



**DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT MODELİNDE
KOLSİŞİNİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Fathi Mohamed AMRAJE

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2020

Fatma F. Mohamed AMRAJE tarafından hazırlanan "DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT MODELİNDE KOLŞİSİNİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY~~ ~~ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Başkan : Prof. Dr. Belgin CAN

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

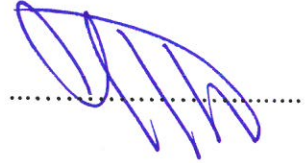
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

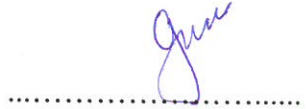
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT

Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

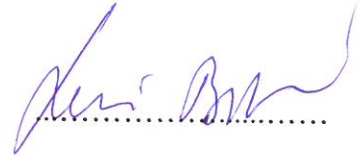
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : ~~Prof.~~ Dr. Deniz BILLUR

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

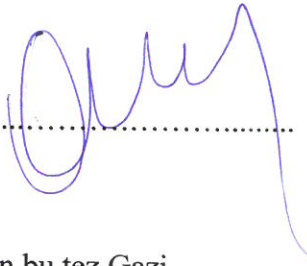
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Deniz KARÇAALTINCABA

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 06/01/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA Tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fatma Fathi Mohamed AMRAJE

06/01/2020

DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT MODELİNDE KOLŞİSİNİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Fatma Fathi Mohamed AMRAJE

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2020

ÖZET

Metabolik bir karaciğer hastalığı olan alkolik olmayan steatohepatitis (NASH), yavaş yavaş fibrozis veya siroz hatta hepatoselüler karsinomaya kadar ilerleyebilir. NASH'ın ilerleyen prevelansı ve etkin olmayan tedaviler farklı terapötik yaklaşımlara yöneltmiştir. Kolşisin antiinflamatuvar, antifibrotik ve antioksidan bir ilaç olarak bilinir. Amacımız Kolşisinin aşırı fruktoz tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan deneysel NASH modelindeki etkilerini araştırmaktır. 12 hafta boyunca sıçanlara yüksek fruktoz diyeti uygulandı. 28 adet yetişkin dişi Sprague Dawley türü sıçanlar (150-22 gr) 4 gruba ayrıldı. Grup 1: (n=7) Kontrol grubu, Grup 2: (n=7) NASH Grubu, Grup 3: (n=7) NASH+Kolşisin Grubu, Grup 4: (n=7) Kolşisin Grubu olarak ayarlandı. Vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları, kan glukoz seviyeleri, karaciğer enzimleri, ve oksidatif stres (MDA) seviyeleri ölçüldü. Karaciğer kesitleri histopatolojik değerlendirmeler için alındı. Çalışmanın sonunda, NASH grubunda karaciğer histopatolojisinde steatozis, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrotik değişiklikler gözlemlendi. Kolşisin ile tedavi sonrasında inflamatuvar ve fibrotik değişiklikleri iyileştirici etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Alkolik olmayan steatohepatit, fruktoz, karaciğer, Kolşisin
Sayfa Adedi : 91
Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

INVESTIGATION OF COLCHICINE EFFECTS ON LIVER IN EXPERIMENTAL NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS MODEL

(Ph. D. Thesis)

Fatma Fathi Mohamed AMRAJE

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2020

ABSTRACT

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a metabolic disorder of the liver, may gradually progress into fibrosis or cirrhosis and even hepatocellular carcinoma. The rising prevalence of NASH and the lack of efficient treatments have led to the exploration of different therapeutic approaches. Colchicine is known as an anti-inflammatory, anti-fibrotic and anti-oxidant drug. Our aim is to investigate the effects of Colchicine on experimental NASH model with overconsumption of fructose. Rats received fructose enriched diet for 12 weeks. 28 adult female Sprague Dawley rats (150-200g) were divided into 4 groups. Group 1: (n=7) Control Group, Group 2: (n=7) NASH Group, Group 3: (n=7) NASH+Colchicine Group, Group 4: (n=7) Colchicine Group. Body weight, liver weight, blood glucose levels, liver enzymes, oxidative stress (MDA) levels were measured. Liver sections were taken for histopathological examinations. At the end of the study, liver histopathology in NASH group showed changes which includes steatosis, inflammatory cell infiltration, and fibrotic changes. The inflammation and the fibrotic changes have improved after treatment with Colchicine.

Science Code	:1033
Key Words	: Colchicine, fructose, liver, non-alcoholic steatohepatitis
Page Numbers	: 91
Supervisor	: Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana yol gösteren, hoşgörüsü, sabrı ve tecrübesi ile yanımda olan saygıdeğer danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, değerli hocam Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na, Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Kazime AKBULUT'a, İç Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Seren ÖZENİRLER'e, Anatomi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER'e, biyokimyasal analizlerde yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hakan BOYUNAĞA'a, Ankara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Deniz BİLLUR'a katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tecrübesinden yararlandığım değerli asistanlarımızdan Araş. Gör. Dr. Özen AKARCA DÜZAKAR'a, deney aşamalarında bana yardımcı olan Araş. Gör. Müşerref Şeyma CEYHAN ve Araş. Gör. İsmail TÜRKOĞLU'na ve doktora öğrencisi Ayşe KÖYLÜ'ye teşekkür ederim.

Son olarak anneme, babama, eşime ve çocuklarıma bana bu yolda gösterdikleri destek ve dualarından dolayı sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİGİLER	5
2.1. Karaciğerin Embriyolojisi.....	5
2.2. Karaciğer Anatomisi	6
2.3. Karaciğer Histolojisi	8
2.4. Karaciğerin Fizyolojisi	12
2.5. Alkolik Olmayan Steatohepatit (NASH)	15
2.5.1. Tarihi ve tanımı.....	15
2.5.2. NASH histopatolojisi	15
2.5.3. NASH patofizyolojisi	17
2.5.4. Klinik özellikler	20
2.5.5. Tanı	20
2.5.6. NASH prevelansı	21
2.5.7. Tedavisi.....	22
2.6. Kolşisin	22
2.6.1. Kimyasal yapısı ve genel özellikleri.....	22

	Sayfa
2.6.2. Kolşisinin terapötik kullanımı	23
2.6.3. Kolşisinin etki mekanizması	23
2.6.4. Kolşisin ve karaciğer hastalığı	24
2.7. Fruktoz	25
2.7.1. Kimyasal yapısı ve genel özellikleri	25
2.7.2. Fruktoz metabolizması	26
2.7.3 Fruktozun karaciğer üzerine etkileri	27
2.7.4. Fruktoz ve NASH	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	31
3.2. Işık Mikroskopik İncelemeler	32
3.2.1. Hematoksilen eozin boyama yöntemi	32
3.2.2. Masson Trikrom boyama yöntemi	33
3.2.3. Oil Red O boyama yöntemi	33
3.2.4. İmmünohistokimyasal yöntem	34
3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi	35
3.3.1. Serum örneklerinin biyokimyasal analizleri	35
3.4. İstatistiksel Analizler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	37
4.2. Biyokimyasal Parametre Bulguları	40
4.2.1. Serum analiz bulguları	40
4.3. İstatistiksel Bulgular	43
4.3.1. Vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	43
4.3.2. Karaciğer dokusu ağırlığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	44
4.3.3. İmmünohistokimyasal bulguların değerlendirilmesi	45

	Sayfa
4.3.4. Gruplar arası kollagen lif yoğunluğunun değerlendirilmesi	46
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ	75
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	87
EK-1. Etik Kurul onayı	88
EK-2. Katılım Sertifikası	90
ÖZGEÇMİŞ	91

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Brunt'a göre NASH'da histopatolojik lezyonların derecelendirilmesi ve evrelemesi	16
Çizelge 4.1. Her gruba ait biyokimyasal parametrelerin serum düzeylerine ait ortalama $\pm$ SD değerleri	40
Çizelge 4.2. Karaciğer dokularına ait kollajen lif yüzdelerine ait ortalama $\pm$ SD değerleri	46



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Karaciğer yağlanması ve NASH'in patogenezi	18
Şekil 2.2. Kolşisinin moleküler yapısı	23
Şekil 2.3. Kolşisinin antifibrotik etkisi	25
Şekil 2.4. Fruktozdan trigliserit sentezini düzenleyen yolak	27
Şekil 2.5. NAFLD'nin gelişimine ve ilerlemesine aracılık eden fruktoz mekanizması..	29
Şekil 4.1. Çalışma gruplarında elde edilen Serum glukoz düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği.....	41
Şekil 4.2. Çalışma gruplarında elde edilen Serum GGT düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği.....	41
Şekil 4.3. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ALP düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği.....	42
Şekil 4.4. Çalışma gruplarında elde edilen Serum AST düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği.....	42
Şekil 4.5. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ALT düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği.....	43
Şekil 4.6. Gruplara ait vücut ağırlığının ortalama $\pm$ SD grafiği.....	44
Şekil 4.7. Gruplara ait karaciğer dokusu ağırlık ortalama $\pm$ SD grafiği	45

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, vena centralis'den (v.c) periferi doğru ışınsal olarak uzanan hepatosit (h) kordonları arasında, normal düzenlenime sahip sinüzoidler (*) dikkati çekmekte (A: H.E, x100, B: H.E x200)	47
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis'ten (v.c) periferi doğru ışınsal olarak uzanan hepatositlerin (h) merkezi ve yuvarlak çekirdeğe sahip, poligonal şekilli oldukları, bazı hepatositlerin ise çift çekirdekli oldukları görülmekte (A: H.E, x200, B: H.E x400).....	48
Resim 4.3. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit (h) ışınsal kordonlarının ve sinüzoidlerin düzenleniminde bozulma (►) dikkati çekmekte (A: H.E, x100, B: H.E x200).....	49
Resim 4.4. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, sitoplazmik sınırları net olarak ayırt edilmeyen ve poligonal şekillerini kaybeden hepatositlerde (h) steatoz izlenmekte (A,B : H.E, x400)	50
Resim 4.5. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, parankim hücreleri arasındaki inflamatuvar alanlar (►) ile hepatositlerdeki vakuoler değişiklikler (▼) dikkati çekmekte (A: H.E, x200, B: H.E x400)	51
Resim 4.6. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, boyutları farklı balonlaşma özelliği gösteren hepatositler ile (▼) sinüzoidlerde konjesyon (↔) izlenmekte (A,B: H.E, x400)	52
Resim 4.7. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, birbirlerinden sınırla ayrılan ve boyanma özellikleri farklılık gösteren hepatositlerin oluşturduğu alanlarda NASH grubuna göre daha organize ve düzenlenim gösterdiği dikkati çekmektedir (A,B : H.E, x200).....	53
Resim 4.8. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, boyanma özelliği farklılık gösteren alanlar (h) arasında NASH grubuna göre yoğunluğu azalmış steatoz alanları izlenmekte (A, B: H.E, x200).....	54
Resim 4.9. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit kordonlarının NASH grubuna göre daha organize düzenlenim gösterdiği ancak yer yer (=perisinüzoidal) alanda inflamatuvar hücre birikiminin olduğu dikkati çekti (A, B: H.E, x200)	55
Resim 4.10. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, hepatositlerdeki dejeneratif değişikliklerin, inflamatuvar hücre birikiminin NASH grubuna göre azalarak devam ettiği görüldü (A,B : H.E, x400).....	56

Resim	Sayfa
Resim 4.11. Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit kordonları (h) ve sinüzoidler (*) izlenmekte (A,B: H.E, x200).....	57
Resim 4.12. Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit kordonları (h) ve sinüzoidler (*) dikkat çekmekte (A, B: H.E, x200).....	58
Resim 4.13. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) etrafında ve portal aralıkta etrafında normal yoğunlukta kollagen lif dağılımı (◀) izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, A, B x400)	59
Resim 4.14. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, kontrol grubuna göre, vasküler oluşumlar ve parankimal alanda kollagen lif yoğunluğu artışı (◀)izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, A x200, B x400)	60
Resim 4.15. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda v. centralis (v.c) çevresinde NASH grubuna göre azalmış perivasküler kollagen lif dağılımı (◀) izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, A x200, B x400)	61
Resim 4.16. Kolşisin grubuna ait karaciğer dokusunda normal yoğunlukta kollagen lif dağılımı izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, x200)	62
Resim 4.17. Deney gruplarına ait sıçan karaciğer dokusunda Oil Red O Boyaması. (A: Kontrol Grubu, B: NASH Grubu, Ax1000, B x400, İnsert: x1000). NASH grubunda karaciğer parankim dokusundaki lipid damlacıklarının varlığı gözlemlendi	63
Resim 4.18. Deney gruplarına ait sıçan karaciğer dokusu Oil Red O Boyaması. (A: NASH+Kolşisin Grubu, B: Kolşisin Grubu, A x400, Bx1000, İnsert: x1000). NASH+Kolşisin grubunda NASH grubuna göre daha az yoğunlukta lipid damlacıkları izlenmekte.....	64
Resim 4.19. A. Kontrol grubu; B. NASH grubu; C. NASH+Kolşisin grubu; D. Kolşisin grubu. NASH grubunda diğer gruplara göre artmış; NASH+ Kolşisin grubunda NASH grubuna göre azalmış TNF- α immünreaktivitesi izlenmekte (DAB & Hematoksilen A-D X400)	65
Resim 4.20. A. Kontrol grubu; B. NASH grubu; C.NASH+Kolşisin grubu; D. Kolşisin grubu. NASH ve NASH+Kolşisin gruplarındaki artmış AFP immünreaktivitesi görülmekte (DAB & Hematoksilen A-D X400).....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklama

µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
cm	Santimetre
dl	Desilitre
gr	Gram
H₂O₂	Hidrojen peroksit
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
°C	Santigrat
u	Ünite

Kısaltmalar Açıklama

A1AT	Alfa-1 antitripsin
AFP	Alfa-Fetoprotein
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine Aminotransferase
AMP	Adenosin monophosphate
AST	Aspartate Aminotransferase
ATP	Adenosin triphosphate
BCL2	B-cell lymphoma 2
BMP	Bone morphogenic protein

Kısaltmalar	Açıklama
CCK	Cholecystokinin
CCL4	Carbon tetrachloride
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Deoxyribonucleic acid
ER	Endoplazmk retikulum
FFA	Free fatty acid
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
GLUT5	Glucose transporter
GSH	Reduced glutathion
H&E	Hematoxylin & Eosin
HBV/HCV	Hepatitis b virus / hepatitis c virus
H-MRS	Proton manyetik rezonans spektroskopisi
HNF 3,4	Hepatocyte nuclear factor 3,4
IL-8	İnterleukin -8
KHK	Ketoheksokinaz
LDL	Low density lipoprotein
MCD	Methionine choline deficient diet
MDA	Malondialdehit
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD activity score
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
NF-Kb	Nuclear factor-Kb
PMNC	Peripheral blood mononuclear cells
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
T- SH	Total- free sulfhydryl groups
TG	Triglyceride
TGF-β	Transforming growth factor-β
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
V.	Ven
VKİ	Vücut kitle indeksi
VLDL	Very low density lipoprotein

1. GİRİŞ

1980 yılında, Ludwing ve arkadaşları tarafından, kronik karaciğer hastalığına sahip alkolik karaciğer hastalarında görülen histolojik bulgulara benzer özellikler gösteren ancak alkol kullanmadıklarını belirten 20 hasta tanımlanmıştır [1]. Sonraki 30 yıllık süreçte yapılan araştırmalar NAFLD olarak tanımlanan ve dünyada kronik karaciğer hastalığının en yaygın sebebi olarak görülen bu durumun daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [2].

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), basit steatozdan alkolik olmayan steatohepatite (NASH) kadar değişiklik gösterebilen, tüm dünyada yaygın olarak görülen bir kronik karaciğer hastalığıdır. NASH, alkol bağımlılığının olmadığı durumlarda, karaciğer hücrelerinde meydana gelen ve steatoz olarak isimlendirilen anormal yağ birikimi, yüksek oranda fibrozis ve nekroinflamasyon ile karakterize bir patolojidir [3].

Yapılan araştırmalara göre, hepatit yayılma oranı gelişmiş ülkelerde yetişkinler arasında %30 iken, bu oranın %10'dan fazlası alkolik olmayan steatohepatit türünde ilerleyen karaciğer hasarlanmalarıdır. Obez bireylerde NASH görülme sıklığının yüksek olması nedeniyle, NASH'ın abdominal obezite, Tip-2 diabetes mellitus, hipertansiyon, hiperglisemi ve hiperlipidemi gibi metabolik sendrom ile ilişkili hastalıklara eşlik edebileceği düşünülmektedir [4].

Günümüzde hareketsiz yaşam tarzı, yüksek konsantrasyonlu fruktoz içeren içeceklerin ve yüksek yağ içerikli yiyeceklerin tüketimindeki artış gibi bazı faktörler NASH gelişimini direkt olarak etkileyebilmektedir [5]. NASH tedavisinde diyet ve egzersiz ile yaşam şeklini değiştirmek dışında herhangi bir yöntem bulunmamaktadır [6]. Birçok hasta tip-2 diyabet, hiperlipidemi ve santral obezite gibi risk faktörlerine sahip olmasına rağmen bazı kişilerde bu tanımlanan risk faktörlerinden hiç birisi yoktur. NAFLD anormal yağ metabolizması ve mitokondriyal hasar veya disfonksiyona neden olan ilaçlar, toksinler, metabolik, cerrahi ve genetik durumlar ile ilişkilidir.

NASH patogenezinde yer alan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte "çift virüs teorisi" bu konudaki temel görüşlerden biridir. Bu teoriye göre, NASH oluşumu için "ilk virüs" hepatositlerdeki yağ asitlerinin alımı ve sentezini sağlayan metabolik yollardaki dengesizlik, oksidasyon ile yağ asitlerinin dışarı aktarımının sonucu olarak ortaya çıkan

çoğunlukla trigliserid formunda olan lipid birikimidir. Obezite ve tip-2 diabetes mellitus patolojilerinde görülen insülin direncinin, hepatik steatoz (ilk vuruş) gelişiminde rol oynayan önemli faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. İnsülin direnci, hiperinsülinemi ve periferik lipolize sebep olmaktadır. Lipoliz serbest yağ asitlerinin (FFA) sirkülasyonunu ve hepatositlerin yağ asidi alımını arttırmaktadır. Hiperinsülinemi ise glikolizi tetikleyerek hepatik yağ asidi sentezine neden olmaktadır. Ayrıca, hiperinsülinemi karaciğerin yeniden esterleme ve trigliserid salınım yeterliliğini azaltarak hepatositlerdeki trigliserid birikimini kolaylaştırmaktadır [7, 8].

Hepatik steatoz sonucunda hepatositlerde oksidatif strese karşı duyarlılık gelişmektedir. Bu durum, nekroinflamasyon aktivitesi ve fibrozis ile ilişkili olarak basit steatozdan NASH gelişimine kadar gidebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle oksidatif stres "ikinci vuruş" olarak bildirilmektedir. Mitokondriyonlar, yağ asidi oksidasyonunda merkezi bir role sahiptir ve hidrojen peroksit formunda bulunan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana hücrel kaynağı olduğundan mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Oksidatif stres, ROS üretimi ile hücrel antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Hepatik steatoz durumunda, sınırlı endojen antioksidan rezervi ve artan mitokondriyal serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan serbest radikaller hücrede bulunan lipid, protein ve DNA'ya oksidatif zarar vererek hücre ölümüne sebep olmaktadır [8, 9].

Oksidatif stres, steatohepatiti lipid peroksidasyonu, sitokin indüksiyonu ve Fas ligand indüksiyonu olmak üzere üç ana mekanizma ile tetiklemektedir. ROS, massif membran lipoperoksidanı ile doğrudan hücrel yıkımı indüklemenin yanı sıra ikincil haberci olarak tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), dönüştürücü büyüme faktörü (*transforming growth factor beta*, TGF- β) ve interlekin 8 (IL-8) gibi proinflamatuvar ve profibrogenik sitokinlerin düzenlenmesinde görev almaktadır [7, 8].

Kolşisin bitkilerden elde edilen bir alkaloid maddedir. Gut artriti ve Ailesel Akdeniz ateşi (FMF), Romatoid Artrit, Behçet hastalığı gibi diğer romatizmal hastalıklara karşı etkin bir şekilde kullanılmaktadır [10]. Kolşisin etkisi, granülositlerin inflamasyonlu alana göç etmesini engelleme ve granülositlerin metabolik ve fagositik aktivitesini azaltma temeline dayanmaktadır. Ayrıca, Kolşisin antioksidan, antiinflamatuvar, antimitotik ve antifibrotik bir ajan olduğu ve 129 farklı mikrotübül aracılı prokollagen taşınımını yavaşlattığı ve

kollagenaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir [11, 12]. Bu çalışmamızda, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen Kolşisin uygulamasının NASH'daki etkisini değerlendirmek amacı ile TNF- α değişimi incelenecektir.

Kısmi hepatektomi ve kimyasal veya viral kaynaklı karaciğer hasarından sonra artan alfa-fetoprotein (AFP) konsantrasyonunun karaciğerin eski durumuna dönme sürecinde hepatositlerin proliferasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Karaciğer yenilenme sürecinde artan AFP miktarı, hepatosit proliferasyonu durdurulduğu zaman azalma göstermiştir [13]. Bu nedenle çalışmamızda kolşisinin karaciğer üzerindeki etkisini incelemek amacı ile AFP, hepatosit yenilenme-rejenerasyon belirteci olarak kullanılmıştır.

Fruktoz, trigliseridlerin ve serbest yağ asitlerinin hepatik dokularda ve kan dolaşımındaki birikimi tetikleyen ve insülin direncine neden olan lipojenik bir şeker molekülüdür [14]. Hepatik dislipidemi ve insülin direnci ile ilgili araştırmalarda kullanılan modellerin oluşumunda fruktoz tercih edilmektedir. Yüksek fruktoz içerikli yiyecek ve içecek tüketimi metabolik sendrom, obezite ve NASH riskini artırmaktadır. Sıçanlarda uygulanan fruktoz içeriği yüksek diyet sonucunda alkole bağlı olmayan karaciğer hastalık modeli oluşturulmuş ve etkileri gözlemlenmiştir. Vücut ağırlığında, abdominal bölgede, kan glukoz düzeyinde ve hepatik indikatörlerde artış olduğu, HDL'de azalma olduğu belirtilmiştir. Karaciğer histopatolojisi değerlendirildiğinde ise, inflamatuvar hücre inflamasyonu, mikro ve makroveziküler yağlanma ile fibrozis gösterilmiştir [15]. Çalışmamızda, deneysel NASH modeli oluşturmak için deney hayvanlarına 12 hafta boyunca %10 fruktoz içeren içme suyu verilmiştir [16].

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, kolşisinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkilerini göz önünde bulundurarak deneysel olarak NASH oluşturulan sıçanlar üzerinde oluşabilecek karaciğer hasarı üzerinde Kolşisin'in etkisini araştırmak ve bu bağlamda klinik uygulamalara destek vermesine katkıda bulunmasını sağlamaktır.



2. GENEL BİGİLER

2.1. Karaciğerin Embriyolojisi

Karaciğer üçüncü haftanın ortalarında, ön bağırsağın distal ucunda endodermal kalınlaşma sonucu ortaya çıkan bir çıkıntıdan gelişir. Bu çıkıntı, hepatik divertikulum ya da karaciğer tomurcuğu olarak da bilinmektedir [17]. Septum transversum penetre ederek çoğalan hücrelerden oluşur [18, 19]. Bu hücrelerin hızla çoğalması sonucu hepatik divertikulum ile duodenum arasında kalan alan daralarak safra kanallarını oluşturur. Bu kanallardan köken alan ventral çıkıntı safra kesesi ve duktus sistikusu meydana getirir [17].

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, epitelyal karaciğer kordonlarının vitellin ve umbilikal venler ile karışması sonucu hepatik sinüzoidler meydana gelmektedir. Septum transversum mezoderminden ise karaciğerin hematopoietik dokusu, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri gelişir [17, 20].

Karaciğer hücreleri çoğalarak septum transversumun tamamını kapladığında organ karın boşluğuna doğru büyür [17]. Karaciğerle duodenum ve karaciğerle karın ön duvarı arasında uzanan septum transversum mezodermi membranöz duruma gelerek sırasıyla omentum minus ve ligamentum falciforme'yi oluşturur. Bu iki oluşum birlikte ventral mezogastrium olarak bilinen peritoneal bağlantıyı oluştururlar [18, 20, 21].

Karaciğer gestasyonun beşinci haftasından altıncı haftasına doğru hızlı bir şekilde büyür. Altıncı haftada başlayan hematopoezis ve yüksek sinüzoid içeriği nedeniyle dokuzuncu haftaya gelindiğinde karaciğer ağırlığı fetüsün toplam vücut ağırlığının %10'u kadar olur. Bu süreçte, karaciğerde hepatositler ve damar duvarları arasında lökosit ve eritrosit öncül hücrelerinin üretildiği hücre çoğalmaları ile karakterizedir [22]. İntrauterin yaşamın son iki ayı boyunca hematopoietik aktivite yavaş yavaş azalır ve doğumda sadece birkaç küçük hematopoietik adacık kalır. Bu dönemde, karaciğer ağırlığı toplam vücut ağırlığının yaklaşık %5'i kadardır [19].

Gelişimin on ikinci haftasında karaciğer hücreleri safra üretmeye başlar. Hepatositlerde başlayan safra üretimi ductus sistikus ile barsağa verilir. Ductus sistikus hepatik kanal ile birleşmesi sonucunda safra gastrointestinal yolağa girebilir. Sonuç olarak, içeriği koyu

yeşil bir renk alır [19, 20]. Duodenumun pozisyonunda meydana gelen değişiklikler sonucunda safra kanalının girişi başlangıçtaki anterior pozisyondan posterior pozisyona doğru yön değiştirir ve sonuç olarak safra kanalı duodenumun arkasından geçer [17, 18, 21].

Karaciğer gelişiminin moleküler düzenlenimi

Karaciğere özgü genleri ifade edebilme ve karaciğer dokusuna dönüşebilme yeteneği ön bağırsak endoderminde var olan bir potansiyeldir. Bu durum çevrede bulunan ektoderm, kardiyak olmayan mezoderm ve özellikle notokord tarafından üretilen faktörlerle inhibe edilir. Bu inhibitörlerin etkisi de kardiyak mezoderm tarafından üretilen fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) tarafından inhibe edildiğinde karaciğer gelişimi başlar.

Kardiyak mezoderm, komşu endotel hücreleri ile birlikte, bu genlerin inhibe edici faktörünü engelleyerek, bağırsak endodermini karaciğere spesifik genleri ifade etmek için yönlendirir. Bu komutlara katılan diğer faktörler arasında septum transversum tarafından salınan kemik morfogenetik proteinlerde (BMP) bulunmaktadır. BMP'ler, FGF-2'nin karaciğer endodermi üzerindeki etkisini artırmaktadır. Bu moleküller ile beraber hepatosit nükleer transkripsiyon faktörlerinin (HNF) de kontrolü altında, karaciğer hücreleri hepatositlere farklılaşmaya başlarlar [20].

2.2. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, abdominal boşlukta regio hypochondriaca dextra ve regio epigastrica'da bulunur. Erişkinlerde 1200 - 1600 gr ağırlığındadır. Karaciğer bağ dokusundan yapılmış kuvvetli bir fibröz kapsül ile çevrelenmiştir. Diaphragma alt yüzüne gevşek bağ dokusu ile tutunan karaciğer, karın içi organların üzerinde yer alır. Karaciğerin diyafragmaya bakan facies diaphragmatica, iç organlara bakan facies visceralis adlı iki yüzü vardır. Facies diaphragmatica'nın üst kısmına pars superior denilir. Burada impressio cardiaca denilen hafif çukurluk bulunur. Pars dextra, bu yüzün peritonla örtülü sağ kısmıdır. Diafragmatik yüzün ön bölümü pars anterior, arka tarafı ise pars posterior olarak adlandırılır. Pars superior ile pars posterior'da area nuda denilen periton içermeyen bir alan vardır. Pars posterior'un sağ tarafında sulcus venae cavae bulunur. Sulcus venae cavae'nın 2 - 3 cm solunda fissura ligamenti venosi gözlenir. Burada ductus venosus'un kapanmasıyla oluşan

lig. venosum yer alır. Bu yüzdeki en belirgin çukurluk fossa vesicae biliaris (fossa vesicae fellea) denilen ve vesicae biliaris'in yerleştiği bölümdür. Bu yüzde ayrıca lig. teres hepatis ve bu ligamentin oturduğu fissura ligamenti teretis bulunur. Facies visceralis'in ortasında porta hepatis denilen damar ve sinirlerin girip çıktığı geniş bir geçit bulunur. Porta hepatis'in solunda tuber omentale adı verilen kabartı bulunur.

Facies diaphragmatica ve facies visceralis'in kesiştiği kenara margo inferior denilir. Karaciğerin lobus hepatis dexter ve lobus hepatis sinister olmak üzere iki büyük, visseral yüzde de lobus caudatus ve lobus quadratus olmak üzere iki küçük lobu vardır. Lobus caudatus ve lobus quadratus lobus hepatis dexter'e aittir. Lobus caudatus sağda sulcus venae cavae, solda fissura ligamenti venosi ve altta porta hepatis ile sınırlanmıştır. Lobus quadratus sağda fossa vesicae biliaris, solda fissura ligamenti teretis ve arkada porta hepatis ile sınırlıdır. Lobus hepatis dexter ile lobus hepatis sinister'i diafragmatik yüzde lig. falciforme hepatis, visseral yüzde ise fissura ligamenti teretis ve fissura ligamenti venosi birbirinden ayırır. Karaciğer sağ lobu visseral yüzünde arkadan öne doğru impressio suprarenalis, impressio renalis, impressio duodenalis ve impressio colica denilen ve sağ böbreküstü bezi, sağ böbrek, duodenum ve flexura coli dextra'nın oturduğu izler yer alır. Sol lob visseral yüzünde ise içten dışa doğru impressio oesophageale ve impressio gastrica denilen özefagus alt ucu ve mideye ait izler bulunur.

Karaciğerin diafragmatik yüzü area nuda denilen küçük bir alan ve ligamentum falciforme hepatis'in yapıştığı yer dışında, tamamı periton ile örtülüdür. Visseral yüzü ise fissura ve fossa'ların bulunduğu bölgeler dışında, her tarafı periton ile örtülüdür.

