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**

**AYDIN- 2015**

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
THE- YL – 2015- 0001**

## **Kateşin ve Gallik Asitin Sıçan Karaciğer Yağlanmasına Etkisi**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tuğba ÇELİK SAMANCI**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**

**AYDIN- 2015**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Tuğba ÇELİK SAMANCI tarafından hazırlanan “Kateşin ve Gallik Asitin Sıçan Karaciğer Yağlanmasına Etkisi ” başlıklı tez, 02.09.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Unvanı, Adı ve Soyadı :**

**Üniversitesi :**

**İmzası:**

Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN

Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Enver OZAN

Fırat Üniversitesi

Prof. Dr. Kemal ERGİN

Adnan Menderes Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Karaciğer yağlanması günümüz koşullarının beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak yaygın bir şekilde artış göstermektedir. Yağlanmanın karaciğerde oluşturduğu hasar siroza kadar ilerleyebilmektedir. Hastalığın tedavisi ve önlenmesi üzerine çalışmalar hayvanlarda da yağlanma modelleri oluşturulmasıyla artmıştır. Çalışmamızda, insanlarda da yağlanma etkeni kabul edilen yüksek yağ içerikli diyetle sıçanlarda yağlanma oluşturularak farklı dozlardaki kateşin ve gallik asitin karaciğer yağlanmasındaki etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi ÖYP Koordinatörlüğü tarafından ÖYP 12023 numaralı ve ‘‘Kateşin ve Gallik Asitin Sıçan Karaciğer Yağlanmasına Etkisi’’ isimli proje kapsamında desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
KABUL VE ONAY .....	i
ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Karaciğerin Genel Yapısı.....	1
1.1.1. Karaciğer Lobülü.....	2
1.1.1.1. Klasik Karaciğer Lobülü.....	2
1.1.1.2. Portal Lobül.....	2
1.1.1.3. Portal Asinüs ( Karaciğer asinüsü, Hepatik Asinüs).....	2
1.1.1.3.1. Periferik Zon (Zon 1).....	3
1.1.1.3.2. Ara Zon (Zon 2).....	4
1.1.1.3.3. Sentral Zon ( Zon 3).....	4
1.1.2. Karaciğer Epitel Hücresinin (Hepatosit ) Özellikleri.....	4
1.1.3. Sinüzoidler.....	5
1.1.4. Endotel Hücresi.....	6
1.1.5. Kupffer Hücresi.....	6
1.1.6. Disse Aralığı (Perisinüzoidal Aralık, Subendotelyal Aralık).....	6

1.1.7. ITO Hücreleri (Hepatik Stellat Hücreler).....	7
1.2. Karaciğerin Embriyonik Gelişimi.....	8
1.3. Karaciğerin İşlevleri.....	10
1.4. Karaciğer Yağlanması.....	11
1.4.1. Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı.....	12
1.4.1.1. Yağlanma (Steatoz).....	12
1.4.1.1.1. Mikroveziküler Steatozis.....	12
1.4.1.1.2. Makroveziküler Steatozis.....	12
1.4.1.1.3. Miks(Karışık) Tip Steatozis.....	13
1.4.1.2. Steatohepatit.....	13
1.4.1.3. Fibrozis Gelişimi ve Siroz.....	15
1.4.2. NAFLD'nin Risk Faktörleri.....	15
1.4.3. Karaciğer Yağ Asitleri Kaynağı.....	16
1.4.4. NAFLD'nin Patogenezi.....	18
1.4.4.1. Çift Vuruş Hipotezi.....	18
1.4.4.1.1. Birinci Vuruş.....	19
1.4.4.1.1.1. İnsülin Direnci.....	19
1.4.4.1.2. İkinci Vuruş.....	21
1.4.4.1.3. Lipid Peroksidasyonu ve Oksidatif Stres.....	21
1.4.4.1.4. Sitokin Salınımı.....	23
1.4.5. NAFLD Modelleri.....	23
1.4.6. Antioksidanlar.....	25
1.4.6.1. Flavanoidler.....	26

1.4.6.1.2. Kateşin.....	26
1.4.6.1.3. Gallik Asit.....	28
2. GEREÇ veYÖNTEM.....	30
2.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	30
2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	30
2.3. Sıçan Yemlerinin Hazırlanması.....	32
2.4. Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi.....	32
2.4.a. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	32
2.4.b. Masson Trikrom Boyama.....	32
2.4.c. PAS Boyama.....	34
2.5. Karaciğer Dokusunun Elektron Mikroskopik Takip Yöntemi.....	36
2.6. İmmünohistokimyasal İnceleme.....	37
2.7. Biyokimyasal Analiz (ALT, AST, TG).....	39
2.8. Örneklerin Homojenizasyonu.....	39
2.9. Total Protein Analizi.....	39
2.10. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Ölçümleri.....	40
2.10.a. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi.....	40
2.10. b. Karaciğer Dokusunda Katalaz (CAT) Enzim Analizi.....	40
2.10.c. Karaciğer Dokusunda Glutasyon (GSH) Enzim Analizi.....	40
2.11. Karaciğer Dokusunda Lipid Peroksidasyonu (Malondialdehit, MDA) Analizi.....	41
2.12. İstatistiksel Analiz.....	41
3. BULGULAR.....	42
3.1. Yüksek Yağ İçerikli ve Standart Diyet ile Beslenen (10 hafta) Gruplar.....	42

3.1.1. Vücut Ağırlıkları.....	42
3.1.2. Rölatif Karaciğer Ağırlıkları.....	43
3.1.3. Karaciğer Dokusunun Yapısı.....	43
3.1.3.a. Kontrol Grubu Karaciğer Dokuları.....	43
3.1.3.b. Yağlı Karaciğer Dokuları.....	44
3.1.4. Elektron Mikroskopik İnceleme.....	48
3.1.4.a. Kontrol Grubu Karaciğer Dokuları.....	48
3.1.4.b. Yağlanma Grubu Karaciğer Dokuları.....	48
3.1.5. iNOS Enzim Aktivitesi .....	50
3.1.6. Biyokimyasal Analizler.....	51
3.1.6.a Serum ALT ve AST Değerleri.....	51
3.1.6.b. Serum TG Değerleri.....	51
3.1.7. Karaciğer MDA, SOD, CAT ve GSH Değerleri.....	52
3.2. Standart Diyet ile Beslenen ve Yüksek Yağ İçerikli Diyete İlaveten Kateşin ve Gallik Asit Uygulaması (16 hafta).....	52
3.2.1. Vücut Ağırlıkları.....	53
3.2.2. Rölatif Karaciğer Ağırlıkları.....	54
3.2.3. Karaciğer Dokusu Yapısı.....	55
3.2.3.a. Kontrol Grubu karaciğer Dokuları.....	55
3.2.3.b. Yağlanma Grubu Karaciğer Dokuları.....	55
3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 10 mg/kg/gün Kateşin Verilen Grubun Karaciğer Dokuları.....	59
3.2.3.d. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 50 mg/kg/gün Kateşin Verilen Grubun Karaciğer Dokuları.....	61



3.2.3.e. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 100 mg/kg/gün Kateşin Verilen Grubun Karaciğer Dokusu.....	63
3.2.3.f. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 10 mg/kg/gün Gallik Asit Verilen Grubun Karaciğer Dokusu.....	65
3.2.3.g. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 50 mg/kg/gün Gallik Asit Verilen Grubun Karaciğer Dokusu.....	67
3.2.3.h. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 100 mg/kg/gün Gallik Asit Verilen Grubun Karaciğer Dokusu.....	69
3.2.4. Elektron Mikroskobik İnceleme.....	71
3.2.5. iNOS Enzim Aktivitesi.....	76
3.2.6. Biyokimyasal Analizler.....	78
3.2.6.a. Serum ALT ve AST Değerleri.....	78
3.2.6.b. Serum TG Değerleri.....	79
3.2.7. Karaciğer MDA, SOD, CAT ve GSH Aktiviteleri.....	79
4. TARTIŞMA.....	81
5. SONUÇ.....	91
ÖZET.....	92
SUMMARY.....	93
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	111
TEŞEKKÜR.....	112

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%:	Yüzde
<sup>0</sup> C:	Santigrat derece
A <sup>0</sup> :	Angstrom
AGER:	Düz endoplazmik retikulum
ALT:	Alanin transaminaz
Apo B100:	Apolipoprotein B100
Apo E:	Apolipoprotein E
ASH:	Alkolik steatohepatit
AST:	Aspartat amino transferaz
ATP:	Adenozin trifosfat
AYKH:	Alkolik yağlı karaciğer hastalığı
BMP:	Kemik morfojenetik proteinler
c-AMP:	Siklik AMP
CAT:	Katalaz
CCl <sub>4</sub> :	Karbon tetraklorür
ChREBP:	Karbonhidrat cevap elementlerini bağlayan protein (carbonhydrate responsive element binding protein)
CuCl <sub>2</sub> :	Bakır klorür
CYP2E1:	sitokrom p450 2E1
Ç:	Çekirdek
DAB:	3,3'-diamino benzin
DNA:	Deoksiribonükleik asit
E.M:	Elektron Mikroskopi
EGCG:	Epigallokateşin gallat
ER:	Endoplazmik Retikulum
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
G:	Glukojen
GAG:	Glikoz amino glukan

Gal:	Gallik asit
GER:	Granüler endoplazmik retikulum
GSH:	Glutasyon
GSH-Px:	Glutasyon peroksidaz
GSSGR:	Glutasyon redüktaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen peroksit
HCl:	Hidroklorik asit
HFD:	Yüksek yağ içerikli diyet
HFD:	Yüksek yağ içerikli diyet (High fat diet)
HSC:	Hepatik stellat hücre
ICAM-1:	Hücre içi adhezyon molekülü (Intercellular adhesion molecule)
IL 1 $\beta$ :	İnterlökin 1beta (Interleukin 1beta)
IL 6:	İnterlökin 6 (Interleukin 6)
ITO:	Karaciğer yıldızlı hücresi
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (induced nitric oxide synthase)
K:	Kontrol
Kat:	Kateşin
kg:	Kilogram
KY:	Yağlanma
MCD:	Metiyonin ve kolin içermeyen (Methionine and choline deficient)
MDA:	Malondialdehit
Mit DNA:	Mitokondriyal DNA
mm:	Milimetre
Mv:	Mikrovillus
NAFLD:	Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı
NASH:	Alkolik olmayan steatohepatit
NF- $\kappa$ $\beta$ :	Nükleer faktör kapa beta
nm:	Nanometre
PA:	Portal alan

PAS:	Periferik asit schiff
PBS:	Fosfat buffer
PPAR $\alpha$ :	Peroksizom çoğaltıcısı ile uyarılan reseptör
ROS:	Reaktif oksijen türleri
rpm:	Dakikada devir
S:	Sitoplazma
SD:	Standart diyet
Si:	Sinüzoid
SK:	Safra kanalikülü
SOD:	Süperoksit dismutaz
SREBP:	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein (Sterol regulatory element binding protein)
STM:	Septum transversum mezenşim
SYA:	Serbest Yağ Asiti
TBA:	Tiyobarbitürik asit
TCA:	Trikloroasetik asit
TG:	Trigliserit
TGF $\beta$ :	Dönüştürücü büyüme faktörü beta (Transforming Growth Factor Beta)
TNF $\alpha$ :	Tümör nekroz faktör alfa(Tumor necrosis factor alfa)
U/mg:	Ünite / miligram
VEGF:	Damarsal endotelyal büyüme faktörü
VLDL:	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (Very low density lipoprotein)
Yd:	Yağ damlacığı
$\mu\text{m}$ :	Mikrometre

## ÇİZELGELER

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Hepatosteatoz derecesi.....	13
Çizelge 1.2. Steatohepatit derecesi.....	14
Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırması.....	25
Çizelge 2.1. Çalışma grupları.....	31
Çizelge 2.2. Hematoksilen – Eozin Boyama İşlemi.....	33
Çizelge 2.3. Masson trikrom boyama işlemi.....	34
Çizelge 2.4. PAS boyama işlemi.....	35
Çizelge 2.6. İmmünohistokimyasal boyama işlemi.....	38
Çizelge 3.1. K ve Ky gruplarının rölatif karaciğer ağırlıkları (10h).....	43
Çizelge 3.2. iNOS immünreaktivitesi histoskoru.....	50
Çizelge 3.3. 10 haftalık K ve KY gruplarının ALT ve AST değerleri.....	51
Çizelge 3.4. 10 haftalık K ve KY gruplarının MDA, SOD, CAT, GSH değerleri.....	52
Çizelge 3.5. Rölatif karaciğer ağırlıkları.....	54
Çizelge 3.6. iNOS immünreaktivitesi histoskoru.....	76
Çizelge 3.7. Serum ALT, AST değerleri.....	78
Çizelge 3.8. MDA, SOD CAT, GSH değerleri.....	80

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 1.1. Karaciğerin yapısı.....	1
Şekil 1.2. Karaciğer klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü.....	3
Şekil 1.3. Karaciğer asinüsü ve zonlanma.....	3
Şekil 1.4. NAYKH ilerleme süreci.....	11
Şekil 1.5. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı.....	12
Şekil 1.6. Fibrozis ve siroz görüntüsü.....	15
Şekil 1.7. Karaciğere yağ asitlerinin alınışı.....	17
Şekil 1.8. Çift vuruş hipotezi.....	19
Şekil 1.9. Hepatositlere insülin ve glukoz alınımı.....	20
Şekil 1.10 Karaciğere yağ asidi alımı ve yıkımı.....	21
Şekil 3.1. K ve KY gruplarının haftalık vücut ağırlıkları (10 h).....	42
Şekil 3.2. 10 haftalık K ve KY gruplarının TG içeriği.....	51
Şekil 3.3. KY, K ve farklı dozlarda kateşin uygulanan grupların haftalık vücut ağırlıkları.....	53
Şekil 3.4. KY, K ve farklı dozlarda gallik asit uygulanan grupların haftalık vücut ağırlıkları.....	53
Şekil 3.5. Serum TG değerleri.....	79

## RESİMLER

### Sayfa

Resim 1.1. Karaciğerin ışık mikroskobik ve elektron mikroskobik görünümü.....	4
Resim 3.1. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (10h; H-E).....	44
Resim 3.2. Yağlı karaciğer dokusunun görünümü (10h; H-E).....	45
Resim 3.3. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (10h; Masson Trikrom).....	45
Resim 3.4. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (10h; Masson Trikrom).....	46
Resim 3.5. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (10h; PAS).....	46
Resim 3.6. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (10h; PAS).....	47
Resim 3. 7. K grubu karaciğer dokusunun yarı ince kesiti (10h; Toluidin blue).....	47
Resim 3. 8. KY grubu karaciğer dokusunun yarı ince kesiti (10h; Toluidin blue).....	48
Resim 3.9. K grubu karaciğer dokusunun E.M görüntüsü (10h).....	49
Resim 3.10. KY grubu karaciğer dokusunun E.M görüntüsü (10h).....	49
Resim 3.11. K(a) ve KY(b) gruplarında iNOS enzim aktivitesi (10h).....	50
Resim 3.12. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h).....	56
Resim 3.13. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h).....	56
Resim 3.14. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h).....	57
Resim 3.15. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h).....	57
Resim 3.16. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h).....	58
Resim 3.17. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü ( 16h).....	58
Resim 3.18. KY+Kat 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h).....	59
Resim 3.19. KY+Kat 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; Masson trikrom).60	
Resim 3.20. . KY+Kat 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; PAS).....	60

Resim 3.21. KY+Kat 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; H-E).....	61
Resim 3.22. KY+Kat 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; Masson trikrom).	62
Resim 3.23. KY+Kat 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü ( 16h; PAS).....	62
Resim 3.24. KY+Kat 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; H-E).....	63
Resim 3.25. KY+Kat 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; Masson trikrom).....	64
Resim 3.26. . KY+Kat 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü ( 16h; PAS).....	64
Resim 3.27. KY+Gal 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; H-E).....	65
Resim 3.28. KY+Gal 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; Masson trikrom).	66
Resim 3.29. KY+Gal 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; PAS).....	66
Resim 3.30. KY+Gal 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; H-E).....	67
Resim 3.31. KY+Gal 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; Masson trikrom).	68
Resim 3.32. KY+Gal 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; PAS).....	68
Resim 3.33. KY+Gal 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; H-E).....	69
Resim 3.34. KY+Gal 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; Masson trikrom).....	70
Resim 3.35. KY+Gal 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (16h; PAS).....	70
Resim 3.36. Kontrol grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü. (16h).....	72
Resim 3.37. Yağlanma grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	72
Resim 3.38. KY+Kat 10 grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	73
Resim 3.39. KY+Kat 50 grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	73



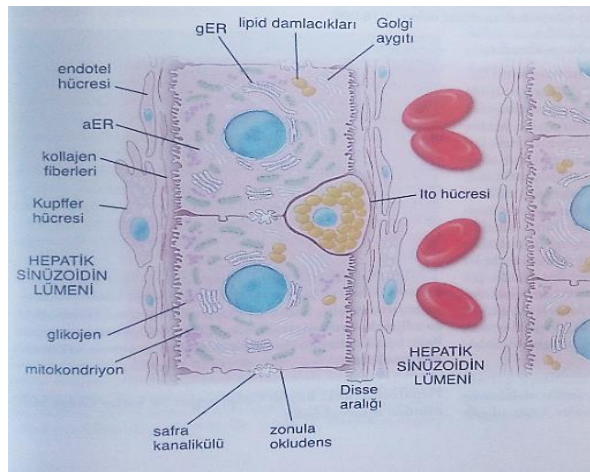
Resim 3.40. KY+Kat 100 grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	74
Resim 3.41. KY+Gal 10 grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	74
Resim 3.42. KY+Gal 50 grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	75
Resim 3.43. KY+Gal 100 grubunda karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü (16h).....	75
Resim 3.44. iNOS enziminin immünohistokimyasal reaksiyonu.....	77

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Karaciğerin Genel Yapısı

Karaciğer, yaklaşık olarak 1,5 kg ağırlığında olup, vücudumuzun en büyük iç organı ve bezidir. Karın boşluğunun sağ üst bölümünde, mide ve bağırsakların üzerinde ve diyaframın altında yerleşiktir. Karaciğer, diyafram ve abdomen duvarıyla temasta olan kısımlar dışında, tek katlı yassı epitel (mezotelyum) ve altında bağ dokudan oluşmuş visseral peritonla çevrilidir. Peritonun alt kısmında kollajen ve elastik liflerce zengin bağ dokusu olan glisson kapsülü yer almaktadır. Glisson kapsülü karaciğer içine yaptığı girintilerle karaciğeri, yaklaşık 1 mm çapında ve 1-2 mm uzunluğunda 1 milyon kadar lobüllere ayırmaktadır. Altıgen şeklindeki lobüllerin birleştiği kısımlarda arter, ven ve safra kanallarını içeren portal alanlar (Glisson üçgeni ya da Kiernan aralığı) bulunur (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2009, Ross ve Pavlina 2013).

Karaciğer parankim, stroma, sinüzoidler (sinüzoidal kapillerler) ve disse aralıklarını (perisinüzoidal aralıklar) içeren yapılardan oluşmaktadır. Parankim, sinüzoidal kapillerce birbirinden ayrılmış hepatosit plaklarından meydana gelmiştir. Bağ dokusu yapısında olan stroma, glisson kapsülü ile devam etmektedir. Stroma içerisinde kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve safra kanalları bulunur. Sinüzoidler, hepatosit tabakaları arasındaki vasküler kanallardır. Hepatosit ve sinüzoidal endotel arasında disse aralığı yer alır (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2009, Ross ve Pavlina 2013) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Karaciğerin yapısı (Ross ve Pavlina 2013)

### **1.1.1. Karaciğer Lobülü**

Karaciğer lobülü işlevsel birim bakımından; klasik, portal lobül ve karaciğer asinüsü olmak üzere sınıflandırılabilir.

#### **1.1.1.1. Klasik Karaciğer Lobülü**

Klasik karaciğer lobülünün merkezinde terminal hepatik venül (vena sentralis, sentral ven) yer alır. Hepatositler (karaciğer epitel hücreleri) sentral venden ışınsal biçimde çevreye uzanarak, tek hücre kalınlığında hepatosit hücre plaklarını (karaciğer hücre kordonlarını veya Remark kordonlarını) oluştururlar.

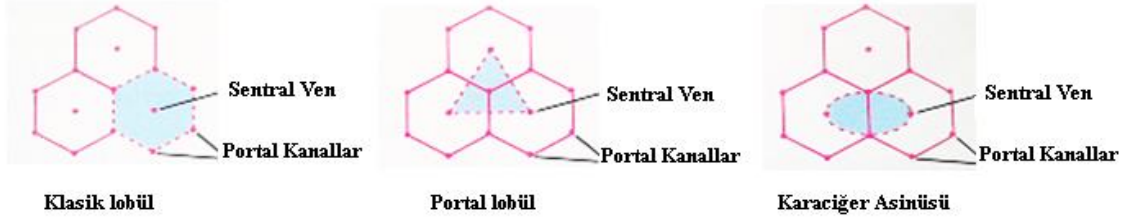
Hepatosit plakları, dallanmış sinüzoidler tarafından birbirinden ayrılmaktadır. Yaklaşık 2,0 x 0,7 mm ölçülerinde olan lobüller, enine kesitlerde altıgen şeklindedir. Altıgenin her köşesinde portal triadlarla karakterize gevşek bağ dokusu olan portal alanlar (portal kanallar) bulunmaktadır (Şekil 1.2). Klasik karaciğer lobülü, karaciğerin incelemesinde kolaylığa yol açmakta, fakat karaciğer işlevlerini tam olarak açıklayamamaktadır (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2009, Ross ve Pavlina 2013).

#### **1.1.1.2. Portal lobül**

Portal lobül, safra salgılanımıyla karaciğerin önemli ekzokrin işlevini gösterir. Karaciğerden ortak hepatik kanal yoluyla çıkan safra, sistik kanal yoluyla safra kesesine akar. Portal lobülün sınırları yan yana bulunan üç klasik lobülün sentral venlerinin birleşmesiyle belirir (Şekil 1.2). Portal lobül modeli, karaciğer parankim yapısının diğer ekzokrin bezlerin parankimlerine benzer olarak tanımlanmasını sağlamaktadır (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2009, Ross ve Pavlina 2013).

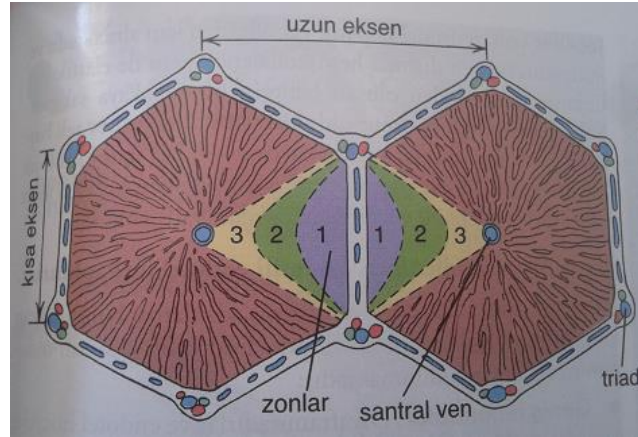
#### **1.1.1.3. Portal asinüs (Karaciğer asinüsü, Hepatik asinüs)**

Karaciğer, asinus olarak adlandırılan işlevsel birimlere ayrılmaktadır. Parankimin en küçük işlevsel birimini temsil eden eşkenar dörtgen şeklindeki karaciğer asinüsünün sınırları, 2 vena sentralis ve 2 portal aralığın birleşmesiyle oluşur (Şekil 1.2). Kan perfüzyonu, metabolik faaliyet ve karaciğer patolojisi arasında en iyi bağlantıyı sağlayan yapısal birim portal asinüstür. Karaciğer asinüsü iki komşu klasik lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre gruplarını içermektedir (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2009, Ross ve Pavlina 2013).



Şekil 1.2. Karaciğer klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü (Ross ve Pavlina 2013)

Karaciğer histolojik görüntüsünde homojen olarak tanımlanmasına rağmen 1856 yılında karaciğer anatomisinin detaylı ortaya çıkarılmasıyla, hepatositlerde yağ birikimi ve safra salgısı açısından karaciğerin heterojeniteye sahip olduğu belirlenmiştir (Beale 1856). Karaciğerde heterojen enzim dağılımı metabolik zonlaşmayı meydana getirir (Jungermann ve Sasse 1978). Her karaciğer asinüsündeki hepatositler, iki sentral ven arasında periferik zon, ara zon ve sentral zon olmak üzere 3 zon şeklinde düzenlenmiştir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Karaciğer asinüsü ve zonlanma (Ross ve Pavlina 2013)

#### 1.1.1.3.1. Periferik zon (Zon 1)

Klasik karaciğer lobülünün çevresine karşılık gelen portal kanala en yakın zondur. Portal ven ve hepatik arterden gelen kan desteği lobülün çevresinden merkeze doğru ilerlediğinden, glukojen ve oksijen gibi maddelerden zengin kanla karşılaşanlar, zon 1'de yer alan periferik hücrelerdir. Bunun yanı sıra zon 1, kandaki zararlı maddelerden de ilk etkilenen bölgedir (IJaz ve ark 2003). Glukojen en çok zon 1'de depolandığı gibi, zon 1'de glukoneogenez daha aktiftir ve diğer bölgelere göre daha çok alkalen fosfotaz ve transaminaz içermektedir (Tosh ve ark 1988).

### 1.1.1.3.2.Ara zon (Zon 2)

Periferik ve sentral zon arasında kalan ve sınırları kesin olarak belirlenemeyen zondur.

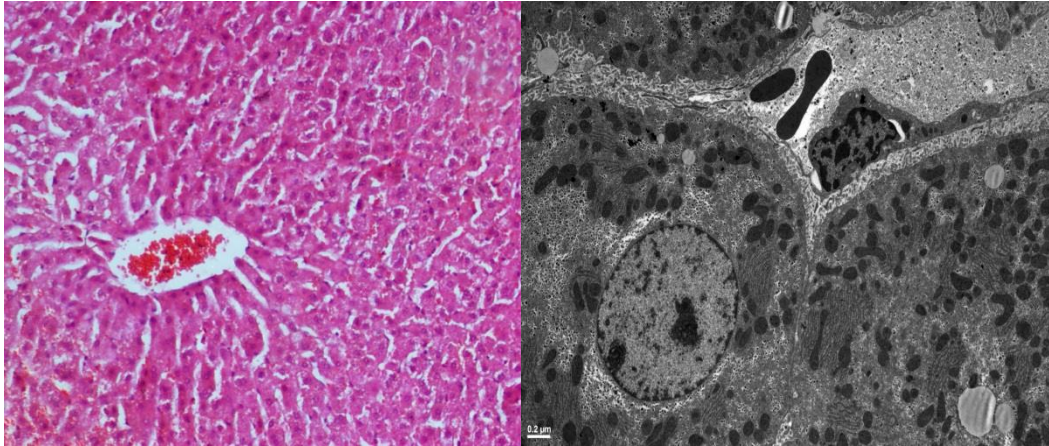
### 1.1.1.3.3. Sentral zon (Zon 3)

Zon 3, karaciğer asinüsünde sentral vene en yakın olan zonudur. Düz endoplazmik retikulumca (AGER) zengin olmasına rağmen, diğer zonlardaki hücrelerle karşılaştırıldığında organeller açısından daha az gelişmiş hücrelere sahiptir.

Yağlanmanın başlangıç bölgesi olup viral, toksik ve anoksik durumlarda, karaciğer hasarına en çok maruz kalan bölge olması açısından, karaciğer patolojisinde büyük öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar karaciğer yağlanmasının sentral alanlarda başlayarak ara zon ve periferik zonlara doğru ilerlemekte olduğunu göstermiştir (Ijaz ve ark 2003).

## 1.1.2. Karaciğer Epitel Hücresinin (Hepatosit) Özellikleri

Karaciğer hücrelerinin yaklaşık % 80'ini oluşturan hepatositler, bir veya birkaç çekirdeğe sahip, yaklaşık 20-30 µm çapında polihedral (çok yüzlü) hücrelerdir. Hepatositlerde çekirdek, büyük olup hücrenin merkezinde bulunmaktadır. Her bir çekirdekte iki veya daha fazla sayıda çekirdekçik bulunmaktadır (Resim 1.1).



Resim 1.1. Karaciğerin ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik görünümü

Hepatositlerin sitoplazması genellikle asidofiliktir. Rutin ve özel boyama işlemleri ile hepatositlerde özel sitoplazmik yapılar incelenebilir. Yüksek metabolik faaliyetlerinden dolayı, hepatositlerde çok sayıda krista içeren mitokondriyonlar yer almaktadır.

Hepatositlerde bulunan granüllü endoplazmik retikulum (GER) plazma proteinlerinin sentezinde rol oynarken, AGER glukojen, lipid sentezi ve detoksifikasyon metabolizmaları ile ilişkilidir. Hepatositlerin ilaç, toksinler veya metabolik uyarıcılar ile karşılaşması durumunda, AGER'in hücredeki hacmi artabilmektedir. AGER membranlarında; kolesterol ve safra tuzlarının sentezi, serbest yağ asitlerinin trigliseritlere esterleştirilmesi ve glukojenin glukoza yıkımı gibi işlevlere sahip enzimler de bulunmaktadır. Bol miktarda mitokondriyon ve AGER içeriklerinden dolayı hepatositler hematoksilen-eozin boyamada eozinofiliktirler. Hepatositlerde özellikle plazma proteinlerinin (albümin), glikoproteinlerin (transferrin) ve lipoproteinlerin (VLDL) salgılanmasında görev alan safra kanaliküne yakın yerleşim gösteren golgi cisimcikleri, lizozom ve peroksizomlar da bulunmaktadır. Hepatositlerde bulunan lizozomlar, plazma glikoproteinlerini, bazolateral bölgede hepatik lektin membran reseptörü ile yıkıma uğratmaktadır. Her bir hepatositte çapları 0.2- 1.0 µm olan en az 200-300 peroksizom bulunur. Oksijen kullanımının ana alanlarından olan peroksizomlar, mitokondriyonlara benzer işlev göstermektedirler. Ayrıca peroksizomlar, toksik etkiye sahip hidrojen peroksiti, katalaz enzimi sayesinde hidrojen ve oksijene ayırma özelliğine sahiptirler.

Hepatositler bazolateral bölge ve apikal bölge olmak üzere iki adet hücresel bölgeye sahiptirler. Bazolateral bölge, hepatositlerin çok sayıda mikrovillus içeren disse aralığına bakan kısmıdır. Hepatositler arasındaki iletişim hepatositlerin yan yüzlerinde bulunan gevşek bağlantı kompleksleri (neksuslar) ile saplanmaktadır. Bazolateral bölge albumin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri V, VII ve IX gibi kandan kaynaklanan maddelerin emilimine ve plazma proteinlerinin salgılanmasına katkı sağlamaktadır. Apikal bölge ise, safra kanalikülünün etrafını çevrelemektedir. Nispeten uzun yaşayan hepatositlerin hayat süreleri yaklaşık olarak 5 aydır. Ayrıca, karaciğer dokusu hepatoksik durumlar, hastalıklar ve cerrahi girişimler ile kayba uğradığında, hepatositler önemli rejenerasyon yetemeği gösterirler.

### **1.1.3. Sinüzoidler**

Hepatositlerin sentral venden periferik doğru ışınal olarak oluşturdukları hücre kordonları arasındaki boşluklarda, sinüzoidal kapillerler yer alır (Şekil 1.1). Portal alanda yer alan portal ven ve hepatik arter, kanı sinüzoid adı verilen bu damar sistemine boşaltır. Dolayısıyla sinüzoidlerde hem arter hem de ven kanı bulunmuş olur.

Sinüzoidal damarlar birbirleriyle yaptıkları dallanmalar sonucu karaciğer hücre kordonlarını birbirinden ayırarak, vena sentralise açılmaktadırlar. Hepatositler ile temasta olan hücreler sinüzoid duvarındaki endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve ITO hücreleridir (hepatic stellat hücreler) (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2009, Ross ve Pavlina 2013).

#### **1.1.4. Endotel Hücresi**

Sinüzoid duvarında yer alan yassı ve koyu boyanan çekirdeklere ve az miktarda organelle sahip hücrelerdir (Şekil 1.1). Endotel hücreleri çok ince retikulum liflerinden oluşan bir bazal membran ile çevrilidir. Aralıklı olarak yerleşimlerinden dolayı sinüzoid duvarında pencere oluşmasına neden olurlar. Sinüzoidler bu açıklıklar ya da pencerelerden dolayı vücuttaki diğer kapillerlerden farklıdırlar (Wisse 1970, Ross ve Pavlina 2013).

#### **1.1.5. Kupffer Hücreleri**

Mononükleer fagositik sistem üyesi olan olan kupffer hücreleri, kemik iliği kökenlidir ve hepatic makrofajlar olarak bilinmektedirler (Fox ve ark 1987, Smedsrod ve ark 1994). Karaciğer hücre popülasyonunun % 10'unu ve vücuttaki makrofajların % 80-90'ını oluştururlar. Sinüzoidlerin lümenine yerleşik, kan damarları duvarına dizili ve endotel hücrelere yapışık olarak yer alırlar (Şekil 1.1) (Bouwens ve ark 1986).

Kupffer hücreleri, oval çekirdeğe sahip düzensiz sitoplazmik uzantılarından dolayı yıldız şekilli ve endotel hücrelerinden daha büyük hücrelerdir. Fagositoz yeteneğinden dolayı bol lizozom içerirler. Ömürlerini tamamlamış eritrositleri sindirme, çeşitli sitokinleri salgılama gibi özelliklere sahiptirler.

#### **1.1.6. Disse aralığı (perisinüzoidal aralık, subendotelial aralık)**

Karaciğer hücreleri ile sinüzoid duvarı arasında bulunan dar aralığa disse aralığı (perisinüzoidal aralık, subendotelial aralık) denir (Şekil 1.1). Hepatositlerin disse aralığına bakan kısımda, salgılama ve emilim alanını yaklaşık altı kat arttıran çok sayıda mikrovilluslar bulunur. Disse aralığında, hem endotel hücrelerinden hem de kupffer hücrelerinden türeyebilen az sayıda perisinüzoidal hücreler bulunur. Disse aralığında fibroblast bulunmadığından, retiküler ve fibrojen fibril sentezi, perisinüzoidal hücreler tarafından yapılmaktadır.

Perisinüzoidal hücreler en çok ara zonda ve periferik zonda yer alır. Hepatositte sentezlenen lipoprotein, albümin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri gibi moleküller, disse aralığıyla sinüzoidlerdeki kana geçerler. Bu sebepten dolayı disse aralığı kan ve karaciğer hücreleri arasında materyal değişim alanı olarak görev yapar.

### **1.1.7. ITO Hücreleri (Hepatik Stellat Hücreler)**

ITO hücreleri; hepatik stellat hücreler, perisitler, lipositler, intersitisyel hücreler, yağ depolayan hücreler ya da vitamin A depolayan hücreler olarak da isimlendirilmektedirler (Şekil 1.1) (Geerts 2001, Ichikawa ve ark 2011). Bu hücreler 1996 yılında standardize edilerek hepatik stellat hücreler (HSC'ler) olarak isimlendirilmişlerdir (Ahern ve ark 1996).

ITO hücreleri, karaciğer hücrelerinin % 10-15'ini oluşturur (Geerts 2001). Karaciğerde retinoidlerin alınması, depolanması ve salgılanması, bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin ve proteoglikanların sentezi ve salgılanması, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanması gibi çeşitli işlevlere sahiptir. Bu hücreler mezenşimal kaynaklı olup, yağ içerirler ve A vitamininin lipid damlacıkları içinde retinil esterler halinde depolamasını sağlarlar. Vücut retinolünün % 80'ini retinil ester olarak depolamaktadırlar (Blomhoff ve Blomhoff 2006). Patolojik durumlarda, ITO hücreleri, kollajen üreten hücrelere dönüşürler. tip I kollajenin sentezine ve salınımına ek olarak, laminini, proteoglikanları ve büyüme faktörlerini salgılamaktadırlar. Uzantıları komşu hepatositlerle ilişki kurmaktadır. Ancak bağlantı birimlerine sahip değildirler. ITO hücreleri hücre-hücre etkileşim yetenekleri sayesinde, sitokinler aracılığıyla karaciğer rejenerasyonunda (yenilenmesinde) etkindirler (Chen ve ark 2012).

Normal fizyolojik şartlar altında aktif olmayan HSCler, karaciğer hasarı olduğunda faal hale geçerler. Hasarlı karaciğerde HSC aktivasyonu, AGER'in lümeninin genişlemesi, vitamin A depolarında azalma, çekirdek zarında şekil bozukluğu ve kasılabilir filamentlerin oluşumunu artırmıyla karakterizedir (Bataller ve Brenner 2005). Faal HSC'ler kollajen, proteoglikan, GAG ve glikoprotein gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerini sentezlemekte ve salgılamaktadırlar (Mormone ve ark 2011). HSC'lerin faaliyeti sırasında, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu ve salgılanmasında artış meydana gelmektedir (Bataller ve Brenner 2005, Tacke ve Weiskirchen 2012).



## 1.2. Karaciğerin Embriyonik Gelişimi

Karaciğer, gastrulasyon aşamasında gelişen üç tabakadan biri olan endodermden köken almaktadır (Zaret ve ark 1999). Sox17 ve Foxa1-3 transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasıyla gelişen endoderm, mezoderm ile çevrelenmiş primitif bağırsak tüpünü meydana getirmektedir (Shen 2007, Zorn ve Wells 2007). Mezodermden salgılanan transkripsiyon faktörleriyle, bağırsak tüpü anteriyor-posteriyor olarak uzama göstermektedir. Karaciğer dokusu da Hhex transkripsiyon faktörünün uyarılmasıyla gelişen ventral ön bağırsaktan meydana gelmektedir (Beck 2004, Tremblay ve Zaret 2005). Karaciğer gelişimini uyarıcı sinyaller, ventral ön bağırsağa bitişik bulunan mezoderm olan kardiyak mezoderm ve septum transversum mezenşimden (STM) salgılanmaktadır. Ön bağırsak oluşumunun ardından gelişen kalpten alınan fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyali ve STM'lerden salınan kemik morfojenetik proteinler (BMP), ventral ön bağırsaktan salgılanarak karaciğer gelişimini uyarılmaktadır (Duncan ve Watt 2001, Rossi ve ark 2001, Dessimoz ve ark 2006, Mclin ve ark 2007). Bu uyarının ardından, basit kübik epitel kalınlaşarak yalancı çok katlı silindirik epitele dönüşerek, etrafı laminince zengin bazal membran ile çevrelenmektedir.

3. haftanın ortasında hızla çoğalan hücrelerden meydana gelen çıkıntı karaciğer divertikülü olarak adlandırılır (Bort ve ark 2006). Karaciğer hücreleri, septum içine doluşurken hepatik divertikül ile ön bağırsak arasındaki bağlantı daralarak safra kanalları oluşur. Safra kanalından kaynaklanan küçük bir ventral çıkıntı, safra kesesi ve sistik kanal haline gelmektedir. Gebeliğin 8. ve 10. haftaları arasında hepatoblastlar karaciğer tomurcuğunu oluşturmak üzere göç etmeye başlamaktadırlar.

Karaciğer hücreleri septum transversumu tamamen işgal ettiklerinde, karaciğer karın boşluğunda kaudal yönde büyümektedir. Ardından karaciğer tomurcuğunun büyüüp gelişimini içeren hepatik morfogenez meydana gelmektedir. Ortaya çıkan karaciğer tomurcuğu, hepatoblastlara ek olarak endotelial hücreler ve gelişen stellat hücreleri içermektedir (Shiojiri ve Sugiyama 2004, Bort ve ark 2006). Çoğalıp olgunlaşmanın ardından hepatoblastlar, hem hepatositlere hem de intrahepatik safra kanallarını oluşturmak üzere kolanjiositlere farklılaşmaktadırlar. Safra kanalları oluşumu sırasında, parankimadaki hepatoblastlar da hepatositlere farklılaşmaktadır. Bu kısma kadar olan karaciğer gelişimi, epitel kısımda meydana gelen gelişimi içermektedir.

Epitel ve epitel özelliği göstermeyen yapılardaki değişiklikler sonucu karaciğer dokusu meydana gelmektedir.

