



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



KLOROJENİK ASİT VE YEŞİL KAHVE ÇEKİRDEĞİ EKSTRAKTININ RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT (NASH) GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Gülşah DEMİRCİ

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK**

**ANKARA
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KLOROJENİK ASİT VE YEŞİL KAHVE ÇEKİRDEĞİ
EKSTRAKTININ RATLARDA NON-ALKOLİK
STEATOHEPATİT (NASH) GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Gülşah DEMİRCİ

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK

**Bu araştırma TÜBİTAK 1002 projesi kapsamında 119R065 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Klorojenik Asit ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktının Ratlarda Non-Alkolik Steatohepatit (NASH) Gelişimi Üzerine Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 16.10.2019 tarihinde, 2019-19-177 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gülşah Demirci

Tarih:

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Uzmanlık tezi

Yazar : Gülşah Demirci

Gönderim Tarihi: 19-Kas-2021 07:16ÖS (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1707718224

Dosya adı: TEZ-G_L_AH_DEM_RC_-_Kaynak_Son.docx

Kelime sayısı: 19,034

Karakter sayısı: 130,061

KLOROJENİK ASİT VE YEŞİL KAHVE ÇEKİRDEĞİ EKSTRAKTININ RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT (NASH) GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **10**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **6**

YAYINLAR

% **5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ



ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Gülşah DEMİRCİ	Sınav tarihi: 09 /12 / 2021
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Biyokimya AD	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Klorejenik Asit ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ektraktının Ratlarda Non-Alkolik Steatohepatit (NASH) Gelişimi Üzerine Etkileri.	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	ile karar verilmiştir.
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu	

IV. AÇIKLAMALAR
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı

Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD

ÖNSÖZ

TÜBİTAK 1002 projesi kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında antioksidan diyetel ajanlar grubunda yer alan yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin NAYKH ile mücadeledeki rolünü ortaya koymaya yönelik olarak; yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü beslenme modeli ile tetiklenen bir non-alkolik steatohepatit (NASH) modelinde bu iki diyetel ajanın hepatoprotektif etkilerinin gözlenmesi ve karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu projenin gerçekleştirilmesinde verdiği destek için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında, eğitim hayatımda ve akademik çalışmalarımı büyük katkıları olan, bilgi ve tecrübeleri ile her daim yolumu aydınlatan, başarılarıyla bana örnek olan, asistanı olmaktan onur duyduğum Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve değerli danışman hocam Prof. Dr. Hasan Serdar Öztürk'e saygılarımı sunar, yardımları ve desteği için sonsuz teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimde ve gelişimimde büyük katkıları olan, ihtiyacım olduğunda her an bana zaman ayıran, çok kıymetli bilgi birikimlerini bana aktaran ve yol gösteren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar'a, Prof. Dr. Erdinç Devrim'e, Prof. Dr. İlker Durak'a, Prof. Dr. Aslıhan Gürbüz'e, Prof. Dr. B. İmge Ergüder'e, Doç. Dr. Özlem Doğan'a saygılarımı sunar ve emekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında ve özellikle de histolojik çalışmaların yürütülmesinde bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevim Aydın'a ve değerli arkadaşım Araş. Gör. Gökçen Gökçe'ye sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Klinik biyokimyaı sevdiren, laboratuvara bakış açıları ve laboratuvar disiplinleriyle her zaman örnek olan, eğitimimde ve gelişimimde büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Doğan Yücel'e ve Doç. Dr. Mehmet Şeneş'e destekleri ve emekleri için teşekkür ederim.

Tıp fakültesi öğrencilik yıllarımda sınavlarda biyokimyadan tam puan aldığım da bana çok güzel kitaplar ve müzik CD'leri hediye ederek; zihnimde tıbbi biyokimya dersleri ile dopaminerjik yollar arasındaki ilk bağlantıları inşa eden ve eğitimimde büyük katkıları olan sevgili hocam Prof. Dr. Güler Buğdaycı'ya teşekkür ederim.