Karaciğeri yerinde tutan periton bağları vardır. Ligamentum coronarium olarak bilinen bağ, karaciğeri diyafragmaya sabitler. Bu bağ lig. falciforme, lig. triangulare dextrum, lig. triangulare sinistrum ve lig. hepatorenale oluşturur.

Karaciğer'in dışarı alınması gerekiyorsa, karaciğer üst yüzünde bulunan lig. falciforme hepatis, lig. coronarium ve ligamenta triangulare karın ön duvarı ve diaphragma'ya tutundukları yerlerden kesilir. Daha sonra vena cava inferior, diaphragma'yı delip geçtiği noktada kesilmelidir. Son olarak porta hepatis'te karaciğere giren ve çıkan yapılar, karaciğere en yakın yerlerinden kesilir ve karaciğer dışarı alınır [23].

2.3. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer, yoğun ve düzensiz sıkı bağ dokusu kapsül (Glisson kapsülü, capsula fibrosa) ile çevrelenmiş olup periton ile kaplıdır. Glisson kapsülünden karaciğer içerisine giren ince bağ doku oluşumları organı lob ve lobüllere ayırır. Kan ve lenf damarları, sinirler ve safra kanalları bu ince bağ dokusu içinde ilerler [24, 25].

Karaciğer lobülleri, ışınal tarzda düzenlenim gösteren hepatosit kordonları ile sinüzoidleri içerir. Karaciğerde klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü olmak üzere işlevsel olarak farklı üç lobül yapısı tanımlanmıştır [26]. Klasik karaciğer lobülünde, v. centralis merkezde yerleşim gösterirken, portal üçgen köşelerde yer almaktadır. Hepatosit kordonları arasında, v. centralisten lobül çevresine doğru sinüzoidler uzanır. Bu geometrik organizasyon sınırlayıcı perilobuler bağ dokusunun fazla bulunmamasından dolayı insanlarda zayıf olarak tanımlanmıştır. Portal alanlar ise v. porta, a. hepatica ve bir safra kanalı dalını içeren gevşek, stromal bağ dokusu yapısındadır. [26, 27].

Portal alanın kenarlarında, stroma ile hepatositlerin arasındaki bağ dokusunda periportal alan (=Mall alanı) adında küçük bir alan bulunmaktadır. Bu alan karaciğerde lenfin orjin aldığı yerlerden birisidir [26, 28].

Portal lobül merkezi portal alan olmak üzere sanal bir çizgi ile çevresindeki komşu lobüllerin v. centralislerini birleştiren üçgen şeklinde prizmalardan oluşur. Portal lobülde safra çevreden merkeze, kan ise merkezden çevreye doğru akmaktadır. [24, 26].

Hepatik asinüs (Rappaport'un asinüsü) olarak bilinen elmas şekilli yapılanma ise kan akışına ve bunun sonucunda hepatositlerdeki toksik veya hipoksik etkenler sonrasındaki değişiklikleri açıklamaya yöneliktir. Merkezde bir dağıtıcı arteri çevreleyen üç eş merkezli hepatik parankim bölgesi tanımlanır. En dış tabaka olan ve santral venden en uzakta bulunan alan zon 3 olarak isimlendirilir. Bu zon diğerleri ile karşılaştırıldığında oksijen bakımından en fakir olan bölgedir. Asinüsün en iç bölgesinde olan ve oksijen bakımından en zengin olan bölge zon 1 iken, ortadaki bölge 2. bölgedir. [24, 25].

Zonlar, hepatik hücrelerin vasküler perfüzyon derecesine veya durumuna göre karaciğerdeki dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanmasında ve

değerlendirilmesinde önemlidir. Zon 1'deki hücreler sinüzoidal kandan gelen oksijenin, besinlerin ve toksik maddelerin alınmasında diğer zonlardaki hücrelere göre ilk sıradadır. Bu zondaki hücreler, safra kanalı tıkanmasından sonra meydana gelen yapısal değişikliklerin ilk görüldüğü hücrelerdir. Ayrıca bu zondaki hücreler dolaşımda bir hasar meydana geldiğinde en son ölen hücrelerken, rejenerasyonun gerçekleştiği ilk hücrelerdir. Zon 3'deki hücreler perfüzyonun azaldığı durumlarda iskemik nekrozun ilk görüldüğü hücrelerdir. Yağ birikimi ilk bu zondaki hücrelerde görülmeye başlar. 3. Zonda bulunan hücreler toksik maddelere ve safra kanalı tıkanmalarına en son yanıt veren hücrelerdir. Zon 2'deki hücrelerin yanıtları ise zon 1 ile zon 3'deki hücrelere göre orta düzeydedir [26].

Anastomazlaşan hepatosit tabakaları 7 yaşına kadar iki sıradan daha kalın olmazken, sonrasında tek hücre kalınlığını geçmeyen bu hücreler. v. centralisten klasik lobülün çevresine yayılır. Hepatosit tabakaları arasındaki boşluklarda hepatik sinüzoidler bulunur. Bu geniş damarlara akan kanın hepatositler ile olan teması, sinüzoidal sınırlayıcı hücrelerden oluşan endotelyal sınır ile engellenmiştir. Sinüzoid endotelyumu, geniş bir alanda bulunmayan kesintili bir bazal laminaya sahiptir. Endotelyumun kesintili olduğu iki şekilde gösterilmiştir;

- 0,5 mm'den az çapta diyaframı olmayan geniş fenestraların delikli (veya elek) tabaka (sieve plate) olarak bilinen endotelyal hücrelerin arasındaki varlığı [24, 27].
- Komşu endotelyal hücreler arasındaki geniş boşlukların varlığı [26].

Hepatik sinüzoidler, diğer sinüzoidlerden duvarlarındaki ikinci bir hücre tipi olan Kupffer hücresini (stellat sinüzoidal makrofaj) içermesi nedeni ile farklıdır. Kupffer hücreleri monositlerden köken alır ve mononükleer fagositik sistemin bir üyesidir. Komşu endotelyal hücreleri ile bağlantı kurmazlar. Kupffer hücrelerinin uzantıları sıklıkla sinüzoidal lümeni aşar ve kısmen kapatır [24, 26]. Kupffer hücrelerinin fagozomları endositoz edilmiş partiküler maddeleri, hücresel debrisleri ve bu hücreler tarafından öldürülmüş eritrositleri içerir. Kupffer hücrelerinin elektron mikroyağlarında çok sayıda filopodia benzeri çıkıntı, mitokondriyon, granüllü endoplazma retikulumu (GER), küçük bir Golgi aygıtı ve bol miktarda lizozom ile geç endozom izlenir. Bu hücrelerin komşu hücreler ile hücreler arası bağlantı yapmamlarından dolayı hareketli oldukları düşünülmektedir [27].

Perisinüzoidal aralık (=Disse aralığı), hepatositlerin bazal yüzeyleri ile sinüzoidleri döşeyen endotelial hücrelerinin ve Kupffer hücrelerin bazal yüzeyleri arasında uzanır. Hepatositlerin bazal yüzeyinde bu aralığa doğru uzanan küçük ve düzensiz mikrovilluslar bulunur. Mikrovilluslar, hepatosit ile plazma arasındaki madde değişiminin gerçekleşebilmesi için yüzey alanını artırır. Buna rağmen perisinüzoidal aralıkta tip - 3 kollagen liflerin yanı sıra sınırlı sayıdaki tip -1 ve tip- 4 kollagen lifler de sinüzoidi destekler. Perisinüzoidal aralıkta bulunan bir diğer hücre tipi ise hepatik stellat hücresidir ve çoğunlukla İto hücresi olarak isimlendirilir. Hepatik stellat hücresinin A vitamini depolanmasında, tip-3 kollagen sentezinde ve Disse aralığına salınmasında, yeni hepatositlerin üretiminde ve büyüme faktörlerinin salgılanmasında görev aldığı düşünülmektedir [24, 25, 28].

Hepatik lenf sıvısı, perisinüzoidal aralıktan salınır. Perisinüzoidal aralıkta bulunan plazma periportal bağ dokusuna drene olur. Bu toplama bölgesinden sonra sıvı, portal triadın diğer elemanları ile birlikte seyreden lenfatik kapillerlere girer. Lenf gittikçe büyüyen damarların içinde, hepatositlerin seviyesinden portal kanallara doğru ilerler ve karaciğer hilusuna doğru akan safra ile birlikte aynı yönde hareket eder. Hepatik lenfin yaklaşık %80'i bu yolu takip ederek ductus thoracicus lenfinin büyük bir bölümünü oluşturup bu kanala direne olur [26].

Hepatositler, karaciğer lobülünün anastomozlaşan hücre kordonlarını meydana getirir. Hepatositler büyük ve poligonal hücrelerdir ve her düzlemde 20 ila 30 µm ölçülerindedir. Karaciğerdeki hücre popülasyonunun yaklaşık %80'ini oluştururlar. Bu hücreler karaciğer lobüllerindeki yerleşimlerine bağlı olarak yapısal özellikleri bakımından çeşitlilik gösterirler [24, 26]. Hepatositlerin yaklaşık %75'inin bir, kalanların iki çekirdeği vardır. Çekirdeğin boyutu değişkendir, en küçükleri diploid en büyükleri poliploid olmaktadır [26].

Hepatositlerin bazolateral ve apikal olmak üzere iki farklı hücresel yüzü vardır. Bazolateral yüzde bolca mikrovillus bulunur ve Disse aralığına bakar. Plazma proteinlerinin sekresyonu ve kanla taşınan maddelerin emilimi bazolateral yüz tarafından gerçekleşir. Apikal yüz safra kanaliküllerini ve safra sızıntısını önlemek adına mikrovilluslar tarafından örülmüş tıkaçıcı bağlantı birimlerini içerir [27].

Hepatosit sitoplazması genellikle asidofiliktir. Rutin ve özel boyama teknikleri ile spesifik sitoplazmik yapılar tanımlanabilir. Bunların içinde;

- Plazma proteinlerin sentezinden sorumlu GER içeren bazofilik bölgeler
- Vital boyama veya enzim histokimyası teknikleri ile her hücre başına 800 ila 1000 mitokondriyon.
- Her hücrede spesifik boyama ile gözlenebilen çoklu küçük Golgi kompleksleri
Hepatositlerdeki büyük Golgi aygıtlarında 50 kadar Golgi unitesi bulunmaktadır. Golgi aparatının yapıları safra kanaliküllerine yakın yerde yoğunlaşmıştır ve safranin salgılanması ile ilişkilidir. Hücrenin sinüzoidal yüzeyine yakın Golgi sisternaları ve vezikülleri elektronca yoğun 25 ile 80 nm çapında granüller içermektedir.
- İmmünohistokimyasal teknikleri ile büyük miktarlarda peroksizomlar saptanır. Peroksizomlarda bulunan katalaz enzimi hidrojen peroksiti oksijen ve suya indirger.
- Hepatositlerdeki granülsüz endoplazma retikulumu, kolesterol ve lipoprotein lipit bölümünün sentezlenmesinden sorumlu enzimlerin yanı sıra toksinlerin ve ilaçların parçalanmasına ve konjugasyonuna katılan enzimleri içerir [24-26, 29].

Hepatositler lipit damlacıkları ve glikojen yapısında, değişik miktarlarda inklüzyonlar içerir. Lipit damlacıkları daha çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerdir (*low density lipoproteins*, VLDLs). Glikojenler, granülsüz endoplazma retikulumu yakınlarında β partikül olarak bilinen 20 ila 30 nm boyutunda elektron yoğun granüllerin birikimi şeklinde görülür. Portal alana yakın bölgedeki karaciğer hücreleri granülsüz endoplazma retikulumu tarafından kuşatılmış büyük β partikül kümeleri ile çevrelenmiştir. Buna karşılık perisantral hepatositlerde yaygın glikojen görülür [24].

Hepatositlerin yaşam süreleri yaklaşık 150 gündür. Eğer hepatotoksik ilaçlar kullanılırsa veya karaciğerin bir kısmı çıkarılırsa hepatositler çoğalarak karaciğerin normal yapısına ve önceki boyutuna yeniden kavuşmasını sağlar. Yenilenmenin mekanizması dönüştürücü büyüme faktörü alfa (*transforming growth factor- α* , TGF- α), TGF- β , epidermal büyüme faktörü, interlökin-6 (IL-6) ve hepatosit büyüme faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Bu faktörlerin birçoğu Disse aralığında bulunan hepatik stellat hücresi (Ito hücresi) tarafından salgılanır. Birçok durumda yenilenme hepatositlerin kendisini replike edebilme yeteneklerinden ileri gelmektedir. Eğer hepatosit hasarı çok büyükse karaciğerdeki

yenilenme, kolanjioldeki ve herring kanalındaki oval hücrelerin mitotik aktivitelerine bağlıdır [26].

2.4. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğer abdominal kavitede bulunan ve sindirim sistemi ile yakından ilişkili olan vücudumuzun büyük bir organıdır. Karaciğerde gerçekleşen metabolik işlevler vücut için çok önemlidir. Vücut için gerekli olan birçok substratın yani glukoz, aminoasit ve plazma proteinlerin depolanması ve üretilmesinde karaciğer görev alır. Karaciğerde yürütülen fonksiyonlara örnek olarak detoksifikasyon ve atık ürünlerin uzaklaştırılması verilebilir [30].

Karaciğerde karbonhidrat metabolizması

Vücudumuz için önemli bir enerji kaynağı olan glukozun kandaki konsantrasyon değerleri karaciğerdeki mekanizmalar tarafından düzenlenir. Bunlara glikozun glikojen şeklinde depolanması, fruktoz ve galaktozun glikoza çevrilmesi ve glikoneogenesis örnek olarak verilebilir. İhtiyaç halinde glikoz üretimi karaciğerde 2 mekanizma tarafından gerçekleştirilir. Bunlardan ilki glikoneogenesis diğeri ise glikojenogenesis'dir. Vücutta glikoz seviyesi düştüğü zaman karaciğerde glikojenden glikoz sentezi gerçekleşir ve glikoz kana verilir. Bu olaya glikoneogenesis denir. Aminoasit, yağ ve karbonhidratlardan glikoneogenesis ile glikoz sentezi yapılır [31]. Yemek ile alınan glikoz sindirim sistemi tarafından absorbe edilince pankreasdaki insülin sekresyonunu uyarır. Karbonhidrat metabolizmasının kontrolünde insülin önemli bir hormondur. İnsülin reseptörleri uyarıldığında kas ve yağ dokusuna glikoz alımını insülin tarafından artırılır [32].

Karaciğerde yağ metabolizması

Vücudumuzda yağ metabolizması her hücrede gerçekleşmesine rağmen sadece karaciğere özgü birkaç fonksiyon tanımlanır. Bunlar;

1. Trigliseritlerden oksidasyon ile enerji üretimi gerçekleşir. Trigliseritler (TG) 1 gliserol ve 3 yağ asidinden oluşur. TG sentezi karaciğerde endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyinde gerçekleşir. TG hidrolizi ile açığa çıkan yağ asitleri enerji kaynağı olarak kullanılır. Yağ asitleri beta oksidasyon ile son ürün olan asetil CoA'yı

oluştururlar. Asetil CoA kolestrol, steroid ve yağ asitlerinin sentezi için birincil kaynağı oluşturur [33].

2. Kolesterol, fosfolipid ve lipoproteinlerin üretimi karaciğerde gerçekleşir.
3. Karbonhidrat ve proteinlerden yağ asitleri ve trigliserit sentezi gerçekleşir.

Enerji durumuna bağlı olarak karaciğer içindeki yağ asitleri ya TG olarak depolanır ya da enerji depolanmasına katkıda bulunmayan, hepatositlerin mitokondri veya peroksizomlarında β -oksidasyona uğrarlar. Yağ asitleri enerji üretmek için kullanılmadığında depolanma için trigliseritlere dönüştürülür veya VLDL ile dolaşımlara taşınır. VLDL üretimi için temel yağ asitleri kaynağı yağ dokusu içindeki lipolizden gelir. Karaciğerin VLDL partiküllerini bir araya getirip salgılaması hepatik lipid stabilitesini önemli ölçüde etkiler [31, 34].

Karaciğerde protein metabolizması

Karaciğerde albümin, transferrin, haptoglobulin gibi proteinlerin sentezi gerçekleşmektedir. Hemen hemen bütün plazma proteinleri (%90) karaciğerde sentezlenirken geriye kalan kısmı (%10) lenfatik dokularda üretilir. Aminoasitlerin özellikle esansiyel olmayan amino asitlerin hepsi karaciğerde sentez edilir. İlk aşama olarak keto asit sentezlenir sonrasında transaminasyon ile bir amino asidin amino grubu bir keto aside taşınır. Buna transaminasyon denir. Deaminasyon ile toksik madde olan amonyak karaciğerde üreye çevrilir [31].

Safra, karaciğerdeki hepatositlerde sentezlenir ve önce safra kanalına oradan da duodenuma boşalır, hepatositlerin apikal membranlarından safra kanalikülülerine geçerek aktif olarak başka bir yere taşınabilir. Safra, yapısı itibarıyla bir mişel solüsyondur ve içeriğinde safra asiti, fosfatidilkolin ve kolesterol bulundurur. Safra asitleri hepatositlerde kolesterol metabolitlerin son ürünlerinden sentezlenir. Kolesterol birçok enzimin işlevi sayesinde son ürün olan safra asidine dönüştürülür. Safra içeriğindeki çözünen maddeler sayesinde elektrolitler ve su birlikte kanalikülileri oluşturan iki hepatosit arasındaki sıkı bağlantıları aşarak geçer. Safra içeriği biliyer kanallardan geçerken değişebilir. Ağza alınan ilk besinle beraber duodenumdaki sfinkter gevşer, mideden gastrik içerikler de duodenuma doğru boşalınca intestinal mukozada bulunan kolesistokinin hormonu (CCK) safra kesesinin kasılmasına yol açar. Karaciğer potansiyel olarak toksik bir madde olan

bilirubin vücuttan atılımı ile görevlidir. Bilirubin hemoglobinin yapısındaki hem grubunun dalakta retikuloendotelial sistem tarafından parçalanması sonucu açığa çıkar. Bilirubin karaciğere Disse aralığından girer [30, 35].

Safra içeriğinin belirleyici etmeni safra tuzlarının oranıdır ve bunlar enterohepatik sirkülasyon ile geri dönen safra tuzlarının konsantrasyonu ile kontrol edilirler. Gastrointestinal hormonlar olan sekretin, kolesistokin ve glukagon safra hacmini ve safraya inorganik iyon salınımını artırır [36].

Karaciğer bazı vitaminleri depo edebilir. Karaciğerde özellikle A vitaminin depolanması önemlidir. Buna ilaveten B ve D vitaminleri de depo edilmektedir. Demirin depo şekli olan ferritin karaciğerde depolanır. Vücutta demir miktarı arttığı zaman demir apoferritin ile birleşerek hepatositlerde depolanır. Buna ek olarak vücuttaki demir seviyesi düştüğü zaman ferritin demiri serbest bırakır. Vücuttaki bu denge karaciğerde kan demirinin tamponlanması ile mümkündür. Karaciğer kanın pıhtılaşmasında görev alan faktörlerin sentezlenmesinde görev alır. Bunlar fibrinojen, protrombin, faktör VII gibi koagülasyon faktörleridir [31].

Karaciğer ekzojen ve endojen kimyasalları, yabancı molekülleri zehirsizleştirebilir ve biyolojik olarak değişime uğratabilir. Metabolik detoksifikasyon adı verilen bu işlem potansiyel olarak toksik maddelerin bağırsak veya böbrek tübüllerin yeniden emilimini azaltır ve bağırsak ve böbrek atılımlarını kolaylaştırır. Bu şekilde alkol, barbitüratlar, amfetaminler, steroidler ve östrojen, aldosteron, antidiüretik hormon ve testosteron gibi hormonlar metabolize veya detoksifiye edilerek, aşırı birikim ve yan etkileri önlenir [34].

Karaciğerin sinüzoidlerindeki Kupffer hücreleri portal kandaki bakterileri ve yabancı parçacıkları uzaklaştırır. Karaciğer tüm venöz kanı bağırsak ve pankreastan aldığı için Kupffer hücreleri zararlı bağırsak bakterilerinin yok edilmesinde ve enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir rol oynar [29, 34].

2.5. Alkolik Olmayan Steatohepatit (NASH)

2.5.1. Tarihi ve tanımı

1980 yılında, Ludwing ve arkadaşları tarafından, kronik karaciğer hastalığına sahip alkolik karaciğer hastalarında görülen histolojik bulgulara benzer özellikler gösteren ancak alkol kullanmadıklarını belirten 20 hasta tanımlanmıştır [1]. Sonrasında sebebi bilinmeyen bu durumu belirtmek için alkolik olmayan terimi kullanılmıştır. Bu hasta grubunda biri dışında tüm hastaların aşırı kilolu veya obez olduğu gözlemlenmiştir. Sonraki 30 yıllık süreçte yapılan araştırmalar NAFLD olarak tanımlanan ve dünyada kronik karaciğer hastalığının en yaygın sebebi olarak görülen bu durumun daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [2].

NAFLD, alkol tüketmeyen ve kronik karaciğer hastalıklarının bilinen sebeplerinden viral hepatitis B/C (HBV/HCV), otoimmün hastalıklar (otoimmün hepatitis (AIH), primer sklerozan kolanjit (PSC), primer biliyer siroz), genetik hastalıklar (hemokromatozis, Wilson hastalığı, alfa-1 antitripsin (A1AT)), ilaçla indüklenen karaciğer hastalıklarını içeren geniş spektrumlu karaciğer patolojilerini kapsar [37]. Agresif bir NAFLD çeşidi olan NASH ise histolojik olarak %5'ten fazla makroveziküler steatoz, nekroinflamasyon, hepatositlerde balonlaşma görülen, fibrozisin olduğu veya olmadığı; ayrıca karaciğer ilişkili ölüm ve hepatoselüler karsinoma riski yüksek siroz ile sonlanabilen tek bir hastalığı ifade eder [38].

NAFLD hastalarının %90'ında basit steatoz vardır bu nedenle mortalitede bir artış görülmez [37, 39]. Bu hastaların yaklaşık olarak %10-30'unda hepatosellüler hasar ve inflamasyon ile ilişkili NASH görülür. NASH görülen hastaların %25-40'ında ilerleyen fibrozis, siroz ve karaciğer hastalıklarının son evresi gelişir [40, 41].

2.5.2. NASH histopatolojisi

NASH'ın histopatolojik özelliği genellikle perivenüler alanları (asiner zon 3) etkileyen makroveziküler steatozdur. Şiddetli vakalarda bu steatoz tüm zonlara ilerleyebilir. Karaciğerin ışık mikroskopunda yağlanma yönünden normal olarak değerlendirilmesi için belirlenen net bir yağ vakuol sayısı yoktur, fakat hepatositlerin %5'inden daha azını içerdiğinde normal kabul edilmesi önerilmektedir [40]. Hepatik steatoza, nekroinflamasyon

eşlik ettiği zaman NASH teşhisi konulabilir. NASH'ta görülen nekroinflamasyon ve hepatosellüler hasarın en karakteristik özelliği, ara sıra Mallory hiyalin cisimcik oluşumu ile ilişkili olan hepatosellüler balonlaşmadır. NASH'ta görülen Mallory cisimcikleri çoğu kez küçük ve zayıf oluşumlardır. Bu histolojik yapıları tespit etmek için immünohistokimyasal tekniklerin uygulanması gerekmektedir [42, 43]. Lobüler inflamasyon, nötrofillerin, lenfositlerin ve makrofajların karışık olarak infiltrasyonu olarak tanımlanır. Fibrozis, bazen steatohepatitin belirleyici bir özelliği olarak düşünülür ve yaygın olarak hastalığın evresini belirlemek için kullanılmaktadır. NASH'ın tipik fibrozis bulgusu perisinüzoidal ve/veya periselüler dağılımdır. Zamanla fibrozisin en şiddetli formu olan köprüleyici fibrozis gelişebilir ve bazı hastalarda bu fibrozis siroza ilerlemektedir. Siroz geliştikten sonra, steatohepatit bulguları genellikle daha az dikkat çeker hale gelmektedir [44].

Brunt ve arkadaşları tarafından geliştirilen NASH'ın puanlama sistemi geniş çapta kabul görmüştür. Steatoz lezyonlarını ve nekroinflamasyonu “derece” olarak, fibrozisin lezyonlarını ise “evre” olarak birleştirir [38].

Çizelge 2.1. Brunt'a göre NASH'da histopatolojik lezyonların derecelendirilmesi ve evrelemesi [38].

Nekroinflamatuvar Evreleme
Evre 1; Hafif Steatoz (ağırlıklı olarak makroveziküler) biyopsinin %66'sını içerir; zon 3'te balonlaşmış hepatositler görülebilir. İntraasiner polimorfonükleer hücreler ve lenfositler bulundurulabilir.
Evre 2; Orta Herhangi bir derecede steatoz, hepatositlerde belirgin balonlaşma (ağırlıklı zon 3'te), intraasiner polimorfonükleer hücreler görülür, zon 3 periselüller fibrozis ile ilişki olabilir; portal ve intraasiner kronik inflamasyon hafiften orta şiddete doğrudur.
Evre 3; Şiddetli Panasiner steatoz; belirgin balonlaşma ve bozulma, ağırlıklı olarak zon 3'tedir. Hepatositlerde kronik inflamasyon, portal alanda kronik inflamasyon görülür.
Fibrozis Evresi
Evre 1'de Zon 3 perisinüzoidal/periselüller fibrozis; fokal olarak veya geniş ölçüde mevcuttur.
Evre 2'de Zon 3 perisinüzoidal/periselüller fibrozis fokal veya geniş periportal fibrozis ile birlikte görülür.
Evre 3'te Zon 3 perisinüzoidal/periselüller fibrozis ve portal fibrozis fokal veya geniş köprüleme fibrozis ile birlikte.
Evre 4 Siroz.

Bu skarlama sistemi uygun olmakla birlikte sadece NASH için geliştirilmiştir ve tüm NAFLD spektrumunu kapsamaz. Puanlama protokolü, 14 bireysel histopatolojik özellik içermektedir. Çoklu lojistik regresyon kullanılarak, NAFLD aktivite puanı (NAFLD Activity Score = NAS) oluşturulmuştur. NAS, steatoz, lobüler inflamasyon ve hepatoselüler balonlaşma skorlarının ağırlıksız toplamıdır.

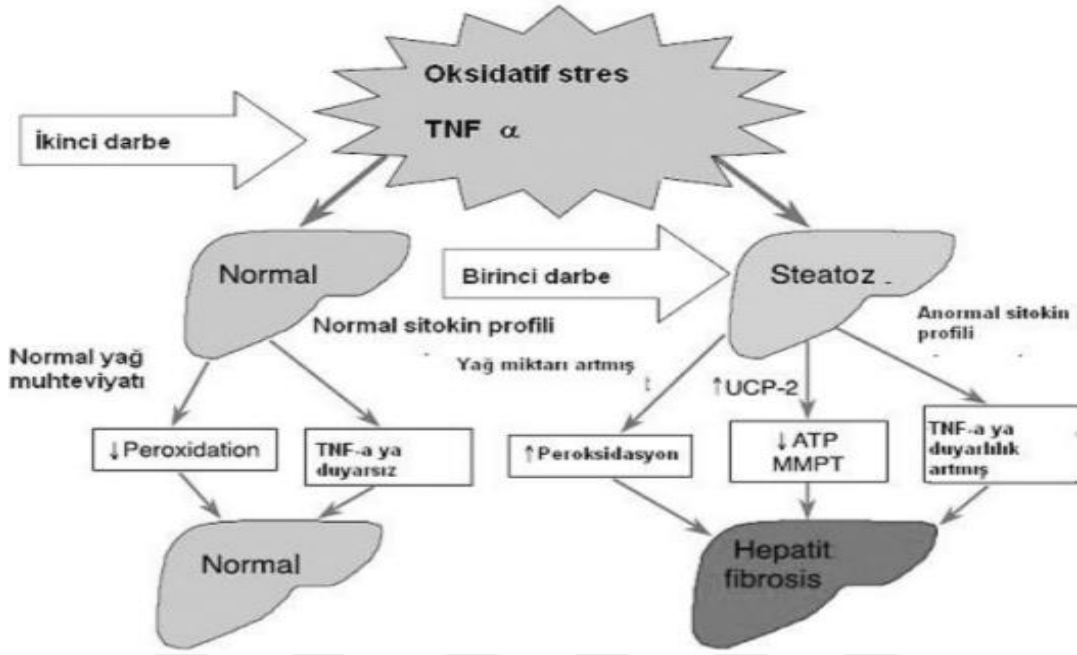
Skarlama, NAS skoru ≥ 5 ise NASH olarak tanımlanırken, 3 veya 4 “NASH sınırı”, ve NAS skoru < 3 iken “NASH değil” olarak belirlenmiştir [45].

2.5.3. NASH patofizyolojisi

NASH patofizyolojisinde yer alan temel görüşlerden biri çift vuruş teorisidir. Obezite ve tip-2 diabetes mellitus patolojilerinde görülen insülin direncinin, hepatik steatoz ("ilk vuruş") gelişiminde rol oynayan önemli faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. İnsülin direnci, hiperinsülinemiye ve periferik lipolize sebep olmaktadır. FFA sirkülasyonunu ve hepatositlerin yağ asidi alımını artırmaktadır. Hiperinsülinemi ise glikolizi tetikleyerek hepatik yağ asidi sentezine neden olmaktadır. Ayrıca, hiperinsülinemi karaciğerin yeniden esterleme ve trigliserid salınım yeterliliğini azaltarak, hepatositlerdeki trigliserid birikimini kolaylaştırmaktadır[8, 46].

Hepatositler içinde yağ birikiminin, iyi huylu ve geri dönüşümlü bir durum olduğu kabul edilmiştir. Yağlı karaciğere sahip bazı kişilerde inflamasyonu ve/veya fibrozis geliştiği ve NAFLD'nin daha agresif bir formu olarak kabul edilen NASH'ın oluşumu tam olarak anlaşılmamıştır. Çok sayıda sitokin, adipokin ve değişmiş gen ifadesinin, yağlı karaciğerin inflamasyonuna ve sonuçta karaciğerin fibrozise ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir. 1998 yılında Day tarafından NASH oluşumu için iki aşamalı bir model ileri sürülmüştür. Bu modele göre ilk aşama hepatik steatozun gelişimi, ikinci aşama inflamasyon ve fibrojenizisdir [47].