Karaciğerde bulunan sinüzoidler, hepatik sinüzoidal endotelial hücreleri ve stellat hücreleri içerir. Ayrıca karaciğerin hepatogenezis sırasında anjiogenezle oluşan ilk kan damarlarıdır (Collardeau-Frachon ve Scoazec 2008, Elvevold ve ark 2008). Sinüzoidal farklılaşmalar gebeliğin 5. ve 12. haftalarında meydana gelmektedir. Perisinüzoidal matriks, 8 ve 10. haftalar arasında bazal membran kısımlarını (laminin) kaybetmeye başlar ve aynı zamanda endotelial tabakada tipik sitoplazmik fenestrasyon (pencere) meydana gelmektedir (Enzan ve ark 1997). Sinüzoidal farklılaşmanın ilk aşaması (endotelial fenestrasyon gelişimi, subendotelial bazal membranın kaybı ve ekstraselüler matriksin bileşimindeki değişiklikler) gebeliğin 7. haftasında karaciğerin hemotopoietik işlevlerinin başladığını gösterir.

Perisinüzoidal mezenşimden kaynaklanan faktörler ve hepatositlerin farklılaşması sinüzoidal endotelial hücre farklılaşmasının ana sebebidir. Bu farklılaşmada, damarsal endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF  $\beta$ ) ailelerinin etkin rolü vardır (Yamane ve ark 1994, Yoshida ve ark 2007 ).

Dördüncü hafta sonunda embriyoda üç venöz sistem bulunur. Bunlardan iki tanesi umbilikal ven ve vitellin veni içeren ekstraembriyonik diğeri de kardinal venleri içeren intraembriyonik venöz sistemdir (Kiserud ve Acharya 2004). Vitellin venler, kanı vitellus kesesinden kalbe, umbilikal venler oksijenlenmiş kanı plasentadan kalbe taşır.

Dördüncü haftada, karaciğer tomurcuğu oluşumun hemen ardından, vitellin ve umbilikal sistemlerde büyük değişiklikler meydana gelir. Karaciğer, gebeliğin embriyonik dönemin ilk kan yapıcı organı olarak görevini yerine getirmeye başlar ve 6. haftada hematopoez başlar. Portal ven, vitellin venlerin çeşitli segmentlerinden gelişmektedir (Dickson 1957).

HSC'ler ve kupffer hücreleri, hepatositlerin bazolateral yüzeyi ve sinüzoidal endotelial hücrelerin adluminal yüzeyinde yer alan perisinüzoidal alanda (disse aralığı) bulunmaktadır. Stellat hücreleri, septum transversumun mezenşimal hücrelerinden gebeliğin 8 ila 10. haftaları arasında gelişmektedir. Kupffer hücreleri, hepatik sinüzoidal hücrelerinde yüzeyinde yer alan makrofajlardır. Karaciğer organogenezinde rol almaktadırlar ve bu hücrelerde septum transversum mezenşiminden kaynaklanmaktadır.

### 1.3. Karaciğerin İşlevleri

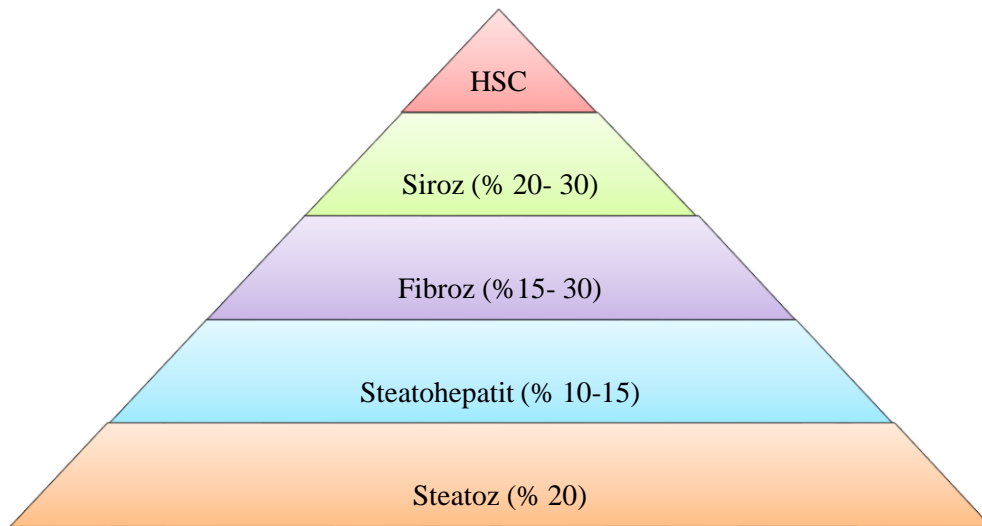
Karaciğer vücut için oldukça önemli işlevlere sahiptir. Buna göre;

- ❖ Safrayı safra kanalları yoluyla duodenuma boşaltan ekzokrin bir bezdir.
- ❖ Albumin, globulinler, lipoproteinler, protrombin, fibrinojen gibi proteinleri ve glukozu sentezleyerek, bu maddeleri doğrudan kana vermesinden dolayı aynı zamanda endokrin bir bezdir.
- ❖ Metabolizmanın düzenlenmesinde, proteinlerin yapımında, vitaminlerin depolanmasında ve toksinlerin dışarı atılmasında önemli role sahiptir.
- ❖ Karaciğer, iskelet kası ile birlikte vücuttaki ana glukojen depo organıdır.
- ❖ Kanda glukoz seviyesi yükseldiğinde, glukozun bir kısmı tarafından dönüştürülen glukojen, kanda glukoz seviyesi düştüğünde glukojenolizle glukozla çevrilerek kana verilmektedir.
- ❖ Aminoasitler, yağlar ve basit karbonhidratların glukoneogenez ile glukozla çevrildiği yerdir.
- ❖ Proteinlerin yıkılması sonucu, aminoasitler amonyak haline dönüşmektedir. Çoğu doku tarafından parçalanamayan amonyak, dokular için zehir etkisi meydana getirebilir. Karaciğer amonyağı üreye çevirerek, amonyağın zararsız hale getirilmesini sağlamaktadır.
- ❖ Yağ metabolizmasında da rol alarak, karaciğer trigliserit içeriğinin denge tutulmasına sebep olmaktadır.
- ❖ Çoğu plazma proteinlerinin sentezlendiği demir, A, D ve B12 gibi vitaminlerinin depolandığı organdır (Berne ve ark 2008).
- ❖ Genişleyebilen bir organ olması nedeniyle hepatik venler ve sinüsler içinde normalde var olan 450 ml'lik kan deposuna 500 – 1000 ml daha kan ekleyebilir.
- ❖ Portal sisteme bağırsaklardan gelen mikroorganizmalar, hepatik sinüslerde bulunan kupffer hücreleri aracılığı ile filtrelenir.

#### 1.4. Karaciğer Yağlanması

Hepatosit sitoplazmasında lipid damlacıklarının birikimi sonucu karaciğer yağlanması oluşmaktadır. Karaciğerin ağırlığının % 5'inden daha fazla lipid ve % 2'den daha fazla trigliserit (TG) içermesi karaciğer yağlanması olarak adlandırılmaktadır (Adams ve ark 2005). Karaciğer yağlanması alkol alımına bağımlı olarak gelişen alkolik yağlı karaciğer hastalığı (AYKH) ve alkol alımı dışındaki metabolik ve genetik faktörler, ilaç ve toksinler, cerrahi işlemler ve bakteri çoğalımı gibi diğer nedenlerden kaynaklanan alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) olarak iki hastalığın oluşumuyla ilgilidir. AYKH; alkolik karaciğer yağlanması ve alkolik steatohepatitisi (ASH) içerisine almaktadır. NAFLD ise alkolik olmayan karaciğer yağlanması ve alkolik olmayan steatohepatitisi (NASH) içermektedir.

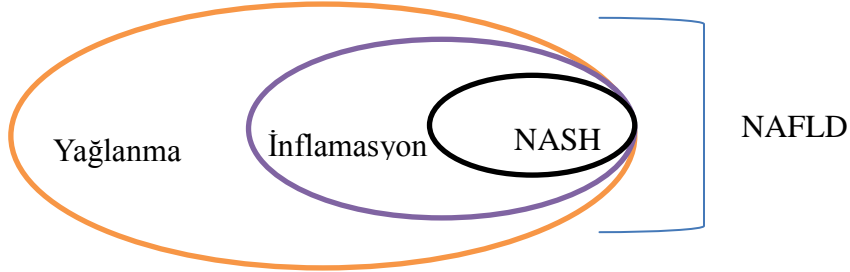
NAFLD ilk olarak Ludwig (1980) tarafından ortaya atılmıştır. Bu terim aslında alkol alımını dışındaki nedenlerden kaynaklanan karaciğer yağlanması ve yağlanmaya ek olarak inflamasyonun meydana gelmesi sonucu oluşan NASH'ı içermektedir (Ludwig ve ark 1980). Yağlanma meydana gelmiş bir karaciğer çeşitli faktörlerle steatohepatite (% 10-15), fibrozise ve siroza (% 20-30) ilerleyebilmektedir (Powell ve ark 1990, Ratziu ve ark 2005). İnsan popülasyonunun yaklaşık % 20'sinde karaciğer yağlanması gözlenirken, % 2-3'ünde NASH görülmektedir (Falck-Ytter ve ark 2001). Siroz evresindeki karaciğer de de hepatoselüler karsinoma meydana gelebilmektedir (Şekil 1.4) (Adams ve ark 2005).



Şekil 1.4. NAFLD ilerleme süreci

### 1.4.1. Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı

Yağlanma ve yağlanmaya ek olarak inflamasyonu da içine alan durumları içermektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı

#### 1.4.1.1. Yağlanma (Steatoz)

Yağlanma (steatoz); NAFLD'nin en erken aşamasıdır. Karaciğerin % 5'inden daha fazla lipid içermesi (hepatosteatoz) bir sonraki evre olan NASH'a ilerleyebilmektedir. Tek başına hepatosteatozda inflamasyon ve skar yoktur, hepatosteatoz beningdir ve geri dönüşümü olabilen bir durumdur. Mikroskopik olarak hepatosteatoz makroveziküler yağ birikimi, mikroveziküler yağ birikimi ve miks yağ birikimi olarak üç şekilde oluşmaktadır.

##### 1.4.1.1.1. Mikroveziküler Steatozis

Mitokondrial işlev bozukluğunun yağ asitlerinin karaciğer oksidasyonuna sebep olmasıyla meydana gelmektedir. Tipik olarak çekirdeğin merkezi yerleşimini engellemeyen küçük lipid zerreciklerinden oluşan mikroveziküler steatozistir. Kolesterol ester depo hastalığı, mitokondriyal yağ oksidasyonunda genetik hasarlar, reye sendromu ve ilaç toksisitesi gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

##### 1.4.1.1.2. Makroveziküler Steatozis

Yağ alımı ve atılımındaki bozukluk sonucu insülin/glukagon oranının yükselmesiyle meydana gelmektedir. Çekirdeğin merkezden perifer kaymasına sebep olan büyük lipid damlaları birikiminin sebep olduğu makroveziküler steatoz; inflamatuvar bağırsak hastalığı, obezite, hiperlipidemi, Wilson hastalığı, viral enfeksiyonlar ve ilaç toksisitesi gibi nedenlere bağlı olarak oluşmaktadır (Kleiner ve ark 2005).

#### 1.4.1.1.3. Miks (Karışık) Tip Steatoz

Hepatosteatozun bir diğer tipi olan miks tip yağlanma ise mikroskobik olarak karaciğerde hem mikroveziküler hem de makroveziküler tip yağlanmanın görülmesidir. Karaciğerde yağlanma genellikle zon 3'te gözlemlenen bir durumdur (Brunt ve Elizabeth 2001). Hepatosteatoz yağlanmanın derecesine göre üç evrede görülebilir. Bunlardan 1. derece yağlanma, hepatosteatozun % 33'ten daha az olduğu durumları, 2. derece yağlanma, hepatosteatozun % 33 ve % 66 arasında olduğu durumları 3. derece yağlanma ise hepatosteatozun % 66'dan daha fazla olduğu durumları göstermektedir. Bu derecelere göre de hepatosteatoz geriye dönebilmekte veya çeşitli etkenlere bağlı olarak NASH'a ilerleyebilmektedir. Derecelendirilme tablosu aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.1)

Çizelge 1.1. Hepatosteatoz derecesi

Steatoz Derecesi	Steatoz Oranı
0	Yağlanma yok
1	Hepatositlerin % 33'ten daha azı etkilenmiş
2	Hepatositlerin % 33-66'sı etkilenmiş
3	Hepatositlerin % 66'dan fazlası ekilenmiş

#### 1.4.1.2. Steatohepatit

NASH; steatoza ek olarak inflamasyonun meydana gelmesiyle ortaya çıkmaktadır. NASH tablosunda makroveziküler tip yağlanma, hepatositlerde balonlaşma, asidofilik cisimcikler, mallory cisimcikleri, akut veya kronik inflamatuvar hücrelerle lobüler inflamasyon ve büyük mitokondriyonlar gözlemlenebilmektedir (Ludwig ve ark 1980, Day ve James 1998, Brunt ve ark 1999, Matteoni ve ark 1999, Diehl ve Poordad 2002). Yağlanma genellikle makroveziküler olup yaygındır. Fakat baskın olarak mikroveziküler olup zon 3'te (perivenüler) oluşabilmektedir (Diehl ve Poordad 2002).

Balonlaşma genellikle zon 3'te gözlemlenen hepatositlerde intraselüler sıvı birikimiyle meydana gelen bir durumdur. Asidofilik cisimcikler ise apoptotik hücre ölümü sonucu meydana gelen sinüzoidlerde, eozinofilik sitoplazmik parçacıklar şeklindedir (Brunt ve Elizabeth 2001).

Karaciğer yağlanması ve oksidatif stres durumunda ER'nin geçirgenlik özelliği kaybolmakta, sitokeratin elementlerinin azalmasıyla hücre iskeleti de bu durumda zarar görmekte ve mallory cisimcikleri şekillenmektedir (Mallory 1911, Denk ve ark 1975).

Mallory cisimciklerinin varlığı değişken (% 9-90) olmakla birlikte, genellikle zon 3'te gözlenmektedirler (Sheth ve ark 1997). NAFLD'nin fibroze ilerlemesinin en iyi göstergesinin hepatositlerde balonlaşma ve mallory cisimciklerinin olduğu düşünülmektedir (Harrison ve ark 2003).

Hepatosteatozda olduğu gibi NASH'ın da evreleri bulunmaktadır. Dolayısıyla NASH; yağlanma, hepatositlerde balonlaşma, lobüller ve portal inflamasyonlara bakılarak hafif, orta ve şiddetli olarak derecelendirilmektedir. NASH'ın derecelendirilmesi aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Steatohepatit derecesi

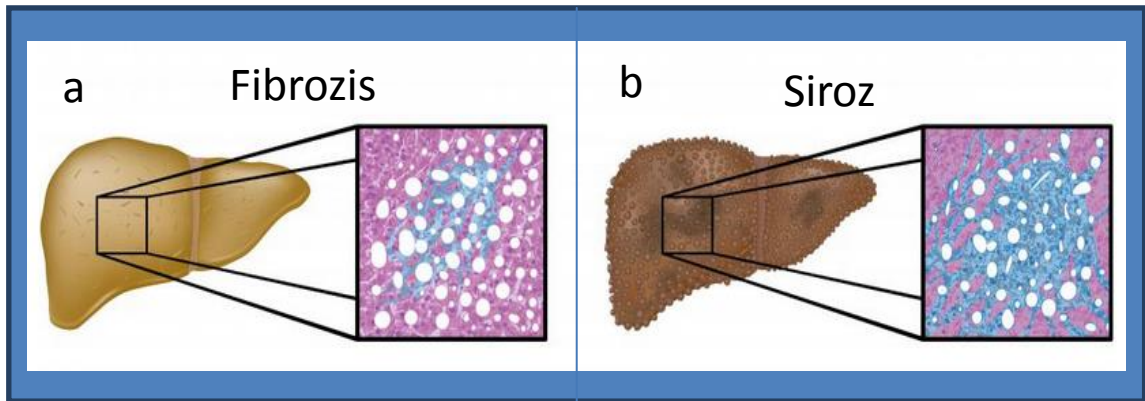
<b>NASH Derece</b>	<b>NASH Şiddeti</b>	<b>Steatoz</b>	<b>Balonlaşma</b>	<b>Lobüller inflamasyon</b>	<b>Portal inflamasyon</b>
1.Derece	Hafif	Lobülün % 66'sı etkilenmiş, makrovezikuler	Sıklıkla görülür	Yer yer veya hafif akut inflamasyon (PNL) ve nadiren kronik inflamasyon (mononükleer)	Yok veya hafif
2.Derece	Orta	Değişik derecelerde karışık makrovezikuler ve mikrovezikuler	Belirgin	Hepatositlerle PNL infiltrasyonu, periselluler fibrozis ve hafif kronik inflamasyon	Hafif veya orta
3.Derece	Şiddetli	Lobüllerin % 66'dan (panaciner) fazlası etkilenmiş ve karışık steatoz	Belirgin	Yer yer akut ve kronik inflamasyon, perisinuzoidal fibrozis ve balonlaşmanın olduğu zon 3 de PNL infiltrasyonu yoğunlaşmış.	Hafif veya orta

NASH'ın ilerlemesiyle birlikte kollajen lif artışına bağlı olarak fibrozis meydana gelebilmektedir. Fibrozisin de devam etmesiyle bağ doku harabiyeti ve karaciğerde siroz gelişebilmektedir (Harrison ve ark 2003).

#### 1.4.1.3. Fibrozis Gelişimi ve Siroz

Fibrozis, karaciğer subendotelyal disse aralığında yerleşik olan lipositler ve ITO hücrelerinin aktivasyonu ile oluşmaktadır. NAFLD'de parenkimal hücre hasarlanması ile oluşan lipid peroksidleri, lipositleri aktive etmektedir. Ayrıca lökosit ve kupffer hücreleri de lipositleri çoğalması için uyararak fibrojenik sitokinlerin (dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF  $\beta$ ), interlökin 6 (IL 6)) salınımını sağlamaktadır (Washington ve ark 2000).

Zon 3'te, perivenüler ve perisinüzoidal alanda kollajen birikimi meydana gelmektedir (Niemela ve ark 2000). Artan kollajen sentezi, matriks bileşenleri yıkılması, hücreler arası bağlantıların zayıflamasıyla ve bağ dokusu birikimiyle fibrozis oluşabilmektedir. Bazı alanlarda kollajen tek bir hücrenin etrafında birikmesi periselluler veya "chicken-wire" fibrozis olarak isimlendirilir. Bu chicken wire görüntüsü alkolik steatohepatitte de sıklıkla görülmektedir. Dolayısıyla bu görüntü alkolik ve alkolik olmayan steatohepatitin portal fibrozis oluşumunda gözlenen diğer kronik karaciğer hastalıklarından ayırt edilmesini sağlamaktadır. Fibrozisinde takiben bağ dokusunun artışıyla birlikte, hepatositlerin kümeler içine alınmasıyla nedbe denilen yapılar ortaya çıkarak siroz gelişebilmektedir.



Şekil 1.6. Fibrozis ve siroz görüntüsü (<http://www.wisegeek.com>)

#### 1.1.1. NAFLD'nin Risk Faktörleri

NAFLD'ye sebep olan faktörler alkol alımına bağlı olmayan nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Genel olarak NAFLD;



- ❖ Viral hepatit
- ❖ Obezite
- ❖ İlaçlar (Steroidler, antiviral ilaçlar, tetrasiklin, amiodaron, perheksilin)
- ❖ Tip 2 diyabet
- ❖ İnsülin direnci
- ❖ Aşırı bakteri çoğalımı (*Bacillus cereus*)
- ❖ Çeşitli hastalıklar (Wilson hastalığı, galaktozemi, kistik fibrozis) sonucu meydana gelmektedir (Cortez-Pinto ve Camilo 2004, Federico ve ark 2006).

Kadınlarda NAFLD'nin görülme olasılığı daha yüksektir. Bunun yanı sıra ileri yaş ile birlikte NAFLD'ye yakalanma olasılığı daha da artmaktadır.

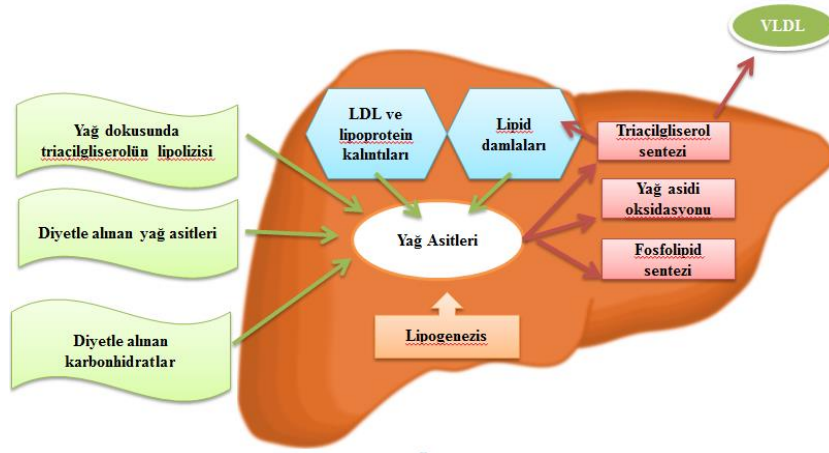
Obezite ve diyabet NASH ile oldukça yakından ilişkili bir durumdur. Obez kişilerin yaklaşık % 75'inden fazlasında karaciğer yağlanması görülürken, % 24'ünde NASH ve % 3-11'inde de siroz gelişebilmektedir. NASH'lı hastaların yaklaşık %30'unda diabetes melitus gözlemlenmektedir. Dolayısıyla diyabetik kişilerde NASH riski 2-6 kat artmaktadır (Chitturi ve Farrell 2001, McCullough 2002, Clark ve ark 2002, Ruhl ve Everhart 2003).

Trigliserit içeriğindeki yüksekliğin de NASH gelişiminde etkin olduğu ve hiperglisemi tedavisinin karaciğer testlerinde iyileşmelere sebep olduğu görülmüştür (Assy ve ark 2000, Brunt 2004). Yüksek doz kortikosteroid kullanımının da NASH oluşumunda etkilidir. Dolayısıyla NAFLD birçok değişik klinik durum ve/veya hastalıklarla ilişkili olabilir.

Hastalıkların çoğunda olduğu gibi yağlı karaciğer hastalığında da normal risk faktörleri yüksek olanlar vardır. Bunlara örnek olarak obezite, tip 2 diyabet, hiperglisemi, metabolik sendromu sayabiliriz. NAFLD çoğunlukla toplum genelinde ana risk faktörleri dediğimiz bu faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

### **1.1.2. Karaciğer Yağ Asitleri Kaynağı**

Yağ asitleri karaciğere farklı yollarla giriş yapmaktadır. Şekil 1.7'de hepatosit içerisinde yağ asitlerinin geçişi ve daha sonraki aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Karaciğere yağ asitlerinin alınışı

Buna göre; normal bir karaciğerde hepatositlerde bulunan yağın yaklaşık % 60'ı adipoz dokudan triaçilgliserol lipolizle sağlanmaktadır. Karaciğerdeki yağ asitleri havuzunun % 5'ten daha azını de novo lipogenezis oluşturmaktadır. Diyetle alınan yağ asitleri bağırsaklarda emilerek, şilomikronlar aracılığıyla dolaşıma katılarak hepatosit içerisine taşınmaktadır. Hepatositlere alınan yağ asitlerinin oksidasyonu mitokondriyal matriks, peroksizomlar ve AGER'de meydana gelir. Yağ asidi ve triaçilgliserol sentezi ise sitozolde meydana gelmektedir. Glukoz ve insülin seviyeleri düşürse yağ dokudan triaçilgliseroller yağ asitlerine hidrolize olur ve plazma yoluyla karaciğere gönderilir. Yağ asitleri hepatositlerce alındığında, beta oksidasyonuna uğrar ve ekstrahepatik dokular tarafından enerji olarak kullanılmak üzere keton cisimciklere dönüştürülür. Yağ asitleri triaçilgliserollere dönüştürülerek VLDL oluşturmak üzere kolesterol esterleriyle birleştirilir. Dolayısıyla karaciğerdeki serbest yağ asitleri (SYA) ya fosfolipid, trigliserit, kolesterol esterleri sentezinde kullanılır ya da mitokondriyal, peroksizomal veya mikrozomal oksidasyonlarda kullanılır. Hepatositlerden sentezlenen trigliserit ve kolesterol esterleri, VLDL molekülü halinde dolaşıma verilir. Karaciğerde, trigliserit salınımı VLDL'nin şekillenmesiyle gerçekleşir. VLDL, hidrofilik fosfolipidler ve apolipoprotein B (ApoB) 100 ile kaplı TG ve kolesterol esterlerini içeren hidrofobik lipidleri içermektedir. VLDL'nin oluşum süreci, ApoB 100'ün translyasyon ve transkripsiyonu sırasında AGER'de başlamaktadır. ApoB 100'e lipid transferi, ER deki mikrozomal TG transfer proteini ile gerçekleşir (Wetterau ve ark 1992). Olgunlaşmadan önce VLDL, TG, ApoB 100 ve ApoE içermektedir. ApoB-100 yani öncü VLDL, olgunlaşma için golgiye gönderilir ve daha sonrada ekzositozla karaciğerden salınır.

Olgun VLDL şekillenmesinde VLDL partikülü, kolestrol esterleri ve HDL katabolizmasından sağlanan diğer A, C-II, C-III, E apolipoproteinler ile zenginleştirilir. Salınımın ardından, lipoprotein lipazın aktivitesi ile yağ asitleri VLDL'den salınır. Eğer bu olaylar esnasında herhangi bir anormallik (lipid alınımının artması, de novo lipogenezin artması, lipoprotein sentezinin ve sekresyonunun bozulması, yağ asidi oksidasyonunun azalması) oluşursa, yani yağ alımı üretimi, oksidasyonu ve kana verilmesi arasındaki denge bozulacağından, karaciğerde yağ birikimi başlar. (Chitturi ve ark 2002). Ayrıca, uzun süre SYA'lara maruz kalmak ER stresini ve oksidatif stresi tetikler ve ApoB-100'ün bozunmasına yol açar. VLDL salınımını azaltır ve yağlanmanın ilerlemesine sebep olur.

#### **1.4.4. NAFLD'nin Patogenezi**

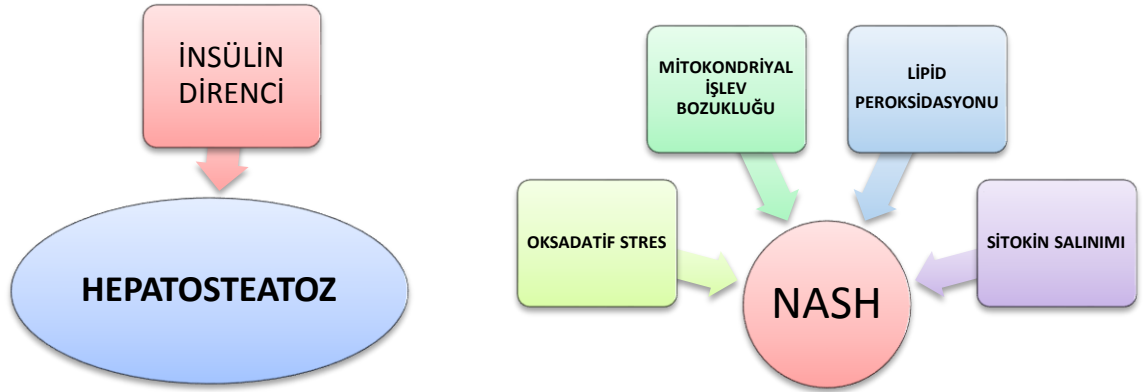
NAFLD'nin patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Bazı vakalarda sadece steatoz, bazılarında steatohepatit ve fibroz görülmemesinin nedenleri anlaşılmamakla beraber, bu farklılıkların vücut yağ oranları, antioksidan savunma sistemi farklılıkları ve genetik yatkınlıkla ilişkisi olduğunu düşündürmektedir.

Steatozla başlayıp NASH, fibrozis ve siroza kadar ilerleyebilen NAFLD, genel olarak otoimmün hastalıklar, bazı ilaçlar, viral enfeksiyonlar, obezite gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat NAFLD'nin en büyük risk faktörleri obezite, metabolik sendrom, hiperglisemi ve tip 2 diabetes mellitustur (Cortez- Pinto ve Camilo 2004, Federico ve ark 2006).

Genellikle ana risk faktörlerine bağlı olarak meydana gelen NAFLD'nin çoklu vuruş hipotezi (çift vuruş hipotezi) olarak adlandırılan hipoteze dayanmaktadır. (Day ve James 1998).

##### **1.4.4.1. Çift Vuruş Hipotezi**

Çift vuruş hipotezinde, birinci vuruş genellikle insülin direncine bağlı meydana gelen hepatosteatozu, ikinci vuruş ise oksidatif stres, mitokondriyal işlev bozukluğu, lipid peroksidasyonu ve sitokin salınımına bağlı gelişen NASH'ı içermektedir (Day ve James 1998).



Şekil 1.8. Çift vuruş hipotezi

#### 1.4.4.1.1. Birinci Vuruş

Birinci vuruş sonucunda, çoğunlukla neden kaynaklanan steatoz meydana gelmektedir (Day ve James 1998). Steatoz, organın ikinci vuruşa duyarlılığını arttırmaktadır.

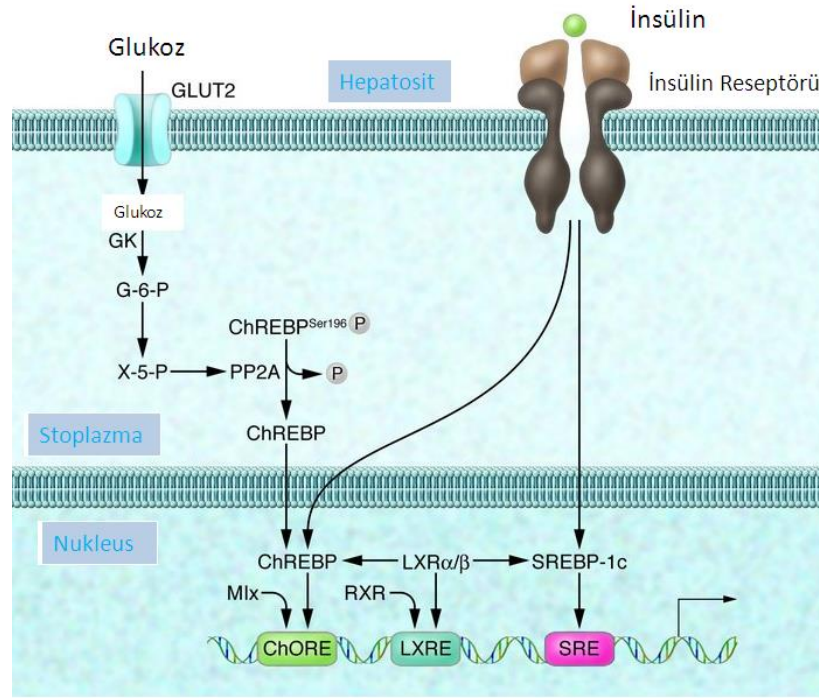
##### 1.4.4.1.1.1. İnsülin direnci

İnsülin, yağ dokuda lipolizi baskılayarak ve lipoproteinlerden dokuya serbest yağ asidi transferini sağlayarak anabolik etki gösterir (Fulop ve ark 2006). Plazmadaki serbest yağ asitleri temel olarak, c-AMP bağımlı hormon duyarlı lipaz etkisi ile yağ dokudan salınır. Ayrıca yağ asitleri, lipoprotein lipaz etkisiyle dokudaki trigliseritlerden zengin lipoproteinlerin lipolizi ile açığa çıkar. İnsülin hem antilipoliz hem de lipoprotein lipazın uyarılmasında etkindir. İnsülin etkisinde en duyarlı yolak, yağ dokuda lipolizin engellenmesidir. (Zimmet ve ark 2005). Yine insülin, yüksek glukoz düzeyinde lipogenezi uyarır. İnsülin direncinde, dolaşımdaki serbest yağ asidi düzeyi artar ve periferde yağ asidini azaltır (Fulop ve ark 2006). İnsülinin serbest yağ asitleri üzerindeki baskılayıcı etkisi, obez, insülin dirençli kişilerde ve tip 2 diyabette bozulmuştur (Hawkins ve Rosetti 2005). Serbest yağ asitlerinin artması, insülinin etkisini engelleyerek lipolize katkıda bulunur (Zimmet ve ark 2005).

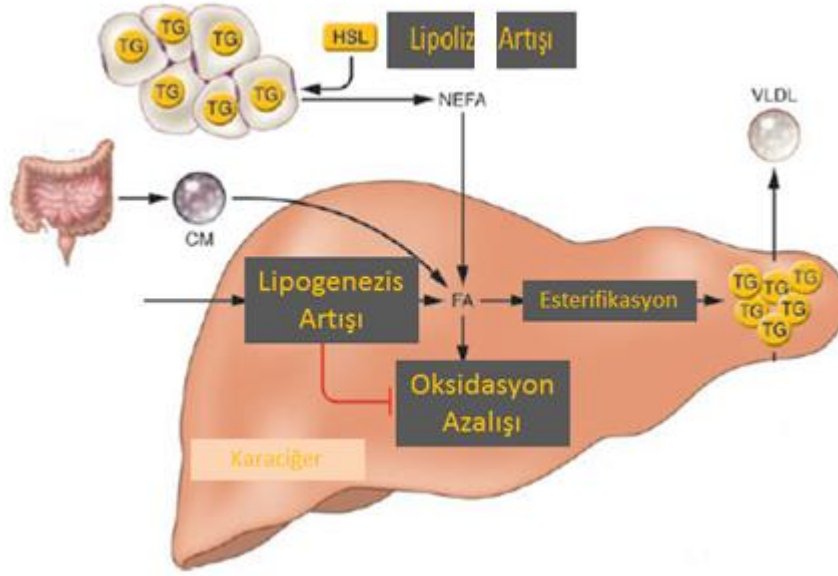
Yemeklerden sonra, glukoz miktarının artmasıyla birlikte insülin salınımı başlar. Hücre yüzeylerinde, insülinin bağlanabilme özelliğine sahip olduğu insülin reseptörleri bulunmaktadır.

İnsülin bu reseptörlere bağlandığında, glukoz taşıyıcılar sayesinde glukozun hücre içine taşınmasını sağlar. Eğer insülin reseptörlerinde bir hasar meydana gelirse, taşıyıcılar uyarılamaz ve insülin hücre içine alınamaz. Bu duruma insülin direnci denir. İnsülin direnci sonucunda, kanda glukoz konsantrasyonunun artmasına sebep olur. Böylece insülin ve glukoz hepatositler içerisine girerek, ChREBP ve SREBP gen aktivasyonlarıyla, lipogenezise yani yağ asidi oluşumuna sebep olur (Bjorntorp 1997). Şekil 1.9’da hepatositlere insülin ve glukoz alınımları gösterilmiştir. ChREBP normalde sitoplazmada fosforlanmış haldedir, fakat glukoz alınımıyla defosforile olarak lipogenezisi uyarır. Lipogenezis de karaciğerde yağ asidi artışına sebep olur.

Artan lipogenezis artışı, oksidasyonu engeller ve insülin direnciyle karaciğerde yağ asitleri birikir. Karaciğere yağ asitlerinin alımı ve alımdan sonra gerçekleşen olaylar Şekil 1.10’da gösterilmiştir. Diyetle alınan yağlar, şilomikronlara aracılığıyla karaciğere taşınır ve yine yağ dokudaki TG’lerde NEFA yoluyla karaciğere geçer. Karaciğere gelen bu yağ asitleri oksidasyona uğramaz, esterleşip TG haline geldikten sonra VLDL olarak alınmazsa, karaciğerde yağ birikimi oluşur. Böylece karaciğerde histolojik olarak makro ve mikro vezikuler yağlanmalar görülür.



Şekil 1.9. Hepatositlere insülin ve glukoz alınımları (Shiota ve Magnusa 2008).



Şekil 1.10 Karaciğere yağ asidi alımı ve yıkımı (Aldons ve Pajukanta 2008)

#### 1.4.4.1.2. İkinci Vuruş

Bu basamak, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres ve endotoksin sitokin aracılı hücre hasarı olarak iki kısımdan oluşur. Reaktif oksijen türleri (ROS) nin oluşumuna sebep olan yağ asidi oksidasyonları mitokondriyonlar, peroksisomlar ve mikrozoamlar olmak üzere üç yapıda gerçekleşmektedir.

#### 1.4.4.1.3. Lipid Peroksidasyonu ve Oksidatif Stres

Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına rağmen, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri (ROS) lipit, DNA ve koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verebilir. Bu zararın yaşanmayı teşvik ettiği ve kalp damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde baskılanma sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Diplock 1998). Hücre işlevine verilen bu hasardan dolayı, ROS oluşumunun ve aktivitesinin kontrol altına alınması gerekmektedir. Vücudumuzu oluşturan her hücrede radikallere karşı, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSGR) enzimlerinden oluşan savunma mekanizması ile enzimatik olmayan maddelerden oluşan yardımcı savunma mekanizmaları vardır (Dergel 1992). Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilmektedir (Elliot 1999).

Vücuttaki serbest oksijen radikalleri ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Aruoma 1998).

Oksidatif stres, steatoz durumunda hepatik inflamasyon, hepatositlerde balonlaşma, nekroz ve fibrozise yol açarak hepatositlerde hasar meydana getirmektedir (de la Maza ve ark 2000).

Hepatositlerde serbest yağ asitlerinin artışıyla birlikte, beta oksidasyonunda rol alan mikrozomal bir enzim olan sitokrom p 450 (CYP2e1)'de artış meydana gelmektedir. CYP2e1'de gerçekleşen bu artış mikrozomal  $\beta$  oksidasyon oluşumuna neden olarak reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi gerçekleştirmektedir. Artmış yağ asidi miktarına göre de oluşan ROS'larda bir yükseliş meydana gelir (Pessayre ve ark 2001).

Yağ asitlerinin temel yıkım yeri mitokondriyonlardır, fakat farklı tipte yağ asitleri bulunduğu için mitokondriyonlar yağ asitlerinin yakımı için yardımcı bir birime gereksinim duymaktadırlar. Hepatositlerde bulunan en uzun SYA'ları, peroksizomlarda oksidasyona uğrayarak reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit açığa çıkar. Peroksizomlar, yağ asitlerinin farklı uzunluklardaki kuyruklarını şekillendirerek bunları mitokondriyonların yıkımı için uygun hale getirirler. Ardından bunları mitokondriyonlara gönderirler.

Peroksizomlar yağ asitlerinin (20-26 karbonlu veya dallı zincirli ) yıkımı sırasında metabolik oksijeni kullanarak ve yağ asitlerinden de hidrojeni alarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) sentezlerler. Normal karaciğerde oluşan hidrojen peroksidin zararlı etkisi, katalaz enzimi tarafından ortadan kaldırılmaktadır, fakat serbest yağ asidi artışına bağlı olarak oksidasyonun artışı sonucu bu denge sağlanamaz ve ortamda bol miktarda  $H_2O_2$  oluşur.  $H_2O_2$ , ortamda bulunan demirle birleştiğinde ROS meydana gelir (Bacon ve ark 1993). ROS artışı, glutatyon ve vitamin E gibi doğal antioksidanların tüketilmesine ve oksidatif stresin oluşumuna sebep olur.

Yağ asidi oksidasyonunun gerçekleştiği bir diğer yer olan mitokondriyona bakıldığında; mitokondriyon hem ROS üretimi için önemli bir kaynak hem de lipid peroksidasyonu sonucu oluşturulan ROS'tan zarar görmektedir. Bunun dışında lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ROS, mitokondriyal DNA hasarına yol açarak ardından hücrenin işlevinin bozulmasına ve hücre ölümüne sebep olur. Ayrıca ROS solunum zincirinde, elektron transfer zincirinin bozulmasına sebep olur.

Bu durum elektron sızmasıyla reaktif oksidasyon üretimi daha da arttırır. Bu arada zincirde de bozulma meydana geldiği için ATP de bir düşüş meydana gelir. Tüm bu olaylar sonucunda mitokondriyonların işlevsel özelliğinin dışında, yapısında da bozulmalar meydana gelir. Örn; megamitokonri kristalin lezyon (Pessayre ve ark 2001).