Son olarak uzun eğitim yolculuğum boyunca beni sabırla destekleyen eşim Dr. Adem Demirci'ye, anneme, babama, ablam Dr. Dt. Ayşe Mete'ye ve kızlarım Eylül Mira Demirci ve Miray Ece Demirci'ye sevgilerimi sunar ve varlıklarıyla hayatımı daha anlamlı ve güzel kıldıkları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	iii
Kabul ve Onay Sayfası	iv
Önsöz	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller Dizini	ix
Tablolar Dizini	xi
1. TÜRKÇE ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. NAYKH Tanımı, Tanı ve Tedavisi	7
4.2. NAYKH Patogenezi Ve Lipotoksisite	10
4.3. Yeşil Kahve Çekirdeğinin İçeriği ve Organizmadaki Etkileri	12
4.4. Klorojenik Asitin Yapısı ve Organizmadaki Etkileri	13
4.4.1. Klorojenik Asitin Antioksidan Etkisi	14
4.4.2 Klorojenik Asitin Antiinflamatuvar Etkisi	14
4.4.3 Klorojenik Asitin Hipoglisemik ve Lipid Düşürücü Etkisi	14
4.4.4 Klorojenik Asitin Hasarlı Bölgede Ters Nötrofil Göçü Etkisi	15
4.5. Dikarbonil Stres Ve Gliksalaz Sistemi	15
4.6. Yeşil Kahve Çekirdeğine İlişkin Literatür Özeti	17
4.7. Klorojenik Asite İlişkin Literatür Özeti	18
5. GEREÇ VE YÖNTEM	21
5.1 Ratlarda Nash Modelinin Oluşturulması	21
5.2 Serum Ve Doku Parametrelerinin Biyokimyasal Analizi	23
5.3 Karaciğer Dokusunda Nash Aktivitesinin Histopatolojik Açıdan Değerlendirilmesi	27
5.3.1 Histolojik Takip	27
5.3.2 Histokimyasal Boyama	27
5.4. Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi	30
6. BULGULAR	31
6.1. Kontrol ve Model Gruplarının Karşılaştırılması	31
6.2 YYYY Yem Verilen Gruplardan Diyetsetel Ajan Alan ve Almayan Grupların Karşılaştırılması	35
6.3. Standart Rat Yemi Verilen Gruplardan Diyetsetel Ajan Alan ve Almayan Grupların Karşılaştırılması	43
	vi

