



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**TOPİRAMATIN NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER
ÜZERİNDEKİ ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİ**

SEVTAP KILINÇ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2022



**TOPİRAMATIN NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER ÜZERİNDEKİ
ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİ**

Sevtap KILINÇ

**DOKTORA TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2022

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.

Sevtap KILINÇ

...../.../2022

TOPİRAMATIN NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER ÜZERİNDEKİ ANTIOKSİDAN ETKİNLİĞİ

(Doktora Tezi)

Sevtap KILINÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2022

ÖZET

Bu çalışma anti-obezite etkisi bilinen bir anti-epileptik ilaç olan topiramatin (TPM) sağlıklı ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) oluşturulmuş karaciğer dokusunda oksidan-antioksidan parametreler üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amacıyla planlandı. NAYKH oluşturmak amacıyla yüksek yağlı diyet kullanıldı. Çalışmamızda 30 adet Wistar albino sıçan kontrol, TPM, diyet, diyet + TPM ve diyet + vitamin E olmak üzere 5 gruba ayrıldı. TPM, 6 haftalık diyet sonrasında, 21 gün boyunca 100 mg/kg/gün dozunda oral olarak verildi. TPM'nin olası antioksidan etkinliğini karşılaştırmak amacı ile antioksidan etkinliği bilinen E vitamini ise yine 6 haftalık diyet sonrasında, 21 gün boyunca 250 mg/kg/gün dozunda oral olarak verildi. Çalışma sürecinde haftalık ağırlık ve kan şekeri takipleri yapıldı; karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri, glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçüldü. Karaciğer fonksiyon testleri değerlendirmek için AST ve ALT düzeyleri ölçüldü. Karaciğerden alınan doku örneklerinde hematoksilen & eozin boyaması ile yağlanma, infiltrasyon ve balonlaşma NAYKH aktivite skoru (NAS) ile histolojik olarak değerlendirildi. karaciğer histolojik olarak incelendi. İstatistiksel analiz için Jamovi yazılım programı kullanıldı ve $P<0.05$ anlamlı kabul edildi. Diyet grubuna kıyasla Diyet + TPM grubunda ağırlık ve kan şekerlerinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0,05$). NAYKH gelişiminin ve TPM'nin karaciğer dokusunda MDA düzeylerini arttırdığı, GSH düzeylerini azalttığı, GPx aktivitesini azalttığı ve bu ikisinin birlikte SOD aktivitesini arttırdığı; E vitaminin ise bu değerleri kontrol seviyelerine çektiği görüldü ($p<0,05$). Histoloji verileri değerlendirildiğinde TPM grubunda belirgin infiltrasyon, sitoplazmik vakuol görülürken, puanlama sonucunda istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. DT grubunda yaygın balonlaşma ve infiltrasyon görülmüş olup puanlama sonucu istatistiksel olarak anlamlıdır. Sonuç olarak TPM'nin karaciğer dokusunda oksidan etkili olduğu görülmüştür.

Bilim Kodu : 1023

Anahtar Kelimeler : Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, Topiramet, Oksidatif stres

Sayfa Adedi : 120

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Meltem SEVGİLİ

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TOPIRAMATE ON NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER

(Ph. D. Thesis)

Sevtap KILINÇ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2022

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of topiramate (TPM), an anti-epileptic drug with known anti-obesity effect, on oxidant-antioxidant parameters in healthy and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) developed liver tissue. A high-fat diet was used to induce NAFLD. 30 Wistar albino rats were allocated into 5 groups as control, TPM, Diet, Diet + TPM and Diet + Vitamin E. TPM was given orally at a dose of 100 mg/kg/day for 21 days after a 6-week diet. In order to compare the possible antioxidant activity of TPM vitamin E, as a well-known antioxidant, was given orally at a dose of 250 mg/kg/day for 21 days, again after a 6-week diet. During the study, weekly weight and blood sugar follow-ups were made; malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels, glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities were measured in liver tissue. AST and ALT levels were determined to evaluate liver function tests. Tissue samples taken from the liver were stained with hematoxylin & eosin then steatosis, infiltration and ballooning were evaluated histologically in order to calculate NAFLD activity score (NAS). Jamovi software was used for statistical analysis and when p was lower than 0.05 difference considered as significant. Weight and blood sugar levels were lower in the Diet + TPM group compared to the diet group ($p < 0.05$). Diet and TPM increased MDA levels and decreased GSH levels and GPx activity in liver tissue. SOD activity increased only in the group in which Diet and TPM were administered together. Vitamin E decreased these values to control levels ($p < 0.05$). When histological data were evaluated, while significant infiltration and cytoplasmic vacuolization were observed in the TPM group, there was no statistically significant difference between groups histological scoring. Widespread ballooning and infiltration were observed in the Diet + TPM group, and the scoring result was also statistically significant. As a result, it has been observed that TPM has an oxidant effect on liver tissue.

Science Code : 1023

Key Words : Nonalcoholic fatty liver disease, topiramate, oxidative stress

Page Number : 120

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Ayşe Meltem SEVGİLİ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, güler yüzlü ile sevgi ve hoşgörüsünü daima hissettiren, çalışmalarımız sırasında sabır ve anlayış gösteren, bana güvenen ve varlığı ile kendimi güvende hissettiren akademik danışmanım, çok kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Meltem SEVGİLİ'ye sonsuz minnetlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince her türlü desteği sağlayan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamın başlangıcından itibaren çalışma sürecimin şekillenmesinde yol gösterici olan tez izleme komitesi üyesi hocalarım Prof. Dr. Gülriz ERİŞGEN'e ve Prof. Dr. Çiğdem ÖZER'e katkı ve görüşlerinden ötürü teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince histolojik analizler sırasında her türlü desteği ile çalışmamıza katkıda bulunan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YİĞMAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca, yardımlarını, emeklerini benden esirgemeyen, her konuda yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Duygu TOZCU'ya, Dr. Öğr. Üyesi Arzu KESKİN AKTAN'a ve Pelin ASLAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, bana her zaman inanan, güvenen, başarılarımda büyük emekleri olan değerli annem Nebahat TÜRKAN'a, babam Zafer TÜRKAN'a ve dostum ve bir tanecik ablam Funda AKÇAY'a ve eşi Uğur AKÇAY'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez yazım aşaması boyunca tecrübelerinden yararlandığım, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve daima yanımda olan değerli babam Prof. Dr. Kamer KILINÇ'a ve annem Asuman KILINÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Her konuda bana yardımcı olan, sabırla beni dinleyen, anlayan, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren, tezimin her aşamasında emeği olan sevgili eşim Uzm. Dr. Onur Can KILINÇ'a ve varlığıyla beni güçlendiren, sevgisiyle enerji veren biricik kızım Ece KILINÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Anatomisi, Histolojisi ve Fizyolojisi.....	3
2.1.1. Karaciğer anatomisi	3
2.1.2. Karaciğer histolojisi	5
2.1.3. Karaciğer fizyolojisi.....	6
2.2. Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	9
2.2.1. Epidemiyolojisi	10
2.2.2. Risk faktörleri ve etiyolojisi.....	11
2.2.3. Patofizyolojisi	13
2.2.4. Histopatolojisi	16
2.2.5. Prognozu	20
2.2.6. Klinik ve laboratuvar bulguları	20
2.2.7. Görüntüleme yöntemleri	21
2.2.8. Tedavisi	22
2.3. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemleri.....	27

	Sayfa
2.3.1. Serbest radikaller.....	27
2.3.2. Reaktif oksijen türleri.....	28
2.3.3. Nitrik oksit ve reaktif nitrojen oksit türleri	30
2.3.4. Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik etkileri.....	31
2.3.5. Reaktif oksijen türlerinin patolojik etkileri	32
2.3.6. Antioksidanlar	35
2.4. Topiramet	41
2.4.1. Yapısı	41
2.4.2. Farmakokinetiği	42
2.4.3. Farmakodinamiği	43
2.4.4. Endikasyonları ve kontrendikasyonları.....	44
2.4.5. Yan etkileri.....	46
2.5. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Gereç	49
3.1.1. Etik kurul.....	49
3.1.2. Deney hayvanları	49
3.1.3. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazları	49
3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve kitler	49
3.2. Yöntem.....	51
3.2.1. Araştırma planı.....	51
3.2.2. Araştırma protokolü	52
3.2.3. Karaciğer dokusunda yapılan biyokimyasal ölçümler	54
3.2.4. Histolojik değerlendirmeler	59
3.2.5. İstatistiksel Analiz:.....	60
4. BULGULAR	63

Sayfa

4.1. Ağırlık Değişimleri	63
4.2. Kan Şekeri Düzeyleri.....	66
4.3. Alanin Transaminaz (ALT) Düzeyleri.....	68
4.4. Aspartat Transaminaz (AST) Düzeyleri	69
4.5. Gama Glutamil Transferaz (GGT) Düzeyleri	70
4.6. Lipid Peroksidasyonu/Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	70
4.7. Glutasyon (GSH) Düzeyleri	71
4.8. Süperoksit Dismutaz (SOD) Değerleri	73
4.9. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyi.....	74
5. TARTIŞMA	83
5.1. Kullanılan Yönteme Yönelik	83
5.1.1. Hastalık modeli	83
5.1.2. Topiramet veriliş süre ve dozu.....	84
5.1.3. E Vitamini dozu	85
5.2. Bulgulara Yönelik.....	86
5.2.1. Ağırlık değişimi	86
5.2.2. Kan şekeri değişimi.....	86
5.2.3. Karaciğer fonksiyon testleri	87
5.2.4. Oksidan-antioksidan biyokimyasal parametreler.....	88
5.2.5. Histoloji.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
6.1 Çalışmanın Kısıtlılıkları.....	98
6.2. Geleceğe Yönelik Araştırma Planları	98
KAYNAKLAR	99
EKLER.....	117
Ek-1. Etik Kurul Onayı.....	118

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	119
----------------	-----

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Vücutta en çok oluşturulan oksijen radikalleri ve oluşum mekanizmaları	28
Çizelge 2.2. Antioksidan sistemlerin listesi	36
Çizelge 2.3. Sentetik antioksidanlar ve etkileri	41
Çizelge 3.1. Laboratuvarıda kullanılan donanımlar	50
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler	51
Çizelge 4.1. Deney hayvanlarının başlangıç, yedinci ve onuncu hafta sonundaki gram cinsinden ortalama ağırlık değerleri.....	63
Çizelge 4.2. Deney hayvanlarının başlangıç, yedinci ve dokuzuncu hafta sonundaki mg/dL cinsinden ortalama kan şekeri değerleri.....	66
Çizelge 4.3. Serum ALT düzeyleri (U/L)	68
Çizelge 4.4. Serum AST düzeyleri (U/L)	70
Çizelge 4.5. Deney hayvanlarının nmol/mg cinsinden karaciğer dokusundaki ortalama MDA düzeyleri.....	70
Çizelge 4.6. Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer dokusunda nmol/mg cinsinden GSH düzeyleri.....	72
Çizelge 4.7. Deney hayvanlarının mU/mg cinsinden karaciğer dokusundaki ortalama SOD düzeyleri.....	73
Çizelge 4.8. Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer dokusunda nmol/dk/ml cinsinden GPx düzeyleri	74

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan karaciğer anatomisi	3
Şekil 2.2. Sıçan karaciğer anatomisi	4
Şekil 2.3. Karaciğer histolojisi.....	5
Şekil 2.4. NAYKH patofizyolojisi.....	14
Şekil 2.5. Çift vuruş hipotezi. "İlk vuruş" hepatik steatoz, "ikinci vuruş" inflamatuvar araçlar ile artan oksidan stres	15
Şekil 2.6. Non-alkolik yağlı karaciğerin histolojik görüntüsü	19
Şekil 2.7. Reaktif oksijen türlerinin üretimi.....	29
Şekil 2.8. Fagositik aktivite	31
Şekil 2.9. Redoks homeostazi	32
Şekil 2.10. Lipid peroksidasyonunun mekanizması	34
Şekil 2.11. Glutatyon döngüsü.....	38
Şekil 2.12. TPM'nin yapısal formülü	42
Şekil 3.1. Araştırma protokolünün zaman planlaması	52
Şekil 3.2. Glutatyonun tiyol bileşikleri ile tepkimesi	56
Şekil 4.1. Yedinci haftada tedavi başlangıcından önce standart diyet (normal ve TPM grubu) ve yağlı diyet (diyet, diyet + TPM, diyet + Vitamin E) ile beslenen sıçanların ortalama ağırlıklar değişimleri.....	64
Şekil 4.2. Bütün grupların onuncu hafta sonundaki ortalama ağırlık değerlerinin karşılaştırılması	65
Şekil 4.3. On hafta süresince sıçanların ortalama ağırlıklarının haftalara göre değişimi. Not: Ağırlık takibi grafiğinde grafiğin görsel anlaşılabilirliğini artırmak için DE grubu çıkarılmıştır.	66
Şekil 4.4. Yedinci haftada tedavi başlangıcından önce standart diyet (normal ve TPM grubu) ve yağlı diyet (diyet, diyet + TPM, diyet + Vitamin E) ile beslenen sıçanların ortalama kan şekeri değişimleri.	67
Şekil 4.5. Bütün grupların dokuzuncu hafta sonunda ortalama kan şekeri değerlerinin karşılaştırılması	68
Şekil 4.6. Serum ALT düzeyleri	69

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri	71
Şekil 4.8. Karaciğer dokusunda GSH düzeyleri	72
Şekil 4.9. Karaciğer dokusunda SOD düzeyleri	73
Şekil 4.10. Karaciğer dokusunda GPx düzeyleri	75
Şekil 4.11. Steatoz değerlendirilmesi.....	78
Şekil 4.12. İnfiltrasyon değerlendirilmesi.....	79
Şekil 4.13. Balonlaşma değerlendirilmesi	80
Şekil 4.14. NAYKH aktivite skorunun değerlendirilmesi	81
Şekil 5.1. Oksidan-antioksidan parametrelere ait tüm veriler.....	89
Şekil 5.2. Histolojik değerlendirme sonuçlarının ait tüm veriler.....	93

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Normal ve yağlı karaciğer görüntüsü	9
Resim 3.1. İntrakardiyak kan alımı.....	53
Resim 3.2. Diyet grubuna ait retroperitoneal yağlanma görüntüsü	54
Resim 4.1. Kontrol (A) ve topiramat grubundan (B, B', B'') hayvanların karaciğer doku örneklerinin HE boyalı kesitlerine ait mikrograflar	76
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait normal hepatosit görüntüsü	76
Resim 4.3. Diyet (A, A', A''), diyet + topiramat (B, B', B'') ve diyet +E vitamini (C, C', C'') gruplarındaki hayvanların karaciğer örneklerinin HE boyalı kesitlerine ait mikrograflar ve alkolik olmayan steatohepatit hasarının belirlenmesinde kullanılan steatoz, balonlaşma dejenerasyonu, inflamasyon ve NAS skorunun gruplar arası farklılıklarının karşılaştırılması	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

cm	Santimetre
dL	Desilitre
dk	Dakika
gr	Gram
IU	Uluslararası Birim
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
nmol	Nanomol

Kısaltmalar

Açıklamalar

AFABP	Adiposit yağ asidi bağlayıcı protein
AFMK	N(1)-asetil-N(2)-formil-5-metoksikinuramin
ALT	Alanin aminotransferaz
AMK	N1-asetil-5-metoksikinuramin
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
AST	Aspartat aminotransferaz
BHT	Butil Hidroksi Toluen
BT	Bilgisayarlı tomografi
CA	Karbonik anhidraz
Ca²⁺	Kalsiyum
CAT	Katalaz
C_{max}	Doruk plazma seviyesi
CK-18	Sitokeratin-18
CuZnSOD-SOD1	Sitozolik süperoksit dismutaz1

DTNB	5',5'- Ditiobis 2-Nitrobenzoik asit
ECSOD-SOD3	Hücre dışı süperoksit dismutaz 3
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGF21	Fibroblast büyüme faktörü 21
GABA	Gama-aminobütirik asit
GGT	Gamma glutamil transferaz
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipokloröz asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HSD17B13	17-β-hidroksisteroid dehidrogenaz 13
IL-6	İnterlökin-6
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MnSOD-SOD2	Mitokondriyal süperoksit dismutaz 2
MPO	Miyeloperoksidaz
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojenfosfat
NAS	Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Aktivite Skoru
NASH	Non-alkolik steatohepatit
NAYKH	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NO	Nitrik oksit
O₂⁻	Süperoksit
OH[·]	Hidroksil

PIVENS	Pioglitazone vs Vitamin E vs Placebo for Treatment of Non-Diabetic Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis (Non-alkolik Steatohepatiti Olan Diyabetik Olmayan Hastaların Tedavisinde Pioglitazon, Vitamin E ve Plasebonun Karşılaştırılması)
PNPLA3	Patatin-benzeri fosfolipaz domain-içeren 3
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gama
RNT	Reaktif azot türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
SAF	Steatoz Aktivite Fibroz
SOD	Süperoksit dismutaz
α-TOH	α -Tokoferol
T2DM	Tip 2 diyabetes mellitus
TBA	2-Tiyobarbiturik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TCA	Trichloroacetic asit
TLR	Toll benzeri reseptör
TM6SF2	Transmembran 6 süperailisi üyesi 2
TNF-α	Tümör nekroz faktörü- α
TONIC	Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children (Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Çocuklardaki Tedavisi)
TPM	Topiramet
UDKA	Ursodeoksikolik asit
USG	Ultrasonografi
VKİ	Vücut kitle indeksi
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

1. GİRİŞ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) aşırı alkol tüketmeyen hastalarda karaciğerde yağ birikimi olarak tanımlanabilir. NAYKH prevalansı yetişkinlerde yaklaşık %20-30'dur [1,2]. Obez bireylerde ise NAYKH görülme sıklığı %80'in üzerindedir [3]. NAYKH ifadesi basit steatozdan steatohepatit (non-alkolik steatohepatit; NASH), fibroz ve klinik sonuçlarıyla birlikte siroza kadar geniş bir yelpazeyi kapsar [1]. NAYKH'nın patofizyolojisinde obezite ve oksidatif stres başta olmak üzere genetik faktörler, diyet, fiziksel inaktivite, insülin direnci, lipid metabolizmasındaki değişiklikler, lipotoksisite, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu ve endokrin faktörler dahil çok sayıda faktör rol oynar [4]. Yapılan çalışmalarda NAYKH/NASH oluşturulan gönüllülerde oksidatif stres belirteçlerinde artış ve antioksidan parametrelerde azalma bildirilmiştir [5,6].

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının hepatositlerde neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan tedavilerin olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur [3,5,6]. Yapılan çalışmalarda E vitamininin karaciğerdeki oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir [7–11].

Topiramet (TPM), esas olarak epilepsi tedavisinde kullanılan bir ilaçtır [12]. Buna ek olarak migren profilaksisi ve obezite tedavisinde kullanımı için de FDA onayı bulunmaktadır [13,14]. TPM'nin oksidan-antioksidan denge üzerinde değişken etkileri olduğu bilinmektedir. Literatürde TPM'nin oksidatif stresi azaltıp, antioksidan parametreleri arttırdığını rapor eden çalışmalar mevcuttur [15–17]. Ancak bunların aksine, daha az sayıda da olsa TPM'nin oksidatif stresi artırdığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur [18,19].

TPM'nin farklı dokularda oksidan-antioksidan sistemler üzerindeki etkileri araştırılmış olsa da karaciğerde oksidan-antioksidan sistemler üzerindeki etkisi bugüne kadar çalışılmamıştır. TPM'nin sağlıklı karaciğer dokusu üzerindeki oksidan-antioksidan etkinliği dahi bilinmezken; obezite tedavisinde kullanılan bir ilaç olması, obezitedeki yüksek NAYKH sıklığı ve NAYKH patofizyolojisinde oksidatif stresin rolü göz önüne alındığında bu ilacın karaciğerde oksidan etki göstermesi durumunda kullanımının hasarı daha artırıcı sonuçlara yol açabileceği öngörülebilir. Dolayısı ile TPM'nin hem sağlıklı karaciğer dokusunda hem de yağlı karaciğer üzerinde oksidan-antioksidan sistemi nasıl modüle ettiğinin bilinmesi çok önemlidir.

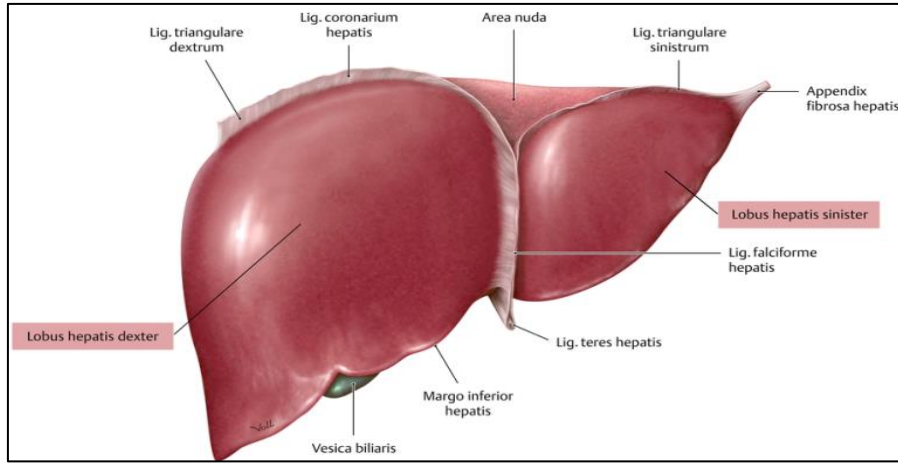
Biz araştırmamızda hem normal hem de NAYKH oluşturduğumuz sıçan karaciğerinde TPM'nin oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla planladığımız çalışmanın hipotezini “NAYKH oluşturulan sıçanlarda TPM karaciğer dokusunda antioksidan etkilidir” olarak kurduk. Bunun ötesinde söz konusu olabilecek muhtemel antioksidan etkiyi kıyaslamak amacıyla antioksidan etkinliği bilinen vitamin E grubunu çalışmamıza ekledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi, Histolojisi ve Fizyolojisi

2.1.1. Karaciğer anatomisi

İnsan karaciğeri diyafragmanın hemen altında abdominal boşluğa yerleşmiştir [20]. Karaciğer sağ hipokondriyak ve epigastrik bölgededir ve sol hipokondriyuma doğru uzanır. İnferiorda duodenum, transvers kolon, sağ böbrek, sağ sürrenal bez ile, medialde ise özofagus ve mide ile komşudur [21]. Karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organı ve bezidir. Yaklaşık ağırlığı 1,5 kg'dır [20]. Karaciğerin birbirine hemen hemen eşit sağ ve sol lobları vardır. Bu loblar falsiform ve teres ligamentleri ile birbirinden ayrılır. Daha küçük çaptaki kaudat lob karaciğerin visseral yüzeyinde yer alır. Loblar Glisson kapsülü ile çevrilidir [22]. Karaciğerin işlevsel birimi olan lobüller birkaç milimetre uzunluğunda, 0,8-2 mm çapında ve silindirik yapıdadır. İnsan karaciğerinde yaklaşık 50.000-100.000 adet lobül bulunur [23] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnsan karaciğer anatomisi

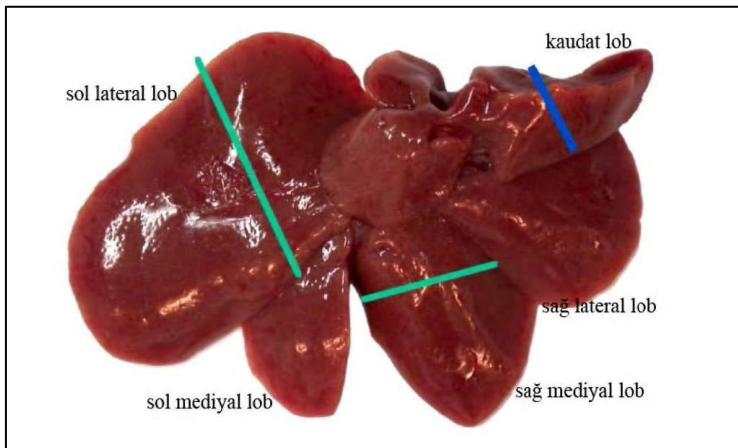
Karaciğerin kanlanmasını iki önemli damar sağlamaktadır. Bunlar a. hepatica propria ve v. porta hepatis. Karaciğere arteriyel kan a. hepatica propria tarafından getirilirken, besin maddelerinden zengin venöz kan ise v. porta hepatis tarafından getirilir. A. hepatica propria karaciğer kanlanmasının %20'sini sağlarken v. porta hepatis %80'ini sağlamaktadır. Bu iki damarın interlobuler dalları ve safra kanallarının interlobüler dalları spatium interlobulare hepatis (Kiernan aralığı) adlı karaciğer lobüllerinin köşelerinin birleştiği yerde portal triad

oluştururlar. V. porta hepatisin dalları ve a.hepatica proprianın interlobüler dalları sinüzoidlere açılır. Böylece sinüzoidlere hem arteryel kan hem de portal venöz kan gelmiş olur [24].

Karaciğerin lenf damarları iki grupta toplanır. Yüzeyel grup lenf damarları; v. cava inferior'un terminal kısmında yer alan nodi hepatici ve nodi coeliaci lenf nodülllerine drene olur. Derin grup lenf damarları ise nodi hepatici'ye drene olur [24].

Karaciğeri inerve eden parasempatik sinir lifleri truncus vagalis anterior ve truncus vagalis posteriordan, sempatik sinir lifleri ise n. splanchnicus majörden gelir [24].

Çalışmamızda kullanılan sıçan karaciğeri ise dört ayrı lobdan oluşur: sol lateral lob (lobus hepatis sinister lateralis), orta (veya median) lob, sağ lob (lobus hepatis dexter) ve kaudat lob (lobus caudatus). En büyük lob orta lobdur. Sol lateral lob hariç diğer loblar alt bölümlere ayrılır. Sol lateral lob epigastrik bölgenin sol kısmında ve sol hipokondriyak bölgede yer almaktadır. Orta lob ise hemen diyaframın altına yerleşmiştir. Derin bir fissür (ana fissür veya umbilikal fissür) bu lobu iki kısma ayırır: sol ve sağ orta lob. Sağ orta lob, sol orta lobun yaklaşık 3 katı büyüklüğündedir. Sağ lob vena kava'nın sağ tarafına yerleşiktir. Sağ lob derin yatay bir fissür ile iki kısma ayrılmaktadır: dorsal (veya superior) sağ lob ve ventral (veya inferior) sağ lob. Kaudat lob ise sol lateral lobun ventralinde ve vena kava'nın sol tarafına bulunmaktadır (Şekil 2.2) [25].



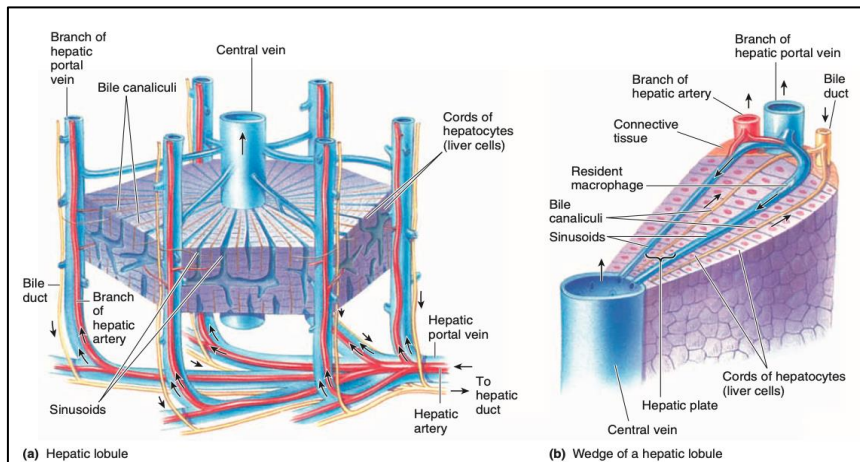
Şekil 2.2. Sıçan karaciğer anatomisi

2.1.2. Karaciğer histolojisi

Yetişkin karaciğer dokusunun yaklaşık %80'i hepatositlerden meydana gelmiş parankim yapısındadır. Geriye kalan %20'lik kısım ise, dıştan organı saran Glisson kapsülünü de meydana getiren stromadır. Glisson kapsülü, porta hepatitisten itibaren organ içine doğru dallanan ve karaciğere giren hepatik arterle portal venin damar yoluna ve safra kanallarına eşlik eden bağ dokusu şeklinde devam eder. Bu üç yapının dalları portal triadı oluşturur. Karaciğerin içindeki bağ dokusu, parankimi yapısal birimleri olan klasik karaciğer lobüler şeklinde ayırır [22].

Hepatositler karaciğer sinüzoidlerinin arasında düzensiz tabakalar şeklinde sıralanmış olan ve yaklaşık 20-30 µm çapında polihedral parankim hücreleridir. Genellikle merkezde yerleşim gösteren tek çekirdeğe sahiptirler. Çekirdekleri ökromatiktir ve bir veya daha fazla çekirdekçik içerir. Sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri, granüllü endoplazma retikulum, düz endoplazma retikulum, iyi gelişmiş golgi cisimciği, serbest ribozomlar, lizozomlar ve peroksizomlar bulundurulur. Hepatositler sıklıkla glikojen içerir. Karaciğerde bulunan glikojen miktarı diurnal bir ritme sahiptir ve kişinin beslenme durumuna bağlıdır [20,22].

İki hepatositin bitişik olduğu yerlerde hücreler arasında safra kanalikülleri bulunur. Safra kanal sisteminin ilk kısmını bu kanaliküller oluşturur. Çevrede safra kübik hücrelerden oluşmuş safra kanalcıklarına (Hering kanalları) girer. Daha sonra hepatositleri geçerek portal alandaki safra kanallarında sonlanır. Safra kanalları giderek genişleyip birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar ve en sonunda karaciğeri terk ederler (Şekil 2.3) [20].



Şekil 2.3. Karaciğer histolojisi [26]

2.1.3. Karaciğer fizyolojisi

Karaciğerin başlıca işlevleri arasında emilen maddelerin işlenmesi; safra asitlerinin sentezi ve salgılanması; bilirubin konjugasyonu ve atılımı; karbonhidratlar, proteinler ve lipidler dahil olmak üzere temel besinlerin metabolizmasına katılım; ve atık ürünlerin detoksifikasyonu ve atılımı yer almaktadır [27].

Karaciğerin işlevleri

Safra oluşumu ve salgılanması: Karbonhidratların ve proteinlerin aksine, lipidler suda çözünmedikleri için sindirim ve emilim için aracı bir maddeye ihtiyaç duyarlar. Safra, ince bağırsakta lipidlerin sindirimi ve emilimi için gereklidir [27].

Karaciğer biliyer sistemin bir parçasıdır. Karaciğerin hepatositleri, safra bileşenlerini sürekli olarak sentezler ve salgılar. Safranın bileşenleri safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, safra pigmentleri, iyonlar ve sudur [27]. Safra asitleri, kolesterol metabolizmasının son ürünleri olarak hepatositler tarafından üretilir. Kolesterol, safra asidi oluşumuyla sonuçlanan bir dizi enzim tarafından seçici olarak metabolize edilir [28]. Karaciğer, safra tuzlarını oluşturmak için safra asitlerini glisin veya taurin amino asitleriyle birleştirir [27].

Hepatositlerde yapılan safra kanaliküllere salgılanır ve oradan da safra kanallarına geçer. Safra, safra kanallarından karaciğerden dışarı akar ve depolandığı safra kesesinde biriktirilir. Safra kesesinden daha sonra su ve iyonlar geri emilerek safra tuzları konsantre edilir. Safra, koledok kanalı yoluyla duodenuma ulaşır. Bu yol Oddi sfinkteri ile kontrol edilir. Sfinkter kasıldığı zaman ortak safra kanalının safra akımına direnci yüksektir ve sonuçta safra keseye gider. Sfinkter gevşediği zaman safra ortak hepatik kanala akar ve duodenuma doğru ilerler [29].

Detoksifikasyon: Karaciğer hem toksik maddelerin kan dolaşımına girişini sınırlar hem de potansiyel olarak toksik metabolik ürünleri atılabilecek kimyasal formlara dönüştürür. Diğer tüm organlardan farklı olarak, karaciğere gelen kanın büyük bir kısmı venöz kandır ve bu da bağırsaklardan portal ven yoluyla sağlanır. Bu nedenle, karaciğer sadece emilen besinleri değil, aynı zamanda ilaçlar ve bakteriyel toksinler gibi potansiyel olarak zararlı molekülleri de alacak şekilde konumlanmıştır.

Karaciğerin, portal dolaşımdan kaynaklanan maddeleri uzaklaştırdığı ve metabolize/detoksifiye ettiği iki seviye vardır. Bunlardan ilki fizikseldir. Karaciğere gelen kan, Kupffer hücreleri olarak bilinen makrofaj hücreleri arasında süzülür. Bu hücreler fagositiktir ve normal koşullarda dahi portal dolaşıma girebilen bakterilerin temizlenmesinde önemlidir. İkinci savunma seviyesi ise biyokimyasaldır. Hepatositler, hem endojen hem de eksojen toksinleri metabolize eden ve modifiye eden geniş bir enzim dizisine sahiptir, böylece ürünler genel olarak suda daha fazla çözünür ya da bağırsak tarafından geri alıma daha az duyarlı hale getirilir [28]. Bu metabolik reaksiyonlar genel olarak iki sınıfa ayrılır: Faz I reaksiyonlar organik moleküllerin oksidasyonu için sitokrom P450 enzimlerini kullanır. Bu reaksiyonlar ilaçların büyük kısmını metabolize eder. Faz II reaksiyonlar ise maddeleri glukuronid, sülfat, amino asitler veya glutatyon ile konjuge eden fazdır. Bu yolla ürünler filtre edilmek ve böbreklerden atılmak üzere sistemik dolaşıma serbestlenir veya sonunda atılmak üzere safra ile ince bağırsağa salgılanır [28,29].

Metabolizma

Karbonhidrat metabolizması: Karaciğer karbonhidrat metabolizmasında merkezi bir rol oynar, karbonhidratların bilinen bütün metabolik yolları karaciğerde gerçekleşebilir. Diyet ile alınan diğer karbonhidratları glukozu çevirir, glukoneogenez yolu ile aminoasitler ve laktattan glukoz sentezler, glikojeni sentezleyerek depolar, ihtiyaç durumunda glikojen yıkımı veya glukoneogenez ile sentezlenen glukozu kana vererek kan glikozunu düzenlenmesini sağlar. Ayrıca glukozdan sentezlediği glukaronik asidi detoksifikasyon işlemlerinde kullanır [23].

Yağ metabolizması: Karaciğer lipid metabolizması bakımından da en aktif dokudur. Kendisinin karbonhidrat ve aminoasitlerden sentezlediği yağ asitlerini trigliseridlere çevirerek VLDL yapısına katar. Kolesterol sentezinin en aktif olduğu dokudur. Reseptör aracılı olarak plazmadan lipoproteinleri alır ve tekrar VLDL şeklinde salgılar. Yağ asitlerini keton cisimciklerine çevirerek beyin ve kalp gibi aerobik dokulara açlık durumunda alternatif enerji kaynağı temin eder [29].

Protein metabolizması: Karaciğer hücresi, kendisi için gerekli proteinlerin sentezine ek olarak, Ig'ler hariç tüm plazma proteinlerini (örneğin albümin, pıhtılaşma faktörler) de sentezler. Karaciğer yetmezliği olan kişilerde hipoalbüminemi ve pıhtılaşma bozuklukları gelişir. Karaciğer ayrıca protein katabolizmasının bir yan ürünü olan amonyağı daha sonra

idrarla atılan üreye dönüştürür [27]. Karaciğerin protein metabolizmasındaki bir diğer görevi aminoasitlerin yıkımı ve sentezidir [23].

Vitamin metabolizması: Karaciğerin vitaminleri depo etme özelliği vardır. A, D, E, K ve B12 vitaminlerinin ana deposu karaciğerdir. Karaciğerde en fazla depo edilen vitamin A vitamini A vitamini eksikliğini on ay gibi uzun bir süre önlemeye yetecek kadar A vitamini depo edilebilir. D vitamini eksikliğini üç-dört ay önleyecek kadar, B12 vitamini eksikliğini ise en az bir yıl önleyecek kadar depo edebilir [23]. Depo görevine ek olarak karaciğer D vitamini sentezinde de rol almaktadır. Karaciğere gelen kolekalsiferol (D3) burada 25-hidroksikolekalsiferole (25-OHD3; kalsifediol) dönüştürülür. 25-OHD3 daha sonra böbreklerde 1,25 OHD3'e çevrilerek aktif vitamin D oluşturulur [30].

Bilirubin metabolizması: Retiküloendotelial sistem (RES) yaşlanmış kırmızı kan hücrelerini işler. Hemoglobin RES tarafından yıkıldığında, yan ürünlerden biri biliverdindir (yeşil renkli), bu da bilirubine (sarı renkli) dönüştürülür. Bilirubin daha sonra dolaşımdaki albümine bağlanır ve hepatositler tarafından alındığı karaciğere taşınır. Hepatik mikrozomlarda bilirubin, UDP glukuronil transferaz enzimi aracılığıyla iki adet glukuronik asit ile konjuge edilir. Konjuge bilirubin suda çözünür ve bir kısmı idrarla atılır. Konjuge bilirubinin geri kalanı safraya ve daha sonra safra yoluyla ince bağırsağa salgılanır. Konjuge bilirubin, bakteriyel enzimler tarafından dekonjuge edildiği ve bazıları enterohepatik dolaşım yoluyla emilen ve karaciğere geri dönen ürobilinojene metabolize edildiği terminal ileum ve kolona doğru ilerler; geri kalanı dışkıyla atılan ürobilin ve sterkobiline dönüştürülür [27,28].

Kan depo işlevi: Karaciğer genişleyebilen bir organ olduğu için, kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolayabilir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinüslerdeki kan ile birlikte karaciğerin normal kan hacmi 450 mL, yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin %10'u kadardır [23].

Demiri ferritin şeklinde depo etmesi: Vücutta, kandaki hemoglobinde bulunan demir dışında, demirin büyük bölümü karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Karaciğer hücrelerinde, demirle birleşebilen bir protein olan apoferritin bol miktarlarda bulunur. Böylece, vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere hepatik hücrelerde depolanır. Vücut sıvılarında demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin demiri serbestleştirir. Böylece,

karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yaptığı gibi, *kan demirinin tamponu* işlevini de yürütür [23].

İmmün işlevler: Portal dolaşım ile besinler bağırsaktan karaciğere getirilir. Bağırsak içinde bulunan bir çok bakteri besinle beraber karaciğere ulaşır. Karaciğerde bulunan Kupffer hücreleri karaciğere özelleşmiş fagositik makrofajlardır. Bu hücreler gelen portal dolaşım ile gelen bakterileri yok ederler [23,29].

2.2. Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

1849 yılında Avusturyalı bir patolog olan Carl von Rokitansky, karaciğerde yağ birikimine bağlı olarak siroz oluşabileceği hipotezini ortaya koymuştur. Yağlı karaciğerde hepatit ise ilk kez 1962 yılında Heribert Thaler tarafından tanımlanmış ve 1980 yılında Jürgen Ludwig ve arkadaşları tarafından non-alkolik steatohepatit kavramı terminolojiye kazandırılmıştır. Daha kapsamlı bir tanım olan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) terimi ise 2002 yılından sonra kullanılmaya başlanmıştır. Zamanla, küresel obezite salgınına paralel olarak NAYKH'nin insidansı ve prevalansı çarpıcı biçimde artmıştır [31].



Resim 2.1. Normal ve yağlı karaciğer görüntüsü

NAYKH, aşırı alkol tüketmeyen hastalarda karaciğerde yağ birikimi olarak tanımlanır [1]. Aşırı alkol tüketimi ile kast edilen miktar erkekler için günde iki standart içkiden fazlası (140 gr etanol/hafta), kadınlar için ise günde bir standart içkiden fazlasıdır (70 gr etanol/hafta) [32]. NAYKH'ı metabolik sendromun hepatik belirtisi olarak kabul etmek de mümkündür. Bununla birlikte, metabolik sendrom bulunmadan da NAYKH görülebilmektedir [33].