#### **1.4.4.1.4. Sitokin salınımı**

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal ve malonilaldehit, IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B yi aktive ederek ICAM-1 ve İNOS'un transkripsiyonunu gerçekleştirir. Bu aktivasyon, karaciğerde farklı hücreler tarafından sitokin üretimini düzenler (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , osteopontin, leptin). En önemli proinflamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$  serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonu sonucu adipoz doku, hepatositler ve kupffer hücrelerinden salınır (Kern ve ark 1995). TNF- $\alpha$  diğer duyarlı kinazalardan I kappa B kinase (IKK- $\beta$ ) aktivasyonuna sebep olur. Bu durum, proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa beta (NF-  $\kappa$  $\beta$ ) aktivasyonuna, daha fazla TNF- $\alpha$  salınımına ve daha fazla insülin direncine sebep olur (Valverde ve ark 1998). Bağırsak duvarında geçirgenliğin artmasıyla birlikte endotoksinler makrofajlar ve kupffer hücrelerinden sitokin üretimini uyarır (Wigg ve ark 2001). Sitokinler inflamasyona yol açmaları yanında, HSC'leri uyararak fibrozise neden olurlar. Ayrıca nötrofil kemotaksisinin uyarılmasıyla, hücre infiltrasyonuna neden olurlar.

#### **1.4.5. NAFLD Modelleri**

Genetik ve çevresel olarak fare ve sıçanlarda değişik NAFLD modelleri oluşturulabilmektedir. Genetik olarak oluşturulan modellerden ob/ob fareler, db/db fareler, yellow obese agouti (AY) fareler, CD36  $-/-$  fareler, PEPCK-NSREBP-1a fareler, aP<sup>3</sup>-NSREBP-1c fareler ve aP2-Diphtheria toksin farelerde amaç, lipid sentezini arttırarak karaciğer yağlanması oluşturmak iken, PPAR  $\alpha$   $-/-$  fareler ve Asetil Coa oksidaz  $-/-$  farelerde ise; amaç lipid katabolizmasını azaltarak steatoz meydana getirmektir (Koteish ve Diehl 2001, Brix ve ark 2002, Chen ve ark 1996, Iizuka ve ark 2004)

Çevresel faktörler ile genetiği değiştirilmeden oluşturulan modellerde lipid sentezini arttırıcı olanlar; yüksek yağ içerikli diyet, yüksek sukroz, yüksek fruktoz içerikli diyet, arjininden eksik diyet, lipid yıkımını azaltıcı olan metiyonin/kolin içermeyen (MCD) diyet, steroidler, östrojen, tamoksifen ile oluşturulan yağlanmalardır( Weltman ve ark 1996, Gao ve ark 2004, Klunski ve ark 2004).



ob/ob farelerdeki mutasyon, 6. kromozomdaki leptin genindeki mutasyondan kaynaklanan leptin eksikliğine bağlıdır (Friedman ve ark 1991, Zhang ve ark 1994). ob/ob fareler standart besin ile beslendiklerinde, aşırı yem tüketmeye başlarlar. Sonuçta yağ doku kütlelerinin artmasıyla birlikte TNF  $\alpha$  ekspresyonunu artmaktadır. Artan TNF  $\alpha$  uzun zincirli yağ asitlerini salan yağ doku lipolizisini uyarır. Artan yağ asitleri karaciğere gönderilerek obeziteye bağlı yağlanma oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu fareler obezite ile ilişkili yağlanma için uygun bir model olmaktadır. db/db farelerde 4. kromozomda diyabet geninde meydana gelen mutasyon sonucu, otozomal resesif diyabet görülmektedir (Hummel ve ark 1966). ob/ob farelerde olduğu gibi ikinci vuruştan sonra steatohepatite geçebilir. db geni, leptin reseptörünü kodladığından bu farelerde leptin reseptör eksikliğine bağlı yağlanma gözlenmektedir. Yellow obese agouti farelerde, melanokortin tarafından hipotalamik iştah bastırma oluşturmadığından, steatoz gelişmektedir. Cd36<sup>-/-</sup> farelerde, transmembran proteini olan Cd36 kas ve yağ dokuyu içeren periferik dokularda eksprese edilen yağ asidi taşıyıcısının mutasyona uğramış şekli bulunmaktadır. Cd36 mutant farelerde, yağ asidi ve trigliseritlerde artış ve karaciğer insülin direnci meydana gelmektedir (Coburn ve ark 2000, Goudriaan ve ark 2003).

MCD diyet; kolin hücre membran geçirgenliğinde, transmembran sinyalinde, fosfatidilkolin sentezinde, nörotransmisyonunda ve metil metabolismesinde rol oynayan temel besindir. Diyette kolin yokluğu, steatozisi tetiklemekte ve plazma VLDL de seviyelerini azaltmaktadır (Zeisel ve Blusztain 1994). Hem metiyonin hem de kolin yokluğuyla beslenen farelerde, inflamasyon gelişmekte ve basit steatozise ek olarak karaciğerde fibrozis meydana gelmektedir (Weltman ve ark 1996). MCD diyet ROS üretimini tetiklemekte, mitDNA hasarına ve apoptotik hücre ölümüne sebep olmaktadır (Gao ve ark 2004). Yüksek yağ içerikli diyet ile beslenen sıçanlarda yağ asidi, adipozite ve insülin direncinin artmasıyla birlikte, yağlanma ve NASH meydana gelmektedir. HFD diyet insanlarda da yağlanma oluşumunda en önemli etkenlerden birisidir ve kimyasal kullanımı olmadığı için araştırmacı açısından da bir riski bulunmamaktadır.

NAFLD oluşturulmasında, hem mutant fareler, hem de diyet birlikte de uygulanabilir. Örn; Abcb11 mutant fareler ile MCD diyet (Sundaram ve ark 2005), Apolipoproteine mutant fareler ve HFD diyet (Tous ve ark 2005), PPAR $\alpha$  mutant fareler ile MCD diyet (Kashireddy ve Rao 2004) birlikte kullanıldığında da steatoz meydana gelmektedir.

Ayrıca karaciğer yağlanması, karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>), merkürük klorid, etanol, paraquat gibi çeşitli kimyasallar kullanılarak oluşturulabilmektedir (Tsuchiya ve ark 1996, Dai ve ark 2014, Huang ve ark 2014, Joshi ve ark 2014).

#### 1.4.6. Antioksidanlar

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve tespit etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” denmektedir (Elliot 1999). Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki büyük gruba ayrılır. Bu antioksidanların bazıları metabolizmada sentezlenmekte olan çeşitli enzimler ve enzim kofaktörler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), mitokondriyal sitokrom oksidaz ve glutatyon-s-transferaz (GST)’dir. Enzimatik olmayan antioksidanların kaynağı ise diyetlerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar; mineraller (örn; çinko, selenyum), vitaminler (Örn; A,C, E, K), organosülfür bileşikleri (örn; indol, aliyum), karetonoidler (örn; β karoten, likopen), düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar ve polifenollerden oluşmaktadır (Örn; flavanoidler, fenolik asitler). Polifenoller flavanoidler ve fenolik asitler olmak üzere 2 gruba ayrılırlar.

Çalışmamızda kullandığımız enzimatik olmayan kateşin ve gallik asit antioksidanlardır. Bunlardan kateşin flavanoidler, gallik asit ise fenolik asitler grubuna aittir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Antiokadidanların sınıflandırması

Antioksidanlar	
Enzimatik Endojen Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
SOD	Mineraller (Çinko , Selenyum)
CAT	Vitaminler (A, C, E, K)
GSH-Px	Organosülfür Bileşikleri (İndol, Aliyum)
GST	Karetenoidler (β karoten, likopen)
	Düşük Moleküler ağırlıklı antioksidanlar
	Polifenoller
	Flavanoidler (hesperidin, kateşin)
	Fenolik Asitler (gallik asit)

#### **1.4.6.1. Flavanoidler**

Sarı renklerinden dolayı Latince sarı anlamına gelen “flavus” sözcüğünden türetilerek “flavanoid” adını almışlardır. 15 karbon atomlu, 2 fenil benzopiron (difenilpropan) yapısına sahiptirler. Bu yapıları nedeniyle fenolik bileşik olarak kabul edilirler.

Düşük moleküler ağırlığa sahip biyoaktif polifenoller olan flavanoidler, hücrelerde hayati öneme sahiptirler (Hollman ve Katan 1999, Heim ve ark 2002, Fernandez ve ark 2006). Flavanoidler, flavan çekirdek ve C6-C8- C6 karbon iskeletiyle karakterize edilen ikincil metabolitlerdir (Peterson ve Dwyer 1998, Heim ve ark 2002, Tsuchiya 2010). Flavanoidlerin temel yapısı, heterosiklik püran halkası boyunca bağlanmış iki benzen halkası içeren 2 fenil- benzo gama püran çekirdektir.

#### **1.4.6.1.2. Kateşin**

Flavonoidler meyveler, sebzeler, tahıllar, çiçekler ve çayda bulunan polifenolik bileşiklerdir (Middleton 1998) ve çeşitli biyolojik etkilere sahiptirler (Hollmann ve Katan 1999). Flavonoidler antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, sitotoksik, antineoplastik, mutajenik, antiinflammatuar ve antioksidan aktivitelere sahiptirler (Formica ve Regelson 1995). Flavonoidlerin antioksidan etkinlikleri, lipid peroksidasyonunu durdurmalarıyla açıklanmaktadır. Flavonoidlerin in vivo antikanserojenliği ile ilgili kesin bir kanıt bulunmamasına rağmen, çalışmalarda flavonoid bileşiklerin çeşitli denek hayvanlarında tümör gelişimini durdurduğu tespit edilmiştir (Robards ve Amtolovich 1997). Polifenol türevli maddeler serbest radikaller ve fenoksi radikallerin oluşturduğu oksidatif strese karşı kritik önem taşımaktadır (Kagan ve Tyurina 1998). Çalışmalarda flavonoidlerin mutajenlere (Bear ve Teel 2000) ve lipid peroksidasyonuna karşı etkileri olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark 1990). Flavonidler ROS hasarını engelleyebilirler. Serbest radikallere karşı doğrudan savunucu olarak kullanılabilirler (Hanasaki ve ark 1994). Ayrıca, flavonoidler yüksek reaktif oksijen türevli peroksi nitrit radikallere karşı antioksidan savunma gösterebilmektedirler (Bors ve ark 1990). Kateşinler; flavonoidlerden flavanol sınıfına ait ve çeşitli bitkilerde yüksek konsantrasyonda bulunan fitokimyasal bileşiklerdir ve yüksek antioksidan sistemlerinden dolayı oldukça önemlidir (Rice- Evans ve ark 1995, Vinson ve ark 1995).

Son zamanlarda bitkilerin antioksidan özellikleri üzerine yapılan çalışmaların artış göstermesiyle birlikte, yeşil çayın içeriğinde antioksidan bulunmasından dolayı kateşinin önemi de oldukça artmıştır. Birçok çalışmada polifenol grubuna ait olan kateşinin yeşil çayda yüksek oranda bulunduğu, antikanserojenik, antimutajenik, antioksidan ve hipolipidemik etkilere sahip olduğu üzerine çalışmalar mevcuttur (Kada ve ark 1985, Maramatsu ve ark 1986, Wang ve ark 1988, Sarafani ve ark 1996, Lotito ve Fraga 1998). Antioksidan özellikleri de büyük oranda hidroksil gruplarının varlığı ve pozisyonuna bağlıdır (Rice- Evans ve ark 1996). Kateşinlerin antioksidan enzimleri arttırdığı (Zhao ve ark 1989) ve süperoksit, hidroksi, peroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırdığı bilinmektedir (Rice-Evans ve ark 1996). Kateşinler yüksek oranda yeşil çayda bulunmaktadır (%27 W/w). Yeşil çayda bulunan ana kateşinler (monomerik flavanoidler) (-)- epikateşin, (-)- epigallokateşin (EGCG) ve (-)- epikateşin 3 gallattır (Feng 2006).

Yukarıda da belirtildiği gibi kateşinler kanseri baskılama, antiviral işlev, antioksidan etkinlik, anti bakteriyel aktivite gibi özelliklere sahipler (Toda ve ark 1992, Nakayama ve ark 1993, Hanasaki ve ark 1994, Okabe ve ark 1997, Fujiki ve ark 1998). Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) görülen insanlar üzerinde yapılan bir araştırmaya göre; yüksek kateşin içerikli yeşil çayın karaciğer işlevini ve yağ infiltrasyonunu iyileştirdiği belirtilmiştir (Sakata ve ark 2013). Kateşinin lipid peroksidasyonu oluşumuna bağlı olarak artan MDA düzeyini önemli ölçüde engellediği görülmüştür (Halder ve Bhaduri 1998, Chan ve ark 2002, Goldberg ve ark 2003). Kateşinin karaciğer yıldız hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada, yıldız hücrenin işlevini azaltabileceği ileri sürülmüştür (Bragança ve ark 2013). Obez sıçanlarda, karaciğer lezyon gelişiminde ECCG'in baskılayıcı etkisi olduğu, bu yüzden de ECCG'in alkolik olmayan stetaohepatit (NASH) ile ilişkili fibrozis ve tümorogenezisi önleyebileceği düşünülmüştür (Kochi ve ark 2014). Deneysel olarak (safra kanalı ligasyonu) oluşturulan karaciğer yaralanmasında yeşil çay kateşininin antioksidan etkisi araştırılmış ve oral olarak 50 mg/kg/gün şeklinde verilen kateşin sonucunda 17. günde kateşinin stellat hücre aktivasyonundaki transkripsiyon faktörlerinin işlevini kontrol ederek ve oksidatif stresi baskılayarak, karaciğerde fibrozis oluşumunu azalttığı görülmüştür (Kobayashi ve ark 2010). Sıçanlarda kateşin alımının, antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon seviyeleri üzerine etkisinin araştırıldığı (standart diyetle % 1 oranında kateşin ilavesiyle 3 hafta süreyle gerçekleştirilen) çalışmada, diyetle kateşin alımının eritrosit düzeylerinin düşürdüğü görülmüş ve bunun da antioksidan enzim

aktivitesini kateşinin indüklemesiyle oluştuğu şeklinde yorumlanmıştır (Koçyiğit ve ark 2000). Bu çalışmada; kateşinin oksidatif stres duyarlı transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF-KB)'nin baskılaması ve lipid peroksil radikallerini ortadan kaldırarak lipid peroksidasyonunu önlediği görülmüştür (Parvez ve ark 2006). Başka bir çalışmada, yüksek yağ içerikli diyet uygulanan sıçanlara 100 mg/kg /gün alacak şekilde kateşin verilerek 30 ve 45 gün kateşinin etkisine bakıldığında, kateşinin PPAR yolağını uyararak obeziteyi önlediği ve trigliseriti düşürdüğü gösterilmiştir (Yan ve ark 2013). Sıçanlarda CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan oksidatif stres çalışmasında, 20 gün boyunca kateşin ve CCl<sub>4</sub> birlikte verilmiş ve kontrole yakın sonuçlar elde edilmiştir (Kurt ve ark 2004). Yüksek sukroz, yüksek yağ içeren diyet ile beslenen sıçanlara 12 hafta boyunca hem diyet, hem 110 mg/kg şeklinde kateşin verildiğinde kateşinin oksidatif stresi azaltıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür (Mehra ve ark 2013).

Kateşinin toksik etkisi araştırılmış ve 90 gün boyunca kateşinin 724 mg/kg dozunda deneklere uygulanmasında, hiçbir yapısal ve hematolojik toksisite gözlenmemiştir (Takami ve ark 2008).

#### **1.4.6.1.3. Gallik asit**

3, 4, 5 trihidrobenzoikasit olarak bilinen gallik asit, meyvelerde, sebzelerde, çaylarda ve meyve sularında bulunmaktadır (Kim ve ark 2006, Hogan ve ark 2009). Gallik asit antioksidatif, antikarsinojenik, antiallerjik, antidiyabetik ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir (Schlesier ve ark 2002, Jo ve ark 2006, Jang ve ark 2008). Gallik asit 'Food and Drug Administration' tarafından güvenli olarak tanımlanarak, yiyeceklerde antioksidan olarak kullanılmaktadır.

Gallik asit, hidroksi benzoik asit grubuna ait bir fenolik asittir. Güçlü antioksidan aktivite göstermektedir (Kim ve ark 2006). Diyetle indüklenmiş obez farelerde, gallik asidin 10 mg/kg /gün şeklinde 2 hafta uygulanmasıyla trigliserit konsantrasyonunda ve kan glukoz konsantrasyonunda önemli iyileşmeler oluşturduğu görülmüştür (Bak ve ark 2013). Gallik asidin 5, 10 ve 20 mg/kg/gün şeklinde uygulandığı 45 günlük çalışmada, gallik asidin antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve en iyi sonucunda 20 mg/kg/gün de elde edildiği belirtilmiştir (Ramkumar ve ark 2014).

CCl<sub>4</sub> ile karaciğer fibrozisi oluşturulan farelerde, gallik asidin etkisi incelendiğinde, 2 haftada fibrozis oluşturulup, bunu takiben 6 hafta 5mg/kg ve 15mg/kg/g gallik asidin etkisi incelenmiş ve fibroziste azalma olduğu gözlemlenmiştir (Wang ve ark 2014). Yüksek yağ içerikli diyet ile indüklenmiş dislipidemi, hepatosteatoz ve oksidatif stres üzerine yapılan çalışmada, gallik asit 50 mg/kg ve 100 mg/kg doz şeklinde 10 hafta boyunca uygulanmış ve oksidatif streste meydana gelen azalmayla birlikte tüm bu yan etkenler üzerinde yararlı olabileceği görüşüne varılmıştır (Hsu ve Yen 2007). Sıçanlara verilecek gallik asit miktarının belirlenmesinde, yapılan subkronik toksisite çalışması da göz önünde bulundurulmuştur. Sıçanlarla yapılan çalışmada gallik asit seviyesi, erkeklerde 119 mg/kg/gün dişilerde 128 mg/kg/gün şeklinde bulunmuştur (Niho ve ark 2001).Rodentlerde yapılan toksisite çalışmalarında ise, 120 mg:/kg/gün herhangi bir yan etki gözlemlenmemiştir. Bu da yaklaşık 70 kg ağırlığındaki bir kişide 2.9 grama eşdeğerdir. Çalışmamızda, yüksek yağ içerikli diyetle sıçanlarda oluşturulan karaciğer yağlanmasına antioksidan özelliği olan gallik asit ve kateşinin karşılaştırılmalı etkisi incelenmiştir.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmamızda Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen ve Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunca onaylanan (64583401/2014/058 sayılı) ağırlıkları 160 +/- 30 gram (5 haftalık) Wistar cinsi albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney süresince sıçanlara 12; 12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (21±1 °C) ve nemi (% 45-65) otomatik olarak ayarlanmış odalarda bakıldı. Deney başlangıcından itibaren bir hafta süreyle hayvanların ortam koşullarına uyumu sağlandı. Uyum süresi boyunca her kafese 4'er sıçan yerleştirildi. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslenerek, içme suyu olarak da çeşme suyu verildi.

### 2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Uyum sürecinin ardından, sıçanlar rastgele 10 (n=8) gruba ayrıldı. Çalışmamızda toplam 80 sıçan kullanıldı. Bu gruplardan 1. ve 2. grup pilot çalışma grubunu oluşturdu. Buna göre yüksek yağ içerikli diyet ile oluşturulan karaciğer yağlanması hangi aşamada olduğunu gözlemleyebildik. 9. grup 10 hafta boyunca standart diyetle beslenirken, 10. grup 10 hafta boyunca yüksek yağ içerikli diyet ile beslendi. 10. haftanın sonunda, karaciğer yağlanması oluşumunun ve yağlanmanın yapısal ve biyokimyasal olarak 9. ve 10. gruptaki sıçanlarda kontrolünün ardından, aşağıda belirtilen kateşin ve gallik asit belirlenen doz ve sürede verildi. Buna göre 3. gruba 10 mg/kg/gün kateşin, 4. gruba 50 mg/kg/gün kateşin, 5. gruba 100 mg/kg/gün kateşin, 6. gruba 10 mg/kg/gün gallik asit, 7. gruba 50 mg/kg/gün gallik asit, 8. gruba 100 mg/kg/gün gallik asit yüksek yağ içerikli diyetle ek olarak, 6 hafta boyunca gavaj yoluyla verildi. 1. gruba standart diyetle ek olarak serum fizyolojik ve karaciğer yağlanması oluşturulan 2. gruba yüksek yağ içerikli diyetle ek olarak serum fizyolojik, sırasıyla 6 hafta boyunca verilerek kontrol gurupları oluşturuldu. 8. haftanın sonunda 1. ve 2. gruptaki sıçanlar yüksek yağ içerikli diyet ile beslenen sıçanlarda deneysel yağlı karaciğer modelinin oluşumunu gözlemlenebilmesi için, karaciğer dokularına bakıldı. Diğer gruplarda (3-10) çalışmaya 6 hafta daha deneye devam edildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Çalışma grupları

Grup No	Grup Adı	Beslenme	Süre (hafta)	İşlem ve Verilme Şekli (Gavaj)	Süre (hafta)
<b>I. Grup</b>	<b>Kontrol (K)</b>	<b>Standart Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>Karaciğer dokusu çıkarıldı</b>	
<b>II. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması (KY)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>Karaciğer dokusu çıkarıldı</b>	
<b>III. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması+Kateşin (KY+KA)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+KA (10mg/kg/gün)</b>	<b>6 h</b>
<b>IV. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması+Kateşin (KY+KA)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+KA (50mg/kg/gün)</b>	<b>6 h</b>
<b>V. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması+Kateşin (KY+KA)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+KA (100mg/kg/gün)</b>	<b>6 h</b>
<b>VI. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması+Gallik Asit (KY+GA)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+GA (10mg/kg/gün)</b>	<b>6 h</b>
<b>VII. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması+Gallik Asit (KY+GA)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+GA (50mg/kg/gün)</b>	<b>6 h</b>
<b>VIII. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması+Gallik Asit (KY+GA)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+GA (100mg/kg/gün)</b>	<b>6 h</b>
<b>IX. Grup</b>	<b>Kontrol (K)</b>	<b>Standart Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>Standart diyet+Serum Fizyolojik</b>	<b>6 h</b>
<b>X. Grup</b>	<b>Karaciğer yağlanması (KY)</b>	<b>Yüksek Yağ İçerikli Diyet</b>	<b>10 h</b>	<b>KY+ Serum Fizyolojik</b>	<b>6 h</b>



### **2.3. Sıçan yemlerinin hazırlanması**

Sıçan yemleri Li ve arkadaşlarının deneysel karaciğer modelinde kullandıkları % 45 yağ, % 35 karbonhidrat ve % 20 protein içeren yüksek yağ içerikli diyet referans alınarak hazırlandı (Li ve ark 2014). Standart sıçan yemlerinin uygun şartlarda öğütülüp toz hale getirilmesinin ardından, % 45 oranında iç yağ ile karıştırılmasıyla günlük olarak elde edilen yüksek yağ içerikli diyet (HFD), pellet haline getirilerek, kafeslere yerleştirildi. Karaciğer yağlanması olmayan kontrol gruplarındaki sıçanlar da standart sıçan (SD) yemiyle beslendi.

Çalışma başlangıcından itibaren sonuna kadar tüm sıçanların vücut ağırlıkları günlük olarak ölçüldü. 1. ve 2. gruptaki sıçanlara 8. haftanın sonunda, diğer tüm gruplardaki sıçanlara ise 14. haftanın sonunda periton içi 100 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin anestezi karışımının verilmesiyle batin açılarak kalpten kan alındı ve karaciğer dokuları çıkarıldı.

### **2.4. Yapısal Değişliklerin İncelenmesi**

Karaciğer doku örnekleri ışık mikroskobu incelemesi için % 10'luk nötral formaldehit ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra rutin ışık mikroskobu doku takibi yöntemi uygulandı. Dokular parafin içinde bloklandı. Mikrotomla 5 µm'lik kesitler alınıp, karaciğerin genel histolojisini incelemek için dokular hematoxilen-eozin, bağ dokusunu incelemek için masson'un üçlü boyaması ve glukojen içeriğini belirlemek için PAS boyası ile boyandı.

#### **2.4.a. Hematoxilen- Eozin Boyama**

Lam üzerine alınan kesitler bir gece etüvde bekletildikten sonra, 1 saat ksilolde tutularak parafini uzaklaştırıldı. Ardından azalan alkol serilerinden (% 100, % 95, % 80, % 70) geçirilen dokular distile su ile 5 dakika yıkandı. Hematoxilen ile 5 dakika boyandıktan sonra 5 dakika yıkama işlemi yapıldı. Hematoxilen boyamasından sonra, dokular 5 dakika eozin ile boyandı. Dokular artan alkol serilerinden (% 70, % 80, % 95, % 100) geçirilerek 10 dakika ksilole alındı ve dokular entellan kullanılarak kapatıldı. Preparatlar Olympus marka B X 50 model ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı. Boyama işlemi aşağıdaki şekilde yapıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Hematoksilen – Eozin Boyama İşlemi

İŞLEM	SÜRE
Parafini giderme	Etüvde 1 gece
Ksilol	1 saat
Azalan derecede alkol serileri (%100, %95, %80, %70)	2'şer dk
Yıkama (Distile Su)	5 dk
Hematoksilen	5 dk
Yıkama (Akarsu+distile su)	1dk
Eozin	5dk
Artan derecede alkol serileri (%70, %80, %95, %100)	2'şer dk
Ksilol	10dk
Kapatma (entellan)	

#### 2.4.b. Masson Trikrom Boyama

Masson trikrom boyaması için Scy Tek Marka Masson Trikrom Boyama Kiti kullanıldı. Ksilol ile parafini giderilen lamlar, 2 kez 15'er dakika % 96'lık alkolden geçirilerek suyla yıkandı. Preparatlar 62-64 °C'de su banyosunda Bouin solüsyonunda 1 saat bekletildi. Ardından sarı renk gidene kadar akarsu altında yıkanan lamlar distile sudan geçirildi. Eşit hacimlerde karıştırılan hematoksilen A ve B solüsyonunda, 5 dakika inkübasyon yapıldı. 2 dakikalık yıkama işleminin ardından, % 0. 5'lik asit alkol solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra 1 dakika yıkama yapıldı. Trikrom boya ile 15 dakika inkübe edilen lamlar, distile suyla hızlıca yıkandı. % 0.5 lik asetik asit solüsyonunla 10 saniye muamele işleminin ardından, suyunu giderme işlemi için lamlar % 95'lik alkolde 5'er dakika iki kez bekletildi. Lamlar ksilolden geçirilerek entellanla kapatıldı. Preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi ve fotoğraflandı. Boyama işlemi aşağıdaki şekilde yapıldı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Masson trikrom boyama işlemi

İŞLEM	SÜRE
Parafini giderme	Etüvde 1 gece
Ksilol	1 saat
%96'lık Alkol	2 x 15 dk
Bouin sıvısı (56-64 °C)	1 saat
Yıkama (Akarsu+distile su)	5 dk
Hematoksilen A ve B karışımı	5 dk
Yıkama (Akarsu+distile su)	2 dk
% 0.5 Asit- Alkol solüsyonu	5 dk
Yıkama (Akarsu+distile su)	1 dk
Trikrom boyama	15 dk
Yıkama (Distile Su)	1 dk
% 0.5'lik Asetik asit	10sn
% 96'lık Alkol	2 x 15 dk
Ksilol	15dk
Kapatma (entellan)	

#### 2.4.c. PAS Boyaması

PAS boyaması için ksilol ile parafini uzaklaştırılan lamalar, 3'er dakika % 100 ve % 96'lık alkolden geçirilerek, distile suyla yıkandı. 10 dakika periyodik asit ile muamele edilen preparatlar, distile suyla yıkandı. 10 dakika Schiff leuco-fuksin solüsyonunda bekletildikten sonra, yıkama işlemi yapıldı. Harris hematoksilin ile 1 dk boyama işleminin ardından, yıkama yapıldı.

Ardından suyunu giderme işlemi için lamalar % 95'lik ve % 100'lük alkolde bekletildi. Lamalar ksilolden geçirilerek entellanla kapatıldı. Preparatlar ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi. Boyama işlemi aşağıdaki şekilde yapıldı (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. PAS boyama işlemi

İŞLEM	SÜRE
Parafini giderme	Etüvde 1 gece
Ksilol	6dk
% 100'lük ve % 96'lık Alkol	3 dk
Yıkama (Distile su)	1dk
Periyodik Asit (% 1)	10 dk
Yıkama (Distile su)	1 dk
Shiff leuco-fuksin Solüsyonu	10 dk
Yıkama (Akarsu+distile su)	10 dk
Harris Hematoksilen	1 dk
Yıkama (Distile su)	1 dk
% 96'lık Alkol	2 x 2 dk
% 100'lük Alkol	3 dk
Ksilol	2 x 3 dk
Kapatma (entellan)	

## 2.5. Karaciğer Dokusunun Elektron-Mikroskopik Takip Yöntemi

Elektron mikroskop için seçilen karaciğer doku parçaları, millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5'lik glutraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra, üzerinde birkaç damla glutraldehit olan dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde, bistüri yardımıyla 1 mm<sup>3</sup> lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları, tekrar glutraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edildi. Daha sonra dokular millonig fosfat tamponunda, 10 dk çalkalandı. Dokular ikinci kez millonig fosfat tamponuna alındıktan sonra aynı tampon içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1'lik osmium tetraoksit solüsyonu ile ikinci defa tespit edildi ve fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dk yıkandı. Karaciğer dokusundaki su aşağıdaki işlemlerle uzaklaştırıldı:

- % 50 etil alkol (+ 4° C'de 15 dakika)
- % 70 etil alkol (+ 4° C'de 15 dakika)
- % 86 etil alkol (+ 4° C'de 15 dakika)
- % 96 etil alkol (+ 4° C'de 15 dakika)
- % 100 etil alkol (+ 4° C'de 15 dakika)
- % 100 etil alkol (+ 4° C'de 15 dakika)

Bu aşamaya kadar olan işlemler buzdolabında + 4° C'de gerçekleştirildi. Daha sonraki işlemler oda ısısında gerçekleştirildi :

- %100 etil alkol (15 dakika)
- Propilen oksit (15 dakika)
- Propilen oksit (15 dakika)

Suyu uzaklaştırılan doku parçaları, aşağıdaki solüsyonlar içerisinde bekletildi :

Propilen oksit ve gömme materyali (30 dakika)

Propilen oksit ve gömme materyali (30 dakika)

Bu işlemlerden sonra, doku parçaları içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (rezin) bulunan tüplere alındı ve bir gece süreyle rotatorda karıştırıldı.

Gömme Materyali:

- Araldit CY 212 20 ml
- Sertleştirici HY 964 20 ml
- Hızlandırıcı DY 064 0.6 ml
- Plastikleştirici – Dibütil Fitalat 1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak, polietilen kapsüllere gömüldü ve 60 °C etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Elde edilen bloklar, etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile, yarı ince kesitler alınarak toluidin blue ile boyandı. Yarı ince kesitlerin incelenmesinin ardından, 500 A° kalınlığında ince kesitler elde edildi. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alındı ve % 70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler, Zeiss E.M. 10 B elektron mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflandı.

## 2.6. İmmünohistokimyasal İnceleme

Karaciğer dokusunda iNOS immünreaktivitesinin belirlenmesi için, avidin-biotin-peroksidaz kompleksi yöntemi uygulandı. (Çizelge 2.6).

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında elde edilen kesitler, polilizinli lamlara alındı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildi. Parafini giderilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilip, antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için, Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra, primer antikor (Epitopa ÖzgünTavşan Antikoru, Labvision Fremont CA 94539 USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra, sekonder antikor (biotinylated goat anti-polyvalent) (Labvision TP-125- BN) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulanmasından sonra HRP (TS-060-AP, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra, distile su içerisine alındı. Dokulara AEC (TA-125-AF, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp, ışık mikroskobunda görüntü sinyali elde edilip eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı.

Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan, dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Pozitif kontrol için, meme dokusu ile karşılaştırıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine PBS kullanılarak, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0. 1: < % 25, 0. 4: % 26-50, 0. 6: % 51-75, 0. 9: % 76-100) ve şiddeti (0: yok, +0. 5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak, histoskor oluşturuldu. (Histoskor= yaygınlık x şiddet) .

#### Çizelge2.6. İmmünohistokimyasal boyama işlemi

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I, II, III	10 dakika
2	% 100 Alkol, % 96 Alkol, % 80 Alkol	10 dakika
3	Distile su	5 dakika
4	Mikrodalga	7+5 dakika
5	Oda ısısında soğutma	20 dakika
6	PBS (Fosfat buffer)	3X5 dakika
7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 dakika
8	PBS	3X5 dakika
9	Ultra V Block Solüsyonu	5 dakika
10	Primer antikor	60 dakika
11	PBS	3X5 dakika
12	Sekonder antikor	30 dakika
13	PBS	3X5 dakika
14	HRP (Horse Radish Peroksidaz)	30 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	AEC	5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
19	Akarsu	5 dakika
20	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

## **2.7. Biyokimyasal Analiz (ALT, AST, TG)**

Hayvanlardan abdominal aortadan alınan kan örnekleri tüplere aktarıldı. Kanlar 4100 rpm' de 15 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonunda elde edilen serumdaki TG, ALT ve AST enzim analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

## **2.8. Örneklerin Homojenizasyonu**

Karaciğer doku örnekleri alınarak total protein, SOD, CAT, GSH ve MDA ölçümleri için analiz gününe kadar -80 °C'de (NU 9668E, Nuair, Japonya) saklandı. Analiz günü dokular, homojenizasyon aşaması için önce -20 °C ardından +4 °C'ye alındı. 0,5 g karaciğer dokusu tartılarak distile suda yıkandı. Hafif kurutma işleminin ardından üzerine 5 ml % 10'luk 150 mM PBS (pH 7. 4) eklenerek Yellow line "IKA Overhead Stirrer" marka homojenizatörde 2000 devir ve 1 dk süreyle homojenizasyon yapıldı. Homojenatlar +4 °C'de 12000 rpmde 10 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R) edildikten sonra süpernatantlar analizler için kullanıldı. Elde edilen süpernatantlar analiz aşamasına kadar -80 °C'de bekletildi.

## **2.9. Total Protein Analizi**

Oksidan/antioksidan parametrelerin hesaplanmasında kullanılan ara parametredir. Total protein analizi biüret metoduna göre (Archem Diagnostic Ind. Ltd.) total protein kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Ependorflara her bir örnek için total protein kiti içerisindeki ayıraçtan 1 ml eklendi. Vortekslenen süpernatantlardan her bir ependorfa 10 µl eklendi. Spektrofotometrede okumak için 2 adet kör ve 1 adet standart hazırlandı. Körlere 1ml total protein solüsyonu ve 10 µl distile su koyulurken, standarta 1 ml total protein solüsyonu ve 10 µl kit içerisindeki standart eklendi. Vorteksleme işleminin ardından tüm tüpler 27-30 °C etüvde 10 dk süreyle inkübe edildi. Ardından spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Kyoto) Hellma Analytics marka 10 mm quartz kuvvetlerde köre karşı 546 nm dalga boyunda okuma yapıldı.



## **2.10. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Ölçümleri**

### **2.10.a. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi**

SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre ölçüldü (Sun 1988). Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri, nitro blue tetrazolium varlığında reaksiyona girerek formazon boyası oluştururlar. SOD enzimi, süperoksit radikallerini  $H_2O_2$ 'e dönüştürdüğü için formazon oluşumu azalır ve buna bağlı olarak absorbans da azalır. Vortekslenen süpernatantlardan 0.5 ml ependorflara aktarılarak, üzerine 250 µl etanol ve 150 µl kloroform eklenerek +4 °C'de 12000 rpmde 10 dakika santrifüj yapıldı. Cam tüplere 1225 µl reaktif karışımı ve 250 µl örnek ilave edildi. Spektrofotometrede kör için ise 1225 µl reaktif karışımı üzerine 250 µl distile su ilave edildi. Vortekslenen tüplerin üzerine 25 µl ksantin oksidaz eklenerek, 25 °C'de su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. Ardından 0.5 ml  $CuCl_2$  ilave edilerek spektrofotometrede quartz kuvvetlerde köre karşı, 532 nm dalga boyunda okundu ve sonuçlar U/mg doku protein olarak gösterildi.

### **2.10.b. Karaciğer Dokusunda Katalaz (CAT) Enzim Analizi**

Katalaz aktivitesi, Aebi isimli araştırmacı tarafından tarif edilen metot ile ölçülmüştür (Aebi 1984). CAT enzim aktivitesi,  $H_2O_2$ 'in 240 nm'de  $H_2O$ 'ya dönüşümünü sırasında absorbans azalmasının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Absorbansta gözlenen azalma hızı CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Fosfat tampon ve numune içeren küvetlerden birine,  $H_2O_2$  eklenmesiyle 240 nm absorbansda  $H_2O_2$ 'deki azalma 1 dakika boyunca spektrofotometrede "Hellma Analytics" marka 10 mm kuartz kuvvetlerde kaydedildi. Elde edilen değerler sonucu katalaz enzim aktivitesi hesaplanarak k/mg doku protein olarak ifade edildi.

### **2.10.c. Karaciğer Dokusunda Glutatyon (GSH) Enzim Analizi**

GSH (indirgenmiş glutatyon) ölçüm ortamındaki disülfid bir kromojen olan DTNB (5,5'-ditiyobis, 2-nitrobenzoik asit) ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. GSH bu kompleks oluşumunu katalizlediği için, oluşan rengin şiddeti ile GSH aktivitesi arasında doğru orantı vardır. GSH seviyesi, spektrofotometrik olarak Tietze (1969)'e göre analiz edildi. Analiz için kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı (Tietze 1969). Standart tüpe 200 µl standart, numune tüpüne 200 µl örnek konulduktan sonra her iki tüpe 1.8 ml saf su ve 3 ml presipitasyon solüsyonu ilave edildi.

Kör tüpe ise 0. 4 ml saf su ve 0. 6 ml presipitasyon solüsyonu konuldu. Hazırlanan karışımlara süzme işlemi uygulandıktan sonra, süzülen kısımlardan 2 ml süpernatant alındı ve üzerine 8 ml fosfat solusyonu ve 1 ml DTNB (5- 5'- dithiobis (2-nitrobenzoik asit)) eklendikten sonra 412 nm' de okundu ve sonuçlar mg/kg doku olarak hesaplandı.

### **2.11. Karaciğer Dokusunda Lipid Peroksidasyonu (Malondialdehit, MDA) Analizi**

MDA analizi, Ohkawa (1979) ve arkadaşlarının metoduna göre MDA'nın asidik ortamda tiyobarbütirik (TBA) asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı (Ohkawa ve ark 1979). Vortekslenen süpernatantlardan, kilitli kapaklı cam tüplere 750 µl aktarılarak üzerlerine 1,5 ml stok solüsyondan (TCA, TBA ve HCl içeren) eklenerek vortekslenen tüpler 20 dakika kaynatıldı. Soğutma işleminin ardından, tüpler 3000 rpmde 10 dakika santrifüj edildi. Ardından spektrofotometrede kuartz kuvetlerde köre karşı, 532nm dalga boyunda havaya karşı okuma yapıldı. Ardından MDA konsantrasyonu absorban katsayısı ( $\epsilon=1.56 \times 10^5 / \text{M/cm}$ ) ile hesaplanarak nmol/mg doku protein şeklinde hesap edildi.