6.4. Kontrol ve NASH Gruplarında Serum Glo-1 Düzeyi ile Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	48
6.5 NASH Gruplarında Naykh Aktivite Skoru İle Antropometrik Ölçümler Ve Serum Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	49
6.6 NAYKH Aktivite Skorunu Serum Parametreleri İle Öngörebilmek Üzere Oluşturulan Bir Regresyon Modeli	51
6.7. Ratların Karaciğer Histopatolojisinin Değerlendirilmesi	52
6.7.1. Kontrol Grubu	53
6.7.2. NASH Model Grubu	56
6.7.3. YYYYK-YKÇ Grubu	59
6.7.4. YYYYK-KA 10 Grubu	62
6.7.5. YYYYK-KA 50 Grubu	64
6.7.6. KA Kontrol ve YKÇ Kontrol Grupları	67
7. TARTIŞMA	71
7.1. NASH Modelimizin Kontrol Grubundan Ayrılan Özellikleri ve NASH Tablosunun Araştırdığımız Parametrelere Etkisi	71
7.2. Klorojenik Asit ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktının NAYKH Aktivite Skoru Ve Araştırdığımız Diğer Parametrelere Etkisi	76
7.3. Klorojenik Asit ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktının Standart Yemle Beslenen Sağlıklı Ratlara Etkisi	82
7.4. Dikarbonil Stres ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki	85
7.5. NAYKH Aktivitesi İle İlişkili Parametrelerin İncelenmesi ve NAYKH Aktivitesini Öngörmeye İstatistiksel Açıdan Anlamlı Bir Regresyon Modelinin Oluşturulması	86
7.6. Grupların Histopatolojik Açıdan Değerlendirilmesi	87
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
9. KAYNAKLAR	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGE	: Advanced glycation end products
Glo-1	: Glioksalaz 1
GLUT	: Glucose transporter
GPO	: Glutasyon peroksidaz
YYYK	: Yüksek yağlı ve yüksek kolesterol içerikli
HMG-KoA	: Hidroksi-metil glutaril koenzim A
KA	: Klorojenik Asit
MDA	: Malondialdehit
MG	: Metilglioksal
NASH	: Non-alkolik steatohepatit
NAYKH	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
PIIINP	: Prokollajen III N-terminal peptid
RAGE	: AGE reseptörü
SOD	: Süperoksit dismutaz
VKİ	: Vücut kitle indeksi
YKÇ	: Yeşil kahve çekirdeği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. NAYKH patogenezi ile ilişkili potansiyel tedavi ajanları	9
Şekil 4.2. MG'nin glioksalaz sistemi aracılığı ile detoksifikasyonu	17
Şekil 5.1. Ratlara oral gavaj uygulamasıyla diyetel antioksidanların verililişi	22
Şekil 6.1. Normal karaciğerin makroskopik ve mikroskopik görünümü	52
Şekil 6.2. NASH modeli, karaciğerin makroskopik ve mikroskopik görünümü	53
Şekil 6.3. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	54
Şekil 6.4. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	54
Şekil 6.5. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	55
Şekil 6.6. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	55
Şekil 6.7. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	56
Şekil 6.8. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	57
Şekil 6.9. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	57
Şekil 6.10. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	58
Şekil 6.11. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	58
Şekil 6.12. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	59
Şekil 6.13. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	60
Şekil 6.14. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	60
Şekil 6.15. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	61
Şekil 6.16. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	61
Şekil 6.17. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	62
Şekil 6.18. YYYYK-KA 10 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	63
Şekil 6.19. YYYYK-KA 10 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	63
Şekil 6.20. YYYYK-KA 10 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	64
Şekil 6.21. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	65
Şekil 6.22. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	65
Şekil 6.23. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	66

Şekil 6.24. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	66
Şekil 6.25. KA kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	67
Şekil 6.26. YKÇ kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	68
Şekil 6.27. KA kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü.	68
Şekil 6.28. YKÇ kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	69
Şekil 6.29. KA kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	69
Şekil 6.30. YKÇ kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü	70



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. NAYKH spektrumu içerisinde yer alan tanımlar	7
Tablo 4.2. NAYKH açısından yüksek riskli durumlar	8
Tablo 4.3. NAYKH tedavisinde güncel yaklaşımlar	9
Tablo 5.1. Çalışmada yer alan gruplar ve özellikleri	21
Tablo 5.2. Kleiner skorlama sisteminin genel özellikleri	29
Tablo 6.1. Kontrol ve model gruplarının antropometrik ölçümler açısından karşılaştırılması	31
Tablo 6.2. Kontrol ve model gruplarının serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması	32
Tablo 6.3. Kontrol ve model gruplarının serum Glo-1 ve serum oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	33
Tablo 6.4. Kontrol ve model gruplarının karaciğer PIIINP ve karaciğer oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	33
Tablo 6.5. Kontrol ve model gruplarının kalp PIIINP ve kalp oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	34
Tablo 6.6. Kontrol ve model gruplarının NAYKH aktivite skoru açısından karşılaştırılması	34
Tablo 6.7. Grupların antropometrik ölçümler açısından karşılaştırılması	36
Tablo 6.8. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması	37
Tablo 6.9. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması	38
Tablo 6.10. Grupların serum Glo-1 düzeyi ve serum oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	39
Tablo 6.11. Grupların karaciğer PIIINP ve karaciğer oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	40
Tablo 6.12. Grupların kalp PIIINP ve kalp oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	41
Tablo 6.13. Grupların NAYKH aktivite skoru açısından karşılaştırılması	42
Tablo 6.14. Grupların antropometrik ölçümler açısından karşılaştırılması	43