Obezitede, adipoz dokudaki makrofaj infiltrasyonu, proinflamatuvar bir yanıtı yol açar [48]. Proinflamasyon durumunda, bazı adipokinler ve sitokinlerin salınımının, yağ birikimi ve NASH'ın varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Karaciğer yağlanması ve NASH'in patogenezi [47]

NASH'daki inflamasyon ve fibrojenizle ilişkili özgün moleküllerin ve hücrel süreçlerin bazıları daha fazla araştırılmıştır.

Tümör nekroz faktörü- α

Basit yağlı karaciğerden NASH'a ilerleme sürecinde TNF- α önemli bir molekül olarak kabul edilir. TNF- α , adipoz dokudaki makrofajlar tarafından üretilir ve obezite varlığında düzeyi artar [48]. Serbest yağ asitleri, nükleer faktör kappa B (NF-KB) aktivasyonu ile hepatositlerde TNF- α ekspresyonunu indükleyebilir böylece hepatik steatozda görülen serbest yağ asiti akışındaki artış, inflamasyon süreci ile ilişkilidir [49]. TNF- α , adipositlerde adiponectin üretimini azaltır [50]. NF-KB'nin kappa B inhibitör kinaz (IKK- β), TNF- α , IL-6 ve IL-1 β tarafından aktive edilmesi yaygın olarak NASH ile ilişkili olan hepatik ve sistemik insülin direnci ile bağlantılıdır [51]. Serbest yağ asitleri, hepatositlerdeki IKK- β / NF-KB yolunu doğrudan aktive edebilir; bu sadece karaciğerde serbest yağ asitlerinin düzeyini arttırmakla kalmaz, inflamasyonun başlamasını da destekler.

Oksidatif stres

Lipid peroksidasyonu, ROS türlerinin hücre zarlarındaki lipidlerden elektronları alarak lipidlerin bozulmasına neden olan bir reaksiyondur. NASH'da hücre hasarına neden olan farklı yolların önemli bir parçasıdır. Lipid peroksidasyon ürünleri, proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra apoptozisi uyaran ölüm ligandlarının üretilmesine yol açan NF-KB transkripsiyon faktörünü aktive eder [52]. ROS'un oluşması, inflamasyon durumu ortaya çıkınca inflamatuvar hücrelerden kökenlenir. İnsülin direncinin bir sonucu olarak serbest yağ asitlerinin hepatositlere geçmesi, mitokondriyonda ve granülsüz endoplazma retikulumu ROS türlerinin üretilmesine yol açar. Sitokrom P-450 sisteminin indüklenabilir bir enzimi olan sitokrom P-450 2E1 (CYP2E1)'in indüksiyonunun NASH durumundaki karaciğer hasarında arttığı ve bu durum ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [53, 54]. CYP2E1, etanolün yanı sıra yağ asitlerini de metabolize eder ve her iki substrat da enzimin ekspresyonunu indükler. Artan CYP2E1 aktivitesi, substratlar metabolize edildiğinde artan oksijen radikallerinin üretimine yol açar. Böylece CYP2E1'in uyarılması, hepatositler içindeki lipid peroksidasyonuna katkıda bulunur. Bunun vücut kitle indeksi (VKİ) ile arasında bağlantı bulunmaktadır [55].

Endoplazmik retikulum stresi

Endoplazmik retikulum (ER), proteinlerin sentezinde, katlanmasında ve taşınmasında merkezi bir rol oynar. ER, homeostazdaki değişikliklere duyarlıdır. ER stresi, katlanmamış protein yanıtı varlığında ER tetiklenmesiyle birlikte katlanmamış proteinlerin birikimi ile ortaya çıkan bir durumdur. NASH hastalarında, katlanmamış protein yanıtı, düzeltme yollarını aktive etmeyerek değiştirmektedir. Bu değişiklikler, serbest yağ asidi toksisitesi ve mitokondriyal işlev bozukluğu ile birlikte apoptozis ve inflamasyonla sonuçlanan c-jun-N-terminal kinazın aktivasyonuna yol açar [56].

Hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonu

Hepatik stellat hücreleri, kronik karaciğer hastalığında fibrozis gelişiminde önemli olan ve Disse aralığında bulunan (daha önce İto hücreleri, lipositler, perisinüsoidal hücreler veya yağ depolayan hücreler olarak adlandırılmıştır) perisinüsoidal hücrelerdir [57]. NASH'ın süreci ile ilişkili daha önce tanımlanan inflamatuvar değişiklikler, normal iyileşme

işlemlerinin bir parçası olarak hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonuna yol açar. Şimdiye kadar, TNF- α stellat hücrelerini doğrudan aktive ediyor gibi görünmemektedir, ancak TNF- α olasılıkla fibrojenik sitokinleri salgılayan aktif hepatik Kupffer hücreleri yoluyla fibrogenezi indüklemektedir. Kupffer hücreleri tarafından üretilen önemli sitokinlerden biri, stellat hücrelerinde hücre dışı matriks sentezini belirgin şekilde uyaran TGF- β 'dir [58]. İnflamasyon yolları dışındaki yolların da stellat hücre aktivasyonuna dahil olduğu düşünülmektedir. Obezite, insülin direnci ve NASH ile ilişkili bağ dokusu büyüme faktörünün pozitif regülasyonu yoluyla leptin, anjiyotensin II, norepinefrin; hiperglisemi ve hiperinsülinemi için profibrojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [59].

2.5.4. Klinik özellikler

NASH hastalarında son dönem dışında herhangi bir klinik belirti yoktur. Ancak bazı hastalar üst karın bölgesinin sağ tarafında dolgunluk hissi tanımlamaktadır. Hepatomegali vakaların % 75'inde bulunur, ancak NASH hastalarındaki yüksek obezite prevalansı nedeniyle tespit edilmesi zor olabilir. Aşırı kilo / obezite ve diyabetin NASH gelişimi için önemli risk faktörleri olduğu açıktır [60]. NAFLD olgularının çoğunda hastaların kadın olduğu bildirilmiştir [1].

2.5.5. Tanı

Karaciğer fonksiyon testleri

NAFLD olan hastaların çoğunda sıklıkla saptanan tek laboratuvar bulgusu alanin transaminaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) veya her ikisinde birden hafif veya orta derecede artıştır. Bazı hastalarda ise enzimler normaldir [61]. Hastaların bazılarında alkalen fosfataz (ALP) ve/veya γ -glutamilttransferaz (GGT) bir miktar artmış olarak bulunur ve bu artış genellikle 2 katından daha fazladır. GGT artışının, insülin direncinin duyarlı bir ayırıcı olduğuna dair bazı deliller vardır. Bu nedenle GGT artışı, NAFLD için erken biyokimyasal bulgular arasında bulunur [62].

Ultrasonografi

Karaciğer ultrasonografisi, güvenli ve ucuz bir yöntemdir. Yağlı karaciğer prevalansını araştıran birçok çalışmada farklı şekillerde kullanılmıştır. Ultrasonografi basit yağlı

karaciğer ile NASH arasında ayırım yapabilme yeteneğine sahip değildir. Ayrıca fibrozisi saptama kapasitesine de sahip değildir [63].

Proton manyetik rezonans spektroskopisi

Proton manyetik rezonans spektroskopisi (1H-MRS), yağlı karaciğere tanı koymak için yeni ve invazif olmayan bir tekniktir. Bu yöntem pahalı olup özellikle gelişmekte olan ülkelerde her merkezde bulunmasa da, karaciğer yağlanması değerlendirilmesinde çok değerli bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Bu teknik özellikle hepatik steatozda olduğu gibi su ve yağ içeriğinin karışık olduğu dokularda kullanışlıdır. 1H-MRS invaziv olmayan tanı ve hepatik yağ infiltrasyonunun kantitatif değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ultrasonografide olduğu gibi, 1H-MRS basit yağlı karaciğer ile NASH arasında ayırım yapma yeteneğinden yoksundur. Ayrıca karaciğerdeki fibrozis gelişimi hakkında da bilgi vermez [64].

Karaciğer biyopsisi

Karaciğer biyopsisi, karaciğer hastalığının şiddetini ve prognozunu değerlendirmek için genellikle kullanılan en özgün yöntemdir. NASH tanısı sadece karaciğer dokusunun incelenmesi ile yapılabilir. Son yıllarda karaciğer biyopsisini, karaciğer fibrozisini değerlendirmek için kullanılan invaziv olmayan teknikler geri plana itmiştir, ancak bugüne kadar karaciğer biyopsisi NASH evrelemesinde hala önemli standart olarak kabul edilmektedir [65].

2.5.6. NASH prevalansı

Genel popülasyonda NASH prevalansı ile ilgili güvenilir bir veri yoktur. Obezite cerrahisi geçiren bireylerde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu hastalarda NASH sıklığı % 14 ile % 56 arasında değişmektedir. Karaciğer biyopsisi yapılan hasta serilerinde, NASH sıklığı % 1 ile % 32 arasında değişmektedir. NASH prevalansındaki bu büyük değişiklikler kısmen NASH'in farklı tanımlarına ve tanı koymak için kullanılan histopatolojik bulguların farkından kaynaklanabilmektedir [66]. Yapılan 351 otopsi serisinde alkolik olmayan hastalarda NASH sıklığı % 6,3 tür. NASH, obez kişilerin % 18.5'inde ve zayıf kişilerin % 2.7'sinde görülmüştür [67].

2.5.7. Tedavisi

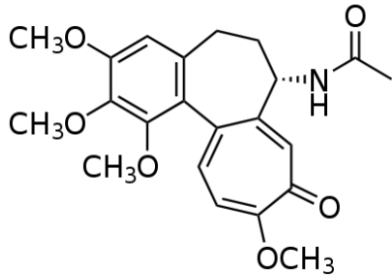
NASH'lı hastalar için bakım standardı, tedavinin temelini oluşturan kilo kaybıyla yaşam tarzı değişikliğidir. Haftada 3-4 kez yapılan, yaklaşık 400 kalori harcayan egzersiz, NASH hastalarında metabolik profili iyileştirebilmektedir [68, 69]. Obezite cerrahisi ile elde edilen kilo kaybı, NASH hastalarında karaciğer histolojisini iyileştirmektedir [70]. Şimdiye kadar NASH için belirlenmiş bir farmakolojik tedavi yoktur. NASH için tedavi yöntemleri, insülin duyarlılığını arttırmayı, altta yatan metabolik risk faktörlerini değiştirmeyi veya oksidatif stresi azaltarak karaciğeri daha fazla hasardan korumayı amaçlar. Farklı başarılar gösteren çoklu farmakolojik girişimler denenmiştir. Bunlar pentoksifilin, orlistat, E vitamini, ursodeoksikolik asit ve lipit düşürücü ajanları içerir [71, 72]. Metformin ve tiyazolidindionlar gibi insülin duyarlılaştırıcı ajanların çalışmaları umut verici sonuçlar vermiştir [73, 74]. Plasebo kontrollü bir pioglitazon çalışmasında aktif tedavi alan 26 NASH hastasında metabolik ve histopatolojik iyileşme görülmüştür [75]. Benzer sonuçlar, 63 NASH hastasının olduğu bir çalışmada da rapor edilmiştir. Bu çalışmada steatoz ve aminotransferaz düzeyleri belirgin şekilde düzelmiş, ancak diğer karaciğer hasarı parametrelerinde bir düzelme olmamıştır [76].

2.6. Kolşisin

2.6.1. Kimyasal yapısı ve genel özellikleri

Kolşisin, yaklaşık olarak 10-30 cm uzunluğundaki *Colchicum* cinsine ait *Colchicum autumnale* türü bitkiden izole edilen bir alkaloid ve ikincil bir metabolit olma özelliği taşır. Ayrıca antimitotik özelliğe sahip olan bu bitkinin ürünü çok şiddetli bir zehire sahiptir. Avrupa'nın güneyi ve batısına doğru yayılım gösteren bu bitki 20'den fazla alkaloid içerir. Kolşisin ve türevleri bunların en tehlikelilerindendir. *Colchicum* cinsinin neredeyse 200 türü bulunmaktadır [77].

Sistematik adı N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo [a] heptalen-7-y1] acetamid (kimyasal formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$) olan Kolşisin hafif alkali özellikte bir alkaloiddir. Tuzları çok dengesiz ve sulu çözeltileri içinde kuvvetlice hidrolize olmaktadır. Tubuline spesifik bir yerden bağlanan trisiklik bir türevidir [77].



Şekil 2.2. Kolşisinin moleküler yapısı

2.6.2. Kolşisinin terapötik kullanımı

Kolşisinin en sık FMF ve gut hastalığında kullanılır. Bunun yanısıra Kolşisinin romatizmal osteoartrit, Behçet hastalığı, perikardit, ateroskleroz karaciğer sirozu gibi romatizmal olmayan durumlarda da kullanımı söz konusudur [78].

2.6.3. Kolşisinin etki mekanizması

Kolşisinin antimiyotik ve antiinflamatuvar etkileri

Kolşisinin etki mekanizması tam olarak aydınlatılmış değildir. Fakat bilinen en iyi özelliklerinden biri kolşisinin antimiyotik özelliğinin olmasıdır. Kolşisinin ana mekanizması mikrotübüldeki polimerizasyonu engellemesidir. Mikrotübüller hücre iskelet yapısındaki ana unsurlardır ve protein filamentlerinden meydana gelirler. Mikrotübüller hücrede gerçekleşen migrasyon, bölünme ve kutuplaşma gibi aktivetelerde görev alırlar. Mikrotübülün yapısı α ve β tubülin heterodimerlerden oluşur ve bunlar antimiyotik ajanlara karşı duyarlıdır. Her bir kolşisin molekülü bir tubülin molekülüne tutunur ve bir polimer yapı oluşturmayı engeller. Mikrotübül uzaması durur, mitotik mekik yapısı bozulur ve bu nedenle hücre bölünmesi tamamlanamaz [79]. Moleküler düzeyde incelendiğinde, kolşisin hücre bölünmesinin metafaz evresindeki mitotik aktiveteleri bloke eder. Kolşisin mikrotübül yapısına müdahale ederek uzamayı durdurur. Kolşisin düşük konsantrasyon düzeylerinde mikrotübül büyümesini durdururken yüksek konsantrasyon düzeylerinde mikrotübüllerde depolarimerasyona neden olmaktadır [80].

Kolşisin hücre iskelet yapısını bozarak birçok sinyal yolağını engeller. Buna örnek olarak endojen düzenleyicisi olan sitokin ve kemokin salınımının engellenmesi verilebilir. Ayrıca, kolşisin lökositlerdeki adhezyon, mobilite ve sitokin üretimini değiştirir. Kolşisin, endotel

hücre yüzeyindeki E-selektin dağılımını değiştirir ve nötrofillerin buraya bağlanmasını engeller. Ayrıca, nötrofil adezyon molekülü olan L-selektinin uzaklaştırılmasında da rol oynar ve böylece inflamatuvarlı dokuya yeni nötrofil geçişini engellemiş olur. Bunlar, kolşisinin antiinflamatuvar etkilerini açıklamaktadır [79, 80]. Kolşisinin makrofajlar üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır. Deneysel sıçan modelinde kolşisin makrofajlar tarafından salınan liposakkarit-uyarımli TNF- α sekresyonu değiştirmektedir. Farelerde kolşisin varlığında peritoneal makrofajlar daha az ROS oluşum ve NO ile IL1 β salınımına neden olmaktadır [80].

Kolşisin ve antifibrotik etkisi

Kolşisinin antifibrotik etkisi bulunmaktadır. Bir deneysel sıçan modelinde kolşisin karaciğer fibrozisini hepatik stellat hücre aktivasyonunun engellenmesi ve stellat hücre apoptozisini uyarması ile engeller. Ayrıca, apoptotik yolakta görev alan B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) proteinin ekspresyonunu ve kaspaz-3'ün baskılanmasını sağlayarak fibrozisi önler [80].

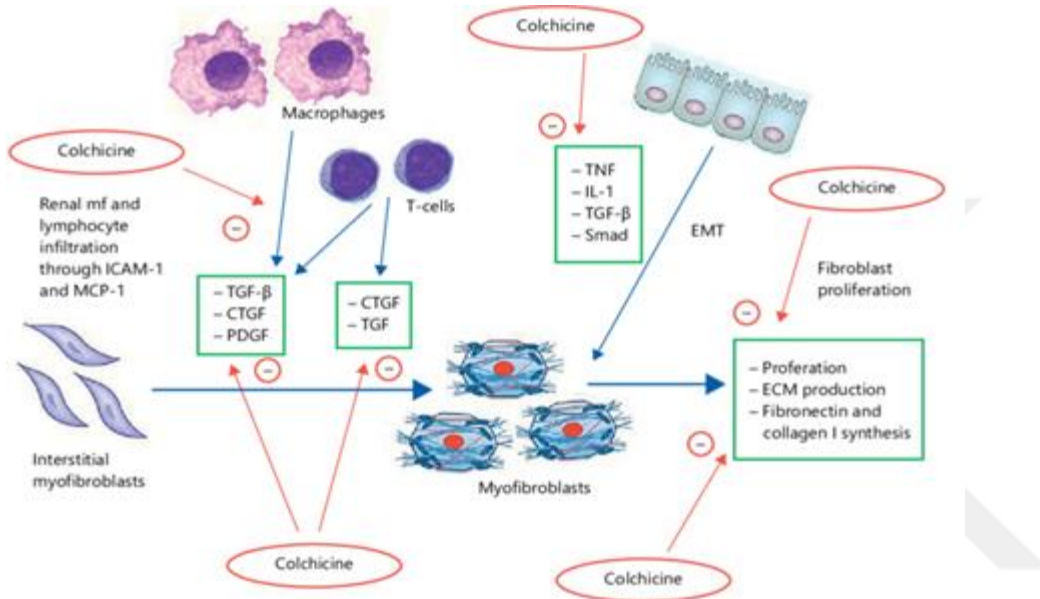
Kolşisin ve antioksidan etkisi

Kolşisin antioksidan özellikli bir ilaçtır. Diğer plazma antioksidanlarından farklı olarak kolşisin yüksek konsantrasyonlarda etki gösterir. Uzun süreli kullanımda ve yüksek konsantrasyonda olumlu etkisi vardır. Yapılan bir karbon tetraklorür (CCL₄) kaynaklı akut karaciğer hasarı çalışmasında kolşisinin uzun dönem kullanımı ile MDA seviyerleri düşmüştür [81].

2.6.4. Kolşisin ve karaciğer hastalığı

Kolşisin antitübilin ve mitozu engellmesi ile karaciğer hastalıklarında yararlı olabileceği ve geniş kapsamlı bir etkiye sahip olabileceği bilinmektedir. Bunlar antiinflamatuvar etki, lipid peroksidanın engellenmesi, membran stabilizasyonu ve sitokrom P-450 seviyelerini azaltmaktadır. Karbon tetraklorür (CCL₄) kaynaklı akut karaciğer hasarı modelinde kolşisin malondialdehit (MDA) seviyelerini azaltmıştır [81]. Muntoni ve ark., kronik karaciğer sirozlu ve alfa-interferon ile tedavi edilemeyen 74 hasta için rastgele kontrollü çift-kör bir çalışma yapmıştır. 4 yıl süren çalışma boyunca günlük 1 mg dozdaki Kolşisinin hayatta kalmayı önemli derecede artırdığı ve serum tip-III prokollagen N-

terminal peptidi (karaciğer fibrozisi için bir belirteç) azalttığı gösterilmiştir [82]. Karaciğer siroz seçili olgularda Kolşisinin yararlı bir etkisinin olabileceğini akla getirebilir. Ursodeoksikolik aside yetersiz cevap veren primer biliyer sirozlu 91 hasta ile yapılan açık uçlu bir çalışmada, Kolşisin tedavisi ve onu izleyen metotreksat tedavisi ile 6 aylık karaciğer enzimlerinde ve histolojik fibrozis ve inflamasyon skorlarında önemli bir düşüş gözlenmiştir [83].



Şekil 2.3. Kolşisinin antifibrotik etkisi [80]

2.7. Fruktoz

2.7.1. Kimyasal yapısı ve genel özellikleri

Fruktoz meyvelerde, bazı sebzelerde ve balda bulunan bir monosokkarit olup bu yiyeceklerde sadece küçük miktarlarda bulunur. Fruktoza diyetle maruz kalma en çok sakkaroz veya glukozdan izomerizasyonla üretilen yüksek fruktozlu mısır şurubu (*high fructose corn syrup*, HFCS) bileşeni ile gerçekleşir. Fruktozun glukoz ile %42 veya %55 oranlarda kombinlendiği farklı HFCS formülasyonları olabilir [84]. Fruktoz, glukoz ile aynı kimyasal formüle sahip olmasına karşın ($C_6H_{12}O_6$) karaciğer metabolizmasının bu iki bileşene etkisi farklıdır. Karaciğer fruktozu daha hızlı bir hepatik dönüşüm ile glukoz, glikojene, laktat ve yağa dönüştürmektedir. Glukoz tüketimi sonrası kana geçen glukoz insülin salgısına neden olur ve kişide tokluk hissi meydana gelirken fruktozda insülin salgısı gerçekleşmez. Bu nedenle fruktoz tüketimi sonrası gerçekleşmeyen tokluk hissi

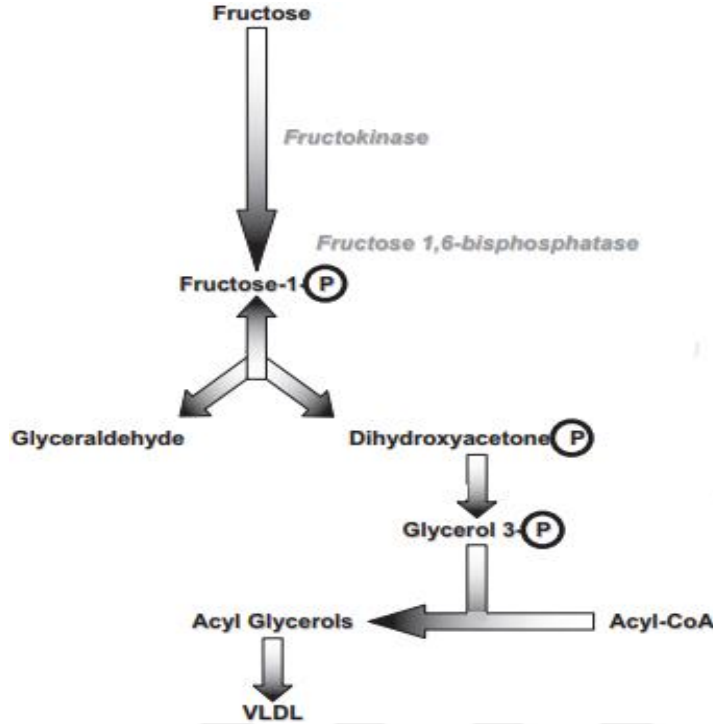
kişide aşırı beslenmeye bağlı organ içi yağlanmasına, obeziteye ve hipertansiyona yol açabilir [84].

Kemirgenlerde yüksek fruktoz tüketimi kronik olarak hepatik ve ekstrahepatik insülin direncine, obeziteye, tip 2 diabetes mellitusa ve yüksek tansiyona yol açar [85]. Yüksek seviyelerde fruktoza diyetle maruz kalmak karaciğerden kaynaklanan bir dizi metabolik değişikliği tetikler. Örneğin hepatik steatoz, hipertrigliseridemi, insülin direnci ve azalmış leptin duyarlılığına yol açmaktadır [86]. Diyetteki fruktoz, NAFLD ve karaciğerde hormonla düzenlenmiş lipid yollarıyla *de novo* trigliserit sentezinin artmasına neden olabilir [87]. Yüksek fruktoz diyetinin serum trigliserit seviyelerini artırabildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, yağlı karaciğer hastalıklarının gelişimi ilgili tüm faktörler tamamen anlaşılmamıştır. İnsülin direnci, inflamasyon, yağ birikimi, reaktif oksijen türlerinin kontrolündeki anormallikler ve mitokondriyonda eşlenmemiş proteinlerin varlığı bu faktörler arasında sayılabilmektedir [88, 89].

2.7.2. Fruktoz metabolizması

Fruktozun bağırsaktan portal ven içine Emilimi, jejunumdaki glukoz taşıyıcı 5 (GLUT5) tarafından sağlanır. Bu emilim yolu, karaciğer tarafından yoğun fruktoz alımı ile sonuçlanır. Fruktozun hepatik metabolizması glukoz metabolizmasından çok farklıdır. Fruktoz, fruktoz-1-fosfat'ı oluşturan fruktokinaz ile fosforile edilir, daha sonra gliseraldehit, dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat dahil olmak üzere birkaç üç karbonlu moleküle dönüştürülebilir. Bu üç karbonlu moleküllerin bazıları glukoneogenez yoluyla glukozla dönüştürülebilir veya TG gibi başka ürünler üretmek için kullanılabilir. Fruktoz metabolizmasının bu yönü, glukoz metabolizmasından büyük oranda farklıdır. Fruktozdan fruktoz-1-fosfatın oluşumu, fosfofruktokinazı basamağını geçerek gerçekleşir bu da fruktozdan gelen karbonların bu enzimden sonraki basamakta glikolize girmesine izin verir. Üç karbonlu moleküller sonunda esterleşme yoluyla TG oluşturabilen gliserol ve yağ asitlerinin sentezi için kullanılabilir. Bu nedenle yüksek fruktoz alımı bu yolun regülasyon eksikliğinden dolayı büyük miktarlarda TG sentezi ile sonuçlanabilir. TG, karaciğer tarafından çok VLDL paketlenir. VLDL'ler kan dolaşımında ilerlerken, TG esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA) ve monoasilgliserol oluşturmak için lipoprotein lipaz ile hidrolize edilebilir. Adipoz doku bu bileşenleri alır ve TG'yi yeniden sentezleyebilir. Bu

nedenle, aşırı fruktoz tüketimi yüksek seviyelerde serbest yağ asitlerine ve obeziteye neden olmaktadır [90].



Şekil 2.4. Fruktozdan trigliserit sentezini düzenleyen yolak [90]

2.7.3 Fruktozun karaciğer üzerine etkileri

Aşırı fruktozun *de novo* lipogenezisi desteklediği bilinmektedir. İnsanlarda, yüksek miktarda fruktoz diyeti metabolik sendrom, obezite ve NAFLD ile ilişkilidir. Fruktoz, protein fruktosilasyonunu ve karaciğerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu teşvik eder [87].

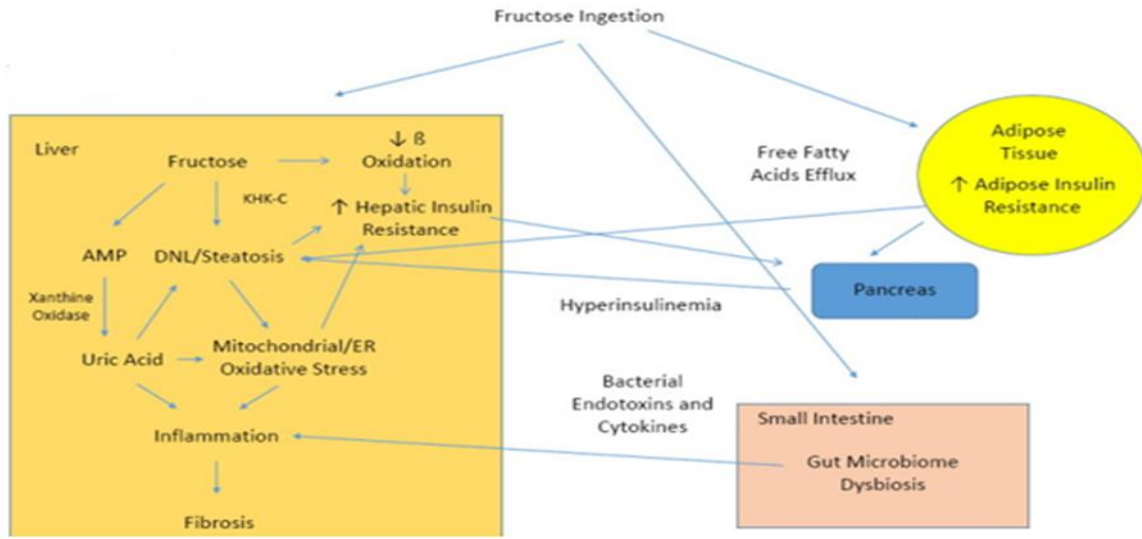
Fruktozla zenginleştirilmiş diyetlerle beslenen deneysel sıçanlar, NAFLD ve NASH için daha iyi bir model olarak görünmektedir [87]. Bir fruktozla zenginleştirilmiş diyet, daha yüksek derecelerde makrovesiküler ve mikrovesiküler steatoz ve bazı deneylerde, inflamasyon ve periportal fibrozisi indüklemektedir. Histolojik bulgulara insülin direnci, dislipidemi, proinflamatuvar sitokinler ve hepatik lipid peroksidasyonu eşlik etmektedir [91].

Lozana ve arkadaşları, şeker açısından zengin ve yağlı ürünlerin tüketiminin (meşrubat gibi) arttığına dikkat çekmiştir. Ayrıca metabolik bozukluklar genç yaşta daha yaygın hale gelmektedir. Bu durum diabetes mellitus ve ilgili metabolik hastalıkların gelişimini ve kardiyovasküler riski arttırabilmektedir. Bu çalışmada, vücut ağırlığı, kan glukozu, kolesterol, inflamatuvar parametreler ile karaciğer üzerindeki metabolik ve işlevsel etkileri değerlendirilmiştir. Hepatik histolojik değişikliklerin derecesi hematoksilin-eozin boyaması ile, steatoz Oil Red O ile, fibrozis Masson Trichrome boyaması ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın başlangıcından 2 ay sonra elde edilen sonuçlara göre sıçanlarda yüksek fruktoz steatoza, plazma ve dokularda oksidatif strese, kan glukozu ve total kolesterol artışına ve bununla ilişkili vücut ağırlığının artışına sebep olmuştur. Plazmatik inflamatuvar parametresinin (TNF- α) arttığı gösterilmiştir. Histolojik analizde inflamasyon, yağ birikimi ve fibrozis gözlemlenmiştir [92].