### **2.12. İstatistiksel Analiz**

Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu "Kolmogorov-Smirnov" testi ile incelendi. Normal dağılıma uygun olan nicel değişkenlerin bağımsız iki grup arasındaki karşılaştırmada, bağımsız örneklem "t testi" kullanıldı. İki'den fazla grup arasındaki karşılaştırmada "tek yönlü varyans analizi" kullanıldı. "Levene testi" sonucunda grupların varyanslarının homojen olup olmamasına göre çoklu karşılaştırmalarda "Tukey ya da Tamhane's T2 testi" kullanıldı. Normal dağılan nicel değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi. Normal dağılıma uygun olmayan, nicel değişkenlerin iki grup arasındaki karşılaştırmada "Mann Whitney U testi", ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırmada ise "Kruskal Wallis analizi" kullanıldı ve tanımlayıcı istatistikler medyan (25-75. persantil) şeklinde gösterildi.  $p < 0,05$  olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

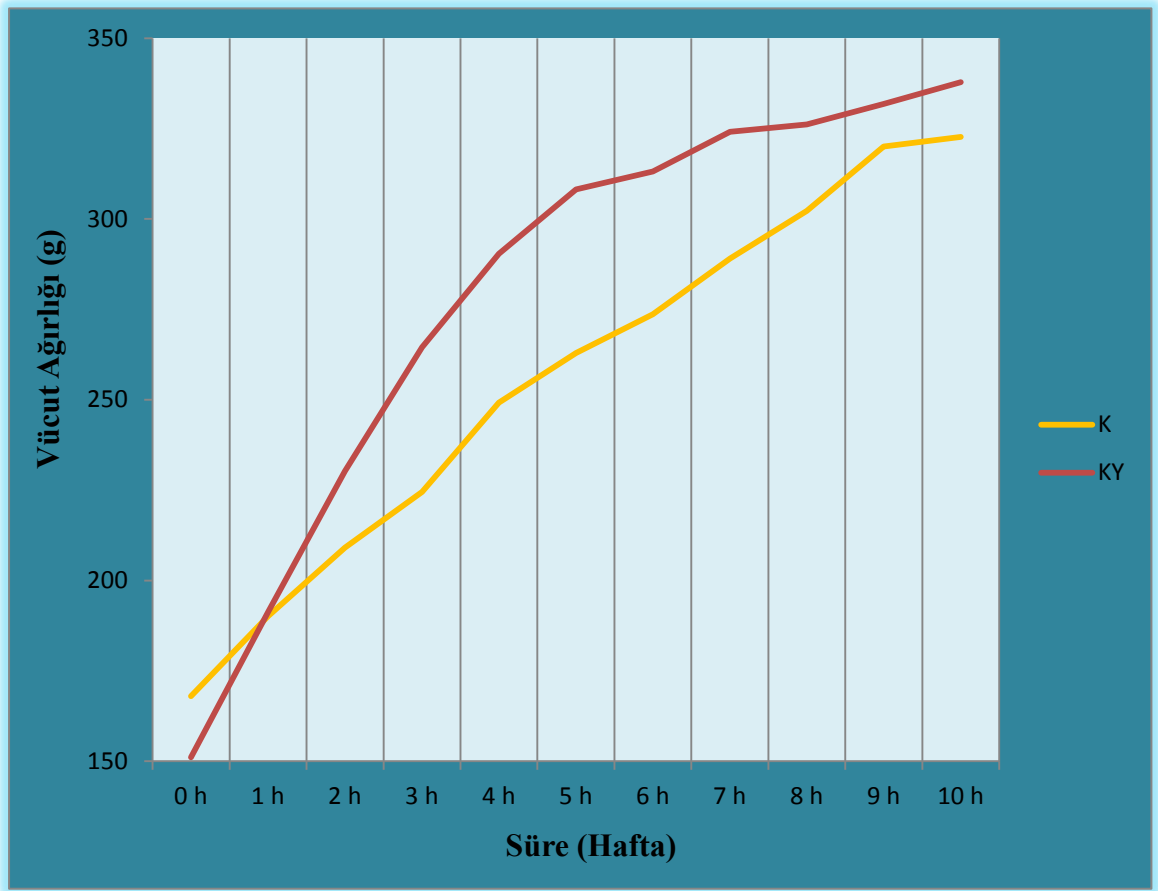
#### 3.1. Yüksek Yağ İçerikli ve Standart Diyet ile Beslenen (10 hafta) Gruplar

Araştırmamızın pilot çalışma kısmını oluşturan, 10 hafta süreyle HFD ve SD ile beslenen iki gruba ait sıçanlardan elde edilen verileri içermektedir.

##### 3.1.1. Vücut Ağırlıkları

10 hafta süreyle yağlanma oluşturulan KY grubu ve K grubunun vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, KY grubunda vücut ağırlığının daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 3. 1). Vücut ağırlıklarındaki değişim yüzdesinin istatistiksel analizi sonucu, iki grup arasında anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

Şekil 3.1. K ve KY gruplarının haftalık vücut ağırlıkları (10h)



### 3.1.2. Rölatif Karaciğer Ağırlıkları

10 hafta süreyle yağlanma oluşturulan KY grubu ve K grubunun rölatif karaciğer ağırlıklarının ortalama değerleri karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. K ve KY gruplarının rölatif karaciğer ağırlıkları (10 h)

GRUP	Rölatif Karaciğer Ağırlıkları (g/100g) (Ortalama $\pm$ Standart sapma)
K (10 h)	3,69 $\pm$ 0,23
KY (10 h)	3,47 $\pm$ 0,25

### 3.1.3. Karaciğer Dokusunun Yapısı

10 hafta süreyle yağlanma oluşturulan KY grubu ve K grubundan alınan karaciğer dokularının H-E, Masson trikrom, PAS ve toluidin blue boyamalarının ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu elde edilen verileri içermektedir.

#### 3.1.3.a. Kontrol Grubu Karaciğer Dokuları

H-E, Masson trikrom, PAS ve toluidin blue boyaları uygulanmış, kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik yapısının normal bir görünüme sahip olduğu gözlemlendi.

H-E boyamada, sentral ven etrafında yerleşmiş ışınal düzeydeki hepatositler ve hepatosit dizilerinin aralarında normal görünümlü sinüzoidler izlendi (Resim 3.1).

Masson trikrom boyamada, hepatositler ve sinüzoidler normal görünümdeydi. Bağ dokusunda herhangi bir artış gözlenmedi (Resim 3.3).

PAS boyamada, hepatositlerde glukojen dağılımı normal olarak izlendi (Resim 3.5).

Yarı ince kesitlerin toluidin blue boyamasında, çekirdek, çekirdekçik ve sinüzoidler normal olarak izlendi (Resim 3.7).

### 3.1.3.b. Yağlı Karaciğer Dokuları

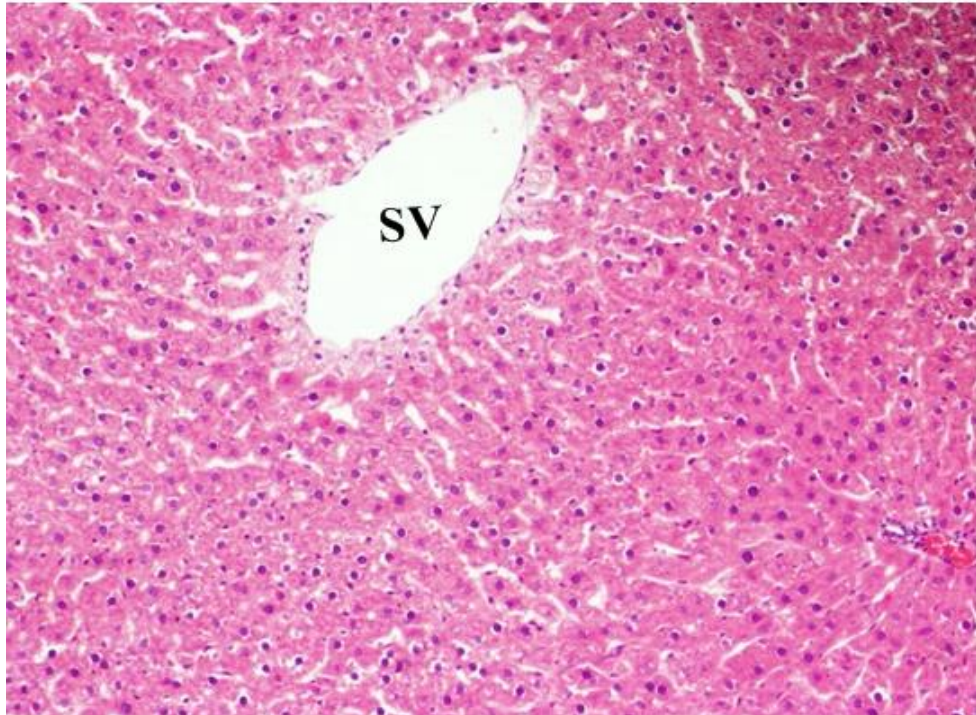
H-E, Masson trikrom, PAS ve toluidin blue boyaları uygulanmış kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik yapısında, özellikle PAS boyamada daha belirgin olarak görülen, hepatositlerde 3. derecede yağlanma gözlemlendi.

H-E boyamada, sentral ven etrafında hepatositler içerisinde makroveziküler ve mikroveziküler yağ damlacıkları gözlemlendi. Sinüzoidler normal görünümdeydi (Resim 3.2).

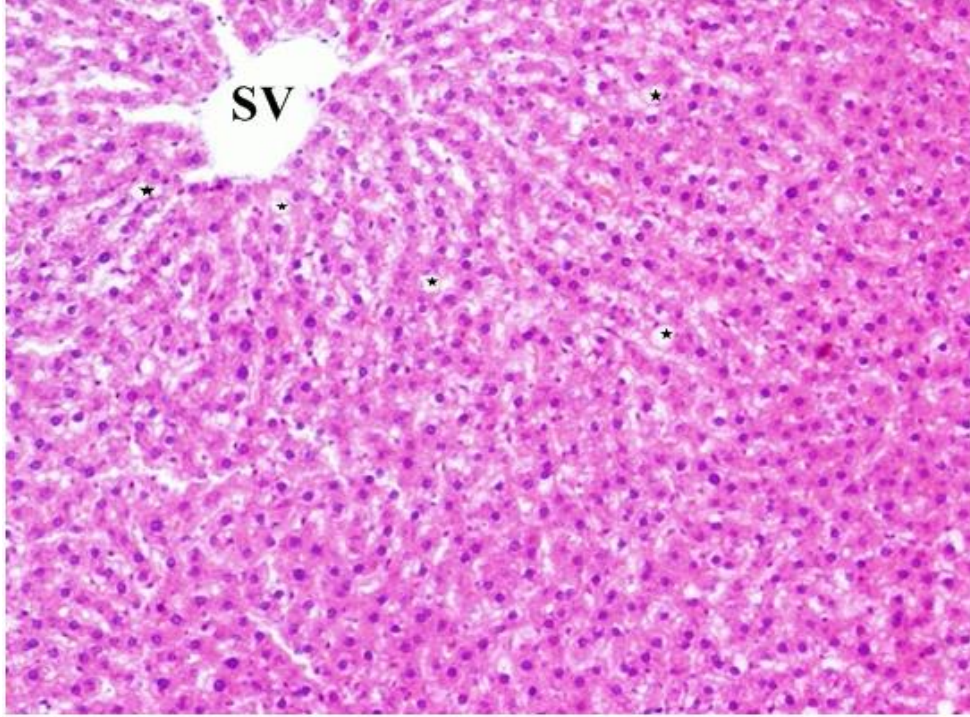
Masson trikrom boyamada, bağ dokusunda herhangi bir artış gözlemlenmedi. Sinüzoidlerde hafif dilatasyonlara ek olarak, hepatositlerde makroveziküler ve mikroveziküler yağlanmalar belirlendi. Portal alan normal görünümdeydi (Resim 3.4)

PAS boyamada, bazı hepatositlerde glukojen, bazı hepatositlerde yağ damlacıkları birikimi olduğu gözlemlendi. Yüksek büyütmede hepatositlerdeki yağ damlacıkları daha belirgindi (Resim 3.6).

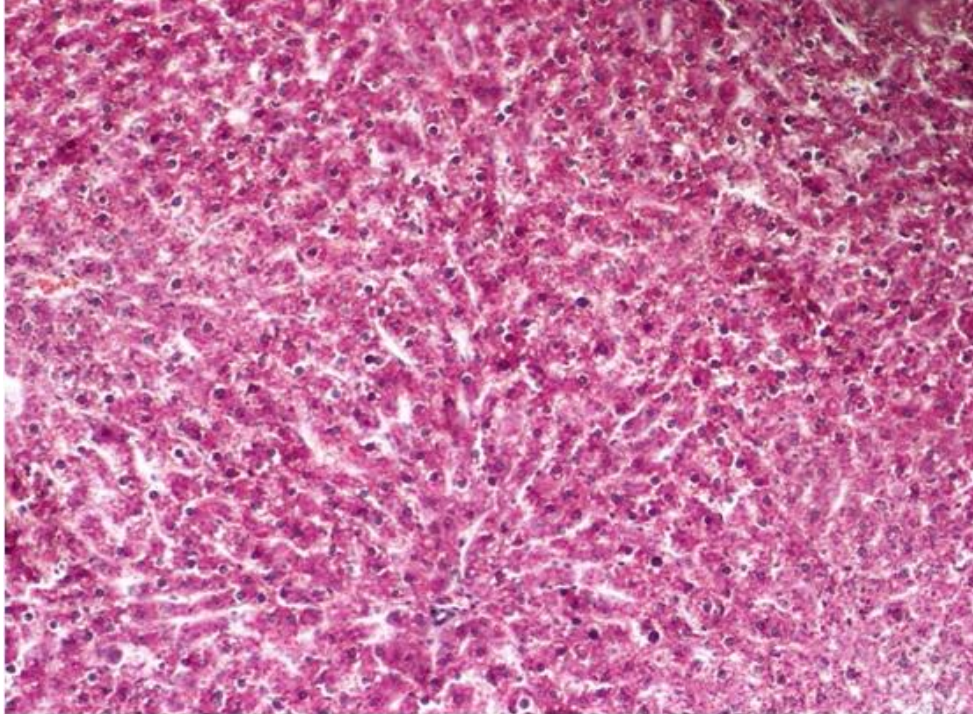
Yarı ince kesitlerin toluidin blue boyamasında, hepatositler içerisinde bol miktarda makroveziküler ve mikroveziküler yağ damlacıkları tespit edildi. Bazı hepatositlerde heterokromatik çekirdek gözlemlendi (Resim 3.8).



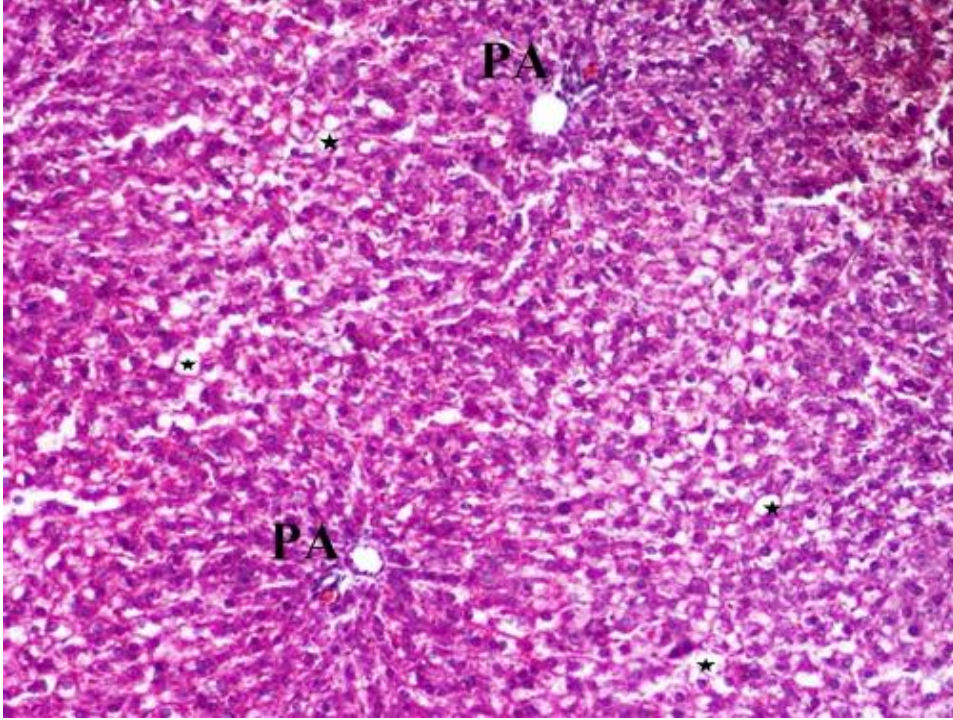
Resim 3.1. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral ven) (10h; H-E; X100).



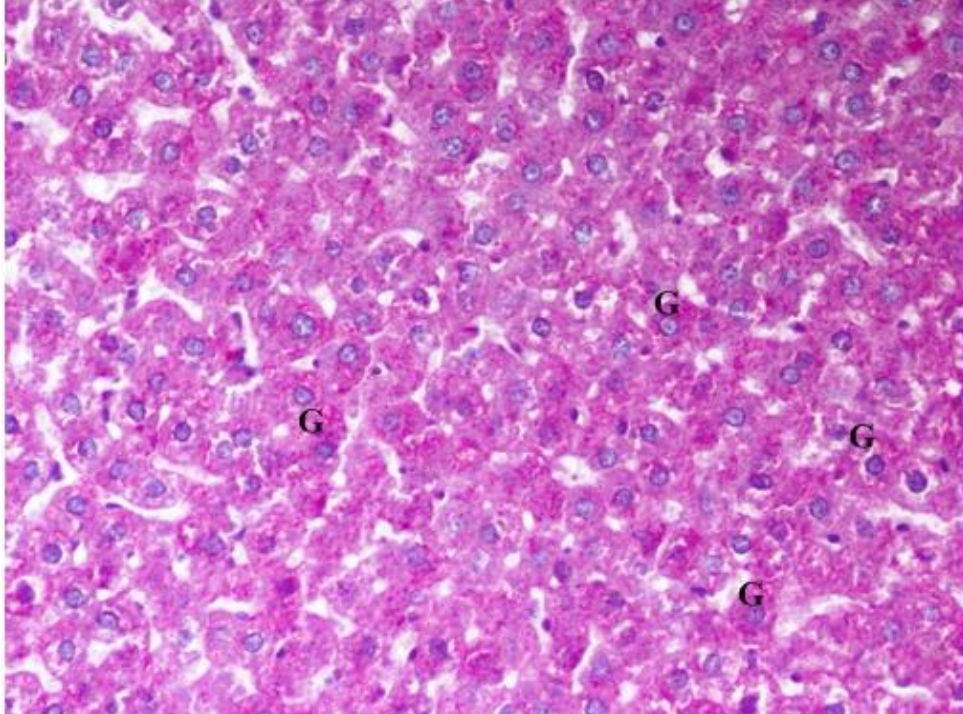
Resim 3.2. Yağlı karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral ven, ★:Yağ damlacığı) (10h; H-E; X100).



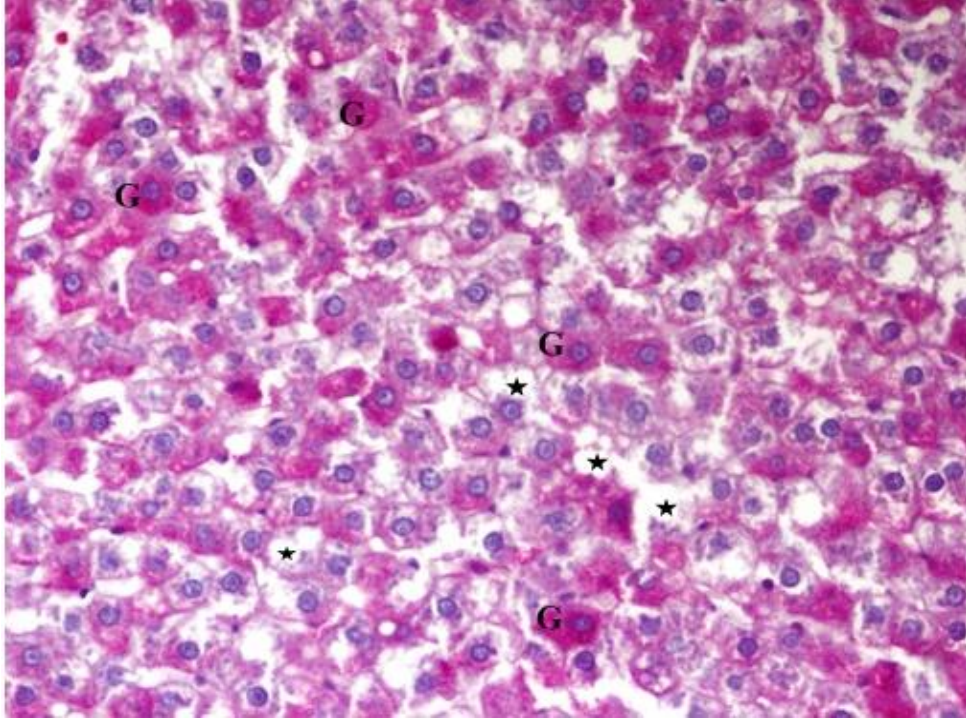
Resim 3.3. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (10h; Masson Trikrom; X100).



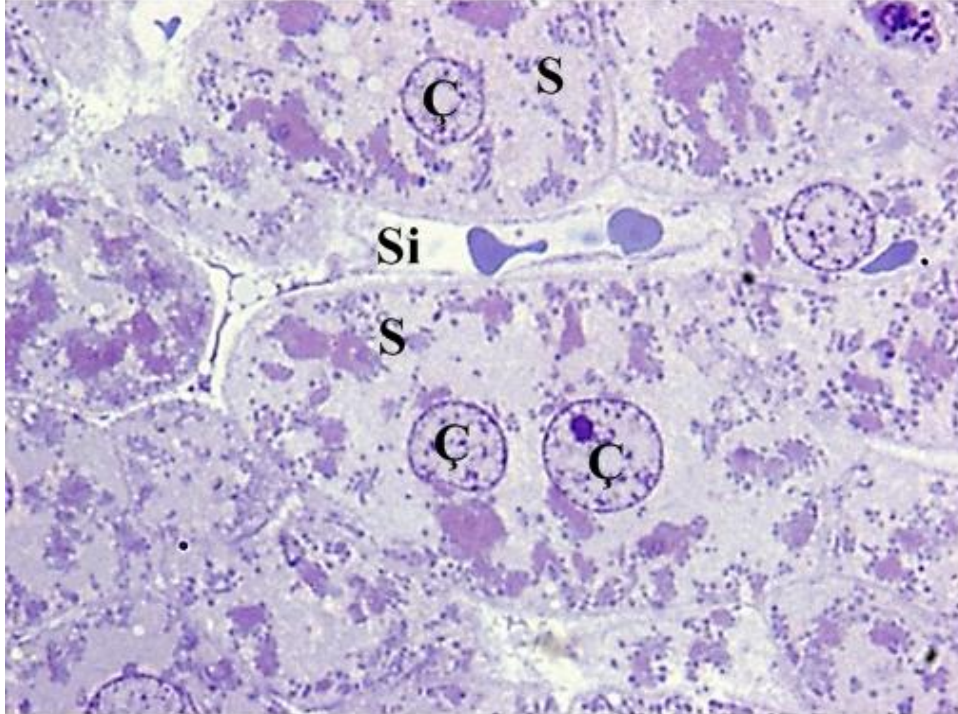
Resim 3.4. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (PA: Portal Alan, ★ :Yağ damlacığı) (10h; Masson Trikrom; X100).



Resim 3.5. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glukojen) (10h; PAS; X200).

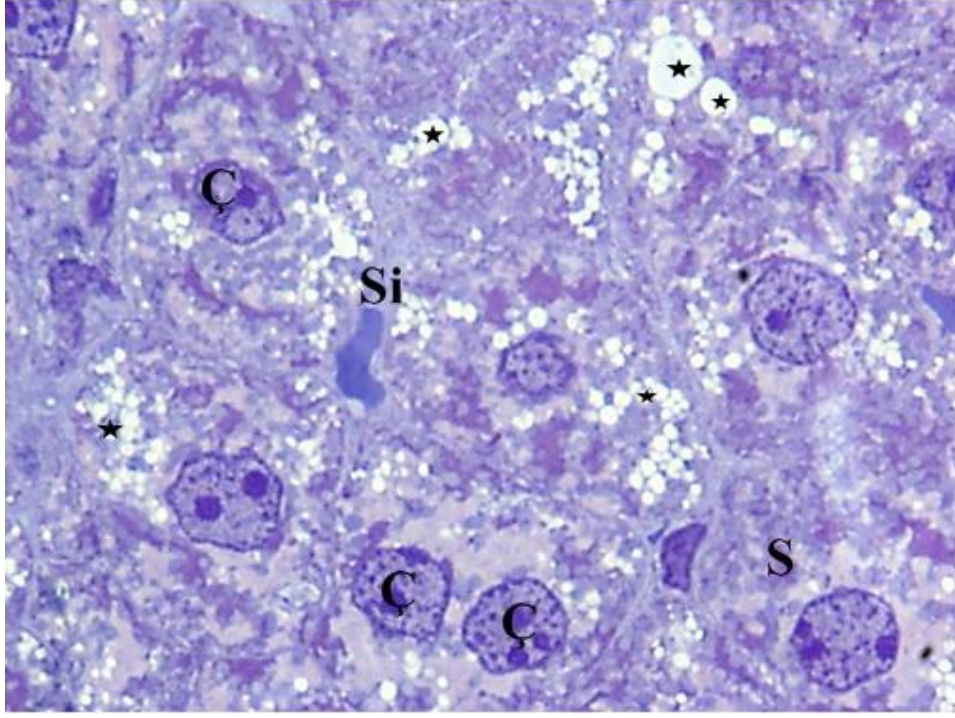


Resim 3.6. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glukojen, ★: Yağ damlacığı) (10h; PAS; X200).



Resim 3.7. K grubu karaciğer dokusunun yarı ince kesiti (Ç: Çekirdek, S: Hepatosit sitoplazması, Si: Sinüzoid) (10h; Toluidin blue; X1000).





Resim 3.8. KY grubu karaciğer dokusunun yarı ince kesiti (Ç: Çekirdek, S: Hepatosit sitoplazması, Si: Sinüzoid) (10h; Toluidin blue; X1000).

### 3.1.4. Elektron Mikroskopik İnceleme

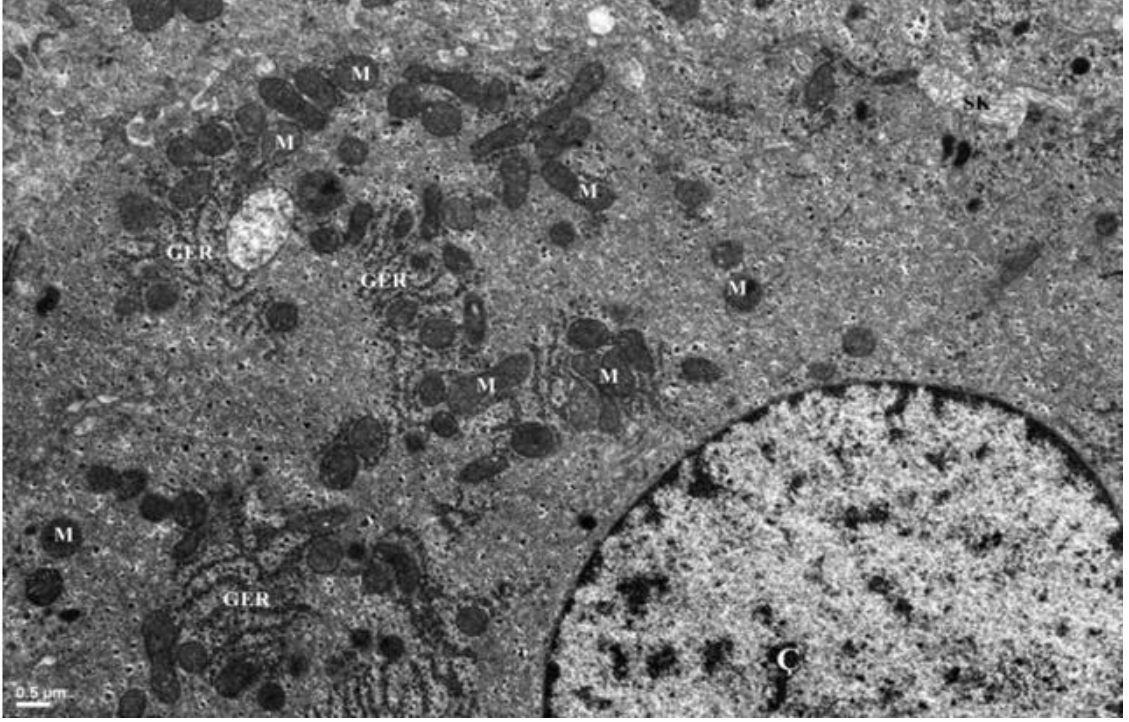
10 hafta süreyle yağlanma oluşturulan KY grubu ve K grubundan alınan karaciğer dokularının, uranil asetat ve kurşun sitrat boyamalarının elektron mikroskopunda incelenmesi sonucu elde edilen verileri içermektedir.

#### 3.1.4.a. Kontrol Grubu Karaciğer Dokuları

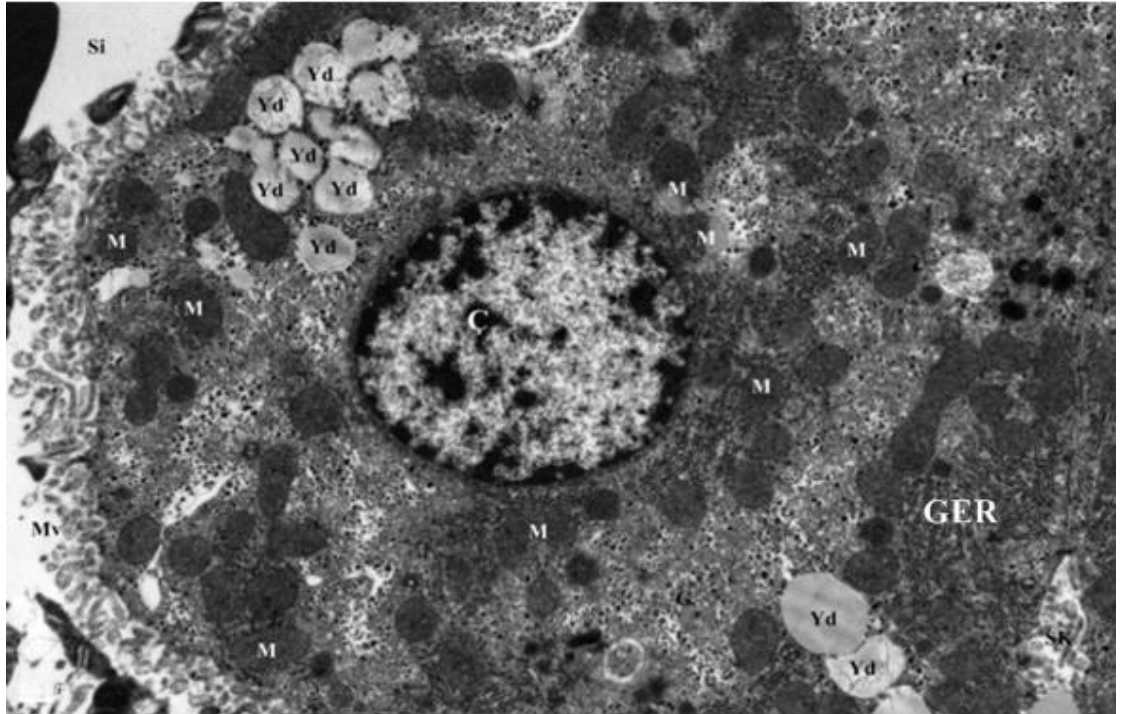
Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun elektron mikroskopik incelemesinde, karaciğer hücresinin çekirdeğinin normal görünümüne sahip olduğu görülmektedir. Çekirdeğin etrafını kuşatan mitokondriyon ve GER'ler, şekil ve boyut olarak normal olarak izlenmektedir. (Şekil 3. 9).

#### 3.1.4.b. Yağlanma Grubu Karaciğer Dokuları

Yağlanma oluşturulan karaciğerin elektron mikroskopik incelemesinde, hepatosit içerisinde çok sayıda makro ve mikroveziküler yağ damlacıkları görülmektedir. Mitokondriyonlar kontrol grubuna göre daha hipertroftiktir (Resim 3. 10).



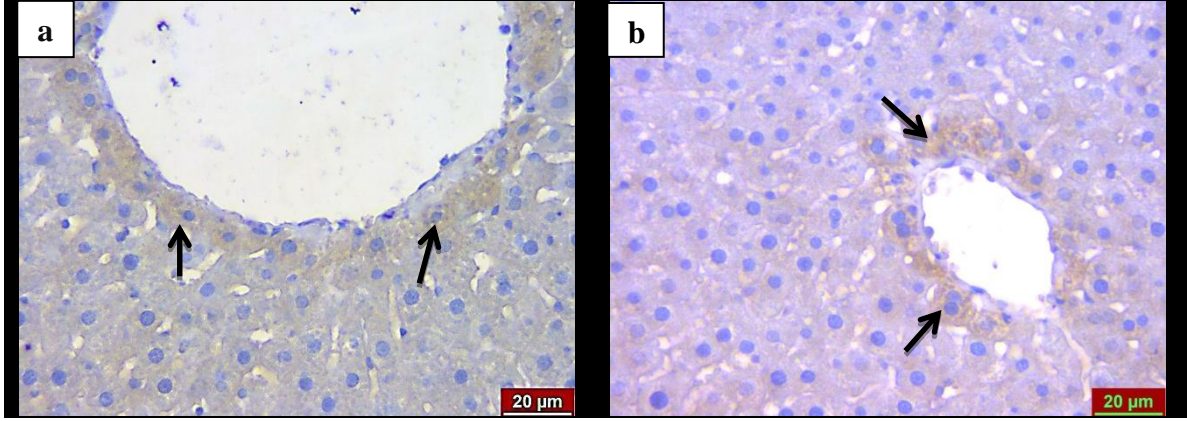
Resim 3.9. K grubu karaciğer dokusunun E.M görüntüsü (Ç: Çekirdek, M: Mitokondriyon, GER: Granüllü endoplazmik retikulum, SK: Safra kanalikülü) (10h; Bar: 0,5µm).



Resim 3.10. KY grubu karaciğer dokusunun E.M görüntüsü (Ç: Çekirdek, M: Mitokondriyon, GER: Granüllü endoplazmik retikulum, Mv: Mikrovillus, Si: Sinüzoid, Yd: Yağ damlacığı) (10h; Bar: 0,5µm).

### 3.1.5. iNOS Enzim Aktivitesi

iNOS immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamada, iNOS immünreaktivitesi sentral ven etrafında ve hepatositlerin sitoplazmasında kahverengi renkte granüller şeklinde (siyah ok) görüldü ( Resim 3.11 ).



Resim 3.11. K(a) ve KY(b) gruplarında iNOS enzim aktivitesi (oklar: iNOS pozitif) X400)

iNOS immünreaktivitesinde 10 haftalık KY grubu (Resim 3.11.b), K grubuyla (Resim 3.11a) karşılaştırıldığında, anlamlı artış vardı ( $p<0,05$ ). iNOS immünreaktivitesi histoskoru çizelge 3. 2’de verildi.

Çizelge 3.2. iNOS immünreaktivitesi histoskoru

Grup	Histoskor (Yaygınlık x Şiddet)
K (10 Hafta)	$0,30 \pm 0,15^b$
KY (10 Hafta)	$0,41 \pm 0,09^a$

Değerler ortalama  $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> Karaciğer yağlanması grubuna göre karşılaştırıldığında ( $p<0,05$ ).

### 3.1.6. Biyokimyasal Analizler

#### 3.1.6.a. Serum ALT ve AST Değerleri

10 haftalık KY grubunda ALT ve AST değerlerinin K grubundan daha yüksek olduğu gözlemlendi ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 3. 3. 10 haftalık K ve KY gruplarının ALT ve AST değerleri

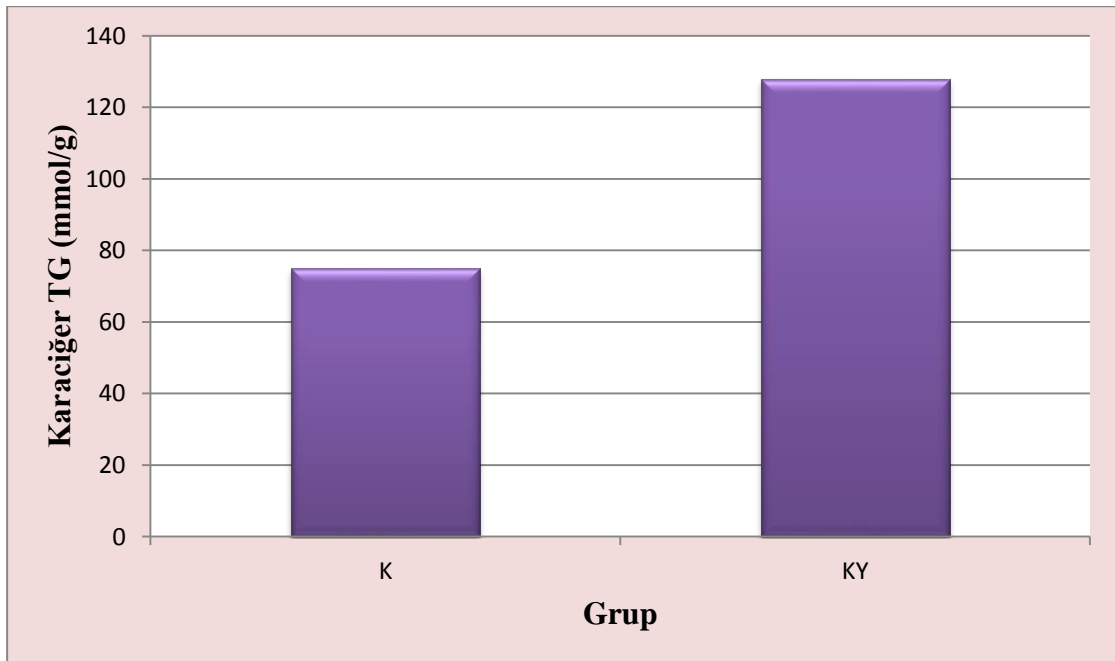
Grup	ALT	AST
	Ortalama $\pm$ ss	Ortalama $\pm$ ss
K (10 h)	36,25 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>	105,12 $\pm$ 1,24 <sup>b</sup>
KY (10 h)	48,5 $\pm$ 8,51 <sup>a</sup>	127,12 $\pm$ 2,03 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> Karaciğer yağlanması grubuna göre karşılaştırıldığında ( $p < 0,05$ ).

#### 3.1.6.b. Serum TG Değerleri

Karaciğer yağlanması oluşturulan sıçanlarda, serum TG içeriklerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış gözlemlendi (Şekil 3. 2 ). ( $p < 0.05$ )



Şekil 3.2. 10 haftalık K ve KY gruplarının TG içeriği

### 3.1.7. Karaciğer MDA, SOD, CAT ve GSH Değerleri

10 haftalık K ve KY grupları karşılaştırılarak, sonuçlar ortalama olarak verildi (Çizelge 3.4). KY grubunda MDA değerleri K grubuna göre daha yüksek bulunurken, SOD ve CAT değerleri, K grubunda daha yüksekti ( $p<0.05$ ). GSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Çizelge 3.4. 10 haftalık K ve KY gruplarının MDA, SOD, CAT, GSH değerleri

	MDA	SOD	CAT	GSH
	Ortalama $\pm$ SS	Ortalama $\pm$ SS	Ortalama $\pm$ SS	Ortalama $\pm$ SS
K	27,13 $\pm$ 4,19 <sup>b</sup>	4,19 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>	13,41 $\pm$ 5,88 <sup>b</sup>	15,11 $\pm$ 3,29
KY	54,01 $\pm$ 11,55 <sup>a</sup>	2,63 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	7,63 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	12,02 $\pm$ 2,57

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> Karaciğer yağlanması grubuna göre karşılaştırıldığında ( $p<0,05$ ).