Tablo 6.15. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması	44
Tablo 6.16. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması	45
Tablo 6.17. Grupların serum Glo-1 düzeyi ve oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	46
Tablo 6.18. Grupların karaciğer PIIINP ve oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	47
Tablo 6.19. Grupların kalp PIIINP ve kalp oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması	48
Tablo 6.20. Kontrol ve nash gruplarında serum Glo-1 ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişki	49
Tablo 6.21. NAYKH aktivite skoru ile antropometrik ölçümler arasındaki ilişki	50
Tablo 6.22. NAYKH aktivite skoru ile serum oksidatif stres parametreleri ve Glo-1 düzeyleri arasındaki ilişki	50
Tablo 6.23. NAYKH aktivite skoru ile serum biyokimyasal parametreleri arasındaki ilişki	51
Tablo 6.24. NAYKH aktivite skoruna ilişkin bir lineer regresyon modeli	52

1. TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Araştırmamızda antioksidan diyetset ajanlar sınıfında yer alan yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asitin; yüksek yağlı ve yüksek kolesterol beslenme ile tetiklenen bir non-alkolik steatohepatit (NASH) modelinde hepatoprotektif etkilerinin gözlenmesi ve karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 56 adet wistar cinsi erkek rat (13 haftalık) randomize olarak 7 gruba ayrılmış olup, 3 kontrol ve 4 deney grubu olmak üzere toplam 7 ayrı gruba yer verilmiştir. Deney gruplarındaki ratlara 10 hafta süre ile yüksek kolesterol ve yüksek yağ içerikli (YYYK) diyet uygulanarak NASH modelinin oluşması sağlanmıştır. Çalışma süresince deney gruplarından NASH model grubu sadece YYYK yem alırken; YYYK yeme ek olarak YYYK - YK grubuna 20 mg/kg dozunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı; YYYK -KA10 grubuna 10 mg/kg klorojenik asit ve YYYK -KA50 grubuna 50 mg/kg klorojenik asit verilmiştir. Kontrol grubuna sadece standart rat yemi verilirken, standart rat yemine ek olarak KA Kontrol grubuna 10 mg/kg klorojenik asit; YK kontrol grubuna ise 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilmiştir. Çalışmanın sonunda 12 saatlik açlık sonrası ratlara tenazi uygulanmış ve ratlardan karaciğer, kalp dokuları ve kan örnekleri alınmıştır. Ratlardan alınan serum örneklerinde rutin biyokimyasal parametreler, oksidatif stres parametreleri ve Glo-1 düzeyleri analiz edilmiştir. Karaciğer ve kalp dokularında ise PIIINP düzeyleri ve oksidatif stres parametreleri analiz edilmiştir. Ayrıca karaciğer dokusu histopatolojik olarak değerlendirilmiş ve NAYKH aktivite skoru hesaplanmıştır.

Bulgular: Araştırmamızda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 50 mg/kg klorojenik asit alan gruplarda NAYKH aktivite skorunun NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu izlenmiştir. NASH model grubunda serum Glo-1 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek izlenmiş ve Glo-1 düzeyi ile NAYKH aktivite skoru arasında negatif korelasyon izlenmiştir. Ayrıca NASH model grubunda karaciğer PIIINP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanırken kalp PIIINP düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir. Araştırmamızda klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının hastalığın histolojik aktivitesini azaltmasının yanısıra karaciğer PIIINP düzeyini arttırmaları dikkate değerdir.