Son yıllarda yapılan çalışmalar diyetle alınan fruktozun inflamasyona neden olduğunu göstermiştir. Fruktoz, inflamatuvar yolağın kilit araçları olan TNF- α üretiminin ve c-Jun N-terminal kinazın aktivasyonunun arttırılmasından sorumlu olabilmektedir. Fruktozun, inflamatuvar mediatör STAT-3'ü, bir başka inflamatuvar kaskadın önemli bir bileşeni olan NF-KB'deki bir artışla beraber aktive ettiği sıçanlarda gösterilmiştir. Ayrıca, peroksizom proliferatör-aktif reseptör-a aktivitesinde ve yağ asidi oksidasyonunda bir azalma ile birlikte lipid birikiminde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir [93].

2.7.4. Fruktoz ve NASH

Fruktoz tüketiminin NAFLD şiddetine sebep olan hepatotoksik değişiklikleri uyardığı öne sürülmüştür. Epidemiyolojik çalışmalar, artmış günlük fruktoz alımının çocuklarda ve ergenlerde NASH ile bağlantılı olduğunu belirtmiştir. Ayrıca yüksek fruktoz tüketiminin erişkinlerde artmış karaciğer fibrozisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [94]. Ürik asitin fruktozun hepatotoksik etkilerinden bazılarını aracılık ettiği öne sürülmüştür. Sindirilen fruktoz, fruktoz-1-fosfat üretmek için hepatik ketohekzokinaz (KHK) tarafından fosforile edilir. Bu reaksiyon hızla intrahepatik adenosin trifosfat (ATP) seviyelerini tüketir ve adenosin monofosfat (AMP) üretimini arttırır [95]. Yüksek AMP seviyeleri, purin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit üretimini uyarır. Ürik asidin, NASH'ın ilerlemesinde önemli bir itici güç olarak kabul edilen hücre içi oksidatif stresi uyardığı gösterilmiştir. Dolaşımdaki ürik asit seviyeleri bağımsız olarak NASH ile ilişkilidir [94].



Şekil 2.5. NAFLD'nin gelişimine ve ilerlemesine aracılık eden fruktoz mekanizması [96]



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 10.10.2017 tarihli ve G.Ü.ET-17.076 sayılı kararı ile onaylanmış olan çalışmamızda, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM) 'nden sağlanan 6-8 haftalık 150-200 gr ağırlığında değişen 28 adet dişi *Sprague Dawley* türü sıçan kullanıldı. Denekler oda sıcaklığı 20-25°C, nem % 55, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olarak düzenlenen odada tutuldu. Hayvanlar ad-libitum beslenerek suya serbest olarak erişimleri sağlandı.

Deney hayvanları her bir grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 farklı gruba ayrıldı.

- Grup 1: (n=7) Kontrol Grubu
12 hafta boyunca standart diyet ve su verildi.
- Grup 2: (n=7) NASH Grubu
Birinci günden itibaren 12 hafta boyunca %10 lik D- Fruktoz çözeltisi eklenerek standart diyet olarak beslendi [97].
- Grup 3: (n=7) NASH+Kolşisin Grubu
Birinci günden itibaren 12 hafta boyunca %10 fruktoz çözeltisi eklendi. Bu grupta 9. haftadan başlayarak 12. haftanın sonuna kadar 100 µg/gün dozunda Kolşisin suda çözüldükten sonra gavaj ile uygulandı [81, 97].
- Grup 4: (n=7) Kolşisin Grubu
Standart diyet ve su verilen sıçanlar 9. haftanın başından 12. haftanın sonuna kadar 100 µg/gün dozunda Kolşisin suda çözüldükten sonra gavaj ile uygulandı.

Deney sırasında kullanılan kimyasallardan, 100 µg/gün dozunda Kolşisin ≥95% (HPLC), powder,(Cat:9754, Sigma Aldrich, Almanya) suda çözüldü ve gavaj yöntemi ile uygulandı. %10 luk D- Fruktoz ≥99% (Carlo Erba, Cat:452666,france) içme sularına eklenerek uygulandı. On iki hafta süren deney süreci boyunca bütün gruplardaki sıçanlar her hafta bir kez ağırlık ölçülerek tüm gruplara ait kayıtlar tutuldu.

On iki haftalık deney süresi sonunda tüm denekler 40mg/kg ketamine hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg dozda ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile uyutularak intrakardiyak kan alımıyla ötenazileri gerçekleştirildi.

Alınan kan örnekleri silikalı serum tüplerine konularak santrifüj edilerek, ayrılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C’ de saklandı.

Sakrifiye edilen deneklerin karaciğer ağırlıkları ölçülerek rutin histolojik incelemeleri için %10’ luk nötral formalin solüsyonuna alındı. Fiksatif içerisinde 72 saat oda sıcaklığında tespit edilen karaciğer dokuları, rutin histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Elde edilen paraffin bloklardan ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal analizler için mikrotom ile (Leica SM 2000, Germany) 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

Sol karaciğer lobları ise dondurulmuş kesit için soğuk fizyolojik çözeltide yıkandıktan sonra sıvı azotta dondurularak -80°C’de saklandı. Bu dokulara Oil Red O boyaması yapıldı.

3.2. Işık Mikroskopik İncelemeler

3.2.1. Hematoksilen eozin boyama yöntemi

Alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon işlemi için 37°C’lik etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonun devamı için etüv ısısı 57°C’ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Ardından deparafinizasyonun tamamlanması için 3 kez 20’şer dakika ksilolde bırakılan kesitler, rehidratasyon işlemi için sırasıyla %100, %90, %80, %70, ve %50 etil alkol serilerinde 10’ar dakika tutuldu. Kesitler havada kurutuldu ve 10 dakika akan musluk suyu ile yıkanarak alkolün uzaklaşması sağlandı. Ardından 10 dakika hematoksilen boya solüsyonunda bekletildi. Akan musluk suyunda tekrar 10 dakika yıkandı. Kesitler daha sonra glasiyel asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyunda 10 dakika yıkandı. Bu işlemin ardından, 10 dakika Eozin boya solüsyonunda tutuldu. Akan musluk suyunda 10 dakika yıkandıktan sonra dehidratasyon işleminin gerçekleşmesi için sırasıyla %50, %70, %80, %90 ve %100’lük artan etil alkol serilerinden geçirilerek 45 dakika ksilolde tutuldu ve lamalar

entellan ile kapatıldı. Boyanan kesitler Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda incelenerek, Leica Q Vin 3 programında değerlendirilerek görüntülendi.

Hematoksilen eozin boyama sonucunda karaciğer dokusundaki histolojik değişimler incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi.

3.2.2. Masson Trikrom boyama yöntemi

Karaciğer dokularından alınan 4µm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece bırakıldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1saat daha bekleme işlemi gerçekleştirildi. Kesitlerin, 2 kez 5' er dakika ksilolde bekletilmesiyle deparafinizasyonları sonlandırıldı. Daha sonra, 2 kez 3 dakika %100'lük etil alkolden ardından da sırasıyla %90, %80, %70, ve %50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi. Kesitler, akan musluk suyunda yıkandı ve boyamaya hazır hale getirildi. Kesitler için Atom Scientific BIOSTAIN Masson Trichrome Stain Kit – Methly Blue (Masson Trichrome stain kit – Methly Blue, Code: RRSK20-100, BIOSTAIN Atom Scientific, Manchester, UK) kiti uygulandı. Haematoxylin Weigert's A ve Haematoxylin Weigert 's B solüsyonları eşit miktarda karıştırıldı ve Weigert Hematoksilen hazırlandı. Kesitler sudan geçirilerek, Weigert'in Demirli Hematoksilen solüsyonu ile 20 dakika çekirdek boyaması yapıldı.,%1'lik asit alkol solüsyonu içeren suda yıkanan kesitler daha sonra Ponceau Fuchsin solüsyonunu ile 5 dakika boyandı ve distile suda ile yıkandı. Daha sonra %1' lik fosfotungstik asit solüsyonu ile 10 dakika morlaştırılan kesitler %2,5' lik asetik asit - %2' lik Metil Blue Solüsyonu karışımı ile 5 dakika boyanarak suda yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirilerek ksilole alınan kesitler entellan ile kapatıldı.

Masson'un üçlü boyaması sonucunda hepatosit çekirdekleri mavi-siyah; hepatosit sitoplazmaları ise kırmızı ve kollagen lifler mavi olarak izlendi. Bu boyama ile gruplar arası karaciğer kollagen lif yoğunluğu belirlenerek, fibrosis değerlendirilmesi yapıldı.

3.2.3. Oil Red O boyama yöntemi

Dokulardaki lipid varlığının değerlendirilmesi için Oil Red O boyama yöntemi uygulanmıştır.

Oil Red O boyaması için ayrılan ve – 80 °C’ de saklanan örneklerden dondurulmuş kesitler alındı. Kesitlere Bio-optica Oil Red O (Cat:30-30112, Lot:1817, Bio-optica ,MİLANO) kiti uygulandı. Oil Red O solüsyonu olan Reaktif A damlatılıp 30 dakika beklendi ve hücresel lipidlerin boyanması sağlandı. Daha sonra çeşme suyunda hemen yıkandı. Hematoksilen solüsyonu olan Reaktif B damlatılıp çekirdeğin boyanması için 5 dakika yıkandı. Daha sonra kesitler, akan musluk suyunda 5 dakika yıkandı. Sudan çıkan kesitler, kurutularak ultravisionla kapatıldı.

Oil Red O boyama yöntemi ile hücresel lipidler kırmızı boyanırken, hepatosit çekirdekleri mavi renkte boyandı.

3.2.4. İmmünohistokimyasal yöntem

Deneklere ait karaciğer dokularında alfa fetoprotein (AFP) (Cat:ab46799, Lot:GR320569-7, ABCAM) ve TNF- α (Cat:ab6671, Lot:GR235155-28, ABCAM) antikolarıyla immünohistokimyasal boyama yapılarak immünoaktivite açısından değerlendirildi.

Kesitler polilizinli lamlara alınarak 37°C’lik deki etüvde bir gece tutulmuş, daha sonra etüv ısısı 57°C’ ye çıkarılarak deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla bu ısıda 1 saat, sonrasında 61°C’ de 20 dakika bekletilmiştir. Deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 20’şer dakika ksilolde tutuldu ve sonrasında 10’ ar dakika %100, %96, %90, %80 ve %70’lik alkol serilerinden geçirilerek rehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler 2 kez 5’ er dakika boyunca distile sudan geçirildi. Dokuda fiksatif tarafından kapatılan reseptör bölgelerini açığa çıkarmak amacıyla, sitrat buffer (Ph 6.0) (Cat:AP-9003-500, Lot: 9003LT13610, Lab vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retrieval işlemi uygulandı. Kesitler 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılıp daha sonra, PBS (Phosphate Buffer Saline) (ph:7.4) ile 3 kez 2 dakika boyunca yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 15 dakika boyunca 3%’lük hidrojen peroksit (H₂O₂)’de (Lot: AP41515) inkübe edildi ve işlem bitiminde kesitler PBS ile yıkandı. 10 dakika serum blok solüsyonu uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. AFP ve TNF- α primer antikorları 1/100 oranlarında dilüe edilerek, 45 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 gece +4 derecede inkübasyon sağlandı. Daha sonra primer antikor uzaklaştırmak amacıyla 3 kez 3’er dakika PBS’de yıkanan kesitlerin 10 dakika boyunca biotinli sekonder antikor uygulanarak primer

antikora bağlanması sağlandı. PBS ile tekrar yıkama sonrasında dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksi ile konjuge edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler immünreaktiviteyi ortaya çıkarmak amacıyla diaminobenzidine (DAB) substratı içeren kromojen DAB (Lot:HD39609) ile inkübe edildi. Yaklaşık 5-10 dakika bekletildi ve immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer' in Hematoksileni kullanılarak zıt boyamalar yapıldı. DAB ile boyanan kesitler azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra 20 dakika ksilolde bekletilerek sonrasında entellan ile kapatıldı. Leica DM 4000B (Germany) görüntülü analiz sisteminde incelenerek elde edilen görüntüler, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

3.3.1. Serum örneklerinin biyokimyasal analizleri

Alınan kan örnekleri silikalı serum tüplerine konularak 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan serum örnekleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarlarında alkalen fosfataz (ALP), alanine aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), glutamil transferaz (GGT) ve glukoz biyokimyasal parametreleri Mindray bs 2000m cihazı ile mindray kitlerinin kullanımı ile analiz edilmiştir. Ayrıca aynı merkezde total SH ve MDA düzeyleri de ölçülmüştür.

MDA ölçümü

Çalışmamızda MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşları [98] tarafından tarif edilen yöntemle göre analiz edilmiştir. 50 µl sodyum dodesil sülfat (SDS, %8.1)'a 100 µl plazma eklenir, çalkalanır ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edilir. 375 µl asetik asit (pH 3.5, 20%) ve 375 µl tiobarbitürik asit (0.6%) eklenir ve kaynar su banyosunda 60 dakika bekletilir. Örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. 1.25 ml bütanol:piridin (15:1) eklenir, çalkalanır ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. 750 µl organik pembe tabaka 532 nm'de ölçülür. Tiobarbitürik asit ile MDA reaksiyonundan sonra reaksiyon ürünü 532 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilir. Sonuçlar plazma için nmol/ml olarak tanımlanır.

Toplam serbest sülfhidril grup ölçümü

Serum örneklerinden total SH ölçümleri Sedlak ve arkadaşları [99] referans alınarak gerçekleştirildi. Deney gruplarından alınan örnekler DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından 420 nm’de spektrofotometrik ölçümler standart çözelti serileri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile değerlendirildi. Sonuçlar plazma için nmol/ml olarak tanımlandı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Sıçanların deney başlangıcından sonlandırılıncaya kadar her hafta bir kez ağırlıkları tartıldı ve deney sürecindeki ağırlık artışları takip edildi. Her gruba ait sıçanların deney sonlandırıldıktan sonra karaciğer dokuları tartıldı. Deney sonrası biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri değerlendirildi. Her gruba ait sıçanların vücut ağırlığı, biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri ve karaciğer dokusu ağırlığından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Elde edilen tüm verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlendi.

$P \leq 0,05$ ise nonparametrik testler, $p > 0,05$ ise parametrik testler uygulanarak gruplar arası karşılaştırmalar sağlandı. Normal dağılıma uygun değişkenlerde ortalama $\pm$ standart sapma değeri belirlendi. İmmünohistokimyasal skorlamalar, pozitif boyama gösteren sayımlarının dört grup arasındaki farklılıkları Kruskal-Wallis testi uygulanarak analiz edildi. Kruskal-Wallis testinde anlamlılık görüldüğü takdirde gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

İstatistiksel analiz SPSS versiyon 22 yazılımı kullanılarak yapıldı. $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokularının Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, küçük büyültmede, v. centralis ile v. centralisden ışınsal şekilde periferde doğru uzanan hepatosit kordonları ve hepatosit kordonları arasındaki sinüzoidler görüldü (Resim 4.1-A, B).

Sınırları net olarak ayırt edilemeyen karaciğer lobüllerinde endotelle döşeli olan v. centralisler ile v. centralisden periferde doğru ışınsal olarak düzenlenim gösteren poligonal şekilli hepatositlerin sitoplazmalarının asidofilik boyanma özelliği gösterdiği ve normal yapıda oldukları izlendi. Hepatosit hücre çekirdeklerinin yuvarlak ve merkezi yerleşimli olduğu izlenirken, bazı hepatositler ise iki çekirdekli ve normal yapıdaydı. Hepatosit kordonları arasında dallanarak birbirleri ile anastomozlaşan karaciğer sinüzoidal aralıklarının normal düzenlenimde olduğu dikkati çekti (Resim 4.2-A,B)

Bağ doku yoğunluğunu ve dağılımını değerlendirmek amacıyla yapılan Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanmış kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokularında, portal aralıkta ve v. centralis etrafında bağ dokusu izlendi (Resim 4.13-A,B).

Karaciğerdeki steatozun değerlendirilmesi için yapılan Oil Red O ile boyanmasında kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokularında lipid damlacıkları görülmedi (Resim 4.17-A)

NASH grubu

NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokularının Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, küçük büyültmede karaciğer lobüllerinin yapısının sınırlarının net olarak ayırt edilemediği ve hepatosit kordonlarının ışınsal düzenleniminde bozulma olduğu görüldü (Resim 4.3-A,B)

Aynı grubun büyük büyültmedeki kesitlerinde, sinuzoidlerde konjesyonun yanı sıra hepatositlerin sitoplazmik sınırlarının net olarak ayırt edilemediği ve hepatositlerin poligonal şekillerinin korunamadığı saptandı (Resim 4.6-A,B). Hepatositlerde balonlaşma ve boyut farklılıkları ile karakterize dejeneratif değişiklikler dikkati çekti. Bazı alanlarda çok sayıda hepatositlerde vakuolar dejenerasyon ve steatoz izlendi (Resim 4.4,5-A,B). Parankim hücrelerindeki bütünlüğün bozulması nedeniyle, hücreler arası bağlantıların kaybolduğu izlenirken, kontrol grubuna göre artan Kupffer hücre yoğunluğu ve parankim hücreleri arasındaki alanlarda inflamasyon ve vakuoler değişiklikler dikkati çekti. Hepatositlerde vakuolar dejenerasyon, sinüzoidal aralıkların bozulması ve asidofilik boyanma özelliğinin dejenerasyon sonrası azalması izlenen diğer bulgular arasındaydı (Resim 4.6-A,B).

Bağ dokusu yoğunluğunu göstermek amacıyla Masson' un üçlü boyama yöntemi uygulanmış NASH grubuna ait kesitlerde, v. centralis çevresindeki parankimal dokuda kontrole göre artmış kollagen lif yoğunluğunda artma izlendi (Resim 4.14-A,B,).

Oil Red O boyamasıyla, yoğun olan lipid damlacıklarının yer yer hepatositlerde yer yer de karaciğer parankim dokusunda agregatlar yapmış şekilde dağıldığı gözlemlendi (Resim 4.17-B).

NASH+Kolşisin grubu

NASH+Kolşisin grubuna ait karaciğer dokusunun Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerinde, küçük büyültmede v. centralis çevresinde karaciğer parankim hücreleri olan hepatositlerin NASH grubuna göre daha düzenli organizasyon gösterdiği, ancak lobül yapısının net olarak izlenemediği dikkati çekti (Resim 4.9-A,B).

Büyük büyültmede, bazı alanlarda karaciğer parankim hücrelerinde NASH grubunda olduğu gibi dejeneratif değişiklikler, vakuolizasyon, sitoplazmik sınırlarının belirgin olarak ayırt edilememesi, lokalize steatoz ve inflamatuvar alanlarının olduğu dikkati çekerken, bazı alanlarda ise sitoplazmik sınırları daha belirgin, asidofilik boyanma özelliği gösteren normal hücreler de izlendi (Resim 4.7, 8-A,B).

Sinüzoidal aralıklar, NASH grubuna göre daha düzenliydi. Sinüzoidlerde konjesyon, vakuolizasyon, infiltratif hücre yoğunluğu ve balonlaşma gösteren hücre yoğunluğunun NASH grubuna göre azaldığı dikkati çekti (Resim 4.9-4.10).

Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanmış NASH+Kolşisin grubuna ait kesitlerde v. centralis çevresinde kollajen lif dağılımının normal yoğunlukta olduğu, ancak yer yer intralobüler alanlarda ve perivasküler oluşumların etrafında devam eden kollajen lif yoğunluğu saptandı (Resim 4.15-A,B).

Oil Red O boyamasıyla, NASH grubuna göre lipid damlacıklarının yer yer hepatositlerde yer yer de karaciğer parankim dokusunda agregatlar yapmış şekilde azaldığı dikkati çekti (Resim 4.18-A).

Kolşisin grubu

Kolşisin uygulanmış gruba ait sıçan karaciğer dokularının Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, kontrol grubuna benzer şekilde, v. centralis ve çevresinde normal düzenlenim gösteren hepatosit kordonları ve hepatosit kordonları arasındaki sinüzoidler normal yapıda izlendi. Hepatositlerin poligonal şekillerini korudukları ve asidofilik boyanma özelliklerinin homojenite gösterdirdiği ve bazılarının çift çekirdeğe sahip olduğu dikkati çekti (Resim 4.11,12-A,B).

Kollajen yoğunluğunu ve fibrozisi göstermek için yapılan Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanmış Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokularında v. centralis etrafında ve periportal alanda normal yoğunlukta kollajen lif dağılımı izlendi (Resim 4.16).

Lipid varlığını göstermek için yapılan Oil Red O boyama yöntemi ile boyanmış Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokularında lipid damlacıkları izlenmedi (Resim 4.18-B).

4.2. Biyokimyasal Parametre Bulguları

4.2.1. Serum analiz bulguları

Deney sonrası her gruba ait elde edilen, biyokimyasal parametreler karşılaştırmalı olarak incelendi. Elde edilen veriler, istatistiksel olarak yorumlandı ve istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede her grubun biyokimyasal parametreleri Çizelge 4.1’de gösterildi.

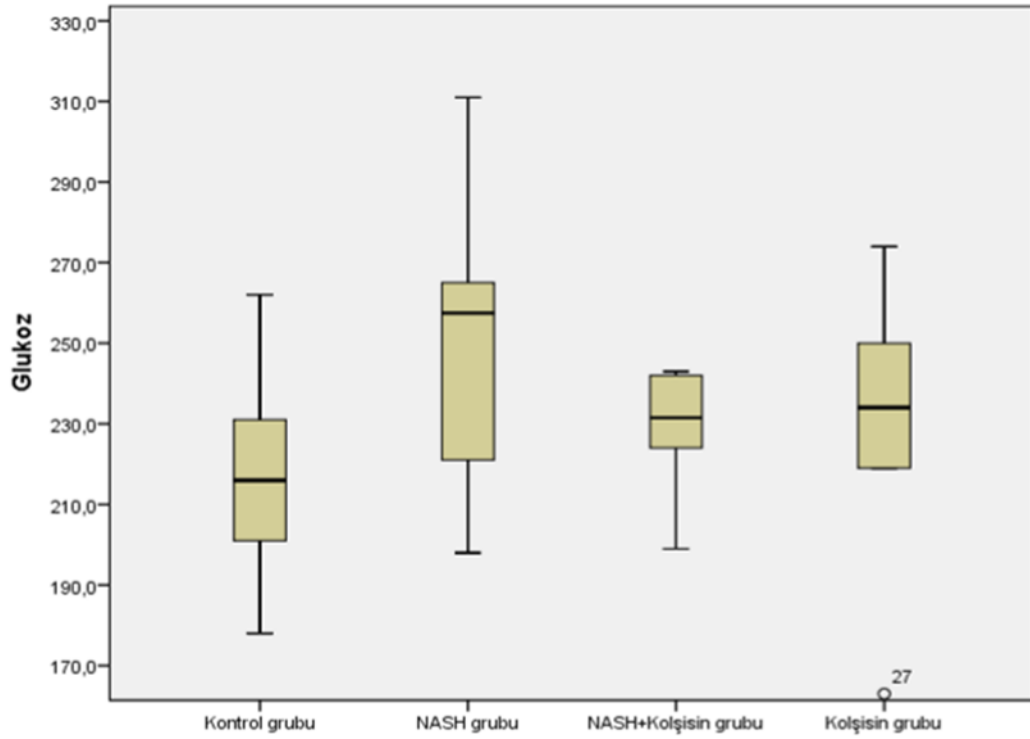
Çizelge 4.1. Her gruba ait biyokimyasal parametrelerin serum düzeylerine ait ortalama $\pm$ SD değerleri

Parametre	Kontrol	NASH	NASH+KOLŞİSİN	Kolşisin
Glukoz (mg/dl)	217,14 $\pm$ 28,43	251,66 $\pm$ 38,95	228,50 $\pm$ 16,13	229 $\pm$ 37,38
GGT(U/L)	1,71 $\pm$ 0,48	3,17 $\pm$ 2,71	0,67 $\pm$ 0,51	1,33 $\pm$ 0,15
ALP(U/L)	113,42 $\pm$ 37,77	72,0 $\pm$ 25,55	137,16 $\pm$ 100,62	123,50 $\pm$ 52,42
AST(U/L)	156,14 $\pm$ 52,93	161,33 $\pm$ 42,14	174,16 $\pm$ 65,91	178,33 $\pm$ 76,34
ALT(U/L)	153 $\pm$ 7,91	46,66 $\pm$ 1,86	45,66 $\pm$ 11,14	64,33 $\pm$ 13,96
MDA (nmol/mL)	1,15 $\pm$ 0,28	1,56 $\pm$ 0,23	1,47 $\pm$ 0,24	1,34 $\pm$ 0,38
TOTAL SH (μ mol/L)	317,48 $\pm$ 44,67	394,88 $\pm$ 96,84	311,33 $\pm$ 117,56	270,93 $\pm$ 65,41

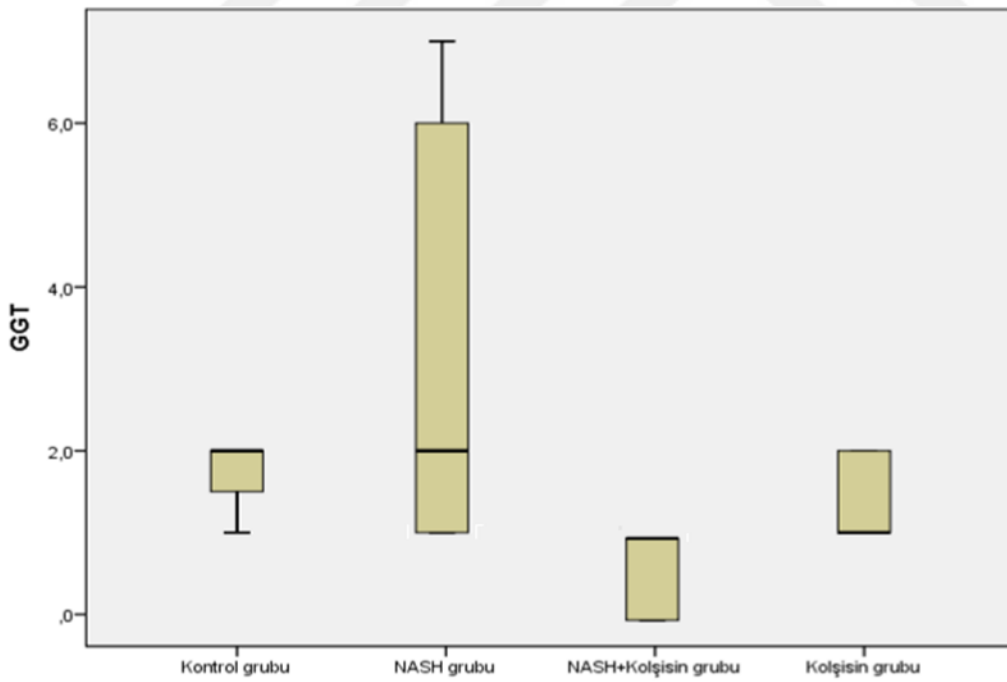
GGT: glutamiltransferaz,ALP: Alkalen fosfataz,AST: Aspartate aminotransferase,ALT: Alanine Aminotransferase,MDA: Malondialdehit,Total-SH:total free sulfhydryl groups.

Gruplar arasında biyokimyasal parametre farklılıklarını istatistiksel olarak ortaya koymak için (Kruskal-Wallis testine göre değerlendirme yapılmıştır.

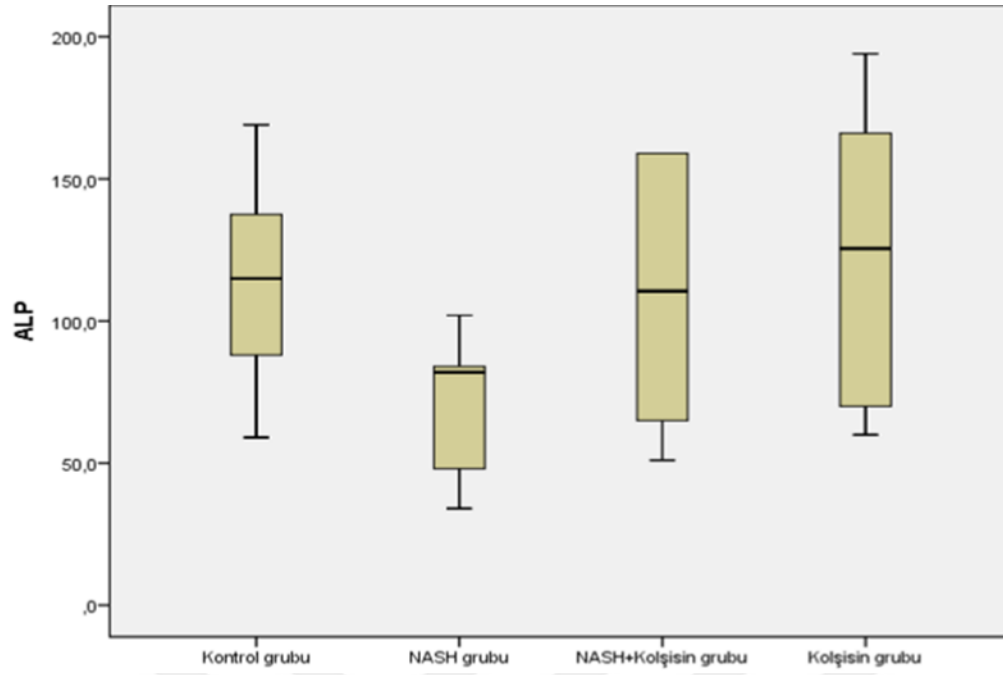
Yapılan biyokimyasal değerlendirmelerde kontrol grubu ile NASH grubu karşılaştırıldığında GGT düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p=0,008$). NASH grubu ile NASH + kolşisin grubu karşılaştırıldığında GGT düzeyindeki artış anlamlı görülmüştür ($p=0,032$). Biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde Kolşisin uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,005$). Glukoz, ALP, AST, MDA ve total SH düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p=0,288$; $p=0,189$; $p=0,901$; $p=0,557$ ve $p=0,081$ sırası ile). Yağlı karaciğer hastalığının histolojik şiddeti ile klinik bulguları aralarında korele değildir. Yağlı karaciğer hastalığının ve hatta siroz da dahil, histolojik spektrumundaki serum aminotrasnferaz düzeyleri normal veya normale yakın seyreder [100].