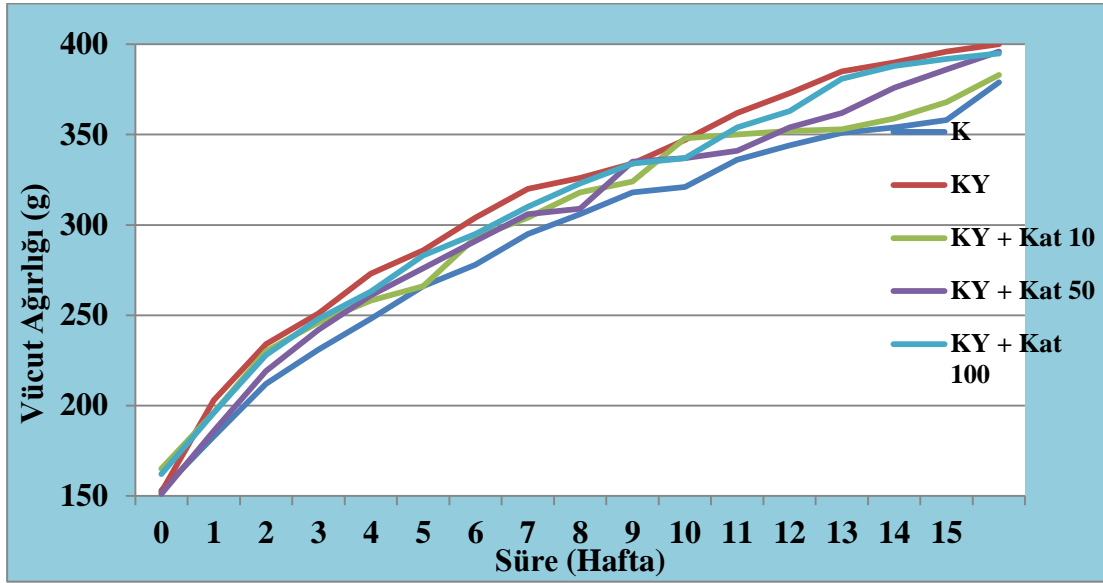
Araştırmamızın pilot çalışma kısmını oluşturan bu kısımdan elde edilen veriler, % 45 yağ içerikli diyet ile 10 haftada karaciğerde yağlanma oluşturulduğunu göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda, yağlanmanın derecesi belirlenmiştir. Kateşin ve gallik asitin karaciğer yağlanmasında olumlu etkisinin olup olmadığının araştırılması için ön hazırlık yapılmıştır. Bundan sonraki veriler, 16 hafta süre ile yağlanma oluşturulan gruplara, farklı dozlarda kateşin ve gallik asit uygulamasıyla elde edilmiştir.

### 3.2. Standart Diyet İle Beslenen ve Yüksek Yağ İçerikli Diyete İlaveten Kateşin ve Gallik Asit Uygulaması (16 hafta)

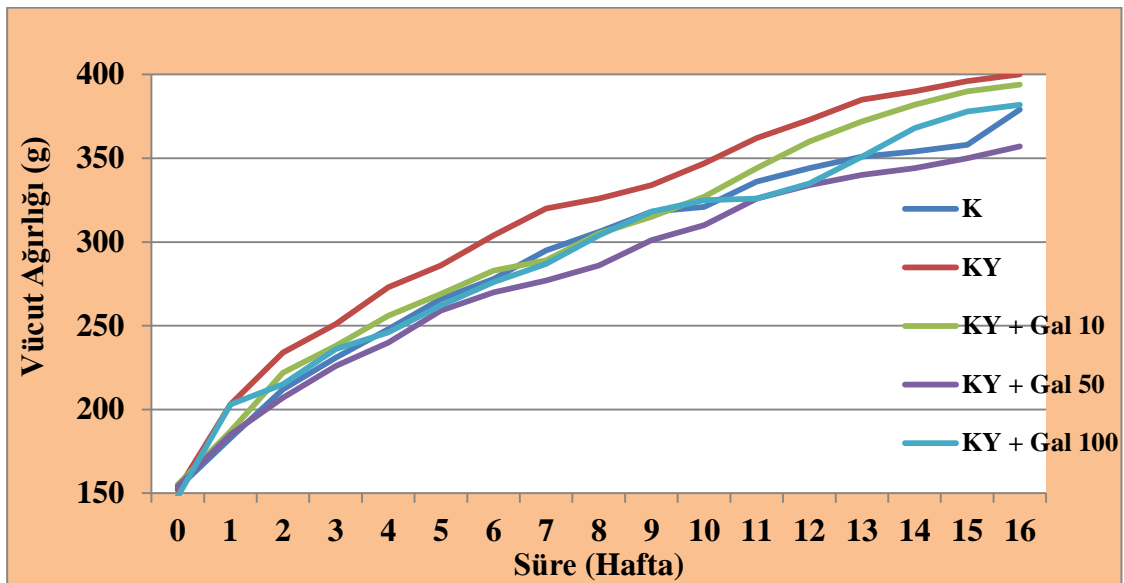
16 hafta süreyle yağlanma oluşturulan ve yağlanmaya ek olarak üç farklı dozda (10, 50, 100 mg/kg/gün) kateşin ve gallik asit uygulanan gruplara ait bulguları içermektedir.

### 3.2.1. Vücut Ağırlıkları

10 haftalık HFD diyetine ek olarak 6 hafta boyunca farklı dozlarda kateşin (Şekil 3.3) ve gallik asit (Şekil 3.4) uygulanan gruplara ait haftalık vücut ağırlıklarının karşılaştırılması aşağıda verilmiştir. Vücut ağırlığındaki en fazla artış, KY grubunda gözlenmesine rağmen, vücut ağırlığındaki değişimin yüzdesinin istatistiksel analizi sonucu gruplar arasında fark gözlenmedi ( $p > 0.05$ ).



Şekil 3.3. KY, K ve farklı dozlarda kateşin uygulanan grupların haftalık vücut ağırlıkları



Şekil 3.4. KY, K ve farklı dozlarda gallik asit uygulanan grupların haftalık vücut ağırlıkları

### 3.2.2. Rölatif Karaciğer Ağırlıkları

Vücut ağırlığının toplam karaciğer ağırlığına bölünmesi sonucu elde edilen rölatif karaciğer ağırlıkları, çizelge 3. 5'te verildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucu gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ).

Çizelge 3. 5. Rölatif karaciğer ağırlıkları

<b>Grup</b>	<b>Rölatif Organ Ağırlıkları (g/100g) (Ortalama <math>\pm</math> Standart sapma)</b>
<b>K</b>	3,35 $\pm$ 0,28
<b>KY</b>	3,14 $\pm$ 0,26
<b>KY+KA (10mg/kg/gün)</b>	3,29 $\pm$ 0,22
<b>KY+KA (50mg/kg/gün)</b>	3,15 $\pm$ 0,28
<b>KY+KA (100mg/kg/gün)</b>	3,24 $\pm$ 0,22
<b>KY+GA (10mg/kg/gün)</b>	3,10 $\pm$ 0,19
<b>KY+GA (50mg/kg/gün)</b>	3,26 $\pm$ 0,15
<b>KY+GA (100mg/kg/gün)</b>	3,25 $\pm$ 0,24

### **3.2.3. Karaciğer Dokusu Yapısının Değerlendirmesi**

16 hafta süreyle yağlanma oluşumuna ek olarak, 10 mg/kg/gün kateşin, 50 mg/kg/gün kateşin, 100 mg/kg/gün kateşin, 10 mg/kg/gün gallik asit, 50 mg/kg/gün gallik asit, 100 mg/kg/gün gallik asit uygulanan gruplara, K ve KY grubularına ait verileri içermektedir.

#### **3.2.3.a. Kontrol Grubu Karaciğer Dokuları**

H-E, Masson trichrom ve PAS boyama sonuçlarına göre kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik yapısının normal bir görünüme sahip olduğu gözlemlendi.

H-E boyamada, sentral venler etrafında hepatositler ve hepatosit dizilerinin aralarında normal görünümlü sinüzoidler izlendi (Resim 3.12).

Masson trikrom boyamada, hepatositler, sinüzoidler ve portal alan normal görünümdeydi. Bağ dokusunda herhangi bir artış görülmedi (Resim 3.13).

PAS boyamada, hepatositlerde glukojen dağılımı normal olarak izlendi (Resim 3.14)

#### **3.2.3.b. Yağlanma Grubu Karaciğer Dokuları**

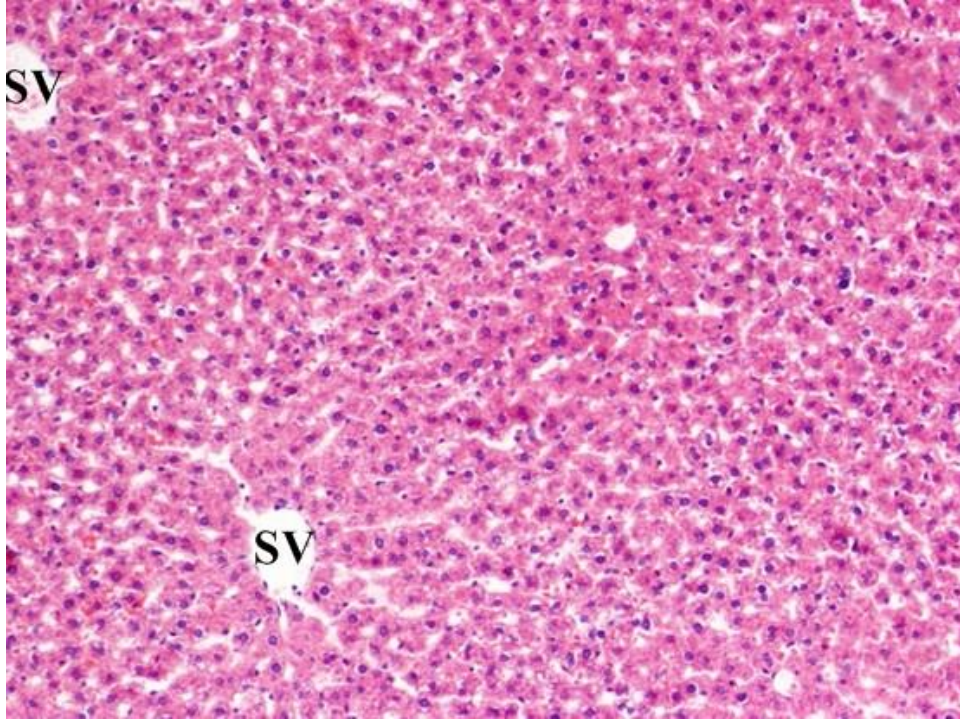
H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanma oluşturulan gruba ait karaciğer dokusunda karaciğerde trigliserit içeriğindeki artışa bağlı olarak, 3. derecede yağlanma meydana geldiği gözlemlendi.

H-E boyamada, hepatositler içerisinde yağ damlacıkları, bazı hepatositlerde balonlaşmalar, hidropik dejenerasyon, lobüler alanda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu, granüler ve vakuoler dejenerasyonlar, sinüzoidal dilatasyonlar tespit edildi (Resim 3.15).

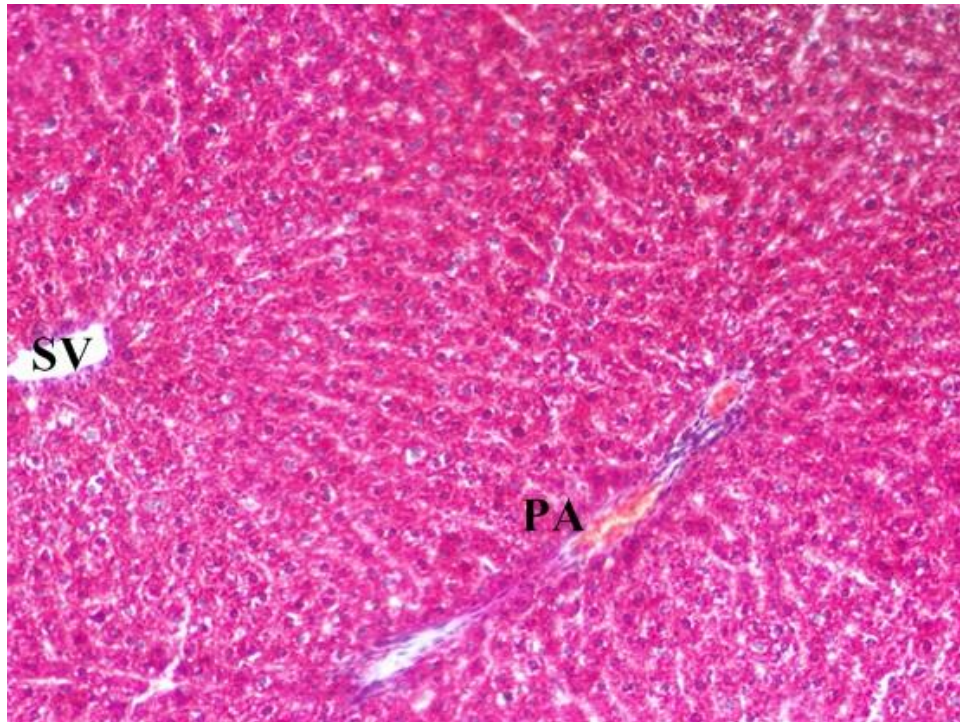
Masson trikrom boyamada, H-E boyamaya paralel bulgular görüldü. Herhangi bir bağ dokusu artışı gözlenmedi (Resim 3.16).

PAS boyamada hepatositler içerisinde, bol miktarda yağ damlacıkları gözlemlendi. Yağ damlacıkları içeren hücrelerin yoğunluğundan dolayı, sitoplazmalarında glukojen içeren hepatosit sayısı K grubundan daha azdı (Resim 3.17).

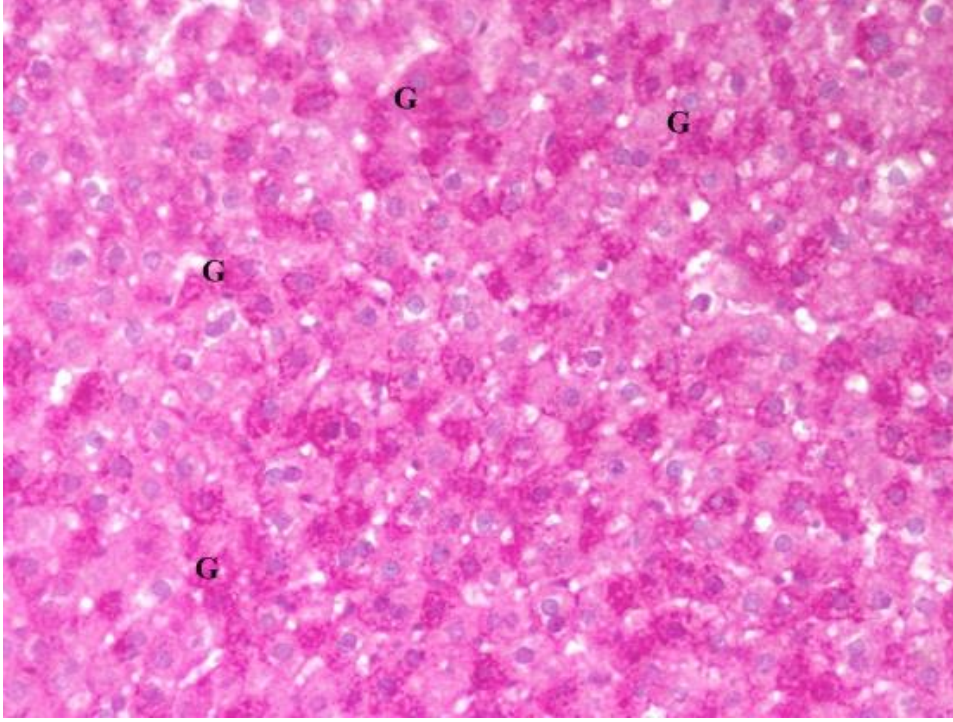




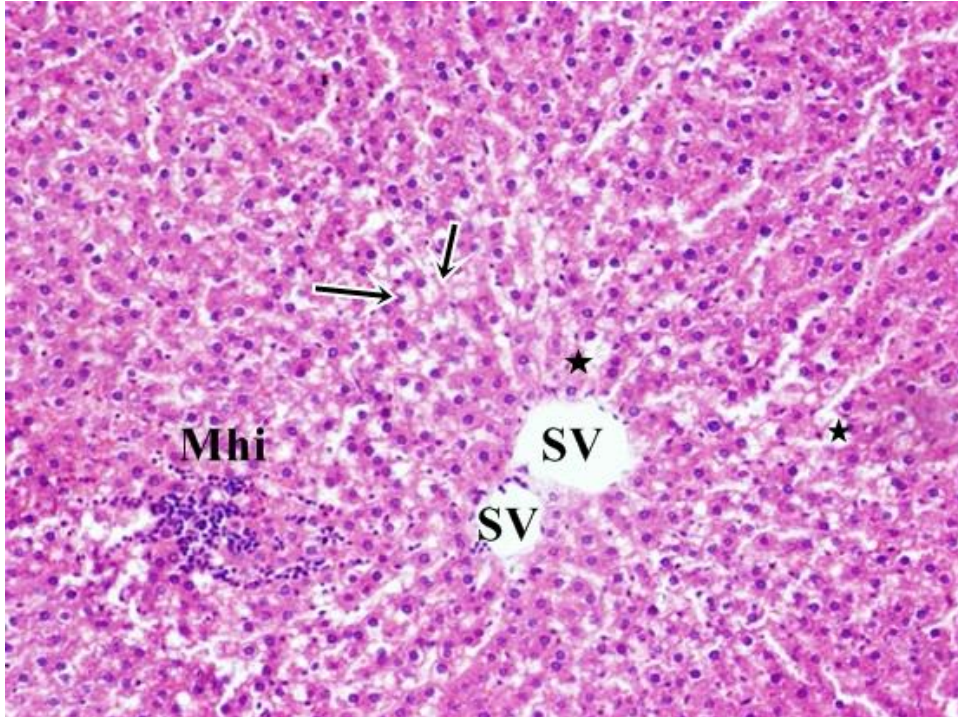
Resim 3.12. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (**SV**: Sentral ven) (16h; H-E;X100).



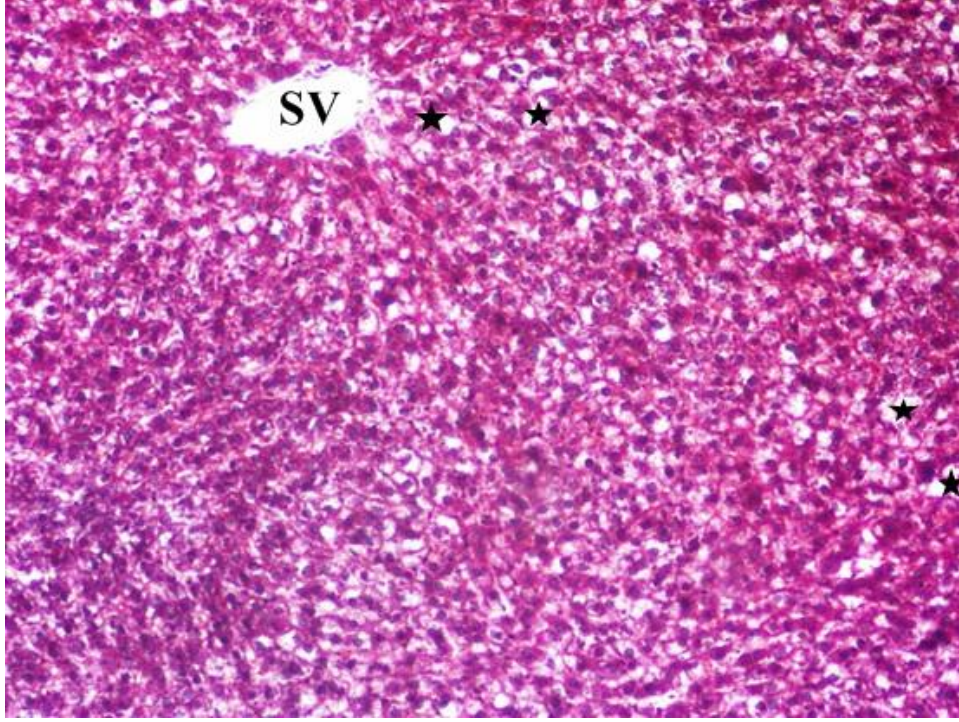
Resim 3.13. K grubu karaciğer dokusunun görünümü ( **SV**: Sentral ven, **PA**: Portal Alan) (16h; Masson Trikrom;X100).



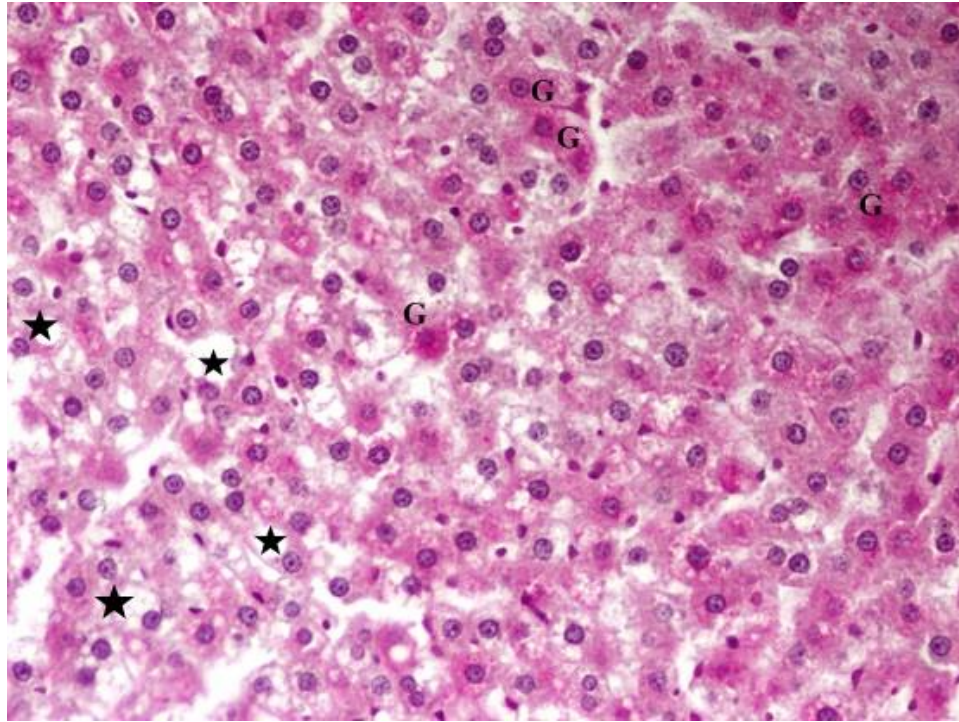
Resim 3.14. K grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glukojen) (16h; PAS; X200).



Resim 3.15. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, Mhi: Mononükleer hücre infiltrasyonu, ★ : Yağ damlacığı, oklar: Balonlaşmış hepatosit (16h; H-E; X100).



Resim 3.16. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★: Yağ damlacığı) (16h; Masson Trikrom; X100).



Resim 3.17. KY grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glukojen, ★: Yağ damlacığı) (16h; PAS; X200).

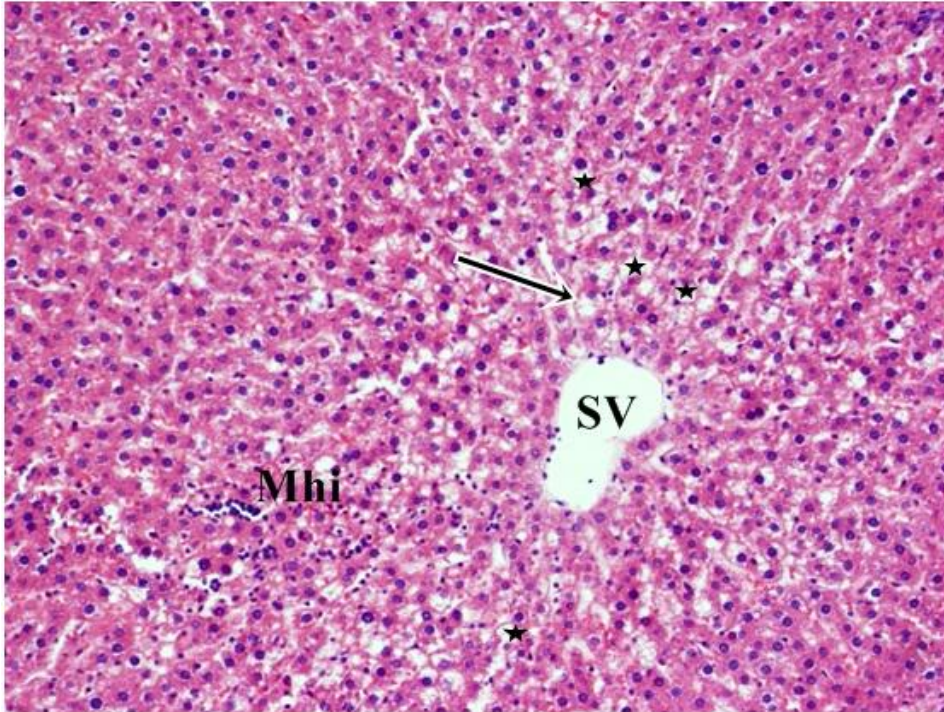
### 3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 10mg/kg/gün Kateşin Verilen Grubun Karaciğer Dokuları

H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanmaya ek olarak 10 mg/kg/gün kateşin verilen grupta, yağlı karaciğerde olduğu gibi yağlanmanın devam ettiği görüldü.

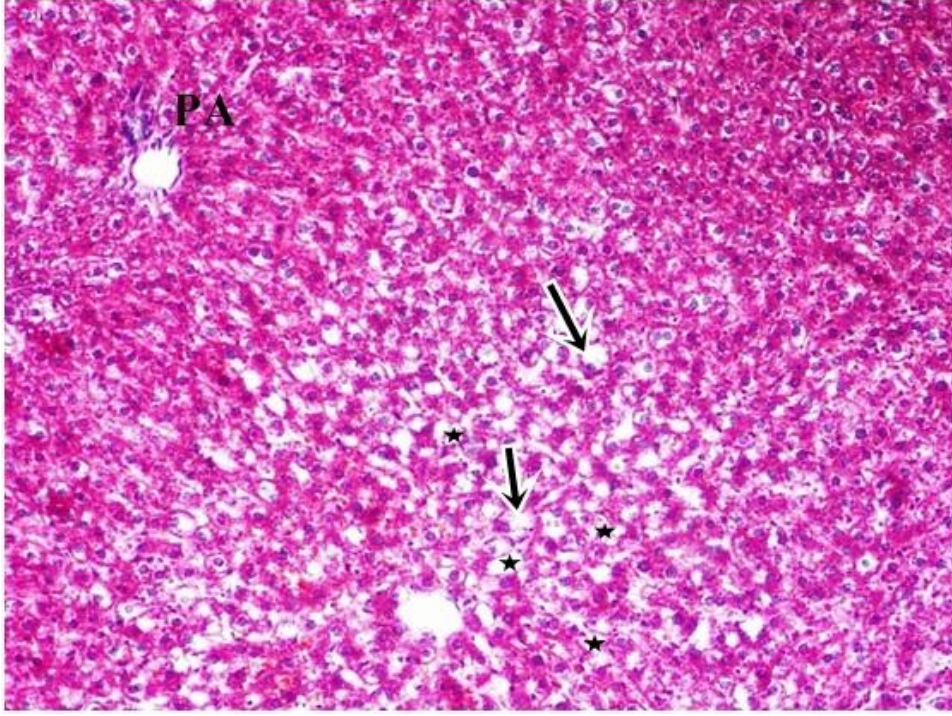
H-E boyamada, hepatositler içerisinde yağ damlacıkları, bazı hepatositlerde balonlaşmalar, hidropik dejenerasyon, lobüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyonlar tespit edildi. Granüler dejenerasyonlar devam ederken vakuoler dejenerasyonların azaldığı belirlendi (Resim 3.18).

Masson trikrom boyamada, H-E boyamada gözlenen bulgularla paralel olarak yağ damlacıkları, hepatositlerde balonlaşmalar gözlemlendi. Portal alanda hafif inflamasyon vardı. Herhangi bir bağ dokusu artışı gözlenmedi (Resim 3.19).

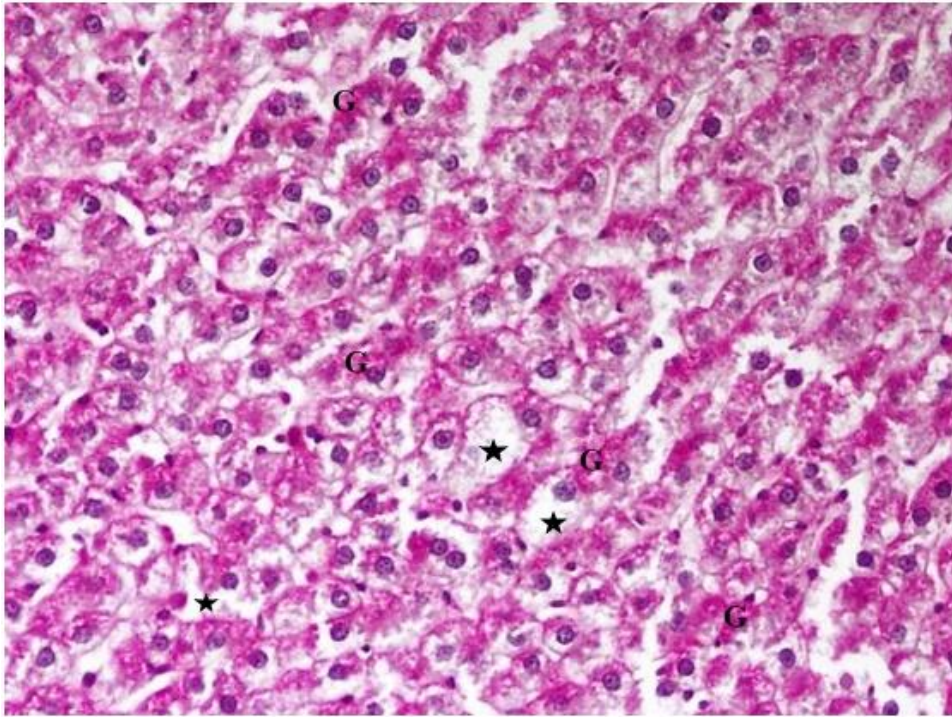
PAS boyamada hepatositler içerisinde, bol miktarda yağ damlacıkları gözlemlendi. Yağ damlacıkları içeren hücrelerin yoğunluğundan dolayı, sitoplazmalarında glukojen içeren hepatosit sayısı K grubundan daha azdı (Resim 3.20).



Resim 3.18. KY+Kat 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, Mhi: Mononükleer hücre infiltrasyonu, ★ Yağ damlacığı, ok: Balonlaşmış (16h; H-E; X100).



Resim 3.19. KY+Kat 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü ( ★: Yağ damlacığı, oklar: Balonlaşmış hepatosit (16h; Masson trikrom; X100).



Resim 3.20. . KY+Kat 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glukojen, ★ : Yağ damlacığı)( 16h; PAS; X200).

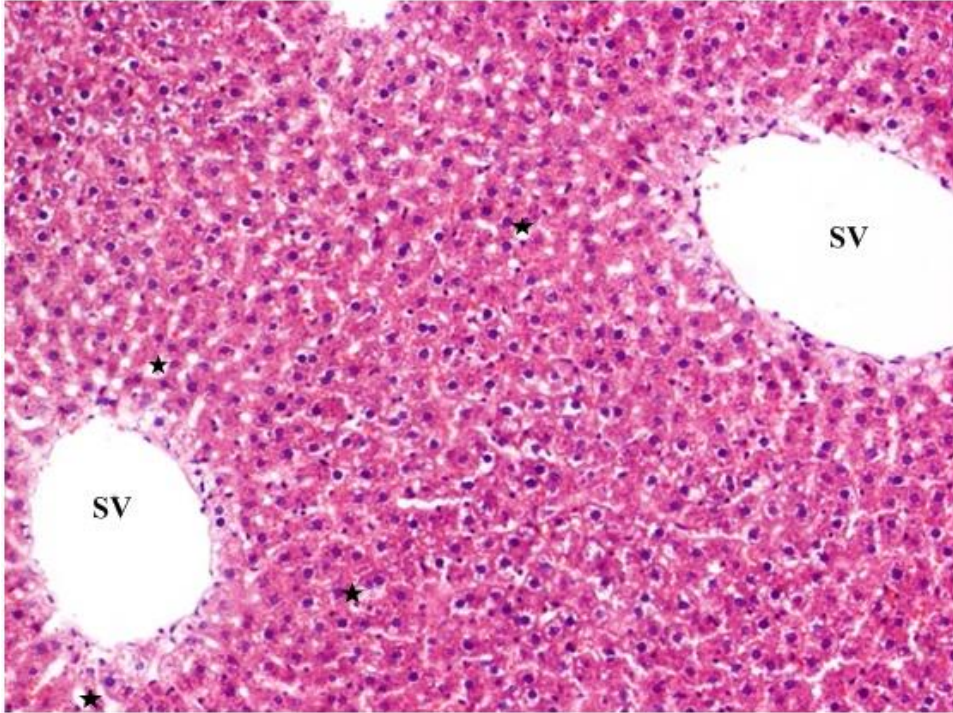
### 3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 50mg/kg/gün Kateşin Verilen Grubun Karaciğer Dokuları

H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanmaya ek olarak, 50 mg/kg/gün kateşin verilen grupta yağlanmanın devam ettiği, fakat deney grubuna göre yağlanmanın gerileyerek 2. derecede bir steatozisin meydana geldiği görüldü.

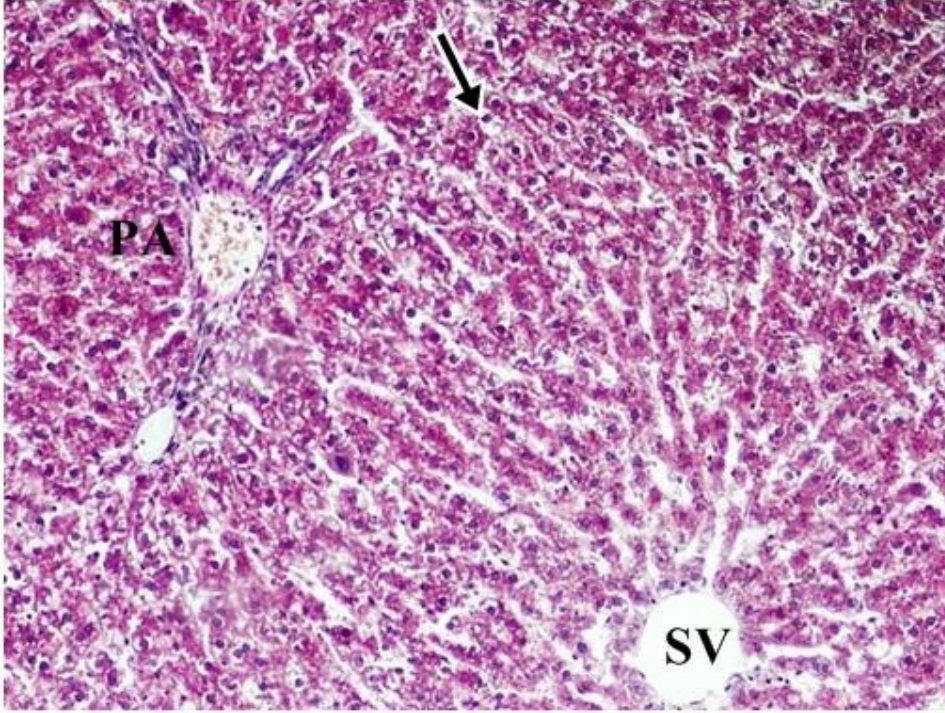
H-E boyamada, hepatositler içerisinde hafif mikroveziküler yağ damlacıkları belirlendi. Hidropik dejenerasyonun da azaldığı görüldü (Resim 3.21).

Masson trikrom boyamada, deney grubuna göre hepatositlerde balonlaşmanın devam ettiği görüldü. Portal alanda inflamasyon vardı. Herhangi bir bağ dokusu artışı izlenmedi (Resim 3.22).

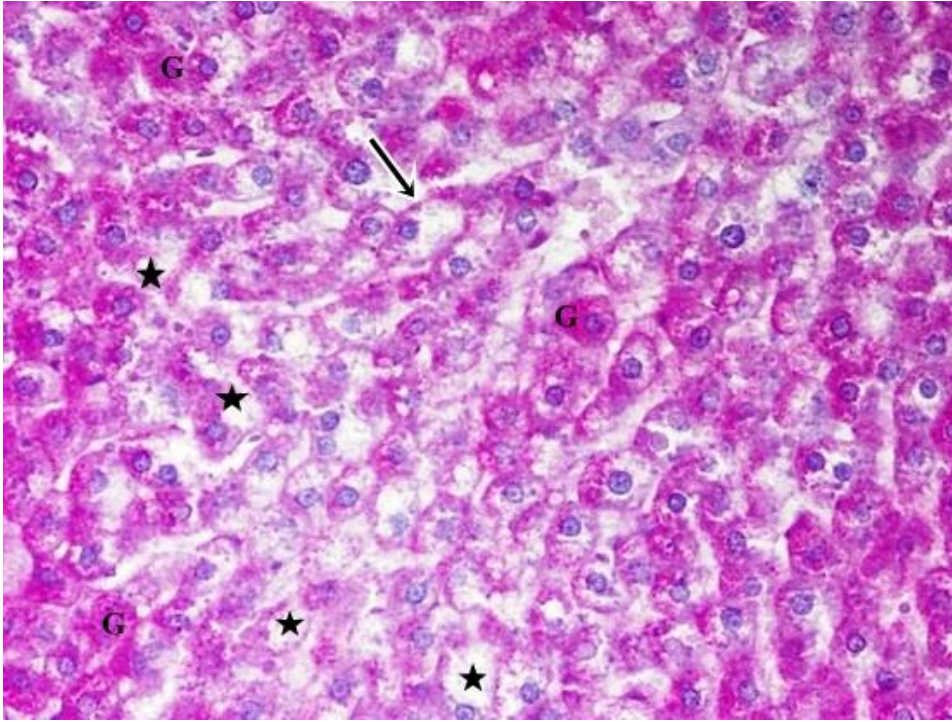
PAS boyamada hepatositler içerisinde, bol miktarda yağ damlacıkları gözlemlendi. Yağ damlacıkları içeren hücrelerin yoğunluğundan dolayı sitoplazmalarında glukojen içeren hepatosit sayısı K grubundan daha az olduğu belirlendi (Resim 3.23).



Resim 3.21. KY+Kat 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★ Yağ damlacığı, (16h; H-E; X100).



Resim 3. 22. KY+Kat 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü ( **SV**: Sentral Ven, **oklar**: Balonlaşmış hepatosit (16h; Masson trikrom; X100).



Resim 3.23. KY+Kat 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (**G**: Glikojen, **★**: Yağ damlacığı, **oklar** : Balonlaşmış hepatosit) ( 16h; PAS; X200).

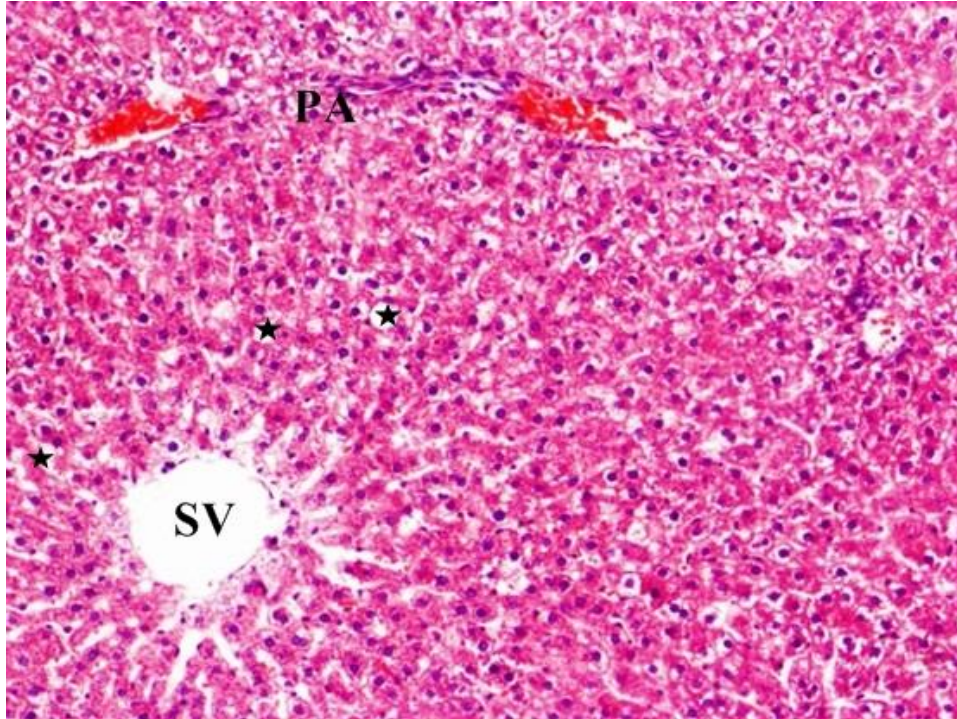
### 3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 100mg/kg/gün Kateşin Verilen Grubun Karaciğer Dokuları

H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanmaya ek olarak 100 mg/kg/gün kateşin verilen grupta grupta, hepatositlerde yağlanmanın azalarak 2. dereceye gerilediği görüldü.