Sonuç: Araştırmamızda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı alan ve 50 mg/kg dozda klorojenik asit alan gruplarda hastalık aktivite skoru anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Bu bulgular koruyucu hekimlik alanında diyetset ajanlarla NASH aktivitesini azaltmak hedeflendiğinde yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ya da 50 mg/kg dozunda klorojenik asit kullanımının daha yararlı olabileceğine dikkat çekmektedir. NAYKH temelde bir lipid metabolizması bozukluğudur. Hastalığı tetikleyen en önemli faktör karaciğerde artan lipid yükü ve bu durumun indüklediği lipotoksitedir. Çalışmamızda NASH grubunda karaciğerde bir lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA'nın diğer karaciğer oksidatif stres parametrelerine nazaran ön plana çıkmış olması dikkate değerdir. Dolayısıyla yoğun oksidatif stresin bir getirisi olan lipid peroksidasyonu

NAYKH patogenezinde önemli bir faktördür. Ayrıca NASH model grubunda serum Glo-1 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek izlenmiştir. Bu açıdan Glo-1 hasta bireyleri sağlıklı bireylerden ayırmada önemli bir serum parametresidir ve NAYKH hastalığının tanısında ve hasta taramalarında non-invazif bir serum göstergesi olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: yağlı karaciğer, klorojenik asit, oksidatif stres, PIIINP, glioksalaz I



2. ABSTRACT

Aim: The aim of our study was to observe and compare hepatoprotective effects of green coffee bean extract (GCBE) and chlorogenic acid (CA) in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model.

Materials and Methods: Fifty-six male wistar rats were randomly divided into seven groups; three of which were control and four were experimental groups. Experimental groups were fed a high-fat, high-cholesterol (HFHC) diet for ten weeks, which resulted in NASH. NASH model group was only fed a HFHC diet; while HFHC-GCB group was treated with 20 mg/kg GCBE, HFHC-CA10 group was treated with 10 mg/kg CA and HFHC-CA50 group was treated with 50 mg/kg CA in addition to HFHC diet. Control groups were fed standard rat chow; while CA-control group was fed 10 mg/kg CA and GCBE-control group was fed 20 mg/kg GCBE in addition to rat chow. At the end of the experimental period; blood, liver and heart tissue samples were collected. Routine biochemical parameters, oxidative stress parameters and Glo-1 levels were analyzed in serum samples. PIIINP levels and oxidative stress parameters were measured in the liver and heart tissues. Liver tissue samples were examined histopathologically, also.

Results: In our study, the NAFLD activity score was found to be significantly lower in the groups treated with GCBE and 50 mg/kg CA compared to the NASH model group. Serum Glo-1 levels were significantly higher in the NASH model group compared to the control group, and a negative correlation was observed between Glo-1 level and NAFLD activity score. In addition, liver PIIINP levels were found to be significantly lower in the NASH model group compared to the control group; while no statistically significant difference was observed in cardiac PIIINP levels. Another significant finding of our study was that CA and GCBE caused a decrease in the histological activity of the disease, also increased the liver PIIINP levels.

Conclusions: This study has shown that green coffee bean extract or chlorogenic acid at a dose of 50 mg/kg may be effective to reduce NASH activity. NAFLD is a lipid metabolism disorder. The most important factors that trigger the disease are increased lipid burden of the liver and lipotoxicity. In our study, liver MDA levels were found to be higher in the NASH group compared to the control group. Therefore, lipid peroxidation, which is a result of oxidative stress, is an important factor in the pathogenesis of NAFLD. In addition, serum Glo-1 levels were significantly higher in the NASH model group than in the control group. And this finding has shown that serum Glo-1 may be used to distinguish patients with NASH from healthy individuals.

Key Words: fatty liver, chlorogenic acid, oxidative stress, PIIINP, glyoxalase I

3. GİRİŞ VE AMAÇ

NAYKH'nın başlangıç aşamasında görülen basit karaciğer yağlanması her ne kadar masum bir hastalık gibi görünse de hastaların çoğunda takipte NASH gelişmekte ve hastalığa bağlı diğer komplikasyonların da (siroz, dekompanse karaciğer yetmezliği, hepatosellüler karsinom, artmış kardiyovasküler risk vb.) eklenmesiyle hastalığa bağlı mortalite ve morbidite artmaktadır (1). Yakın tarihte yapılan bir çalışmada ortalama 6,6 yıllık bir takibin sonunda NAYKH hastalarının %42'sinde basit karaciğer yağlanmasının NASH'ye ilerlediği bildirilmiştir (2). Aynı çalışmada ortalama 12,6 yıllık takipte NAYKH hastalarının %33,2'si ya hayatını kaybetmiştir ya da süreç karaciğer nakli ile sonuçlanmıştır (2).