NAYKH için minimum histolojik tanı kriteri hepatositlerin en az %5'inde lipit birikimi görülmesidir [32]. NAYKH, karaciğer biyopsisi veya görüntüleme yöntemleri ile tespit edilmiş karaciğerdeki aşırı yağlanmayı tanımlayan çatı bir tanıdır [34]. NAYKH basit steatozdan, hepatositer hasar ve inflamasyonun da bulunduğu steatohepatite (non-alkolik steatohepatit; NASH), fibroz ve klinik sonuçlarıyla birlikte siroza kadar geniş bir yelpazeyi kapsar [1].

NASH, hepatoselüler hasar ve nekroinflamasyonun varlığı ile karakterize, karaciğer sirozu ve yetmezliğine ilerleyebilen, NAYKH'nın bir alt kümesini temsil eder [32]. NASH'de steatozun yanı sıra hepatositlerde balon dejenerasyonu, sitoplazmalarında Mallory cisimcikleri ve değişik derecelerde fibroz bulunmaktadır [34]. NASH'li hastalarda siroz ve karaciğerle ilişkili ölüm riski belirgin şekilde artmıştır [35].

2.2.1. Epidemiyolojisi

NAYKH prevalansı yetişkinlerde %20-30'dur ve bu rakam sanayileşmiş ülkelerde daha yüksektir [1]. Obezlerde NAYKH insidansı %80-100'e kadar çıkmaktadır [3].

Younossi ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları, 22 ülkeden yaklaşık 8,5 milyon vakayı kapsayan 86 çalışmanın dahil edildiği meta-analizde NAYKH'nın küresel prevalansı %25,24 olarak rapor edilmiştir. En yüksek prevalansa sahip bölgelerin Orta Doğu ve Güney Amerika olduğu belirtilirken, en düşük prevalansa sahip bölgenin ise Afrika olduğu belirtilmiştir. Yine bu meta-analizde tip 2 diabetes mellitusun (T2DM) %22,51, hiperlipidemisinin %69,16, hipertansiyonun %39,34, metabolik sendromun %42,54 ve obezitenin %51,34 oranında NAYKH'a eşlik ettiği ortaya konulmuştur [2]. Bununla birlikte NAYKH'nın görülme sıklığı obez veya diyabetik olmayan bireylerde de yaygındır. Nitekim Kim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada obez veya diyabetik olmayan erişkinlerde NAYKH prevelansını %23,4 olarak bulmuşlardır [36].

Doğrulama için karaciğer biyopsisi gerektirmesi nedeni ile genel popülasyonda NASH prevalansını tahmin etmek zordur. Genel olarak, Batı popülasyonlarında NASH prevalansının %3 ile %10 arasında olduğu tahmin edilmektedir [37]. Amerika Birleşik Devletleri'nde popülasyonun üçte birinde NAYKH, yaklaşık %2-5'inde NASH olduğu tahmin edilmektedir [38].

Etiyolojisi bilinmeyen ve belirteç negatif (enfeksiyöz, metabolik, otoimmün veya herediter karaciğer hastalıkları için serum belirteçleri negatif olan; alkol veya hepatotoksik ilaç kullanımı öyküsü bulunmayan), kronik karaciğer fonksiyon testi yüksekliği olan hastalar incelendiğinde en olası histolojik tanı, kimi zaman fibrozun da eşlik ettiği karaciğerin yağlı metamorfozudur [39].

Pediyatrik popülasyon incelendiğinde ise Japonya’da yapılan bir çalışmada çocuklarda NAYKH prevalansının %2,6 olduğu ve 6 yaşından itibaren NAYKH görülebildiği belirtilmiştir [40]. İtalya’da yapılan bir diğer çalışmada ise obez çocuklarda bu rakamın %53’e kadar çıktığı ortaya konulmaktadır [41].

Söz konusu bu oranlar cinsiyete özgü farklılıklar da sergilemektedir; örneğin premenopozal kadınlara kıyasla erkeklerde NAYKH gelişme riski önemli ölçüde daha yüksektir [3].

2.2.2. Risk faktörleri ve etiyolojisi

NAYKH için sık karşılaşılan risk faktörlerine bakıldığında obezite ilk sırada yer alırken ve bunu T2DM, dislipidemi ve metabolik sendrom takip etmektedir. Ağır obezite nedeniyle bariatrik cerrahi geçiren hastalarla yapılan bir çalışmada, NAYKH prevalansı %90’nın üzerinde bulunmuş ve hastaların %5 kadarında daha önceden şüphe edilmemiş siroz görülmüştür [42]. T2DM hastaları üzerinde yapılan bir ultrasonografi çalışmasında ise NAYKH prevalansı bu kitle için %69,4 olarak rapor edilmiştir [43]. Başka bir çalışmada ise 204 adet T2DM hastasına ultrason yapılmış ve bunların 127’sinde yağ infiltrasyonu gözlenmiştir; NAYKH gözlenen hastaların 90’ı karaciğer biyopsisine onam vermiş ve bunların %87’sinde NAYKH histolojik olarak doğrulanmıştır [44]. NAYKH’lı hastalarda serum trigliserit seviyeleri yüksek bulunurken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyeleri genellikle düşük tespit edilmektedir. Dislipidemili bireylerde NAYKH prevalansının %50 olduğu tahmin edilmektedir [42,45].

NAYKH için yaş, cinsiyet ve etnik köken de birer risk faktörüdür. NAYKH prevalansının yaşla birlikte arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Aynı zamanda, hastalığın ilerlemiş fibroza veya ölüme ilerleme olasılığı NAYKH’ı olan yaşlı hastalarda daha yüksektir. Erkek cinsiyetin de NAYKH için bir risk faktörü olduğunu belirten birçok çalışma mevcuttur [42]. Örneğin, genel sağlık taraması yaptıran 26.527 kişinin sonuçları üzerinden yapılan bir çalışmada NAYKH prevalansı erkeklerde %30,94 iken kadınlarda %15,65 olarak tespit

edilmiştir [46]. NAYKH'ın beyazlara kıyasla hispaniklerde daha sık, siyahlarda ise daha az görüldüğü de bildirilmektedir [47,48].

NAYKH ile ilişkili diğer durumlar total parenteral nütrisyon, akut açlık, abdominal cerrahi (geniş ince bağırsak rezeksiyonu, biliopankreatik diversiyon ve jejunal bypass gibi) ve bazı ilaçların (amiodaron, tamoksifen, glukokortikoidler, sentetik östrojenler, diltiazem, aspirin, metotreksat, yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedavi) kullanımındır. NAYKH aynı zamanda hepatit C, HIV, hipobetalipoproteinemi, lipodistrofi, hipopituitarizm, hipotalamik obezite, Weber-Christian sendromu, gebeliğin akut yağlı karaciğeri, Reyes sendromu ve Mauriac sendromu ile de ilişkilidir [33]. Organik çözücülere mesleki maruziyetin NAYKH gelişmesinde rol oynayabileceğini belirten [49] ve polikistik over sendromlu kadınlarda NAYKH prevalansının artmış olabileceğini belirten [35] çalışmalar mevcuttur.

NAYKH, farklı risk faktörlerinin birikiminin bir sonucu olarak yıllar içinde gelişir. Bu risk faktörlerinin arasında değişen derecelerde genetik yatkınlıklar ve genetik olmayan faktörler bulunmaktadır. Beslenme alışkanlıkları, diyetin miktarı ve bileşimi, fiziksel hareketsizlik, kronik stres ve yaşam tarzı, hastalığın ciddiyetini belirleyen genetik olmayan başlıca faktörlerdir [38].

NAYKH'da hastalığın genetik etkenlerini araştıran çok sayıda araştırma yapılmıştır [31]. Örneğin 22. kromozomda bulunan ve adiponutrin geni olarak da bilinen patatin-benzeri fosfolipaz domain-içeren 3 (PNPLA3) geninde olan rs738409 C>G (Ile148Met) polimorfizminin NAYKH ile kuvvetli derecede ilişkili bir genetik varyasyon olduğu bilinmektedir. Rotman ve arkadaşlarının biyopsi ile doğrulanmış 1117 NAYKH hastası ile yaptıkları çalışmada, PNPLA3 rs738409 G allelinin steatoz, portal inflamasyon, lobüler inflamasyon, NAS ve fibroz ile ilişkili olduğu ve pediatrik hastalarda hastalığı erken prezentasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [50,51]. NAYKH'ın beyazlara kıyasla hispaniklerde daha sık görüldüğü ve bu durumun hispanikler arasında da değişiklik gösterdiği görülmüştür. Meksika kökenli hispaniklerde NAYKH prevalansı %33 iken, Porto Riko kökenlilerde %18 ve Dominik Cumhuriyeti kökenlilerde %16'dır. Bu farklılığın nedeni ise Meksika'da PNPLA3 polimorfizminin görece daha sık olması olabilir. Benzer şekilde Japonya ve Güney Kore gibi bazı ülkelerde de PNPLA3 rs738409 G alleli görece daha sık gözlenmektedir. Afroamerikalılarda ise bu sıklık daha azdır [31,52,53]. Bu genin ürünü olan PNPLA3 enzimi, hepatositlerdeki yağ damlacıklarının lipolizini düzenlemektedir ve söz

konusu riskli allelin varyantı, normal proteozomal yıkıma dirençli olur ve dolayısıyla yağ damlacıklarında birikir ve lipoliz etkilenir [31].

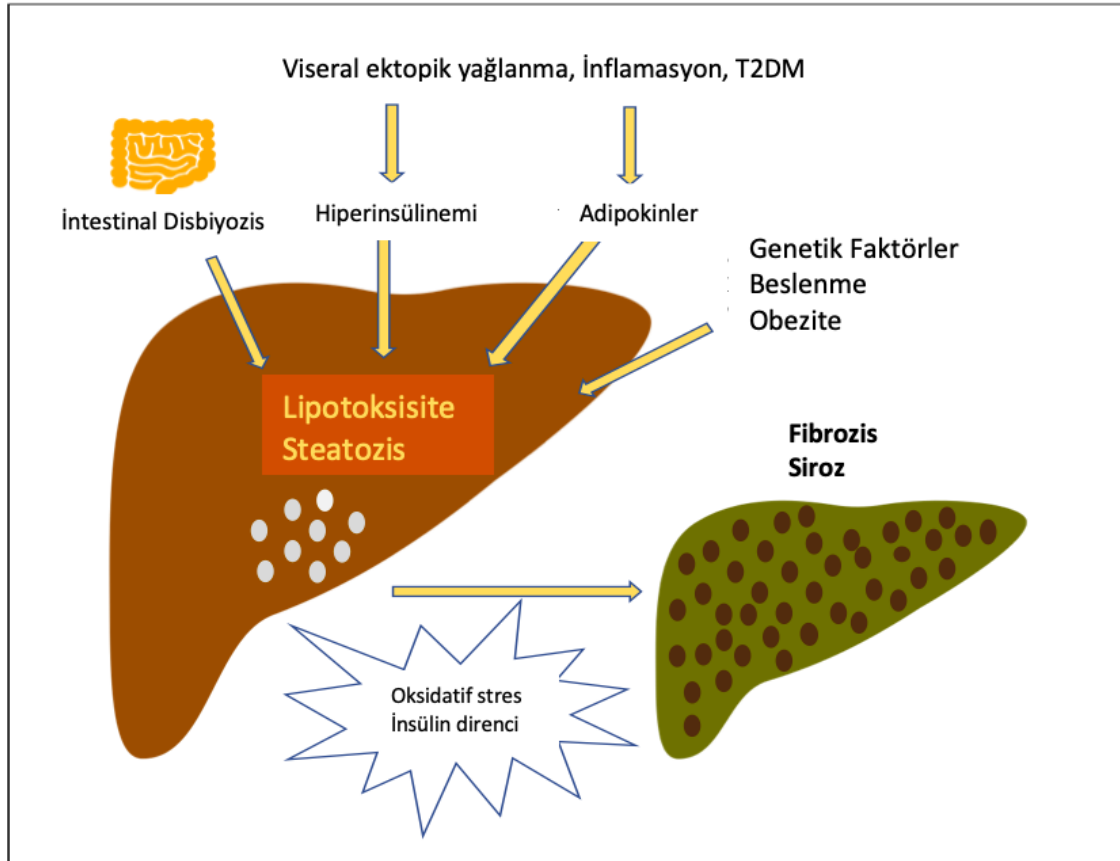
Genetik yatkınlık oluşturan durumlara başka bir örnek 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaz 13 (HSD17B13) enzimidir. 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzim ailesi esas olarak seks hormon metabolizmasında görev yapmakta iken bu ailenin bazı üyeleri kolesterol ve yağ asidi metabolizmasında da anahtar rollerde bulunmaktadır. Son yıllarda biyolojik fonksiyonu bilinmeyen HSD17B13 enziminin fare ve insanlarda karaciğere özgü lipit damlacığı ilişkili bir protein olduğu ortaya konulmuştur. HSD17B13'ün hepatik aşırı ekspresyonu, karaciğerde lipit birikimine neden olur. Nitekim NAYKH'lı fare ve insanlarda HSD17B13'ün ekspresyonunun upregüle olduğu bulunmuştur [54]. Abul-Husn ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada, HSD17B13'teki bir fonksiyon kaybı varyantının, kronik karaciğer hastalığı ve steatozdan steatohepatite ilerleme riskinin azalmasıyla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [55].

Transmembran 6 süperailisi üyesi 2 (TM6SF2) ve zara bağlı O-asiltransferaz alanı içeren protein 7 (MBOAT7) genlerindeki polimorfizmler de NAYKH için risk oluşturmaktadır [56,57]. 19. kromozomda bulunan TM6SF2'nin rs58542926 varyantı artmış hepatik trigliserit içeriği ve NAYKH ile ilişkilidir. Aynı zamanda bu varyant NAYKH hastalarında ilerlemiş hepatik fibroz ve siroz ile de ilişkilidir [58]. MBOAT7'nin rs641738 varyantı ise NAYKH için risk oluşturmalarının yanı sıra NAYKH'lı hastalarda artmış fibroz ile de ilişkilidir [57].

2.2.3. Patofizyolojisi

Karaciğer lipid metabolizması bakımından en aktif dokudur. Kendi sentezlediği veya dolaşımdan aldığı yağ asitlerini trigliseridlere çevirerek VLDL şeklinde dolaşıma salgılar. Plazma lipoprotein metabolizmasında rol alır, açlık durumunda veya insülin eksikliğinde yağ asitlerini keton cisimlerine oksitleyerek dolaşıma bırakır. Karaciğer parankim dokusunda yüksek oranda yağ bulunduran bir doku değildir. Hepatositlerde trigliserit birikmesi bir ektopik lipit birikimi şeklindedir ve bu da hepatik steatoz olarak adlandırılır [59].

İnsanlarda NAYKH'nin patogenezi oldukça karmaşıktır ve bu alanda her biri birbiriyle etkileşime girebilen birçok faktör vardır (Şekil 2.4). Dahası, bazı risk faktörleri daha az veya daha çok belirgin olabilir ve zamanla bunlar ortaya çıkabilir veya kaybolabilir. Şu an için, benzer risk faktörlerine sahip bazı hastaların bir kısmında neden yağ birikimi gelişmediği, diğerlerinde ise steatoz ve steatohepatit geliştiği tam olarak anlaşılamamıştır. NAYKH'nin patogenezi her hastaya özgün görünmektedir, ancak risk faktörleri muhtemelen aynıdır [38].



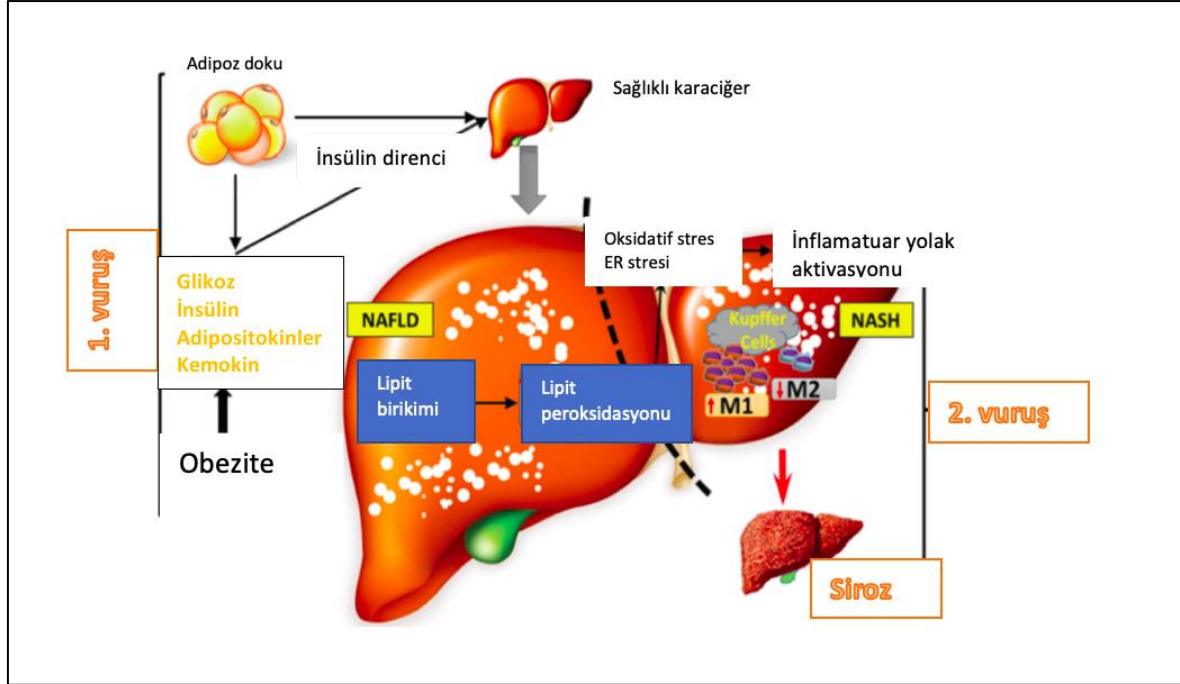
Şekil 2.4. NAYKH patofizyolojisi

NAYKH'nin patogenezi için günümüzde en çok kabul edilen model “çift vuruş hipotezi”dir [37]. Bu modelde “ilk vuruş” hepatik steatoza yol açmaktayken, “ikinci vuruş” hepatik lezyonun temelinde oksidatif stres ile nekroinflamasyondur. İnsülin direnci ve bunu takiben hiperinsülinemi, her iki vuruştan da sorumlu olabilir [32].

Çift vuruş hipotezi

NAYKH patogenezindeki çift vuruş hipotezinde bahsedilen “ilk vuruş” steatoz ve insülin direncini içermektedir. İnsülin direnci, lipolizin artmasına neden olur ve bu da yağ dokusundan serbest yağ asitlerinin salınımının artmasıyla hepatositlerde aşırı trigliserit

birikimine yol açar. Ayrıca hiperinsülinemi, mitokondriyal oksidasyon yerine trigliserit oluşumunu destekler [32]. Protein-enerji malnütrisiyonu, jejunoileal bypass ve parenteral nütrisyon gibi durumlar ise karaciğerin lipoprotein sentezini etkileyip ve lipit salınımını inhibe ederek karaciğerde trigliserit birikimine neden olur [37].



Şekil 2.5. Çift vuruş hipotezi. "İlk vuruş" hepatic steatoz, "ikinci vuruş" inflammatuar araçılar ile artan oksidan stres

Beslenme alışkanlıkları ile çevresel ve genetik faktörler, insülin direncinin gelişmesine, adiposit proliferasyonu ile obeziteye ve bağırsak mikrobiyomunda değişikliklere neden olabilir [1].

NAYKH'lı çoğu hastada insülin direnci gözlenmektedir. Hatta obez olmayan ve oral glukoz tolerans testi normal olan NAYKH'lı hastalarda dahi insülin direnci görülmüştür. İnsülin direnci, periferik lipolizin, trigliserit sentezinin ve karaciğer tarafından yağ asitlerinin alınımının artışı ile ilişkilidir ve bunların tümü hepatic yağ birikimine katkıda bulunur. Adipokinler esas olarak insülin direnci üzerindeki etkileriyle NASH gelişiminde rol oynamaktadırlar [37].

"İkinci vuruş" etmenleri ise artmış oksidatif stres ve lipit peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, sitokin/adipokin dengesinde bozukluk, serbest yağ asitleri kaynaklı lipotoksisite, hepatic kolesterol birikimi, bağırsak kaynaklı lipopolisakkaritler ve immün sistemin aktivasyonu olabilir [38].

Serbest yağ asitleri, serbest kolesterol ve diğer lipit metabolitleri lipotoksisite oluşturup mitokondriyal disfonksiyona ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile oksidatif strese, ayrıca endoplazmik retikulum stresine yol açarlar [1].

Beslenme içerikleri (yağ ve fruktoz gibi) dahil birtakım faktörler sonucu bağırsak florasında ve yapısında meydana gelen değişiklikler, bağırsakta daha fazla yağ asidi üretimine, ince bağırsak geçirgenliğinin artışı ve dolayısıyla artmış yağ asidi ve bakteri kaynaklı lipopolisakkaritlerin (LPS) emilimine yol açar. Kan LPS seviyelerinde diyetle bağlı artış, metabolik endotoksemi olarak da bilinir. Yağ asitleri ve dolaşımdaki bu moleküllerdeki artış, inflamatuvar yolların aktivasyonuna ve IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına katkıda bulunurlar [1,60]. Oluşan bu düşük dereceli inflamasyonda Toll benzeri reseptörlerin (TLR) de rolü bulunmaktadır. Örneğin bir LPS reseptörü olan TLR4'ün inaktivasyonunun ve bağırsak mikrobiyotasını düzenlemek amacı ile verilen prebiyotikler ile probiyotiklerin kemirgenlerde fruktoz kaynaklı hepatik steatozu düzelttiği ortaya konulmuştur. Bunlara ek olarak, bağırsak bakterileri, NAYKH'da durumun basit steatozdan NASH'e ilerleyişini de kolaylaştırabilir [60]. Örneğin farelerde yapılan bir çalışmada özel bir diyet ile bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu sağlanmış ve bunun sonucu oluşan bakteriyel ürünler TLR4 ve TLR9 uyarımı sağlayarak, NASH'e ilerleyişi sağlayan TNF- α 'nın salınımını arttırmıştır [60,61].

2.2.4. Histopatolojisi

Karaciğer biyopsilerinden alınan histolojik örneklerin incelenmesi steatoz, nekroinflamatuvar değişiklikler ve fibrozun derecesini doğru bir şekilde değerlendirmek için altın standart yöntemdir ve bu şekilde NAYKH derecelendirilebilir [38].

NAYKH'ın histolojik incelenmesinde kabul edilen iki skorum sistemi vardır; Non-alkolik Steatohepatit Klinik Araştırma Ağı (Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network; NASH CRN) tarafından ortaya konulan NAYKH Aktivite Skoru (NAS) ve Avrupa Yağlı Karaciğer İlerleme Engelleme Konsorsiyumu (Fatty Liver Inhibition of Progression; FLIP Consortium) tarafından ortaya konulan Steatoz Aktivite Fibroz (SAF). Her ikisi de steatoz, lobüler inflamasyon ve hepatoselüler balonlaşmayı inceler. SAF ayrıca fibroz evresini de inceler [31].

Karaciğerdeki yağlanma çoğu zaman makrovezikülerdir ancak bazen medioveziküler yağlanma da görülebilir. Makroveziküler yağlanmada neredeyse tüm hepatositi dolduran ve çekirdeği kenara iten büyük bir lipit vakuolü bulunmaktayken medioveziküler yağlanmada sitoplazmada bir veya daha fazla sayıda daha küçük lipit vakuolü bulunur. Sitoplazmada çok sayıda küçük lipit vakuolünün bulunduğu ve hücrenin köpüksü bir görünüm aldığı mikroveziküler yağlanma ise oldukça nadirdir. Yağlanma sıklıkla perisantral bölgede (zon 3) görülürken bazen tüm asinüste eşit dağılmış olarak da görülebilir. Hastalık siroza ilerledikçe yağlanmanın dağılımı düzensizleşebilir ve yağlanma azalabilir. Hatta son evre sirozda yağlanma kısmen veya tamamen kaybolabilir [62].

NAS skorlamasında steatoz, hepatoselüler balonlaşma ve lobüler inflamasyon evrelerinin toplamı ile toplamda 0 ile 8 arasında bir puan elde edilir. Steatozun evresi 0'dan 3'e kadar değişmektedir (S0-S3).

- Normal karaciğerde (S0) hepatositlerin %5'inden daha azında yağlanma
- Evre 1 steatozda (S1) %5 ile %33 hepatositte yağlanma
- Evre 2 steatozda (S2) %34 ile %66 hepatositte yağlanma
- Evre 3 steatozda (S3) ise hepatositlerin %66'sından fazlasında yağlanma bulunur.

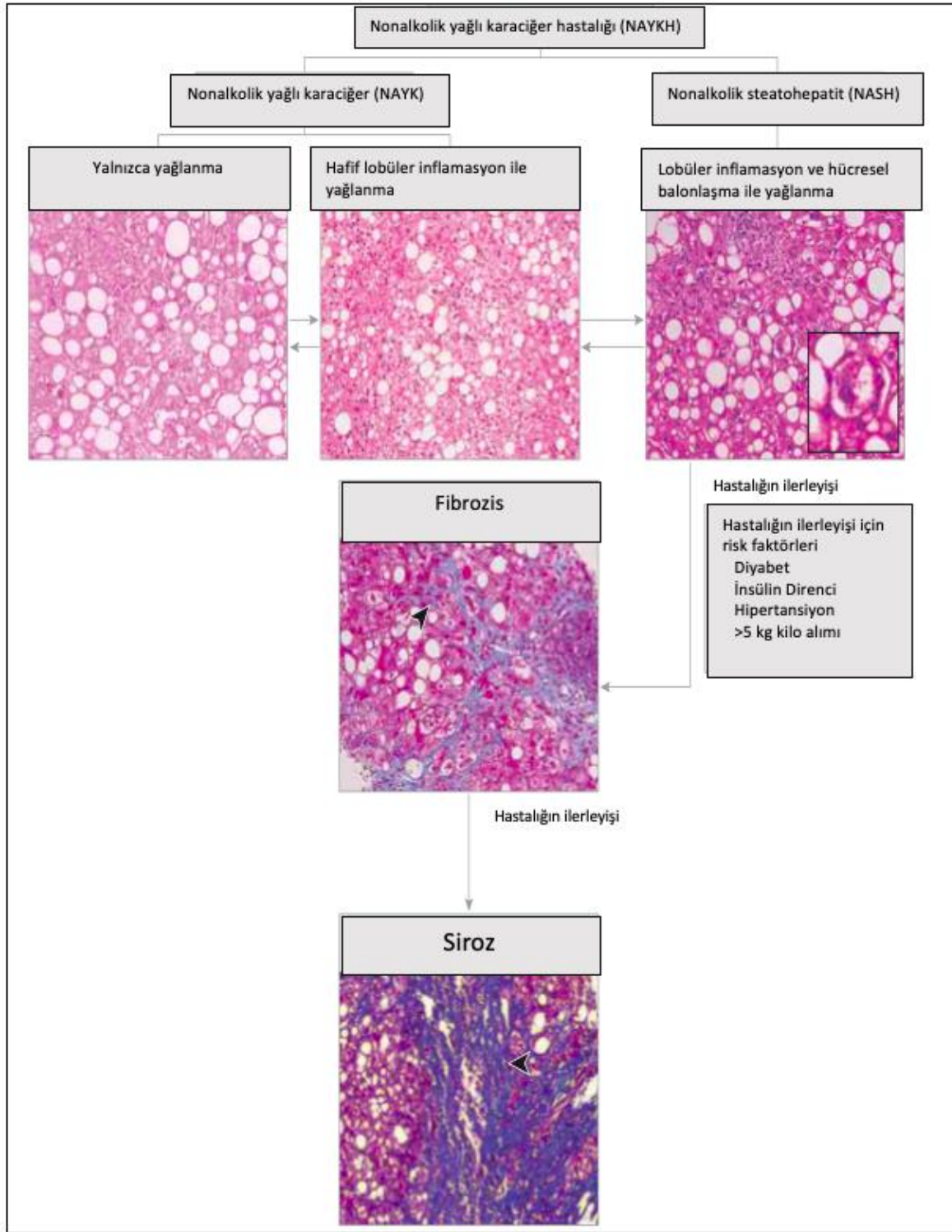
Hepatoselüler balonlaşma 0 ile 2 arasında, lobüler inflamasyon ise 0 ile 3 arasında evrelendirilir. Bu skrolama sisteminde fibrozun derecesi göz önünde bulundurulmaz. NAS'ı 5 veya daha fazla olan vakalarda çoğu zaman tanı NASH iken skoru 3'ten az olanlar NASH olarak değerlendirilmez [63].

SAF (Steatoz, Aktivite, Fibroz) skorlamasında da steatozun evresi 0'dan 3'e kadar değişmektedir (S0-S3). Steatozun evrelendirilmesi NAS'ta olduğu gibidir (<%5, %5-%33, %34-%66, >%66). Yine bu skrolama sisteminde hepatoselüler balonlaşma ve lobüler inflamasyon da ayrı ayrı 0 ile 2 arasında evrelendirilir ve aktivite skoru bu iki değerin toplanması ile belirtilir (A0-A4). Fibroz derecesine göre de 4 evre bulunmaktadır (F0-F4) ve F4 sirozu temsil eder [62,64].

SAF skrolama sisteminde S1-3 olan hastalarda evre 1 balonlaşması ve evre 1 veya 2 lobüler inflamasyonu olanlar ile evre 2 balonlaşması ve evre 1 veya 2 lobüler inflamasyonu olanlar NASH olarak, diğerleri basit steatoz olarak değerlendirilir. Ek olarak, NASH tanısından

bağımsız olarak hastalığın histolojik ciddiyeti aktivite ve fibroz skorlarına göre tanımlanmıştır; hafif hastalık ($A < 2$ ve $F < 2$) veya ciddi hastalık ($A > 2$ ve/veya $F > 2$) [64].

Karaciğer biyopsisi invaziv bir işlemdir ve işleme bağlı kanama ve hatta ölüm dahil bir takım komplikasyon risklerini barındırmaktadır. İşlemin maliyetli olması da dezavantajdır. Bir diğer dezavantaj ise örnekleme hatasıdır. Örneğin, Ratziu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, karaciğer biyopsisi preparatında köprüleşme fibrozu olan hastaların %35'inde diğer preparatta ya hafif düzeyde fibroz olabileceği ya da hiç fibroz olmayabileceği rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak, NASH tanısı konusunda patologlar arasında tam bir birlik de yoktur [31,65].



Şekil 2.6. Non-alkolik yağlı karaciğerin histolojik görüntüsü [66]

2.2.5. Prognozu

Basit steatozlu hastaların yaklaşık %12-24'ünde 8-13 yıl sonra NASH geliştiği tahmin edilmektedir. Başlangıçtaki fibrozun derecesine bağlı olarak, NASH hastalarının da %15-25'inde benzer bir süre içinde siroz gelişmektedir [5].

Basit steatozu olan hastalar genel popülasyonla benzer yaşam beklentisine sahipken, NASH hastalarının hayatta kalma süresi, esas olarak kardiyovasküler ve karaciğerle ilgili nedenlerden ötürü bozulmuştur [1].

Klinik olarak NAYKH'lı hastalar obez olma eğilimindedirler ve bunlar arasında insülin direnci ve/veya T2DM, dislipidemi, hipertrigliseridemi ve hipertansiyon sıktır. Tüm bu durumlar kardiyovasküler hastalıklar için birer risk faktörüdür. Bu faktörlerden dolayı kardiyak olaylara bağlı ölümler NAYKH hastaları için önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Hatta NAYKH'lı hastalarda kardiyovasküler mortalitenin insidansı karaciğer ilişkili mortaliteden yüksektir [2].

2.2.6. Klinik ve laboratuvar bulguları

NAYKH'lı hastaların çoğu asemptomatiktir ve semptomlar ortaya çıktığında genellikle spesifik değildir. Sık görülen şikayetler yorgunluk ve karın sağ üst kadranda belirsiz rahatsızlık hissidir [59]. Sıklıkla palpe edilebilen büyümüş bir karaciğer olmasına rağmen, fizik muayene dikkat çekici olmayabilir [32]. Hepatomegalinin, hastaların %75'ine varan bir kısmında mevcut olduğu söylenir, ancak belirgin abdominal obezitesi olan hastalarda fiziksel muayenede tespit edilmesi zor olabilir [34]. Santripetal obezite, hipertansiyon ve akantozis nigricans gibi insülin direnci ve metabolik sendromun bulguları bulunabilir [32,34]. Siroz gelişmesi halinde palmar eritem, spider anjiyom, jinekomasti veya belirgin üst abdominal venler fizik muayenede saptanabilir. Dekompanse sirozu olan hastalarda ise bu bulgular daha belirgin hale gelir ve sarılık, asit, tırnak değişiklikleri, splenomegali veya asterixis gibi ek bulgular mevcut olabilir [66].

NAYKH'nın laboratuvar bulguları da genellikle non-spesifiktir [34]. Ancak Mandal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ALT değerinin NAYKH için daha belirleyici olduğu bildirilmiştir [67]. NAYKH hastalarında gamma glutamil transferaz (GGT) değerinde artış ise ilerlemiş fibroz ve genel mortalitede artış ile ilişkilidir [68,69]. GGT aynı zamanda

NAYKH'da hepatik steatozu ve fibrozu saptamak için kullanılan yağlı karaciğer endeksi ve FibroTest panellerinin de bir bileşenidir [68]. Karaciğer fonksiyon testleri yararlı olmakla birlikte, duyarlılık ve özgüllükleri zayıftır. Morbid obez hastalarda, NAYKH'nın tüm spektrumlarında (ilerlemiş NASH ve hepatik siroz dahil) aminotransferaz düzeyleri normal olabilir [32].

ALT ve AST seviyelerinin ölçülmesinin NAYKH tanısına katkıda bulunmasının önemli bir yolu, ALT/AST oranını hesaplamaktır. ALT değerinden daha yüksek bir AST değeri, alkolik karaciğer hastalığını veya herhangi bir nedenden kaynaklanan sirozu düşündürtürken, AST değerinden daha yüksek bir ALT değeri, NAYKH varlığını düşündürtür [34].

Son yıllarda NAYKH/NASH tanısı ve basit steatoz ile NASH arasında ayırım yapabilmek için bir takım biyobelirteçler önerilmiştir. Bu belirteçlerin başında serum sitokeratin-18 (CK-18) fragmanı gelir; bu belirteç NASH'in karakteristik bir özelliği olan hepatoselüler apoptozun derecesini yansıtır. Bir diğer belirteç fibroblast büyüme faktörü 21 (fibroblast growth factor 21; FGF21)'dir. İnsan karaciğerindeki FGF21 mRNA ekspresyonu steatoz derecesi ile artar ve serum seviyesi NAYKH hastalarında anlamlı ölçüde daha yüksektir. Üçüncü bir belirteç olan adiposit yağ asidi bağlayıcı protein (adipocyte fatty acid binding protein; AFABP) ise adipositler ile makrofajlar arasındaki etkileşimde rol oynar ve bu etkileşim sonucunda inflamasyon ve insülin direnci ortaya çıkar. CK-18 ve FGF21'e kıyasla AFABP'nin tanısal doğruluk oranı daha düşüktür. Bu üç biyobelirteç, NAYKH ve NASH patogenezinin farklı yönlerini yansıttığından, daha iyi bir teşhis doğruluğu elde etmek için bunları birlikte kullanmak anlamlı olabilir [70].

2.2.7. Görüntüleme yöntemleri

Ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemleri karaciğerdeki yağlanmanın saptanmasında kullanılabilir [59].

Abdominal USG, en sık kullanılan ve daha az maliyetli bir görüntüleme yöntemidir ve orta ila şiddetli steatozu teşhis etmek için kullanılabilir [59]. Steatozun %33'ten fazla olduğu vakalarda duyarlılığı %93'dür. Ancak steatozun %30'dan az olduğu vakalarda duyarlılığı zayıftır [66]. Örneğin Dasarathy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada steatozun %20'den az olduğu vakalarda USG'nin duyarlılığı %43, özgünlüğü %73 olarak bulunmuştur [71]. USG'nin tanısal kapasitesi steatozun derecesi arttıkça artar ancak hepatik yağ miktarının

kesin ölçümü ve basit steatoz ile steatohepatit arasında ayırım yapmak bu yöntem ile mümkün değildir [59].

BT görüntüleme, hastalardaki steatozu USG'ye kıyasla daha iyi bir şekilde tespit edebilir. Yağla infiltrate olmuş hepatositlerin miktarının ölçülmesi için, karaciğer ve dalak arasındaki gri skala farkı Hounsfield ünitesi cinsinden ölçülebilir. Bu ölçüm, yağla infiltrate hepatosit yüzdesi ile iyi korelasyon gösterir. Steatoz için kontrastlı BT'nin kontrastsıza kıyasla duyarlılığı ve özgüllüğü daha düşüktür [59].

Yağlı karaciğerin değerlendirilmesinde kullanılabilen bir diğer yöntem MRG'dir ve çoğunlukla kullanılan teknik aynı-faz (in-phase) ve karşı-faz (opposed-phase) kimyasal shift MRG'dir. Her ne kadar anatomik görüntüler oluşturan bir yöntem olmasa da, proton MR spektroskopisi, yağlı karaciğerin değerlendirilmesi için en kesin non-invaziv yöntemdir [72].

2.2.8. Tedavisi

Non-farmakolojik tedaviler

Günümüzde yaşam tarzı değişikliği, NAYKH/NASH'i olan hastalar için kabul edilen ilk basamak tedavidir. Yaşam tarzı değişikliği ile kast edilen çoğu zaman kalıcı kilo kaybının sağlanması ve egzersiz miktarının artırılmasıdır [73].

Son yıllarda, NAYKH'ın kontrolü için ideal olduğu düşünülen birkaç diyet modeli önerilmiştir. Bu öneriler arasında en çok vurgulanan diyet Akdeniz diyetidir. Akdeniz diyeti, ilk olarak 1960'ların başlarında Amerikalı bir fizyolog olan Ancel Keys tarafından tarif edilmiştir. Bu diyet genel olarak kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini azaltmada etkili olan, sağlıklı bir diyet olarak kabul edilmektedir. Akdeniz diyetinin NAYKH'lı hastalarda faydalı etkileri birçok araştırma ile ortaya konulmuştur [73–75]. Hatta Akdeniz diyeti tüketen hastalarda kilo kaybından bağımsız olarak hepatik steatozun azaldığı ve insülin duyarlılığının arttığı belirtilmiştir [74].

Promrat ve arkadaşlarının yaptıkları randomize kontrollü çalışmada yaşam tarzı değişikliği (diyet, egzersiz ve davranışsal değişiklikler) uygulanan NASH'li hastalarda 48 haftada vücut ağırlıklarının ortalama %9,3 azaldığı, NAS'larında iyileşme olduğu ve kilo kaybı yüzdesi ile NAS'taki iyileşmenin anlamlı ölçüde korele olduğu ortaya konulmuştur [76]. Vilar-Gomez ve arkadaşlarının histolojik olarak doğrulanmış NASH'li hastalarda yaptıkları prospektif

çalışmada özellikle vücut ağırlıklarının %10 veya daha fazlasını kaybetmeyi başaran hastalarda başta fibroziste azalma olmak üzere kayda değer histolojik düzeltilmeler gözlemlendiği rapor edilmiştir [77].

Kilo kaybının hızı da tedavide önem taşımaktadır; Luyckx ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gastroplastisi uygulanan obez hastalarda meydana gelen hızlı kilo kaybının hepatik steatozu azalttığı ancak inflamatuvar lobüler hepatit insidansını arttırdığı bildirilmiştir [78].

Fiziksel aktivitede artış, NAYKH hastalarına büyük ölçüde fayda sağlamak için bağımsız bir potansiyele sahiptir. Egzersizin, hepatik lipogenezi azaltarak ve karaciğerden yağ mobilizasyonunu artırarak intrahepatik lipit içeriğini azaltmaya yönelik etkili bir yöntem olduğu belirtilmektedir [73,79]. NAYKH'lı yetişkinlerde tek başına egzersiz, hepatik steatozu azaltabilir, ancak karaciğerdeki diğer histolojik değişiklikleri iyileştirme yeteneği bilinmemektedir [42]. Slentz ve arkadaşları aerobik egzersizin, direnç egzersizine göre hepatik steatozda daha fazla azalma sağladığını rapor etmişlerdir [80].