H-E boyamada yağ damlacıklarının, hepatositlerde balonlaşmanın portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonlarının azaldığı gözlemlendi. Lobüler inflamasyon tespit edilmedi. Hepatositlerin çoğu normal görünümüne sahipti (Resim 3.24).

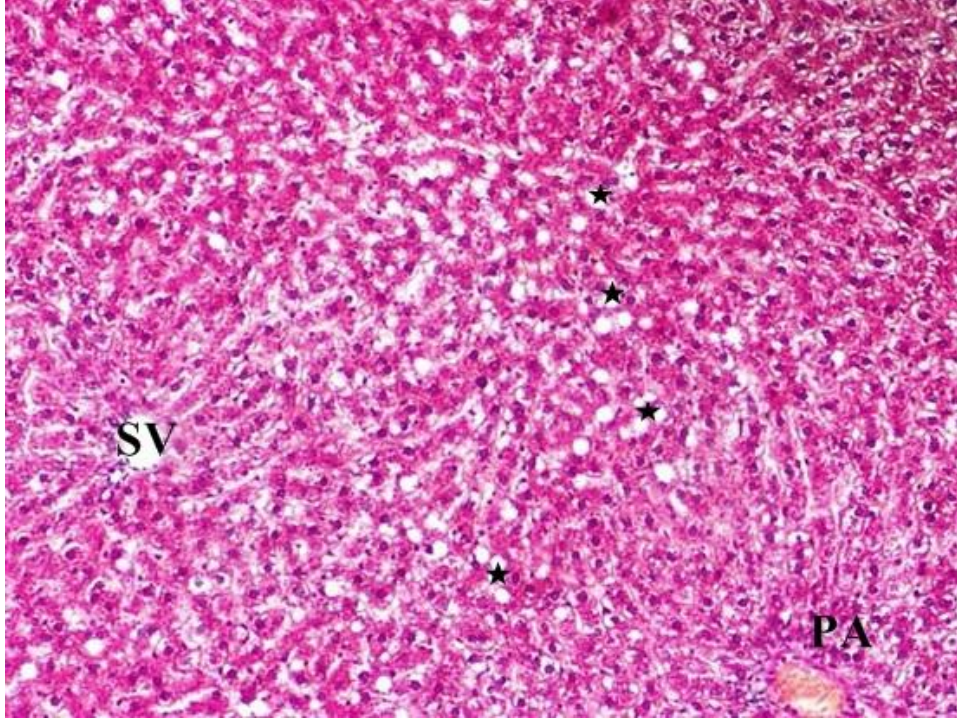
Masson trikrom boyamada, H-E boyamadaki bulgularla paralellik gösterdi. Herhangi bir bağ dokusu artışı gözlenmedi (Resim 3.25).

PAS boyamada hepatositler içerisinde bol miktarda yağ damlacıkları görüldü. Yağ damlacıkları içeren hücrelerin yoğunluğundan dolayı, sitoplazmalarında glukojen içeren hepatosit sayısı K grubundan daha azdı (Resim 3.26).

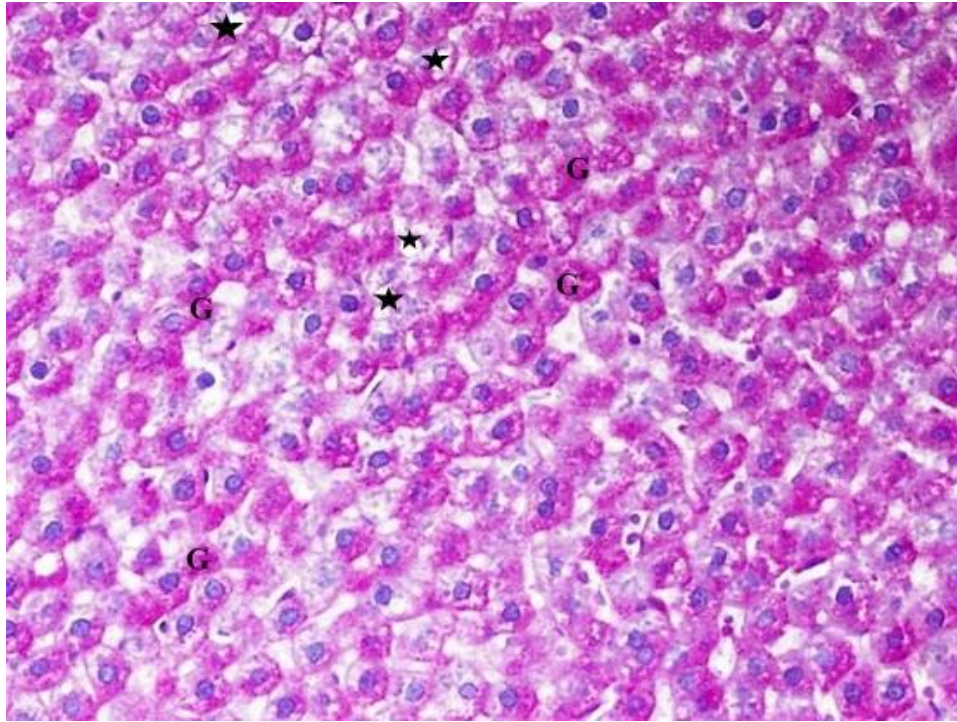


Resim 3.24. KY+Kat 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★ : Yağ damlacığı, PA: Portal Alan (16h; H-E; X100)).





Resim 3.25. KY+Kat 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü ( **SV**: Sentral Ven, **PA**: Portal Alan, ★: Yağ damlacıkları (16h; Masson trikrom; X100).



Resim 3.26. . KY+Kat 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (**G**: Glikojen, ★ : Yağ damlacığı)( 16h; PAS; X200).

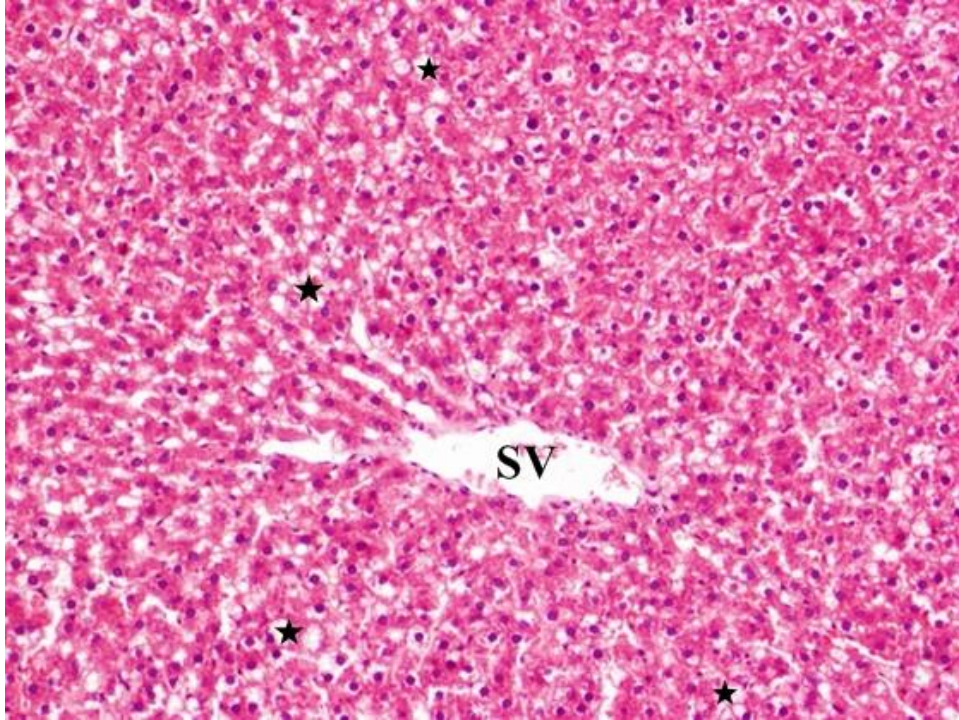
### 3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 10mg/kg/gün Gallik Asit Verilen Grubun Karaciğer Dokusu

H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanmaya ek olarak 10 mg/kg/gün gallik asit verilen grupta, 2. derecede yağlanmanın meydana geldiği görüldü.

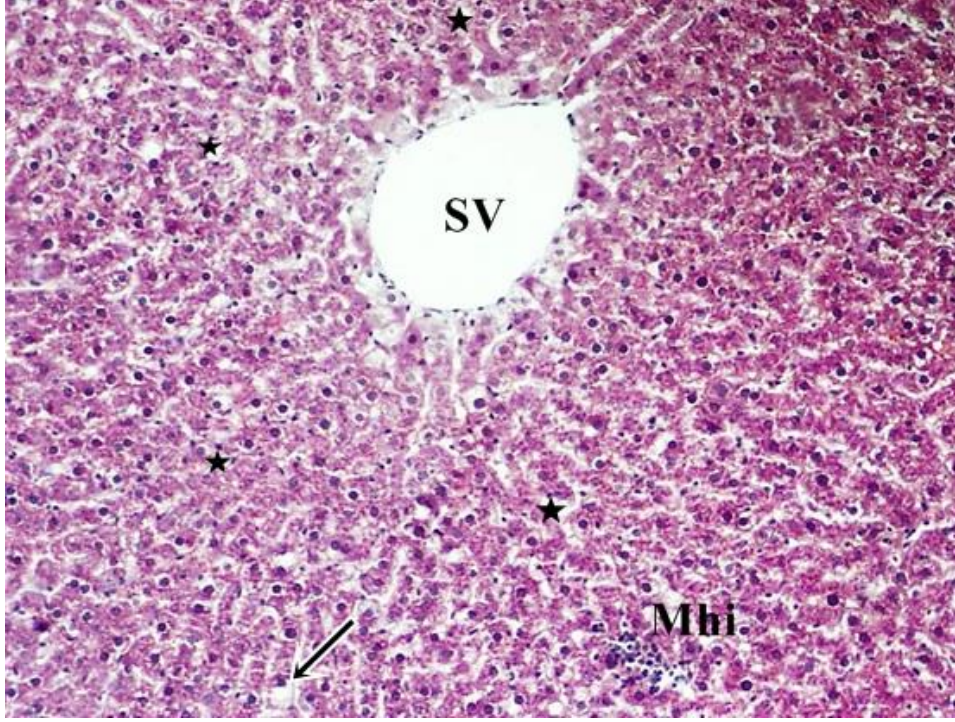
H-E boyamada, hepatositlerin sitoplazmasında yağ damlacıkları belirlendi (Resim 3.27).

Masson trikrom boyamada, yağlanma grubunda olduğu gibi hepatositlerde balonlaşmanın, portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonlarının bulunduğu, granüler dejenerasyonun devam ettiği görüldü. Bağ dokusunda herhangi bir artış gözlenmedi (Resim 3.28).

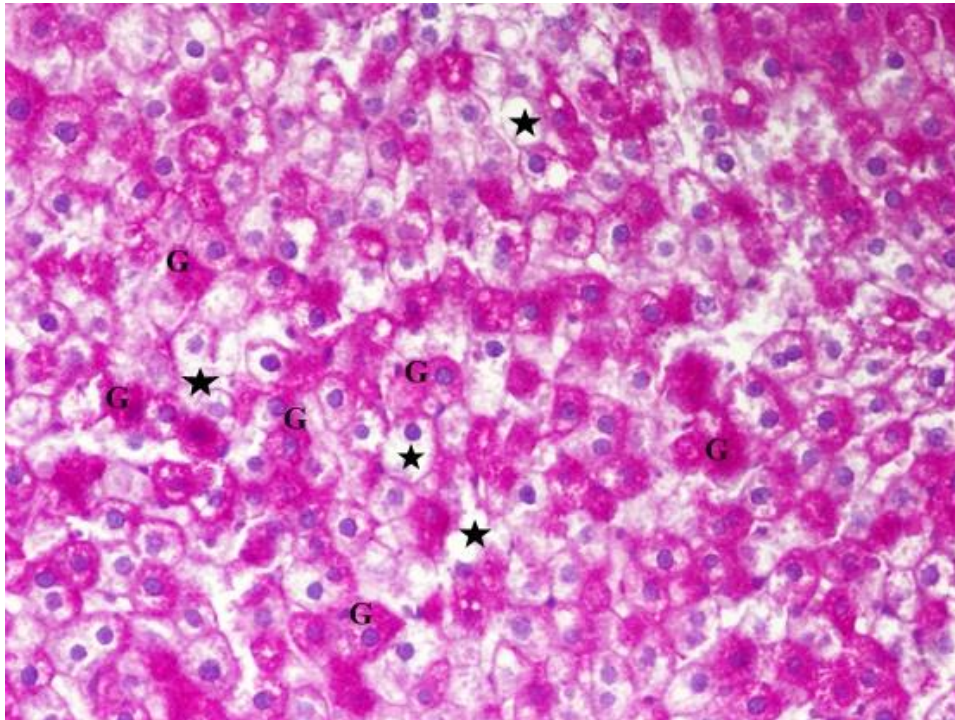
PAS boyamada, yağlanmanın yanı sıra glukojen içeren hepatositler de vardı. Bu glukojen içerikleri oldukça yoğundu (Resim 3.29).



Resim 3.27. KY+Gal 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★ : Yağ damlacığı) (16h; H-E; X100).



Resim 3.28. KY+Gal 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, **Mhi**: Mononükleer hücre infiltrasyonu, ★ Yağ damlacığı, **ok**: Balonlaşmış hepatosit) (16h; Masson trikrom; X100).



Resim 3.29. KY+Gal 10 grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glikojen, ★ : Yağ damlacığı)( 16h; PAS; X200).

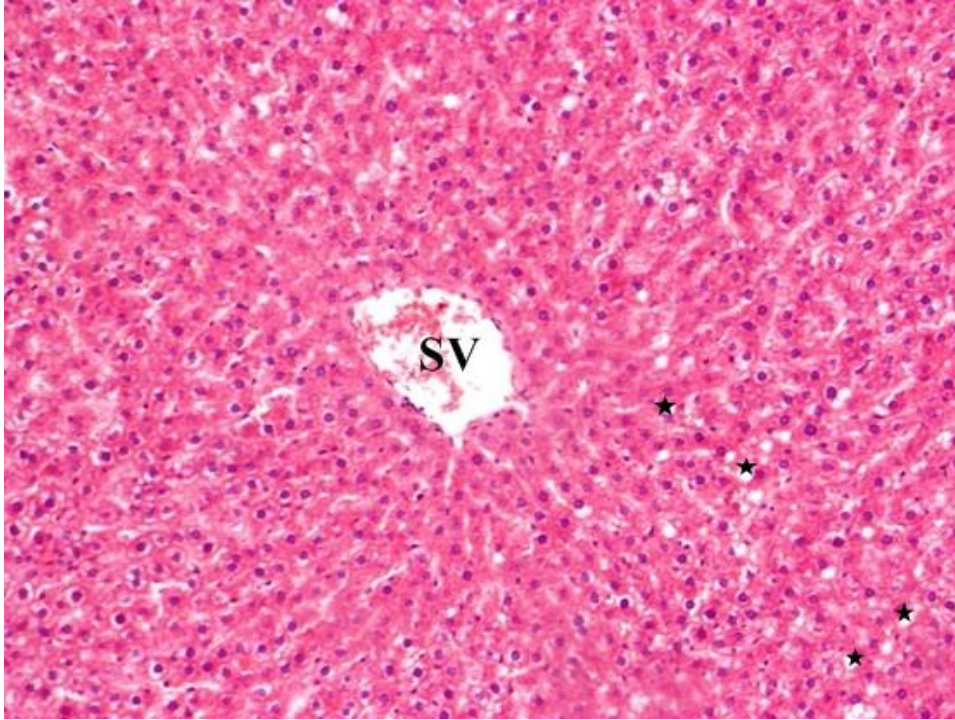
### 3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 50mg/kg/gün Gallik Asit Verilen Grubun Karaciğer Dokusu

H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanmaya ek olarak 50 mg/kg/gün gallik asit verilen grupta, 2. derecede yağlanmanın meydana geldiği görüldü.

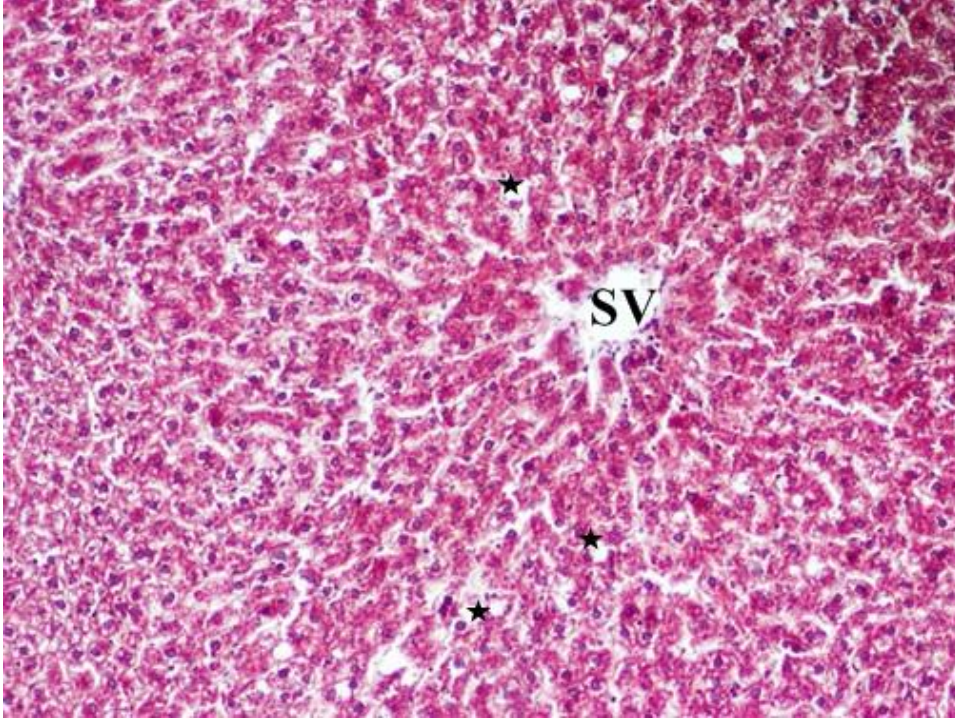
H-E boyamada, hepatositlerin sitoplazmasında hafif mikroveziküler yağ damlacıkları gözlemlendi. Mononükleer hücre infiltrasyonları ve balonlaşmış hepatositler görülmedi (Resim 3.30).

Masson trikrom boyamada, H-E boyamaya paralel olarak hafif mikroveziküler yağ damlacıkları gözlemlendi. Mononükleer hücre infiltrasyonları ve balonlaşmış hepatositler belirlenmedi (Resim 3.31).

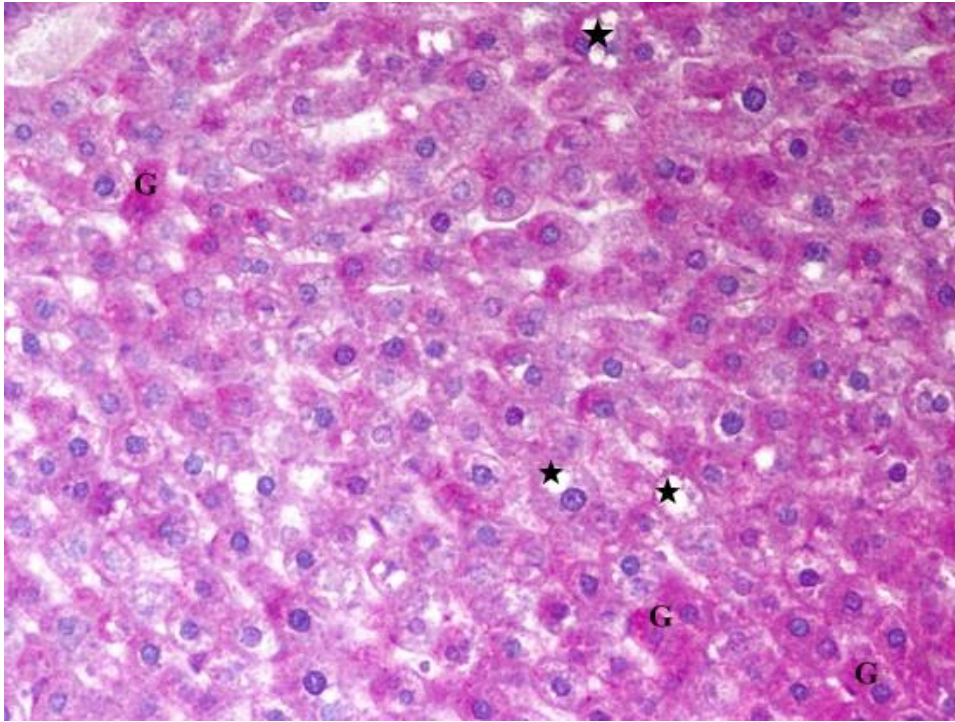
PAS boyamada yağlanmanın oldukça azaldığı görüldü. Glukojen içeren hücreler normal yoğunlukta idi (Resim 3.32).



Resim 3.30. KY + Gal 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★: Yağ damlacığı) (16h; H-E; X100).



Resim 3.31. KY+Gal 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★: Yağ damlacığı) (16h; Masson trikrom; X100).



Resim 3.32. KY+Gal 50 grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glikojen, ★: Yağ damlacığı) (16h; PAS; X200)

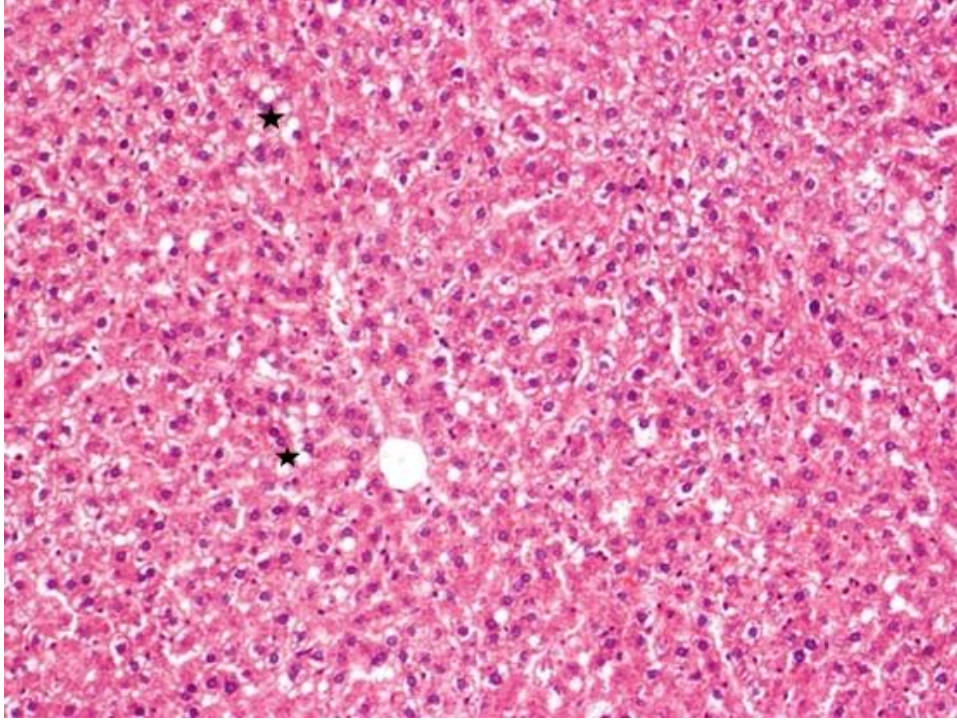
### 3.2.3.c. Yüksek Yağ İçerikli Diyete Ek Olarak 100mg/kg/gün Gallik Asit Verilen Grubun Karaciğer Dokusu

H-E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış yağlanmaya ek olarak, 100 mg/kg/gün gallik asit verilen grupta, 1. derecede yağlanmanın bulunduğu diğer tüm histolojik özelliklerin normal karaciğer görünümüne yakın olduğu gözlemlendi

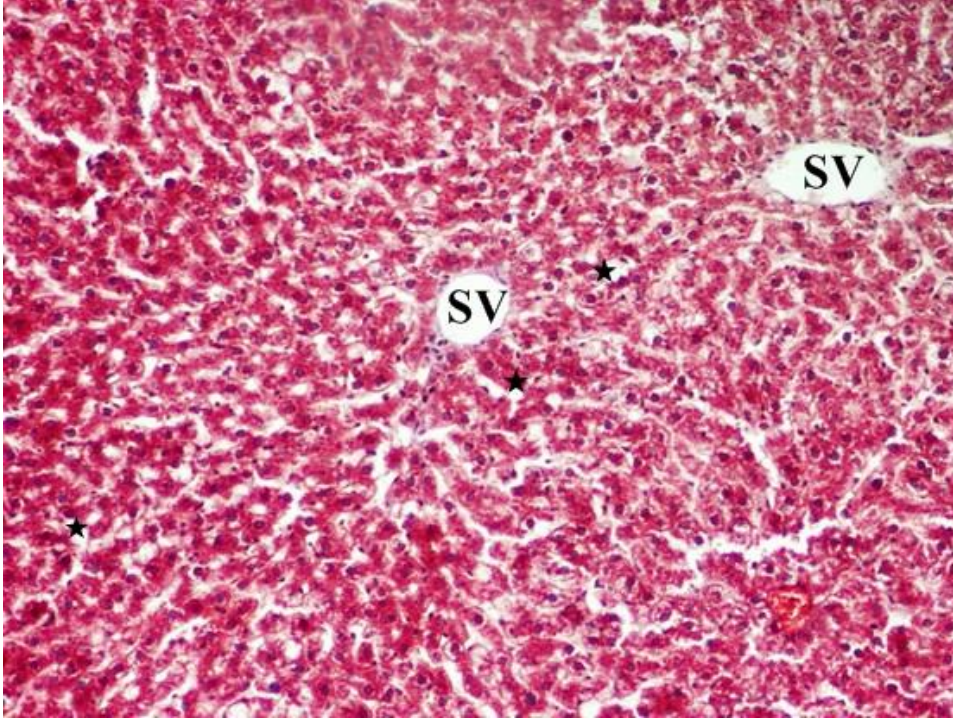
H-E boyamada, hepatositlerin sitoplazmasında hafif mikroveziküler yağ damlacıkları belirlendi, mononükleer hücre infiltrasyonları ve balonlaşmış hepatositler görülmedi (Resim 3.33).

Masson trikrom boyamada, H-E boyamaya paralel olarak hafif mikroveziküler yağ damlacıkları gözlemlendi. Mononükleer hücre infiltrasyonları ve balonlaşmış hepatositler gözlemlenmedi (Resim 3.34).

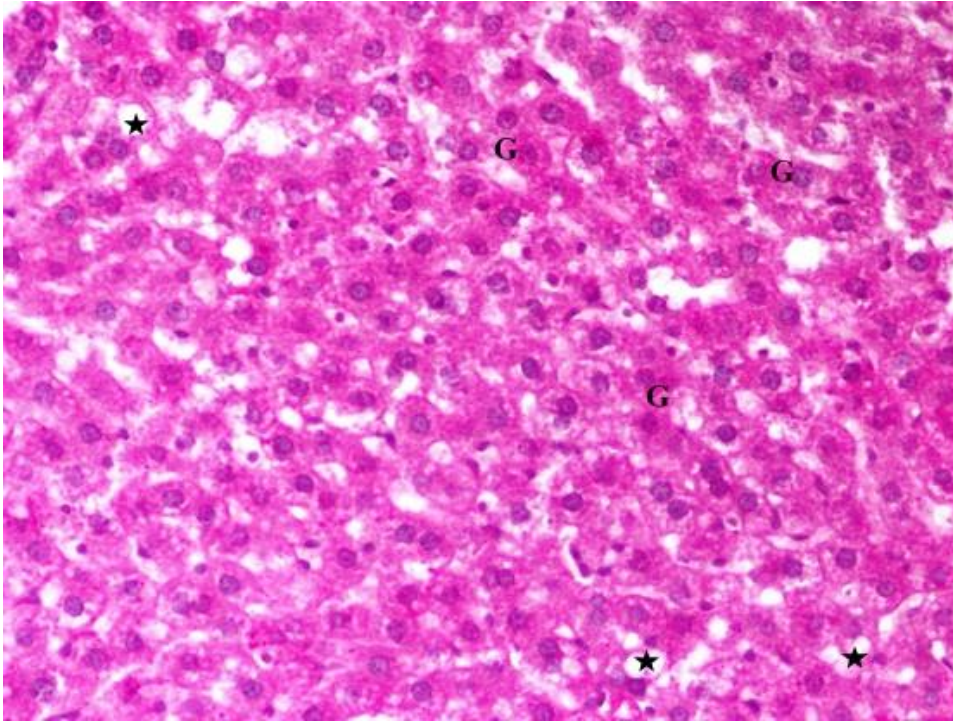
PAS boyamada, H-E ve Masson trikrom boyamaya paralel bulgular vardı. Glukojen içeriği kontrole yakındı (Resim 3.35).



Resim 3.33. KY + Gal 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (★: Yağ damlacığı) (16h; H-E; X100).



Resim 3.34. KY+Gal 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (SV: Sentral Ven, ★: Yağ damlacığı) (16h; Masson trikrom; X100).



Resim 3.35. KY+Gal 100 grubu karaciğer dokusunun görünümü (G: Glikojen, ★ : Yağ damlacığı) (16h; PAS; X200).

### 3. 2. 4. Elektron Mikroskopik İnceleme

Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun elektron mikroskopik incelemesinde, karaciğer hücresinin çekirdeği ve çekirdekçığının normal görünümdeydi. Çekirdeğin etrafını kuşatan mitokondriyon ve granüllü endoplazmik retikulumlar şekil ve boyut olarak normal görünüme sahipti. Hepatositlerin sinüzoidal alana bakan kısımda mikrovillusları izlenmekteydi (Şekil 3.36).

Yağlanma oluşturulan karaciğerin elektron mikroskopik incelemesinde, hepatosit içerisinde çok sayıda makro ve mikroveziküler yağ damlacıkları görüldü. Hepatosit çekirdeğinde şekil bozukluğu meydana gelmiş olup mitokondriyonlar kontrol grubuna göre daha büyük yapıda ve kristalarında bozulmalar gözlemlendi (Resim 3.37).

10mg/kg/gün kateşin verilen grupta yağlanmanın mikro ve makroveziküler yağ damlacıkları şeklinde devam ettiği belirlendi. Mitokondriyonlar ve çekirdek normal görünüme sahipti (Resim 3.38).

50mg/kg/gün kateşin verilen grupta yağlanmanın mikro ve makroveziküler yağ damlacıkları şeklinde devam ettiği görüldü. Mitokondriyonlar ve çekirdek normal görünüme sahipti (Şekil 3.39).

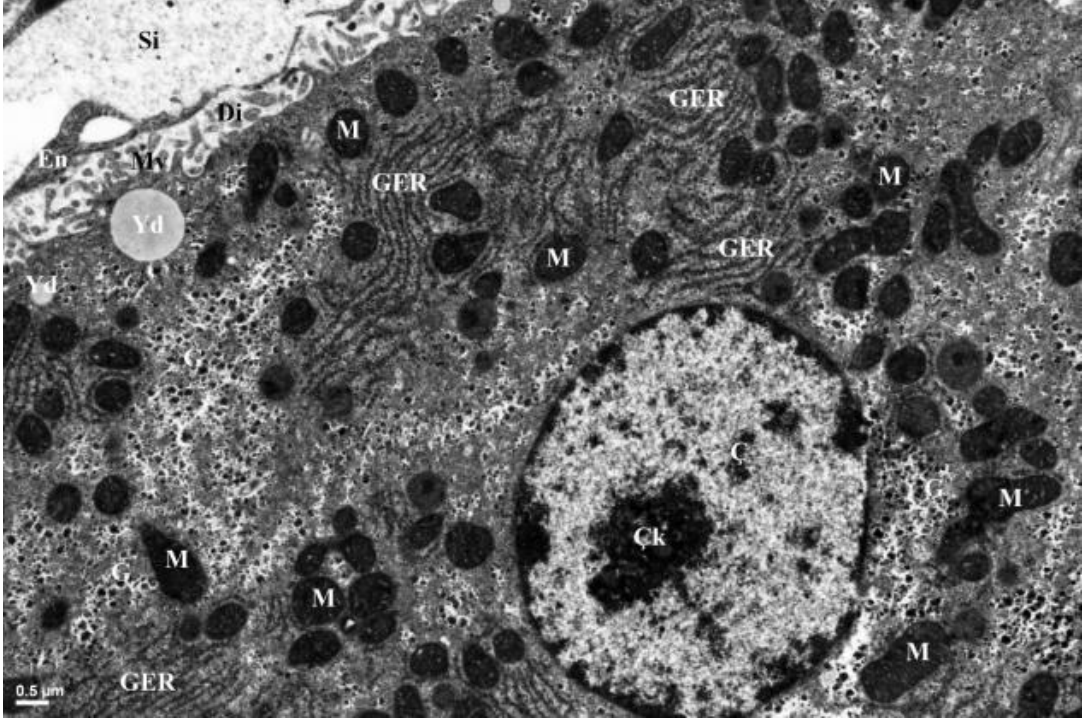
100mg/kg/gün kateşin verilen grupta yağlanmanın mikro ve makroveziküler yağ damlacıkları şeklinde devam ettiği gözlemlendi. Mitokondriyonlar ve çekirdek normal görünüme sahiptir (Resim 3.40).

10mg/kg/gün gallik asit verilen grupta yağlanmanın makroveziküler yağ damlacıkları şeklinde devam ettiği görüldü (Resim 3.41).

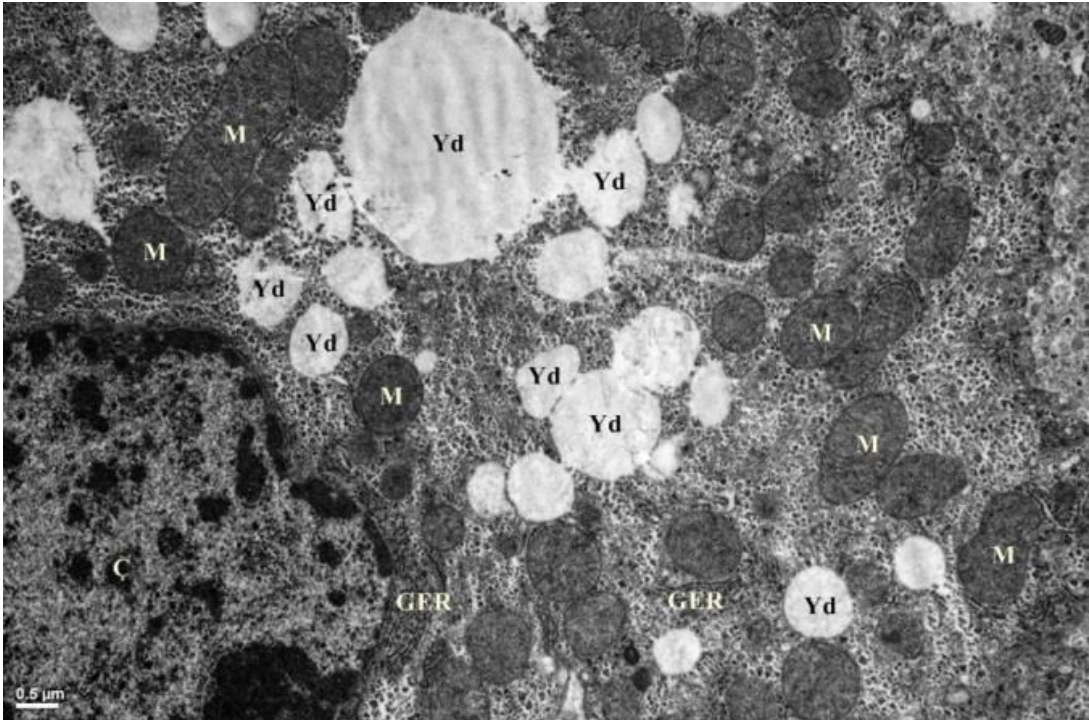
50mg/kg/gün gallik asit verilen grupta yağlanmanın azaldığı ve mikroveziküler yağ damlacıkları şeklinde devam ettiği belirlendi (Resim 3.42).

100mg/kg/gün gallik asit verilen grupta yağlanmanın azaldığı ve genellikle mikroveziküler yağ damlacıkları şeklinde devam ettiği görüldü (Resim 3.43).