NAYKH'nın gelişim mekanizmasını açıklamak üzere geliştirilmiş olan çift vuruş teorisine göre birinci vuruş karaciğerde yağlanma yaparken tabloya oksidatif stres ve inflamasyonun eklenmesiyle ikinci vuruş gerçekleşmekte ve ikinci vuruştan sonra hastalık hızla ilerlemektedir (3). Oksidatif stres ve inflamasyonun hastalığın ilerlemesinde önemli birer etken olduğunu göz önünde bulundurarak projemizde NASH gelişiminin önlenmesine yönelik olarak anti-inflamatuvar ve anti-oksidan özellikte iki farklı diyetel ajanın (yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit) etkinliğini değerlendirmeyi ve karşılaştırmayı amaçladık.

Hepatik fibrozis; ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerinin enzimatik sentezi ve yıkımını içeren dinamik bir süreçtir (4). ESM bileşenlerinden hyaluronik asit, kollajen ve laminin düşük konsantrasyonlarda dolaşıma geçmektedir ve her biri gerek ayrı ayrı gerek birlikte kullanıldıklarında NAYKH için önemli göstergelerdir (4). Tüm bu ESM bileşenleri içerisinde prokollajen III N-terminal peptid (PIIINP) NASH histolojisi ile ilişkili olduğu gösterilen tek serum parametresidir (4). PIIINP; Tip III kollajen üretimi için prokollajen-III'ün yıkılması ile açığa çıkan bir yan üründür ve literatürde karaciğer fibrozisi ve NASH'nin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (5).

NAYKH karaciğer dışındaki diğer doku ve organları etkileyen multisistemik bir hastalıktır (6). NAYKH'ye bağlı diğer organ tutulumları arasında prognostik açıdan en önemli olan kardiyak tutulum olup; NAYKH'ye bağlı ölümlerin büyük kısmının kardiyovasküler hastalığa bağlı olduğu bildirilmektedir (6). Ayrıca literatür incelendiğinde kalp yetmezliği olan hastalarda serum PIIINP seviyelerinin NAYKH'den bağımsız olarak, kalp kaynaklı olarak yükseldiğinden ve PIIINP'nin kardiyak fibrozis göstergesi olarak da kullanılabileceğinden bahsedilmektedir (7). Günümüzde PIIINP basit karaciğer yağlanması ile NASH ayrımının saptanmasında güvenilir bir

serum göstergesi olarak kabul edilmektedir (8). Bu nedenle PIIINP Avrupa’da NAYKH hastalarının taranmasında yaygın olarak başvurulmuş ‘enhanced liver fibrosis’ (ELF) skorunun hesaplanmasında kullanılan parametrelerden biridir (9). NASH ayrımı için sık başvurulmuş ve yaygın kullanıma sahip bir gösterge olan PIIINP’nin serum seviyelerinin NASH hastalarında yükseldiği bilinmektedir (8). Ancak bu yükseklik ön planda karaciğer dokusundan mı kalp dokusundan mı kaynaklanıyor literatürde buna ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle araştırmamızda geliştirdiğimiz rat modelinde kalp ve karaciğer dokusunda PIIINP düzeylerinin karşılaştırılması ve serumda yükselen PIIINP’nin karaciğer dokusundan mı kalp dokusundan mı kaynaklandığının aydınlatılması hedeflenmiştir.