NAYKH'ı olan hastalar için izin verilen alkol miktarı için geniş çapta kabul gören bir öneri bulunmamaktadır, ancak çoğu klinisyen, alkolün tamamen kesilmesi ile haftada en fazla bir içkiye (10-20 gr etanol/hafta) kadar değişen bir tüketim önermektedir [34].

Farmakolojik tedaviler

Yaşam tarzı değişikliği başarılı olmadığında veya yetersiz kaldığında, insülin direnci, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi sorumlu mekanizmaları hedefleyebilecek farmakolojik tedaviler kullanılabilir.

Belirtildiği gibi oksidatif stres, NAYKH'ın patofizyolojisindeki anahtar bileşenlerdir ve bu oksidatif strese karşı savaşan antioksidanlar NAYKH'ın tedavisinde kullanılabilirler.

E vitamini, yağda çözülebilen bir antioksidandır ve özellikle lipit peroksidasyonu kaynaklı oksidatif stresten koruyucudur [81,82]. E vitamini, serbest radikalleri inaktive etmesi, lipit peroksidasyonunu azaltması ve böylece hepatik inflamasyonu baskılaması amacıyla NAYKH'lı hastalarda kullanılabilmektedir [73]. PIVENS (Pioglitazone vs Vitamin E vs Placebo for Treatment of Non-Diabetic Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis) çalışmasında biyopsi ile kanıtlanmış NASH'i olan non-diyabetik hastalarda pioglitazon ve E vitamininin karaciğer histolojisi üzerindeki etkileri plasebo ile karşılaştırılmıştır.

Gerçekleştirilen bu çok merkezli, randomize kontrollü ve çift-kör çalışma sonucunda E vitaminin serum ALT ve AST değerlerinde azalmayı sağladığı, hepatik steatozu azalttığı, lobüler inflamasyonu azalttığı ve histolojik iyileşme sağladığı ortaya konulmuştur [83]. Bu çalışmaya benzer şekilde, başka bir çok merkezli, randomize kontrollü ve çift-kör çalışma olan TONIC (Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children) çalışmasında NAYKH'lı çocuklarda ve adölesanlarda E vitamininin ve metforminin etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda ise, plasebo ile karşılaştırıldığında, E vitamini alan grupta hepatoselüler balonlaşmada ve NAS'ta iyileşme olduğu, NASH tablosunda gerileme olduğu ortaya konulmuştur [84]. Bu bilgiler ışığında güncel kılavuzlar, biyopsi ile NASH'li olduğu doğrulanmış non-diyabetik hastalara 800 IU/gün E vitamini kullanılmasını önermektedir [42,73]. Ancak, Klein ve arkadaşlarının yaptıkları randomize kontrollü çalışmada günlük 400 IU E vitamini alan erkeklerde prostat kanseri riskinin arttığı da göz önünde bulundurulması gerekmektedir [42,85].

E vitamini dışında, NAYKH/NASH tedavisinde şu an için başka hiçbir farmakolojik müdahale yaygın olarak önerilmemiştir. Her ne kadar başka tedavi rejimlerini tavsiye eden çalışmalar bulunsun ve devam eden klinik çalışmalar olsa da, bu rejimlerin henüz onaylanmadığını ve tavsiyelerin şu an için güçlü kanıtlara dayanmadığını belirtmek gerekir [73].

E vitamininin NASH'te yarattığı bu olumlu etkiye benzer özellik gösterecek başka ajanların bulunması için arayışlar devam etmektedir. Cunningham ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ratlarda NASH oluşturulmuş ve antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip bir polifenol olan kurkumin verilmiştir. Çalışma sonucunda kurkumin tedavisinin hepatoselüler inflamasyonu, steatozu, NAS'ı, AST ve alkalen fosfatazı azalttığı ortaya konulmuştur. Bu açıdan kurkuminin gelecek vaat etmesi olasıdır [3].

Orlistat bir enterik lipaz inhibitörü olup bağırsaktan yağ emiliminin inhibisyonunu sağlar ve aynı zamanda obezitenin de tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Orlistatin bu etkilerinden dolayı NAYKH'ın tedavisinde etkili olup olmayacağı açısından incelenmiştir. Zelber-Sagi ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri randomize kontrollü çalışmada yaşam tarzı değişikliğine ek olarak orlistat veya plasebo verilen NAYKH hastaları karşılaştırılmış; orlistat alan hastalarda kilo kaybına ek olarak plaseboya kıyasla serum ALT değerlerinde ve USG'de steatozda anlamlı azalma saptanmıştır. Ancak çalışmaya katılan hastaların önemli bir çoğunluğuna takiplerinde ikinci bir karaciğer biyopsisine onam vermemiş olmaları

nedeni ile karaciğer histolojisi üzerindeki etkisi değerlendirilememiştir [86]. Diğer taraftan, Harrison ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri başka bir randomize kontrollü çalışmada kalori kısıtlamasına ve E vitaminine ek olarak orlistat verilen ve verilmeyen NASH'li hastalar karşılaştırılmış; orlistat alan grup ile almayan grup arasında kilo kaybında, karaciğer enzim değerlerinde veya karaciğer histolojisinde anlamlı bir fark gözlenememiştir [87]. Görüldüğü üzere orlistat kullanımı hakkında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır.

İnsülin direnci NAYKH'ın patogenezinde anahtar rol oynayan etkenlerden biridir, bu sebeple insülin duyarlaştırıcı ilaçlardan metformin NASH'li hastalarda denenmiş ve aminotransferazlar ve karaciğer histolojisi üzerindeki etkisini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Shields ve arkadaşlarının ve Omer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda metforminin aminotransferazlar ve karaciğer histolojisi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir [88,89]. Bu bilgiler ışığında, kılavuzlar tarafından NASH'li yetişkinlerde karaciğer hastalığı için spesifik bir tedavi olarak metformin önerilmemektedir [42].

Araştırmalara konu olan bir diğer insülin duyarlaştırıcı ilaç grubu da thiazolidinedionlardır. Thiazolidinedionlar, ki günümüzde en çok kullanılanlarının başında pioglitazon gelir, peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PPAR- γ) aktivatörleridir ve günümüzdeki başlıca endikasyonu T2DM'dir [90]. Belfort ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri randomize kontrollü çalışmada bozulmuş glukoz toleransı veya T2DM'si olan NASH'li hastalarda diyetle ek olarak verilen 45 mg/gün pioglitazon ile plasebo karşılaştırılmış; pioglitazon alan grupta aminotransferazlarda düzelme, hepatik insülin duyarlılığında artış, hepatik steatozda azalma, balonlaşma nekrozunda ve inflamasyonda azalma gözlenmiştir [91]. Benzer şekilde Aithal ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri randomize kontrollü çalışmada da non-diyabetik NASH'li hastalarda yaşam tarzı değişikliğine ek olarak verilen 30 mg/gün pioglitazon ile plasebo karşılaştırılmış; pioglitazon alan grupta histolojik olarak hepatoselüler hasarın ve fibrozun azaldığı ortaya konulmuştur [92]. Ayrıca daha önce de bahsettiğimiz PIVENS çalışmasında da 30 mg/gün pioglitazon alan NASH'li hastalarda E vitaminine benzer şekilde serum ALT ve AST değerlerinde azalma, hepatik steatozda ve lobüler inflamasyonda azalma gözlenmiştir [83]. Bu bilgiler ışığında Amerikan Gastroenteroloji Derneği'nin NAYKH tanı ve tedavi kılavuzunda, biyopsi ile NASH'i olduğu doğrulanmış hastalara pioglitazon

verilebileceği belirtilmiş, ancak pioglitazonun NASH hastalarında uzun vadeli güvenlik ve etkinliğinin belirlenmediği hatırlatılmıştır [42].

T2DM tedavisinde kullanılan, inkretin bazlı bir tedavi olan glukagon benzeri peptid-1 (Glucagon-like peptide-1; GLP-1) reseptör agonistlerinin NASH'li hayvan modellerinde karaciğer enzimlerini azalttığı ve karaciğer histolojisini düzelttiği gösterilmiştir. 2016 yılında yayınlanan Lira-NAFLD çalışmasında kontrolsüz T2DM hastalarına bir GLP-1 analogu olan liraglutid verilmiş; liraglutid tedavisi sonucu hepatik yağ içeriğinin azaldığı ortaya konulmuştur. Yine 2016 yılında yayınlanan, çok merkezli ve randomize kontrollü bir çalışma olan LEAN çalışmasında liraglutidin NASH'li hastalarda histolojik iyileşme sağladığı rapor edilmiştir [93,94].

NAYKH/NASH hastaları, kardiyovasküler hastalıklar açısından yüksek risk altındadırlar ve kardiyovasküler hastalıklar bu hasta grubunda en yaygın ölüm nedeni olarak belirlenmiştir. NAYKH ile yakın ilişkili olan dislipidemi de kardiyovasküler risk oluşturan önemli durumlardan biridir. Statinler, dislipideminin tedavisinde kullanılan önemli ajanlardan biridir ancak güvenilirlik endişeleri nedeni ile bazı klinisyenler bu ajanların NAYKH da dahil olmak üzere kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda kullanımları konusunda çekingen davranmaktadır. Yapılan çalışmalar statinlerin karaciğer hastalığı olan hastalarda güvenli olduğunu ve NAYKH dahil kronik karaciğer hastalığı olan hastaların, olmayanlara kıyasla statin kaynaklı ciddi karaciğer hasarı için daha yüksek risk altında olduklarına dair bir kanıt olmadığını ortaya koymuştur. Literatür statinlerin karaciğer fonksiyon testlerini ve histolojisini düzeltebileceğini öne süren küçük çapta çalışmalar mevcut olsa da statinlerin NASH'in tedavisinde kullanılabilirliğini araştıran, histolojik sonlanım noktalı randomize kontrollü çalışmalar bulunmamaktadır. Bu veriler ışığında statinler, NAYKH/NASH hastalarında dislipidemiye tedavi etmek için kullanılabilir. Ancak histolojik sonlanım noktasına sahip randomize kontrollü çalışmalar etkinliklerini kanıtlayana kadar, statinlerin NASH'i tedavi etmek için kullanımı önerilmemektedir [42].

Doğal safra asitlerinden biri olan ve hepatoprotektif etkileri olduğu bilinen ursodeoksikolik asitin (UDKA) de NASH tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüş olsa da Lindor ve arkadaşlarının yaptıkları randomize kontrollü çalışmada UDKA'nın NASH'li hastalarda hepatik steatoz veya karaciğer histolojisi üzerine plaseboya kıyaslı anlamlı bir etkisi olmadığı ortaya konulmuştur [95].

Yokohama ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, bir anjiyotensin II reseptör antagonisti olan losartanın NASH'li hastalarda hepatik yıldız hücrelerini inaktive ederek hepatik fibrozu azaltabileceğinden bahsedilmiştir [96].

Pentoksifilin, NASH'in patogeneğinde rol oynadığı varsayılan $\text{TNF-}\alpha$ 'nın güçlü bir inhibitörüdür. Pentoksifilin ile yapılan kısıtlı ve küçük çaplı çalışmalarda, NASH'de pentoksifilin tedavisinin serum transaminaz değerlerinde ve inflamasyon belirteçlerinde azalma sağladığı belirtilmiştir. Pentoksifilin çalışmaları yan etkileri (başlıca bulantı ve kusma) nedeniyle sınırlı kalmıştır [37].

Her ne kadar yukarıda bahsedilen farmakolojik tedaviler ve diğer denenmekte olan tedaviler günümüzde farklı kliniklerde kullanılıyor olsa da aslında E vitamini dahil olmak üzere tedavide etkinlikleri düşüktür [66]. Bununla birlikte söz konusu araştırmaların daha sık olarak NASH'li hastalarda yapıldığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla NAYKH tedavisine yönelik arayışlar günümüzde hala devam etmektedir.

2.3. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemleri

2.3.1. Serbest radikaller

Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron (ikinci bir elektronla eşleşmemiş) içeren maddeler, radikal olarak adlandırılır. Radikaller bu nedenle son derece reaktif olup, diğer kimyasal türlerden elektron almak veya kovalent olarak bağlanmak üzere reaksiyona girerler [97–99].

Serbest radikaller 3 genel mekanizma ile oluşurlar [100]:

1. Normal bir molekülden kovalent bağın homolitik bölünmesi
2. Normal bir molekülden tek elektron kaybı
3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi

Uygun koşullarda her kimyasal maddenin radikal formu oluşabilir. Biyolojik sistemler söz konusu olduğunda, radikal denince akla sıklıkla oksijen radikalleri gelir. Bunun haklı gerekçesi, canlılarda aerobik ortamda çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla

oksijen radikallerinin bolca üretilmesidir. Ayrıca herhangi bir yolla diğer elementlerin (karbon, nitrojen, kükürt) üzerinde radikal formlar oluştuğunda, aerobik ortamda bu radikaller hızla oksijen ile tepkimeye girerler ve radikal özellik (paylaşılmamış elektron) oksijene aktarılır [101].

Serbest radikaller, farklı biyokimyasal süreçler için gereklidir ve aerobik canlıların ve metabolizmanın önemli bir parçasını temsil eder [100]. Diğer taraftan eşleşmemiş elektron lipid, DNA nükleotid ve koenzimler gibi bir çok biyolojik molekülle tepkimeye girerek hasar da oluşturabilir [98,99].

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) terimleri sırasıyla oksijen ve nitrojenin reaktif radikal ve radikal olmayan türevlerini ifade eder [97].

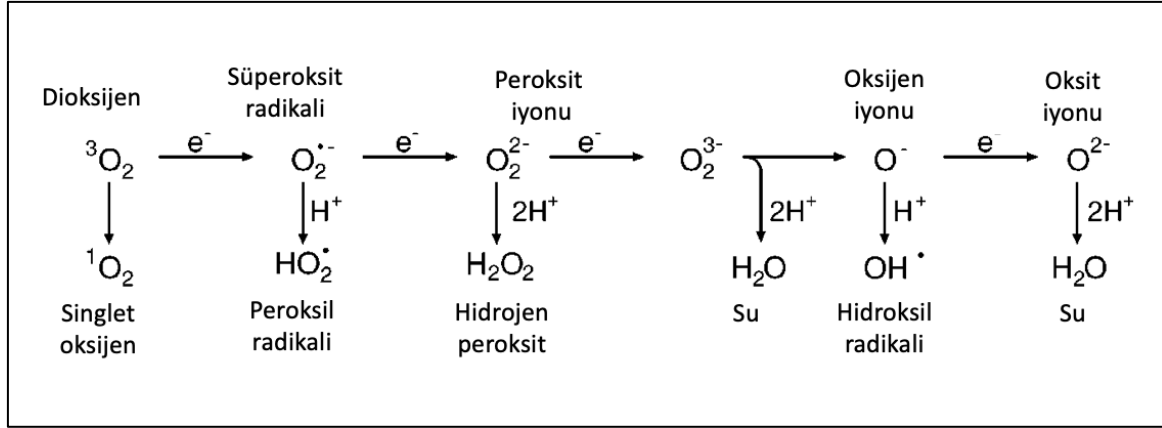
2.3.2. Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen türleri, oksijenden türetilen bir dizi kimyasal olarak reaktif molekülü içermektedir [102] (Şekil 2.7). Aerobik organizmalarda verimli enerji üretimi için oksijen gereklidir ancak hücresel enerji metabolizmasının ve oksijen tüketiminin aşırı artması, hücrelerde ROT üretimine neden olmaktadır [103].

İnsan vücudunda bulunan başlıca oksijen radikalleri ve oluşum mekanizmaları Çizelge 2.1’de verilmiştir [101].

Çizelge 2.1. Vücutta en çok oluşturulan oksijen radikalleri ve oluşum mekanizmaları [101]

<i>Radikal Tür</i>	<i>Başlıca Oluşma Mekanizması</i>
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Oksijenin tek elektronla indirgenmesi
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	H_2O_2 ’ye tek elektron transferi
Hidroperoksil radikali ($HOO^{\cdot}$)	Süperoksitin proton bağlaması
Singlet oksijen ($^1O_2$)	Oksijene enerji transferi, dismutasyon tepkimeleri
Karbon merkezli radikal ($R^{\cdot}$)	Hidroksil radikali ile hidrojen çıkarılması
Organik hidroperoksit ($ROOH$)	Peroksil radikalının indirgenmesi
Peroksi radikali ($ROO^{\cdot}$)	Karbon merkezli radikalın oksijenle tepkimesi
Alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$)	Hidroperoksitlere tek elektron transferi
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Radikal değil, hidroksil radikali öncülü
Ozon (O_3)	Radikal değil, hidroksil radikali öncülü



Şekil 2.7. Reaktif oksijen türlerinin üretimi [104]

Süperoksit Radikali: Süperoksit radikali fizyolojik koşullar altında genellikle bir oksitleyici ajandan ziyade hafif bir indirgeyici gibi davranan orta derecede reaktif bir radikaldir. Bunun nedeni, süperoksitin, başka bir biyolojik molekülden ikinci bir elektronu kabul etmektense elektronunu vermeye daha yatkın olan bir anyon olmasıdır [105]. Süperoksit hücre zarından kolayca geçemez, kısa ömürlüdür ve etkisi lokaldir. Ancak süperoksit dismutaz süperoksiti daha uzun ömürlü ve zarda yayılabilen hidrojen peroksit'e dönüştürür [106]. Süperoksit radikalının üretildiği başlıca mekanizmalar şunlardır:

- Fagositozda (fagozomda fagosite edilmiş partikülün yıkımında)
- Hemoglobinin oksijenasyonu ve deoksijenasyonu sırasında ($HbO_2 \longrightarrow O_2^{\bullet-} + MetHb$)
- Mitokondrideki elektron transport sisteminde (Kompleks I ve Koenzim Q'dan oksijene elektron kaçağı ile)
- Çok sayıdaki enzimatik tepkimelerde (örn. oksidazlar, hidroksilazlar)
- Aerobik ortamda biyomoleküllerin otooksidasyonunda (örn. tiyoller, hemoproteinler, çeşitli koenzimler)
- Ksenobiyotiklerin metabolizmasında (sitokrom p450 sisteminde)

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Radikal yapı içermeyen bir oksitleyici ajandır. Biyolojik membranlardan geçebilmesi nedeniyle oldukça önemlidir. Oksijenin iki elektronla indirgenmiş formu olan peroksi anyonunun ($O_2^{\bullet-}$) iki protonu bağlaması ile oluşur. Hidrojen peroksitin ana kaynağı süperoksitlerdir. Nötrofillerin fagozomlarında bulunan bir enzim olan miyeloperoksidazın etkisiyle H_2O_2 , hipokloröz asit ($HOCl$) gibi daha reaktif ROT moleküllerinin üretiminde kullanılır. Oksitleyici bir ajan olmasının nedeni vücutta hidroksil

radikali oluşumundaki ana öncül olmasıdır. Antioksidan savunma sistemlerinden katalazlar, glutatyon peroksidazlar ve peroksiredoksinler tarafından uzaklaştırılır [102].

Hidroksil radikali (OH·): Biyomoleküllerle güçlü reaktivitesinden dolayı OH·, biyolojik sistemlere diğer ROT'lara kıyasla daha zararlıdır. Hidroksil radikali, metal iyonlar (demir ve bakır) tarafından katalize edilen reaksiyonlarla hidrojen peroksitten oluşur. Bu reaksiyonlara Fenton ve Haber-Weiss tepkimeleri denilir [102]. Sulu ortamda iyonlaştırıcı radyasyon tarafından oluşturulan hidroksil radikali bilinen en reaktif kimyasal türdür.



Demir yerine indirgeyici ajan olarak süperoksit de hidrojen peroksit'e elektron vererek hidroksil radikali yapımını katalizleyebilir:

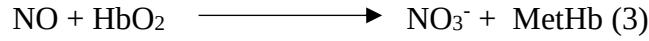


2.3.3. Nitrik oksit ve reaktif nitrojen oksit türleri

Oksijen radikallerinden sonra, vücutta en çok üretilen radikal nitrik oksittir ($\cdot\text{N}=\text{O}$). Ancak oksijen radikallerinin aksine, nitrik oksit tümüyle enzimatik olarak üretilir. Nitrik oksitte paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomu üzerindedir. Fakat bu molekülde bulunan oksijen daha elektrofilik olduğundan, paylaşılmamış elektron delokalize olur, iki element arasında adeta rezonans yapar. Bu durum nedeniyle nitrik oksitin radikal reaktivitesi baskılanmıştır, diğer radikallere göre daha az reaktif ve daha uzun ömürlüdür [107].

Nitrik oksit vücutta nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından arjinin amino asidinden sentezlenir. Nöronal NOS (nNOS) ile endotelial NOS (eNOS) konstitütif enzimler olup, sinyal iletimi amacıyla nitrik oksiti sentezlerler. İndüklenebilir NOS'ın (iNOS) ise patolojik koşullarda (örn. enfeksiyonlarda fagositik lökositlerde) sentezi indüklenir, yüksek konsantrasyonlarda NO sentezlenir ve üretilen NO, oksijen radikalleri ile birlikte patojene karşı silah olarak kullanılır. NO oluşumuna neden olabilen diğer öncüller vücuda dışarıdan alınan nitrat ile organik nitro bileşikleridir (bazı ilaçlar). Nitrat ve organik nitro bileşikleri NOS dışındaki enzimler tarafından metabolize edilerek NO öncülü olarak kullanılabilirler [107].

Nitrik oksit hedef proteini olan hemoproteinlere bağlanarak (örn. sitoplazmik guanilat siklaza bağlanıp aktive ederek) etkisini gösterir. Difüzyonla alyuvarlara giren NO, oksihemoglobin ile tepkimeye girerek nitrata oksitlenir:

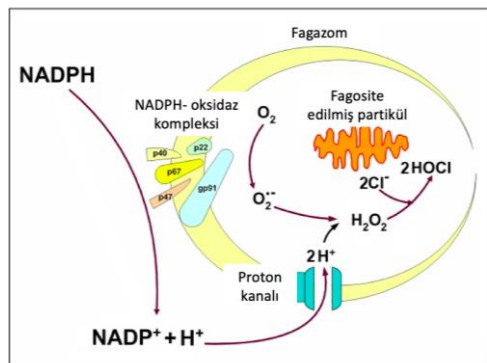


Nitrik oksit oksijenli ortamda stabil değildir. Konsantrasyonu arttığında (iNOS indüksiyonu sonucu çok daha fazla sentezlendiğinde), oksijen ile tepkimeye girer ve reaktif nitrojen oksit türlerinin (RNOS) oluşumuna neden olur. Nitrik oksitin oksidasyonu sonucu peroksinitrit, nitrojen dioksit, dinitrojen trioksit gibi nitrik oksitten çok daha reaktif türler oluşur ve bu türler de biyomoleküllerle tepkimeye girerler. Reaktif nitrojen türlerinden kaynaklanan toksik etki nitrozatif stres olarak adlandırılır. Buradaki stres nitrik oksitin kendisinden değil, fakat oksitlenmiş türlerinden kaynaklandığından, nitrozatif stres aslında oksidatif stresin bir parçasıdır [107].

2.3.4. Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik etkileri

Enfeksiyona karşı savunma

Fagositler aktive olduğunda bakterileri yok etmeye yetecek miktarda ROT üretirler (Şekil 2.8). Buradaki ROT, NADPH oksidaz kompleksi tarafından oluşturulan süperoksit radikalidir. Süperoksit radikali, fagozomun asidik koşullarında iki proton bağlayarak H_2O_2 'yi oluşturur. Bu H_2O_2 daha sonra miyeloperoksidaz tarafından HOCl oluşumunda kullanılır. Fagozomlarda oluşan yüksek derecede reaktif iki reaktif tür (HOCl ve OH), fagosit tarafından yutulan bakteriler için oldukça toksiktir ve ROT'un doğrudan antimikrobiyal etkilerini gösterir [102,106].



Şekil 2.8. Fagositik aktivite [101]

Transkripsiyon faktörü aktivitesinin redoks regülasyonu

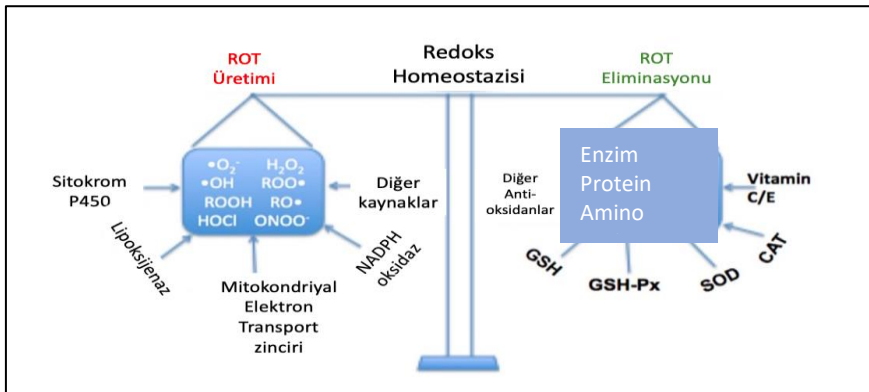
ROT, proteinler veya glutatyon (GSH) gibi tüm sülfidril içeren moleküllerin tiyol kısımlarını oksitleyerek konformasyonunu ve/veya aktivitelerini doğrudan etkileyebilir. Bu tip redoks düzenlemesi, diğer birçok enzimi ve aralarında protein kinaz C, CaATPase, kollajenaz ve tirozin kinazlar gibi membran reseptörleri, sinyal iletimi ve karsinogeneze önemli olan birçok proteini etkiler. Bazı transkripsiyon faktörleri için ROT, transkripsiyon kontrolünün fizyolojik araçları olarak işlev görür. Redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin iyi bilinen örnekleri, nükleer faktör kappa B ve aktivatör protein-1'dir [102,106].

2.3.5. Reaktif oksijen türlerinin patolojik etkileri

Yüksek konsantrasyonlarda üretilen reaktif oksijen türleri biyolojik moleküllerle tepkimeye girerek onların yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya neden olurlar. Hücre/organ fonksiyonlarındaki bu patolojik değişim oksidatif stres diye adlandırılır.

Oksidatif stres

Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve ortadan kaldırılması arasında bir denge vardır. Buna Redoks homeostazı denir (Şekil 2.9). 1985 yılında Sies, prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanların lehine bozulması durumunu “oksidatif stres” olarak tanımlamıştır [105]. Daha geniş bir ifade olarak oksidatif stres, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin (ROT/RNT) varlığı ile ortaya çıkar ve hedef biyomoleküllere yönelik oksidatif hasara karşı savunma için endojen ve/veya eksojen savunma sistemleri olan antioksidan koruyucu yeteneğin yetersiz kalmasından kaynaklanır. [99,108].



Şekil 2.9. Redoks homeostazı

ROT neden olduğu oksidatif stres lipidler, DNA ve proteinlerde çoğu zaman geri dönüşü olmayan fonksiyonel değışikliklere ve hatta tam yıkıma neden olabilir [104,106].

Oksidatif stresin 100'den fazla hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarın geri dönüşsüz ilerlemesi halinde, fizyolojik işlevlerde bozulma, hastalık insidansında artma ve yaşam süresinin azalma gibi olumsuz etkiler gözlemlenmektedir [108]. Oksidatif stres aynı zamanda tüm majör organ/sistemleri etkiler. Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok farklı hastalıkta rol oynamaktadır [106]. Daha geniş bakış açısıyla oksidatif stres etkilenen dokuya bağılı olarak her türden patolojik durumunda oksijen radikalleri de devreye girebilir. Reaktif oksijen türlerinin yapımı patolojik durumların nedeni olabildiğı gibi patolojik durumların sonucu da olabilirler (diyabet ve iskemi/reperfüzyon hasarlarında olduğu gibi).

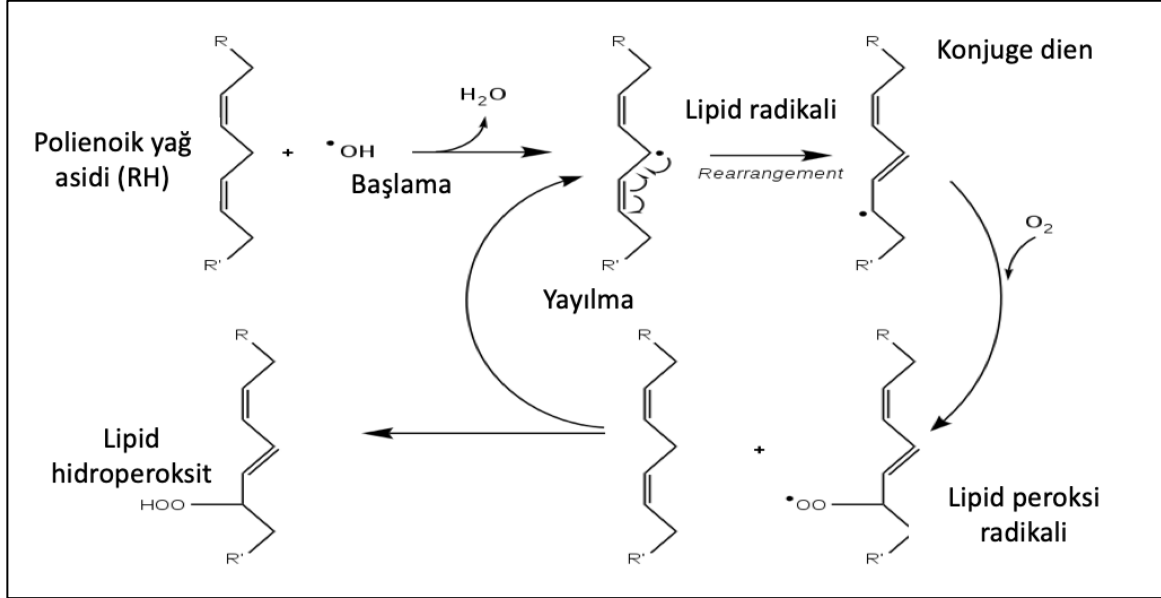
Lipidler üzerine etkisi: Hücre zarını oluşturan lipidler, lipid peroksitlerin, ketonların ve aldehitlerin oluşumuna yol açan serbest radikal hasarlarına karşı açıktır. ROT'un lipidler üzerindeki en önemli etkisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerini polimerize ederek ve çapraz bağ oluşumuna neden olarak hücre yüzeyinin durumunu, iyon transportunu ve enzim aktivitesini etkilemektedir [99].

Lipid peroksidasyonu

Hidroksil radikallerinin zar lipidleri ile tepkimesi lipid peroksidasyonunu başlatır. Zar fosfolipidlerindeki polienoik yağ asitleri (yapılarında birden fazla çift bağ içerenler) hidroksil radikaline en duyarlı hedeflerdir. Lipid peroksidasyonu zincirleme radikalik tepkimeler olup *başlama*, *yayılma* ve *sonlanma* aşamalarını içerir [101].

Hidroksil radikali yağ asitlerinin çift bağına komşu metilen grubundan bir hidrojen çıkararak indirgenirken, yağ asidi üzerinde karbon merkezli radikal ($R\cdot$) oluşur (*peroksidasyonun başlaması*). Oluşan radikal anında oksijen ile reaksiyona girdiğinde ise peroksi radikali ($ROO\cdot$) oluşur. Peroksi radikali bir diğeri yağ asidinden hidrojen çıkarırsa, hidroperoksit formuna ($ROOH$) indirgenir. Lipid hidroperoksite demir varlığında bir elektron aktarırsa tekrar hidroksil radikali oluşur ve yeni bir peroksidasyon tepkimesini başlatır

(peroksidasyonun yayılması). Bu ardışık tepkimeler ortamda lipid kalmayıncaya kadar, radikaller birbiri ile tepkimeye girip nötralize oluncaya kadar ya da antioksidan sistemlerce inaktive edilinceye kadar devam eder (peroksidasyonun sonlanması) [101]. Lipid peroksidasyonunun mekanizması Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Lipid peroksidasyonunun mekanizması [101]

Lipid peroksidasyonu başlatıldıktan sonra zincirleme tepkimeler şeklinde yayılarak devam eder ve yüzlerce ara ürün (radikaller, aldehytler, ketonlar, karboniller vs.) ile son ürünler oluşur. Ara ürünlerin de çoğu reaktiftir ve devam eden tepkimeler sonunda belirli son ürünlere çevrilirler. Lipid peroksidasyonunu başlıca son ürünleri başta malondialdehit olmak üzere çeşitli aldehytler (örn. sitotoksik bir ajan olan 4-hidroksinonenal), metan gibi uçucu hidrokarbonlar ile karbonillerdir. Vücutta belirli bir anda oksijen radikalleri ölçümü mümkün olmadığından, ve lipid peroksidasyonu sırasında etkileri amplifiye olduğundan, lipid peroksidasyonun son ürünlerinden bir veya bir kaçının ölçümü ile canlıda üretilen oksijen radikalleri düzeyi hakkında dolaylı bilgi elde edilebilir [101].

DNA üzerine etkileri: ROT'un bir diğer önemli etkisi ise DNA üzerinedir. Başta $\text{OH}\cdot$ radikali olmak üzere ROT elemanları oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon gibi reaksiyonlarla DNA hasarına neden olabilir. Oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara neden olabilirken, deoksiriboz kısımlarının oksidasyonu DNA zincir kırılmalarına neden olabilir [100]. Eğer DNA yapısı bozulur ve DNA onarımı gerçekleşmezse replikasyon

sırasında mutasyonlar meydana gelebilir. Bu mekanizma, oksidatif strese maruz kalan bireylerde yüksek kanser prevalansını kısmen açıklayabilir [102].

Proteinler üzerine etkileri: ROT'un etkilerini gösterdiği bir diğer yapı ise proteinlerdir. ROT, amino asitlerin modifikasyonuna neden olarak çapraz bağlanmaya, konformasyonda değişikliklere ve fonksiyon kaybına yol açar. Aynı zamanda ROT amino asitlerin yan zincirlerini oksitleyerek protein parçalanmasına neden olur. Protein oksidasyon ürünleri ve protein karbonil türevleri, amino asit yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından, reaktif oksijen aracılı peptit bölünmesinden ve lipid ve karbonhidrat oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlardan kaynaklanabilir [100,102].

2.3.6. Antioksidanlar

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres ile baş edebilmek için canlılar çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Antioksidan savunma sistemi olarak da bilinen bu mekanizmalar oksidatif stresin varlığı durumunda aktive olan sistemlerdir. Antioksidanlar oluşan oksidatif stres, DNA mutasyonlarını, karsinogenezi ve hücre hasarlarına neden olan diğer faktörleri azaltmakla görevlidir. Epidemiyolojik çalışmalar antioksidanların, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların insidansını azaltma kabiliyetini kanıtlamıştır [108]. Antioksidan sistemlerin listesi Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Antioksidanlar etkilerini şu yollarla gösterir [100]:

- Mevcut bir serbest radikali stabilize etmek için bir elektron vererek (örneğin α -tokoferol) serbest radikal oluşum zincirini kırma
- Radikal süpürücü enzimler (örneğin süperoksit dismutaz) aracılığıyla serbest radikalleri doğrudan temizleme
- Endojen antioksidan savunmaları yükseltme (örneğin katalaz)
- Geçiş metali katalizörlerini (örneğin transferrin) şelatlanma
- Radikal oluşumunu baskılama (örneğin glutatyon)
- Hasarı onarmak ve membranı yeniden oluşturma

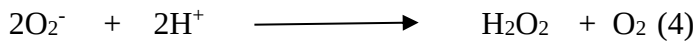
Çizelge 2.2. Antioksidan sistemlerin listesi [108]

ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ
Enzimatik Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD)
Katalaz (CAT)
Glutasyon peroksidaz (GPx)
Nonenzimatik Antioksidanlar
Glutasyon (GSH)
Vitaminler (A, C, E)
Ürik Asit
Bilirubin
Melatonin
Sentetik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutazlar, süperoksit radikal anyonunu H_2O_2 'ye çeviren antioksidan enzimlerdir [108,110].

SOD



Süperoksit dismutaz, biyolojik sistemlerin her hücresinde bulunan, endojen olarak üretilen en önemli hücre içi enzimlerdendir [100]. SOD, oksijen kaynaklı serbest radikallere karşı ilk savunma hattı gibi görünmektedir ve oksidatif strese varlığında hızla indüklenebilir [103]. Karaciğer, adrenal bez, böbrek ve dalakta yüksek düzeyde SOD bulunur [100]. Memelilerde üç tip SOD tanımlanmıştır: sitozolik SOD (CuZnSOD-SOD1), mitokondriyal SOD (MnSOD-SOD2) ve hücre dışı SOD (ECSOD-SOD3). Bu SOD'ların oksidasyon-indirgeme tepkimelerinde aktif merkezlerinde CuZnSOD ve ECSOD için çinko ve bakır ve MnSOD için manganez bulunur [102,103,110].

CuZnSOD: Homodimeriktir ve sitoplazmada bulunur. CuZnSOD genleri insanlarda 21. kromozomda ve farelerde 16. kromozomda bulunur. CuZnSOD esas olarak sitozolde lokalizedir, ancak son çalışmalar, bu enzimin mitokondride ve süperoksit anyonlarının kompleks III'ten salındığı intermembran boşlukta da bulunduğunu göstermiştir [110].

MnSOD: Homotetrameriktir ve mitokondride bulunur. Bu enzimin genleri insanlarda kromozom 6'da ve farelerde kromozom 8'de bulunur. Enzim, proteini mitokondriye hedefleyen 24 amino asitten oluşan bir mitokondriyal lokalizasyon sinyaliyle sahiptir. Hedefine ulaştıktan sonra sinyal parçası uzaklaştırılır ve olgun protein mitokondri içinde lokalize olur [110].

ECSOD: Homotetrameriktir ve glikozile edilmiş bir CuZnSOD'dur. ECSOD genleri insanlarda 4. kromozomda ve farelerde 5. kromozomda bulunur. ECSOD, ağırlıklı olarak dokuların hücre dışı matrisinde bulunur ve hücre dışı olarak üretilen ROT tarafından başlatılan hücre ve doku hasarını önlemek için görev alır. ECSOD, pulmoner fibrozis ve diğer hücre dışı süperoksit aracılı hastalıklara karşı koruma sağlayabilir [110].

Katalaz (CAT): Katalaz, bitki, hayvan ve aerobik bakteri hücrelerinde bulunan bir enzimdir. Esas olarak peroksizomlarda bulunan başlıca birincil antioksidan savunma enzimlerinden biridir. Ancak sitoplazmada ve mitokondride de az miktarlarda bulunur. Karaciğer, böbrek ve kırmızı kan hücreleri belirgin katalaz seviyelerine sahiptir. SOD enzimi tarafından oluşturulan hidrojen peroksit katalaz enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüşür ve maksimum etkinlik için kofaktör olarak demir gerektirir [100,103,111].

CAT



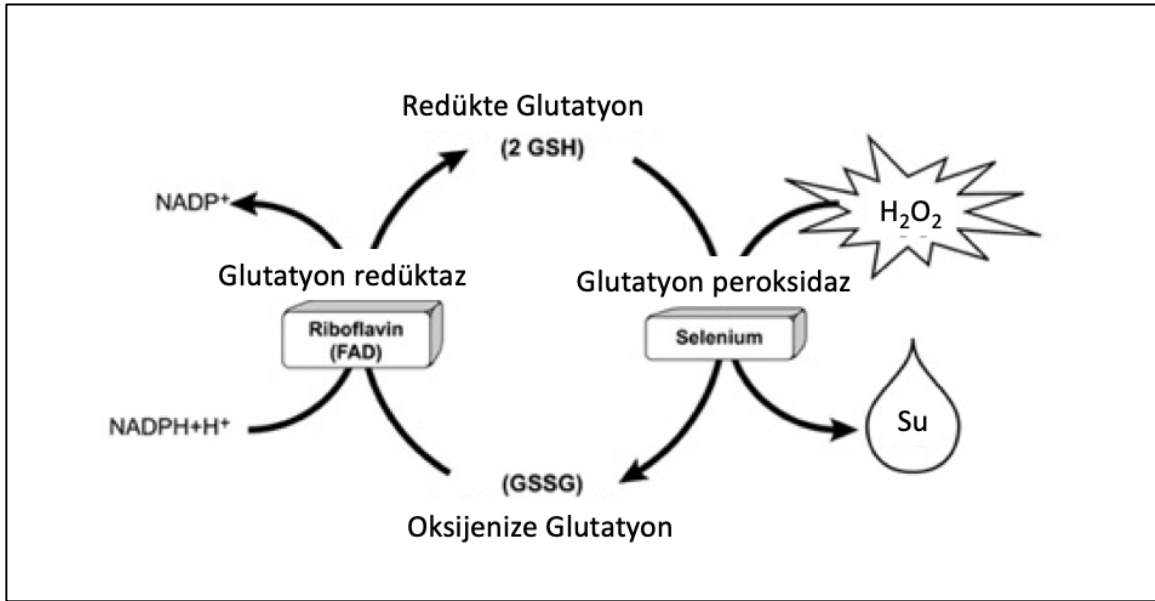
Glutatyon peroksidaz (GPx):

Vücutta oluşan peroksitleri indirgeyen bir enzim grubu olan glutatyon peroksidazların selenyumdan bağımsız (glutatyon-S-transferaz, GST) ve selenyum bağımlı (GPx) olmak üzere iki farklı izoformu vardır [100]. Bu enzimlerden GPx1-4 selenyum aktif merkezlerinde selenosistein amino asidi şeklinde içerirler. GPx 1 insanda en bol ve en yaygın

olan izoenzimdir [112]. GPx1 sitozol ve mitokondride, GPx2 sitozol ve çekirdekte, GPx3 plazmada ve GPx4 membranda bulunmaktadır [102,103].

Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz enzimi peroksitlerin yanı sıra, peroksinitriti de inaktive eder. Peroksinitrit, nitrik oksitin süperoksitle tepkimesi sonucu özellikle fagositoz sırasında oluşur. Peroksinitrit en reaktif nitrojen oksit türü olup proteinler, lipidler, nükleik asitler ve diğer biyomoleküllerle tepkimeye girebilir. Reaktif nitrojen oksit türlerinin neden olduğu protein nitrozasyonu, örneğin nitrozotiyoller yine GSH bağımlı olarak glutatyon peroksidaz tarafından onarılır. Glutatyon peroksidaz enzimi aynı zamanda reaktif nitrojen oksit türlerine karşı da antioksidan etkiye sahip bir enzimdir [113].

Glutatyon peroksidaz hidrojen peroksiti suya indirgemesi için molekül başına iki molekül GSH kullanır ve GSSG oluşur. Oluşan GSSG ise glutatyon redüktaz tarafından indirgenerek 2 GSH rejenere edilir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Glutatyon döngüsü

Enzimatik olmayan antioksidanlar

Glutatyon (GSH): Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı

korumaktadır. Glutatyonun tiyol grubu radikale bir elektron verip onu inaktive ederken, iki glutatyon birleşerek okside glutatyon (GSSG) oluşturur [111].

Vitamin E: Yağda çözünen E vitamini sekiz farklı formda bulunur. α -Tokoferol (α -TOH), en aktif vitamin E türevleridir [100]. α -Tokoferol biyolojik zarlarda bulunan yağda çözünen bir vitamindir. α -TOH bağırsakta emilir ve şilomikronlarda karaciğere taşınır [102]. Esas olarak mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranlarının fosfolipidlerinde yoğunlaşır. Başlıca antioksidan etkisi lipid peroksidasyonuna karşı korumadır. α -TOH zarlarda oluşan radikale tek elektron vererek indirger, böylece zarlar da lipid peroksidasyonunun başlaması ve yayılmasını önler. Elektron verdikten sonra kendisinin radikal formu, tokoferil radikali oluşur. Ancak tokoferil radikalının reaktivitesi çok düşüktür ve GSH veya askorbik asit tarafından indirgenerek rejenere edilir [100,108].

Vitamin A: Karotenoidlerin en yaygın formları α -karoten, β -karoten, likopen, kantaksantin, fukoksantin ve krositindir. Bunlar arasında β -karoten, antioksidan aktivite için en çok araştırmalara konu olanıdır. β -Karoten hem antioksidan hem de pro-oksidan olarak işlev görür. Antioksidan aktivite singlet oksijeni söndürme, serbest radikalleri temizleme ve plazma membran lipidlerini oksidatif hasara karşı koruma yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Aktivitesi doza ve oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Daha yüksek oksijen konsantrasyonlarında pro-oksidan etkiler gösterir ve proteazları aktive edebilir [100,108].

Vitamin C (Askorbik asit): En yaygın suda çözünen antioksidanlardan biri olan askorbik asit, hem hücre içi ve dışı sulu ortamda radikalleri indirger, hem de membran fosfolipidlerini peroksidatif hasardan korur ve özellikle beyinde etkili bir serbest radikal temizleyici olduğu kanıtlanmıştır. Vitamin C biyolojik ortamdaki hidroksil, alkoksil ve süperoksit radikal anyonunu indirgeyerek temizler ve böylece biyomoleküllerin oksidatif hasara karşı korunmasını sağlar. Askorbik asit, lipofilik radikallerin doğrudan süpürücüsü olmamasına rağmen, lipid peroksit radikallerinin uzaklaştırılmasında α -tokoferol ile kombinasyon halinde sinerjistik bir etkiye sahiptir [108]. C vitamini, diğer suda çözünür antioksidanlarla karşılaştırıldığında, plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili korumayı sağlar [100].

Ürik asit: Ürik asit, pürin metabolizmasının ürünü olan endojen bir antioksidandır. Demir ve bakır gibi geçiş metallerini kompleks oluşturarak, radikal temizleyici olarak güçlü bir antioksidan görevi görür. Hücre dışı ve içi savunma mekanizmalarında anahtar rol oynar

[100]. Ürik asit, hemoglobinin otooksidasyonu veya makrofajlar tarafından peroksit üretimi gibi zararlı işlemlerden kaynaklanan reaktif radikalleri temizleme yeteneğine sahiptir [108].

Bilirubin: Hemoglobin metabolizmasının son ürünü olan bilirubin, etkili bir sitoprotektif aktivite sergiler. Lipofilik yapıda olan bilirubinin membran lipidlerinin peroksidasyonunu önlediği doğrulanmıştır. Biliverdin ile birlikte bilirubinin, peroksil radikallerine karşı aktif bir temizleyici olduğu gösterilmiş ve ayrıca oksidatif türlerin, polisiklik aromatik hidrokarbonların ve heterosiklik aminlerin mutajen etkisini azaltma yeteneğini de gösterilmiştir [108].

Melatonin: Hem ROT hem de RNT ürünlerini temizleyebildiği ve mitokondriyal oksidatif strese karşı koruyucu aktivite sergilediği rapor edilmiştir. Melatonin metabolitlerinden olan AFMK (N(1)-asetil-N(2)-formil-5-metoksikinuramin) ve AMK'nın (N1-asetil-5-metoksikinuramin) indirgeyici ve antiradikalik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda melatoninin, E vitamininden daha etkili bir antioksidan özellik taşıdığı göstermiştir [108].

Sentetik antioksidanlar

İnflamatuvar gen aktivasyonunun toksinleri, aracıları ve modülatörleri olarak reaktif oksijen türlerinin belirgin önemi nedeniyle, birçok farklı hastalık durumu için potansiyel terapötik ajanlar olarak bir dizi sentetik antioksidan geliştirilmiştir [114]. Bunlar içerisinde en çok bilinen asetilsisteinin antioksidan özellikleri, serbest radikal süpürücü olarak davranışından kaynaklanmaktadır [108]. Ayrıca farklı hastalıkların tedavisinde geliştirilen birçok ilacın değişik düzeylerde antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir. Bunların arasında etosopid ve tomoksifen gibi antineoplastik ilaçlar olduğu gibi nitekaon ve topiramat gibi sinir sistemi üzerine etkili ilaçlarda bulunmaktadır. Sentetik antioksidanlar ve etkileri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Sentetik antioksidanlar ve etkileri

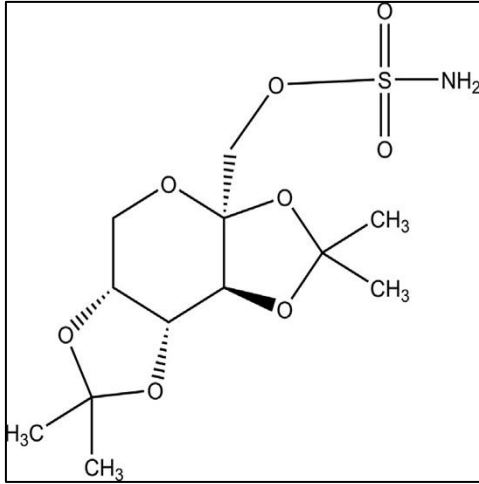
Sentetik Antioksidanlar	Etkisi
Asetilsistein	Antioksidan ve serbest radikal süpürücü
Kalsiyum kanal blokörü	Zincir kıran antioksidan
Ebselen	Glutasyon peroksidaz taklitçisi
Lazaroidler	Serbest radikal süpürücü ve membran stabilizörü
Mesalazin	Antioksidan ve serbest radikal süpürücü
Nitroksidaz	Süperoksit dismutaz taklitçisi
Feniltbutilnitron	Serbest radikal süpürücü
Plazmalojen	Fosfolipid, singlet oksijen ve serbest radikal süpürücü
Probucol	Serbest radikal süpürücü
Stobadin	Antioksidan ve serbest radikal süpürücü
Nitekapon	Katekolmetiltransferaz inhibitörü ve antioksidan
Tamoksifen	Antineoplastik ve antioksidan
Etoposid	Antineoplastik ve serbest radikal süpürücü
Topiramat	Antiepileptik ve antioksidan

2.4. Topiramat

Yeni nesil antiepileptik ilaçlardan biri olan topiramat (TPM) ilk kez 1979 yılında sentez edilmiş ve 1995 yılında İngiltere’de kullanılmaya başlanılmıştır [115,116]. Başlangıçta bir anti-diyabetik ilaç olarak geliştirilmiş olsa da daha sonra asetazolamid ile benzerliğinden dolayı bir anti-konvülzan olarak geliştirilmiştir [117]. Epilepsi tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, aralarında obezite, migren profilaksisi ve alkol kullanım bozukluğu da dahil olmak üzere başka endikasyonlarda da günümüzde kullanılmaktadır.

2.4.1. Yapısı

TPM [2,3:4,5-bis-O-(1-metiletiliden)- β -D-fruktopiranoz sülfamat], doğal monosakkarit D-fruktozun sülfamat içeren bir türevidir [118]. Moleküler formülü $C_{12}H_{21}NO_8S$ ’dir. Moleküler ağırlığı 339,359 gr/mol’dür [116]. TPM’nin yapısal formülü Şekil 2.12’de verilmiştir.



Şekil 2.12. TPM'nin yapısal formülü [116]

2.4.2. Farmakokinetiği

TPM, gastrointestinal sistemden hızla ve iyi emilir (oral biyoyararlanımı %81 ila %95 arasındadır) ve doruk plazma seviyesine (C_{max}) 2 ila 4 saatte ulaşır. Yiyeceklerle birlikte alınması, C_{max} 'a kadar geçen süreyi bir miktar uzatmakla birlikte, belirli bir TPM dozu için ulaşılan maksimum plazma konsantrasyonunu değiştirmemektedir [119]. TPM, düşük düzeyde (%9-17) plazma proteinlerine bağlanır. Beyin dahil tüm dokulara dağılım gösterir [116].

TPM'nin büyük bir kısmı metabolize edilmez. 100 mg [¹⁴C]TPM verilen sağlıklı gönüllülerde değişmemiş topiramatin, uygulamadan 24 saat sonra toplam plazma radyoaktivitesinin %85'inden sorumlu olduğu gözlenmiştir. İnsanlarda glukuronidasyon, hidroksilasyon ve hidroliz ile oluşan altı eser metaboliti tanımlanmıştır. Bu metabolitlerin hiçbiri toplam radyoaktivitenin %5'inden fazlasını oluşturmamaktadır [119].

TPM'nin başlıca atılım yolu böbreklerdir ve çoğunlukla değişmemiş formda atılır [119]. Sağlıklı bireylerde yarı ömrü yaklaşık 20-30 saattir ancak fenitoin, karbamazepin ve barbitüratlar gibi eşzamanlı enzim indükleyici ilaçlar alan hastalarda eliminasyon hızı artar. Böbrek yetmezliği olan hastalarda doz azaltılması gerekir. Hemodiyaliz sırasında ek doz gerekebilir. Karaciğer yetmezliğinde ise doz ayarlaması gerekmediği söylenmektedir [116].

TPM, hepatik enzimlerden sitokrom P450 3A4 (CYP3A4)'ü indükleyip sitokrom P450 2C19 (CYP2C19)'u inhibe edebilir [117]. Bu açıdan bu enzimler tarafından metabolize edilen ilaçlarla beraber kullanılması halinde dikkatli olunmalıdır.

2.4.3. Farmakodinamiği

TPM, etkilerini şu mekanizmalar ile göstermektedir [120,121]:

- 1) Diğer anti-konvülzanlara benzer şekilde voltaj bağımlı sodyum ve kalsiyum kanallarını inhibe eder.
- 2) Eksitator bir nörotransmitter olan glutamatın ionotropik reseptörlerinden Kainat ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptörlerini antagonize ederek glutamat aracılı sinir uyarımını azaltır.
- 3) Gama-aminobütirik asitin (GABA), GABA_A reseptör subtipleri üzerinde negatif veya pozitif modüle edici etki gösterir.
- 4) Karbonik anhidraz enzimini inhibe eder.

Karbonik anhidraz enzimi, karbondioksitin hidrasyonu sonucu bikarbonat ve hidrojen iyonu oluşumu reaksiyonunu ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) iki yönlü katalizler [122]. Karbonik anhidrazın bilinen 16 izoenzimi bulunmaktadır [15]. TPM, bu enzimin özellikle CA-II ve CA-IV izoformlarını daha yüksek potens ile inhibe etmektedir [123].

Yukarıda belirtilen etkilere ek olarak, TPM'nin nöroprotektif etkileri de bulunmaktadır [124]. TPM'nin bu etkisi birçok hayvan çalışmasında ortaya konulmuştur [15,17,125–130].

TPM'nin oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma olmuştur. Her ne kadar da TPM'nin oksidatif stresi azaltıp, antioksidan parametreleri arttırdığını rapor eden; dolayısıyla başta nöroprotektif etkisi olmak üzere birtakım etkilerinin altında yatan önemli bir mekanizmanın bu özelliği olabileceğini belirtilen çalışmalar [7,15–17,126–134] yaygınlıkla bulunsa da TPM'nin oksidatif stresi arttırabileceğini rapor eden daha az sayıda çalışma [12,18,19,135] da mevcuttur. Oksidatif stresin epilepsi etiyolojisinde önemli bir rol

oynadığı bilinmektedir [136] dolayısıyla TPM'nin anti-epileptik etkilerinin altında kısmen antioksidan özelliği de rol oynadığı varsayılabilir.

2.4.4. Endikasyonları ve kontrendikasyonları

TPM'nin başlıca endikasyonları epilepsi tedavisi ve migren profilaksisidir. Epilepsi tedavisi için 1996 yılında, migren profilaksisi için de 2004 yılında FDA tarafından onaylanmıştır [137].

Epilepsi, nöbet oluşturmaya sürekli bir yatkınlık yaratmakla karakterize ve nöbet nökslerinin nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçlarıyla kronik nörolojik bir hastalıktır. Epilepsi sık görülen nörolojik bozukluklardan biridir ve her yaştan, ırktan, sosyal sınıftan ve coğrafi bölgeden bireyleri etkilemektedir [138]. Epilepsinin nokta prevalansı 1000 kişide 6,38 iken, hayat boyu prevalansı 1000 kişide 7,60'dır [139]. Bu rakamlar dünya üzerinde 50 milyondan fazla bireyin bu hastalıktan muzdarip olduğunu ortaya koymaktadır. TPM, çoklu etki mekanizması ile, epilepsi tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem parsiyel başlangıçlı, hem de jeneralize başlangıçlı nöbetlerde kullanılabilen TPM, geniş spektrumlu bir anti-epileptik ajandır [140]. TPM, ayrıca hipoksik iskemik ensefalopatide ve bunun neden olduğu nöbetlerin tedavisinde de kullanılabilir [124].

Migren, en çok görülen ikinci nörolojik bozukluktur (ilk sırada gerilim tipi baş ağrısı gelir) ve dünya üzerinde yaklaşık bir milyar insanı etkilemekte olduğu tahmin edilmektedir. Kadınlarda erkeklere kıyasla üç kat daha sık görülmekte olup genel popülasyonda bir yıllık tahmini prevalansı yaklaşık %15'dir [141]. Migrenin patofizyolojisi karmaşıktır ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Moleküler düzeyde, AMPA ve/veya kainat reseptörleri ile çeşitli voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aşırı aktivasyonun migren patolojisine katkıda bulunan başlıca faktörler olduğu ileri sürülmektedir. TPM'nin anti-migren etkisi bu reseptörler ve kanallar üzerindeki inhibitör etkisinden kaynaklanmaktadır [120]. Silberstein ve arkadaşlarının yaptıkları çok merkezli randomize çift-kör plasebo kontrollü çalışmada, Diener ve arkadaşlarının yaptıkları randomize çift-kör plasebo kontrollü çalışmada ve Linde ve arkadaşlarının yayınladıkları meta-analizde TPM'nin anti-migren etkinliği ortaya konulmuştur ve günümüzde bu amaçla onaylı olarak kullanılmaktadır [14,142,143].

TPM'nin bir diğer endikasyonu ise obezite tedavisidir. TPM'nin neden olduğu kilo kaybının kesin mekanizması bilinmemektedir ancak kalori alımındaki azalma, insanlarda TPM kaynaklı kilo kaybı ile ilişkili önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır. Hayvan çalışmaları, enerji harcamasındaki artışın ve enerji verimliliğindeki azalışın TPM monoterapisindeki kilo kaybına katkıda bulunduğunu öne sürmektedir, dolayısıyla insanlarda da TPM kaynaklı kilo kaybı, kalori alımındaki azalmaya ek olarak benzer mekanizmalarla da gerçekleşiyor olabilir [13,137]. Randomize kontrollü çalışmalar TPM monoterapisinin obez bireylerde klinik olarak anlamlı ölçüde kilo kaybına neden olduğunu, ayrıca glukoz toleransı ve kan basıncı üzerinde de olumlu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur [144–146]. Benzer şekilde, Kramer ve arkadaşlarının yayınladıkları ve 10 randomize kontrollü çalışmanın dahil edildiği meta analizde de TPM'nin kilo kaybı etkisi ortaya konulmuştur [147]. Diğer taraftan TPM, kilo kaybı için optimal dozlarda tek bir ajan olarak kullanımını sınırlayabilen yan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu yan etkiler arasında nispeten sık görülen kognitif yavaşlama zaman zaman ilaç kullanımını sınırlandırabilecek boyuta ulaşabilmektedir. Ayrıca parestezi, oligohidrozu, kapalı açılı glokom, baş dönmesi, ataksi, ajitasyon ve duygu durum bozuklukları da görülebilmektedir [120]. Dolayısı ile obezite tedavisinde klinik pratikte fentermin/TPM kombinasyonu daha çok kabul görmektedir [137]. Fentermin, yapısal olarak amfetamine benzeyen, santral etkili bir sempatomimetik amindir ve etkisini norepinefrin salınımını ve daha az ölçüde dopamin salınımını artırarak gösterir. Aralarında Allison ve arkadaşlarının yaptıkları EQUIP çalışması, Gadde ve arkadaşlarının yaptıkları CONQUER çalışması ve Garvey ve arkadaşlarının yaptıkları SEQUEL çalışması da dahil olmak üzere randomize kontrollü çalışmalarda fentermin/TPM'nin kilo kaybı üzerindeki anlamlı etkisi ve söz konusu ilacın güvenilirliği ortaya konulmuştur [137,148,149]. Fentermin/TPM kombinasyonu FDA tarafından 17 Temmuz 2012'de erişkin (≥ 18 yaş) obez ($VKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$) hastalarda ve hipertansiyon, tip 2 diyabet veya dislipidemi dahil olmak üzere en az bir kilo ile ilişkili komorbiditesi olan aşırı kilolu ($VKİ \geq 27 \text{ kg/m}^2$) hastalarda kronik kilo yönetimi için düşük kalorili diyet ve artmış fiziksel aktiviteye ek olarak kullanılmak üzere onaylanmıştır.

Tıkınırcasına yeme bozukluğu (binge eating disorder), belirli bir süre içinde çok miktarda gıda tüketme davranış biçimidir ve kontrol kaybı hissi vardır. Tıkınırcasına yeme bozukluğu, potansiyel olarak dopaminerjik mekanizmaları içeren beyin dürtü kontrolü, ödül ve duygudurum düzenleme sistemlerinin işlev bozukluğundan kaynaklanmaktadır. TPM, ödül sistemleri, duygu durum ve iştah üzerinde etkili olmasıyla farmakolojik tedavi seçeneği

olarak ortaya çıkmıştır [117]. Nitekim, McElroy ve arkadaşlarının farklı tarihlerde yaptıkları iki randomize çift-kör plasebo kontrollü çalışmada [150,151] ve benzer şekilde Brambilla ve arkadaşlarının yaptıkları randomize kontrollü çalışmada [152] TPM'nin bu etkisi rapor edilmiştir.

TPM, alkol kullanım bozukluğu (alkolizm) tedavisinde de kullanılabilmektedir. Alkol kullanım bozukluğu, Amerika Birleşik Devletleri'nde 12 aylık %13,9 ve yaşam boyu %29,1 prevalansı ile önemli bir sağlık sorunudur. Dünya çapındaki yaşam boyu prevalansı ise %16 olarak rapor edilmiştir. Her ne kadar da FDA tarafından alkol kullanım bozukluğu endikasyonu için günümüzde onaylı olmasa da, TPM'nin bu hastalarda etkili bir tedavi seçeneği olduğu ve zararlı içme alışkanlıklarını azaltmada kayda değer etkinliğe sahip olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur [117]. Arbaizar ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları ve 3 randomize kontrollü çalışmanın incelendiği meta-analizde, TPM'nin plaseboya kıyasla ağır içicilik günlerinin yüzdesini azalttığı, içkiden uzak durma günlerinin sayısını arttırdığı ve GGT seviyelerini azalttığı ortaya konulmuştur [153]. 2014 yılında yayınlanan iki ayrı meta-analiz ile TPM'nin yoksunluk, ağır içicilik, GGT ve içme arzusu üzerinde olumlu etkileri olduğu ve içilen günlerdeki içki miktarını azalttığı belirtilmiştir [154,155]. TPM'nin aynı zamanda alkol yoksunluğu sendromu tedavisinde de kullanılabileceği rapor edilmektedir [156,157]. TPM'nin alkol alımı isteğini azaltmasının glutamat reseptörlerini antagonize ederek ve dopamin salınımını inhibe ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir [154]. Alkol bağımlılığına ek olarak TPM, kokain ve sigara bağımlılığı tedavisinde de kullanılabilmektedir [117]. TPM'nin söz konusu endikasyonlara ek olarak patolojik kumarda da deneysel olarak kullanılabileceği rapor edilmektedir [117,158].

2.4.5. Yan etkileri

TPM genel olarak iyi tolere edilse de belli yan etkilere sahiptir. Bu yan etkilerinden parestezi, metabolik asidoz ve nefrolitiazis, ilacın karbonik anhidraz inhibisyonu etkisine atfedilir. İlacın glutamatın nörotransmitter fonksiyonu üzerindeki inhibitör etkileri sonucu ise akut bilişsel bozukluk gibi merkezi sinir sistemi ile ilgili yan etkiler görülebilmektedir. TPM'nin bazı aquaporinlerin aktivitesini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır; TPM'nin yan etkilerinden olan oligohidrozo, akut miyopi ve bilateral sekonder kapalı açılı glokom bu mekanizma ile gelişiyor olabilir. TPM'nin diğer yan etkileri

arasında baş dönmesi, ataksi, tremor, mide bulantısı, karın ağrısı, kabızlık, ağızda kuruluk ve kötü tat, sinirlilik, depresyon, anoreksi, ajitasyon ve duygudurum bozuklukları yer almaktadır [120].

2.5. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi

Literatürde TPM'nin antioksidan etkinliğe sahip olduğundan bahseden birçok çalışma bulunsa da bazı araştırmalar oksidan etki de gösterebildiğini açıkça ortaya koyulmuştur. TPM farklı dokulardaki oksidan-antioksidan sistemler üzerinde değişken etki göstermesine rağmen karaciğerde oksidan-antioksidan sistemler üzerindeki etkisi bugüne kadar çalışılmamıştır.

Obez hastaların %80'inde görülen NAYKH hem yaşam beklentisini sınırlar hem de ilerleyici karakteri ile hastaların yaşam kalitesini düşürür. TPM obezite tedavisinde de kullanılan bir ilaç olmasına karşın NAYKH ile ilişkisi de bilinmemektedir. Obez hastalardaki NAYKH sıklığı düşünüldüğünde, TPM'nin sağlıklı karaciğer dokusu üzerindeki oksidan-antioksidan etkinliği dahi bilinmezken ve NAYKH patofizyolojisinde oksidan hasarın rolü de göz önüne alındığında bu hastalığın tedavisinde oksidan etkiyi arttırma potansiyeli olan bir ilacın kullanılmasının olumsuz etkileri kolayca tahmin edilebilir.

Bu tez çalışmasında hem normal hem de NAYKH oluşturulmuş sıçan karaciğerinde TPM'nin oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkilerini araştırmak amaçlandı. Bu amaçla planladığımız çalışmanın hipotezini “Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı oluşturulan sıçanlarda TPM karaciğer dokusunda antioksidan etkilidir” olarak kurduk. Bunun ötesinde söz konusu olabilecek muhtemel antioksidan etkiyi kıyaslamak amacıyla antioksidan etkinliği bilinen vitamin E grubunu çalışmamıza eklendi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Etik kurul

Çalışmamız için gerekli olan etik kurul izni Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (Sayı numarası: E-66332047-604.01.02-79967, Kod numarası: G.Ü.ET-21.27). Bu çalışmanın *in vivo* çalışmaları Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM), *in vitro* çalışmaları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ile TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.1.2. Deney hayvanları

G power 3.1.9.2 kullanılarak one-way ANOVA analizi için gerekli n sıçan sayısı istatistiksel olarak güç analizi yapılarak hesaplanmıştır. Güçlü bir etki için (Cohen $f=0.70$) $p<0.05$ 'te anlamlı farklılaşmaları 0.80 güç ile gözlemek için gerekli denek sayısı her grupta 6 olduğu görülmüştür. Çalışmada 30 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Çalışmaya 225 ± 25 g ağırlığında, 3-4 aylık, kan şekeri normal aralıkta olan sıçanlar (50-115 mg/dL) [159] dahil edildi. Tüm hayvanlar çalışma boyunca 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, normal atmosfer koşullarında yaşatıldı. Sıçanlar *ad libitum* beslendi ve normal musluk suyu tüketti.

3.1.3. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazları

Bu çalışmada kullanılan Gazi Üniversitesi Fizyoloji Araştırma Laboratuvarları'na ait cihazların marka/model özellikleri Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve kitler

Çalışmada kullanılan çeşitli kimyasal sarflar, kullanılan kitler, imalatçı firma, katalog numaraları gibi özellikleri ile beraber ilgili Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Laboratuvarda kullanılan donanımlar

Alet/Cihaz Adı	Marka/Model
1. Soğutmalı santrifüj	MPW-350R, Polonya
2. pH metre	Eutech Instruments, Singapur
3. Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo, Japonya
4. Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik, Türkiye
5. Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik, Türkiye
6. Distile su/Saf su cihazı	MES, mpMINIpure
7. Su banyosu	Guft DBS 12734
8. Hassas terazi	Sartorius Basic, Almanya
9. Otomatik pipetler	Nichipet EX, Japonya
10. Spektrofotometre	BioTekELx 800 Bİoelisa Reader, Amerika
11. Vorteks	Nüve NM 110-020488, Türkiye
12. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Asistent, TMA 2071
13. Homojenizatör	Heidolph SilentCrusher M, Almanya
14. Santrifüj	MPW-350, Polonya
15. Steril enjektör (1-5 mL)	Hayat, Türkiye
16. İnsülin enjektörü	Hayat, Türkiye
17. Otomatik pipet uçları ve eppendorf tüpleri (Farklı hacimlerde)	
18. Cerrahi malzemeler (Pens, makas, vb)	

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler

Kimyasal/malzeme adı	Katalog numarası	İmalatçı Firma
1. TCA (Trichloroacetic acid)	T6399	Sigma
2. TBA (2-Thiobarbituric acid)	T5500	Sigma
3. Na ₂ HPO ₄ (Disodyum hidrojenfosfat)	94946	Merck
4. DTNB (5',5'- Dithiobis 2-Nitrobenzoic acid)	D3669	Sigma
5. Süperoksit Dismutaz Kiti	706002	Cayman
6. GPx Kiti	703102	Cayman
7. Alfa tekoferol	T3251	Sigma
8. Ortofosforik asit	100573	Merck
9. n-Butanol	657786	Sigma
10. Sığır serum albümini (BSA)	A7906	Sigma
11. Tris bazı	T1503	Sigma
12. Özel yağlı diyet	C1090-60	Altromin

3.2. Yöntem

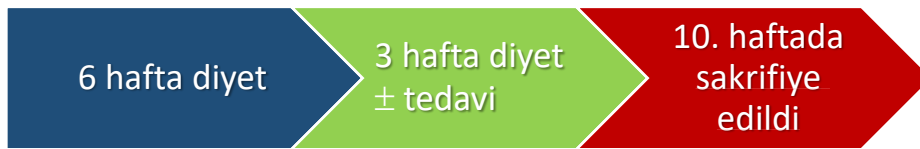
3.2.1. Araştırma planı

Her grupta 6 adet olacak şekilde sıçanlar kura ile rastgele olarak 5 gruba ayrıldı. Gruplara ayrıldıktan sonra hayvan üretim odasından, devam etmekte olan çalışmalara ayrılmış hayvanların bulundurulduğu odaya alınan sıçanların yeni ortamlarında bir hafta uyum süreci geçirmeleri sağlandı. Bu bir haftalık süreç içerisinde gereken grupların aşağıda belirtilen protokolle yağlı diyetle alışmaları da sağlandı.

Gruplar:

1. Kontrol: 9 hafta boyunca normal diyetle beslendi.
2. Diyet: 9 hafta boyunca yağlı karaciğer diyeti* [14] ile beslendi.

3. TPM: 6 hafta normal diyet, sonraki 3 hafta normal diyet yanında oral TPM** (100 mg/kg/gün) aldı.
4. Diyet + TPM: 6 hafta boyunca yağlı karaciğer diyeti, sonraki 3 hafta yağlı karaciğer diyeti yanında oral TPM (100 mg/kg/gün) aldı.
5. Diyet + Vitamin E: 6 hafta boyunca yağlı karaciğer diyeti, sonraki 3 hafta yağlı karaciğer diyeti yanında oral Vitamin E (250 mg/kg/gün) aldı.



Şekil 3.1. Araştırma protokolünün zaman planlaması

* Diyet gruplarındaki sıçanlar özel olarak hazırlanmış %24 karbonhidrat, %16 protein ve %60 yağ içeren diyet aldı. Bu gruplarda diyet dönemi başlamadan önce bir hafta süre ile yeni diyete alıştırma süreci uygulandı. Bu süreçte ilk 3 gün sıçanların tüketeceği yeme %25 oranda yağlı karaciğer diyet yemi eklendi. Sonraki 3 gün bu oran %50'ye ve son 2 gün ise %75'e çıkarıldı. Bu bir haftalık süreç sonrasında diyet protokolü başlandı ve toplam 9 hafta sürdü. Diğer gruplar %65 karbonhidrat, %24 protein ve %11 yağ içeren standart sıçan yemi ile beslendi.

** Topiramatin ticari olarak eczanelerde satılan formu alınarak toz haline getirildi ve her hayvan için uygun olan doz hacmi hesaplanarak 0,8 mL sıvı içerisindeki süspansiyon oral gavaj yöntemi ile 21 gün, günde tek doz halinde, her gün sabah saat 10'da uygulandı. TPM almayacak gruplara da 21 gün boyunca gavaj ile 0,8 mL su verildi.

3.2.2. Araştırma protokolü

Tüm deney sürecince hayvanların haftalık yem tüketimi ve ağırlık takibi yapıldı. Ayrıca deney başlamadan önce, 6. ve 9. hafta sonunda kuyruk veninden alınan kanda glukometre ile kan şekeri ölçümleri yapıldı. 9. haftanın sonunda (10. haftada) sıçanlar ketamin (45 mg/kg, intraperitoneal, tek doz) ve alfazin (5 mg/kg, intraperitoneal, tek doz) kokteyli ile anestezi altına alınıp intrakardiyak kan alınarak eksanguine edildi. Sarı kapaklı jelli serum ayırma tüpü içerisine alınan kanda karaciğer fonksiyon testlerinden alanin aminotransferaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) ve gama glutamil transferaz (GGT) [67] serumdaki düzeyleri ölçüldü. Bu ölçümler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı ile yapıldı.



Resim 3.1. İntrakardiyak kan alımı

Sıçanlardan alınan karaciğerin sol medial lobu (LML) histopatolojik incelemeler için ayrıldı. Karaciğerin geri kalan kısmı loblara ayrılarak alüminyum folyoya sarılmış halde -80°C 'de deneylerin yapılacağı güne kadar saklandı. Biyokimyasal ölçümler için sol lateral lob homojenize edilerek oksidan etkinliğin tespiti için lipid peroksidasyonu TBARS yöntemi ile ölçüldü. Antioksidan düzeylerin ölçümü için süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri için ticari olarak hazır kitler kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüm yapılırken; glutatyon düzeyi modifiye Elman yöntemi kullanılarak tayin edildi. Yapılan biyokimyasal ölçümlerin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.



Resim 3.2. Diyet grubuna ait retroperitoneal yağlanma görüntüsü

3.2.3. Karaciğer dokusunda yapılan biyokimyasal ölçümler

Biyokimyasal ölçümler için dokuların homojenizasyonu

Önceden dondurularak saklanmış karaciğer doku örnekleri tartıldıktan sonra, gram cinsinden yaş ağırlıklarının 5 katı (mililitre olarak) fosfat tamponu (100 mM, pH: 7,4) içinde mekanik homojenizatör (Heidolph SilentCrusher M, Almanya) kullanılarak homojenize edildiler. Tekrarlanan dondurup çözme işleminden kaçınmak için her doku homojenatı ikişer mililitrelik hacimlere bölünerek donduruldu. Bu homojenatlar yapılacak biyokimyasal ölçüme göre doğrudan veya santrifüj edildikten sonra kullanıldılar.

Protein tayini

Doku homojenatlarında ve santrifüj edilmiş doku homojenatları süpernatantlarında protein tayini Sigma-Aldrich firmasının protein reaktifi kiti (Biüret reaktifi) kullanılarak yapıldı. Lipid peroksidasyonu ile glutasyon tayininde doku homojenatları, enzim aktivitelerinin

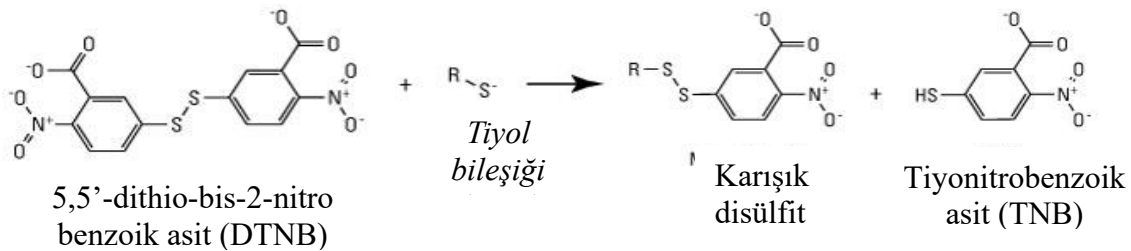
ölçümünde homojenat süpernatantları kullanıldığından, homojenatlar ile homojenat süpernatantlarında ayrı ayrı protein tayini yapıldı. Tayin için homojenatlardan 50 µl cam tüpe pipetlenip üzerine 950 µl biüret reaktifi; homojenat süpernatantlarından ise 100 µl üzerine 900 µl reaktif eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra, 540 nm'deki absorpsiyonları 10-15 dakika içinde ölçüldü. Sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanıldı. Standart grafikten yararlanarak doku örneklerinin protein konsantrasyonları mg/mL homojenat cinsinden ve gram yağ doku başına miligram şeklinde hesaplandı.

Karaciğer homojenatlarında lipid peroksidasyonu tayini

Lipid peroksidasyonu lipidlerin enzimatik oksidasyonundan farklı olarak, doymamış yağ asitlerinin radikal bağımlı oksidatif yıkımıdır. Peroksidasyona duyarlı lipidler doymamış yağ asitleri olup, ağırlıklı olarak zar fosfolipidlerinin yapısında bulunurlar. MDA, lipidlerin peroksidasyonunda en çok oluşan son üründür. MDA ve benzeri aldehitler tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimeye girdiklerinde renkli bir kompleks oluştururlar ve bu sayede peroksidasyonun bu ürünleri spektrofotometrik olarak tayin edilebilir. TBA'nın kullanıldığı lipid peroksidasyonunda MDA dışı aldehitler de ölçüldüğünden, bu yöntemle sadece MDA değil, fakat TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) tayin edilir. Ancak ölçülen ana son ürünün MDA olması nedeniyle, TBARS veya MDA düzeyleri çoğunlukla eşanlamda kullanılır ve lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak değerlendirilir. Karaciğer dokularında lipid peroksidasyonu seviyeleri (TBARS) Uchiyama ve Mihara tarafından belirtilen yöntemle tayin edildi [160]. Homojenatlardan 0,2 mL cam tüplere aktarıldıktan sonra üzerine birer mL TBA çözeltisi (% 0.67; 670 mg/100 mL) ve 3 mL %1'lik ortofosforik asit pipetlendi. Aşırı evaporasyonu önlemek için tüplerin ağzına birer cam bilye yerleştirildi ve tüpler kaynar suda 45 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler alındı ve musluk suyu altında tüplerin soğuması sağlandı. Her tüpe üçer mL n-butanol ilave edildikten sonra tüpler vorteks kullanılarak aralıklarla 10 saniye şiddetle karıştırıldı. Tüpler 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek TBA-MDA kompleksinin butanol fazına geçişi (üst faz) sağlandı. Örneklerin absorpsiyonu aynı şekilde çalışılan fakat doku örneği içermeyen köre karşı 532 nm'de ölçüldü. TBA-MDA kompleksinin molar absorptivitesi $1,56 \times 10^5$ 'dir. Okunan absorpsiyon değerleri kullanılarak ve TBA-MDA kompleksinin molar absorptivitesinden yararlanarak deneyde kullanılan numunelerin lipid peroksit değerleri hesaplandı. Doku homojenizasyonu ve lipid peroksidasyonu tayinindeki toplam seyrelme göz önüne alınarak (90x) doku lipid peroksit düzeyleri nmol/gram yağ doku cinsinden hesaplandı [160].

Glutasyon tayini

Oksijen radikallerinin yapımında artış olması durumunda (oksidatif stres koşullarında) hücrelerde glutasyon konsantrasyonunda düşme görülür. Glutasyonun indirgenmiş formu radikal bağımlı olarak azalacağından, glutasyon konsantrasyonu oksidatif stresin değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılır. Karaciğer homojenatlarında glutasyon düzeyleri modifiye Elman yöntemi kullanılarak tayin edildi [161,162]. Elman reaktifi olarak bilinen ve glutasyon (genelde ise tiyolerin) spektrofotometrik tayininde kullanılan reaktif, simetrik bir disülfid olan 5',5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) bileşiğidir. Tiyol bileşikler DTNB ile tepkimeye girdiğinde DTNB'nin disülfidi ortadan kırılarak tiyol bileşiği ile yeni bir disülfid oluştururken (karışık disülfid), diğer yarısı Tiyonitrobenzoik asit (TNB) şeklinde serbest kalır. TNB sarı renkli bir bileşik olup, 412 nm'deki molar absorptivitesi 13.600'dür. DTNB'nin tepkimeye girdiği tiyol sayısı ile oluşan TNB sayısı arasında bire bir sitokiyometrik ilişki vardır. Bu nedenle deney ortamında oluşan TNB konsantrasyonu ile tepkimeye girmiş tiyol konsantrasyonu birbirine eşit olur.