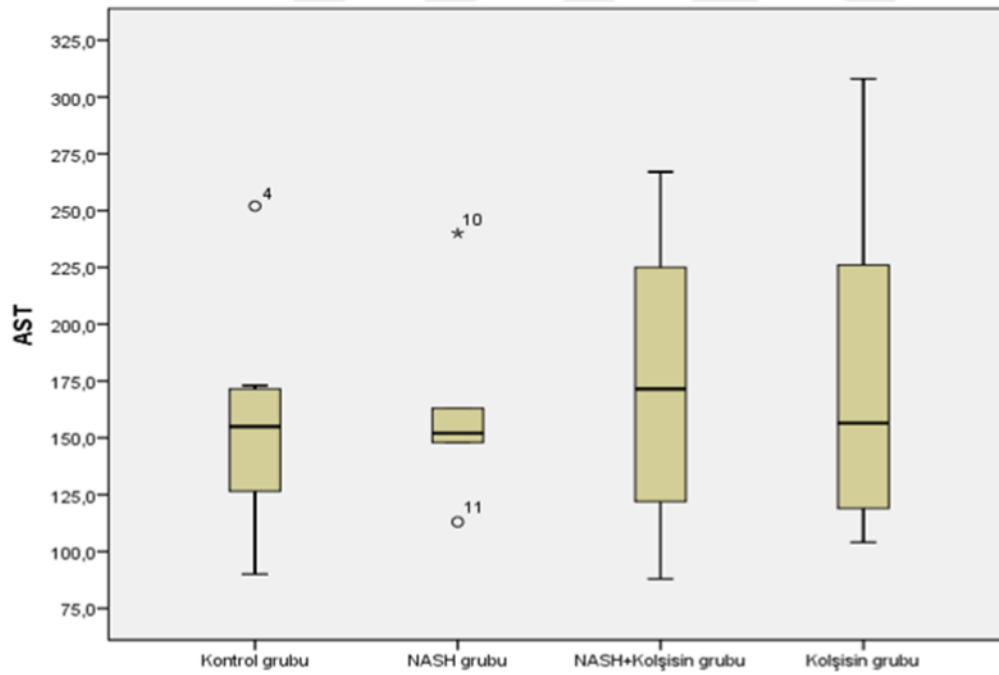
Şekil 4.1. Çalışma gruplarında elde edilen Serum glukoz düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği



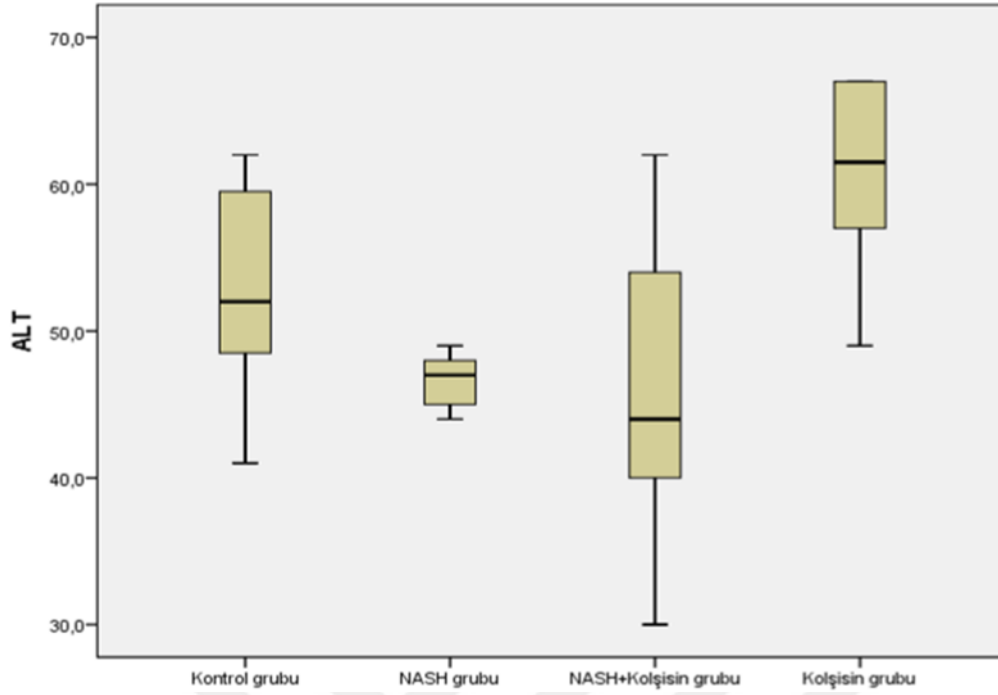
Şekil 4.2. Çalışma gruplarında elde edilen Serum GGT düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği



Şekil 4.3. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ALP düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği



Şekil 4.4. Çalışma gruplarında elde edilen Serum AST düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği



Şekil 4.5. Çalışma gruplarında elde edilen Serum ALT düzeyleri ortalama $\pm$ SD grafiği

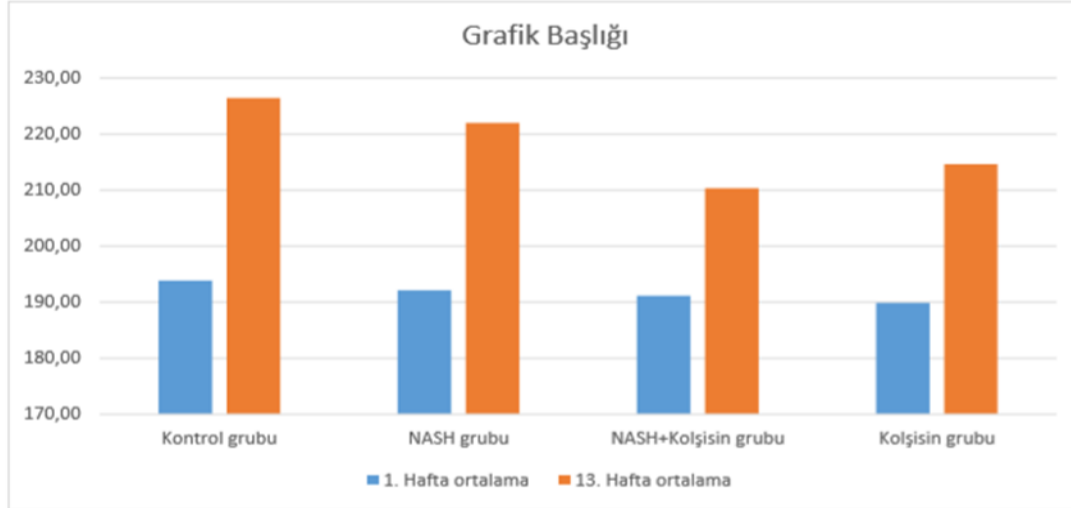
4.3. İstatistiksel Bulgular

4.3.1. Vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Sıçanların deney başlangıcından itibaren deneyin sonuna kadar her hafta ağırlıkları ölçülerek, deney sürecindeki ağırlık artışları takip edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak yorumlandı. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede her grubun deney başından itibaren belirli aralıklarla yapılan ölçüm sonrasındaki ağırlık düzeyi ortalamaları sırasıyla; $213,36 \pm 13,88$; $203,64 \pm 25,24$; $203,23 \pm 20,13$; $201,99 \pm 19,66$ olarak saptandı.

Gruplar arasındaki vücut ağırlığının zamana bağlı olarak değişiminin değerlendirmesini için (Shapiro-Wilk testine göre; $p=0,7029$) Repeated Measure testi uygulandı.

Değerlendirme sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Literatürde de belirtildiği üzere vücut ağırlığındaki artışın 12 hafta uygulanan fruktoz diyeti ile oluşmadığı ancak en çok 26. haftadan sonra ortaya çıktığı görülmüştür [101].

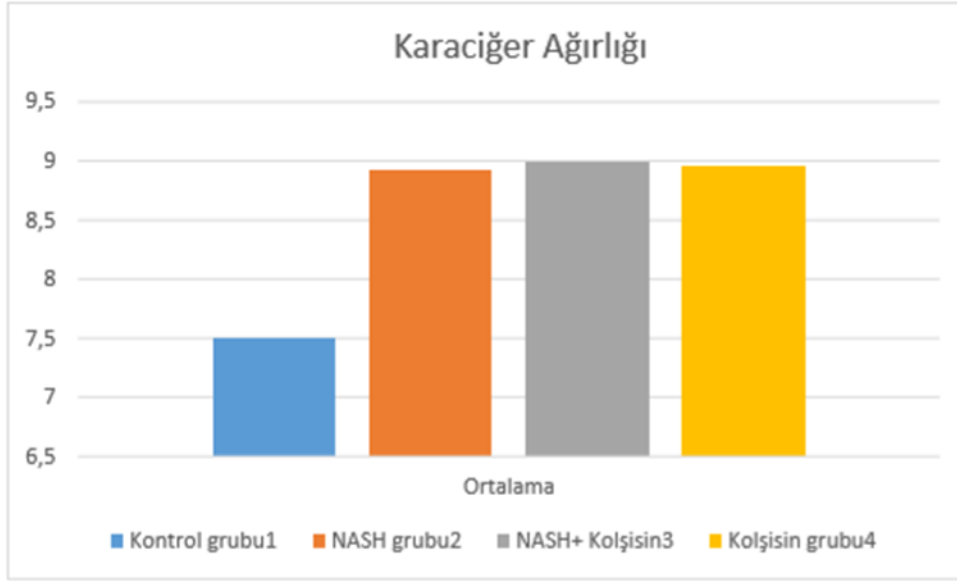


Şekil 4.6. Gruplara ait vücut ağırlığının ortalama $\pm$ SD grafiği

4.3.2. Karaciğer dokusu ağırlığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Her gruba ait sıçanların deney sonlandırıldıktan sonra karaciğer dokuları tartıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak yorumlandı. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede her grubun karaciğer dokusuna ait belirlen ağırlık ortalamalar sırasıyla; $7,50 \pm 0,68$; $8,92 \pm 1,01$; $8,99 \pm 1,01$; $8,96 \pm 1,16$ olarak saptandı.

Gruplar arası karaciğer dokusuna ait farklılıkları istatistik olarak ortaya koymak için (Shapiro-Wilk testine göre; $p=0,025$) Tek-Yönlü ANOVA testi uygulandı. Tek-yön ANOVA testine göre dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p \geq 0,05$).



Şekil 4.7. Gruplara ait karaciğer dokusu ağırlık ortalama $\pm$ SD grafiği

4.3.3. İmmunohistokimyasal bulguların değerlendirilmesi

Karaciğer dokularına ait TNF- α ve AFP antikorlarına ait immunohistokimyasal değerlendirmeler, her gruba ait 6 kesitte immunpozitif hücrelerin semikantitatif analizlerine göre immunreaksiyon skorumla şeklinde yapılmıştır [102]. Tutulum göstermeyen hücrelere sahipse grade 0, <%10 pozitif tutulum gösteren hücreye sahipse grade 1, %10-50 pozitif tutulum gösteren hücreye sahipse grade 2, %51-90 pozitif tutulum gösteren hücreye sahipse grade 3, >%90 pozitif tutulum gösteren hücreye sahipse grade 4 olarak değerlendirildi.

TNF- α NASH gelişiminde, lipid metabolizması, inflamatuvar sitokinler ve karaciğer fibrozisi ile ilişkili olarak anahtar rol oynamaktadır. Bu da çalışmamızda histolojik olarak TNF- α immunreaktivitesinin NASH grubunda artışının bir nedeni olarak değerlendirilebilir.

TNF- α immunreaktivitesi değerlendirildiğinde; NASH grubunda kontrol ve Kolşisin gruplarına göre anlamlı olarak artan immun reaktivite izlenmiştir ($p<0,001$ ve $p<0,001$). Kolşisin uygulanan tedavi grubunda ise TNF- α immunreaktivitesinin NASH grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$) dikkati çekmiştir. Kontrol ve Kolşisin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir ($p=0,695$).

AFP immunreaktivitesi değerlendirildiğinde; NASH ve NASH+Kolşisin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artan immun reaktivite izlenmiştir ($p<0,001$; $p<0,001$). Kolşisin uygulanan tedavi grubundaki AFP immunreaktivitesi ve NASH grubu arasında anlamlılık ($p=0,714$) gözlenmemiştir. Bu durum hepatositlerdeki NASH'a bağlı oluşan hasara bağlı olarak ortaya çıkan rejenerasyon sürecini ortaya koymaktadır.

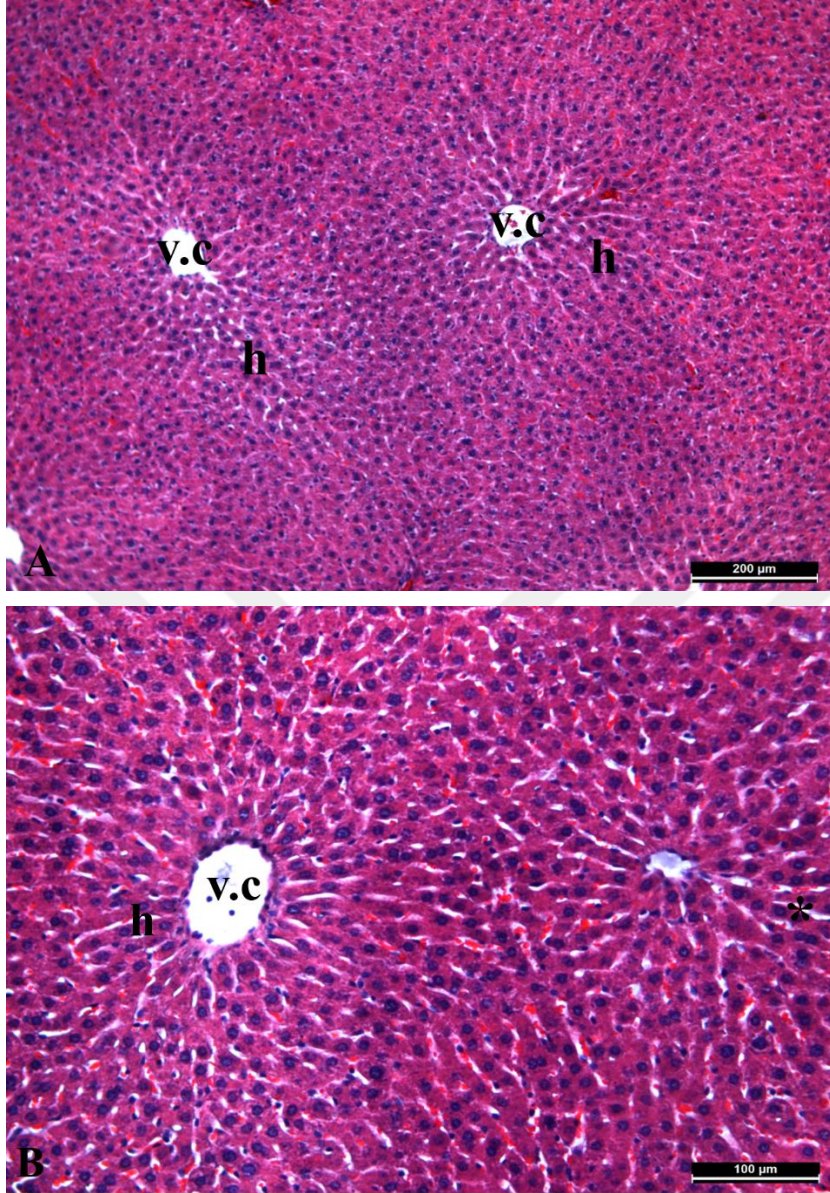
4.3.4. Gruplar arası kollajen lif yoğunluğunun değerlendirilmesi

Gruplara ait karaciğer dokusu kesitlerinde rastgele seçilen 6 preparatta 20 alanda x200 büyütmede kollajen lif pozitif olan mavi alan yüzdesi ImageJ Programı ile ölçülmüştür.

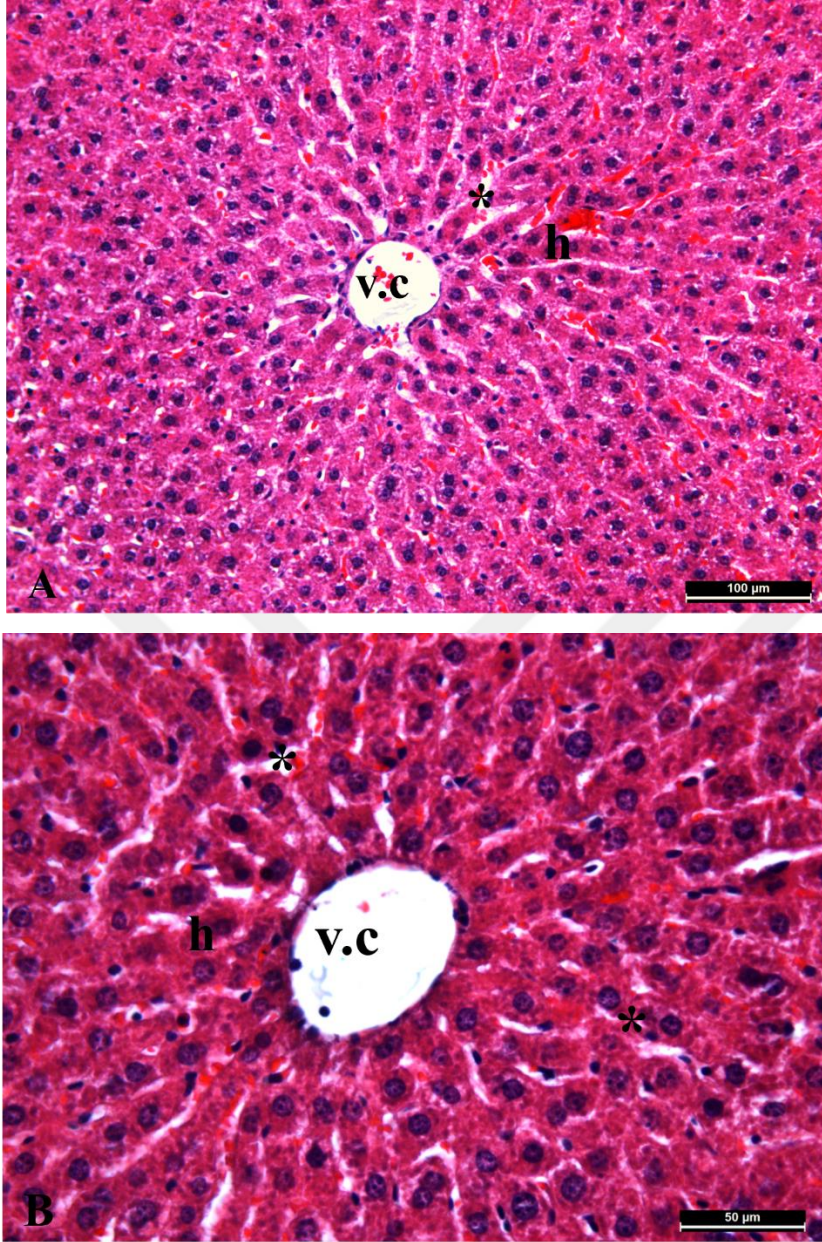
Çizelge 4.2. Karaciğer dokularına ait kollajen lif yüzdelere ait ortalama $\pm$ SD değerleri

Deney Grupları	Kollajen Lif yüzdesi
Kontrol	1,47 $\pm$ 0,74
NASH	7,01 $\pm$ 4,44
NASH+Kolşisin	3,51 $\pm$ 1,23
Kolşisin	1,68 $\pm$ 0,89

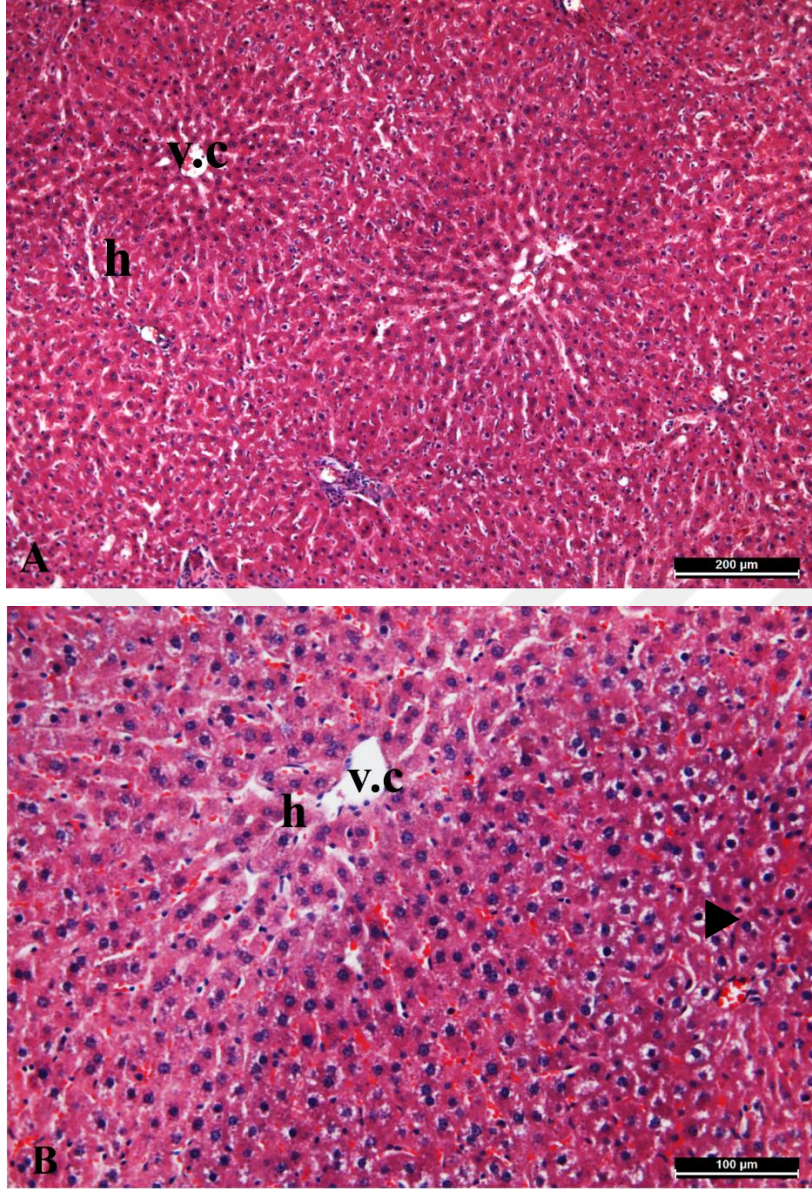
Kollajen lif pozitif olan mavi alan yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda, NASH grubunda kontrol grubuna göre artış izlenmiştir ($p< 0,001$). Kolşisin uygulanan NASH grubunda ise NASH grubuna göre kollajen lif yoğunluğunun anlamlı düşüş gösterdiği dikkati çekmiştir ($p=0,001$). Kontrol ve Kolşisin grupları arasında ise istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p=0,529$).



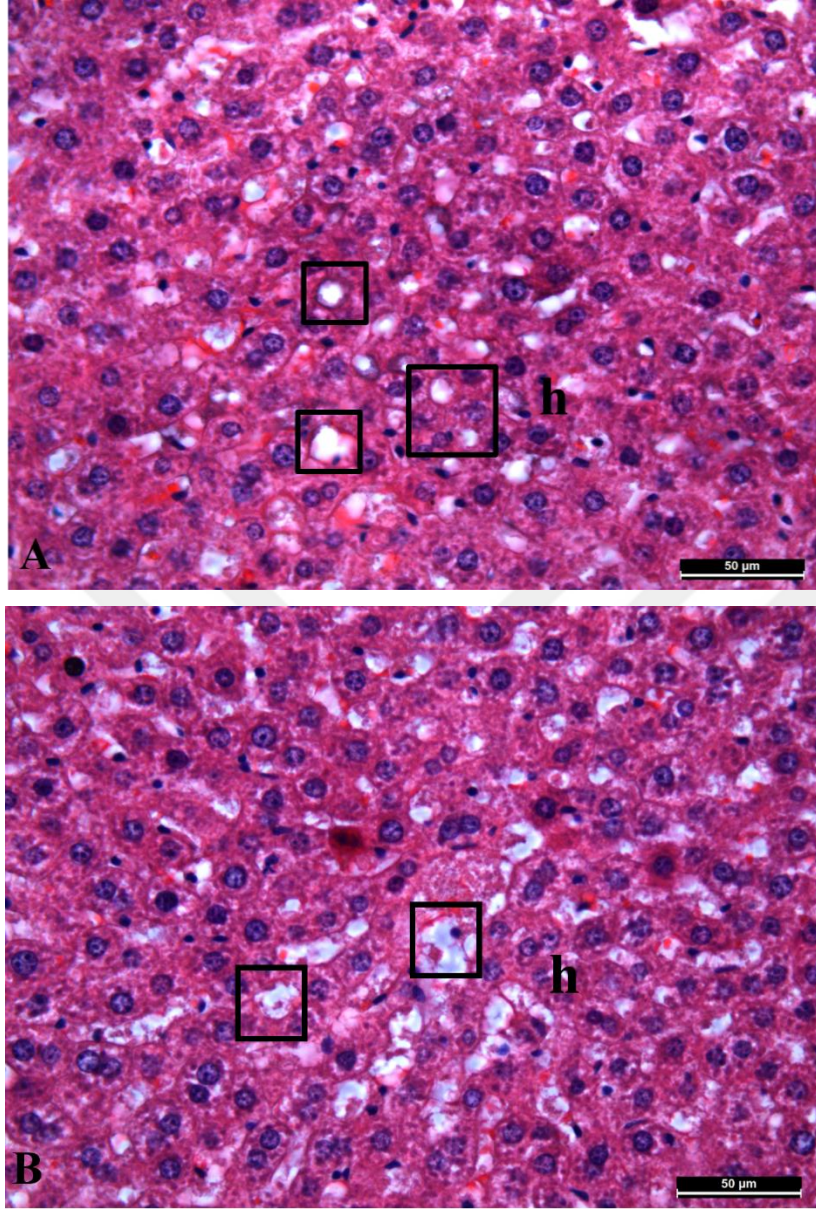
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, vena centralis'den (v.c) perifere doğru ışınal olarak uzanan hepatosit (h) kordonları arasında, normal düzenlenime sahip sinüzoidler (*) dikkati çekmekte (A: H.E, x100, B: H.E x200)



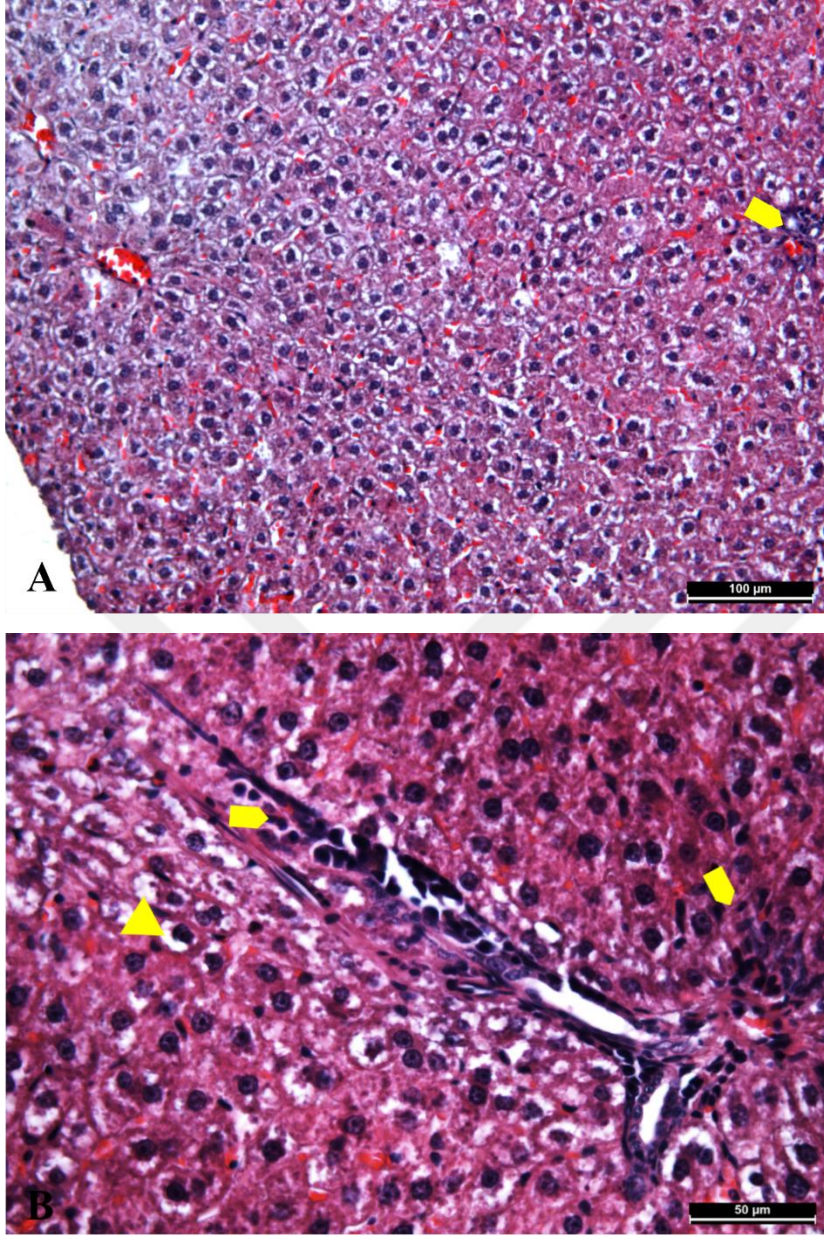
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis'ten (v.c) perifere doğru ışınal olarak uzanan hepatositlerin (h) merkezi ve yuvarlak çekirdeğe sahip, poligonal şekilli oldukları, bazı hepatositlerin ise çift çekirdekli oldukları görülmekte (A: H.E, x200, B: H.E x400)