Dikarbonil stres, metilglioksal (MG) gibi reaktif dikarbonil metabolitlerinin hücre ve dokularda disfonksiyona yol açacak şekilde aşırı birikimi ile karakterize olan bir tablodur (10). MG ileri glikasyon son ürünlerinin (Advanced Glycation End Products-AGE) majör kaynağı olup, glioksalaz 1 (Glo-1) MG detoksifikasyonunda görev alan ana enzimdir (10, 11). Dikarbonil stres obezite, diyabet ve her ikisi ile de ilişkili NAYKH gibi komplikasyonların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (12). Çeşitli çalışmalarda Glo-1 artışının; dikarbonil stresi azalttığı, obezite ve insülin direnci gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (12). Ayrıca çeşitli hayvan modellerinde yüksek yağ ve yüksek fruktoz içeren diyetlerle karaciğer Glo-1 aktivitesinin azaldığı bildirilmektedir (11). Ek olarak NAYKH hastalarında AGE düzeylerinin karaciğerdeki steatoz ve inflamasyonun ciddiyeti ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (13). Ancak literatür incelendiğinde NAYKH’de dikarbonil stresin etkisini araştıran çok sınırlı sayıda çalışma olmasının yanı sıra NAYKH hastalarında Glo-1 enzimini araştıran tek bir çalışmaya rastlanmıştır (11). Araştırmamızda bu çalışmadan farklı olarak araştırdığımız antioksidan ajanların Glo-1 seviyelerine etkisinin de gözlemlenmesi ve Glo-1 seviyelerinin daha kolay ve gereğinde geniş kitlelerde tarama testi olarak kullanılabilecek bir yöntem olan ‘enzyme-linked immunosorbent assay’ (ELISA) yöntemi ile analiz edilmesi amaçlanmıştır. Araştırmamızda değerlendirilen hipotezler:

- 1.Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı yapısında klorojenik asitin yanı sıra çok sayıda farklı polifenolik bileşikler içermektedir. NASH gelişim sürecinde yeşil kahve çekirdeğinin yapısındaki diğer polifenolik bileşikler klorojenik asit ile sinerjistik etkileşim göstererek total hepatoprotektif aktiviteyi artırır.

2. NASH’te sağlıklı bireylere nazaran serum düzeyi yüksek olarak izlenen PIIINP’nin ana doku kaynağı kalp olabilir.

3. NASH grubu ve sağlıklı kontrol grubunda serum Glo-1 düzeyleri anlamlı derecede farklıdır. Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit verilmesi ile serum Glo-1 düzeyleri artar.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. NAYKH Tanımı, Tanı ve Tedavisi

Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAYKH) insülin direnci ile ilişkili olarak karaciğerde aşırı yağ birikimi ile karakterize, hepatositlerin %5'inden daha fazlasında yağlanmanın (steatoz) gösterilmesi ile tanı alan, alkol kullanımı dışı nedenlerle meydana gelen, kronik bir karaciğer hastalığıdır (1) .

Tablo 4.1. NAYKH spektrumu içerisinde yer alan tanımlar (1).

NAYKH: Basit karaciğer yağlanmasından steatohepatit ve siroza kadar uzanan, hastalıkla ilgili tüm klinik tabloları kapsayan genel tanım.
Non-Alkolik Yağlı Karaciğer: Hepatositlerin %5'inden daha fazlasında yağlanmanın gösterildiği ancak steatohepatit ve sirozun eşlik etmediği klinik tablolar için kullanılır. Basit karaciğer yağlanması şeklinde de kullanılmaktadır.
Non-Alkolik Steatohepatit (NASH): Karaciğer yağlanmasına inflamasyon ve hücre hasarının eşlik ettiği klinik tablo. Bu tabloya siroz eşlik edebilir de etmeyebilir de.
NASH Sirozu: NASH tablosuna sirozun eşlik ettiği durumlarda kullanılır.