Şekil 3.2. Glutasyonun tiyol bileşikler ile tepkimesi

Karaciğer glutasyon konsantrasyonu tayini için 1 mL homojenatın üzerine %10'luk TCA çözeltilisinden 1 mL ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Her örnek için süpernatandan 1 mL alınarak üzerine 1 M Tris bazından 0,5 mL ilave edilerek glutasyon tayini için örneklerin nötralizasyonu sağlandı. Bu şekilde örneklerin nötralize edildiği daha önce yüksek hacimlerle yapılan çalışma ile teyit edildi ve ortamın pH'sının 7,5 civarında olduğu görüldü.

Örneklerde GSH ölçümü için tüplere 0,2'şer mL nötralize edilmiş süpernatant ve 0,3 mL Tris tamponu (50 mM, pH 7,4) pipetlendikten sonra üzerine 0,5'er mL DTNB reaktifi ilave edildi. Tüpler karıştırıldıktan 15 dakika sonra absorpsiyonlar 412 nm'de ölçüldü. Kör olarak

örnek yerine 0,2 mL su, 0,3 mL tampon ve 0,5 mL DTNB içeren karışım kullanıldı. TNB'nin molar absorptivitesi ile numunelerin okunan absorpsiyon değerleri kullanılarak ve seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak ölçüm ortamındaki, homojenatın mililitresindeki ve karaciğer GSH konsantrasyonları hesaplandı.

Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) tayini

SOD tayini için Cayman's 706002 numaralı kiti kullanıldı. Çalışma yapılırken üretici firmanın talimatları dikkate alındı. Kitin çalışma prensibi tetrazolium tuzu kullanarak, ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikallerinin saptanmasına dayanır. Bir ünite SOD, süperoksit radikallerinin %50'sinin dismutasyonuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanır. Karaciğer SOD aktivitesi homojenat süpernatandaki miligram protein başına mili ünite (mU/mg protein) olarak hesaplandı.

Kit içeriği ve kullanımı:

Deney Tamponu (DT): 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM DTPA ve 0,1 mM hipoksantin içerir)

Örnek Tamponu (ÖT): 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Radikal Dedektörü (RD): Tetrazolium tuz solüsyonu içerir. Kullanımdan önce DT ile 400 kat sulandırıldı. RD sulandırıldıktan sonra en fazla 2 saat içinde kullanılmalı ve saklama kabı alüminyum folyo ile sarılmalıdır.

SOD Standardı: Sığır eritrositi SOD'u (Cu/Zn SOD). Kullanımdan önce ÖT ile 100 kat sulandırılarak stok SOD standart solüsyonu (sSOD) hazırlanır.

Ksantin Oksidaz (KO): Kullanımdan önce ÖT ile 400 kat sulandırıldı. Sulandırıldıktan sonra KO en fazla 1 saat içinde kullanılmalıdır.

Deneyin yapılışı:

SOD kullanılarak 0-0,25 U/mL aralığında SOD standartları hazırlandı.

Mikroplakaların kuyucuklarına 10 µl standart ve örnekler yüklendikten sonra üzerlerine 200 µl RD konuldu. Tepkimeyi başlatmak üzere kuyucuklara hızlı bir şekilde 20 µl KO eklendi ve kuyucuk içeriklerinin karışması için mikrolaka dikkatli bir şekilde birkaç saniye boyunca sallandı. Mikrolaka, üzeri kapatıldıktan sonra oda ısısında 20 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra örneklerin absorbansı 450 nm’de spektrofotometrik olarak okutuldu.

Örneklerin ve standartların final SOD aktivitesi hesaplanmadan önce, sıfır standardın absorbans değeri, her bir örnek ve standartın absorbansına oranlanarak lineerize absorbans (LRabs) değerleri elde edildi (örn. $LR_{abs}^{örnek1} = 0$ standardın absorbansı / örnek1’in absorbansı)

Daha sonra bu lineerize standart absorbans değerleri kullanılarak final SOD aktivitesine ait standart grafik eğrisi çizdirildi. Örneklerin lineerize absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak her bir örneğin SOD aktivitesi U/mL olarak hesaplandı.

$$SOD (U/mL) = [(LR_{örnek} - y \text{ eksenini kesişim noktası}) / \text{eğim}] \times 0,23 \text{ mL} / 0,01 \text{ mL}$$

Dokuda Glutatyon peroksidaz (GPx) tayini

GPx tayini için Cayman’s 703102 numaralı kiti kullanıldı. Glutathione Peroxidase Assay Kit, glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesini, glutatyon redüktaz (GR) ile birleşik bir reaksiyonla dolaylı olarak ölçer. Kit, biyolojik numunelerde peroksidaz aktivitesini ölçmek için uygun kolorimetrik ve florometrik araçlar sağlar.

Kit içeriği ve kullanımı:

Deney Tamponu (DT): 50 mM Tris-HCl (pH 7,6). ve 5 mM EDTA içerir.

Örnek Tamponu (ÖT): 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 5 mM EDTA ve 1 mg/mL BSA içerir.

Pozitif kontrol (Glutatyon peroksidaz): Sığır eritrosit GPx içerir.

Yardımcı substrat karışımı: Dondurularak kurutulmuş glutatyon ve glutatyon redüktaz içerir.

Glutasyon peroksidaz NADPH: Dondurularak kurutulmuş NADPH içerir.

Glutasyon peroksidaz kümen hidroperoksit: Kümen hidroperoksit içerir.

Deneyin yapılışı:

1. Boş kuyucuk: 70 µl DT, 50 µl yardımcı substrat karışımı ve 50 µl NADPH eklendi.
2. Pozitif kontrol kuyucuk: 50 µl DT, 50 µl yardımcı substrat karışımı, 50 µl NADPH ve 20 µl kontrol GPx eklendi.
3. Örnek kuyucukları: 50 µl DT, 50 µl yardımcı substrat karışımı, 50 µl NADPH ve 20 µl örnek eklendi.
4. Tüm kuyucuklara hızlı bir şekilde 20 µl kümen hidroperoksit eklendi.
5. Birkaç dakika dikkatli bir şekilde çalkalandı.
6. 340 nm'de 5 defa ölçüm yapıldı.

Örneklerin lineerize absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak her bir örneğin GPx aktivitesi nmol/dk/mL olarak hesaplandı.

$$\Delta A_{340/\text{min}} = (A_{340} \text{ time 2} - A_{340} \text{ time 1}) / \text{Time 2 (dk)} - \text{Time 1 (dk)}$$

$$\text{GPx aktivitesi} = (\Delta A_{340/\text{dk}} / 0,00373 \mu\text{M}^{-1}) \times (0,19 \text{ mL} / 0,02 \text{ mL})$$

3.2.4. Histolojik değerlendirmeler

Karaciğer dokusu %10'luk nötral formalinle tespit edildikten sonra artan derecelerde etil alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi ve ardından ksilolde şeffaflandırma işlemi yapılarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alınarak uygun deparafinizasyon ve rehidratasyon aşamalarını takip ederek doku kesitleri boyamaya hazır hale getirildi. Kesitler hematoksilin-eozin ile boyanarak lamalar entellan ile kapatıldı. Boyanan doku örneklerinden Leica DM 4000B

bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi.

Hematoksilen-eozin boyalı karaciğer kesitlerinde histopatolojik parametrelerden steatoz puanlaması (0-3)

- Hepatositlerin %5'inden daha azında yağlanma: 0 puan
- %5 ila %33 hepatositte yağlanma: 1 puan
- %34 ila %66 hepatositte yağlanma: 2 puan
- Hepatositlerin %66'sından fazlasında yağlanma: 3 puan

Alınan karaciğer örneklerinde lobuler inflamasyon puanlaması ise (0-3)

- İnflamatuar hücre birikimi odağı yok: 0 puan
- 200X büyütme alanında 2'den az inflamatuvar hücre birikim alanı: 1 puan
- 200X büyütme alanında 2-4 inflamatuvar hücre birikim alanı: 2 puan
- 200X büyütme alanında 4'den fazla inflamatuvar hücre birikim alanı: 3 puan

Son olarak hepatosellüler balonlaşma dejenerasyon puanlaması (0-2)

- Normal karaciğer: 0 puan
- Az miktarda şişmiş hücreler: 1 puan
- Çok miktarda şişmiş hücreler: 2 puan

Toplam 5-8 arası skorlar non-alkolik steatohepatit için tanısal kabul edildi [163]. Bu değerlendirmeler için daha önce Kleiner ve arkadaşları tarafından belirlenen skarlama sistemi [63] temel alındı ve non-alkolik steatohepatit düzeyi yarı-kantitatif olarak değerlendirilerek gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

3.2.5. İstatistiksel analiz

Deneyler sonucu elde edilen veriler Jamovi istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Uygun bulgular ortalama $\pm$ standart hata olarak verilirken histolojik verilerin analizi için ortanca değer hesaplandı. $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak kabul edildi. Tüm grupların

beraber değerdendirilmesinde tek-yönlü ANOVA testi kullanıldı. Elde edilen sonuçların değerdendirilmesinde Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile posthoc değerdendirilmesi yapıldı. İkili grup karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Histolojik bulgularımızın oksidan-anti oksidan parametreler ve ağırlık ile ilintisi Pearson korelasyon testi ile değerdendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada normal diyet ve yağlı diyetle beslenen sıçanlarda, topiramatin karaciğerde oksidatif metabolizma üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla deney hayvanları 5 gruba ayrılmış, Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtilen şekilde çalışma yürütülmüştür.

4.1. Ağırlık Değişimleri

Çalışmanın başlangıcından ve 10. haftaya kadar deney hayvanlarının ağırlıkları her hafta ölçülerek kaydedildi. Çalışmanın başlangıcında deney hayvanlarının ağırlıkları yaklaşık olarak aynıydı ve ölçülen ağırlıkları yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (Çizelge 4.1). Hayvanların ağırlık değişimleri istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile posthoc değerlendirilmesi yapıldı. 7. haftada ikili grup karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.

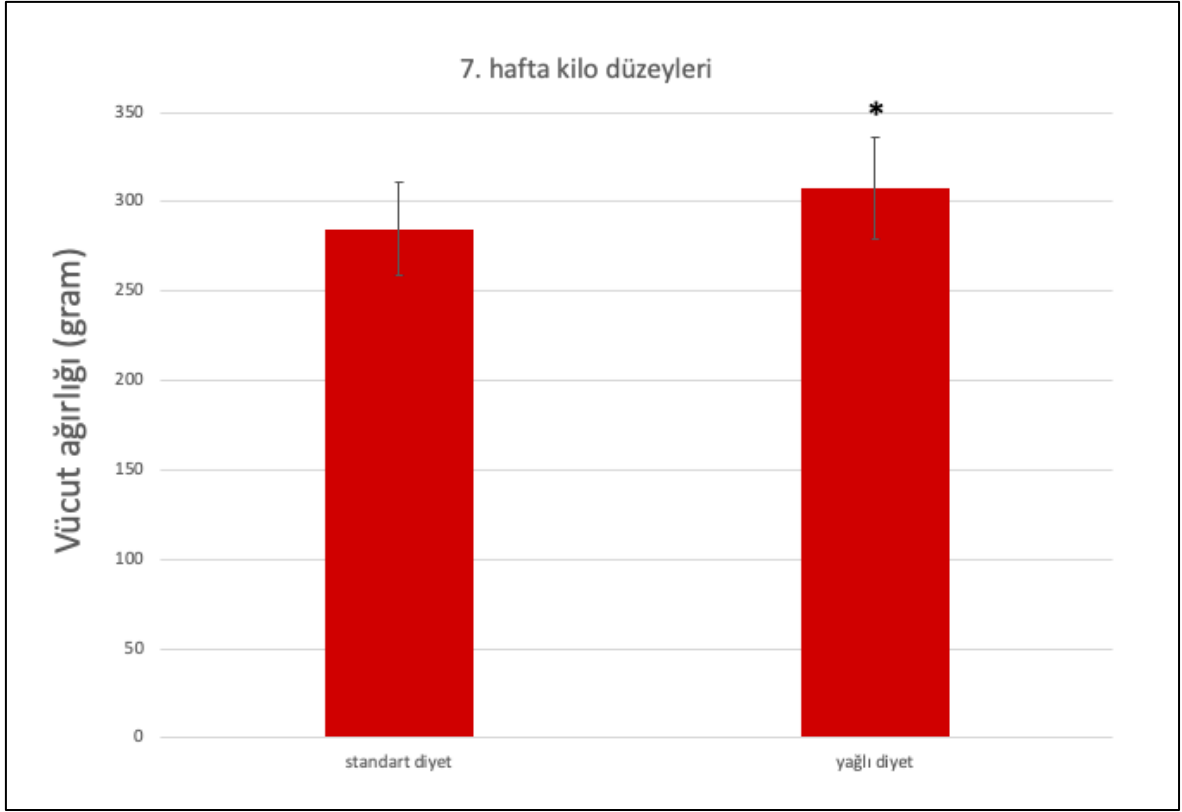
Çizelge 4.1. Deney hayvanlarının başlangıç, yedinci ve onuncu hafta sonundaki gram cinsinden ortalama ağırlık değerleri

Gruplar (gr)	K (n=6)	T (n=6)	D (n=6)	DT(n=6)	DE (n=6)
Başlangıç	224±3	221±18	224±20	221±12	218±12
7. hafta	289±17	289±42	325±19*	306±34	290±20 ^x
10. hafta	307±21	285±38	343±22*	294±38 ^x	304±28 ^x

*Yedinci haftadaki anlamlılık göstergeleri. *Kontrol grubuna göre anlamlılık; ^xD grubu göre anlamlılık göstermektedir.*

*Onuncu haftadaki anlamlılık göstergeleri. *Kontrol grubuna göre anlamlılık; ^xD grubu göre anlamlılık göstermektedir..*

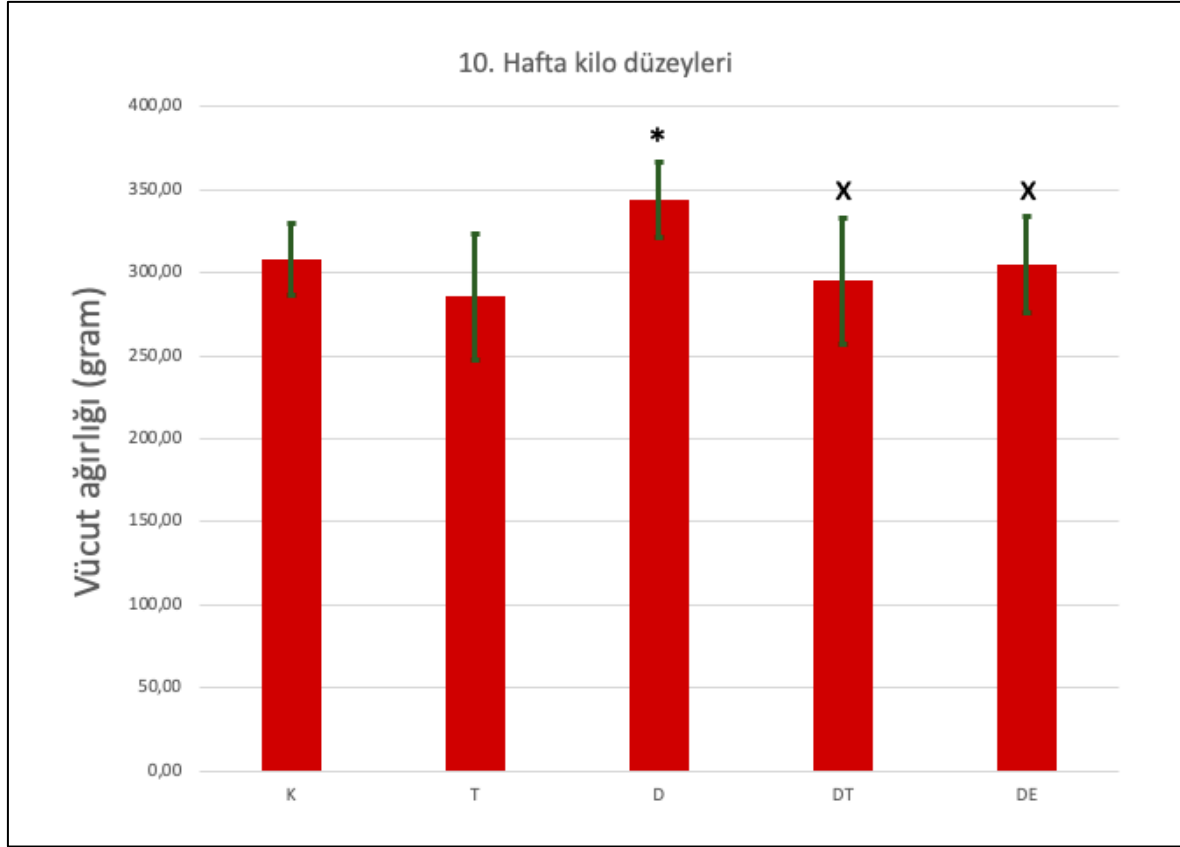
Tedavi başlangıcından önce (7. haftada) normal diyet (kontrol ve TPM grupları) ve yağlı diyet (diyet, diyet + TPM, diyet + vitamin E) olmak üzere 2 farklı grup vardı. Hem normal diyet hem de yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda ağırlık artışı düzenli olarak devam etti (Çizelge 4.1). Bu iki grup ağırlık değişimleri açısından karşılaştırıldığında yağlı diyet alan grup normal diyet alan grubuna göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0,04$, Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Yedinci haftada tedavi başlangıcından önce standart diyet (normal ve TPM grubu) ve yağlı diyet (diyet, diyet + TPM, diyet + Vitamin E) ile beslenen sıçanların ortalama ağırlıklar değişimleri.

*Standart diyet ile yağlı diyet arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

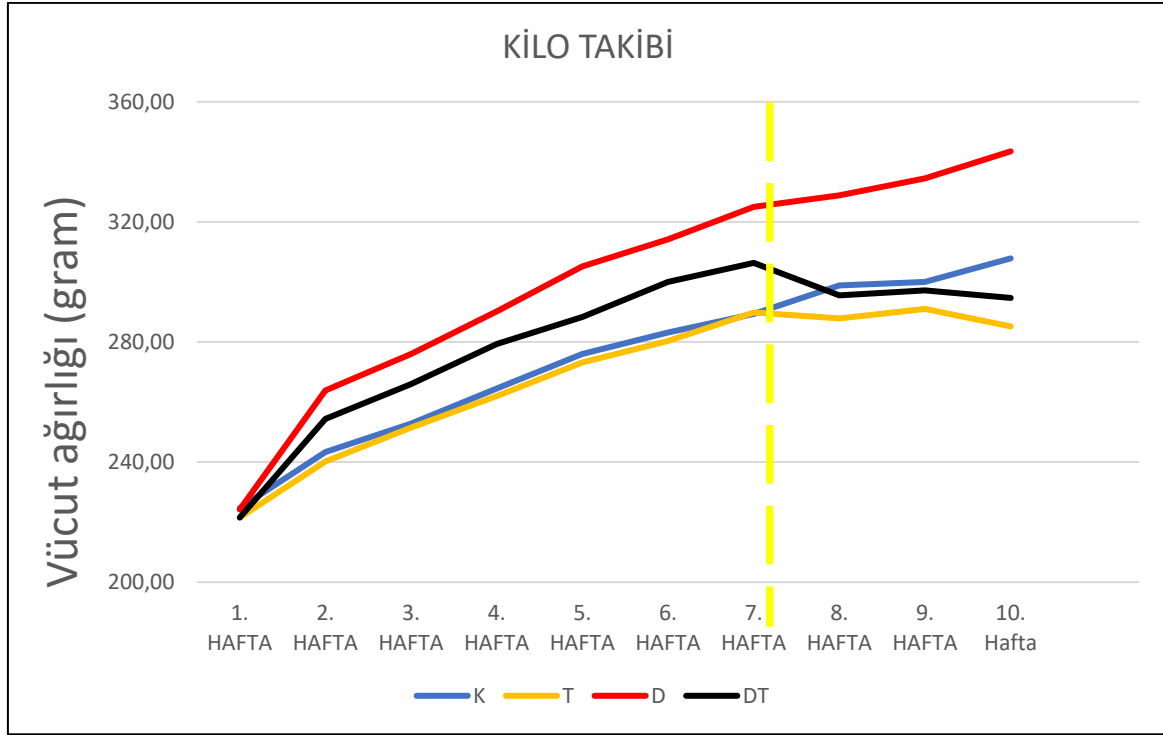
Çalışmada sekizinci haftanın başından itibaren, TPM grubuna her gün oral topiramet, Diyet + TPM grubuna yine oral topiramet ve Diyet + E vitamini grubuna oral olarak vitamin E verilerek her hafta ağırlıkları ölçüldü. Onuncu hafta sonunda grupların ortalama ağırlıkları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Tedavi sonrasında (10. hafta) bakılan ağırlık takibinde ise; kontrol grubu ile sadece Diyet (D) grubunda anlamlı bir fark görülmüştür ($p=0,037$). D grubu ile Diyet + Topiramet (DT) grubu karşılaştırıldığında DT grubunda ağırlık takibi anlamlı olarak daha azdır ($p<0,05$, Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Bütün grupların onuncu hafta sonundaki ortalama ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

**Kontrol grubuna göre anlamlılık; *D grubu göre anlamlılık göstermektedir.*

Farklı gruptaki sıçanların 10 hafta boyunca ortalama ağırlık değişimleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Yedi hafta boyunca yağlı diyetle beslenen hayvanların kilo artışı normal diyetle beslenenlerden fazladır. Yedinci haftadan itibaren normal diyetle beslenip topiramat alan grupta kilo artışı dururken, yağlı diyet alıp topiramat verilen grupta kilo kaybı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. On hafta süresince sıçanların ortalama ağırlıklarının haftalara göre değişimi. Not: Ağırlık takibi grafiğinde grafiğin görsel anlaşılabilirliğini artırmak için DE grubu çıkarılmıştır.

4.2. Kan Şekeri Düzeyleri

Çalışmanın başlangıcından itibaren hayvanlarının kan şekeri her hafta ölçülerek kaydedildi. Deney başlangıcında ölçülen kan şekeri düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (Çizelge 4.2). Hayvanların kan şekeri düzeyleri istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. 7. haftada ikili grup karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.

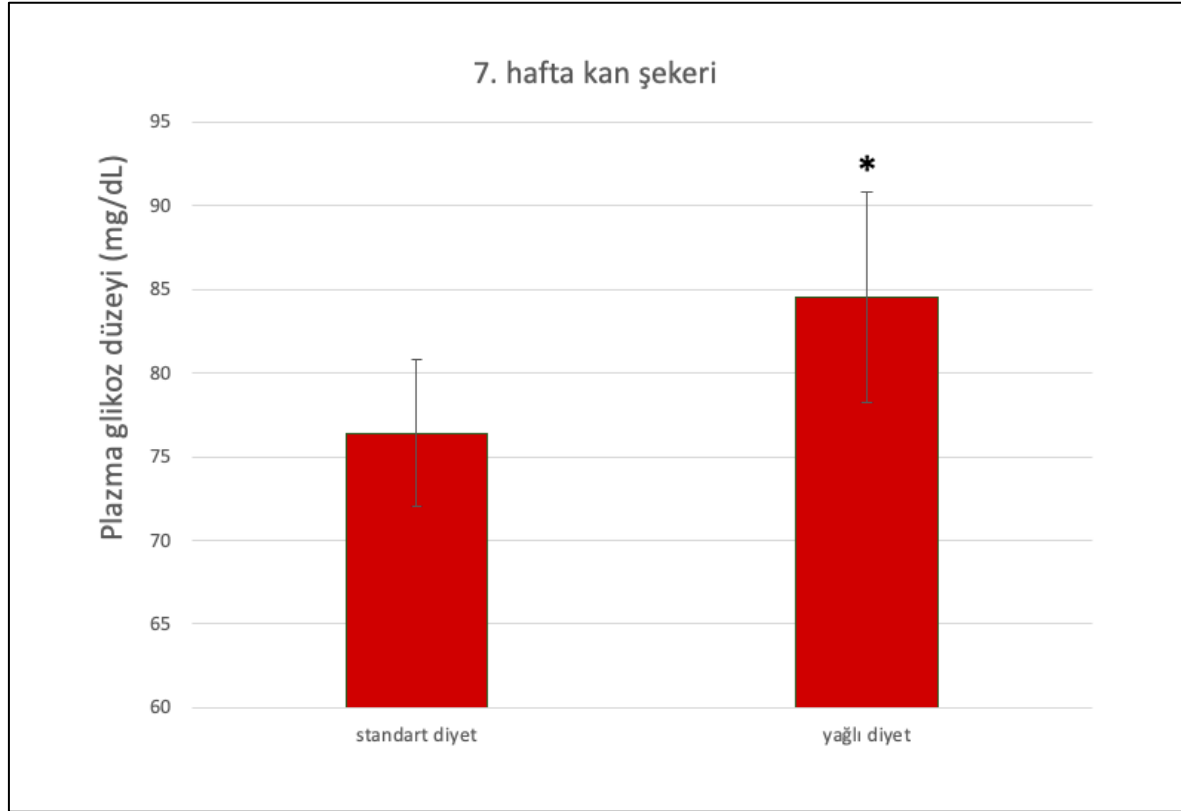
Çizelge 4.2. Deney hayvanlarının başlangıç, yedinci ve dokuzuncu hafta sonundaki mg/dL cinsinden ortalama kan şekeri değerleri.

Gruplar	K (n=6)	T (n=6)	D (n=6)	DT(n=6)	DE (n=6)
Başlangıç	82,83±6,43	88,33±7,34	86,17±5,01	87,50±11,49	89,00±3,78
7. hafta	78,33±4,89	74,50±3,21	85,67±5,28*	84,50±9,31 [#]	83,50±4,18 [#]
9. hafta	74,67±5,65	76,33±4,08	92,17±4,71*	78,00±5,40 ^x	84,50±6,28*

Yedinci haftadaki anlamlılık göstergeleri *Kontrol grubuna göre anlamlılık; [#]TPM grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

Dokuzuncu haftadaki anlamlılık göstergeleri. *Kontrol grubuna göre anlamlılık; ^xD grubu anlamlılığı göstermektedir.

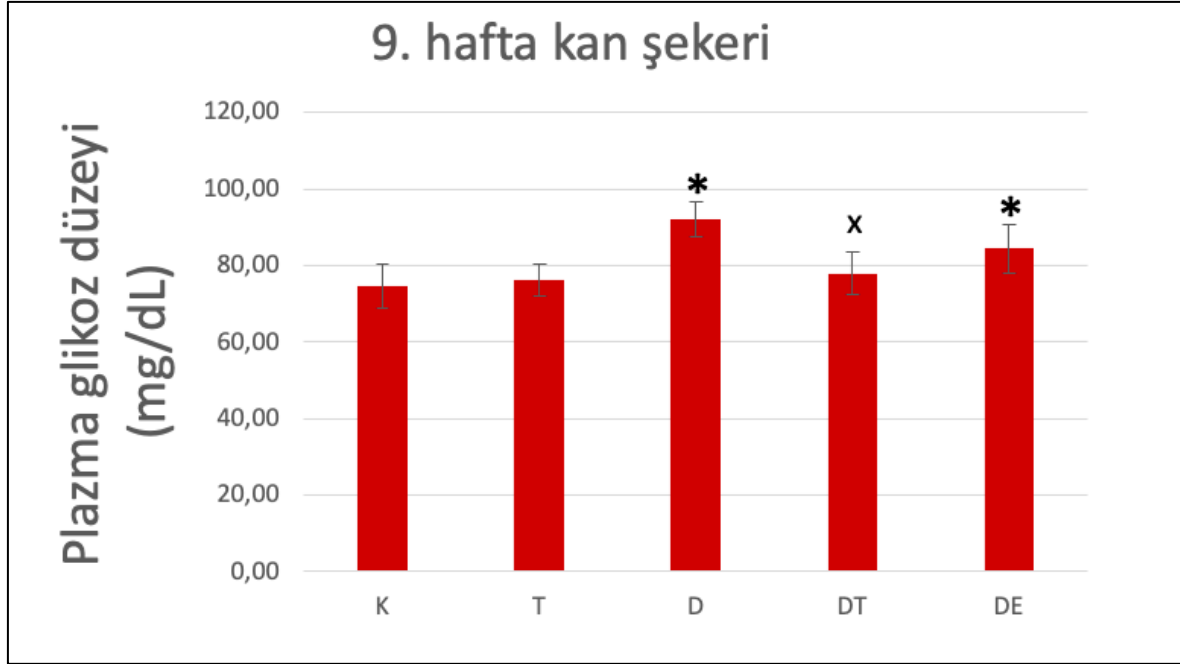
Tedavi başlangıcından önce (7. haftada) normal diyet alan (kontrol ve TPM grupları) ve yağlı diyet alan (diyet, diyet + TPM, diyet + vitamin E) olmak üzere 2 farklı grup vardı. Bu iki grup kan şekeri açısından karşılaştırıldığında yağlı diyet alan normal diyet alanlardan anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0,003$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Yedinci haftada tedavi başlangıcından önce standart diyet (normal ve TPM grubu) ve yağlı diyet (diyet, diyet + TPM, diyet + Vitamin E) ile beslenen sıçanların ortalama kan şekeri değişimleri.

*Standart diyet ile yağlı diyet arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

Dokuzuncu hafta sonunda grupların ortalama kan şekeri düzeyleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Tedavi sonrasında bakılan kan şekeri düzeylerinde ise; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D ve DE gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür (K-D $p<0,0001$; K-DE $p=0,004$). T grubu ile D ve DE grupları karşılaştırıldığında D ve DE gruplarında anlamlı daha fazladır (T-D $p=0,000$; T-DE $p=0,012$). Son olarak D ve DT grupları karşılaştırıldığında diyet grubunda kan şekeri düzeyleri DT grubuna göre daha fazladır (D-DT $p<0,0001$).



Şekil 4.5. Bütün grupların dokuzuncu hafta sonunda ortalama kan şekeri değerlerinin karşılaştırılması

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; *D grubu anlamlılığı göstermektedir.

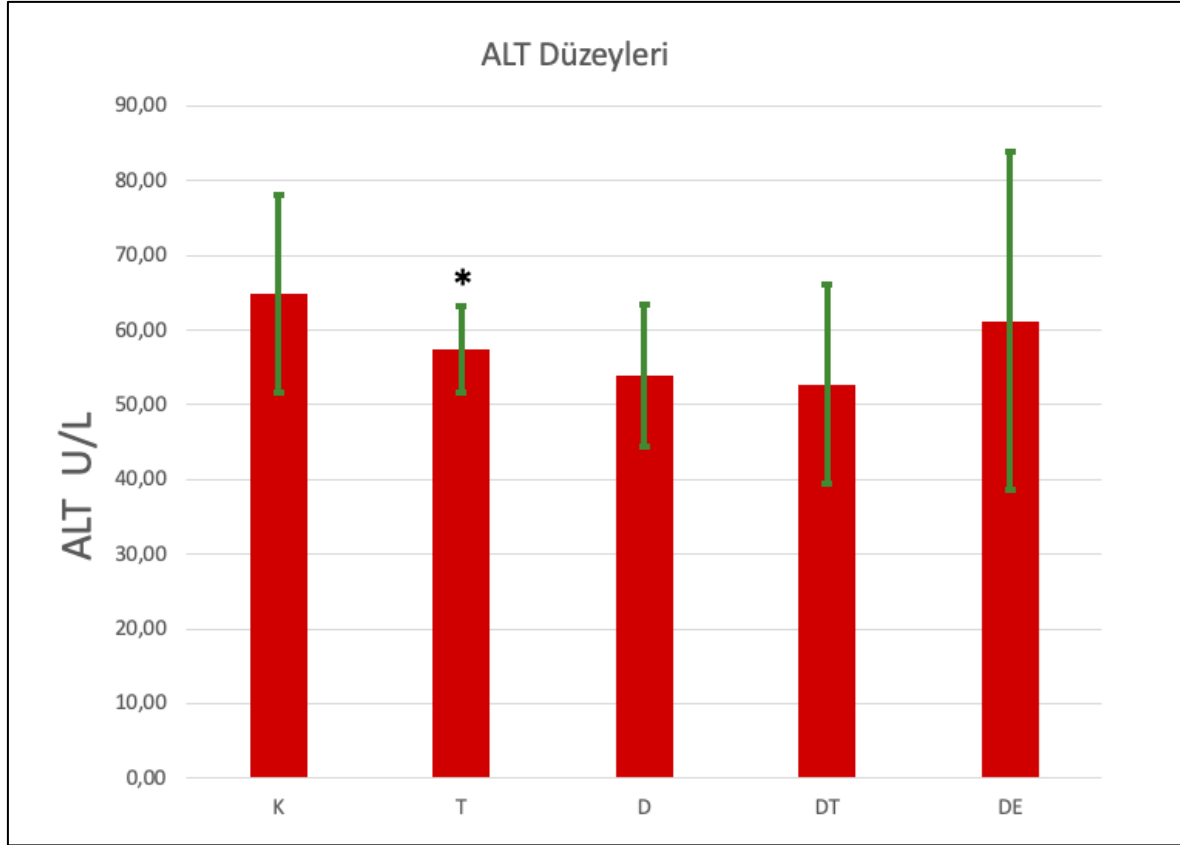
4.3. Alanin Transaminaz (ALT) Düzeyleri

Yüksek yağlı diyet ve topiramatin karaciğer fonksiyonlarına etkisini değerlendirmek amacıyla, karaciğer fonksiyonunu gösteren belirteçlerden serum ALT aktivitesi ölçüldü. ALT düzeyleri istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. ALT düzeylerine bakıldığında sadece kontrol grubu ile T grubu karşılaştırıldığında T grubunda anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p=0,014$). Diğer ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Serum ALT değerleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.3. Serum ALT düzeyleri (U/L)

Gruplar	K(n=6)	T(n=5)	D(n=6)	DT(n=6)	DE(n=6)
Ortalama	64,90	57,40*	53,85	52,75	61,23
Standart hata	13,20	5,77	9,48	13,29	22,56

*Kontrol grubu ile T grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 4.6. Serum ALT düzeyleri

*Kontrol grubu ile T grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

4.4. Aspartat Transaminaz (AST) Düzeyleri

Karaciğer fonksiyon testini değerlendirdiğimiz bir diğer parametre ise AST düzeydi. Serum AST düzeyleri istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. AST düzeylerine bakıldığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; D, DT ve DE gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür (K-D $p=0,015$; K-DT $p=0,001$; K-DE $p=0,000$). Kontrol ve T grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. T grubu ile D grubu arasında anlamlı bir fark yokken; T grubu ile DT grubu karşılaştırıldığında DT gruplarında AST düzeyleri anlamlı daha azdır ($p=0,035$). AST sonuçları için dikkat edilmesi gereken nokta gruplardaki “n” sayısıdır. Bazı gruplarda n sayısı 6’nın altında kalmıştır. Bu durumda istatistiksel verilerin güvenilirliğini sorgulatmaktadır. Farklı gruplarda sıçanların ortalama AST değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Serum AST düzeyleri (U/L)

Gruplar	K (n=4)	T (n=3)	D (n=6)	DT (n=6)	DE (n=6)
Ortalama	140,625	159,300	104,383*	93,683*#	93,500*
Standart hata	11,675	28,472	13,379	10,142	6,271

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; #TPM grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5. Gama Glutamil Transferaz (GGT) Düzeyleri

Çalışmanın başında karaciğer hasar düzeyini tespit edebilmek için GGT düzeyini de ölçmeyi planlamıştık. Ölçümler için Gazi Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarından hizmet alımı yapıldı ancak GGT ölçümleri merkez laboratuvarın kullanmakta olduğu kitlerle güvenilir bir şekilde yapılamadığı için bu parametre çalışma dışı bırakıldı.