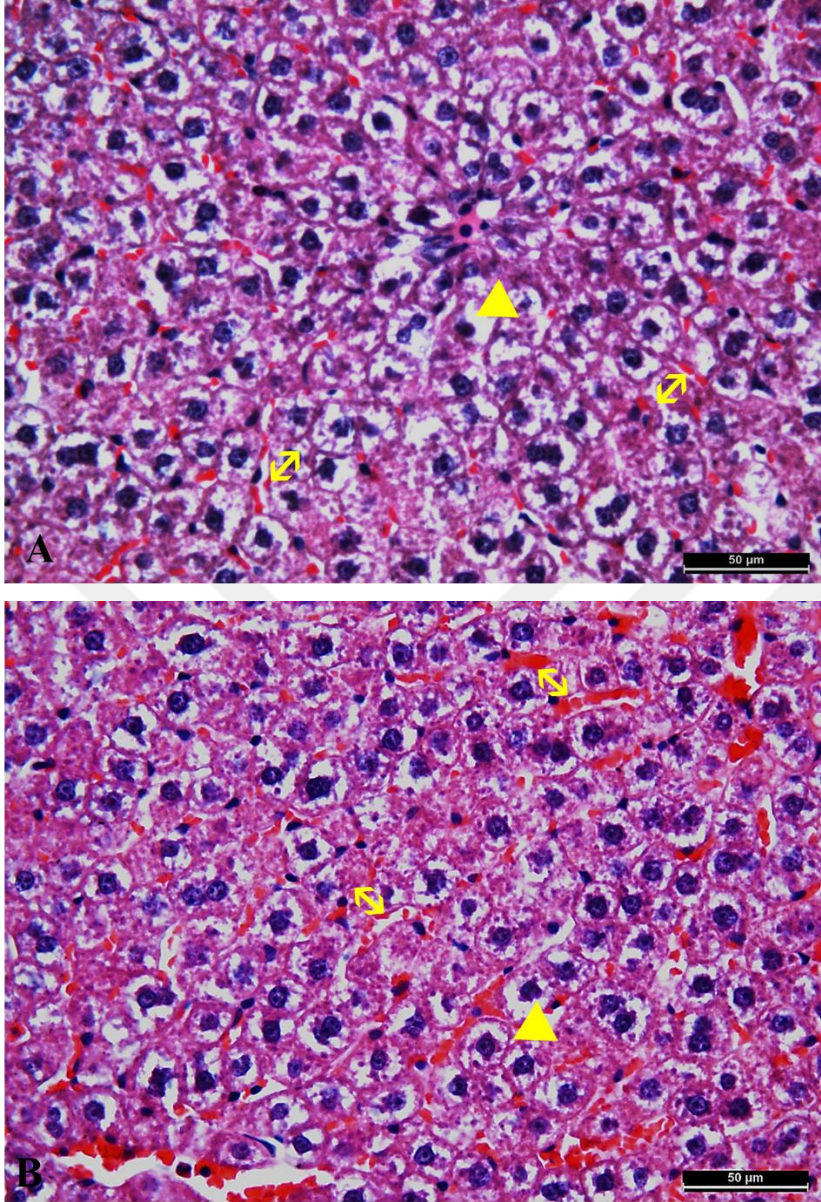
Resim 4.3. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit (h) ışınsal kordonlarının ve sinüzoidlerin düzenleniminde bozulma (►) dikkati çekmekte (A: H.E, x100, B: H.E x200)



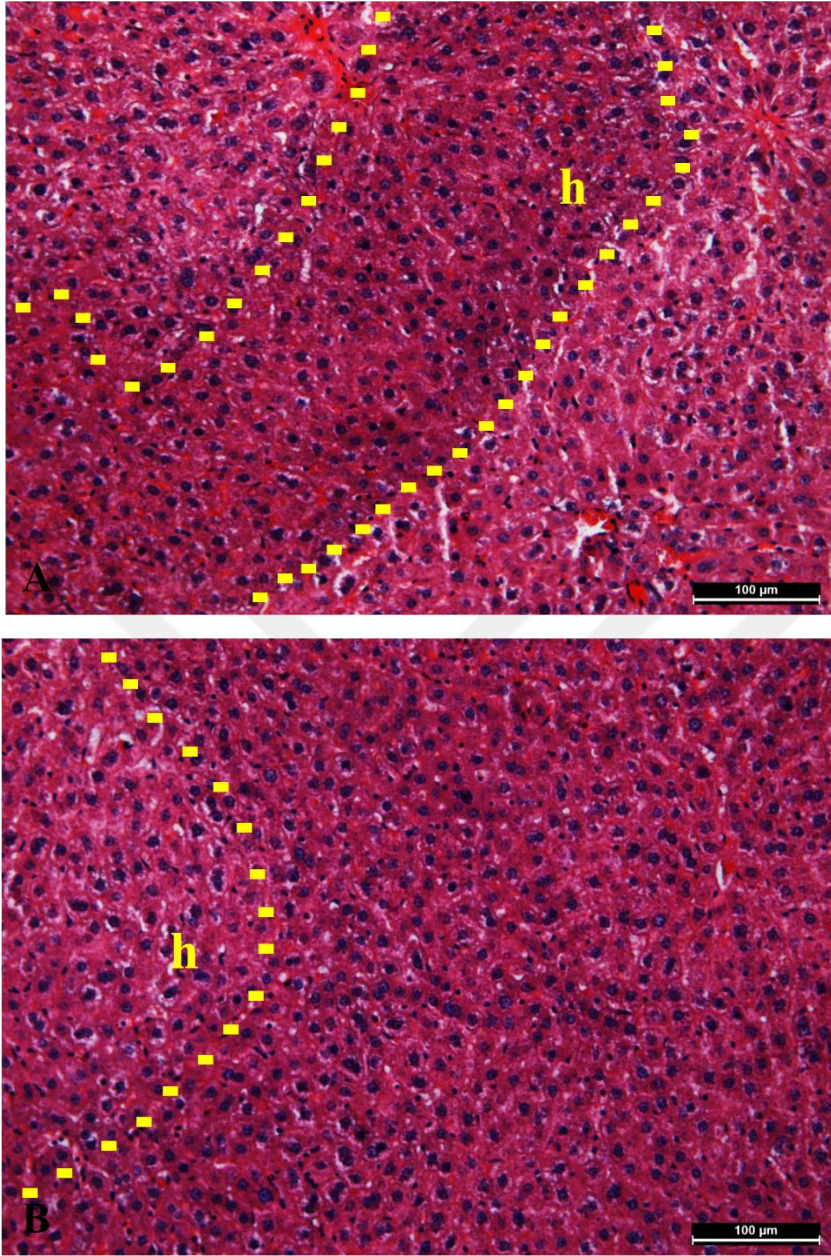
Resim 4.4. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, sitoplazmik sınırları net olarak ayırt edilmeyen ve poligonal şekillerini kaybeden hepatositlerde (h) steatoz izlenmekte (A,B : H.E, x400)



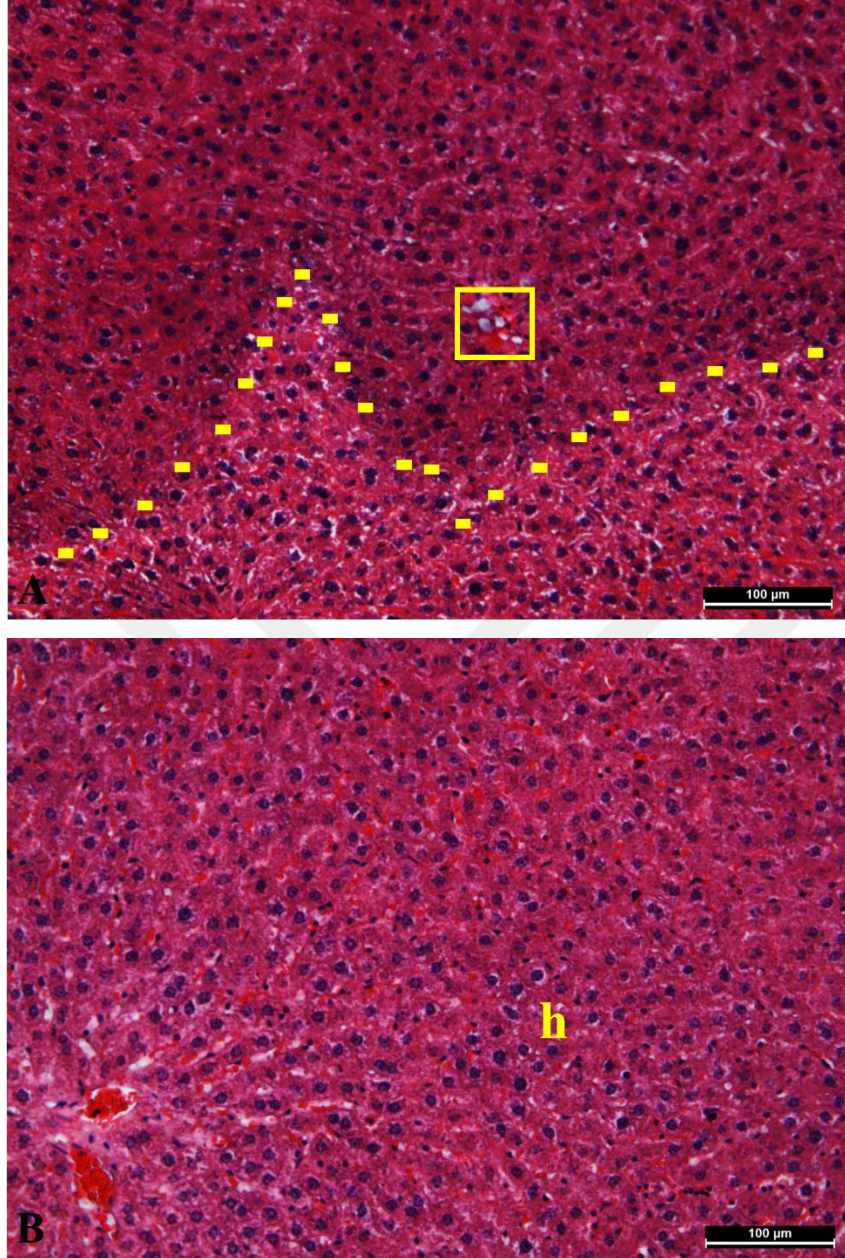
Resim 4.5. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, parankim hücreleri arasındaki inflamatuvar alanlar (■) ile hepatositlerdeki vakuoler değişiklikler (▼) dikkati çekmekte (A: H.E, x200, B: H.E x400)



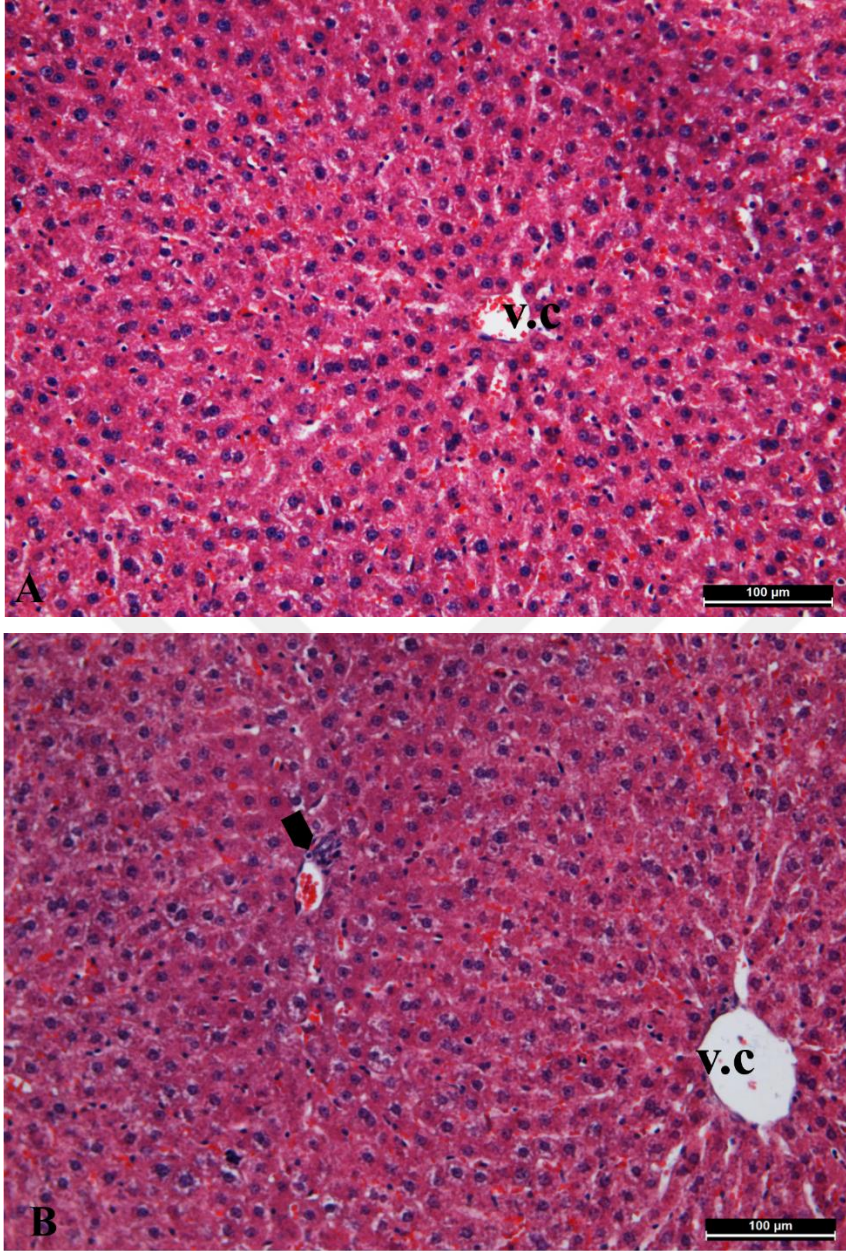
Resim 4.6. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, boyutları farklı balonlaşma özelliği gösteren hepatositler ile (▼) sinüzoidlerde konjesyon (↔) izlenmekte (A,B: H.E, x400)



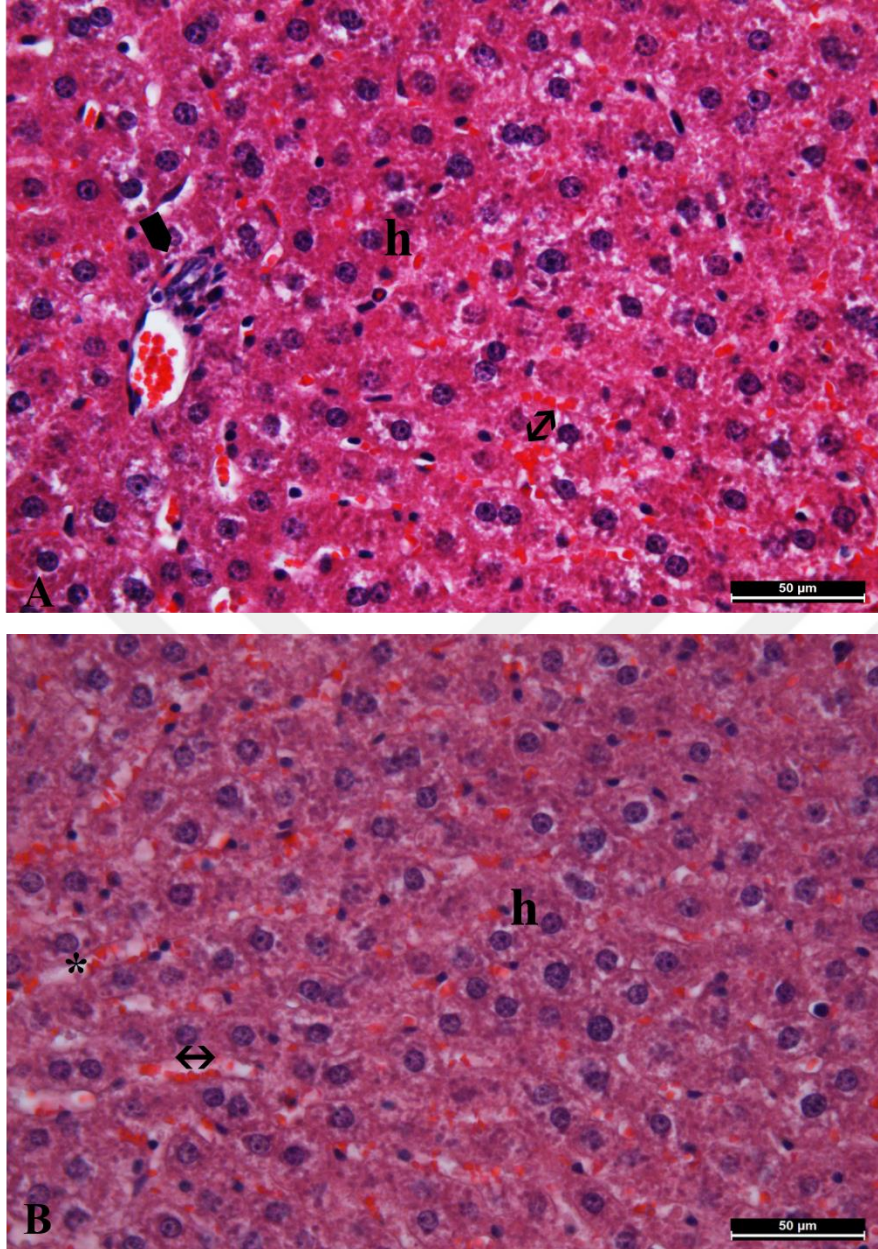
Resim 4.7. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, birbirlerinden sınırla ayrılan ve boyanma özellikleri farklılık gösteren hepatositlerin oluşturduğu alanlarda NASH grubuna göre daha organize ve düzenlenim gösterdiği dikkati çekmektedir (A,B : H.E, x200)



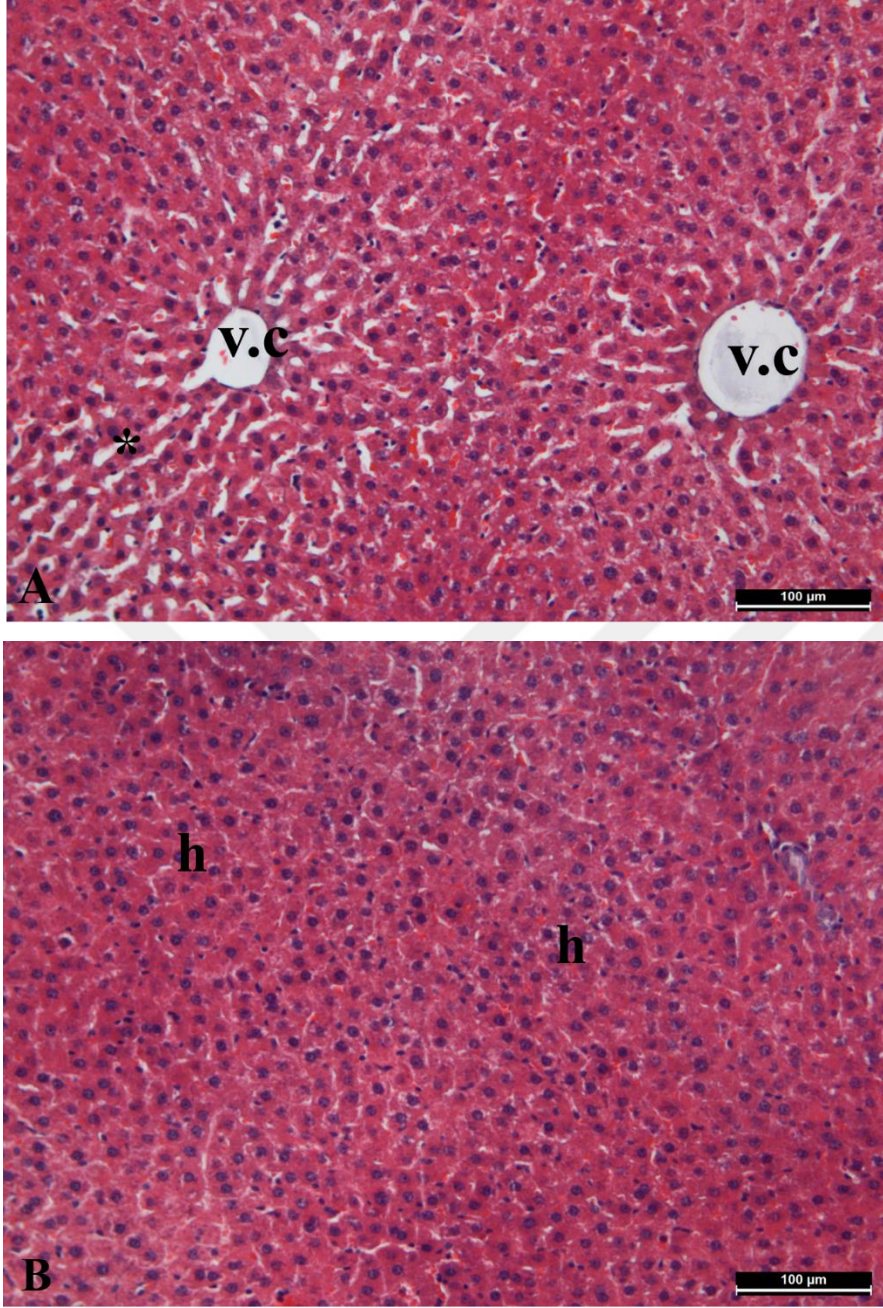
Resim 4.8. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, boyanma özelliği farklılık gösteren alanlar (h) arasında NASH grubuna göre yoğunluğu azalmış steatoz alanları izlenmekte (A, B: H.E, x200)



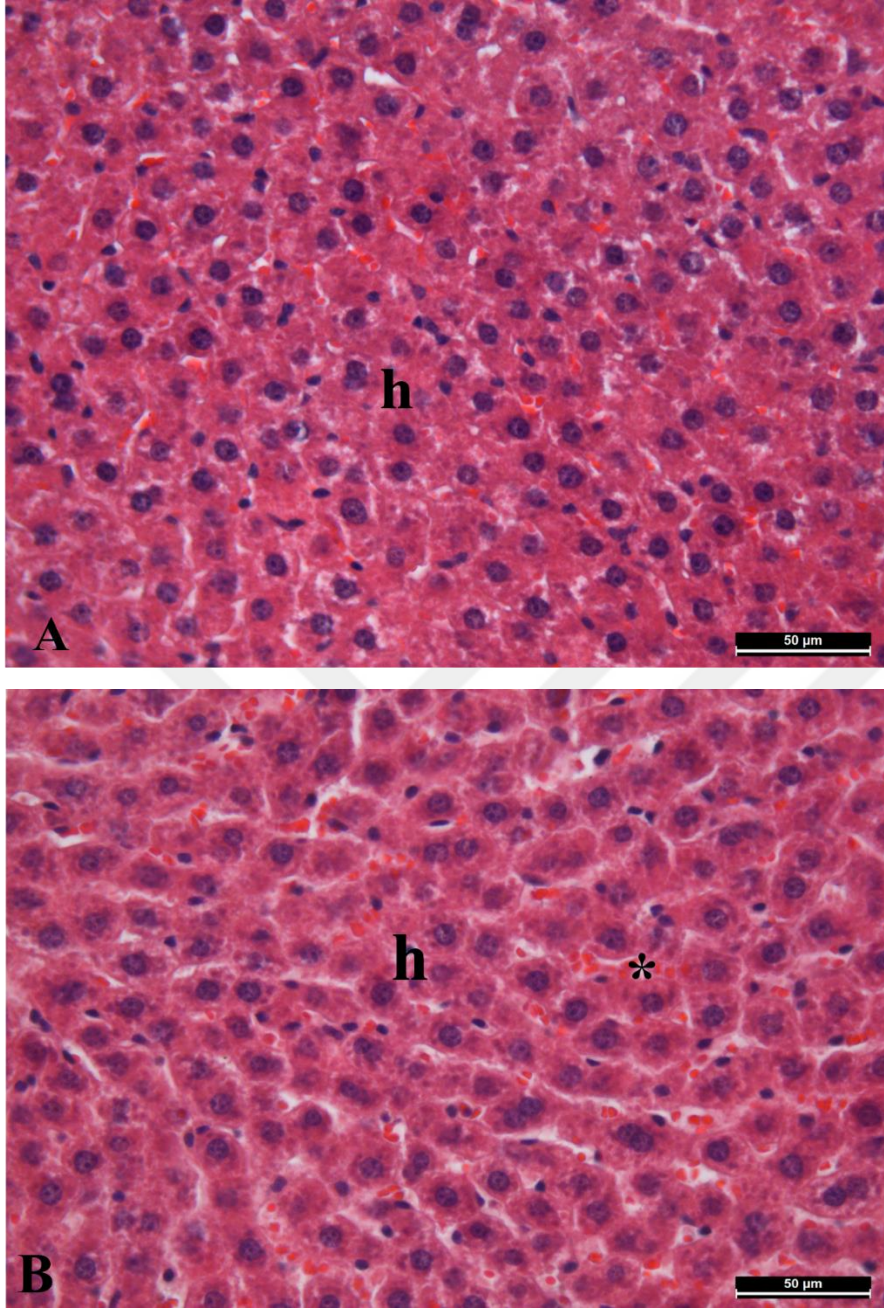
Resim 4.9. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit kordonlarının NASH grubuna göre daha organize düzenlenim gösterdiği ancak yer yer (=perisinüzoidal) alanda inflamatuvar hücre birikiminin olduğu dikkati çekti (A, B: H.E, x200)



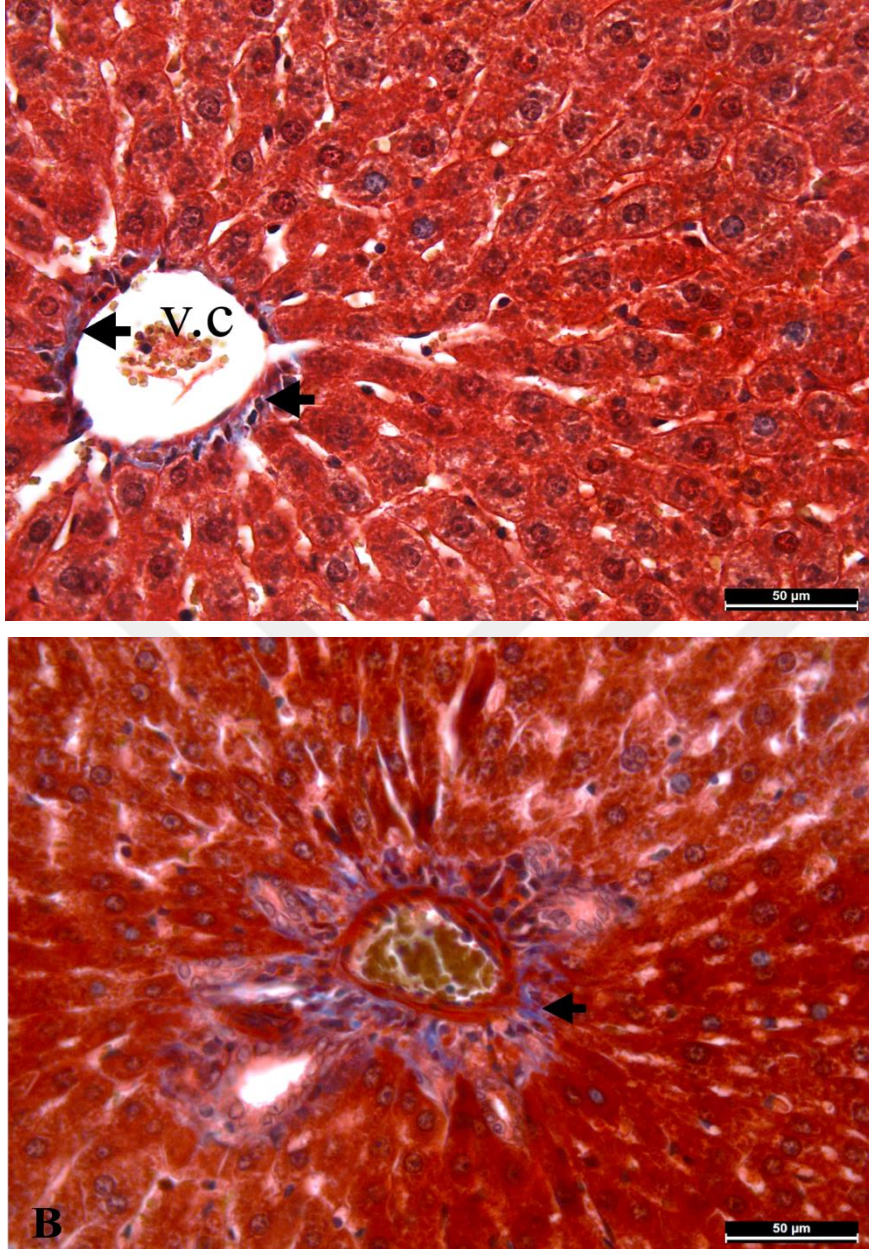
Resim 4.10. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, hepatositlerdeki dejeneratif değişikliklerin, inflamatuvar hücre birikiminin NASH grubuna göre azalarak devam ettiği görüldü (A,B: H.E, x400)