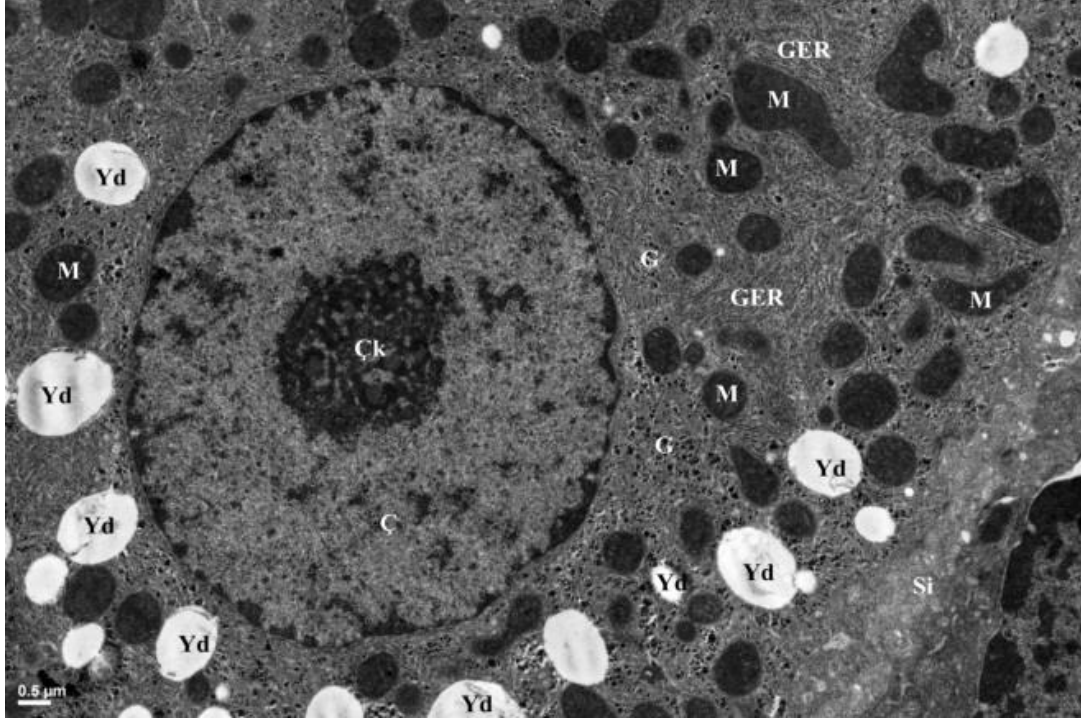




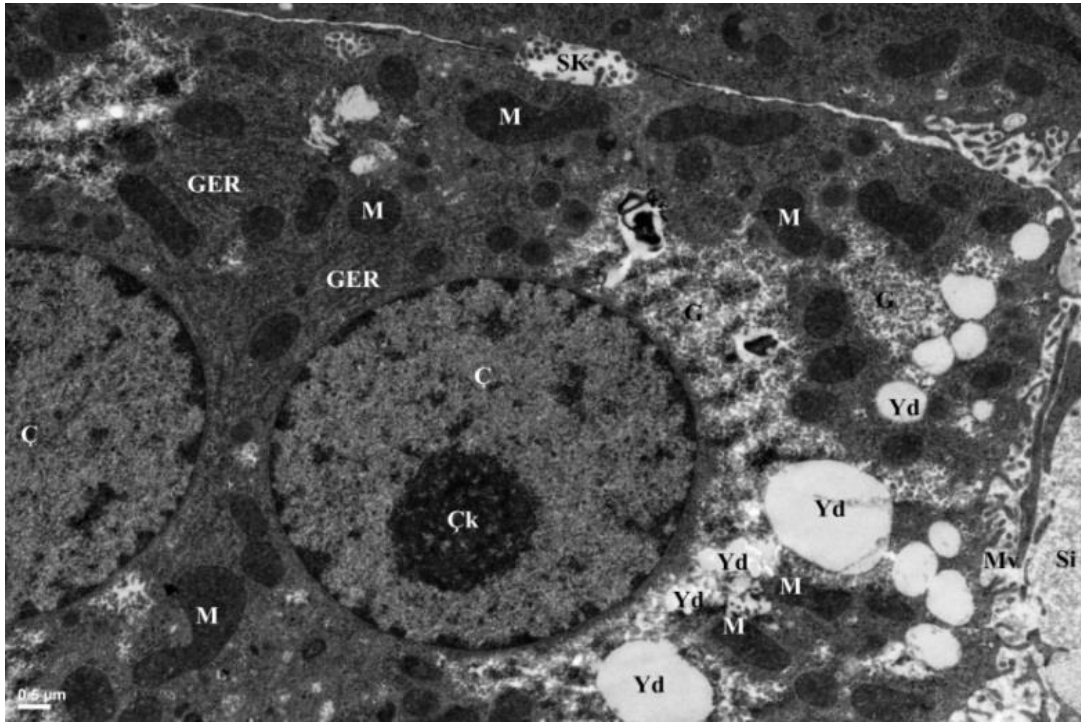
Resim 3.36. Kontrol grubunda karaciğer epitel hücresi. **Ç**: Çekirdek, **Çk**: Çekirdekçik, **Di**: Disse aralığı, **E**: Endotel hücresi, **G**: Glukojen, **GER**: Granüler endoplazmik retikulum, **M**: Mitokondriyon, **Mv**: Mikrovillus, **Si**: Sinüzoidal aralık, **Yd**: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



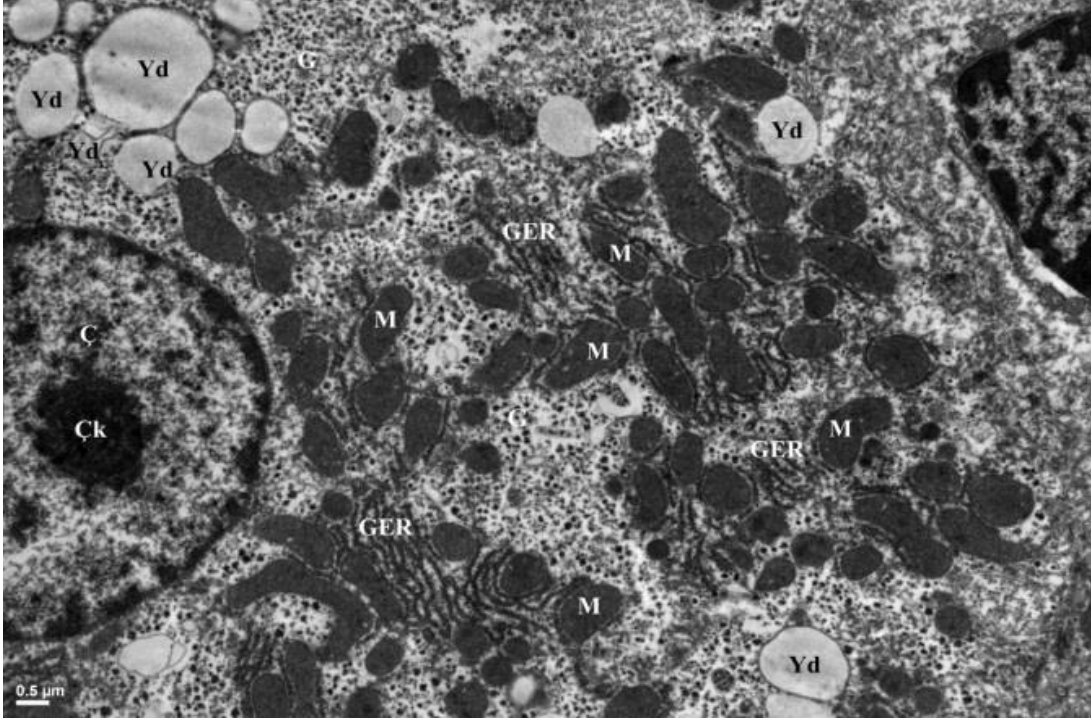
Resim 3.37. Yağlanma grubuna ait karaciğer epitel hücresi. **Ç**: Çekirdek, **GER**: Granüler endoplazmik retikulum, **M**: Mitokondriyon, **Yd**: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



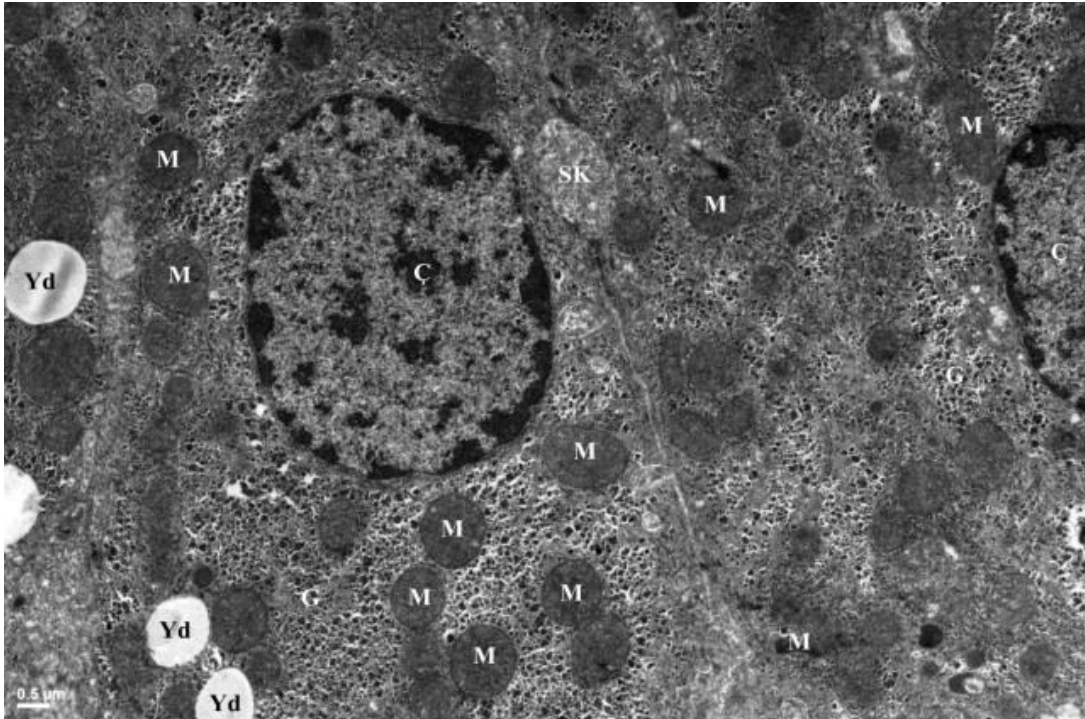
Resim 3.38. KY+Kat 10 grubunda karaciğer epitel hücresi. Ç: Çekirdek, Çk: Çekirdekçik, G: Glukojen, GER: Granüler endoplazmik retikulum, M: Mitokondriyon, Si: Sinüzoidal aralık, Yd: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



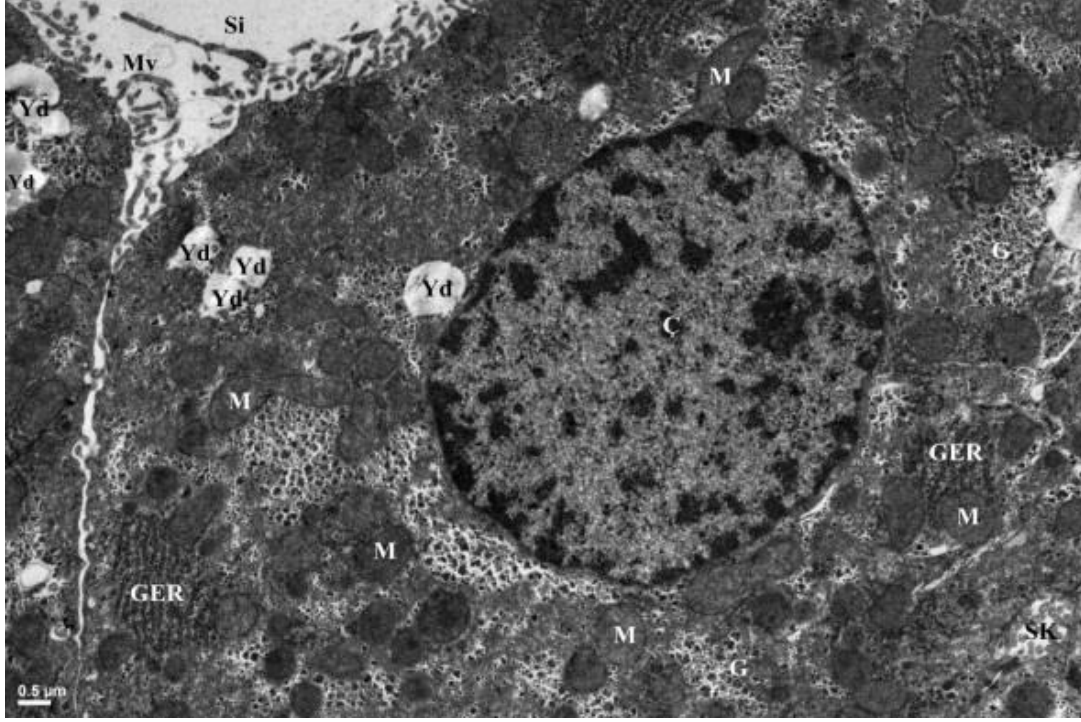
Resim 3.39. KY+Kat 50 grubunda karaciğer epitel hücresi. Ç: Çekirdek, Çk: Çekirdekçik, GER: Granüler endoplazmik retikulum, M: Mitokondriyon, Mv: Mikrovillus, SK: Safrakanalikülü, Si: Sinüzoidal aralık, Yd: Yağ damlacığı, Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



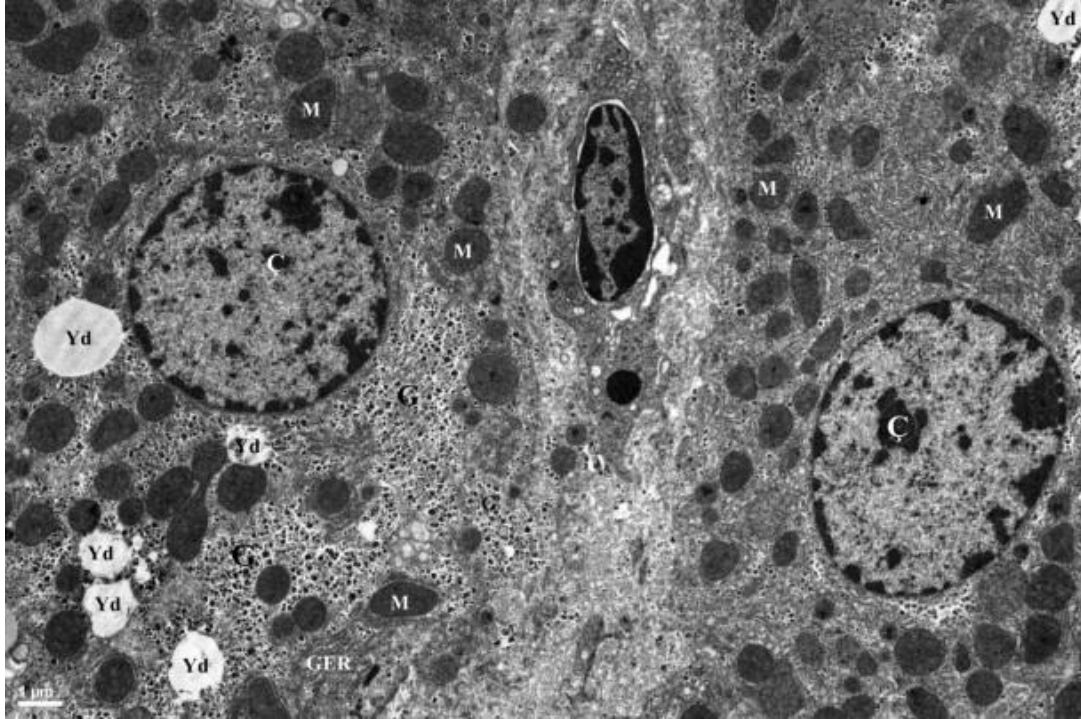
Resim 3. 40. KY+Kat 100 grubunda karaciğer epitel hücresi. Ç: Çekirdek, Çk: Çekirdekçik, G: Glukojen, GER: Granüler endoplazmik retikulum, M: Mitokondriyon, Yd: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



Resim 3.41. KY+Gal 10 grubunda karaciğer epitel hücresi. Ç: Çekirdek, G: Glukojen, M: Mitokondriyon, SK: Safrakanalikulü, Yd: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



Resim 3.42. KY+Gal 50 grubunda karaciğer epitel hücresi Ç: Çekirdek, G: Glukojen, GER: Granüler endoplazmik retikulum, M: Mitokondriyon, SK: Safra kanalicülü, Yd: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).



Resim 3.43. KY+Gal 100 grubunda karaciğer epitel hücresi Ç: Çekirdek, G: Glukojen, GER: Granüler endoplazmik retikulum, M: Mitokondriyon, Yd: Yağ damlacığı. Kurşun sitrat- Uranil asetat (16h; Bar: 0,5µm).

### 3.2.5. iNOS Enzim Aktivitesi

iNOS immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu, iNOS immünreaktivitesi sentral ven etrafında hepatositlerin sitoplazmasında kahverengi granüller şeklinde (siyah ok) görüldü. KY grubu (Şekil 3. 44b), kontrol dâhil tüm gruplarla karşılaştırıldığında, iNOS immün reaktivitesinde anlamlı bir artış vardı ( $p<0,05$ ). KY (Şekil 3. 44 b), KY+KA (10mg/kg/gün) (Şekil 3. 44 c), KY+KA (50mg/kg/gün) (Şekil 3.44 d), KY+KA (100mg/kg/gün) (Şekil 3.44 e) ve KY+GA (10mg/kg/gün) (Şekil 3.44 f) gruplarında kontrol grubuyla (Şekil 3.44 a) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. KY+GA (50mg/kg/gün) (Şekil 3. 44 g) ve KY+GA (100mg/kg/gün) (Şekil 3.44 h) gruplar diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlendi ve sonuçlar kontrole yakındı ( $0,38 \pm 0,04$  ve  $0,38 \pm 0,04$ ). iNOS immünreaktivitesi histoskoru çizelge 3.6'da verildi.

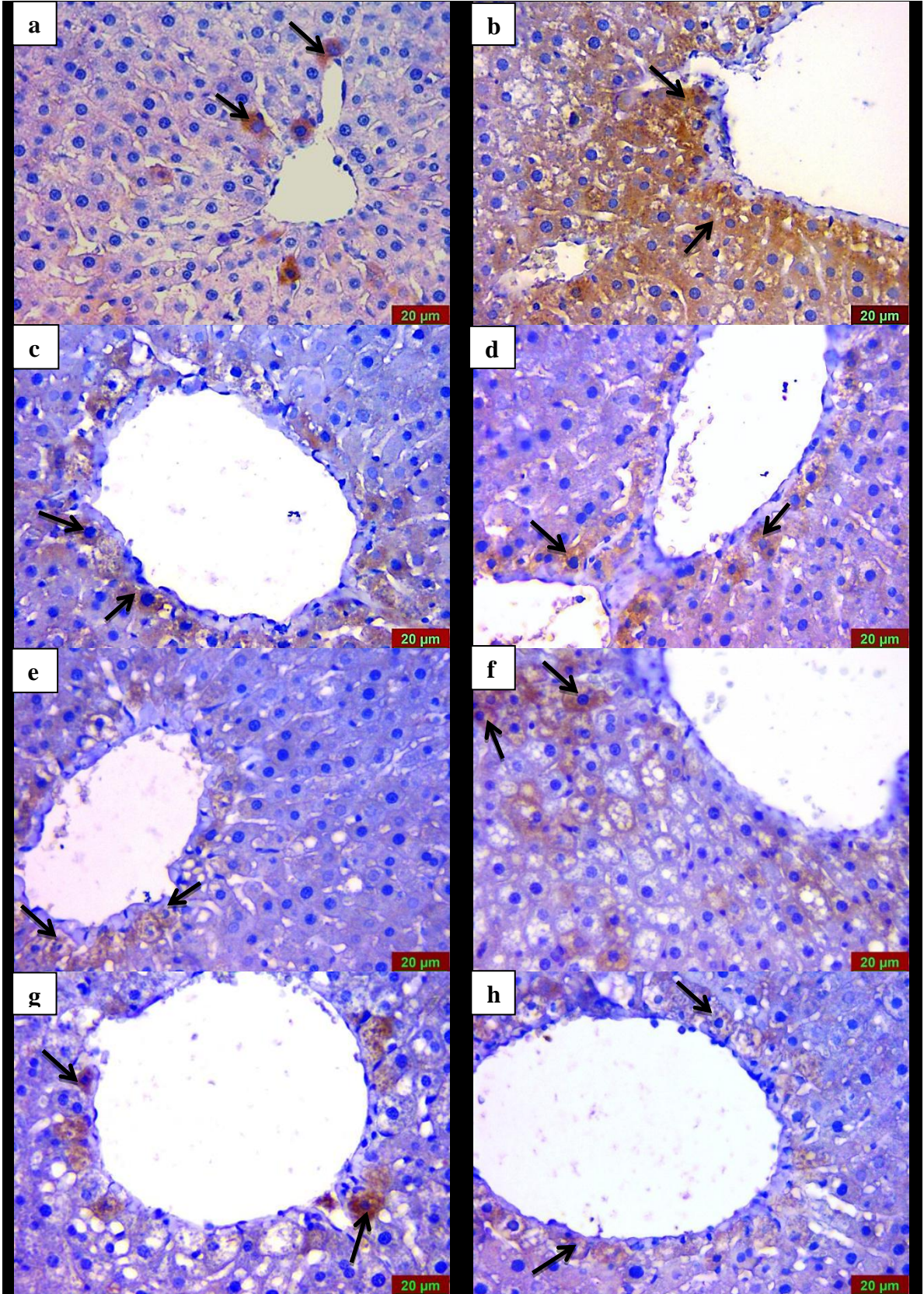
Çizelge 3. 6. iNOS immünreaktivitesi histoskoru

Grup	Histoskor (Yaygınlık x Şiddet)
K	$0,36 \pm 0,05^b$
KY	$2,57 \pm 0,34^{a,b}$
KY+KA (10mg/kg/gün)	$1,06 \pm 0,20^{a,b}$
KY+KA (50mg/kg/gün)	$0,73 \pm 0,10^{a,b}$
KY+KA (100mg/kg/gün)	$0,88 \pm 0,04^{a,b}$
KY+GA (10mg/kg/gün)	$0,86 \pm 0,05^{a,b}$
KY+GA (50mg/kg/gün)	$0,38 \pm 0,04^b$
KY+GA (100mg/kg/gün)	$0,38 \pm 0,04^b$

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> Karaciğer yağlanması grubuna göre karşılaştırıldığında ( $p<0,05$ )



Resim 3.44. iNOS enziminin immünohistokimyasal reaksiyonu. a: Kontrol grubu, b: Yağlanma grubu, c: KY + Kat 10, d: KY + Kat 50, e: KY + Kat 100, f: KY + Gal 10, g: KY + Gal 50, h: KY + Gal 100 gruplarına aittir.

### 3.2.6. Biyokimyasal Analizler

#### 3.2.6.a. Serum ALT ve AST Değerleri

Çalışmamızda K grubuyla karşılaştırıldığında, tüm grupların serum ALT değerlerinde yükselme gözlenirken ( $p < 0,05$ ) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p > 0,05$ ). (Çizelge 3. 7). AST değerleri ise gruplar arasında farklılıklar vardı. Buna göre; K grubuyla karşılaştırıldığında KY, KY+Kat 10 ve KY +Gal 10 gruplarında AST değerleri artış meydana geldi. KY grubuyla karşılaştırıldığında ise KY + Gal 50 grubunda azalma oldu. KY +Gal 10 grubu ile karşılaştırıldığında KY + Gal 50, KY + Kat 50 ve KY + Kat 100 gruplarında AST değerleri azaldı (Çizelge 3.7).

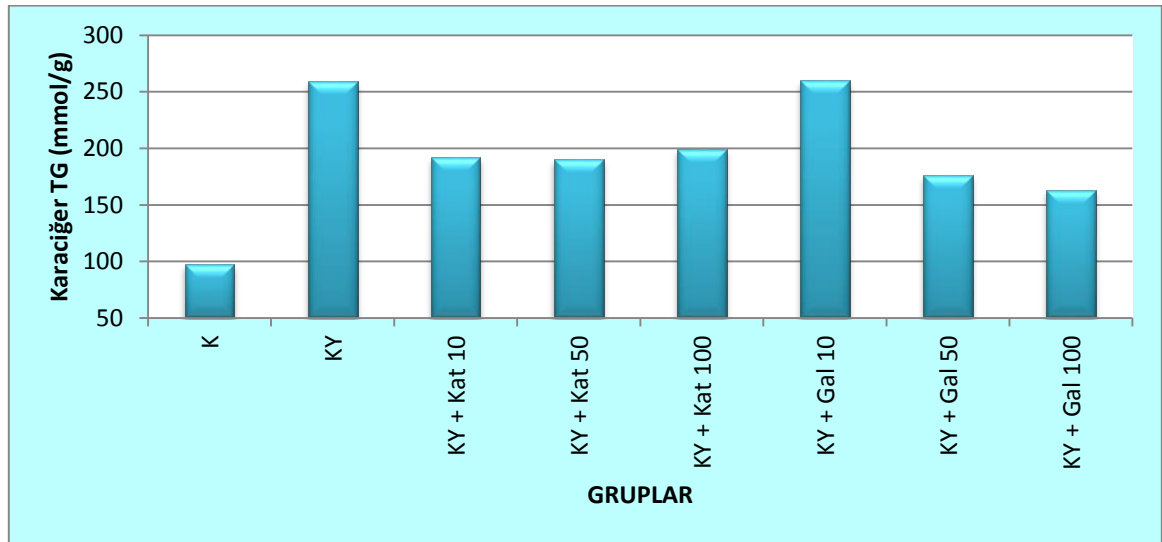
Çizelge 3. 7. Serum ALT, AST değerleri

Grup	ALT	AST	AST
	Ortalama $\pm$ ss	Ortalama $\pm$ ss	Persantil
K	48,13 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>	108,5 $\pm$ 13,85 <sup>b</sup>	110,5 (97,5- 122)
KY	67,50 $\pm$ 9,59 <sup>a</sup>	150,62 $\pm$ 22,6 <sup>a</sup>	150 (128,25- 174,25)
KY+Kat 10	69,63 $\pm$ 6,86a	149,37 $\pm$ 21,94 <sup>a</sup>	155,5 (128,75-168,50)
KY+Kat 50	74,63 $\pm$ 5,7a	119,87 $\pm$ 11,12 <sup>c</sup>	117 (112,25- 124,75)
KY+Kat 100	72,75 $\pm$ 9,37a	114,37 $\pm$ 15,36 <sup>c</sup>	115,5 (99,5- 126,75)
KY+Gal 10	65,75 $\pm$ 7,12a	167,87 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	164,5 (157- 188,5)
KY+Gal 50	68,13 $\pm$ 6,5a	113,25 $\pm$ 7,59 <sup>b,c</sup>	112,5 (106,25- 120,25)
KY+Gal 100	69,38 $\pm$ 12,04a	123,87 $\pm$ 10,72	128 (111,75- 131,25)

<sup>a</sup>: Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında , <sup>b</sup>:KY grubuna göre karşılaştırıldığında, c: KY +Gal 10 grubuna göre karşılaştırıldığında  $p < 0,05$

### 3.2.6.b. Serum TG Değerleri

Tüm grubundaki sıçanların serum TG içerikleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, önemli bir artış belirlendi. KY grubuyla karşılaştırıldığında KY + Gal 10 hariç tüm gruplarda TG içeriğinde azalma vardı. Serum TG değerinde en fazla azalma KY+ Gal 50 ve KY + Gal 100 gruplarında gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Serum TG değerleri

### 3. 2. 7. Karaciğer MDA, SOD, CAT ve GSH Aktiviteleri

K grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer dokularında MDA değerleri KY, KY + Kat10, KY + Kat 50, KY + Gal10 gruplarında daha yüksekti. KY grubuyla karşılaştırıldığında ise KY + Kat 100 ve KY + Gal 100 gruplarında MDA değerlerinde azalma gözlemlendi ve sonuçlar kontrole yakındı (Çizelge 3. 8).

SOD aktivitelerinde K grubuyla karşılaştırıldığında KY, KY +Kat 100, KY + Gal 100 ve KY+Gal 10 gruplarında azalma gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 3.8)

CAT değerlerinde gruplar arasında farklılık gözlemlenmedi ( $p > 0,05$ ) (Çizelge 3.8).

GSH değerleri K grubuyla karşılaştırıldığında, KY + Kat 100 hariç tüm gruplarda azalma gösterdi. KY grubuyla Ky + Kat 100 grubunda anlamlı bir fark gözlemlendi ve sonuç kontrole yakındı (Çizelge 3.8).



Çizelge 3. 8. MDA, SOD CAT

	MDA	SOD	CAT	GSH
	Ortalama ± SS	Medyan (25-75 persantil)	Ortalama ± SS	Medyan (25-75 persantil)
K	38,41 ± 5,22b	4,61 (4,08- 4,79)b	11,79 ± 5,05b	26,54 (16,16- 33,31)
KY	61,59 ± 8,33 <sup>a,c,d</sup>	2,83 (2,03- 3,28) <sup>a</sup>	7,43 ± 1,56a	11,07 (6,79- 13,66)
KY+Kat 10	63,48 ± 11,11 <sup>a,c,d</sup>	2,97 ( 2,81- 3,81)	9,40 ± 4,32	5,86 (3,07- 6,84) <sup>a,c</sup>
KY+Kat 50	68,97 ± 13,32 <sup>a,c,d</sup>	2,84 (2,46- 3,36)	9,55 ± 4,8	6,01 (2,88- 8,81) <sup>a,c</sup>
KY+Kat 100	41,73 ± 8,43b	2,58 (2,20- 2,68) <sup>a</sup>	6,62 ± 3,33a	19,23 (15,44- 21,74)
KY+Gal 10	61,83 ± 17,57 <sup>a,c,d</sup>	2,93 (2,01- 3,13) <sup>a</sup>	10,41 ± 5,08a	3,61 (1,5- 5,14) <sup>a,c</sup>
KY+Gal 50	53,75 ± 18,75	3,24 (2,76- 3,92)	11,68 ± 7,66	4,97 (3,91- 5,70) <sup>a,c</sup>
KY+Gal 100	39,73 ± 5,80b	2,67 (2,13- 3,04) <sup>a</sup>	7,87 ± 1,70a	6,80 (5,65- 7,57)

a: K grubuyla karşılaştırıldığında , b: KY grubuyla karşılaştırıldığında , c: KY + Kat 100 ile karşılaştırıldığında , d: KY + Gal 100 ile karşılaştırıldığında

#### 4. TARTIŞMA

Karaciğer vücudun en önemli organlarından birisidir. Karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon bozukluğu, vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Kimyasal maddeler, ilaçlar, alkol, karaciğer tümörleri, viral kökenli karaciğer hastalıkları, cerrahi girişimler ve kronik karaciğer hastalıkları gibi birçok etken, karaciğer dokusunun hasar görmesine neden olabilir. Kronik karaciğer hastalıklarının en yaygın sebeplerinden birisi olan karaciğer yağlanması; obezite, tip 2 diyabet ve insülin direnciyle yakından ilişkilidir. Karaciğerde yağlanma son yıllarda oldukça artış göstermiş ve bunun neticesinde, karaciğer yağlanmasının tedavisi ve önlenmesi üzerine çalışmalar da artmıştır (Seo ve ark 2012, Charradi ve ark 2013, Li ve ark 2014). Karaciğer yağlanması, oksidatif stresi de içerdiğinden, genellikle yapılan çalışmalar lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi önleyici maddeler üzerine odaklanmıştır. Bu bağlamda hastalıkla ilişkili çeşitli deneysel yağlanma modelleri geliştirilmiştir. Sıçanlarda deneysel yağlı karaciğer modeli kimyasallar ya da diyet aracılığıyla oluşturulabilmektedir. Karbontetraklorür, merkürük klorid, etanol ve paraquat gibi maddeler, kimyasallar yoluyla uyarılan karaciğer yağlanmasında, en çok kullanılan deneysel yağlanma modelidir (Tsuchiya 1996, Dai ve ark 2014, Huang ve ark 2014, Joshi ve ark 2014). Diyet aracılığıyla oluşturulan yağlanma modellerinde ise, çeşitli maddelerden yoksun diyetler (örn; MCD diyet) veya yüksek yağ içerikli diyetler kullanılabilir (Samuhasaneeto ve ark 2007, Sugimoto ve ark 2010, Charradi ve ark 2014, Handayani ve ark 2014).

Çalışmamızda insanlarda da yağlanmanın en büyük etkeni olan yüksek yağ içerikli diyet ile, sıçanlarda karaciğer yağlanması oluşturulmuştur. Yüksek yağ içerikli diyetle oluşturulan yağlanma modellerinde yağ içeriğine, diyetin sıvı ya da katı oluşuna ve uygulama süresine bağlı olarak değişiklikler olabilmektedir. Çalışmamızda % 45 yağ içerikli katı diyet ile 10 haftalık ve 16 haftalık süreçlerde, sıçanlarda karaciğer yağlanması oluşturuldu. Ön çalışma amacıyla, sıçanlar 10 hafta süreyle HFD ile beslendi. Karaciğer yağlanması tespit edildikten sonra, gerekli derecelendirme yapılarak, 6 hafta süreyle etken madde uygulamasına geçildi. Oluşturulan karaciğer yağlanmasında farklı dozlarda kateşin ve gallik asitin etkisi; vücut ağırlıkları, rölatif karaciğer ağırlıkları, H-E, masson trikrom, PAS ve toluidin blue gibi boyalarla ışık mikroskopik incelemeleri, ince yapı düzeyinde değerlendirme, iNOS enzim aktivitesinin belirlenmesi, biyokimyasal

olarak karaciğer fonksiyon testleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri araştırıldı.

10 haftalık ve 16 haftalık deney süreci sonunda, KY gruplarında K grubuna göre vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif artış meydana geldi. Sıçanların ilk ve son ağırlıklarından yola çıkılarak belirlenen vücut ağırlığındaki değişimin yüzdesi hesaplandığında, gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

Yüksek yağ içerikli diyet ile ilişkili karaciğer yağlanması çalışmalarının çoğunda HFD gruplarının vücut ağırlıklarında artış gözlenmiştir (Park ve ark 2011, JinQi ve ark 2013, Charradi ve ark 2014, Li ve ark 2014, Gao ve ark 2015). Bizim çalışmamıza paralel olarak Lieber'in yaptığı bir çalışmada ise (2003) oldukça yüksek (%70) yağ içerikli sıvı diyet kullanılmasına rağmen HFD ile kontrol gruplarının vücut ağırlıkları arasında fark olmadığını bildirmiştir (Lieber ve ark 2004). Karaciğer yağlanması paralelinde vücut ağırlıklarında bir artışa neden olmasına karşın, bizim çalışmamızda anlamlı bir fark gözlemlenmemizin sebebi muhtemelen, kullanmış olduğumuz diyetin, yağ içeriğine bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda farklı dozlardaki kateşin ve gallik asit uygulamalarında da vücut ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Mehra ve arkadaşlarının kateşinin koruyucu etkisi üzerine yaptığı çalışmada, kateşinin vücut ağırlığında azalmaya sebep olduğunu ileri sürmüşler (Mehra ve ark 2014). Bir başka çalışmada farklı dozlarda kateşin türevleri içeren yeşil çay ekstraktının, HFD diyetinde tedavi edici etkisinin araştırıldığı çalışmada, yeşil çay kateşininin vücut ağırlığını azalttığını söylenmiştir (JingQi ve ark 2013). Mehra ve ark çalışmasında, bizim çalışmamızdan farklı olarak kateşinin önleyici etkisine bakıldığından, diğer taraftan JinQi ve ark çalışmasında da farklı kateşin kullanıldığından dolayı farklılıklar olabilir. Gallik asidin HFD diyete ek olarak kullanıldığı çalışmalarda, bizim çalışmamızın aksine gallik asitin vücut ağırlığında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Hsu ve Yen 2007, Chao ve ark 2014,). Fakat bu çalışmalarda gallik asitin koruyucu etkisine bakıldığından dolayı bizim çalışmamızdan farklıdır. Ayrıca çalışmamızda kateşin ve gallik asiti, yağlanma oluşumundan sonra verdiğimizden dolayı vücut ağırlıklarına etkisi, yapılan çalışmalarla paralel değildir. Oluşan tüm farklılıkların tüketilen yemin yağ oranı ve içeriğindeki çeşitlilikten de kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Klasik rölatif karaciğer ağırlığı, karaciğer ağırlığının nihai vücut ağırlığına bölünerek 100 ile çarpılması sonucu elde edilmektedir. Çalışmada kullanılan sıçanların her birinin nihai vücut ağırlıkları birbirinden farklı olduğundan, karşılaştırma açısından rölatif karaciğer ağırlığı tek başına karaciğer ağırlığının verilmesinden daha objektif bir veri olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda rölatif karaciğer ağırlıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapılan araştırmaların bir kısmı çalışmamızı destekler niteliktedir (Lieber ve ark 2004, Wu ve ark 2009, Park ve ark 2011).

10 haftalık K grubunda H-E, masson trikrom, PAS ve toluidin blue boyamalarında, karaciğer normal histolojik görünümdeydi. 10 haftalık KY grubunda ise 3. derecede yağlanmayı içeren makroveziküler ve mikroveziküler yağ damlacıkları gözlemiştik. Bu tabloya göre çalışmamızda, 10 haftada %45 yağ içerikli diyetle 3. derecede yağlanma tespit etmiştik. Yapılan birçok çalışmada kullanılan diyetin içeriğindeki yağ miktarı ve uygulama süresinin farklı derecelerde yağlanmalara neden olduğu gösterilmiştir (Lieber ve ark 2004, Li ve ark 2014, Zou ve ark 2014).

Lieberin 2004 yılında yaptığı çalışmada, %71 oranında yağlı diyetle 3 haftada sıçanlarda NAFLD modeli oluşturulmuş ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen grupta steatozis, inflamasyon ve erken fibrozis gözlenmiştir (Lieber ve ark 2004). Zou'nun (2014) %77 yağ içerikli HFD sıvı diyetle, 6 haftada oluşturduğu yağlanma modelinde artmış steatoz, inflamasyon ve nekroz oluşumu rapor edilmiştir (Zou ve ark 2014). Mohan ve arkadaşlarının (2012) yaptığı 8 haftalık HFD diyet uygulamasında, histolojik olarak steatoz ve balonlaşmaların olduğunu belirtmiştir (Mohan ve ark 2012). Li'nin (2014) yaptığı çalışmada aynı yağ oranına sahip diyetin, 8 haftalık süreçte bizim çalışmamıza benzer olarak yoğun steatoz meydana gelmiştir (Li ve ark 2014). Lieber, Zou ve Mohan'ın yaptığı çalışmalarda HFD diyet yağ içeriği ve uygulama süresindeki farklılıkların, bizim çalışmamızdan farklı sonuçlar elde etmelerine sebep olabileceğini düşünmekteyiz (Lieber ve ark 2004, , Mohan ve ark 2012, Zou ve ark 2014).

16 haftalık K grubunda H-E, Masson trikrom ve PAS boyamayla karaciğerin ışık mikroskopik yapısının normal görünümde olduğu gözlenmişti. 16 haftalık KY grubunda, ise karaciğerin TG içeriğindeki önemli artışa bağlı olarak 3. derecede yağlanma meydana geldiğini gözlemiştik. Hepatositler içerisinde yağ damlacıkları, bazı hepatositlerde balonlaşmalar, hidropik dejenerasyon, lobüler alanda yoğun mononükleer hücre

infiltrasyonu, granüler ve vakuoler dejenerasyonlar, sinüzoidal dilatasyonlar tespit etmiştik. Masson trikrom boyamalarında herhangi bir bağ dokusu artışı gözlememiştik.

Kateşin ve gallik asit uygulanan sıçanlarda, KY + Kat 10 grubunda karaciğer histolojik olarak HFD grubuna benzer bulgulara sahipti. KY + Kat 50 grubunda 2. derecede yağlanma, hidropik dejenerasyonların azaldığı fakat balonlaşmanın devam ettiğini görmüştük. KY + Kat 100 grubunda ise yağlanmanın 2. derecede olduğu, hepatositlerde balonlaşmanın, portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonlarının azaldığını gözlemlemiştik. KY + Gal 10 grubunda 2. derecede yağlanmaya ek olarak hepatositlerde balonlaşmanın, portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonlarının devam ettiği görülmüştü. KY +Gal 50 grubunda 2. derecede yağlanma gözlemlemiştik. Mononükleer hücre infiltrasyonları ve balonlaşmış hepatositler tespit etmiştik. KY + Gal 100 grubunda ise yağlanmanın 1. derecede olduğu ve sonuçların kontrole yakın olduğu görmüştük.

Kateşin türevleri ve gallik asitin NAFLD üzerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamızdaki amaç, farklı dozlarda gallik asit ve kateşinin karaciğer yağlanmasının tedavisinde etkisini araştırmak olduğundan, tedavi edici etki üzerine çalışmalara literatürde rastlayamadık. Fakat kateşin ve gallik asitin koruyucu etkileriyle ilgili birçok araştırmaların olduğunu gördük. Bunlardan; % 60 yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarda 1g/L EGCG 6 hafta uygulandığında, yağ vakuollerinin azaldığı ve karaciğer hepatik inflamatuvar hücre infiltrasyonlarının küçüldüğü belirtilmiştir (Kuzu ve ark 2008).

Jang (2008) çalışmasında farelere HFD diyete ek olarak 7 hafta %1 oranında gallik asit vermiş ve HFD ile beslenmede önemli derecede yağ damlacık oluşumunu ve gallik asit uygulaması ile yağ damlacıklarının azaldığı bildirmiştir (Jang ve ark 2008).

Xiao ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada, 8 haftalık % 30 luk yağ ile oluşturulan NAFLD karaciğer yağlanmasında, haftada 3 kez 50 mg epigallokateşin uygulan ve NAFLD grubunda aşırı miktarda stoplazmik vakuoller, inflamasyon, nekroz görülürken, kateşinle bulguların düzeldiğini rapor etmiştir (Xiao ve ark 2014).

Kateşin ve gallik asitin antioksidan özelliklerinden dolayı, HFD ile oluşturulan karaciğer yağlanmasında yağlanmayı azaltıcı etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda 10 ve 16 hafta KY gruplarında organel bazında mitokondriyonların diğer gruplara göre daha hipertrofik olduğu, krista yapılarında bozulmalar meydana geldiğini gözlemlemiştik. 16 haftalık KY grubunda, bu bulgular 10 haftalık KY grubundan daha baskındı. Dolayısıyla karaciğer yağlanma durumunda gelişen oksidatif stresle ROS'lar açığa çıkmakta ve açığa çıkan bu biyolojik unsurlar hasar oluşturucu etkilerini mitokondriyon membranda gerçekleştirdiklerini öne sürülmüştür (Hirsch ve ark 1998, Turrens 2003). Başka bir çalışmada da bu organeldeki lipid peroksidasyonu ile bağlantılı olarak, zar akışkanlığının azalmasıyla ilişkili olarak süperoksit anyonlarında artış meydana geldiği gözlenmiş ve oluşan bu süperoksit anyon artışını da mitokondriyonlarda yapısal bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (Rafique ve ark 2001).

%71 yağ içerikli sıvı diyetle 3 haftada ve %77'lik yağ içerikli katı diyet, 6 haftada oluşturulan NAFLD modelinde, elektron mikroskopide mitokondriyal matrikste çalışmamızla uyumlu olarak seyrelme ve krista kaybı gözlemlendiği belirtilmiştir (Lieber ve ark 2004, Zou ve ark 2014). Karaciğer epitel hücrelerinin mitokondriyonlarında oluşan hipertrofi ve kristalarında azalma oksidatif stresle ortaya çıkan ROS'ların membran geçirgenliğinde değişiklik yapmasına ve lipid peroksidasyonu ile zar akışkanlığının bozulmasıyla oluşan süperoksit anyon artışının, hepatositlerde hasarlanma oluşturduğunu söyleyebiliriz.