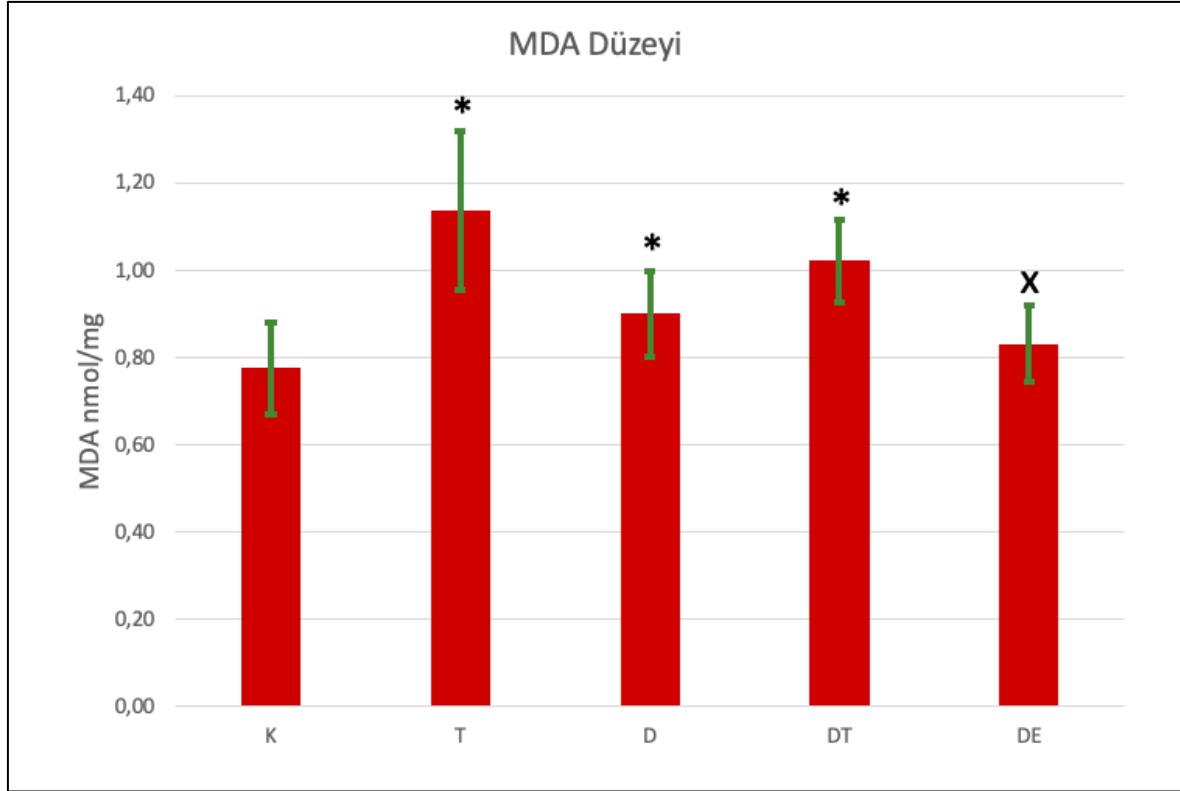
4.6. Lipid Peroksidasyonu/Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Bu çalışmada deney hayvanlarının karaciğerlerindeki lipid peroksidasyonu TBA yöntemi ile tayin edilmiş ve lipid peroksidasyonu düzeyi ‘MDA konsantrasyonu’ şeklinde hesaplanarak verilmiştir. Grupların MDA düzeylerinin karşılaştırılması istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeyleri; T, D ve DT gruplarında anlamlı ölçüde artış göstermiştir (K-T $p < 0,0001$; K-D $p = 0,035$; K-DT $p = 0,000$). Kontrol grubu ile DE grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p = 0,428$). T grubu ile DT grubu arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir ($p = 0,377$). DT grubu ile DE grubu karşılaştırıldığında, DT grubundaki MDA düzeyleri anlamlı olarak daha fazladır ($p = 0,003$). Deney gruplarının karaciğer MDA düzeyleri istatistiksel değerlendirilmeleri ile birlikte Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Deney hayvanlarının nmol/mg cinsinden karaciğer dokusundaki ortalama MDA düzeyleri

Gruplar (nmol/mg)	K (n=6)	T (n=6)	D (n=6)	DT(n=6)	DE(n=6)
Ortalama	0,776	1,138*	0,901*	1,023*	0,831 ^x
Standart hata	0,104	0,182	0,098	0,094	0,088

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; ^xDT grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; *DT grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

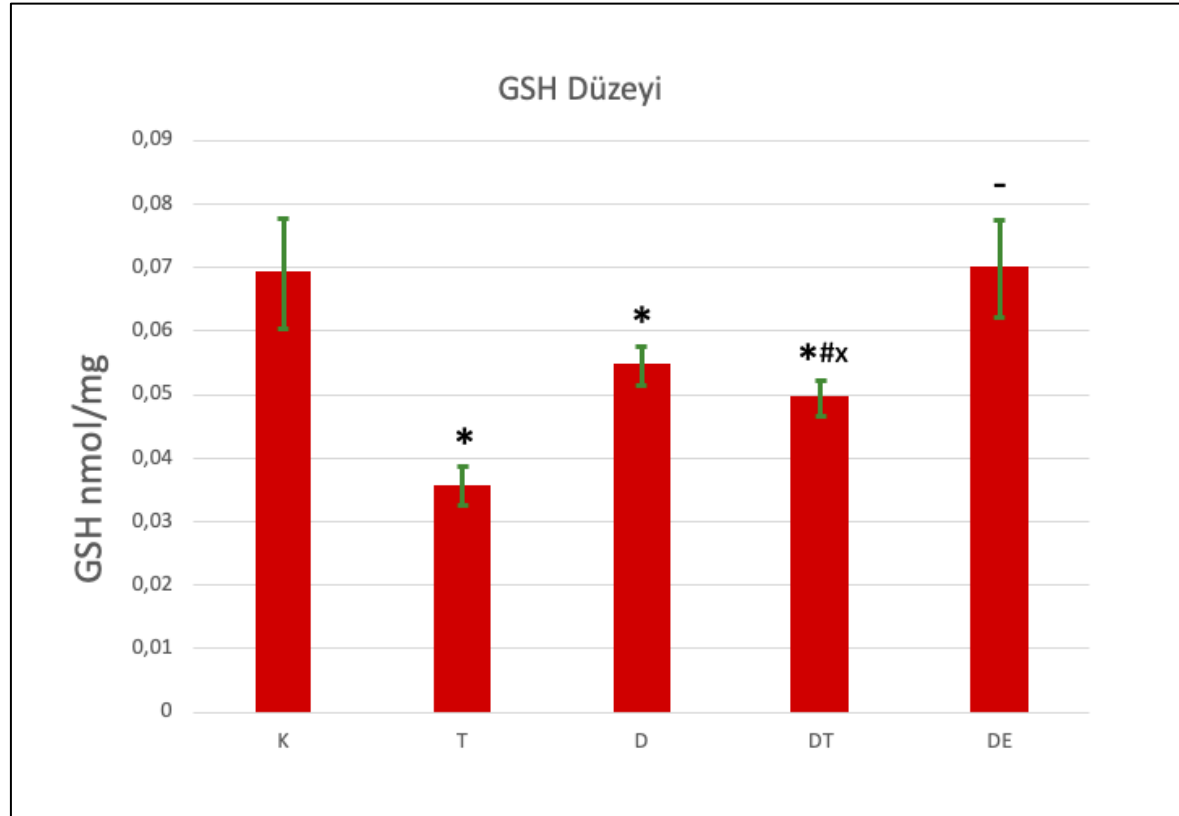
4.7. Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Karaciğer dokusunda ölçülen GSH düzeyleri için istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; T, D ve DT gruplarında anlamlı ölçüde azalma göstermiştir (K-T $p<0,0001$; K-D $p<0,0001$; K-DT $p<0,0001$). Kontrol grubu ile DE grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,785$). DT grubu ile topiramet grubu karşılaştırıldığında GSH düzeyi topiramet grubunda anlamlı ölçüde daha azdır (T-DT $p=0,001$). D ve DT grupları karşılaştırıldığında ise DT grubundaki GSH düzeyi anlamlı olarak daha azdır ($p=0,009$). DE ile karşılaştırıldığında; D ve DT gruplarında anlamlı ölçüde GSH düzeyleri daha azdır (DT-DE $p<0,001$; D-DE $p<0,0001$). Farklı grupların karaciğer GSH düzeyleri istatistiksel değerlendirilmeleri ile birlikte Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer dokusunda nmol/mg cinsinden GSH düzeyleri

Gruplar (nmol/mg)	K (n=6)	T (n=6)	D (n=6)	DT(n=6)	DE(n=6)
Ortalama	69	36*	55*	49*#x	70 ⁻
Standart Hata	9	3	3	3	8

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; #TPM grubuna göre anlamlılık; xD grubuna göre anlamlılık; ⁻DT grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 4.8. Karaciğer dokusunda GSH düzeyleri

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; #TPM grubuna göre anlamlılık; xD grubuna göre anlamlılık; ⁻DT grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

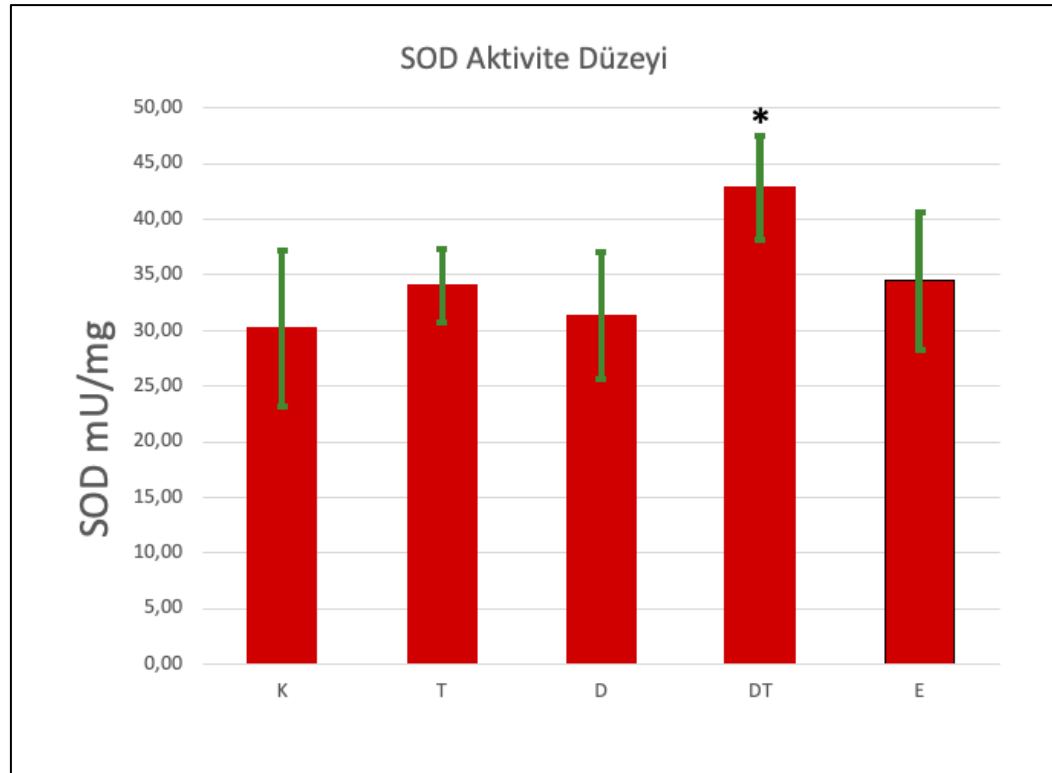
4.8. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

SOD düzeyleri için istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. Kontrol grubu ile T, D ve DE grupları karşılaştırıldığında SOD düzeylerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak kontrol ile karşılaştırıldığında DT grubu SOD düzeylerinde anlamlı bir artış görülmüştür ($p=0,001$). DT grubu ile karşılaştırıldığında T, D ve DE gruplarında SOD düzeyi anlamlı ölçüde daha azdır (T-DT $p=0,007$; D-DT $p=0,001$; DT-DE $p=0,012$). Farklı grupların karaciğer SOD düzeyleri istatistiksel değerlendirilmeleri ile birlikte Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Deney hayvanlarının mU/mg cinsinden karaciğer dokusundaki ortalama SOD düzeyleri

Gruplar	K	T	D	DT	E
Ortalama	30,2	34,0	31,4	42,9*	34,4
Standart hata	7,0	3,4	5,8	4,7	6,2

*DT grubu ile K, T, DT ve DE grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 4.9. Karaciğer dokusunda SOD aktivitesi

*DT grubu ile K, T, DT ve DE grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

4.9. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

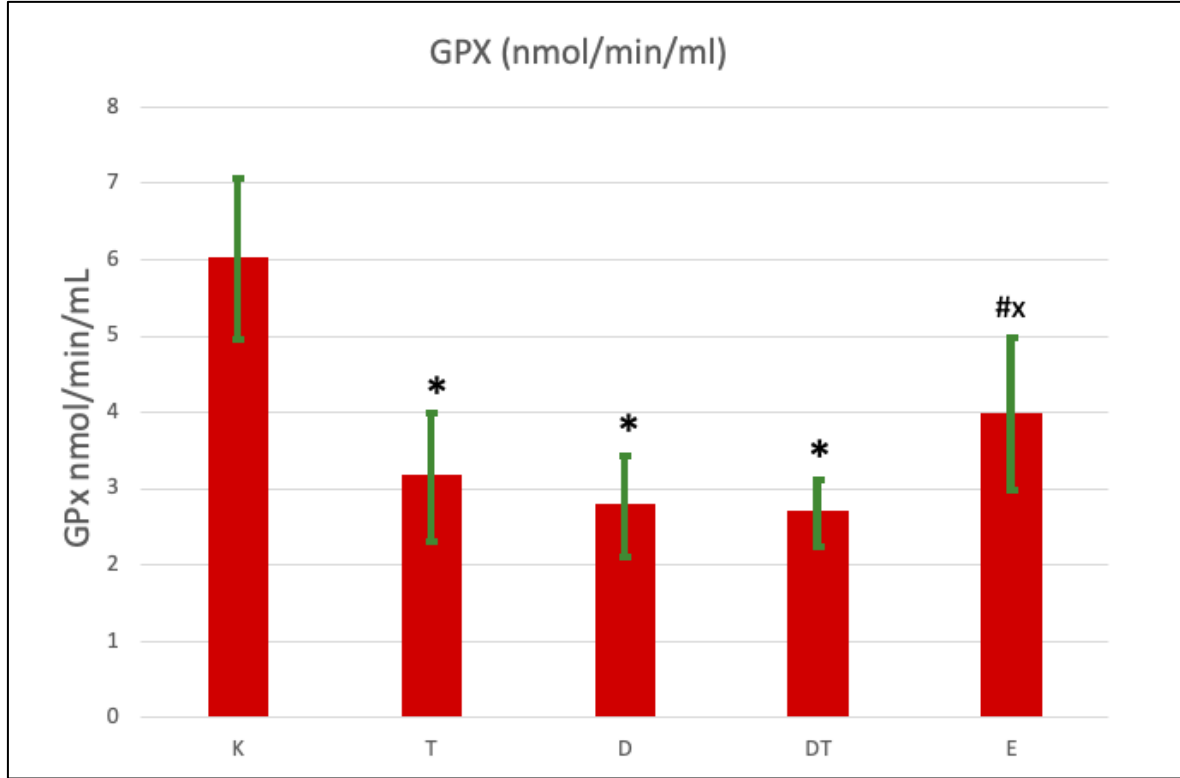
Deney hayvanları karaciğer homojenat süpernatanlarında glutasyon peroksidaz aktivitesi temin edilen ticari kit kullanılarak ölçüldü. Aktivite ölçümü, kit protokolünde belirtilen ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde yapıldı ve yine aktivite hesaplamaları protokolde belirtilen şekilde hesaplandı.

GPx düzeyleri için istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip, Conover-Iman ile post-hoc değerlendirilmesi yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GPx düzeyleri; T, D ve DT gruplarında anlamlı olarak daha düşüktür (K-T $p=0,000$; K-D $p<0,0001$; K-DT $p<0,0001$). Kontrol grubu ile DE grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,056$). DE grubu ile karşılaştırıldığında D ve DT gruplarında GPx düzeyi anlamlı daha azdır (D-DE $p=0,007$; DT-DE $p=0,004$). Farklı grupların karaciğer GPx düzeyleri istatistiksel değerlendirilmeleri ile birlikte Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer dokusunda nmol/dk/mL cinsinden GPx düzeyleri

Gruplar	K	T	D	DT	DE
Ortalama	6,02	3,16*	2,77*	2,68*	3,98 ^{# x}
Standart hata	1,06	0,84	0,66	0,44	0,99

*Kontrol grubuna göre anlamlılık; #D grubuna göre anlamlılık; xDT grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

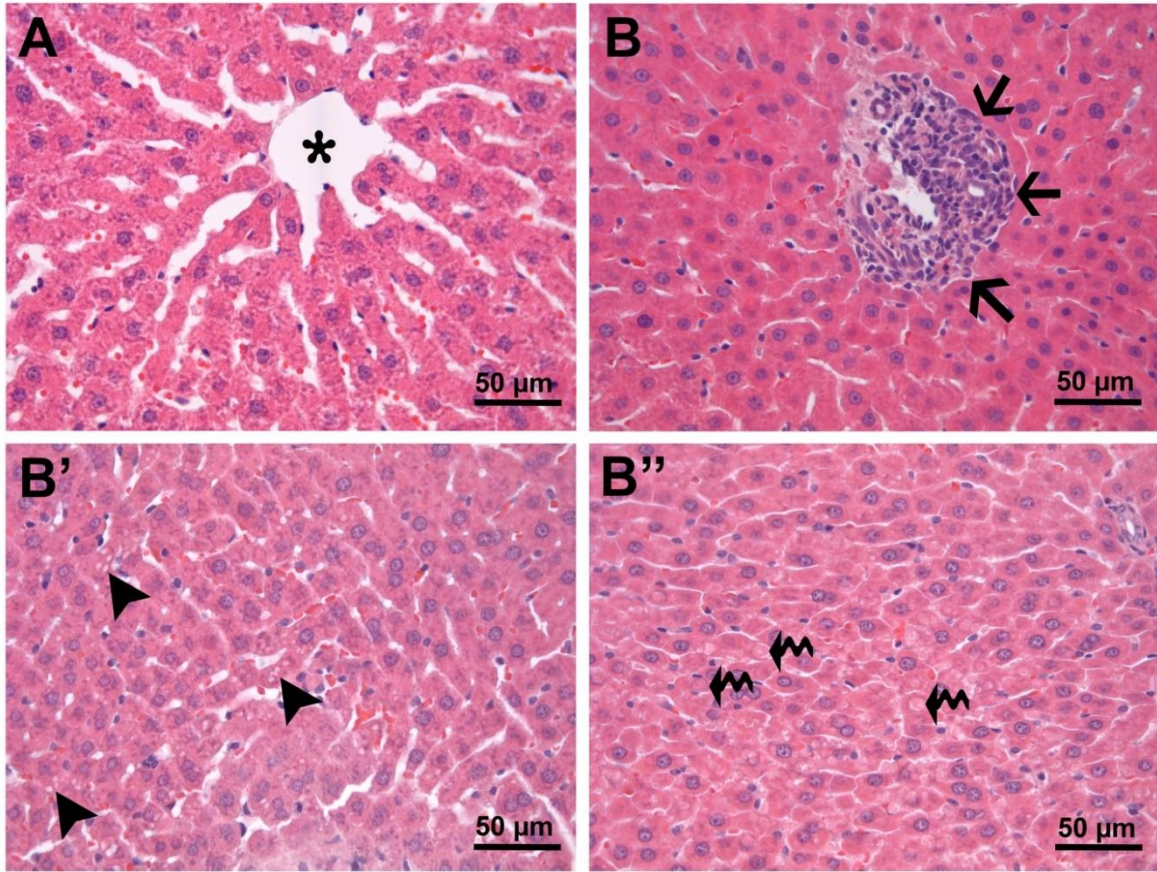


Şekil 4.10. Karaciğer dokusunda GPx aktivitesi

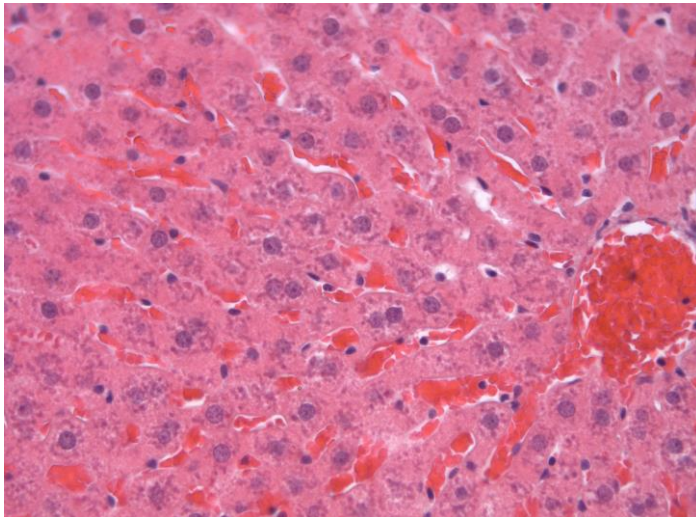
*Kontrol grubuna göre anlamlılık; #D grubuna göre anlamlılık; *DT grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.10. Histolojik Bulgular

Kontrol grubundan hayvanların karaciğer örneklerinde hepatositlerde normal bir histolojik görünüm vardı (Resim 4.1.A). Topiramat grubundan hayvanların karaciğer örneklerinde hepatositlerin yer yer belirgin bir eozinofilik görünüm sergilediği ve dokuda yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu görüldü (Resim 4.1.B). Topiramat uygulanan hayvanların karaciğer kesitlerinde dikkati çeken en önemli değişiklikler hücrelerin bir kısmında hidropik değişikliği düşündüren sitoplazmik vakuollerin varlığıydı, ayrıca yine hücrelerin bir kısmında nukleus hatlarının silikleştiği ve nukleusun soluk boyandığı izlendi (Resim 4.1.B'). Yanı sıra az sayıda karaciğer örneğinde küçük bir hücre grubunda eozinofilik ve globüler sitoplazmik görünüm dikkati çekmekteydi (Resim 4.1.B'').

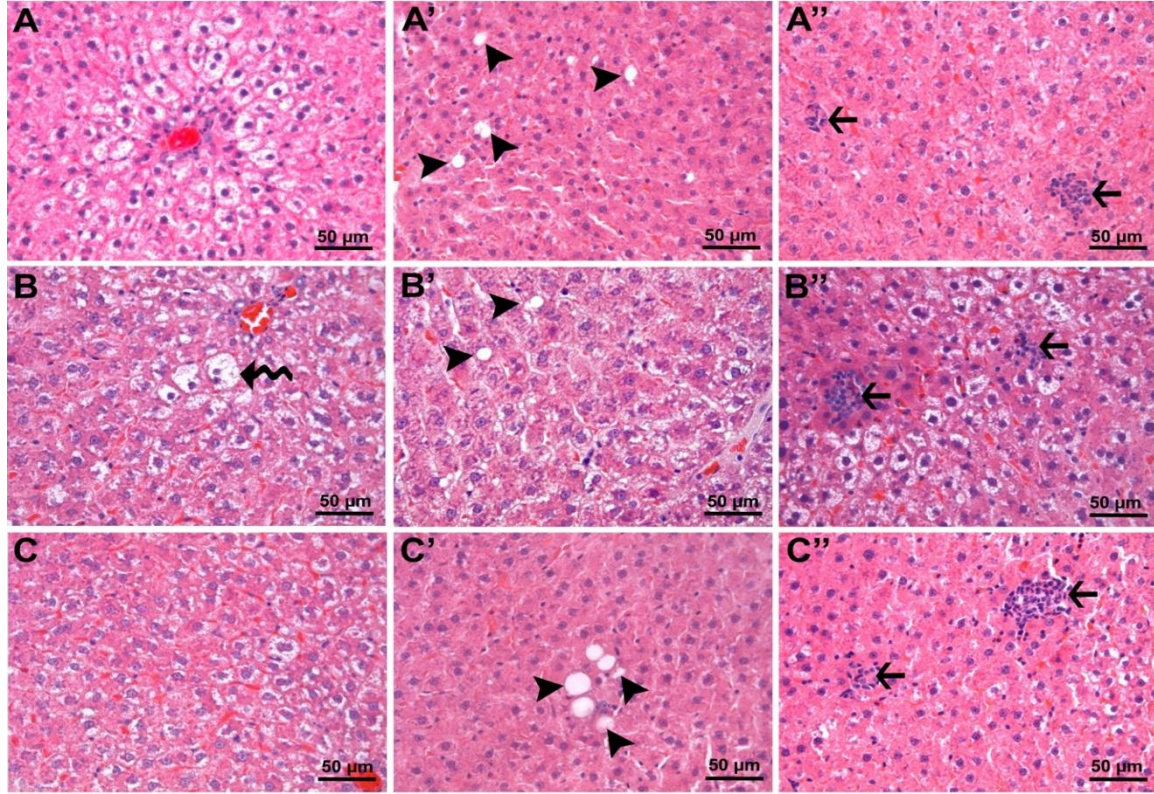


Resim 4.1. Kontrol (A) ve topiramat grubundan (B, B', B'') hayvanların karaciğer doku örneklerinin HE boyalı kesitlerine ait mikrograflar. **A.** Santral ven (asterisk) etrafında ışınsal biçimde hücre kordonları oluşturan normal hepatositler. **B.** Belirgin eozinofilik boyanma gösteren hepatositler ve oklarla gösterilen yoğun bir infiltrasyon dikkati çekmektedir. **B'.** Topiramat uygulanan hayvanların hepatositlerinde değişen derecelerde sitoplazmik vakuoller (ok başları) gözlenmektedir. **B''.** Topiramat grubundan az sayıda karaciğer örneğinde küçük bir hücre grubunda eozinofilik ve globüler sitoplazmik görünüm (kıvrıntılı ok) izlenmektedir.



Resim 4.2. Kontrol grubuna ait normal hepatosit görüntüsü

Diyet gruplarında daha çok mikroveziküler paternde olan yağlanmaya yer yer izole hücreler halinde makroveziküler görünüm de eşlik ediyordu.



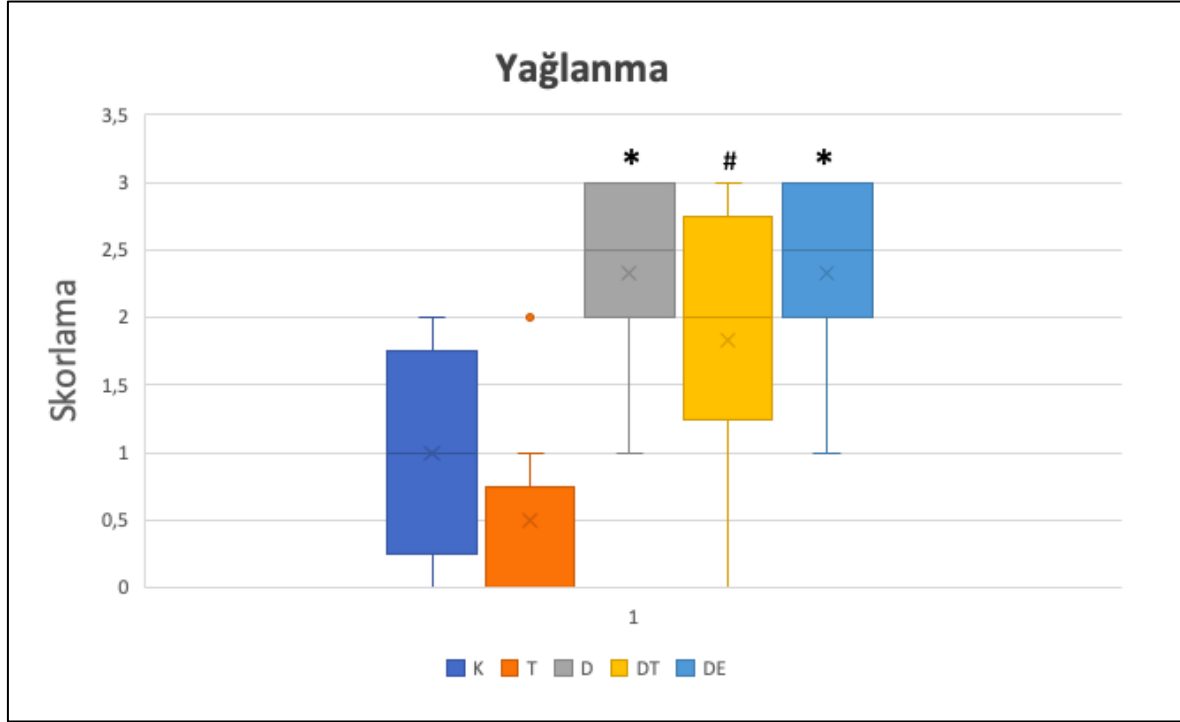
Resim 4.3. Diyet (A, A', A''), diyet + topiramet (B, B', B'') ve diyet +E vitamini (C, C', C'') gruplarındaki hayvanların karaciğer örneklerinin HE boyalı kesitlerine ait mikrograflar ve alkolik olmayan steatohepatit hasarının belirlenmesinde kullanılan steatoz, balonlaşma dejenerasyonu, inflamasyon ve NAS skorunun gruplar arası farklılıklarının karşılaştırılması. Daha çok mikroveziküler birikimlerin görüldüğü kesit alanlarında yer yer makroveziküler birikim paterni (ok başları, A', B' ve C') ve balonlaşma dejenerasyonu (kırıntılı ok, B) izlendi. Gruplar inflamatuvar hücre infiltrasyonu (oklar, A'', B'', C'') bakımından benzerlik gösteriyordu.

Çalışmamızda histolojik olarak steatoz, inflamasyon, balonlaşma ve NAS olmak üzere 4 ayrı skorlama yapıldı. Elde edilen skorlar gruplar arasında karşılaştırıldı. Skor hesaplanırken ortanca veriler kullanıldı ve bu karşılaştırma için de istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ve post-hoc Conover-Iman değerlendirilmesi yapıldı.

Steatoz değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D ve DE gruplarında steatoz skorunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (K-D $p=0,017$; K-DE $p=0,017$). TPM grubu ile

karşılaştırıldığında DT gruplarında steatoz skorlaması anlamlı olarak daha yüksektir (T-DT $p=0,021$). Diyet grubu ile DT grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı (D-DT $p=0,357$).



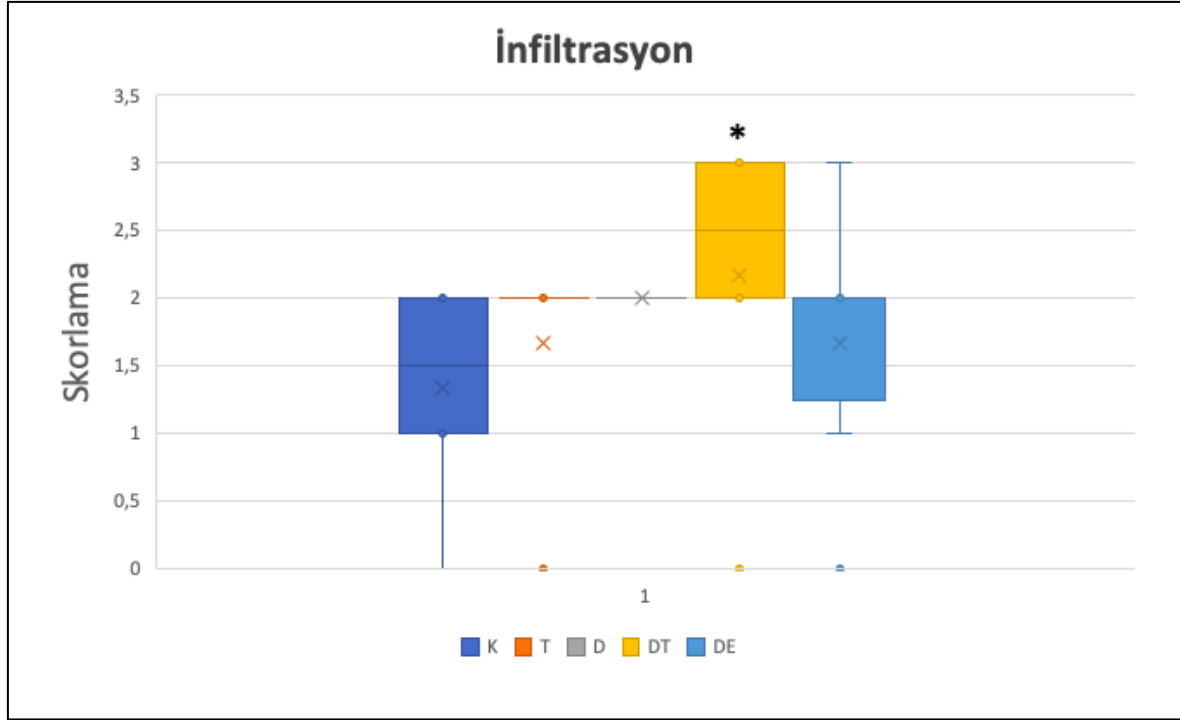
Şekil 4.11. Steatoz değerlendirilmesi

* Kontrol grubu ile D ve DE grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

T grubu ile DT grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

İnfiltrasyon değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece DT grubu arasında anlamlı bir artış gözlenmiştir. (K-DT $p=0,037$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.

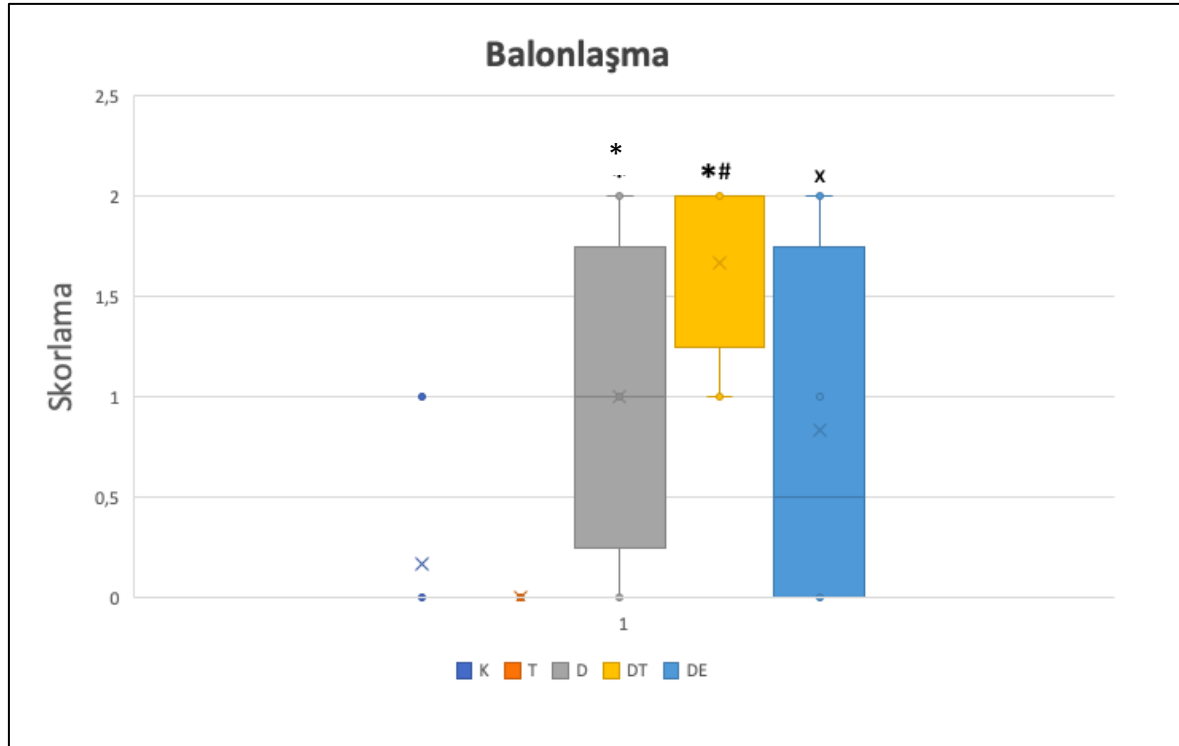


Şekil 4.12. İnfiltrasyon değerlendirilmesi

* Kontrol grubu ile DT grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

Balonlaşmanın değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D ve DT gruplarında balonlaşma skorunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (K-D $p=0,032$; K-DT $p=0,000$). TPM grubu ile karşılaştırıldığında DT grubunda balonlaşma skorlaması anlamlı daha yüksektir (T-DT $p=0,000$). Son olarak DT grubu ile DE grubu karşılaştırıldığında DT grubunda balonlaşma skorlaması anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,032$). Diyet grubu ile DT grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı (D-DT $p=0,095$).



Şekil 4.13. Balonlaşma değerlendirilmesi

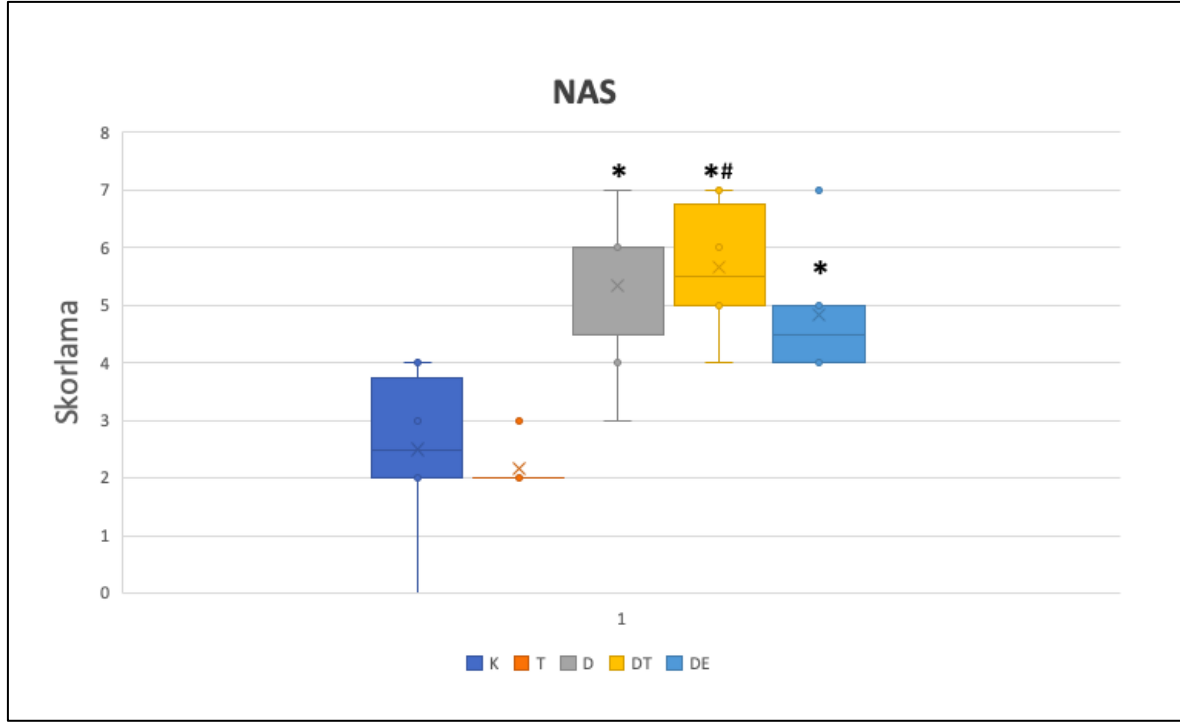
* Kontrol grubu ile D ve DT grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

T grubu ile DT grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

x DT grubu ile DE grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

NAYKH aktivite skorunun değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D, DT ve DE gruplarında NAYKH aktivite skorunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (K-D $p=0,000$; K-DT $p<0,0001$; K-DE $p=0,002$). TPM grubu ile karşılaştırıldığında DT grubunda NAYKH aktivite skorunun anlamlı daha yüksektir (T-DT $p=0,000$).



Şekil 4.14. NAYKH aktivite skorunun değerlendirilmesi

* Kontrol grubu ile D, DT ve DE grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

T grubu ile DT grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

Histolojik verilerin biyokimyasal parametreler ve ağırlık ile korelasyon analizleri yapılmış ancak hiçbir eşleşme arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) tüm dünya çapında en sık görülen karaciğer hastalığıdır ve çalışmalarda prevalansının %25 ila %45 arasında değiştiği bildirilmiştir. Üstelik bu rakamlar gün geçtikçe artan obezite ve diyabet sıklığına paralel olarak artmaktadır [66]. NAYKH'nın metabolik sendrom ve insülin direnci ile yakından ilişkili patogenezi aslında aralarında oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, sitokin/adipokin dengesinde bozulma, lipotoksisite, immün sistemin aktivasyonu ve birçok genetik faktörün de rol aldığı karmaşık bir süreçtir [38]. Obezite tedavisinde kullanılan TPM'nin farklı dokularda oksidan-antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Ancak TPM'nin hem sağlıklı karaciğer hem de NAYKH oluşturulan karaciğer dokusunda oksidan-antioksidan parametreler üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu veriler doğrultusunda biz de bu tez çalışmasında TPM'nin hem sağlıklı karaciğer dokusunda hem de NAYKH oluşturulan karaciğer dokusunda oksidan-antioksidan parametreler üzerine etkisini araştırmak istedik. Ayrıca olası antioksidan etkinliğine bağlı histolojik iyileşme sağlayabilip sağlayamayacağını göstermeyi amaçlamıştık.

5.1. Kullanılan Yönteme Yönelik

5.1.1. Hastalık modeli

Çalışmamızdaki ilk amacımız NAYKH oluşturmaktır. NAYKH için ideal hayvan modeli, insan NAYKH'nın karmaşık etiyopatogenezinin tüm yönlerini ve farklı aşamalarının tipik histolojik bulgularını yansıtmalıdır. İnsan NAYKH'nın doğal seyrine ve patogeneze göre tam ideal bir hayvan modeli olamasa da hayvanlarda NAYKH oluşturmak için yaygın olarak kullanılan birtakım modeller bulunmaktadır. Bu modeller diyet ve genetik modeller olmak üzere ikiye ayrılabilir. Az sayıda NAYKH hastası belirgin genetik kusurlar sergilediği için insan NAYKH'ını taklit etmesi açısından diyet modellerinin daha amaca uygun olduğu kabul edilmektedir. Diyet modelleri arasında yüksek yağ içerikli diyetler, yüksek kolesterol ve yağ içerikli aterosjenik diyetler, yüksek fruktoz ve/veya sükröz içerikli diyetler, metiyonin ve kolinden kısıtlı diyetler ve bunların kombinasyonu yer almaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan diyetlerden biri olan yüksek yağ içerikli diyetin steatoza yol açtığı birçok çalışmada ortaya konulmuştur [38]. Bu nedenlerden dolayı NAYKH oluşturmak amacı ile biz de yüksek yağ içerikli diyeti seçtik. Söz konusu yöntemin başarısı ise deney sürecimiz sonunda kurban edilen hayvanların karaciğer dokusunun histolojik olarak incelenmesi

sonucu ortaya konuldu. Diyet grubundaki tüm hayvanların yağlanma skorunun %5'den fazla olduğu dolayısı ile verdiğimiz yüksek yağlı diyetin NAYKH oluşumunu başarı ile gerçekleştirdiği görülmüştür.

5.1.2. Topiramate verilmiş süre ve dozu

TPM genel olarak antioksidan görülen karakteri nedeni ile birçok hastalık modelinde tedavi amaçlı denenmiş bir ilaçtır. Karaciğerdeki etkilerinin bilinmemesi ve obezite gibi karaciğer patolojilerinin sık görüldüğü bir durumda klinikte kullanılıyor olması, her ne kadar antioksidan etkisi beklense de oksidan hasara yol açma kapasitesi yönünden sorunlu görünmektedir. Nitekim TPM kullanımına bağlı akut karaciğer hasarı rapor eden vaka çalışmaları da bulunmaktadır [164–166].

Çalışmamızda TPM'nin ticari olarak eczanelerde satılan formunu kullandık. Saf TPM maliyetinin yüksek olması, saf formunun dimetil sulfoksit (DMSO) gibi oldukça toksik bir ajanda çözünmesi gerekliliği ve daha önceki yapılan çok sayıda çalışmada ticari formunun başarı ile uygulanması bu yolu seçmemizde etkili oldu. Nitekim TPM'nin ticari formunun içerisindeki etkin madde (TPM) dışında bulunan yardımcı maddeler laktoz monohidrat, mikrokristalize selüloz, sodyum nişasta glikolat, prejelatinize mısır nişastası, magnezyum stearat, karnauba mumu ve opardiy beyaz olup bu yardımcı maddeler incelendiğinde bunların biyolojik sistemlerde herhangi bir etkiye sahip olmayan, non-reaktif inert bileşikler olduğu görülmüştür. Bu maddeler oksidan-antioksidan sistemler dahil olmak üzere bir farmakolojik etkiye sahip değildirler [167]. Bu nedenle insanda ve hayvanlarda güvenli olarak kullanılabilmekte ve sonuçları komplike etmemektedirler.