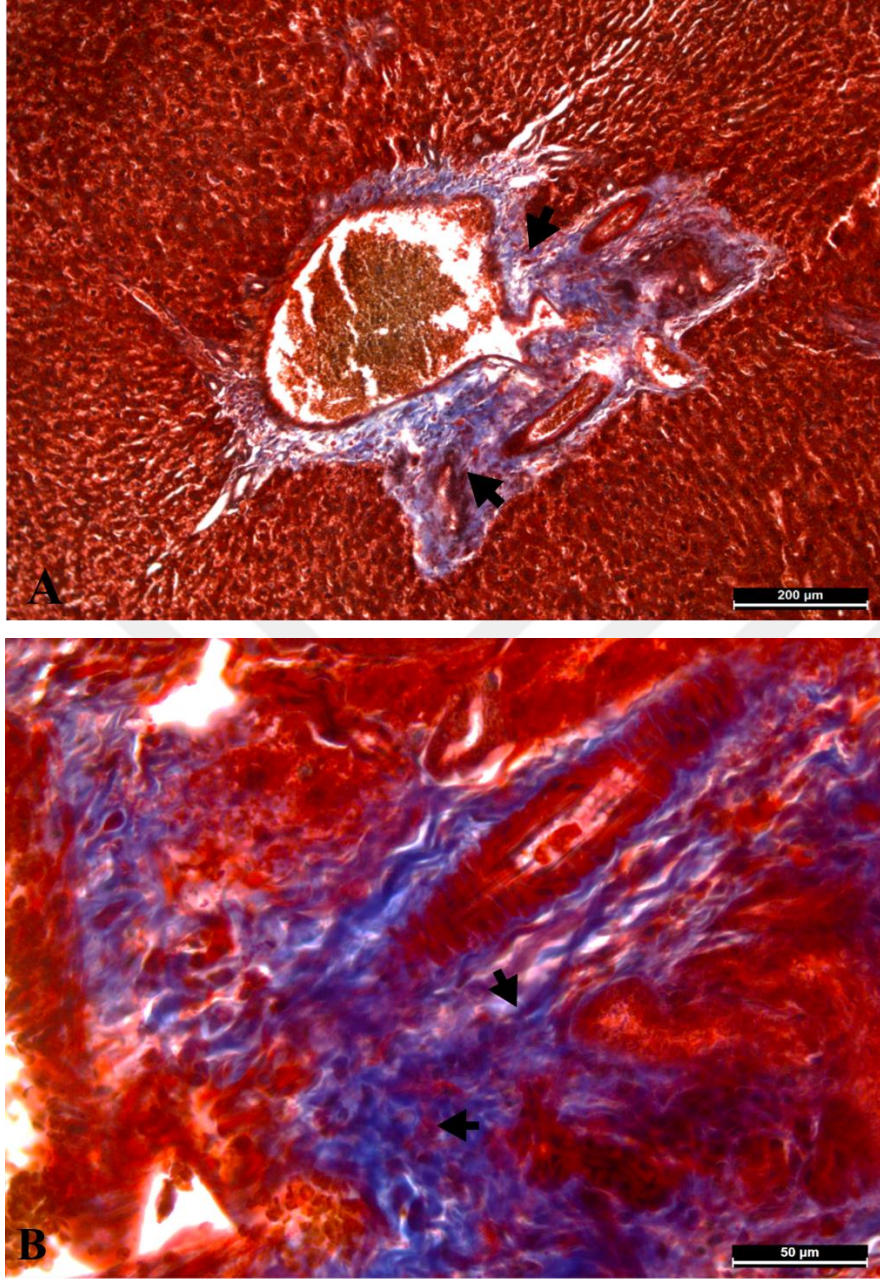
Resim 4.11. Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit kordonları (h) ve sinüzoidler (*) izlenmekte (A,B: H.E, x200)



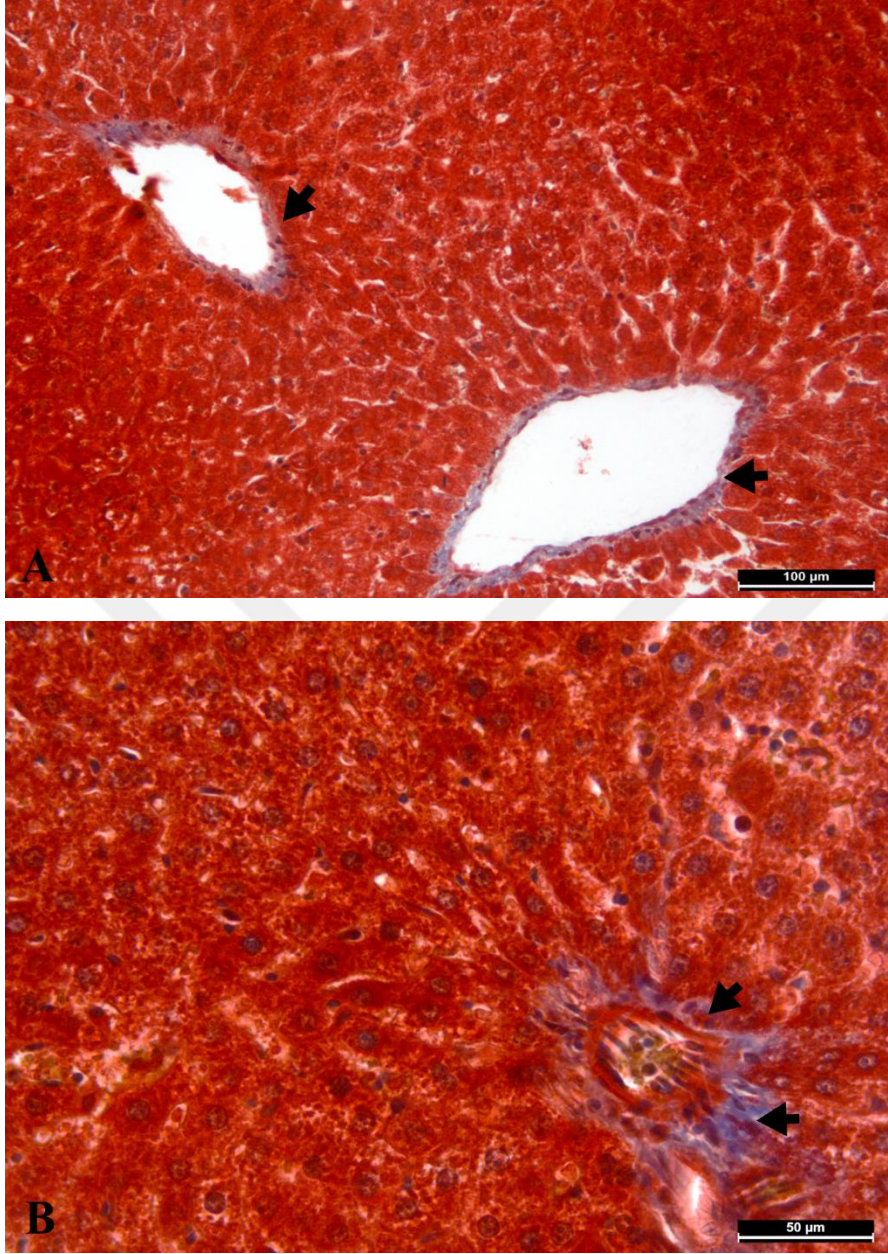
Resim 4.12. Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) çevresindeki hepatosit kordonları (h) ve sinüzoidler (*) dikkat çekmekte (A, B: H.E, x200)



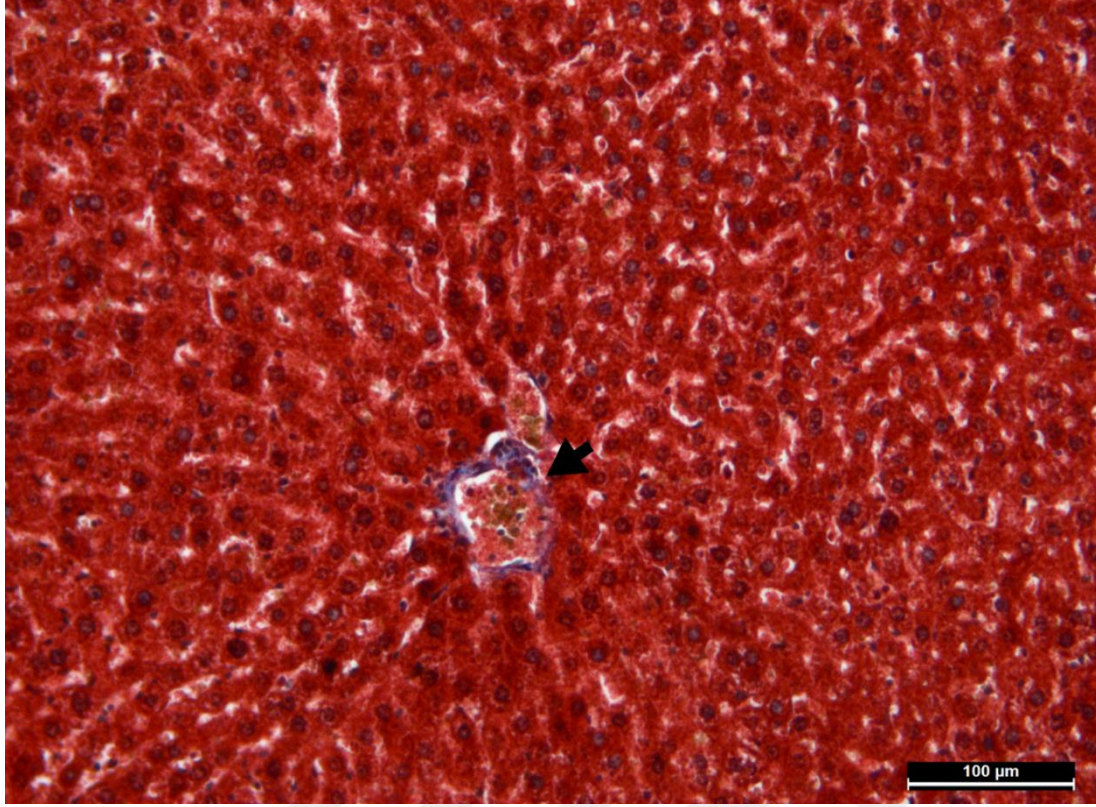
Resim 4.13. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, v. centralis (v.c) etrafında ve portal aralıkta etrafında normal yoğunlukta kollagen lif dağılımı (◀) izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, A, B x400)



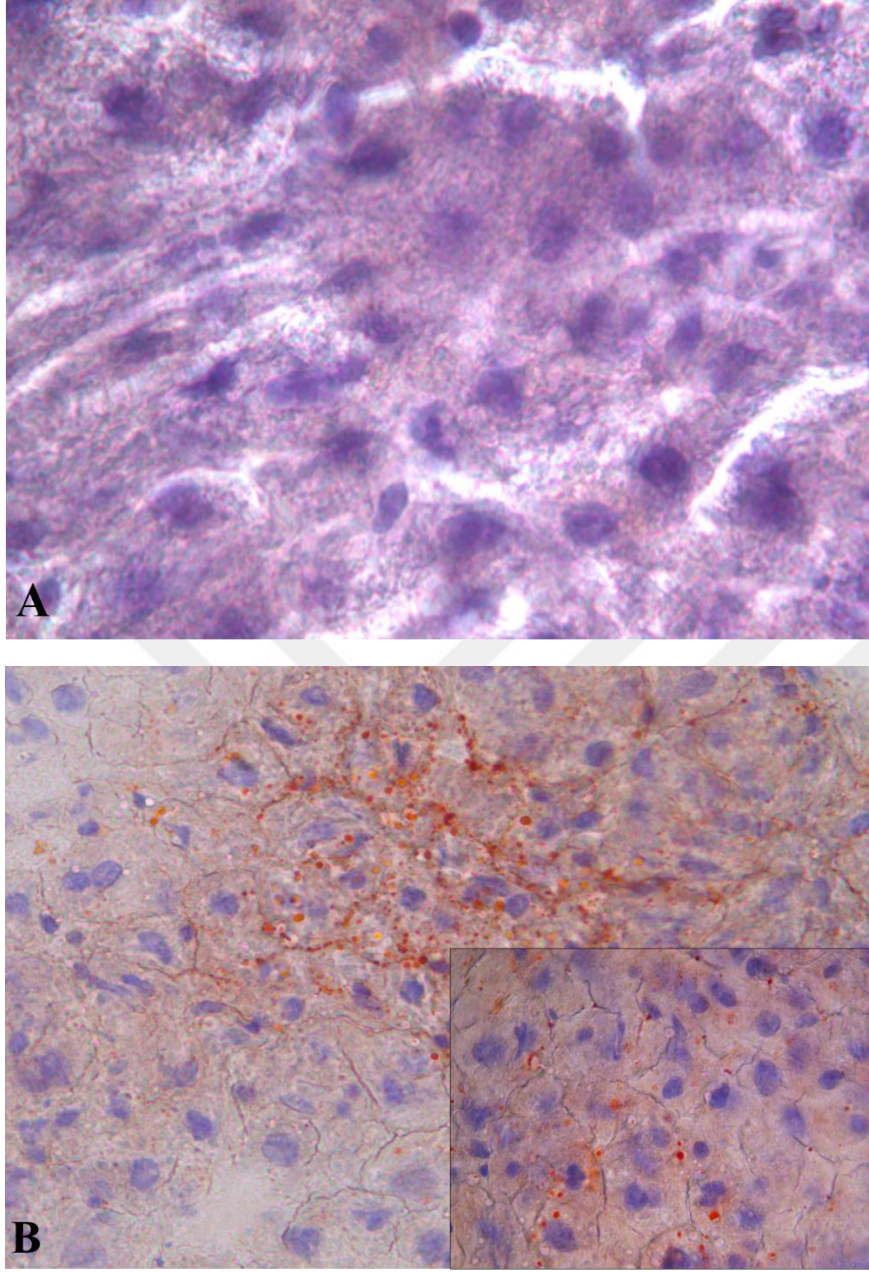
Resim 4.14. NASH grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda, kontrol grubuna göre, vasküler oluşumlar ve parankimal alanda kollagen lif yoğunluğu artışı (↔)izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, A x200, B x400)



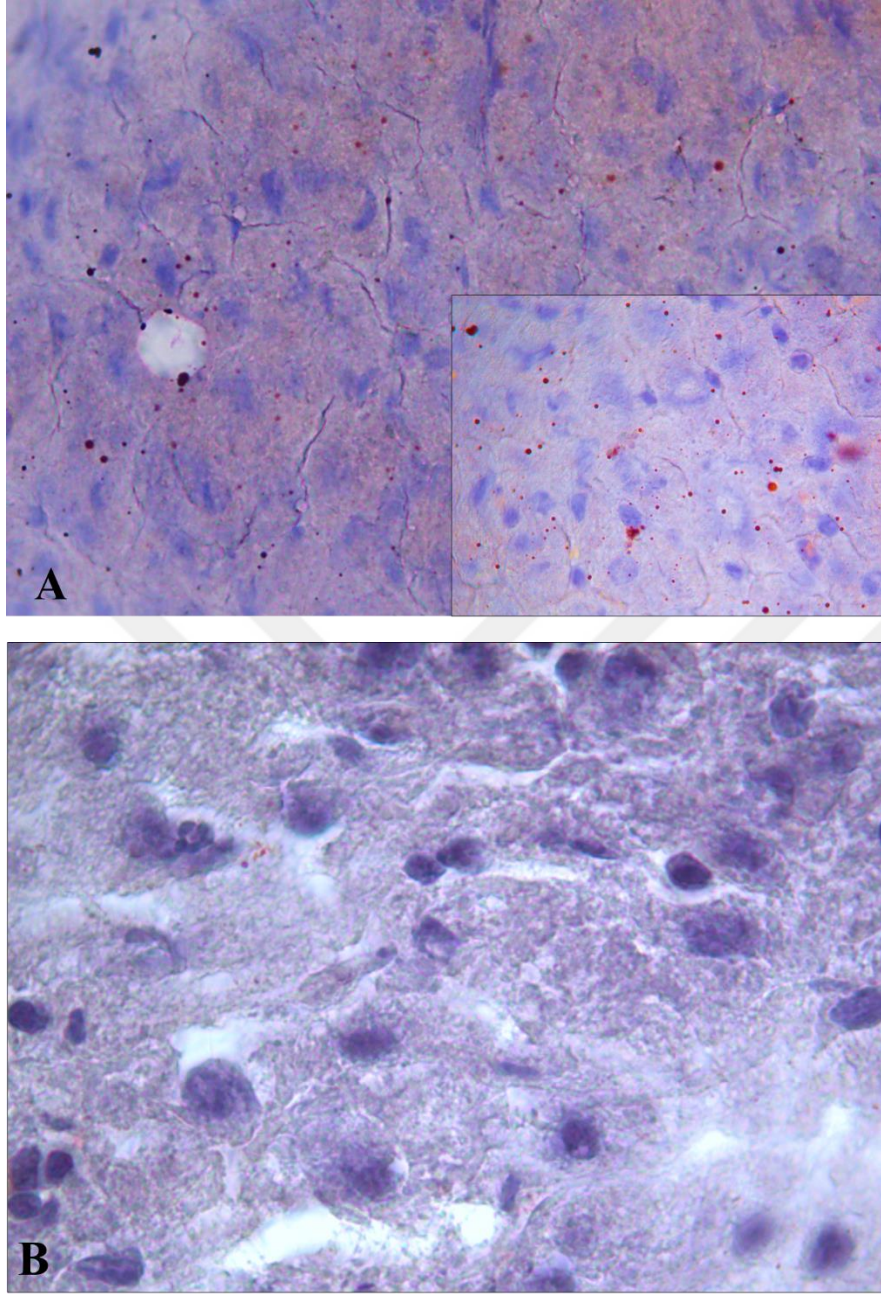
Resim 4.15. NASH+Kolşisin grubuna ait sıçan karaciğer dokusunda v. centralis (v.c) çevresinde NASH grubuna göre azalmış perivasküler kollagen lif dağılımı (↔) izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, A x200, B x400)



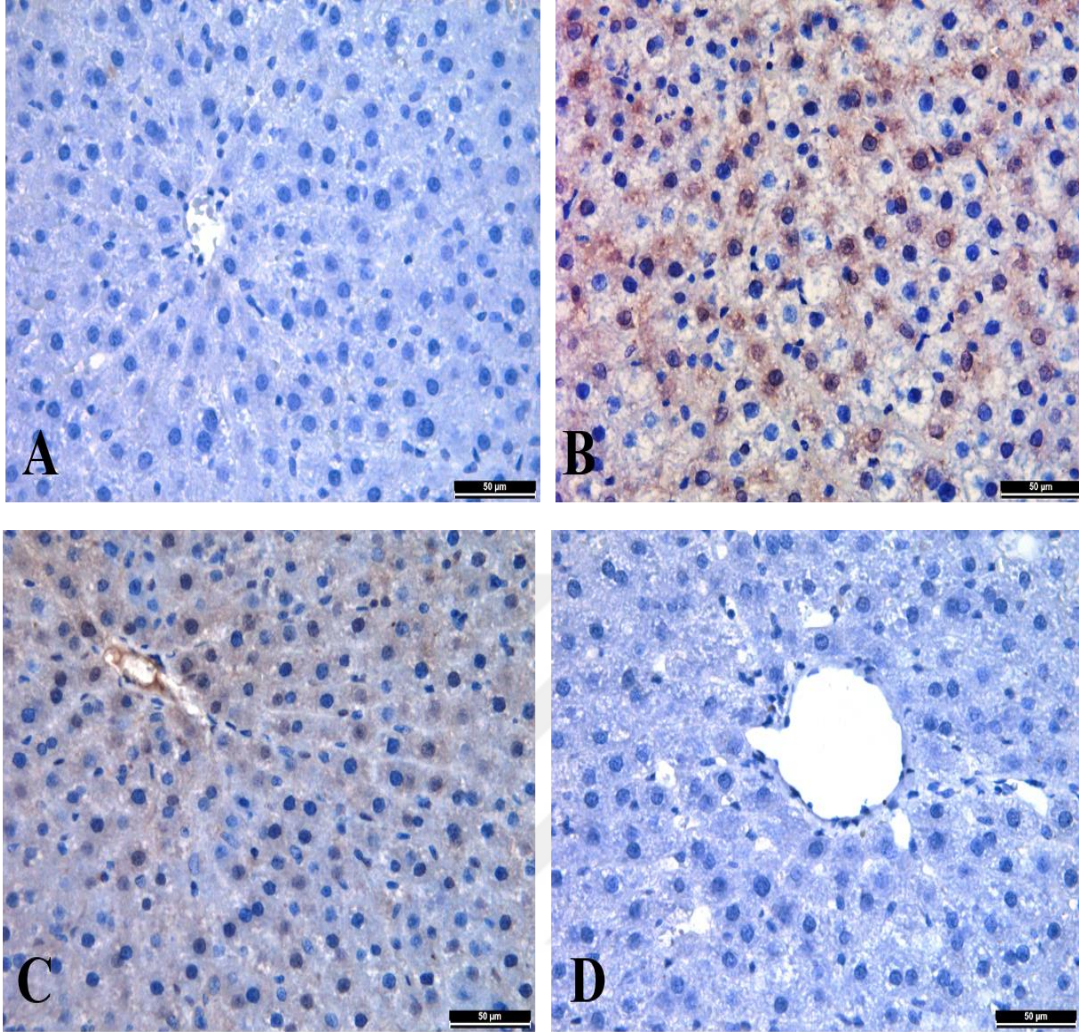
Resim 4.16. Kolşisin grubuna ait karaciğer dokusunda normal yoğunlukta kollagen lif dağılımı izlenmekte (Masson'un üçlü boyaması, x200)



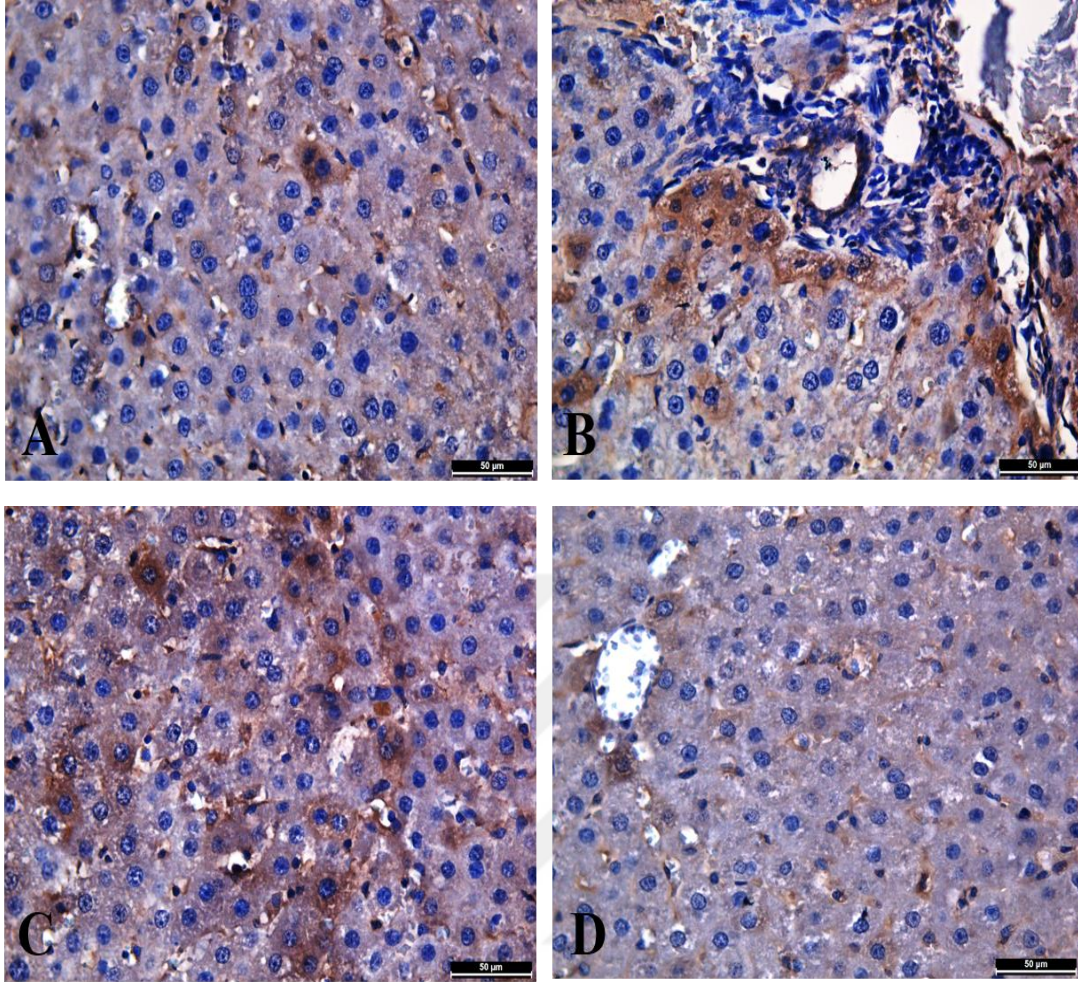
Resim 4.17. Deney gruplarına ait sıçan karaciğer dokusunda Oil Red O Boyaması. (A: Kontrol Grubu, B: NASH Grubu, Ax1000, B x400, İncet: x1000). NASH grubunda karaciğer parankim dokusundaki lipid damlacıklarının varlığı gözlemlendi



Resim 4.18. Deney gruplarına ait sıçan karaciğer dokusu Oil Red O Boyaması. (A: NASH+Kolşisin Grubu, B: Kolşisin Grubu, A x400, Bx1000, İncet: x1000). NASH+Kolşisin grubunda NASH grubuna göre daha az yoğunlukta lipid damlacıkları izlenmekte



Resim 4.19. A. Kontrol grubu; B. NASH grubu; C. NASH+Kolşisin grubu; D. Kolşisin grubu. NASH grubunda diğer gruplara göre artmış; NASH+Kolşisin grubunda NASH grubuna göre azalmış TNF- α immünreaktivitesi izlenmekte (DAB & Hematoksilen A-D X400)



Resim 4.20. A. Kontrol grubu; B. NASH grubu; C.NASH+Kolşisin grubu; D. Kolşisin grubu. NASH ve NASH+Kolşisin gruplarındaki artmış AFP immünreaktivitesi görülmekte (DAB & Hematoksilen A-D X400)

5. TARTIŞMA

NAFLD ve alkolik olmayan steatohepatik tüm dünyada karaciğer hastalılarının en önemli nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. NASH prevelansının artışı nedeniyle farklı terapötik yaklaşımlar da gündeme gelmiştir. Çeşitli antioksidan maddeler NAFLD tedavisinde etkin bulunmuştur. Çalışmamızda antioksidan özelliği bilinen Kolşisin kullanılmıştır. NASH nekroinflamatuvar aktivite ile karakterize bir karaciğer hastalığıdır [97, 103, 104].

NASH patolojisiyle ilgili öne sürülen hipotezler ise insülin direnci, oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinlerin anormal üretimini kapsamaktadır. Bu durum toplumda metabolik sendrom, tip- 2 diabetics mellitus ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patogenezi ile benzerlik göstermektedir [105, 106]. Ancak, NASH hastalarının % 15’inde bu patolojinin siroza kadar ilerleyebileceği görülmüştür. NASH, lobüler inflamatuvar hücre infiltrasyonu, makroveziküler steatozis, hepatositlerde balonlaşma, nekroz, Mallory cisimciği oluşumundan presinüzoidal fibrozise kadar değişkenlik gösteren geniş bir histopatolojik tabloyu içerir [7, 107].

Fruktozdan zengin bir diyet uygulanarak indüklenen NASH modeli ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen karaciğer dokularından Hematoksilen eozin ve Masson trikrom boyamaları yapılmıştır. Elde edilen boyamalar sonucunda, NASH grubunda steatoz, polimorfonükleer infiltrasyon, sentrilobüler inflamasyon, perisinüzoidal ve perisellüler kollagen birikimi (fibrozis) gözlenmiştir [15].

Haddad ve arkadaşları NASH oluşturulan sıçanların karaciğer kesitleriyle yapılan inceleme sonucunda hepatositlerin üçte birinden fazlasında makroveziküler steatoz oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca, bu kesitlerde nekrotik hepatosit, Mallory cisimleri ve kollagen birikimi olduğu da bildirilmiştir. Kawasaki ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadan elde edilen histolojik bulgulara fruktoz içeriği yüksek diyet uygulanan gruptaki sıçanların karaciğerlerinde yüksek oranda makroveziküler steatoz, lobüler inflamasyon ve periportal fibrozis görülmüştür [103, 108].

Duan ve arkadaşları metiyonin ve kolin içermeyen diyet (*methionine and choline deficient diet*, MCD) uygulayarak NASH modeli oluşturdukları çalışmalarında sıçanların vücut

ağırlıklarında gruplar arasında bir farklılık gözlemlemişlerdir. ALT ve AST karaciğer enzim değerlerinin NASH grubunda arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca, karaciğerin histolojik incelemesinde inflamasyon, hücre infiltrasyonu, hepatik steatozis ve fibrozisin varlığı gözlenmiştir. Lipid birikimini değerlendirmek için yapılan Oil red O boyaması sonucunda parankimadaki hücrelerde NASH grubunda aşırı birikmiş lipid damlacıklarının varlığı dikkat çekmiştir. Calycosin uygulaması ile normal sitoplazma, belirgin çekirdeğe sahip hepatositlerin varlığı ve lipid damlacıklarında azalma olduğu görülmüştür [109]. Çalışmamızda hayvanların vücut ağırlıkları arasında ve biyokimyasal parametrelerde anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak, tüm bu çalışmalardaki gibi histolojik değişikliklerde benzer sonuçlara varılmıştır.

Kristiansen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yüksek yağ, fruktoz ve kolesterol içeren diyeti 12 ve 26 hafta süresince farelere uygulayarak NASH gelişiminin zamana bağlı etkilerini araştırmışlardır. 12 hafta diyet uygulanan gruptaki farelerin vücut ağırlıkları ile kontrol grubundakilerin ağırlık değerleri benzerlik gösterirken 26 hafta diyetle devam eden gruptaki farelerin ağırlıklarında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda aynı şekilde 12 hafta süre ile fruktoz uygulanan gruptaki hayvanların vücut ağırlıklarında anlamlı fark bulunmamıştır. Biyopsi ile alınan karaciğer dokusunun histolojik incelemesinde 26 haftalık diyet indüksiyonunda yüksek düzeyde steatoz ve fibrozis görülmüştür. Ancak 12 haftalık diyet indüksiyonunda farelerde hafif steatoz ile birlikte hafif fibrozis varlığı gözlenmiştir [101]. Çalışmamızda içme sularına eklenen %10'luk fruktozun 12 hafta süreyle oral yolla uygulanmasının ardından histopatolojik değerlendirmelerimizde, NASH grubunda hepatositlerde balonlaşma ve boyut farklılıkları ile karakterize dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Bazı alanlarda hepatositlerde çok sayıda vakuolar dejenerasyon ve steatoz izlendi. Parankim hücrelerindeki bütünlüğün bozulması nedeniyle hücreler arası bağlantının kaybolduğu izlenirken, alanlarda infiltrasyon ve vakuoler değişiklikler dikkati çekti. Masson'un üçlü boyama yöntemi ile v. centralis çevresindeki parankimal dokuda kontrole göre artmış kollagen lif yoğunluğuna bağlı fibrotik değişiklikler izlendi. Kollagen lif yoğunluğunun değerlendirilmesinde kollagen lif pozitif olan mavi alan yüzdesi ImageJ Programı ile hesaplandı. Kollagen lif pozitif olan mavi alan yüzdesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde NASH grubunda kontrol grubuna göre artış izlendi. Yaptığımız Oil Red O boyama sonuçlarına göre NASH grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında NASH grubunda lipid damlacıklarının varlığı gösterildi.