NAFLD'de olduğu gibi, iNOS enzimi inflamasyon sırasında NO üretiminde artış meydana getirerek doku hasarına katkıda bulunmaktadır (Yoneda ve ark 2009). Ortamdaki NO artışı süperoksit anyonuyla reaksiyona girip, proteinlerin nitrasyonuna yol açıp peroksi nitriti üretebilir. Ayrıca reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin şekillenmesine yol açabilir (Salamone ve ark 2012).

Çalışmamızda 10 hafta ve 16 hafta süreyle oluşturulan karaciğer yağlanmasında iNOS enzim aktivitesinde, KY grubunda K grubuna göre önemli oranda artış meydana geldiğini gözlemiştik. KY grubundaki iNOS'un artışı, inflamasyonu göstermektedir. KY grubuyla karşılaştırıldığında, tüm gruplarda iNOS aktivitesinde azalma meydana geldiğini gözlemiştik. İnflamasyon ve dolayısıyla oksidatif stresin azaldığı durumlarda, iNOS aktivitesi de baskılanmaktadır (Salamone ve ark 2012). Çalışmamızda KY + Gal 50 ve KY + Gal 100 gruplarında, iNOS değeri kontrole yakın bulunmuştur. Muhtemelen 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün gallik asit uygulaması, inflamasyonu baskılayarak iNOS değerleri normale yaklaştırmıştır. Kateşin ve gallik asitin HFD ile beslenen sıçanlarda

iNOS aktivitesine etkisi üzerine çalışma bulunamamıştır. iNOS enzimidaki bu baskılanma, oksidatif stres tarafından oluşturulan karaciğer hasarının azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Karaciğer yağlanması temelde belirteçlerinden biri serum TG değeridir. HFD diyet uygulandığında, karaciğere yağ alımı ve oksidasyonu, arasındaki denge bozulduğunda karaciğerde yağ asitleri ve dolayısıyla da TG değeri artmaktadır. Çalışmamızda 10 haftalık ve 16 haftalık HFD diyet uygulamasında tüm gruplarındaki serum TG değerleri, önceki çalışmalarla paralellik göstererek kontrol grubundan yüksek bulmuştuk (Hsu ve Yen 2007, Park ve ark 2011, Chao ve ark 2014, Li ve ark 2014, Gao ve ark 2015). KY + Gal 10 hariç tüm gruplarda TG içeriği KY grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı. En fazla azalma KY+ Gal 50 ve KY + Gal 100 gruplarında gözlenmişti ( $p < 0,05$ ). Buna göre kateşin ve gallik asitin 10mg/kg/gün gallik asit hariç tüm uygulanan dozlarının karaciğer lipid düzeylerinde etkisi olduğunu düşünmekteyiz. Karaciğer lipid düzeyini azaltmada 50 ve 100 mg/kg/gün gallik asitin aynı derecede etkili olduğunu söyleyebiliriz. JinQi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı kateşin içeriğine sahip yeşil çay ekstraktının çalışmamızda olduğu gibi, TG değerlerinde azalmaya sebep olduğunu belirtmektedir (JinQi ve ark 2013). Gallik asidin koruyucu etkisi üzerine yapılan diğer bir çalışmada, HFD diyete 50 ve 100mg gallik asit eklenmesinin verilerimize paralel olarak TG değerinde azalma meydana getirdiği görülmüştür (Hsu ve Yen 2007). Gallik asitin TG değerindeki azalmaya sebep olan, etkisi daha önceden tanımlanan hipolipidemik etkisiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Jang ve ark 2008). PPAR- $\alpha$ , yağ asidi oksidasyonunu, transkripsiyonel düzeyde ayarlayan karaciğer yağ asidi duyarlı bir çekirdek reseptördür. PPAR  $\alpha$  aktivasyonu, karaciğere SYA alımını, SYA'nın hücre içinde taşınmasını, SYA'nın mitokondriye taşınmasını ve oksidasyonunu artırır. Kateşinle yapılan çalışmaya paralel olarak, PPAR  $\alpha$  reseptörlerinin modülasyonu TG değerinde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir (JinQi ve ark 2013).

Serum ALT ve AST değerleri, erken akut karaciğer hasarının biyokimyasal işaretçileri olarak kullanılmaktadır. 10 ve 16 haftalık KY gruplarında ALT ve AST değerlerinin K grubundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). 16 haftalık grupların ALT değerlerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözleyemezken ( $p > 0,05$ ) AST değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar vardı ( $p < 0.05$ ). Buna göre; K grubuyla karşılaştırıldığında KY, KY + Kat 10 ve KY +Gal 10 gruplarında AST

değerleri artış meydana gelmişti. KY grubuyla karşılaştırıldığında ise KY + Gal 50 grubunda azalma olmuştu. KY +Gal 10 grubu ile karşılaştırıldığında KY + Gal 50, KY + Kat 50 ve KY + Kat 100 gruplarında AST değerleri azalmıştı. Çalışmamıza paralel olarak HFD diyetle 50 ve 100 mg/kg/gün gallik asit uygulamasında ALT değerlerinde fark gözlenmezken, 50mg/kg/gün gallik asit verilmesinin AST değerlerinde en etkili olduğu Chao (2014) tarafından bildirilmiştir (Chao ve ark 2014).

Buna göre KY gruplarının K grubuyla karşılaştırıldığında, HFD diyetle oluşan karaciğer yağlanması, organın metabolizma ve detoksifikasyon faaliyetlerinde meydana gelen değişmelerin sonucu organda hasar oluştuğunu söyleyebiliriz. Doku hasar gördüğünde, karaciğer enzimleri kan dolaşımına salınmakta ve yaygın doku harabiyetiyle de kandaki konsantrasyonları artmaktadır (Niki 1987). KY gruplarında karaciğer hasarından dolayı ALT ve AST değerleri serumda artış gözlenmişti. Bu sonuçlar KY, KY + Kat 10 ve KY +Gal 10 gruplarında karaciğer hasarının devam ettiğini fakat KY + Gal 50 grubunun da karaciğer hasarını iyileştirmede en etkili olduğunu göstermektedir.

Hsu ve Yen 'in çalışmasında da HFD diyetle ek olarak kullanılan 50 ve 100 mg gallik asitin, ALT ve AST değerlerini etkilemediği rapor edilmiştir (Hsu ve Yen 2007). Bunun nedeni gallik asitin diyetle ek olarak verilmiş olması olabilir. Niho ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise normal diyetle farklı doz gallik asit eklenmesi, ALT ve AST değerlerini değiştirmemiştir. Bu durum gallik asitin herhangi bir yan etkiye yol açmadığını göstermektedir (Niho ve ark 2001).

Leptin içermeyen (ob/ob) farelerle yapılan çalışmada, 6 hafta boyunca %1-2 yeşil çay ekstraktı ( %48 EGCG, %31 epigallokateşin ,%13 epikateşin gallat ve %8 epikateşin içeren) verildiğinde serum ALT ve AST değerlerinde düşüş olduğu belirtilmiştir. (Bruno ve ark 2008). Farklı bir çalışmada % 0.5-1 yeşil çay ekstraktı (%54 epigallokateşin, % 37 gallokateşin % 6 epikateşin gallat ve %3 EGCG) 6 hafta uygulandığında serum ALT seviyelerinde düşüş gözlendiğini söylemiştir (Park ve ark 2011). Deneysel olarak karaciğer hasarlanması oluşturulmuş sıçanlarda, 17 gün boyunca 50 mg kg gün kateşin verilmiş ve antioksidan etkisinden dolayı ALT ve AST değerlerini düşürdüğü görülmüştür (Kobayashi ve ark 2010).

Buna göre; Kateşinin etkisindeki farklılık kateşinin türüne ve diyetle birlikte verilmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.



Çalışmamızda 10 ve 16 haftalık KY gruplarındaki MDA değerlerinin, K gruplarından daha yüksek olduğunu tespit etmiştik Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, karaciğer dokularında MDA değerlerinin KY, KY + Kat 10, KY + Kat 50, KY + Gal 10 gruplarında daha yüksek olduğunu gözlemlemiştik. KY grubuyla karşılaştırıldığında ise, KY + Kat 100 ve KY + Gal 100 gruplarında MDA değerlerinde azalma gözlemlenmişti ve veriler kontrole yakındı. 10 ve 16 haftalık KY gruplarındaki bu MDA artışı, oluşturulan karaciğer yağlanma modelindeki lipid peroksidasyonu artışını göstermektedir. Çünkü lipid peroksidasyonu, inflamatuvar cevabın aktivasyonunda ve hücre hasarının meydana gelmesinde rol oynayan MDA gibi ürünlerin üretilmesine sebep olmaktadır (Xiao ve ark 2014). Dolayısıyla karaciğer dokusunda MDA seviyesindeki artış, karaciğerde lipid peroksidasyonu belirteci olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızın bulguları araştırmacıların elde ettikleri bulgularla paralellik göstermektedir (Svegliati-Baroni ve ark 2006, Amin ve Nagy 2009, Charradi ve ark 2014).

Çalışmamızda elde edilen MDA değerleri, kat 10, kat 50 ve gal 10 gruplarındaki yüksekliği bu dozların lipid peroksidasyonunu azaltma da etkisiz olduğunu göstermektedir. KY + Kat 100 ve KY + Gal 100 gruplarındaki kontrole yakın azalmada bu dozların diyetle oluşturulan karaciğer yağlanmasını peroksidasyonunu azaltarak oksidatif stresi iyileştirerek azaltılabileceğini düşünmekteyiz.

10 ve 16 haftalık KY ve K grupları karşılaştırıldığında, KY gruplarında SOD aktivitelerinin daha düşük olduğu gözlenmişti. Bu da HFD ile oluşturulan karaciğer yağlanmasının, antioksidan kapasiteyi azaltarak, oksidatif stresi arttırdığını göstermektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu veriler literatür ile uyumludur (Charradi ve ark 2014, Li ve ark 2014).

K grubuyla karşılaştırıldığında SOD aktivitelerinde KY grubuna ek olarak, KY +Kat 100, KY + Gal 100 ve KY+Gal 10 gruplarında da azalma gözlenirken KY grubuyla karşılaştırıldığında kateşin ve gallik asit gruplara arası fark gözleyememiştik.

Bu bağlamda hücreler, serbest radikallere karşı SOD, CAT, GSH gibi enzimlerden oluşan savunma mekanizmasına sahiptirler.

Hücrelerin antioksidan savunmasında temel enzim olan SOD süperoksit anyonunun daha az toksik hidrojen perokside dönüşümünü sağlamaktadır. Hepatositlerde Cu/ZnSOD (sitozolik SOD) and MnSOD (mitokondriyal SOD) olmak üzere iki izoformu

bulunmaktadır (Rolo ve ark 2012). Karaciğer yağlanmasıyla birlikte karaciğerde aşırı lipid birikimi oluşmaktadır. Bu durum oksidatif strese neden olmakta ve aşırı ROS üretimine yol açmaktadır. Sonuçta doğal hücrel antioksidan konsantrasyonlarında azalma meydana gelmektedir (Musso ve ark 2009).

Elde edilen verilere göre kateşin ve gallik asit SOD aktivitesi üzerinde tedavi edici etki gösterilmemiştir.

10 haftalık grubun CAT değerinde K grubunda KY grubundan daha yüksek olduğunu tespit etmiştik. Aminve Nagy'nin (2009) çalışması çalışmamızı destekler niteliktedir (Amin ve Nagy 2009). 16 haftalık çalışmamızda ise gruplar arasında CAT değerlerinde bir farklılık gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 6 hafta süreyle yapılan çalışmada sıçanlarda HFD ile karaciğer ve kalp dokularında oksidatif hasar oluşturulduğunda, CAT değerlerinin HFD grubuyla K grubu arasında fark olmadığı rapor edilmiştir (Charradi ve ark 2014). Dolayısıyla CAT, hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırıştırıcı, katalaz antioksidan enzimdir SOD ve GSH gibi antioksidan savunma mekanizmasından sorumludur.

Çalışmamızda GSH aktivitesi yönünden 10 haftalık grupların K ve KY grupları arasında fark olmadığını gözlemiştik. Buna karşın 16 haftalık gruplar arasında KY + Kat 100 hariç GSH düzeyinde azalma tespit etmiştik. Yapılan çalışmalarda da HFD gruplarında GSH içeriğinde azalma olduğu belirtilmiştir. (Amin ve Nagy 2009, Anderson 2009, Park ve ark 2011). KY grubuyla karşılaştırıldığında KY + Kat 100 de GSH 'da artış gözlemlendiği rapor edildi.

Yapılan çalışmada HFD diyetine ek olarak % 0,2 kateşin eklenmesi, GSH içeriğinde herhangi bir etkiye sebep olmadığı belirtilmiştir (Fardet ve ark 2008).

Chin–Lin 2006 yaptığı çalışmada HFD diyetine gallik asit eklenmesi GSH içeriğini arttırdığı rapor etmiştir (Hsu ve Yen 2007).

Glutasyon serbest radikal artışına ve lipid peroksidasyonu oluşumuna bağlı olarak meydana gelen ürünlerle kolayca reaksiyona girerek metabolizma için zararlı olan bu ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılması için görev alan güçlü bir antioksidandır. Oksidatif hasardan kaynaklanan lipid peroksidasyon ürünleriyle reaksiyona girerek okside glutatyon dönüşür. Serbat radikal hasarı ve lipid peroksidasyonu ile glutasyon

düzeyleinin araştırıldığı çalışmada lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, glutatyon düzeylerinde azalma bulunmuştır (Meister 1983).

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak 10 ve 16 hafalık KY gruplarında (2. ve 10 grup) karaciğer yağlanması gözlemlendi. Kateşin ve gallik asit verilen gruplarda KY + Gal 100 grubunun yapısal olarak normale en yakın, KY + Gal 50 grubunun AST enzim aktivitesini düzenleyici, KY + Kat 100 ve KY+ Gal 100 gruplarının lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğu görüldü. KY + Gal 100 grubunun hem yapısal hem de biyokimyasal düzeyde hasarı azalttığını söyleyebiliriz.

## ÖZET

Erkek sıçanlarda yüksek yağ içerikli diyet uygulamasını takiben oluşan karaciğer yağlanması, farklı dozda kateşin ve gallik asitin yağlı karaciğer dokusuna etkisi araştırıldı. Bu amaçla 160 +/- 30gr ağırlığında 80 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 1. grup (K), 2. grup (KY), 3. grup (KY + Kat 10), 4. grup (KY + Kat 50), 5. grup (KY + Kat 100), 6. grup (KY + Gal 10), 7. grup (KY + Gal 50), 8. grup (KY + Gal 100), 9. grup (K-10 hafta) ve 10. grup (KY- 10 hafta) olmak üzere gruplara ayrıldı. Yağlanmayı tespit etmek amacıyla 1. ve 9. grup 10 hafta boyunca standart sıçan yemiyle, diğer gruplar 10 hafta boyunca yüksek yağ içerikli diyetle beslendi. 10 haftanın sonunda 9. ve 10. gruplardan elde edilen karaciğer dokuları ve kan örneklerinde yapısal ve biyokimyasal incelemeler yapıldı. 1. grup standart sıçan yemiyle, 2. grup yüksek yağ içerikli diyetle 6 hafta daha beslendi. Diğer gruplara yukarıda belirtilen şekilde 10, 50 ve 100 mg/kg/gün kateşin ve gallik asit 6 haftalık süreçte gavaj yoluyla verildi. 16 haftalık deney süresi sonunda sıçanlardan kesilerek karaciğer dokuları ve kalpten kan örnekleri alındı. 10 haftalık gruplardan 10. grupta iNOS enzim aktivitesi, TG içeriği, ALT, AST, MDA enzim aktiviteleri artarken, SOD ve CAT aktivitesi azaldı. GSH değerlerinde iki grup arasında fark gözlenmedi. 16 haftalık 2. grupta da iNOS enzim aktivitesi, TG içeriği, ALT, AST ve MDA değerleri artarken SOD aktivitesi azaldı. CAT ve GSH aktivitelerinde ise gruplar arasında fark gözlenmedi. iNOS enzim aktiviteleri ve TG içeriği KY + Gal 50 ve KY + Gal 100 gruplarında azaldı. AST değerleri KY + Gal 50 grubunda düşüş gösterdi. MDA değerleri de KY + Kat 100 ve KY + Gal 100 gruplarında oldukça azaldı. Histolojik olarak 10 haftada 10 grupta 3. derecede yağlanma gözlemlendi. 16 haftalık 2. grupta 3. derecede yağlanmaya ek olarak balonlaşmalar, granüler ve vakuoler dejenerasyonlar, sinüzoidal dilatasyonlar, mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. KY + Gal 100 grubunun yapısal olarak normale en yakın, KY + Gal 50 grubunun AST enzim aktivitesini düzenleyici, KY + Kat 100 ve Ky + Gal 100 gruplarının lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğu görüldü. KY + Gal 100 grubunun hem yapısal hem de biyokimyasal düzeyde hasarı azalttığını söyleyebiliriz.

Anahtar Kelime: Karaciğer yağlanması, kateşin, gallik asit

## SUMMARY

The effect of different doses of catechins and gallic acid to fatty liver tissue was investigated in fatty liver of male rats formed after high-fat diet administration. For this purpose, 160 +/- g of weight 80 Wistar albino male rats were used. Rats were divided into groups as: Group 1 (K), Group 2 (KY), Group 3 (KY + Kat 10), Group 4 (KY + Kat 50), Group 5 (KY + Kat 100), Group 6 (KY + Gal 10), Group 7 (KY + Gal 50), Group 8 (KY + Gal 100), Group 9 (K-10 weeks) and Group 10 (KY- 10 weeks). In order to determine the steatosis, group 1 and 9 were fed with standard rat chow for 10 weeks. And the other groups were fed with high-fat diet for 10 weeks. After 10 weeks, liver tissues and blood samples of Group 9 and Group 10 were investigated as structurally and biochemically. Group 1 was fed with standard rat chow for additional 6 weeks and Group 2 was fed with high-fat diet for additional 6 weeks. Catechins and gallic acid were given by gavage for 6 weeks to other groups as mentioned above 10, 50 and 100 mg / kg / day. At the end of 16-week experimental period, liver tissues and the blood samples from heart were taken from the rats. The iNOS enzyme activity, TG content, ALT, AST, MDA enzyme activities were increased and SOD and CAT enzyme activities were decreased in Group 10 from 10 weekly groups. GSH levels were not different between the two groups. The iNOS enzyme activity, TG content, ALT, AST, and MDA levels were increased and SOD activity was reduced in Group 2(16w). CAT and GSH activities were not different between groups. iNOS enzyme activities and TG content were decreased in KY + Gal 50 ve KY + Gal 100 groups. AST levels decreased KY + Gal 50 group. MDA levels quite decreased in the KY +Kat 100 and KY + Gal 100 groups. Histologically, 3 degree of steatosis was observed in 10 groups (10w). 3 degree of steatosis was observed. in addition to ballooning, granular and vacuolar degeneration , sinusoidal dilation , mononuclear cell infiltration in 2.group(16w). KY + Gal 100 is closest structurally normal group, KY + gal 50 is the regulatory group Ast enzyme activity,KY + .kat 100 and KY + Gal 100 groups were found to have the effect of reducing the lipid peroxidation. We could say, KY + Gal 100 group that reduce liver damage in structural and biochemical level.

Key words: Liver steatosis, catechin, gallic acid

## **KAYNAKLAR**

Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Medical Association Journal* 2005; 172 (7): 899-905.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 1984; 105: 121-126.

Ahern M, Hall P, Halliday LC, Olynyk J, Ramm G, Denk H. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology* 1996; 1: 193.

Aldons JL, Pajukanta P. A Treasure trove for lipoprotein biology. *Nature Genetics* 2008; 40: 129-130.

Amin KA, Nagy MA. Effect of carnitine and herbal nixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetology and Metabolic Syndrom* 2009: 1-14.

Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemical Society* 1998; 75(2): 199-212.

Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Digestive Diseases and Science* 2000; 45(10): 1929-1934.

Bacon BR, O'Neill R, Britton RS. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology* 1993; 105: 1134-1140.

Bak EJ, Kim J, Jang S, Woo GH, Yoon HG, Yoo YJ, Cha JH. Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 2013; 73(8): 607-614.

Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 2: 209-218.

Beale LS. Minute anatomy of the liver. *American Journal of Medicine* 1856; 64: 469.

Bear WL, Teel RW. Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity. *Anticancer Research* 2000; 20: 3609-3614.

Beck F, Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fizyoloji*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008.

Bjorntorp P. Body fat distribution, insulin resistance and metabolic diseases. *Nutrition*

- Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology* 2006; 7: 606–630.
- Bors W, Heler W, Michel C, Saran M. Flavonoids antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymology* 1990; 186: 343-55.
- Bort M, Tremblay K, Signore JP, Martinez- Barbera JP, Zaret K. Homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Developmental Biology* 2006; 290: 44-56.
- Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 1986; 6: 718–722.
- Bragança de Moraes CM, Bitencourt S, de Mesquita FC, Mello D, de Oliveira LP, da Silva GV, Lorini V, Caberlon E, de Souza Basso B, Schmid J, Ferreira GA, de Oliveira JR. (+)-Catechin attenuates activation of hepatic stellate cells. *Cell Biology International* 2013; 38(4): 526-530.
- Brix AE, Elgavish A, Nagy TR, Gower BA, Rhead WJ, Wood PA, Evaluation of liver fatty acid oxidation in the leptin- deficient obese mouse. *Mol. Genet. Metab* 2002; 75: 219-226.
- Bruno RS, Dugan CE, Smyth JA, DiNatale DA, Koo SI. Green tea extract protects leptin-deficient, spontaneously obese mice from hepatic steatosis and injury. *Journal of Nutrition* 2008; 138 (2): 323-331.
- Brunt EM, Elizabeth M. Nonalcoholic steatohepatit: Definition and pathology. *Seminars in Liver Disease* 2001; 21: 3-16.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94(9): 2467–2474.
- Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2004; 24: 3-20.
- Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, Liu JC, Chen YJ, Hsieh MH. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neuroscience Letters* 2002; 328: 281-284.



Chao J, Huo T, Cheng H, Tsai J, Liao J, Lee M, Qin X, Hsieh M, Pao L, Peng W. Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet- induced NAFLD mice. *Plos One* 2014; 9 (6): 96969.

Charradi K, Elkahoui S, Karkouch I, Limam F, Ben Hassine F, El May MV, Aouani E. protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet-induced liver steatosis and zinc depletion in rat. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014; 59(8): 1768-1778.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84: 491-495.

Chen L, Zhang W, Zhou QD, Yang HQ, Liang HF, Zhang BX, Long X, Chen XP. HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. *Cell Biochemistry and Function* 2012; 7: 588–596.

Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoksite scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1990; 9: 19–21.

Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes- Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373–379.

Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2001; 21: 27-41.

Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 1649-1657.

Coburn CT, Knapp FF, Febbraio M, Beets AL, Siverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (42): 32523-32529.

Collardeau-Frachon S, Scoazec JY. Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *Anatomical Record* 2008; 291(6): 614-627.

Cortez-Pinto H, Camilo ME. Non-alcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLd/NASH): diagnosis and clinical course. *Best Practise and Research clinical Gastroenterology* 2004; 18(6): 1089-1104.

Dai N, Zou Y, Zhu L, Wang HF, Dai MG. Antioxidant properties of proanthocyanidins attenuate carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced steatosis and liver injury in rats via CYP2E1 regulation. *Journal of Medicinal Food* 2014; 17 (6): 663-669.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.

De la Maza MP, Hirsch S, Petermann M, Suzo M, Uqarte G, Bunout D. Changes in microsomal activity in alcoholism and obesity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2000; 24: 605-10.

Denk H, Gschnait F, Wolff K. Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. *Laboratory Investigation* 1975; 32: 773-776.

Dergel R. Lipid peroxidation a common pathogenetic mechanism. *Experimental and Toxicologic Pathology* 1992; 44 (4): 169-181.

Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mechanisms of Development* 2006; 123: 42-55.

Dickson AD. The development of the ductus venosus in man and the goat. *Journal of Anatomy* 1957; 91(3): 358-368.

Duncan SA, Watt AJ. BMPs on the road to hepatogenesis. *Genes and Development*. 2001; 15: 1879-1884.

Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology* 1999; 53(2): 46-48.

Elvevold K, Simon-Santamaria J, Hasvold H, McCourt P, Smedsrød B, Sørensen KK. Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *Hepatology* 2008; 48(6): 2007-2015.

Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the ITO cells. *Microscopy Research and Technique* 1997; 39(4): 336-349.

Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Seminars in Liver Disease* 2001; 21(1): 17-26.

Fardet A, Llorach R, Franc J, Martin O, Sesson C, Lyan B, Pujos- Guillot E, Scalbert A. A liquid chromatography-quadrupole time-of-flight (LC-QTOF)-based metabolomic approach reveals new metabolic effects of catechin in rats fed high-fat diets. *Journal of Proteome Research* 2008; 7: 2388-2398.

Federico A, Trappoliere M, Loguercio C. Treatment of patients with nonalcoholic fatty liver disease: current views and perspectives. *Digestive Liver disease* 2006; 38(11): 789-801.

Feng WY. Metabolism of green tea catechins: an overview. *Current Drug Metabolism* 2006; 7: 755–809.

Fernandez, SP, Wasowski, C, Loscalzo, LM, Granger, RE, Johnston, GAR, Paladini, AC, Marder, M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology* 2006; 539: 168-176.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 1995; 33: 1061-1080.

Fox ES, Thomas P, Broitman SA. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat kupffer and peritoneal cells. *Infection and Immunity* 1987; 55: 2962–2966.

Friedman JM, Lieber RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 1991; 11(4): 1054-1062.

Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. *Mutation Research* 1998; 402: 307-310.

Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie Biologie* 2006; 54: 375-386.

Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *American Journal of Physiology* 2004; 287: 1070–1077.

Gao H, Zhang H, Zhou X, Guan L, Deng W, Xu L. The Glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide inhibits oxidative stress and inflammatory response in the liver of rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Pharmaceutical Society of Japan* 2015; 38: 694-702.

Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminar Liver Disease* 2001; 3: 311–335.

Goldberg D.M, Yan J, Soleas G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects, *Clinical Biochemistry*, 2003;36: 79-87. 17.

Goudriaan JR, Dahlmans VE, Teusink B, Margrietouwens D, Febbraio M, Maassen JA, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *Journal of Lipid Research* 2003; 44: 2270–2277.

Halder J, Bhaduri AN. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1998; 244: 903-907.

Hanasaki Y, Owaga S, Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* 1994; 16: 845-850.

Handayani D, Meyer BJ, Chen J, Brown SHJ, Mitchell TW, Huang X. A high-dose shiitake mushroom increases hepatic accumulation of triacylglycerol in rats fed a high-fat diet: Underlying mechanism. *Nutrients* 2014; 6: 650-662.

Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Gastroenterology* 2003; 98: 2042-2047.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobliya DJ. Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 572-584.

- Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biology and Toxicology* 1998; 14(2): 141-145.
- Hogan S, Zhang L, Li J, Zoecklein B, Zhou K. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *LWT-Food Science Technology* 2009; 42: 1269–1274.
- Hollman PCH, Katan MB. Dietary Flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* 1999; 37: 937-942.
- Hsu CL, Yen GC. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition* 2007; 98(4): 727-735.
- Huang X, Wang X, Lv Y, Xu L, Lin J, Diao Y. Protection Effect of Kallistatin on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats via Antioxidative Stress. *Plos One* 2014; 9(2): 88498.
- Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 1966; 153 (3740): 1127-1128.
- Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, Kronenberg M, Cheroutre H. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *Journal of Immunology* 2011; 10: 5549–5555.
- Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Current Issue* 2004; 101(19): 7281-7286.
- Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver, *Microcirculation* 2003; 10: 447–456.
- Jang A, Srinivasan P, Lee NY, Song HP, Lee JW, Lee M, Jo C. Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid-linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. *Chemico-Biological Interactions* 2008; 174: 109–117.
- JinQi Y, Yan Z, Baolu Z. Green tea catechins prevent obesity through modulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Science China Life Sciences* 2013; 56: 804-810.

Jo C, Jeong IY, Lee NY, Kim KS, Byun MW. Synthesis of a novel compound from gallic acid and linoleic acid and its biological functions. *Food Science and Biotechnology*.2006; 15: 317–320.

Joshi D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav AK, Srivastav SK. N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: a histopathological approach. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2014; 28(2): 218-226.

Jungermann K, Sasse D. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends in Biochemical Sciences* 1978; 78: 91764.

Kada T, Kaneko K, Matsuzaki S, Matsuzaki T, Hara Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor. *Mutation Research* 1985; 150: 127-132.

Kagan VE, Tyurina YY. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 854: 425–434.

Kashireddy PV, Rao MS. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatology Research* 2004; 30: 104–110.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95(5): 2111-2119.

Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ankara: Palme Yayınevi; 2006. 447-474.

Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Science* 2006; 91: 123–131.

Kiserud T, Acharya G. The fetal circulation. *Prenatal Diagnosis* 2004; 24(13): 1049-1059.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp- Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ.

Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41: 1313–1321.

Klunski A, Vance DE, Vance JE. A choline- deficient diet in mice inhibits neither the CDP- choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 23916-23924.

Kobayashi H, Asakawa T, Tanikawa K, Kage M, Yagi M. The antioxidant effect of green tea catechin ameliorates experimental. *Phytomedicine* 2010; 17(3-4): 197-202.

Kochi T, Shimizu M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Non-alcoholic steatohepatitis and preneoplastic lesions develop in the liver of obese and hypertensive rats: suppressing effects of EGCG on the development of liver lesions. *Cancer Letters* 2014; 342(1): 60-69.

Koçyiğit A, Arslan SO, Erel Ö, Aktepe N, Avcı Ş, Gür S. Ratlarda kateşin alımının antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon seviyeleri üzerine etkileri.¶ Türkiye Klinikleri *Journal of Medical Science* 2000; 20(1): 1-4.

Koteish A, Diehl AM. Animal Models of Steatosis. *Seminar Liver Disease* 2001; 21: 89-104.

Kurt H, Başaran A, Musmul A. Prevention of oxidative stress induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) using catechine in rats. *Medical Journal of Kocatepe* 2004; 29-34.

Kuzu N, Bahçecioğlu İH, Dağlı AF, Özercan İH, Üstündağ B, Şahin K. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008; 465-470.

Li S, Meng F, Liao X, Wang Y, Sun Z, Guo F, Li X, Meng M, Li Y, Sun C. Therapeutic Role of Ursolic Acid on Ameliorating Hepatic Steatosis and Improving Metabolic Disorders in High- Fat Diet- Induced non- Alcoholic Fatty Liver Disease Rats. *Plos One* 2014; 9(1): 86724.

Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *American Society for Clinical Nutrition* 2004; 79: 502-509.

Lotito SB, Fraga CG. Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 24: 435-441.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: Nonalcoholic steato hepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55(7):434–438.

Maramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1986; 32: 613-22.

Matteoni CA, Younossi ZM, Granlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 114:1413-1419.

McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver diseases. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2002; 34(3): 255-262.

Melin VA, Rankin SA, Zorn MA. Repression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* 2007; 134: 2207-2217.

Mehra P, Garg M, Koul A, Bansal DD. Effect of (+)- catechin hydrate on oxidative stress induced by high sucrose and high fat diet in male Wistar rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 2014;

Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1998; 439: 175-82.

Mohan SK, Saraswathi P, Jainu M. Non alcoholic steatohepatitis (NASH) experimental model induction in rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2012; 3(3): 1085-1090.

Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico- Biological Interactions* 2011; 3: 225–231.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research* 2009; 48: 1-26.

Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Research* 1993; 21: 289-299.

Niemela O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pusanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Hepatology* 2000; 33: 893–901.



- Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chemical Toxicology* 2001; 39(11): 1063-70.
- Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 1987; 227-253.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. 1979; 95: 351-358.
- Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, Sueoka E, Komori A, Fujiki H. Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols. *Japanese Journal of Cancer Research* 1997; 88: 639-643.
- Ovalle WK, Nahirney P. *Netter Temel Histoloji*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009. 311-332.
- Park HJ, Lee Y, Chung MY, Park Y, Bower AM, Koo SI, Giardina C, Bruno RS. Green Tea Extract Suppresses NFκB Activation and Inflammatory Responses in Diet-Induced Obese Rats with Nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Nutrition* 2011; 142: 57-63.
- Parvez S, Tabassum H, Rehman H, Banerjee HD, Athar M, Rahasuddin S. Catechine prevent tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology* 2006; 225:109.
- Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2001; 21(1): 57-69.
- Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* 1998; 18: 1995-2018.
- Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural-history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up-study of 42 patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
- Rafique R, Schapira AHV, Cooper JM. Sensitivity of respiratory chain activities to lipid peroxidation: Effect of Vitamin E deficiency. *Biochemical Journal* 2001; 357(3): 887-892.

- Ramkumar K, Vijayakumar R, Vanitha P, Suganya N, Manjula C, Rajaguru P, Sivasubramanian S, Gunasekaran P. Protective effect of gallic acid on alloxan-induced oxidative stress and osmotic fragility in rats. *Human Experimental Toxicology* 2014; 33: 638-649.
- Rice- Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant- derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 1995; 22: 375.
- Rice- Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biological Medicine* 1996; 20: 933.
- Robards K, Amtolovich M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids Critical Review. *The Analyst* 1997; 122.
- Rolo AP, Teodoro J, Palmeira CM. Role of Oxidative Stress in The Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52: 59-69.
- Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. Ankara: Palme Yayınevi; 2013. 628-662.
- Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes & Development*. 2001; 15: 1998–2009.
- Ruhl CE, Everhart JE. The determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity. *Gastroenterology* 2003; 124: 71-79.
- Sakata R, Nakamura T, Torimura T, Ueno T, Sata M. Green tea with high-density catechins improves liver function and fat infiltration in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients: A double-blind placebo-controlled study. *International Journal of Molecular Medicine* 2013; 32(5): 989-994.
- Salamone F, Galvano F, Cappello F, Mangiameli A, Barbagallo I, Li Volti G. Silibinin modulates lipid homeostasis and inhibits nuclear factor kappa B activation in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Translational Research* 2012; 159 (6): 477-486
- Samuhasaneeto S1, Thong-Ngam D, Kulaputana O, Patumraj S, Klaikeaw N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Medical Association of Thailand* 2007; 90(4):788-97.

Sarafani M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* 1996; 50: 28-32.

Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 2002; 36: 177–187.

Seo DY, Lee S, Figueroa A, Kwaks YS, Kim N, Rhee BD, Ko KS, BAng HS, BAek YH, Han J. Aged garlic extract enhances exercise-mediated improvement of metabolic parameters in high fat diet-induced obese rats. *Nutrition Research and Practice* 2012; 6: 513-519.

Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 2007; 134, 1023–1034.

Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of Internal Medicine* 1997; 126:137.

Shiojiri N, Sugiyama Y. Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology*. 2004; 40(2): 346-355.

Shiota M, MAgnuson MA. Hepatic glucose sensing: does flux matter. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118 (3): 841-844.

Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A. Cell biology of liver endothelial and kupffer cells. *Gut* 1994; 35: 1509–1516.

Sugimoto H, Okada K, Shoda J, Warabi E, Ishige K, Ueda T, Taguchi K, YanagawaT, Nakahara A,Hyodo I, Ishii T, Yamamoto M. Deletion of nuclear factor –E2- related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010; 283- 294.

Sundaram SS, Whittington PF, Green RM. Steatohepatitis develops rapidly in transgenic mice overexpressing Abcb11 and fed a methionine-choline-deficient diet. *American Journal of Physiology* 2005; 288: 1321–1327.

Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *American Journal of Pathology* 2006; 169(3): 846-860.

Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 2012; 1: 67–80.

Takami S, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Onose J, Hirose M. Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(6): 2224-2229.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 1969; 27 (3): 502-522.

Toda M, Okubo S, Ikigai H, Suzuki Y, Hara Y, Shimamura T. The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology and Immunology* 1992; 36(9): 999-1001.

Tosh D, Alberti GM, Agius L. Glucagon regulation of gluconeogenesis and ketogenesis in periportal and perivenous rat hepatocytes. Heterogeneity of hormone action and of the mitochondrial redox state. *Biochemical Journal* 1988; 15(1): 197-204.

Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 268: 53–58.

Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Developmental Biology* 2005; 280: 87–99.

Tsuchiya T, Suzuki O, Igarashi K. Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1996; 60(5): 765-768.

Tsuchiya, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry* 2010; 120: 1089-1096.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2003; 552 (2): 335-344.

- Valverde AM, Tervel T, Navarro P, Benito M, Lorenzo M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  causes insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin induced adipogenesis in fetal Brown adipocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 1229-1238.
- Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavanols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 1995; 43: 2800.
- Wang J, Tang L, White J, Fang J. Inhibitory effect of gallic acid on CCl<sub>4</sub>-mediated liver fibrosis in mice. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2014; 69(1): 21-26.
- Wang ZH, Das M, Bickers DR, Mukhtar H. Interaction of epicatechins derived from green tea with rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 1988; 16: 98-103.
- Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Human Pathology* 2000; 31: 822-828.
- Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 111: 1645-1653.
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. 1992;258:999-1001.
- Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211.
- Wisse E: An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of Ultrastructure Research* 1970, 31: 125-150.
- Wu Y, Wang C, Sun H, LeRoith D, Yakar S. High-efficient FLPo deleter mice in C57BL/6J background. *Plos One* 2009; 4(11): 8054.

Xiao J, Ho CH, Liong EC, Nanji AA, Leung TM, Lau TYH, Fung ML, Tipoe GL. Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and NF-kappa B pathways. *European Journal of Nutrition* 2014; 53: 187-199.

Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, Shibuya M. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 1994; 9(9): 2683-2690.

Yan J, Zhao Y, Zhao B. Green tea catechins prevent obesity through modulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Science China Life Science* 2013; 56(9): 804-810.

Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Tomeno W, Watanabe S, Hosono K, Mawatari H, Iida H, Fujita K, Takahashi H, Kirikoshi H, Kobayashi N, Inamori M, Kubota K, Shimamura T, Saito S, Maeyama S, Wada K, Nakajima A. Influence of inducible nitric oxide synthase polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research* 2009; 10: 963-971.

Yoshida M, Nishikawa Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, McCourt P, Enomoto K. Involvement of signaling of VEGF and TGF-beta in differentiation of sinusoidal endothelial cells during culture of fetal rat liver cells. *Cell Tissue Research* 2007; 329(2): 273-82.

Zaret KS, Jung J, Zheng M, Goldfarb M. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284(5422): 1998-2003.

Zeisel SH, Blusztajn JK. Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 1994; 14: 269-296.

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: 425-432.

Zhao BL, Li X, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen species. *Cell Biophysics* 1989; 14: 175.

Zimmet ZP, Grundy SM, Eckel RE. The metabolic syndrome. *Lancet*, 2005;365:1415-28.

Zorn AM, Wells JM. Molecular basis of vertebrate endoderm development. *International Review of Cytology* 2007; 259: 49–111.

Zou X, Yan C, Shi Y, Cao K, Xu J, Wang X, Chen C, Luo C, Li Y, Gao J, PAng W, Zhao J, Zhao F, Li H, Zheng A, Sun W, Long J, Szeto IM, Zhao Y, Dong Z, Zhang P, Wang J, Lu W, Zhang Y, Liu J, Feng Z. Mitochondrial Dysfunction in Obesity-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Protective Effects of Pomegranate with Its Active Component Punicalagin. *Therapeutics* 2014; 21: 11.

## ÖZGEÇMİŞ

Tuğba ÇELİK SAMANCI 1988 yılında Bursa'da doğmuştur. 2010 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun olduktan sonra, 2010-2012 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik alanında yüksek lisansını tamamlamıştır. 2013 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atanmış olup halen görevine devam etmektedir.



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca bilgisi ve tecrübesiyle eğitimim ve çalışmalarım aşamasında desteği bulunan danışmanım **Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**'e çalışmalarım esnasında bilgi tecrübe ve desteğini esirgemediği için teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız öğretim üyeleri **Prof. Dr. Kemal Ergin**, **Yrd. Doç. Dr. Nezihe Tülün BOYLU** ve **Yrd. Doç. Dr. Hatice Kübra Başaloğlu**'na ve Anabilim dalımızdaki asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca deneysel çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı **Prof. Dr. Sait POLAT**'a, **Yrd. Doç. Dr. Murat BOYACIOęLU**'na ve **Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOęLU**'na teşekkürü borç bilirim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana inanan ve her zaman yanımda olan gerek manevi gerek maddi desteğini esirgemeyen eşim **Yasin SAMANCI**'ya ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.