Çalışmamızda kullandığımız dozu belirlerken, literatürde hayvanlarda TPM'nin farklı dokularda oksidan-antioksidan sistemler üzerinde etkisinin incelendiği çalışmaları baz aldık [7,18,126,127,129,168]. Bununla birlikte literatürde daha düşük [15,130,132] veya daha yüksek doz [133,168] TPM kullanımının da olduğu çalışmalar mevcuttu. Ayrıca TPM'nin obezlerde kilo verdirici etkisine yönelik yapılan doz cevap çalışmasında etkinliği 100 mg üzeri dozlarda daha belirgin olduğu gösterilmiştir [146]. Verilecek dozu belirlerken, söz konusu dozun literatürde sık kullanılmış olmasının ötesinde, insanlarda TPM'nin önerilen maksimum terapötik dozunun 16,7 mg/kg/gün olması ve bunun sıçanlardaki karşılığının 104

mg/kg/gün olması yatmaktadır [18]. Tüm bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda, biz de çalışmamızda “TPM” ve “Diyet + TPM” gruplarına 100 mg/kg/gün dozunda TPM verdik.

Literatürde aynı dozda ancak farklı sürelerde TPM kullanımı mevcuttur. Örneğin, Sarangi ve arkadaşlarının TPM’nin sıçan frontal korteks ve striatumunda oksidan-antioksidan sistemler üzerinde etkisini inceledikleri çalışmada kullandıkları doz ve süre 100 mg/kg/gün ve 45 gün [18]; El Makawy ve arkadaşlarının TPM’nin fare testisinde oksidan-antioksidan sistemler üzerinde etkisini inceledikleri çalışmada kullandıkları doz ve süre 100 mg/kg/gün ve 4 hafta [168]; Armağan ve arkadaşlarının TPM’nin sıçan böbreğinde oksidan-antioksidan sistemler üzerinde etkisini inceledikleri çalışmada kullandıkları doz ve süre ise 50-100 mg/kg/gün ve 1 hafta idi [7].

Literatürde süreden bağımsız olarak farklı dokularda uygulanan TPM’yi oksidan veya antioksidan etkili bulan çalışmalar mevcuttur. Yine literatürde TPM yaygın olarak 3 hafta (21 gün) kullanılmıştır. Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda TPM’yi 21 gün boyunca 100 mg/kg/gün uygulamayı uygun gördük.

5.1.3. E vitamini dozu

E vitamini en iyi bilinen antioksidanlar arasında yer almaktadır. Serbest radikalleri inaktive ederek ve lipid peroksidasyonunu azaltarak antioksidan etkinliğini gösterir. Bu özellikleri nedeni ile hepatik inflamasyonu baskılaması amacıyla NAYKH’lı hastalarda da kullanılabilmektedir [73]. Yaptığımız çalışmada hipotezimiz karaciğer dokusunda TPM’nin antioksidan olacağı yönündeydi. Bu nedenle TPM’nin olası antioksidan etkinliğini de bilinen bir antioksidan olan vitamin E ile de karşılaştırmayı hedefledik. Literatürde birçok çalışmada 100 ila 500 mg/kg/gün dozunda ve 3 ila 4 hafta süresince oral yol ile verilen E vitaminin antioksidan etkinliği başarı ile ortaya konulmuştur [169–175]. Buna dayanarak çalışmamızda “Diyet + Vitamin E” grubuna 3 hafta boyunca 250 mg/kg/gün dozunda oral E vitamini verdik.

5.2. Bulgulara Yönelik

5.2.1. Ağırlık değişimi

Çalışma boyunca haftalık ağırlık takipleri gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta hiçbir grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken 7. haftada (tedavi başlangıcı öncesi 6 haftalık diyet sonunda) yüksek yağlı diyet tüketen grupların ağırlık ortalamasının standart diyet tüketen gruplara kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar NAYKH oluşturmak amacı ile verilen diyetin standart diyete kıyasla daha yüksek enerji içermesine bağlı olup beklenti dahilindedir.

10. haftada yapılan ağırlık karşılaştırmalarında her ne kadar “TPM” grubunda kontrole kıyasla azalma görülmüş olsa da bu iki grup arasında istatistiksel olarak bir anlamlı fark elde edilmemiştir. Ancak aynı haftada yapılan karşılaştırmalarda “Diyet + TPM” grubunda sıçanların ağırlığının “Diyet” grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. TPM’nin ağırlık üzerindeki negatif etkisinin obez deneklerde, normal deneklerdekenden daha belirgin olduğu bu bulgular doğrultusunda söylenebilir. TPM’nin obezite tedavisinde kullanılan bir ilaç olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu sonuçlar oldukça anlamlıdır ve literatür ile uyumludur [144–147]. TPM’nin anti-obezite etkisi bu açıdan çalışmamızca da doğrulanmıştır.

Ayrıca E vitamini alan grup diyet grubuna göre 10. hafta sonunda daha düşük ağırlıklara sahipti. Bu bulgu E vitaminin antioksidan olmasına ek olarak anti-obezite etkili de olduğu ve metabolik sendrom ile ilişkili durumların önlenmesinde etkili olabileceğini bildiren çalışmalarla uyumludur [176,177].

5.2.2. Kan şekeri değişimi

Sıçanlar için kan şekeri normal değerleri 50-115 mg/dL arasındadır. Başlangıçta yapılan karşılaştırmada gruplar arasında ağırlık takibinde olduğu gibi kan şekeri düzeylerinde de istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ve tüm değerler normal sınırlar dahilindedir. Yedinci haftada yapılan karşılaştırmada yüksek yağlı diyet tüketen grupların kan şekerlerinin standart diyet tüketen gruplara kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi bu fark

istatistiksel olarak farklı olmasına rağmen halen yağlı diyet alan hayvanların kan şekeri düzeyleri dahil olmak üzere tüm veriler normal aralıktaydı.

Ağırlık takibinden farklı olarak 10. hafta verileri yerine kan şekerinde 9. hafta verileri kullanılmıştır. Bunun nedeni çalışmamızda aslında sakrifikasyon öncesi yapılan anestezi uygulamasından önce yapılması gereken kan şekeri ölçümünün, hatalı olarak bazı hayvanlarda anesteziden sonra yapılmış olması ve bu ölçümlerin hatalı sonuç vermiş olmasıdır. Bu durumdan dolayı 10. hafta verilerini kullanamadık.

Dokuzuncu haftaya geldiğimizde ise “Diyet” grubunun kan şekerlerinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Her ne kadar diyet gurunda kan şekeri artmış olsa da bu gruptaki tüm hayvanların kan şekerleri halen normal aralıktaydı. Bu durum verdiğimiz diyetin sıçanlarda diyabet oluşturmada NAYKH oluşturduğunu göstermektedir. Diyabet tek başına oksidan hasarın artmasına yol açacak bir patolojidir. Kullandığımız diyetle diyabet oluşturmada yağlı karaciğer tablosunu oluşturabilmemiz bulgularımızda karıştırıcı olabilecek bir faktörü elimine etmemizi sağladı.

Buna ek olarak yine 9. haftada “Diyet + TPM” grubunun kan şekerlerinin “Diyet” grubundan düşük olması TPM’nin kilo verdirici etkisinin yanında kan şekeri düzenlenmesine de olumlu katkısının olduğunu düşündürür ki Wilkes ve arkadaşları tarafından 2005’te benzer bulgular rapor edilmiştir [178].

Vitamin E grubunun 9. hafta sonunda kan şekerleri “Diyet” grubuna kıyasla daha düşük olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Nitekim Kim ve arkadaşları yüksek yağlı diyetle beslenen bir hayvan modelinde E vitamini takviyelerinin kan şekeri düzeyleri üzerindeki etkilerine bakmış ve E vitaminin hiperglisemi üzerinde etkisi olmadığını bulmuştur [179]. Diğer taraftan literatürde E vitamininin yüksek yağlı diyet sonrası uygulanan vitamin E’nin kan şekeri düzeylerini düşürücü etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [180,181].

5.2.3. Karaciğer fonksiyon testleri

ALT değerinin artması beklenirken bizim çalışmamızda yağlı karaciğer oluşmuş olmasına rağmen bu değer beklenenin aksine düşüş eğilimindeydi. Bu bulgu beklentilerimizin

dışındaydı çünkü literatürde NAYKH karaciğer fonksiyon testleri arasından en çok artmış ALT düzeyi ile ilişkilendirilmektedir [67]. Bulgularımızdaki farklılık çalışma süremizin kısalığından kaynaklanmış olabileceği gibi ALT ölçüm yöntemimizden de etkilenmiş olabilir.

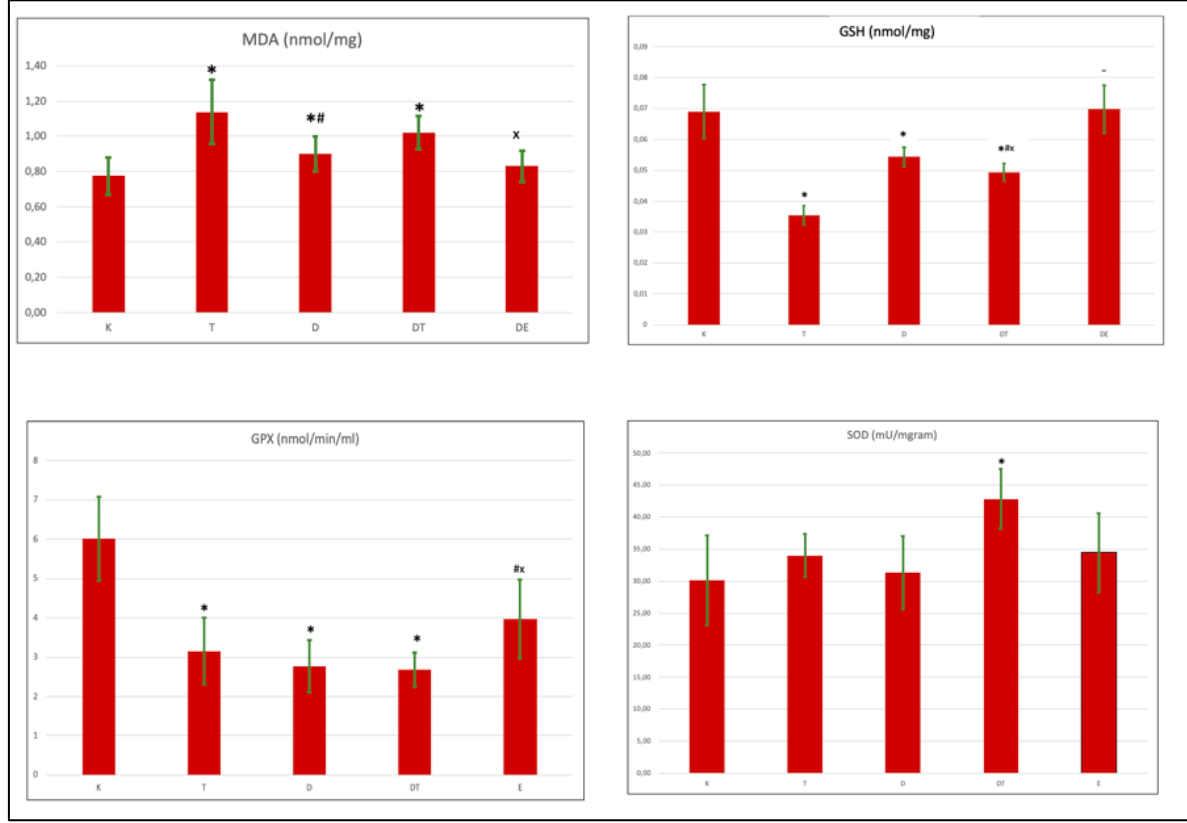
Literatürde TPM'nin karaciğer fonksiyon testleri üzerine etkisi ile ilgili çok kısıtlı veri bulunmaktadır. Ancak ilaç olarak kullanımı öncesi yapılan güvenilirlik çalışmaları genel olarak TPM kullanımı ile karaciğer fonksiyon testlerinin etkilenmediğini göstermektedir [182]. Bu etki muhtemelen karaciğerde metabolize olma oranının düşüklüğünden kaynaklanmaktadır [183].

İlaç güvenilirlik çalışmaları karaciğer fonksiyon testlerinde görülebilecek bir yükselmeye odaklandığı için ters yönde bir etkiyi genel olarak rapor etmezler. Bu TPM kullanan grupta gördüğümüz ALT düzeyindeki düşüşü karşılaştırmalı olarak tartışmamızı zorlaştırmıştır. TPM ile ALT arasında bizimkine benzer sonuçlar rapor eden ulaşabildiğimiz tek çalışmada TPM yüksek yağ ve fruktozlu diyetin neden olduğu ALT yükselmesini azalttığını göstermektedir [184].

5.2.4. Oksidan-antioksidan biyokimyasal parametreler

NAYKH gelişiminde oksidatif stresin önemi bilinmektedir ve NAYKH gelişen gruplarda buna yönelik bulguların tespit edilmesi beklenir. Çalışmanın “Diyet” grubu hayvanlarının MDA düzeylerinin kontrole kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olması yüksek yağlı diyet sonucu karaciğerde oksidatif stresin arttığı anlamına gelmektedir. Benzer şekilde literatürde bir çok çalışma yüksek yağlı diyetin karaciğerde oksidatif stresi arttırdığını bildirilmiştir [177,185–187]. Hatta Zelber-Sagi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kullandıkları regresyon analizi ile artmış serum MDA düzeyleri ile NAYKH arasında belirgin ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [188]. Bizse yaptığımız korelasyon analizlerinde MDA ile karaciğer yağlanma düzeyi ya da karaciğer hasarı gösteren diğer histolojik parametreler arasında anlamlı bir ilinti gösteremedik. Bu çalışmada korelasyon analizi yapılırken her hayvan için MDA düzeyi olduğu gibi kullanılarak yağlanma miktarının NAS’a göre belirlenen değerleriyle arasındaki ilişkisi sorgulandı. Zelber-Sagi ve arkadaşlarının 394 kişiyi kapsayan çalışmasında ise MDA düzeyi üç gruba ayırıp NAYKH ise sadece var-yok şeklinde değerlendirilerek istatistiksel analiz yapılmıştır. İstatistiksel metottaki farklılık ve denek sayımızın hayvanlarla çalışıyor

olmamız nedeni ile az olması MDA ile karaciğer yağlanma düzeyi arasındaki olası ilintiyi bu çalışmada tespit edememiş olmamıza neden olmuş olabilir.



Şekil 5.1. Oksidan-antioksidan parametrelere ait tüm veriler

Yüksek yağlı diyet oksidatif hasarı artırdığı gibi antioksidan kapasitede de azalmaya yol açar. Bu durum birçok çalışmada GSH düzeyi ve GPx aktivitesinde azalma şeklinde karşımıza çıkmaktadır [177,186,187]. Bu çalışmada da literatürle uyumlu şekilde hem GSH düzeyindeki azalma ile hem de GPx aktivitesindeki düşüş ile yağlı diyet alan hayvanlarda antioksidan kapasitenin azaldığı gösterilmiştir.

Diğer taraftan çalışmamızda yine bir antioksidan kapasite göstergesi olarak kabul edilen SOD aktivitesinde yağlı diyet uygulaması ile bir değişiklik saptayamadık. Bu konudaki literatür incelendiğinde yüksek yağlı diyetin 10 hafta kullanıldığı bazı çalışmalarda beklendiği gibi SOD aktivitesinin düştüğü [11,189] gösterilmiştir. Diğer taraftan Jarukamjorn ve arkadaşları 2 – 4 ve 8 hafta uyguladıkları diyet ile tüm deney gruplarında kontrole göre SOD aktivitesinde artış göstermiştir. Aynı zamanda söz konusu çalışmanın ilk iki gruptaki SOD aktivite düzeyi 8. haftadan daha da yüksektir. Jarukamjorn ve arkadaşlarının çalışmasında önceki gruplarında gözlemledikleri istatistiksel olarak da

anlamli trendin devam edeceği varsayılırsa 10. haftada ilk haftalarda artmış olan SOD aktivite düzeyini kontrol değerlerine geri dönmüş olarak bulacak olmaları olasıdır [190]. Bizim çalışmamızın bulguları Jarukamjorn ve arkadaşlarının raporu ile literatürde bulunan diğer çalışmaları birbirine bağlayan bir köprü oluşturabilir.

Bu tez çalışmasının birincil hipotezi topiramatin anti oksidan etki yapacağı yönündeydi. Ancak sadece topiramat verilen hayvan grubunun MDA, GSH ve GPx aktivitesi ile ilgili verileri bu hipotez ile çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. Şöyle ki, MDA'yı artırıp, GSH ve GPx aktivitesini azaltarak TPM tek başına karaciğer üzerinde belirgin oksidan etki göstermiştir.

TPM'nin oksidan-antioksidan sistemler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar elde edildiği bilinmektedir. TPM'nin bazı çalışmalarda [12,18,19,135] oksidatif stresi arttırdığı, bazı çalışmalarda [7,15–17,126–134,136,191] ise azalttığı rapor edilmiştir. Daha da ilginç olanı bu çelişkili sonuçlar aynı dokuda gerçekleşen incelemelerde de ortaya çıkmıştır. Örneğin Agarwal ve arkadaşları fare beyninde TPM alan deneklerde MDA düzeylerini artmış olarak bulmuşken; Price ve arkadaşları benzer koşullarda lipid peroksidasyonu yan ürünlerinin azaldığını göstermiştir [12,15]. Bu çalışmalar sıçanlar üzerinde yapıldığında da çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir [18,128]. Üstelik bu farklılıkların nedenini verilen TPM dozu ile de açıklamak mümkün değildir; örneğin sıçanlarla çalışan Sarangi ve arkadaşları da, Motaghinejad ve arkadaşları da TPM'yi 100 mg/kg/gün dozunda vermiş fakat zıt sonuçlar rapor etmişlerdir [18,128]. Olası bir açıklama verilış süresi ile ilgili olabilir. TPM'nin oksidan etki gösterdiğini söyleyen Agarwal ve arkadaşları TPM'yi 5 hafta, Sarangi ve arkadaşları ise 45 gün süre ile vermişken, antioksidan etkinliği olduğunu savunan Price ve arkadaşları ile Motaghinejad ve arkadaşları TPM'yi 3 hafta süre ile uygulamıştır. Lipid peroksidasyonu ile ilgili bulgular bahsedilen tüm bu çalışmalarda GSH düzeyleri ile uyumlu bulunmuştur. Kısaca TPM'nin oksidan etki gösterdiğini söyleyen çalışmalarda GSH azalmışken antioksidan etkili olduğunu gösterenlerde GSH artmış olarak rapor edilmiştir.

Glutasyon peroksidaz, elektron donörü olarak GSH'yı kullanan ve hücrelerde oluşan çeşitli peroksitlerin seviyelerini azaltan antioksidan bir enzimdir. Oksidatif stresin GPx aktivitesinde azalmaya yol açabildiği bilinmektedir [112]. Motaghinejad ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metilfenidat ile indüklenen oksidatif stres sonucunda beyin dokusunda GPx aktivitesinin azaldığı bulunmuştur [126]. Aynı çalışmada TPM verilen gruplarda GPx

aktivitesi kontrol düzeyine geri dönmüştür. Yine Jafari ve arkadaşları sıçanlarda testis torsiyonu/detorsiyonu yaparak bir iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturmuş ve ortaya çıkan bu oksidan ortamda benzer şekilde GPx aktivitesinin azaldığını, TPM'nin bu etkiyi normalize ettiğini bulmuştur [134]. Diğer taraftan bizim ulaşabildiğimiz kadarı ile TPM'nin oksidan etkisi olduğunu gösteren çalışmalar GPx aktivitesini değerlendirmemiştir. Bizse çalışmamızda TPM'nin oksidan etki gösterdiğini ve bu bulgunun GPx aktivitesinde azalma ile de desteklendiğini gösterdik.

Yağlı diyet grubunda olduğu gibi TPM grubunda da SOD aktivitesinde anlamlı bir değişik gözlemleyemedik. Benzer şekilde TPM'nin oksidatif stresi arttırdığını bildiren çalışmalardan bazıları SOD aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını rapor etmiştir [12,18]. Diğer taraftan TPM'nin antioksidan etkili olduğunu ileri süren çalışmalarda genellikle SOD aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda TPM'nin SOD üzerindeki etkisinde görülen değişkenlik daha önce yağlı diyetin SOD aktivitesi üzerindeki etkilerini tartıştığımız bölümde olduğu gibi süre bağımlı bir değişkenlik olabilir. Akılda tutulması gereken bir diğer nokta ise SOD'un vücutta en fazla bulunan antioksidan enzim olarak bunun düzeyinde değişiklik olabilmesi için dokunun yüksek şiddette oksidatif strese maruz kalması gerekliliğidir [101]. Diğer taraftan çalışmamızda "TPM" ve "Diyet" uygulamalarının birlikte bulunduğu ve oksidatif stresin daha yüksek olmasını bekleyebileceğimiz "Diyet + TPM" grubunda SOD aktivitesinin artmış olması önemlidir. Bu artış Jarukamjorn ve arkadaşlarının çalışmalarında gözlemledikleri gibi lipid peroksidasyonunun arttığı oksidatif stres durumunda aynı zamanda SOD aktivitesinde artışa neden olabilmesi ile açıklanabilir. Nitekim, Mangan-SOD'u (Mn-SOD) kodlayan sod2 geninin oksidatif strese yanıt olarak uyarıldığı ve bunun Mn-SOD seviyelerinde artışa neden olduğu da bilinmektedir [192]. Buna ek olarak Bakır/Çinko-SOD'un (Cu/Zn-SOD) da oksidatif stres varlığında uyarıldığı gösterilmiştir [113].

Bu tez çalışmasının ikincil varsayımı Topiramatin, NAYKH üzerinde anti oksidan etkisi ile faydalı olacağı yönündeydi. Bu varsayım TPM'nin tek başına oksidan hasar oluşturması ile geçersiz kalmıştır. Öyle ki "Diyet + TPM" grubunda MDA düzeyi kontrole göre yüksekken topiramatin tek başına sebep olduğu lipid peroksidasyonunun ötesine geçmemiştir. Bu durum iki ayrı oksidan ortam yaratan faktör olarak diyet ve topiramatin bu yöndeki etkilerinin potansiyelize edici hatta summatif bir karakteri olmadığını gösterir. Benzer şekilde "Diyet + TPM" grubunda GSH düzeyi kontrole göre anlamlı şekilde düşüken,

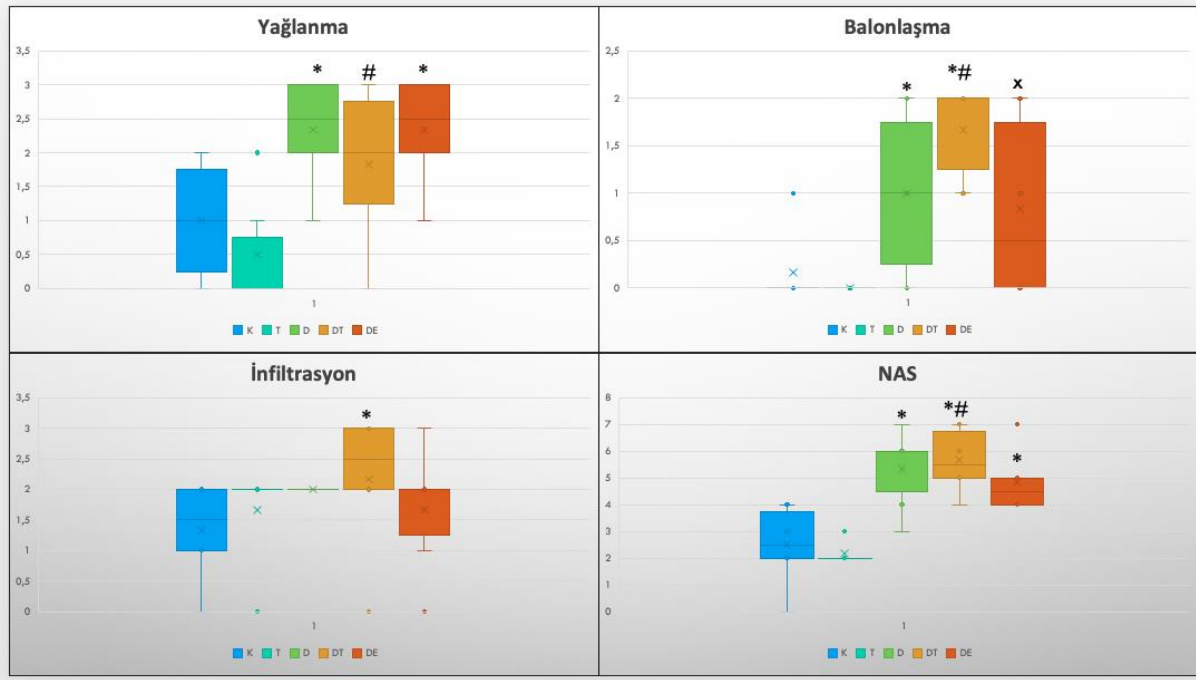
TPM'nin tek başına yarattığı etki burada da daha belirgin kalmıştır. Yine GPx aktivitesi değerlendirildiğinde “Diyet + TPM” grubunun verileri diğer müdahale gruplarından farksız ancak kontrolden belirgin düşük bulunmuştur. Her ne kadar TPM obezite tedavisinde onaylı olarak kullanılıyor olsa da ulaşabildiğimiz kadarı ile literatürde bizim çalışmamıza benzer şekilde diyet ile TPM etkisini karşılaştıran ve bir arada değerlendiren bir başka çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızın önemli özgün noktalarından birini oluştururken verilerimizi tartışma imkanımızı da belirgin şekilde kısıtlamaktadır.

Bu çalışmada E vitamin tedavisi pozitif kontrol grubu olarak planlanmıştır. E vitamini antioksidan etkinliğini hem serbest radikalleri inaktive ederek hem de lipit peroksidasyonunu azaltarak göstermektedir. Literatürde sıklıkla rapor edilen E vitamininin bu özelliği bizim çalışmamızda da yağlı diyetin neden olduğu MDA düzeyindeki artışın E vitamini ile kontrol seviyelerine inmesi, GSH düzeyi ve GPx aktivitesinde yağlı diyetin neden olduğu azalmanın yine kontrol seviyelerine dönmesi ile bir kez daha vurgulanmıştır [12,193,194].

Tüm bu veriler göz önüne alındığında sonuç olarak topiramatin karaciğerde oksidan etki gösterdiği ilk kez bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

5.2.5. Histoloji

NAYKH tanısı konulabilmesi için hepatositlerin en az %5'inde lipit birikimi görülmesi gerekir [32]. Çalışmamızda “Diyet” grubundaki tüm hayvanların karaciğerdeki yağlanma düzeyi %5'ten fazla bulunmuştur. Bu veri kullandığımız yüksek yağlı diyetin literatürle uyumlu ve başarılı bir şekilde NAYKH oluşturduğunu yani modelimizin gerektiği gibi çalıştığını göstermektedir [195].



Şekil 5.2. Histolojik değerlendirme sonuçlarının ait tüm veriler

Yüksek yağlı diyetin karaciğerde yağlanmanın yanı sıra balonlaşma dejenerasyonu ve lökosit infiltrasyonuna da neden olması beklenir. Bizim bulgularımız da bu konuda literatürle uyumlu şekilde diyet alan grupta yağlanmanın ve balonlaşma dejenerasyonunun anlamlı şekilde arttığını göstermektedir [196,197]. Diğer taraftan diyet uygulaması infiltrasyonu artırma eğilimi gösterirken istatistiksel anlamlılığa NAS kriterlerine uygun olarak değerlendirme yapıldığında ulaşamamaktadır. Bu noktada infiltrasyonun NAS kriterlerine göre belirlenirken kullanılan infiltrasyon odağı sayısı aralıklarının istatistiksel anlamlılığı gizlemiş olabileceği akılda tutulmalıdır [63]. Toplam NAS değerine bakıldığında ise kontrol grubuna göre diyet alan grubun uğradığı histolojik hasar çok daha belirgin hale gelmektedir ki bu NAS'ın tanımlanmasındaki ana nedendir [31]. Yüksek yağlı diyetin neden olduğu histolojik hasarı NAS'ın hem alt birimleri hem de toplamını kullanarak biyokimyasal parametrelerimiz ile ilişkilendirmek için yaptığımız korelasyon analizlerinde hiçbir anlamlı bağlantı bulamadık.

Bu tez çalışması, literatürde bizim ulaşabildiğimiz kadarı ile Topiramatin karaciğer üzerindeki etkilerini yağlı karaciğer açısından histolojik olarak inceleyen ilk çalışmadır. TPM'nin oksidan etkileri ile paralel olarak karaciğer histolojisinde belirgin değişiklikler yarattığı görülmüştür. Hepatositlerde gözlemlenen yer yer eozinofilik, yer yer hidropik değişiklikler yanında dokuda inflamatuvar hücre infiltrasyonu da not edilmiştir. Bu

değişiklikler içerisinde sadece inflamatuvar hücre infiltrasyonu NAS'ta yer almaktadır ve TPM etkisi ile kontrol grubunda 1,5 olan ortalama değeri 2'e çıkmış olsa da istatistiksel anlamlılık göstermemektedir. TPM tek başına diğer NAS parametrelerinde de anlamlı değişiklik yaratmamıştır. Literatürde TPM'nin karaciğer histolojisi üzerine etkisini dolaylı olarak inceleyen tek çalışmada TPM uygulama süresi bizim çalışmamızdan çok daha uzun (3 ay) olmakla birlikte bazı hepatositlerde granüler dejenerasyon ve hatta bazı bölgelerde punktat nekroz alanları rapor etmiştir. Söz konusu çalışma 2007'de Chinese Journal of Contemporary Pediatrics dergisinde yayınlanmış olup İngilizce özeti bulunmasına karşın tam makalesi Çince yazılmış olduğu için verilerin detaylarına ulaşılamamaktadır [198]. Diğer taraftan 2020'de Frontiers in Endocrinology dergisinde yayınlanan bir sistemik derlemede TPM'nin histolojik olarak karaciğer yağlanması, inflamasyonu ve fibrozisi hakkında verinin bulunmadığını belirtmektedir [199].

Bu çalışmanın bulguları dahilinde oksidan stres açısından TPM, yüksek yağlı diyet uygulamasına göre daha belirgin oksidan etki göstermesine karşın NAS'ı diyet uygulamasına benzer şekilde bozamaması, diyet uygulamasının karaciğerde yarattığı hasarın oksidan stresten çok doğrudan yağlanmadan kaynaklandığını düşündürebilir.

TPM'nin obezite tedavisinde kullanılıyor olması temel olarak kilo kaybına neden olduğunun görülmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak obezite tedavisindeki temel hedef yağlanmanın yarattığı fonksiyonel bozuklukların önüne geçilebilmesidir. Bu noktada vücuttaki yağlanma tipi önem arz eder ve daha çok erkeklerde görülen elma tipi yağlanma, visseral organlarda daha fazla yağ birikimi ile ilintili olduğu için daha tehlikeli kabul edilir [23]. Bu doğrultuda TPM'nin kilo azaltıcı etkisinin visseral yağlanmada azalmaya sebep olacağı varsayımı ile hareket edildiği söylenebilir. Nitekim genel olarak literatürdeki çalışmalara baktığımızda kilo kaybının organ yağlanmasını azalttığı rapor edilmiştir [73]. Bu çalışmada ise TPM özellikle yağlı diyetle beslenen hayvanlarda kilo kaybına neden olurken histolojik incelemeler sonucunda karaciğer yağlanmasında belirgin bir değişiklik yaratmamıştır. Bu TPM'nin kilo verdirici etkisinin klinik önemini zayıflatacak bir bulgu olarak kabul edilebilir.

Benzer şekilde TPM uygulaması diyetin neden olduğu balonlaşma dejenerasyonunda düzelme sağlayamadığı gibi sadece diyet alan grupta 1 olan ortalama değeri diyetle beraber TPM alan grupta 2 ye çıkmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Diğer taraftan inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlendirildiğinde tek başına diyet ya da TPM

hasarda anlamlı bir artış yaratmazken diyet+TPM grubunda infiltrasyon belirgin düzeyde yüksek bulunmuştur. Tüm bu bulgular beraber değerlendirildiğinde TPM kullanımının yağlı karaciğer üzerinde faydalı bir etkisi olmadığı gibi zararlı dahi olduğu söylenebilir. Ki bu durum toplam NAS'ta kendini açıkça göstermektedir.

E vitamini uygulaması ile diyetin neden olduğu histolojik hasarın kullandığımız hiçbir parametrede anlamlı bir değişiklik yaratmadığı gözlemlenmiştir. E vitamininin bilinen antioksidan etkinliği göz önüne alındığında sonuçlarımız bize bir kez daha diyetin yarattığı histolojik hasarın altında oksidan mekanizmalardan çok doğrudan yağlanmaya bağlı değişikliklerin olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca E vitamininin literatürle uyumlu şekilde TPM gibi kilo verdirici etki göstermiş olmasına karşın histolojik düzelme sağlayamaması ilginç bir nokta olarak tekrar karşımıza çıkmıştır. Diğer taraftan E vitamininin histolojik düzelme sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [73].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) tüm dünya çapında en sık görülen karaciğer hastalığı olup; patogenezinde aralarında oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, lipotoksisite ve birçok genetik faktörün yer aldığı karmaşık bir süreçtir. Literatürde NAYKH oluşturulmuş karaciğer dokusunda TPM'nin oksidan-antioksidan etkilerini araştıran çalışma mevcut değildir. Yaptığımız bu çalışmaya ait bulgularımız doğrultusunda şunları söyleyebiliriz;

- i. TPM, yağlı diyet uygulanmış sıçanlarda vücut ağırlığını ve kan şekerini düşürücü etki göstermiştir.
- ii. TPM, sağlıklı karaciğer dokusunda oksidan etki göstermiş ve bazı histolojik bozukluklar yaratmıştır.
- iii. TPM, NAYKH oluşturulmuş sıçan karaciğer dokusunda oksidan etki göstermiş ve hastalık modelinin yarattığı histolojik hasarı düzeltmediği gibi belli noktalarda hasarı artırmıştır.
- iv. E vitamini, NAYKH oluşturulmuş sıçan karaciğer dokusunda antioksidan etkisini göstermiş ancak hastalık modelinin yarattığı histolojik hasarı düzeltme yönünde bir etkisi olmamıştır.

TPM'nin genel olarak iyi tolere edilen bir ilaç olarak görülse de birtakım yan etkileri olduğu bilinmektedir. Ancak bu yan etkiler içinde hepatotoksik etkiler ön planda değildir, hatta oldukça nadir olduğu söylenmektedir. Yine de literatürde az sayıda da olsa bazı olgu sunumları TPM'ye bağlı gelişmiş akut karaciğer hasarı oluştuğunu bildirmiştir. Bu yan etki genellikle TPM'nin valproik asit ve/veya karbamazepin gibi diğer ilaçlarla kombine kullanılmasıyla ortaya çıkmıştır [164-166] ve bu güne kadar hasar kombine kullanıma atfedilmiştir.

Bu tez çalışmasının öncelikli olarak vurgulanması gereken sonucu TPM'nin tek başına dahi karaciğer üzerinde oksidan hasar oluşturduğu ve klinikteki kullanımında bu durumun özellikle de ek hastalığı olan bireylerde göz önünde bulundurulması gerekliliğidir. Çünkü bu araştırmanın da gösterdiği üzere NAYKH gibi karaciğerde hasar oluşturan ek hastalık

durumunda olumsuz etkiler agreve olabilmektedir. TPM'nin NAYKH ile sıklıkla birlikte görülen obezite tedavisinde kullanılıyor olması uzun dönemde önemli sakıncalar doğurabilir.

6.1. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın kendi içinde bazı kısıtlılıkları mevcuttu. Çalışmamızdaki maddi kısıtlılık nedeniyle oksidan hasarın göstergesi olarak sadece MDA düzeyi ölçüldü. Protein oksidasyonu ölçümünün yapılması oksidatif stresi desteleyecek bir diğer parametre olabilirdi. Diğer bir kısıtlılığımız ise temin edemediğimiz bir kimyasal nedeniyle karbonik anhidraz enzim aktivitesine bakılamamış olunmasıdır. Dolayısı ile TPM'nin neden olduğu oksidan etkinin arkasında karbonik anhidraz inhibisyonunun rolü olup olmadığını gösteremedik. Son olarak karaciğer fonksiyon testlerinden ALT ve AST ölçümleri Gazi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Kullanılan kitler insan için uygun olup, hayvanlara uyarlanması sonucu etkilemiş olabilir. İleriki çalışmalarda bu ölçümler için uygun kit kullanılması daha doğru sonuçlar elde edilmesine yardımcı olabilir.

6.2. Geleceğe Yönelik Araştırma Planları

Yaptığımız bu çalışma sonuçları göz önüne alındığında TPM'nin karaciğer dokusunda oksidan etkili olduğunu söylemek mümkündür. Ancak oksidatif stresi hangi yollar aracılığıyla artırdığı bilinmemektedir. Bu etkiden sorumlu yolları aydınlatacak çalışmaların yapılması, bu konu hakkındaki bilgilerimizi kuvvetlendirecektir.

TPM'nin karbonik anhidraz enzimini inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak TPM'nin oksidan-antioksidan parametreler üzerindeki etkisinin altında bu inhibisyonun rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Gelecekteki çalışmalarda bu konu incelenebilir.

TPM'nin yarattığı oksidatif strese bağlı oluşan hasar histolojik olarak gözlenmiştir. Söz konusu hasarın apoptoz ile sonuçlanıp sonuçlanmadığı, sonuçlanıyorsa bu sürece yol açan yolların neler olduğu bir sonraki araştırmaların konusu olabilir.

Çalışmamızda TPM'nin oksidan-antioksidan parametreler üzerindeki etkileri incelenmişti. Sonraki çalışmalarda bunlara ek olarak sitokinler üzerindeki etkileri de incelenebilir.

KAYNAKLAR

1. Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E.A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). ***Metabolism: Clinical and Experimental***, 65(8), 1038–1048.
2. Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. ***Hepatology***, 64(1), 73–84.
3. Cunningham, R.P., Moore, M.P., Moore, A.N., Healy, J.C., Roberts, M.D., Rector, R.S., and Martin, J.S. (2018). Curcumin supplementation mitigates NASH development and progression in female Wistar rats. ***Physiological Reports***, 6(14), e13789.
4. Polyzos, S.A., Kountouras, J., and Mantzoros, C.S. (2019). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. ***Metabolism: Clinical and Experimental***, 92, 82–97.
5. Yao, J., Zhi, M., and Minhu, C. (2011). Effect of silybin on high-fat-induced fatty liver in rats. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, 44(7), 652–659.
6. Henkel, J., Buchheim-Dieckow, K., Castro, J.P., Laeger, T., Wardelmann, K., Kleinridders, A., Jöhrens, K., and Püschel, G.P. (2019). Reduced Oxidative Stress and Enhanced FGF21 Formation in Livers of Endurance-Exercised Rats with Diet-Induced NASH. ***Nutrients***, 11(11).
7. Armagan, A., Kutluhan, S., Yilmaz, M., Yilmaz, N., Bülbül, M., Vural, H., Soyupek, S., and Naziroglu M. (2008). Topiramate and vitamin e modulate antioxidant enzyme activities, nitric oxide and lipid peroxidation levels in pentylenetetrazol-induced nephrotoxicity in rats. ***Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology***, 103(2), 166–170.
8. Bahri, S., Kaddour, H., Karoui, D., Bouraoui, S., Amri, M., and Mokni, M. (2019). Protective role of vitamin E against cadmium induced oxidative stress into the rat liver. ***La Tunisie Médicale***, 97(1), 100–105.
9. Lee, S.J., Kim, S.Y., and Min, H. (2013). Effects of vitamin C and E supplementation on oxidative stress and liver toxicity in rats fed a low-fat ethanol diet. ***Nutrition Research and Practice***, 7(2), 109–114.
10. Seven, A., Guzel, S., Seymen, O., Civelek, S., Bolayirli, M., Uncu, M., and Burcak, G. (2004). Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. ***Yonsei Medical Journal***, 45(4), 703–710.
11. Feng, Y., Huang, X., Duan, Y., Fan, W., Duan, J., Wang, K., Geng, Y., Ouyang, P., Deng, Y., Chen, D., and Yang, S. (2018). The Effect of Vitamin E and Metallothionein on the Antioxidant Capacities of Cadmium-Damaged Liver in Grass Carp *Ctenopharyngodon idellus*. ***BioMed Research International***, 2018, 7935396.