TNF- α basit yağlı karaciğerden NASH'a doğru ilerleyen süreçte önemli bir molekül olarak kabul edilir. TNF- α adipoz dokuda makrofajlar tarafından üretilir ve obezite varlığında düzeyi artar. Adipoz dokunun obezite ve insülin direncinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. NASH ve diğer metabolik hastalıklar insülin direnci, inflamasyon, makrofaj birikimi ve TNF- α ifadesi ile ilişkilidir. Bu bilgiler yüksek fruktoz verilen sıçanlardaki TNF- α seviyesinin yükselmesini açıklamaktadır [48]. Çalışmamızda da TNF- α ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede NASH grubunda TNF- α immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre artmış olduğu dikkati çekti.

Drori ve arkadaşları farelerle yaptıkları bir çalışma sonucunda yüksek yağlı diyetin serum TNF- α seviyesini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca karaciğerin Hematoksilen eozin ile yapılan histolojik incelenmesinde lobüler inflamasyon, hepatositlerde balonlaşma ve fibrozis görülmüştür. Aynı çalışmada farelere vitamin D ile zenginleştirilmiş mantar özütleri verildiğinde serum TNF- α seviyesinde hepatosit balonlaşmasında ve inflamasyonda anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür [110]. Çalışmamızdaki benzer patolojiler Kolşisinle azalmıştır.

Yüksek fruktoz ve yüksek yağlı diyetle yapılan bir çalışmanın sonucunda diyet uygulanan sıçanlarda plazmadaki TNF- α seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. %10 fruktoz ile hazırlanmış içme suyu verilerek NASH oluşturulan bir çalışmada ise sıçanlarda ELİSA yöntemi ile TNF- α 'nın NASH oluşturulan grupta kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Fruktoz, yağ ve kolesterolden zengin bir diyet uygulanarak yapılan bir çalışmada karaciğer dokusu homojenize edilerek TNF- α 'nın protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Fruktoz, yağ ve kolesterolden zengin diyet verilen grupta TNF- α 'nın protein konsantrasyonu normal diyet uygulanan kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir [97, 103, 111]. Çalışmamızda ise TNF- α antikoru ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda NASH grubunda TNF- α immünreaktivitesinde kontrol grubuna göre artış görülmüştür.

Yapılan bazı çalışmalarda diyet veya %10-60 fruktozlu içme suyu ile alınan fruktozun, kilo alımı ile paralel olduğunu, vücut kitle indeksi ve vücut yağ oranında artış olduğunu, ayrıca karaciğer dokusunda ağırlık artışı olduğunu göstermiştir [15, 97, 112, 113]. Bir çalışmada Sellmann ve arkadaşları 6 hafta boyunca fruktoz, yağ ve kolesterolden zengin diyet uygulayarak farelerde NASH oluşturmuştur. Çalışma sonucunda kontrol ve NASH grubu

karşılaştırıldığında kalori alımı ve vücut ağırlığının benzer olduğu görülmüştür. Karaciğer ağırlığı NASH grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olarak belirlenmiştir [111]. Kristian ve ark., yaptığı çalışmada 12 hafta uygulanan fruktozda vücut ağırlığı artmamıştır. Bu bağlamda fruktoz ile beslemede vücut ağırlığı artışının belirli bir süreden sonra ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Kawasaki ve arkadaşları 5 hafta boyunca yüksek fruktoz diyet ile sıçanlarda NASH oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonunda açlık plazma glukoz konsantrasyonları fruktozla zenginleştirilmiş diyetlerle beslenen sıçanlarda daha yüksek olarak belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada 12 haftalık fruktoz uygulamasının sonucunda kontrol grubuna göre fruktoz verilen grupta glukoz toleransında bozulma olduğu belirtilmiştir. Cathrin ve arkadaşlar tarafından yapılan çalışmada ise NASH grubu ile kontrol grubunun açlık kan glukoz seviyelerinin benzer olduğu görülmüştür. [97, 108, 111]. Bizim çalışmamızda da kan glukoz seviyeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

AST, ALT ve ALP karaciğere özgü enzimlerdendir. Serumdaki AST, ALT ve ALP aktivitelerinin yükselmesi hasarlı hücrelerden kaynaklanması sebebi ile hepatosit hasarını yansıtır [114]. Zou ve arkadaşlarının yüksek yağ emülsiyonu içeren diyet ile oluşturduğu deneysel NASH modeli ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlarda NASH grubunda sıçanların serum AST ve ALT değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir [115]. Benzer şekilde fruktozca zengin diyet ile 8 haftada oluşturulan NASH modeli ile yapılan bir çalışmada hepatik fonksiyon göstergesi kabul edilen enzimlerden AST, ALT ve ALP aktivitelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir. Abd El-Haleim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise ALT aktivitesinde bir değişiklik gözlemlenmezken AST aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir [15, 97].

Haddad ve arkadaşlarının NASH oluşturarak yaptıkları çalışma sonucunda kontrol ve NASH grupları arasında ALT ve AST değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca Cathrin ve arkadaşlarının yüksek fruktoz diyeti ile farelerde oluşturdukları NASH modelinden elde edilen sonuçlardan da plazma ALT ve AST aktiviteleri kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir [103, 111]. Bizim çalışmamızda biyokimyasal parametrelerde anlamlı fark bulunmamıştır. Deneysel NASH çalışmalarında çoğu zaman, histopatolojik

değişiklikler ve biyokimyasal parametreler birbiri ile paralellik göstermediği bildirilmektedir.

Oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengesinin prooksidan yönüne kayması sonucu potansiyel hücrel hasarların oluşması olarak tanımlanır. Oksidatif stres, serbest radikallerin artışı ve antioksidan savunmanın zayıflaması sebebi ile meydana gelmektedir. Alkolsüz steatozun steatohepatite ilerlemesi karaciğerdeki reaktif oksidan türlerinin (ROS) etkisi ile ilişkilidir [116].

MDA, lipid peroksidasyon seviyesini belirleyen bir plazma parametresidir. Ancak total serbest sülfhydryl grupları (total-SH) serumdaki antioksidan seviyelerini gösterir.

Zhong ve arkadaşları NASH ve oksidatif stres ilişkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada farelere yüksek yağ ve yüksek kolesterol diyetini 12 hafta boyunca uygulayarak NASH modeli oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonucunda NASH grubunda karaciğer MDA seviyesi yükselirken GSH ve SOD aktivitesi azalmıştır. Aynı çalışmada karaciğer koruyucu (hepatoprotektif) bir ilaç olan Baicalin kullanıldığında karaciğerdeki antioksidan GSH ve SOD aktivitelerinin arttığı görülmüştür. Ayrıca lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinin Baicalin uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir [108].

Taotao ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarında 6 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile sıçanlarda NASH oluşturmuşlardır. 6 hafta sonunda yüksek yağlı diyet verilen gruptaki sıçanların kontrol grubundakilere göre karaciğerlerindeki MDA seviyesinin arttığı ancak SOD aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Yüksek yağ emülsiyonu ile NASH oluşumu indüklenen başka bir çalışmada NASH grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA'nın NASH grubunda arttığı görülmesine rağmen hepatik SOD seviyesinde anlamlı bir azalma belirlenmiştir [115, 117]. Çalışmamızda 12 hafta süreyle sıçanlara içme suyuna katılan %10'luk fruktoz verdiğimiz neticesinde kandaki oksidatif hasarı değerlendirmek amacıyla yapılan MDA ve total-SH düzeyleri araştırıldı ve değerlendirildi. Sonuçlarımıza göre 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Entzian ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kolşisinin antiinflamatuvar ve antifibrotik özelliklerinin pulmoner fibrozis tedavisi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kolşisinin normal donör periferik kan mononükleer hücrelerinin (normal donor peripheral

blood mononuclear cells, PMNC) sitokin salınımı ve fibroblast proliferasyonu ile kollagen sentez hızı üzerine etkilerini incelemek amacı ile stimüle edilmiş PMNC ve stimüle edilmemiş PMNC ile insan akciğer fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda kolşisinin fibroblast proliferasyonunu ve kollagen sentezini belirgin şekilde inhibe ettiği görülmüştür [118, 119]. Çalışmamızda, kollagen lif varlığının değerlendirilmesi sonucunda, NASH+Kolşisin grubundaki fibrotik değişikliklerin gerilediği görülmüştür.

Pablo ve arkadaşları kolşisinin karaciğer fibrozisi üzerine etkisini araştırmak amacı ile erkek Wistar albino sıçanlara üç ay boyunca CCL4 uygulamasının ardından gavaj ile günlük olarak Kolşisin (10 µg/rat) vermiştir. Masson trikrom boyaması ile kollagen birikimi incelenmiş ve Kolşisin uygulamasının anlamlı bir fibrolitik etki göstermediği belirtilmiştir [120]. Çalışmamızda, sıçanların içme sularına %10'luk fruktoz ve 9. haftaya gelindiğinde buna ilaveten 100 µg/gün dozunda Kolşisin suda çözüldükten sonra gavaj ile uygulandı. Çalışmamızda NASH grubundaki fibrotik değişikliklerin NASH+Kolşisin grubunda gerilediği gösterilmiştir.

AFP, fetüs karaciğer tarafından üretilen ana serum proteindir. Serum AFP düzeyleri gebeliğin 12. haftası civarında en yüksek düzeye ulaşır ve ardından yaşamın ilk yılında ihmal edilebilir seviyelere düşer. Yetişkinlerde yüksek serum AFP seviyesi, genellikle kronik hepatit veya sirozlu hastalarda yüksek hepatoselüler karsinom olasılığını gösterir [121]. Aynı zamanda AFP, karaciğer hasarı koşullarında çoğalan karaciğer kök hücrelerinin biyobelirteçleri olarak kabul edilir [122, 123]. Yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerde serum AFP seviyelerinin neden yükseldiği tam olarak bilinmemekle birlikte hepatosit nekrozu ve ardından oluşan hepatik rejenerasyonun yüksek serum AFP seviyesine sebep olabileceği iddia edilmektedir [124].

Pingo ve arkadaşları tarafından serum AFP seviyesi ve yağlı karaciğer hastalığı arasındaki ilişkiyi incelemek için bir kesitsel çalışma yapılmıştır. Araştırma sonucunda yağlı karaciğere sahip hastaların serum AFP seviyelerinin sağlıklı kişilere göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan korelasyon analizi AFP seviyesi ile hepatik steatoz derecesi arasında pozitif korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır [125]. Ancak serum AFP seviyeleri bakımından yağlı karaciğer hastaları ve sağlıklı kişiler arasında herhangi bir farklılığın gözlenmediğini bildiren başka çalışmalar da

bulunmaktadır [126, 127]. Çalışmamızda ise AFP immunreaktivitesi değerlendirildiğinde NASH ve NASH+Kolşisin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artan immun reaktivite izlendi.





6. SONUÇ

Yüksek fruktoz diyetindeki fruktozun konsantrasyonu, uygulama süresi, Kolşisinin dozu ve uygulama süresinin deneysel NASH modelindeki histopatolojik değişiklikler ve biyokimyasal ve diğer parametreler üzerinde farklı derecelerde etki edebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak, yüksek fruktoz ile oluşturulan deneysel NASH modelinde oluşan histopatolojik değişiklikler üzerinde antioksidan, antifibrotik, antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen Kolşisinin bu değişiklikleri iyileştirici bir ajan olabileceği düşünülmüştür. Ancak bu sonuçların farklı yöntemlerde desteklenerek prelinik uygulamalara yansıtılabileceği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh B. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 55 (7), 434-438.
2. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, Srishord M. (2011). Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* , 9 (6), 524-530.
3. Brunt EM, Kleiner DE, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Torbenson MS, Yeh M. (2011). Misuse of scoring systems. *Hepatology*, 54 (1), 369-370.
4. Bugianesi E. (2005). steatosis, the metabolic syndrome and cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22, 40-43.
5. Misra VL, Khashab M, Chalasani N. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Current gastroenterology reports*, 11 (1), 50.
6. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American journal of clinical nutrition*, 76 (5), 911-922.
7. Angulo P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 346 (16), 1221-1231.
8. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutrition reviews*, 60 (9), 289-293.
9. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free radical biology and medicine*, 52 (1), 59-69.
10. Shi Q, Chen K, Morris-Natschke SL, Lee K-H. (1998). Recent progress in the development of tubulin inhibitors as antimetabolic antitumor agents. *Current pharmaceutical design*, 4 (3), 219-248.
11. Harris Jr ED, Krane SM. (1971). Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 14 (6), 669-684.
12. Rojkind M, Kershenovich D. (1975). Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 378 (3), 415-423.
13. Sell S, Stillman D, Gochman N. (1976). Serum alpha-fetoprotein: a prognostic indicator of liver-cell necrosis and regeneration following experimental injury by galactosamine in rats. *American journal of clinical pathology*, 66 (5), 847-853.

14. Basciano H, Federico L, Adeli K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & metabolism*, 2 (1), 5.
15. Narayanan JM, Jesudoss V. (2016). Hepatoprotective potential of zingerone against nonalcoholic fatty liver disease in rats fed with fructose-enriched diet. *General Physiol Biophys*, 35,185-194.
16. Ben-Chetrit E, Levy M. (1998). Colchicine: 1998 update. *Seminars in arthritis and rheumatism*, Elsevier, 28(1), 48-59.
17. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. (2016). *Before we are born: essentials of embryology and birth defects*: Elsevier Health Sciences, 192-203.
18. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. (2011). *The Developing Human E-Book*, Elsevier Health Sciences, 179-185.
19. Sweeney L. J. (1998). *Basic concepts in embryology: A student's survival guide*. McGraw-Hill New Jersey, 304-307.
20. Sadler, T. W. (2011). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 219-222.
21. Sant, S. (2008). *Embryology for medical students*. india: Jaypee, 190-195.
22. Gürsoy, E, Koptagel, E. (1997). *Embriyoloji atlası*. Esnaf Ofset Matbaacılık, 125.
23. Komárek, V. (2000). *Gross anatomy. The laboratory rat*. Elsevier, 253-283.
24. Leslie P, Gartner Games L. (2001). *The color text book of Histology*. Philadelphia: Saunders company, 422-433.
25. William B, Fawcett D. (1994). *A text book of histology*. WB Saunders Company Philadelphia, 535-542.
26. Ross, M. H. and Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 628-643.
27. Kierszenbaum, A. L. (2015). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E-Book*: Elsevier Health Sciences,459-473.
28. Junqueira, L. C. and Carneiro, J.(2006). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill,323-336.
29. Porth, C. M. (2011). *Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states*. Lippincott Williams & Wilkins, 724-745.
30. Koeppen B.M. (2009). *Berne & Levy Physiology, Updated Edition E-Book*. Elsevier Health Sciences,585-589.

31. Hall J.E. (2015). Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. Elsevier Health Sciences,859-864.
32. Adamo M, Roberts CT, Leroith D. (1997). Chapter 14 - Insulin and the Insulin-like Growth Factors in Health and Disease. Principles of Medical Biology. 10, edn. Edited by Bittar EE, Bittar N: Elsevier, 339-363.
33. Çetinkalp Ş. (2017). Soru 1–Trigliserit nedir? Normal fizyolojideki yeri nedir? Turk Kardiyol Dern Ars, 45 (1), 1-63.
34. Ozougwu. J. (2017). Physiology of the liver. International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences,4(8), 13-24.
35. Ganong W.F.(2015). Review of medical physiology, 16 edn. USA, Mcgraw-hill, 454-458.
36. Kaminski D. L, Nahrwold DL. (1979). Neurohormonal control of biliary secretion and gallbladder function. World Journal of Surgery, 3 (4), 449-456.
37. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. (2006). Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Hepatology, 44 (4), 865-873.
38. Brunt E.M, C.G, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. The American journal of gastroenterology, 94 (9), 2467.
39. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology, 116 (6), 1413-1419.
40. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. (2005). The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. Journal of hepatology, 42 (1), 132-138.
41. Wong VW-S, Wong GL-H, Choi PC-L, Chan AW-H, Li MK-P, Chan H-Y, Chim AM-L, Yu J, Sung JJ-Y, Chan HL-Y. (2010). Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. 59 (7), 969-974.
42. Banner BF, Savas L, Zivny J, Tortorelli K, Bonkovsky HL. (2000). Ubiquitin as a marker of cell injury in nonalcoholic steatohepatitis. American journal of clinical pathology, 114 (6), 860-866.
43. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. The American journal of pathology, 160 (1), 255-263.

44. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. (1999) Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology*, 29 (3), 664-669.
45. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41 (6), 1313-1321.
46. Youssef WI, McCullough AJ. (2002). Steatohepatitis in obese individuals. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 16 (5), 733-747.
47. Day CP, James OF. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? . *Elsevier*, 114(4), 842-845.
48. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112 (12), 1796-1808.
49. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40 (1), 185-194.
50. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285 (3), 527-533.
51. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. (2005). IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine*, 11 (2), 191.
52. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. (2004). Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- κ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *The American journal of gastroenterology*, 99 (9), 1708.
53. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 114 (12), 1752-1761.
54. VIDELA LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical science*, 106 (3), 261-268.
55. Chtioui H, Semela D, Ledermann M, Zimmermann A, Dufour JF. (2007). Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Liver international*, 27 (6), 764-771.

56. Popa-Nita O, Marois L, Paré G, Naccache PH. (2008). Crystal-induced neutrophil activation: X. Proinflammatory role of the tyrosine kinase Tec. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 58 (6), 1866-1876.
57. Friedman SL. (2003) Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38, 38-53.
58. Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Haltner E, Kropf J. (1993). Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat storing cells (perisinusoidal lipocytes). *Journal of hepatology*, 19 (1), 117-132.
59. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C. (2001). High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression. a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 34(4),738-744.
60. Diehl A, Goodman Z, Ishak K. (1988). Alcohollike liver disease in nonalcoholics: a clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology*, 95(4), 1056-1062.
61. Garcia-Monzón C, Martín-Pérez E, Iacono OL, Fernández-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, Larrañaga E, Moreno-Otero R. (2000). Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *Journal of hepatology*, 33(5), 716-724.
62. Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo ME, De Moura MC. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis—a long-term follow-up study: comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Digestive diseases and sciences*, 48(10), 1909-1913.
63. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. (2002). The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 123(3), 745-750.
64. Patel DV, Scott V, Pilcher J. (2012). Investigating focal liver lesions. *Bmj* 344, 657.
65. Baranova A, Younossi ZM. (2008). The future is around the corner: noninvasive diagnosis of progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 47(2), 373-375.
66. Angulo P. (2007). GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 25(8), 883-889.
67. Wanless IR, Lentz JS. (1990). Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*, 12(5), 1106-1110.
68. Hickman I, Jonsson J, Prins J, Ash S, Purdie D, Clouston A, Powell E. (2004). Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut*, 53(3), 413-419.

69. Zelber-Sagi S, Kessler A, Brazowsky E, Webb M, Lurie Y, Santo M, Leshno M, Blendis L, Halpern Z, Oren R. (2006). A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4(5), 639-644.
70. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*, 39(6), 1647-1654.
71. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P. (2004). Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology*, 39(3), 770-778.
72. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour AA, Naserimoghadam S. (2003). Probuco in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *Journal of hepatology*, 38(4), 414-418.
73. Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, David E, Rizzetto M, Marchesini G. (2005). A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *The American journal of gastroenterology*, 100(5), 1082.
74. Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Clore J, Mills AS. (2004). A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(12), 1107-1115.
75. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J. (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 355(22), 2297-2307.
76. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, Podevin P, Lacorte JM, Bernhardt C, Bruckert E. (2008). Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology*, 135(1), 100-110.
77. Houdková T. (2011). Effect of colchicine on P-glycoprotein expression and activity in caco-2 cells, 218, 50-62.
78. Leung YY, Hui LLY, Kraus VB. (2015). Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*:: Elsevier; 45(3), 341-350.
79. Niel E, Scherrmann J-M. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine*, 73(6), 672-678.
80. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. (2015). Colchicine--Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum*, 45(3), 341-350.

81. Das D, Pemberton PW, Burrows PC, Gordon C, Smith A, McMahon RF, Warnes TW. (2000). Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrhosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(3), 351-362.
82. Muntoni S, Rojkind M, Muntoni S. (2010). Colchicine reduces procollagen III and increases pseudocholinesterase in chronic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 16(23), 2889.
83. Kaplan MM, Bonder A, Ruthazer R, Bonis PA. (2010). Methotrexate in patients with primary biliary cirrhosis who respond incompletely to treatment with ursodeoxycholic acid. *Digestive diseases and sciences*, 55(11), 3207-3217.
84. Boyunağa, N. D. Badem, and T. (2018). Mısır şurubunun metabolizmada oluşturduğu anarşi ve hastalıklarla ilişkisi. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(2), 198-204.
85. Tappy L, Lê K-A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological reviews*, 90(1), 23-46.
86. Stoianov A, Adeli K. (2014). Central and metabolic effects of high fructose consumption: evidence from animal and human studies. *Nutrition and Food Sciences Research*, 1(2),3-9.
87. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz J-M, Lustig RH. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 7(5), 251.
88. Cortez-Pinto H, Machado MV. (2009). Uncoupling proteins and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 50(5), 857-860.
89. Gambino R, Musso G, Cassader M. (2011). Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 15(5), 1325-1365.
90. Havel PJ. (2005). Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition reviews*, 63(5), 133-157.
91. Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, Rosenthal T, Pappo O, Link G. (2005). Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*, 45(5), 1012-1018.
92. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, Jeandidier N, Maillard E, Marchioni E, Sigrist S. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & metabolism*, 13(1), 15.

93. Miller A, Adeli K. (2008). Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Current opinion in gastroenterology*, 24(2), 204-209.
94. Mosca A, Nobili V, De Vito R, Crudele A, Scorletti E, Villani A, Alisi A, Byrne CD. (2017). Serum uric acid concentrations and fructose consumption are independently associated with NASH in children and adolescents. *Journal of hepatology*, 66(5), 1031-1036.
95. Caliceti C, Calabria D, Roda A, Cicero AF. (2017). Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: a critical review. *Nutrients*, 9(4), 395.
96. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang D-H. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(5), 1063-1075.
97. El-Haleim EAA, Bahgat AK, Saleh S. (2016). Resveratrol and fenofibrate ameliorate fructose-induced nonalcoholic steatohepatitis by modulation of genes expression. *World journal of gastroenterology*, 22(10), 2931.
98. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
99. Sedlak J, Lindsay RH. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
100. GÖREN B, FEN T. (2005). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 25(6), 841-850.
101. Kristiansen MNB, Veidal SS, Rigbolt KTG, Roth JD, Jelsing J, Vrang N, Feigh M. (2016). Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. *World journal of hepatology*, 8(16), 673.
102. Henriques MSdM, Leite JA, Diniz MdFFd, Araújo MSTd. (2014). Immunohistochemistry pattern of hepatic inflammatory and insulin resistance markers in experimental model of nonalcoholic steatohepatitis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 50(2), 136-143.
103. Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS. (2011). Antioxidant and hepatoprotective effects of silibinin in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011.
104. Mei L, Mochizuki M, Hasegawa N. (2012). Hepatoprotective Effects of Pycnogenol in a Rat Model of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Phytotherapy Research*, 26(10), 1572-1574.
105. Day C. (2002). Pathogenesis of steatohepatitis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 16(5), 663-678.

106. Farrell GC. (2003). Non-alcoholic steatohepatitis: What is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *Journal of gastroenterology and hepatology* 2003, 18(2),124-138.
107. Diehl A, Poordad F.(2002). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. *Gastrointestinal and Liver Disease*. In.: Philadelphia: Saunders, 63(4), 1393-1401.
108. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T, Yamanouchi T. (2009). Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of nutrition*, 139(11), 2067-2071.
109. Duan X, Meng Q, Wang C, Liu Z, Liu Q, Sun H, Sun P, Yang X, Huo X, Peng J. (2017). Calycosin attenuates triglyceride accumulation and hepatic fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis via activating farnesoid X receptor. *Phytomedicine*, 25,83-92.
110. Drori A, Rotnemer-Golinkin D, Zolotarov L, Ilan Y. (2017). Oral administration of CardioAid and lunasin alleviates liver damage in a high-fat diet nonalcoholic steatohepatitis model. *Digestion*, 96(2), 110-118.
111. Sellmann C, Degen C, Jin CJ, Nier A, Engstler AJ, Alkhatib DH, De Bandt J-P, Bergheim .(2017). Oral arginine supplementation protects female mice from the onset of non-alcoholic steatohepatitis. *Amino acids*, 49(7), 1215-1225.
112. Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J. (2006). Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*, 22(7-8), 758-766.
113. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. (2016). A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica*, 546-555.
114. Loria P, Lonardo A, Carulli L, Verrone A, Ricchi M, Lombardini S, Rudilosso A, Ballestri S, Carulli N. (2005). the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22,31-36.
115. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. (2006). High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life sciences*, 79(11), 1100-1107.
116. Eken A. (2017). rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 69-73.
117. Ma T, Huang C, Zong G, Zha D, Meng X, Li J, Tang W. (2011). Hepatoprotective effects of geniposide in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(4), 587-593.

118. Entzian P, Schlaak M, Seitzer U, Bufe A, Acil Y, Zabel P. (1997). Antiinflammatory and antifibrotic properties of colchicine: implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung*, 175(1), 41-51.
119. Sun A, Wang YP, Chia JS, Liu BY, Chiang CP. (2009). Treatment with levamisole and colchicine can result in a significant reduction of IL-6, IL-8 or TNF- α level in patients with mucocutaneous type of Behcet's disease. *Journal of oral pathology & medicine*, 38(5), 401-405.
120. Muriel P, Moreno MG, Hernández MdC, Chávez E, Alcantar LK. (2005). Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 96(5), 375-380.
121. Zhou Y-M, Yang J-M, Li B, Yin Z-F, Xu F, Wang B, Liu P, Li Z-M. (2008). Clinicopathologic characteristics of intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with positive serum α -fetoprotein. *World Journal of Gastroenterology*, 14(14), 2251.
122. Kakisaka K, Kataoka K, Onodera M, Suzuki A, Endo K, Tatemichi Y, Kuroda H, Ishida K, Takikawa Y. (2015). Alpha-fetoprotein: A biomarker for the recruitment of progenitor cells in the liver in patients with acute liver injury or failure. *Hepatology Research*, 45(10), 12-20.
123. Karvountzis G, AG. (1974). Relation of alpha-fetoprotein in acute hepatitis to severity and prognosis. *Annals of internal medicine*, 80(2), 156-160.
124. Bloomer JR, Waldmann TA, McIntire KR, Klatskin G. (1975). α -Fetoprotein in nonneoplastic hepatic disorders. *Jama*, 233(1), 38-41.
125. Xu P, Xu C-F, Wan X-Y, Yu C-H, Shen C, Chen P, Xu G-Y, Li Y-M. (2014). Association between serum alpha-fetoprotein levels and fatty liver disease: a cross-sectional study. *World Journal of Gastroenterology*, 20(33), 11865.
126. Kara M, Genc H, Tapan S, Meral C, Ercin C, Erdal M, Dogru T. (2013). Alpha fetoprotein levels and its relationship with histopathological findings in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17(11), 1536-1541.
127. Polyzos S, Kountouras J. (2013). Serum alpha-fetoprotein in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(17), 2411.



EKLER

EK-1. Etik Kurul onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/02/2018-E.21035



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 10.10.2017 tarihli ve E.142991 sayılı yazımız ile onay alan, araştırmacı grubu Suna ÖMEROĞLU, Seren ÖZENİRLER, Fatma F.Mohamed AMRAJE, MD, Hakan BOYUNAGA, Müşerref Şeyma CEYHAN ve İsmail TÜRKOĞLU'ndan oluşan G.Ü.ET-17.076 kod numaralı ve "*Deneyel Nonalkolik Steatohepatit (NASH) Modelinde Koltrisin Karaciğer Üzerine Etkisinin İncelenmesi*" başlıklı araştırma önerisi ile ilgili alınan 19.01.2018 tarihli dilekçe konusu Başkanlığımız tarafından incelenmiş olup,

Araştırmacı grubuna Saadet Özen AKARCA DİZAKAR'ın da dahil edilmesi ile ilgili talebin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

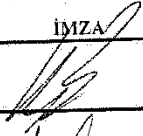
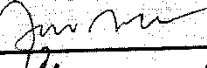
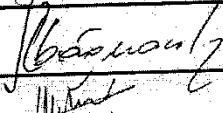
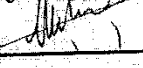
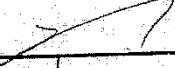
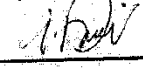
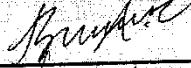


Akdeniz
Tel:0 (312) 202 20 97 - 0 (312) 202 38 78
e-Posta: bedirli@gauni.edu.tr - İnternet: <http://medyegazisi.edu.tr/>

Bilgi için: Nurettin Öner
Ömeri Erenel Sarıoğlu
Telefon: 0312 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ : 26.01.2018	TOPLANTI SAYISI : 01
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	KATILAMADI
Prof.Dr.Tuncay PEKER	KATILAMADI
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	KATILAMADI
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

EK-2. Katılım Sertifikası



**XX. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
23-31 Mayıs 2017
KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Fatma F. MOHAMED AMRAJE

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 23-31 Mayıs 2017 tarihleri arasında düzenlenen "XX. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu"na katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim USLAN
REKTÖR

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
ETİK KURUL BAŞKANI

Sertifika no: 2017/20 - 02

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : AMRAJE, Fatma Fathi Mohamed
 Uyuğu : Libya
 Doğum tarihi ve yeri : 27/04/1984 Libya
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05316118949
 E posta : sohilaissa@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Omer Al Mukhtar Üniversitesi/Tıp Fakültesi	2010
Lise	Algala Lisesi	2003
İş Deneyimi/Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2010-2013	EL Tawra Hastanesi/ Pediyatrik Bölümü	Asistan

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Amraje, F. F. M., Köylü, A., Dizakar, S. Ö. A., Türkoğlu, İ., and Ömeroğlu, S. (2018). Bisphenol A and Male Reproductive System. *Gazi Medical Journal*, 29(3).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..