12. Agarwal, N.B., Agarwal, N.K., Mediratta, P.K., and Sharma, K.K. (2011). Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure*, 20(3), 257–262.
13. Smith, S.M., Meyer, M., and Trinkley, K.E. (2013). Phentermine/topiramate for the treatment of obesity. *Annals of Pharmacotherapy*, 47(3), 340–349.
14. Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Dodick, D.W., Freitag, F.G., Ramadan, N., Mathew, N., Brandes, J.L., Bigal, M., Saper, J., Ascher, S., Jordan, D.M., Greenberg, S.J., Hulihan, J., and Topiramate Chronic Migraine Study Group. (2007). Efficacy and safety of topiramate for the treatment of chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Headache*, 47(2), 170–180.
15. Price, T.O., Eranki, V., Banks, W.A., Ercal, N., and Shah, G.N. (2012). Topiramate treatment protects blood-brain barrier pericytes from hyperglycemia-induced oxidative damage in diabetic mice. *Endocrinology*, 153(1), 362–372.
16. Patrick, P., Price, T.O., Diogo, A.L., Sheibani, N., Banks, W.A., and Shah, G.N. (2015). Topiramate Protects Pericytes from Glucotoxicity: Role for Mitochondrial CA VA in Cerebromicrovascular Disease in Diabetes. *Journal of Endocrinology and Diabetes*, 2(2).
17. Muriach, M., López-Pedrajas, R., Barcia, J.M., Sanchez-Villarejo, M.V., Almansa, I., and Romero, F.J. (2010). Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *Journal of Neurochemistry*, 114(3), 675–684.
18. Sarangi, S.C., Kakkar, A.K., Kumar, R., and Gupta, Y.K. (2016). Effect of lamotrigine, levetiracetam & topiramate on neurobehavioural parameters & oxidative stress in comparison with valproate in rats. *Indian Journal of Medical Research*, 144(1), 104–111.
19. Cardile, V., Pavone, A., Renis, M., Maci, T., and Perciavalle, V. (2001). Effects of Gabapentin and Topiramate in primary rat astrocyte cultures. *Neuroreport*, 12(8), 1705–1708.
20. Junqueira, L.C., and Carneiro, J. (Editörler). (2006). *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 332–344.
21. Drake, R.L., Vogl, W., and Mitchell, A.W.M. (Editörler). (2007). *Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Gray's Anatomi*. Ankara: Güneş Kitabevi, 285–286.
22. Ovalle, W.K., and Nahirney, P.C. (Editörler). (2009). *Netter Temel Histoloji*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 312–323.
23. Guyton, A.C., and Hall, J.E. (Editörler). (2007). *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 859–862.
24. Cumhuri, M. (Editör). (2006). *Temel Anatomi*, Ankara: ODTÜ Yayıncılık, 241–247.

25. Stan, F.G. (2018). Comparative Study of the Liver Anatomy in the Rat, Rabbit, Guinea Pig and Chinchilla. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca**, 75(1), 33-40.
26. Sherwood, L. (2012). *Fundamentals of Human Physiology* (Fourth Edition). Belmont, CA: Brooks/Cole, 436–494.
27. Costanzo, L.S. (2014). *Physiology* (Fifth Edition). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
28. Barrett, K.E., and Raybould, H.E. (2010). Transport and Metabolic Functions of the Liver. In Koepfen, B.M., and Stanton, B.A. (Eds), *Berne & Levy Physiology* (Sixth Edition). Philadelphia, PA: Elsevier Inc.
29. Preston, R.R., and Wilson, T.E. (Editörler). (2014). *Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitapları: Fizyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 402–404.
30. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., and Brooks, H.L. (Editörler). (2011). *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi*. Yirmi Üçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 479–483.
31. Cotter, T.G., and Rinella, M. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. **Gastroenterology**, 158(7), 1851–1864.
32. Machado, M., and Cortez-Pinto, H. (2006). Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 9(5), 637–642.
33. Paschos, P., and Paletas, K. (2009). Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. **Hippokratia**, 13(1), 9–19.
34. Neuschwander-Tetri, B.A. (2005). Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, 330(6), 326–335.
35. Setji, T.L., Holland, N.D., Sanders, L.L., Pereira, K.C., Diehl, A.M., and Brown, A.J. (2006). Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic Fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 91(5), 1741–1747.
36. Kim, H.J., Kim, H.J., Lee, K.E., Kim, D.J., Kim, S.K., Ahn, C.W., Lim, S.K, Kim, K.R., Lee, H.C., Huh, K.B., and Cha, B.S. (2004). Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. **Archives of Internal Medicine**, 164(19), 2169–2175.
37. Kopec, K.L., and Burns, D. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy. **Nutrition in Clinical Practice**, 26(5), 565–576.
38. Kucera, O., and Cervinkova, Z. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**, 20(26), 8364–8376.

39. Daniel, S., Ben-Menachem, T., Vasudevan, G., Ma, C.K., and Blumenkehl, M. (1999). Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *American Journal of Gastroenterology*, 94(10), 3010–3014.
40. Tominaga, K., Kurata, J.H., Chen, Y.K., Fujimoto, E., Miyagawa, S., Abe, I., and Kusano, Y. (1995). Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Digestive Diseases and Sciences*, 40(9), 2002–2009.
41. Franzese, A., Vajro, P., Argenziano, A., Puzziello, A., Iannucci, M.P., Saviano, M.C., Brunetti, F., and Rubino, A. (1997). Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(7), 1428–1432.
42. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., and Sanyal, A.J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*, 142(7), 1592–1609.
43. Leite, N.C., Salles, G.F., Araujo, A.L.E., Villela-Nogueira, C.A., and Cardoso, C.R.L. (2009). Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver International*, 29(1), 113–119.
44. Prashanth, M., Ganesh, H.K., Vima, M.V., John, M., Bandgar, T., Joshi, S.R., Shah, S.R., Rath, P.M., Joshi, A.S., Thakkar, H., Menon, P.S., and Shah, N.S. (2009). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the Association of Physicians of India*, 57, 205–210.
45. Assy, N., Kaita, K., Mymin, D., Levy, C., Rosser, B., and Minuk, G. (2000). Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(10), 1929–1934.
46. Chen, Z., Chen, L., Dai, H., Chen, J., and Fang, L. (2008). Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 9(8), 616–622.
47. Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., and Hobbs, H.H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 40(6), 1387–1395.
48. Kallwitz, E.R., Kumar, M., Aggarwal, R., Berger, R., Layden-Almer, J., Gupta, N., and Cotler, S.J. (2008). Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease in an obesity clinic: the impact of triglycerides. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(5), 1358–1363.
49. Lundqvist, G., Flodin, U., and Axelson, O. (1999). A case-control study of fatty liver disease and organic solvent exposure. *American Journal of Industrial Medicine*, 35(2), 132–136.

50. Rotman, Y., Koh, C., Zmuda, J.M., Kleiner, D.E., and Liang, T.J. (2010). The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 52(3), 894–903.
51. Sookoian, S., and Pirola, C.J. (2011). Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 53(6), 1883–1894.
52. Fleischman, M.W., Budoff, M., Zeb, I., Li, D., and Foster, T. (2014). NAFLD prevalence differs among hispanic subgroups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(17), 4987–4993.
53. Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., and Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(1), 11–20.
54. Su, W., Mao, Z., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, W., Gustafsson, J.A., and Guan, Y. (2019). Role of HSD17B13 in the liver physiology and pathophysiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 489, 119–125.
55. Abul-Husn, N.S., Cheng, X., Li, A.H., Xin, Y., Schurmann, C., Stevis, P., Liu, Y., Kozlitina, J., Stender, S., Wood, G.C., Stepanchick, A.N., Still, M.D., McCarthy, S., O'Dushlaine, C., Packer, J.S., Balasubramanian, S., Gosalia, N., Esopi, D., Kim, S.Y., Mukherjee, S., Lopez, A.E., Fuller, E.D., Penn, J., Chu, X., Luo, Z.J., Mirshahi, U.L., Carey, D.J., Still, C.D., Feldman, M.D., Small, A., Damrauer, S.M., Rader, D.J., Zambrowicz, B., Olson, W., Murphy, A.J., Borecki, I.B., Shuldiner, A.R., Reid, J.G., Overton, J.D., Yancopoulos, G.D., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., Gottesman, O., Teslovich, T.M., Baras, A., Mirshahi, T., Gromada, J., and Dewey, F.E. (2018). A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *New England Journal of Medicine*, 378(12), 1096–1106.
56. Basyte-Bacevice, V., Skieceviciene, J., Valantiene, I., Sumskiene, J., Petrenkiene, V., Kondrackiene, J., Petrauskas, D., Lammert, F., and Kupcinskas, J. (2019). TM6SF2 and MBOAT7 Gene Variants in Liver Fibrosis and Cirrhosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1277.
57. Krawczyk, M., Rau, M., Schattenberg, J.M., Bantel, H., Pathil, A., Demir, M., Kluwe, J., Boettler, T., Lammert, F., Geier, A., and NAFLD Clinical Study Group. (2017). Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study. *Journal of Lipid Research*, 58(1), 247–255.
58. Liu, Y.L., Reeves, H.L., Burt, A.D., Tiniakos, D., McPherson, S., Leathart, J.B.S., Allison, M.E.D., Alexander, G.J., Piguert, A.C., Anty, R., Donaldson, P., Aithal, G.P., Francque, S., Gaal, L.V., Clement, K., Ratzliff, V., Dufour, J.F., Day, C.P., Daly, A.K., and Anstee, Q.M. (2014). TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nature Communications*, 5, 4309.

59. Schreuder, T.C.M.A., Verwer, B.J., van Nieuwkerk, C.M.J., and Mulder, C.J.J. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 14(16), 2474–2486.
60. Kirpich, I.A., Marsano, L.S., and McClain, C.J. (2015). Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*, 48(13–14), 923–930.
61. Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Shulman, G.I., Gordon, J.I., Hoffman, H.M., and Flavell, R.A. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 482(7384), 179–185.
62. Bedossa, P. (2017). Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 37 Suppl 1, 85–89.
63. Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., Sanyal, A.J., and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313–1321.
64. Bedossa, P. (2014). Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 60(2), 565–575.
65. Ratziu, V., Charlotte, F., Heurtier, A., Gombert, S., Giral, P., Bruckert, E., Grimaldi, A., Capron, F., Poynard, T., and LIDO Study Group. (2005). Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 128(7), 1898–1906.
66. Rinella, M.E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Journal of the American Medical Association*, 313(22), 2263–2273.
67. Mandal, A., Bhattarai, B., Kafle, P., Khalid, M., Jonnadula, S.K., Lamicchane, J., Kanth, R., and Gayam, V. (2018). Elevated Liver Enzymes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Curēus*, 10(11), e3626.
68. Agrawal, S., Dhiman, R.K., and Limdi, J.K. (2016). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal*, 92(1086), 223–234.
69. Unalp-Arida, A., and Ruhl, C.E. (2016). Noninvasive fatty liver markers predict liver disease mortality in the U.S. population. *Hepatology*, 63(4), 1170–1183.
70. Shen, J., Chan, H.L.Y., Wong, G.L.H., Choi, P.C.L., Chan, A.W.H., Chan, H.Y., Chim, A.M.L., Yeung, D.K.W., Chan, F.K.L., Woo, J., Yu, J., Chu, W.J.W., and Wong, V.W.S. (2012). Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *Journal of Hepatology*, 56(6), 1363–1370.
71. Dasarathy, S., Dasarathy, J., Khiyami, A., Joseph, R., Lopez, R., and McCullough, A.J. (2009). Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *Journal of Hepatology*, 51(6), 1061–1067.

72. Hamer, O.W., Aguirre, D.A., Casola, G., Lavine, J.E., Woenckhaus, M., and Sirlin, C.B. (2006). Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. *Radiographics*, 26(6), 1637–1653.
73. Golabi, P., Bush, H., and Younossi, Z.M. (2017). Treatment Strategies for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinical Liver Disease*, 21(4), 739–753.
74. Ryan, M.C., Itsiopoulos, C., Thodis, T., Ward, G., Trost, N., Hofferberth, S., O'Dea, K., Desmond, P.V., Johnson, N.A., and Wilson, A.M. (2013). The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 59(1), 138–143.
75. Sofi, F., and Casini, A. (2014). Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: new therapeutic option around the corner? *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7339–7346.
76. Promrat, K., Kleiner, D.E., Niemeier, H.M., Jackvony, E., Kearns, M., Wands, J.R., Fava, J.L., and Wing, R.R. (2010). Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 51(1), 121–129.
77. Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S.L., Diago, M., and Romero-Gomez, M. (2015). Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 149(2), 365–367.
78. Luyckx, F.H., Desai, C., Thiry, A., Dewé, W., Scheen, A.J., Gielen, J.E., and Lefèbvre, P.J. (1998). Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 22(3), 222–226.
79. Johnson, N.A., Keating, S.E., and George, J. (2012). Exercise and the liver: implications for therapy in fatty liver disorders. *Seminars in Liver Disease*, 32(1), 65–79.
80. Slentz, C.A., Bateman, L.A., Willis, L.H., Shields, A.T., Tanner, C.J., Piner, L.W., Hawk, V.H., Muehlbauer, M.J., Samsa, G.P., Nelson, R.C., Huffman, K.M., Bales, C.W., Houmard, J.A., and Kraus, W.E. (2011). Effects of aerobic vs. resistance training on visceral and liver fat stores, liver enzymes, and insulin resistance by HOMA in overweight adults from STRRIDE AT/RT. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(5), E1033-9.
81. Lee, G.Y., and Han, S.N. (2018). The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*, 10(11), 1614.
82. Mustacich, D.J., Bruno, R.S., and Traber, M.G. (2007). Vitamin E. *Vitamins and Hormones*, 76, 1–21.
83. Sanyal, A.J., Chalasani, N., Kowdley, K.V., McCullough, A., Diehl, A.M., Bass, N.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Lavine, J.E., Tonascia, J., Unalp, A., Natta, M.V., Clark, J., Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Hoofnagle, J.H., Robuck, P.R., and NASH CRN. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 362(18), 1675–1685.

84. Lavine, J.E., Schwimmer, J.B., Van Natta, M.L., Molleston, J.P., Murray, K.F., Rosenthal, P., Abrams, S.H., Scheimann, A.O., Sanyal, A.J., Chalasani, N., Tonascia, J., Ünalp, A., Clark, J.M., Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Hoofnagle, J.H., Robuck, P.R., and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2011). Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 305(16), 1659–1668.
85. Klein, E.A., Thompson, I.M.J., Tangen, C.M., Crowley, J.J., Lucia, M.S., Goodman, P.J., Minasian, L.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Gaziano, J.M., Karp, D.D., Lieber, M.M., Walther, P.J., Klotz, L., Parsons, J.K., Chin, J.L., Darke, A.K., Lippman, S.M., Goodman, G.E., Meyskens Jr, F.L., and Baker, L.H. (2011). Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Journal of the American Medical Association*, 306(14), 1549–1556.
86. Zelber-Sagi, S., Kessler, A., Brazowsky, E., Webb, M., Lurie, Y., Santo, M., Leshno, M., Blendis, L., Halpern, Z., and 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.
87. Harrison, S.A., Fecht, W., Brunt, E.M., and Neuschwander-Tetri, B.A. (2009). Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology*, 49(1), 80–86.
88. Shields, W.W., Thompson, K.E., Grice, G.A., Harrison, S.A., and Coyle, W.J. (2009). The Effect of Metformin and Standard Therapy versus Standard Therapy alone in Nondiabetic Patients with Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): A Pilot Trial. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2(3), 157–163.
89. Omer, Z., Cetinkalp, S., Akyildiz, M., Yilmaz, F., Batur, Y., Yilmaz, C., and Akarca, U. (2010). Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 22(1), 18–23.
90. Nanjan, M.J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B.R., and Chandrasekar, M.J.N. (2018). Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry*, 77, 548–567.
91. Belfort, R., Harrison, S.A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., Balas, B., Gastaldelli, A., Tio, F., Pulcini, J., Berria, R., Ma, J.Z., Dwivedi, S., Havranek, R., Fincke, C., DeFronzo, R., Bannayan, G.A., Schenker, S., and Cusi, K. (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 355(22), 2297–2307.
92. Aithal, G.P., Thomas, J.A., Kaye, P.V., Lawson, A., Ryder, S.D., Spendlove, I., Austin, A.S., Freeman, J.G., Morgan, L., and Webber, J. (2008). Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 135(4), 1176–1184.

93. Petit, J.M., Cercueil, J.P., Loffroy, R., Denimal, D., Bouillet, B., Fourmont, C., Chevallier, O., Duvillard, L., and Vergès, B. (2017). Effect of Liraglutide Therapy on Liver Fat Content in Patients With Inadequately Controlled Type 2 Diabetes: The Lira-NAFLD Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(2), 407–415.
94. Armstrong, M.J., Gaunt, P., Aithal, G.P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., Hazlehurst, J.M., Guo, K., Abouda, G., Aldersley, M.A., Stocken, D., Gough, S.C., Tomlinson, J.W., Brown, R.M., Hübscher, S.G., Newsome, P.N., and LEAN trial team. (2016). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*, 387(10019), 679–690.
95. Lindor, K.D., Kowdley, K.V., Heathcote, E.J., Harrison, M.E., Jorgensen, R., Angulo, P., Lymp, J.F., Burgart, L., and Colin, P. (2004). Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology*, 39(3), 770–778.
96. Yokohama, S., Tokusashi, Y., Nakamura, K., Tamaki, Y., Okamoto, S., Okada, M., Aso, K., Hasegawa, T., Aoshima, M., Miyokawa, N., Haneda, M., and Yoneda, M. (2006). Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 12(2), 322–326.
97. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., and Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.
98. Kehler, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1), 21–48.
99. Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W., and Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087–26124.
100. Sharma, G.N., Gupta, G., and Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 28(2), 139–154.
101. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* (Third Edition). New York: Oxford University Press.
102. Nordberg, J., and Arnér, E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287–1312.
103. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553.
104. Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.

105. Di Meo, S., and Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. ***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***, 2020, 9829176.
106. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J.J., and Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. ***Swiss Medical Weekly***, 142, w13659.
107. Kılınç, K., Kılınç, A. (2003). *Nitrik Oksit* (Birinci Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık.
108. Pisoschi, A.M., and Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, 97, 55–74.
109. Stocker, R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. ***Antioxidants & Redox Signaling***, 6(5), 841–849.
110. Indo, H.P., Yen, H.C., Nakanishi, I., Matsumoto, K.I., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Suenaga, S., Oki, M., Sato, T., Ozawa, T., St Clair, D.K., and Majima, H.J. (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. ***Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition***, 56(1), 1–7.
111. Koca, N, ve Karadeniz, F. (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. ***Gıda Mühendisliği Dergisi***, 16, 32-37.
112. Miyamoto, Y., Koh, Y.H., Park, Y.S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Ookawara, T., Suzuki, K., Honke, K., and Taniguchi, N. (2003). Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. ***Journal of Biological Chemistry***, 384(4), 567–574.
113. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. ***Free Radical Biology and Medicine***, 17(3), 235–248.
114. Conner, E.M., and Grisham, M.B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. ***Nutrition***, 12(4), 274–277.
115. Maryanoff, B.E. (2016). Phenotypic Assessment and the Discovery of Topiramate. ***ACS Medicinal Chemistry Letters***, 7(7), 662–665.
116. Khalil, N.Y., AlRabiah, H.K., Al Rashoud, S.S., Bari, A., and Wani, T.A. (2019). Topiramate: Comprehensive profile. ***Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology***, 44, 333–378.
117. Manhapra, A., Chakraborty, A., and Arias, A.J. (2019). Topiramate Pharmacotherapy for Alcohol Use Disorder and Other Addictions: A Narrative Review. ***Journal of Addiction Medicine***, 13(1), 7–22.
118. Shank, R.P., Gardocki, J.F., Vaught, J.L., Davis, C.B., Schupsky, J.J., Raffa, R.B., Dodgson, S.J., Nortey, S.O., and Maryanoff, B.E. (1994). Topiramate: Preclinical Evaluation of a Structurally Novel Anticonvulsant. ***Epilepsia***, 35(2), 450–460.
119. Sachdeo, R.C. (1998). Topiramate. Clinical profile in epilepsy. ***Clinical Pharmacokinetics***, 34(5), 335–346.

120. Shank, R.P., and Maryanoff, B.E. (2008). Molecular pharmacodynamics, clinical therapeutics, and pharmacokinetics of topiramate. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14(2), 120–142.
121. White, H.S., Smith, M.D., and Wilcox, K.S. (2007). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *International Review of Neurobiology*, 81, 85–110.
122. Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 1–20.
123. Dodgson, S.J., Shank, R.P., and Maryanoff, B.E. (2000). Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia*, 41(S1), 35–39.
124. Chen, G., Chen, Y., Xie, Y., Huang, R., Chen, T., Shi, P., Zhang, Z., Hou, Y., Xing, W., and Wei, L. (2020). Topiramate for hypoxic ischemic encephalopathy: A systematic review protocol. *Medicine (Baltimore)*, 99(17), e18704.
125. Landucci, E., Filippi, L., Gerace, E., Catarzi, S., Guerrini, R., and Pellegrini-Giampietro, D.E. (2018). Neuroprotective effects of topiramate and memantine in combination with hypothermia in hypoxic-ischemic brain injury in vitro and in vivo. *Neuroscience Letters*, 668, 103–107.
126. Motaghinejad, M., Motevalian, M., Falak, R., Heidari, M., Sharzad, M., and Kalantari, E. (2016). Neuroprotective effects of various doses of topiramate against methylphenidate-induced oxidative stress and inflammation in isolated rat amygdala: the possible role of CREB/BDNF signaling pathway. *Journal of Neural Transmission*, 123(12), 1463–1477.
127. Motaghinejad, M., Motevalian, M., and Shabab, B. (2016). Neuroprotective effects of various doses of topiramate against methylphenidate induced oxidative stress and inflammation in rat isolated hippocampus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(3), 360–371.
128. Motaghinejad, M., and Motevalian, M. (2016). Involvement of AMPA/kainate and GABAA receptors in topiramate neuroprotective effects against methylphenidate abuse sequels involving oxidative stress and inflammation in rat isolated hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 784, 181–191.
129. Motaghinejad, M., Motevalian, M., Babalouei, F., Abdollahi, M., Heidari, M., and Madjd, Z. (2017). Possible involvement of CREB/BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of topiramate against methylphenidate induced apoptosis, oxidative stress and inflammation in isolated hippocampus of rats: Molecular, biochemical and histological evidences. *Brain Research Bulletin*, 132, 82–98.
130. Price, T.O., Farr, S.A., Niehoff, M.L., Ercal, N., Morley, J.E., and Shah, G.N. (2015). Protective Effect of Topiramate on Hyperglycemia-Induced Cerebral Oxidative Stress, Pericyte Loss and Learning Behavior in Diabetic Mice. *International Library of Diabetes and Metabolism*, 1(1), 6–12.

131. Nazıroğlu, M., Kutluhan, S., and Yilmaz, M. (2008). Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Journal of Membrane Biology*, 225(1–3), 39–49.
132. Salameh, T.S., Mortell, W.G., Logsdon, A.F., Butterfield, D.A., and Banks, W.A. (2019). Disruption of the hippocampal and hypothalamic blood-brain barrier in a diet-induced obese model of type II diabetes: prevention and treatment by the mitochondrial carbonic anhydrase inhibitor, topiramate. *Fluids and Barriers of the CNS*, 16(1), 1.
133. Mazhar, F., Malhi, S.M., and Simjee, S.U. (2017). Comparative studies on the effects of clinically used anticonvulsants on the oxidative stress biomarkers in pentylenetetrazole-induced kindling model of epileptogenesis in mice. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(1), 31–42.
134. Jafari, A., Ghasemnejad-Berenji, H., Nemati, M., and Ghasemnejad-Berenji, M. (2021). Topiramate: A novel protective agent against ischemia reperfusion-induced oxidative injury after testicular torsion/detorsion. *American Journal of Emergency Medicine*, 44, 257–261.
135. Pavone, A., and Cardile, V. (2003). An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*, 44(s10), 34–39.
136. Yürekli, V.A., and Nazıroğlu, M. (2013). Selenium and topiramate attenuates blood oxidative toxicity in patients with epilepsy: a clinical pilot study. *Biological Trace Element Research*, 152(2), 180–186.
137. Allison, D.B., Gadde, K.M., Garvey, W.T., Peterson, C.A., Schwiers, M.L., Najarian, T., Tam, P.Y., Troupin, B., and Day, W.W. (2012). Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults: a randomized controlled trial (EQUIP). *Obesity (Silver Spring)*, 20(2), 330–342.
138. Beghi, E. (2020). The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*, 54(2), 185–191.
139. Fiest, K.M., Sauro, K.M., Wiebe, S., Patten, S.B., Kwon, C.S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D.L., and Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 88(3) 296–303.
140. Klein, P., Friedman, A., Hameed, M.Q., Kaminski, R.M., Bar-Klein, G., Klitgaard, H., Koepp, M., Jozwiak, S., Prince, D.A., Rotenberg, A., Twyman, R., Vezzani, A., Wong, M., and Löscher, W. (2020). Repurposed molecules for antiepileptogenesis: Missing an opportunity to prevent epilepsy? *Epilepsia*, 61(3), 359–386.
141. Ashina, M. (2020). Migraine. *New England Journal of Medicine*, 383(19), 1866–1876.
142. Diener, H.C., Bussone, G., Van Oene, J.C., Lahaye, M., Schwalen, S., and Goadsby, P.J. (2007). Topiramate reduces headache days in chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cephalalgia*, 27(7), 814–823.

143. Linde, M., Mulleners, W.M., Chronicle, E.P., and McCrory, D.C. (2013). Topiramate for the prophylaxis of episodic migraine in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(6), CD010610.
144. Wilding, J., Van Gaal, L., Rissanen, A., Vercruysse, F., and Fitchet, M. (2004). A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 28(11), 1399–1410.
145. Tonstad, S., Tykarski, A., Weissgarten, J., Ivleva, A., Levy, B., Kumar, A., and Fitchet, M. (2005). Efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects with essential hypertension. *American Journal of Cardiology*, 96(2), 243–251.
146. Bray, G.A., Hollander, P., Klein, S., Kushner, R., Levy, B., Fitchet, M., and Perry, B.H. (2003). A 6-month randomized, placebo-controlled, dose-ranging trial of topiramate for weight loss in obesity. *Obesity Research*, 11(6), 722–733.
147. Kramer, C.K., Leitão, C.B., Pinto, L.C., Canani, L.H., Azevedo, M.J., and Gross, J.L. (2011). Efficacy and safety of topiramate on weight loss: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*, 12(5), e338–47.
148. Gadde, K.M., Allison, D.B., Ryan, D.H., Peterson, C.A., Troupin, B., Schwiers, M.L., and Day, W.W. (2011). Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 377(9774), 1341–1352.
149. Garvey, W.T., Ryan, D.H., Look, M., Gadde, K.M., Allison, D.B., Peterson, C.A., Schwiers, M., Day, W.W., and Bowden, C.H. (2012). Two-year sustained weight loss and metabolic benefits with controlled-release phentermine/topiramate in obese and overweight adults (SEQUENCE): a randomized, placebo-controlled, phase 3 extension study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(2), 297–308.
150. McElroy, S.L., Hudson, J.I., Capece, J.A., Beyers, K., Fisher, A.C., and Rosenthal, N.R. (2007). Topiramate for the treatment of binge eating disorder associated with obesity: a placebo-controlled study. *Biological Psychiatry*, 61(9), 1039–1048.
151. McElroy, S.L., Arnold, L.M., Shapira, N.A., Keck, P.E.J., Rosenthal, N.R., Karim, M.R., Kamin, M., and Hudson, J.I. (2003). Topiramate in the treatment of binge eating disorder associated with obesity: a randomized, placebo-controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 160(2), 255–261.
152. Brambilla, F., Samek, L., Company, M., Lovo, F., Cioni, L., and Mellado, C. (2009). Multivariate therapeutic approach to binge-eating disorder: combined nutritional, psychological and pharmacological treatment. *International Clinical Psychopharmacology*, 24(6), 312–317.
153. Arbaizar, B., Diersen-Sotos, T., Gómez-Acebo, I., and Llorca, J. (2010). Topiramate in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis. *Actas Españolas de Psiquiatría*, 38(1), 8–12.

154. Blodgett, J.C., Del Re, A.C., Maisel, N.C., and Finney, J.W. (2014). A meta-analysis of topiramate's effects for individuals with alcohol use disorders. ***Alcoholism: Clinical and Experimental Research***, 38(6), 1481–1488.
155. Jonas, D.E., Amick, H.R., Feltner, C., Bobashev, G., Thomas, K., Wines, R., Kim, M.M., Shanahan, E., Gass, C.E., Rowe, C.J., and Garbutt, J.C. (2014). Pharmacotherapy for adults with alcohol use disorders in outpatient settings: a systematic review and meta-analysis. ***Journal of the American Medical Association***, 311(18), 1889–1900.
156. Leggio, L., Kenna, G.A., and Swift, R.M. (2008). New developments for the pharmacological treatment of alcohol withdrawal syndrome. A focus on non-benzodiazepine GABAergic medications. ***Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry***, 32(5), 1106–1117.
157. Hammond, C.J., Niciu, M.J., Drew, S., and Arias, A.J. (2015). Anticonvulsants for the treatment of alcohol withdrawal syndrome and alcohol use disorders. ***CNS Drugs***, 29(4), 293–311.
158. Dannon, P.N., Lowengrub, K., Gonopolski, Y., Musin, E., and Kotler, M. (2005). Topiramate versus fluvoxamine in the treatment of pathological gambling: a randomized, blind-rater comparison study. ***Clinical Neuropharmacology***, 28(1), 6–10.
159. Kirk, R.W. (Editor). (1977). *Current Veterinary Therapy VI: Small Animal Practice* (Sixth Edition). Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company.
160. Mihara, M., and Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. ***Analytical Biochemistry***, 86(1), 271–278.
161. Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., and Reiner, E. (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. ***Analytical Biochemistry***, 312(2), 224–227.
162. Kılınç, S., and Güney, S. (2019). Effects of Hypoxic Preconditioning on Oxidant-Antioxidant Systems in Rat Lung. ***Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences***, 39(2), 194-201.
163. Savari, F., Mard, S.A., Badavi, M., Rezaie, A., and Gharib-Naseri, M.K. (2019). A new method to induce nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. ***BMC Gastroenterology***, 19(1), 125.
164. Bjørø, K., Gjerstad, L., Bentdal, O., Osnes, S., and Schrumpf, E. (1998). Topiramate and fulminant liver failure. ***Lancet***, 352(9134), 1119.
165. Tsien, M.Z., Cordova, J., Qadir, A., Zhao, L., Hart, J., and Azzam, R. (2016). Topiramate-Induced Acute Liver Failure in a Pediatric Patient: a Case Report and Review of Literature. ***Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition***, 63(3), e37-38.
166. Khivsara, A., Raj, J.P., Hegde, D., and Rao, M. (2017). Topiramate-induced acute liver injury: A rare adverse effect. ***Indian Journal of Pharmacology***, 49(3), 254–256.

167. U.S. Food and Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>. Accessed: 2021-11-7.
168. El Makawy, A.I., Ibrahim, F.M., Mabrouk, D.M., Ahmed, K.A., and Fawzy Ramadan, M. (2019). Effect of antiepileptic drug (Topiramate) and cold pressed ginger oil on testicular genes expression, sexual hormones and histopathological alterations in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 409–419.
169. Presa, N., Clugston, R.D., Lingrell, S., Kelly, S.E., Merrill, A.H.J., Jana, S., Kassiri, Z., Gómez-Muñoz, A., Vance, D.E., Jacobs, R.L., and van der Veen, J.N. (2019). Vitamin E alleviates non-alcoholic fatty liver disease in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase deficient mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(1), 14–25.
170. Baky, N.A.A., Faddah, L.M., Al-Rasheed, N.M., Al-Rasheed, N.M., and Fatani, A.J. (2013). Induction of inflammation, DNA damage and apoptosis in rat heart after oral exposure to zinc oxide nanoparticles and the cardioprotective role of α -lipoic acid and vitamin E. *Drug Research*, 63(5), 228–236.
171. Mishra, P., Paital, B., Jena, S., Swain, S.S., Kumar, S., Yadav, M.K., Chainy, G.B.N., and Samanta, L. (2019). Possible activation of NRF2 by Vitamin E/Curcumin against altered thyroid hormone induced oxidative stress via NF κ B/AKT/mTOR/KEAP1 signalling in rat heart. *Scientific Reports*, 9(1), 7408.
172. Sun, Y., Zhang, J., Song, W., and Shan, A. (2018). Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(26), 26682–26692.
173. Fang, J., Yin, H., Yang, Z., Tan, M., Wang, F., Chen, K., Zuo, Z., Shu, G., Cui, H., Ouyang, P., Guo, H., Chen, Z., Huang, C., Geng, Y., and Liu, W. (2021). Vitamin E protects against cadmium-induced sub-chronic liver injury associated with the inhibition of oxidative stress and activation of Nrf2 pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111610.
174. Singh, M., Sandhir, R., and Kiran, R. (2010). Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(3), 119–126.
175. Ye, J., Zhong, X., Du, Y., Cai, C., and Pan, T. (2017). Role of levothyroxine and vitamin E supplementation in the treatment of oxidative stress-induced injury and apoptosis of myocardial cells in hypothyroid rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(7), 713–719.
176. Wong, S.K., Chin, K.Y., Suhaimi, F.H., Ahmad, F., and Ima-Nirwana, S. (2017). Vitamin E As a Potential Interventional Treatment for Metabolic Syndrome: Evidence from Animal and Human Studies. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 444.

177. Echeverría, F., Valenzuela, R., Bustamante, A., Álvarez, D., Ortiz, M., Soto-Alarcon, S.A., Muñoz, P., Corbari, A., and Videla, L.A. (2018). Attenuation of High-Fat Diet-Induced Rat Liver Oxidative Stress and Steatosis by Combined Hydroxytyrosol- (HT-) Eicosapentaenoic Acid Supplementation Mainly Relies on HT. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 5109503.
178. Wilkes, J.J., Nelson, E., Osborne, M., Demarest, K.T., and Olefsky, J.M. (2005). Topiramate is an insulin-sensitizing compound in vivo with direct effects on adipocytes in female ZDF rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(3), E617-624.
179. Kim, D.Y., Kim, J., Ham, H.J., and Choue, R. (2013). Effects of d- α -tocopherol supplements on lipid metabolism in a high-fat diet-fed animal model. *Nutrition Research and Practice*, 7(6), 481–487.
180. Zhao, L., Kang, I., Fang, X., Wang, W., Lee, M.A., Hollins, R.R., Marshall, M.R., and Chung, S. (2015). Gamma-tocotrienol attenuates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting adipose inflammation and M1 macrophage recruitment. *International Journal of Obesity*, 39(3), 438–446.
181. Shen, X., Tang, Q., Wu, J., Feng, Y., Huang, J., and Cai, W. (2009). Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79(4), 255–263.
182. Liparoti, G., Burchiani, B., Mencaroni, E., Tripodi, D., Di Cara, G., and Verrotti, A. (2022). Individualizing doses of antiepileptic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 18(3), 219–233.
183. Bourgeois, B.F. (1999). Pharmacokinetics and metabolism of topiramate. *Drugs of Today*, 35(1), 43–48.
184. El-Abhar, H.S., and Schaalan, M.F. (2012). Topiramate-induced modulation of hepatic molecular mechanisms: an aspect for its anti-insulin resistant effect. *PLOS One*, 7(5), e37757.
185. Zheng, W., Song, Z., Li, S., Hu, M., Shaukat, H., and Qin, H. (2021). Protective Effects of Sesamol against Liver Oxidative Stress and Inflammation in High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Nutrients*, 13(12), 4484.
186. Andrade, R.S.B., França, L.F.C., Pessoa, L.D.S., Landim, B.A.A., Rodrigues, A.A., Alves, E.H.P., Lenardo, D.D., Nascimento, H.M.S., Sousa, F.B.M., Barbosa, A.L.D.R., Medeiros, J.V.R., Vasconcelos, A.C.C.G., and Vasconcelos, D.F.P. (2019). High-fat diet aggravates the liver disease caused by periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 90(9), 1023–1031.
187. Yang, F., Huang, P., Shi, L., Liu, F., Tang, A., and Xu, S. (2020). Phoenixin 14 Inhibits High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Experimental Mice. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 3865–3874.

188. Zelber-Sagi, S., Ivancovsky-Wajcman, D., Fliss-Isakov, N., Hahn, M., Webb, M., Shibolet, O., Kariv, R., and Tirosh, O. (2020). Serum Malondialdehyde is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver and Related Liver Damage Differentially in Men and Women. *Antioxidants*, 9(7), 578.
189. Kahraman, C., Alver, A., Akça, İ.İ., Rendi, T.A., and Sağlam, N. (2018). The Effects of High-Fat Diets on The Oxidative Stress in Adipose Tissue in Rats, Whose Retroperitoneal Adipose Tissues are Denervated. *Süleyman Demirel Üniversitesi Journal of Health Sciences*, 9(2), 85–89.
190. Jarukamjorn, K., Jearapong, N., Pimson, C., and 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*, 2016, 5029414.
191. Kurt, A., Kalkan, Y., Turut, H., Cure, M.C., Tumkaya, L., and Cure, E. (2018). Topiramate Reduces Aortic Cross-Clamping-Induced Lung Injury in Male Rats. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 61(4), 144–149.
192. Miao, L., and St Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 344–356.
193. Turgut, G., Enli, Y., Kaptanoğlu, B., Turgut, S., and Genç, O. (2006). Changes in the levels of MDA and GSH in mice serum, liver and spleen after aluminum administration. *Eastern Journal of Medicine*, 11(1–2), 7–12.
194. Bergin, P., Leggett, A., Cardwell, C.R., Woodside, J.V., Thakkestian, A., Maxwell, A.P., and McKay, G.J. (2021). The effects of vitamin E supplementation on malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in haemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrology*, 22(1), 126.
195. Kučera, O., Garnol, T., Lotková, H., Staňková, P., Mazurová, Y., Hroch, M., Bolehovská, R., Roušar, T., and Červinková, Z. (2011). The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiological Research*, 60(2), 317–328.
196. Svegliati-Baroni, G., Candelaresi, C., Saccomanno, S., Ferretti, G., Bachetti, T., Marzoni, M., De Minicis, S., Nobili, L., Salzano, R., Omenetti, A., Pacetti, D., Sigmund, S., Benedetti, A., and Casini, A. (2006). A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *American Journal of Pathology*, 169(3), 846–860.
197. Wang, M., Ma, L.J., Yang, Y., Xiao, Z., and Wan, J.B. (2019). n-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(sup1), S116–129.
198. Huang, J., Ren, R.N., Chen, X.M., and Ye, L.Y. (2007). An experimental study on hepatotoxicity of topiramate in young rats. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 9(1), 54–58.

199. Pan, C.S., and Stanley, T.L. (2020). Effect of Weight Loss Medications on Hepatic Steatosis and Steatohepatitis: A Systematic Review. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 70.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 22.04.2021-E.79967



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

Sayı : E-66332047-604.01.02-79967
Konu : Değerlendirme ve Onay

22.04.2021

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Meltem SEVGİLİ
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Ayşe Meltem SEVGİLİ, Sevtap KILINÇ, Pelin ASLAN ve Zeynep YIĞMAN'dan oluşan, G.Ü.ET-21.027 kod numaralı ve **"Topiramatin Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Üzerindeki Antioksidan Etkinliği"** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.027 and entitled **"Antioxidant Activity of Topiramate on Non-Alcoholic Fatty Liver"** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sıçan Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 30

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KILINÇ, Sevtap
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D.	2014
Lisans	Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	2011

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2011-2014	Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi	Yoğun Bakım Hemşiresi

Yabancı Dili

İngilizce

Hobiler

Kitap okumak, Spor yapmak

Yayınlar

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. KILINÇ Sevtap, GÜNEY Şevin. Effects of Hypoxic Preconditioning on Oxidant-Antioxidant Systems in Rat Lung. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2019; 39(2): 194-201.

2. KILINÇ Sevtap, SEVGİLİ Ayşe Meltem. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Topiramate as an Antiobesity Drug. Gazi Medical Journal. 2022; 33: 108-113



GAZİ OLMAK AYRICALIKTIR..