NAYKH dünya nüfusunun %25'ini etkileyen ve en sık görülen kronik karaciğer hastalığıdır (14, 15). Bu hastalık dünya genelinde karaciğer yetmezliği, hepatosellüler karsinom (HCC) ve karaciğer transplantasyonunun önde gelen nedenlerinden biridir (16). Hastalığın doğal seyri sırasında NAYKH hastalarının yaklaşık %20'sinde basit karaciğer yağlanması NASH'e ilerlemekte; NASH ise siroz, dekompanse karaciğer yetmezliği ve HCC'ye ilerlemektedir (1). NAYKH hastalarında karaciğerde inflamasyon varlığında (NASH geliştiğinde) hastalığın morbidite ve mortalitesi büyük oranda artmaktadır. İnflamasyon fibrozisle sonuçlandığında ise (fibrotik NASH/NASH sirozu) tedavi son derece güçleşmekte ve süreç karaciğer nakli ya da ölüm ile sonuçlanmaktadır (1).

NAYKH klinik açıdan çok sessiz seyreden ve neredeyse siroz aşamasına kadar ciddi belirti vermeyen bir hastalıktır. Bu nedenle genellikle başka nedenlerle istenilen abdominal görüntüleme

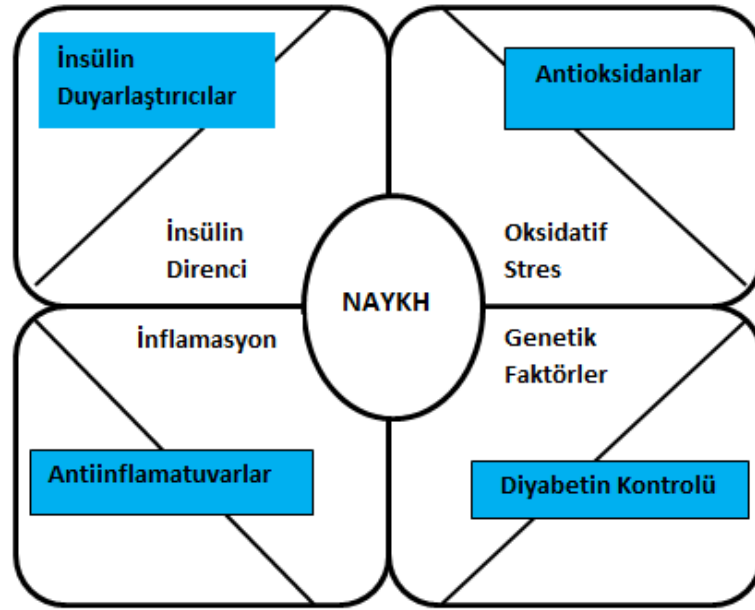
tetikleri neticesinde tesadüfen tanı almaktadır. Ancak hastalığın erken tanı alması hastalığa ilişkin komplikasyonların önlenmesinde son derece önemlidir. Bu nedenle günümüzde NAYKH'ye ilişkin özellikle de NASH ve siroz gelişme riski yüksek olan hasta gruplarında etkili tarama yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinde durulmaktadır.

Tablo 4.2. NAYKH açısından yüksek riskli durumlar (17)

Obezite ve Metabolik Sendrom: Fazla kiloludan morbid obeze kadar obezitenin tüm alt grupları ve eşlik eden metabolik sendrom NAYKH açısından önemli bir risk faktörüdür. Ciddi obezite sınıfına giren hastaların büyük çoğunluğunda (>%95) NAYKH bildirilmiştir.
Tip 2 Diabetes Mellitus (Tip 2 DM): Diyabet ve insülin direnci NAYKH açısından önemli bir risk faktörüdür. Diyabetik hastaların 1/3 ila 2/3'ünde NAYKH bildirilmiştir.
Dislipidemi: Yüksek serum trigliserid seviyeleri ve düşük serum yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyeleri NAYKH hastalarında sık görülen bulgulardır. Dislipidemi ile başvuran hastaların %50'sinde NAYKH bildirilmiştir.

NAYKH tanısında ilk aşama karaciğerde hücrelerin %5'inden fazlasında yağlanmanın varlığının gösterilmesidir. Yağlanmanın belirlenmesinde kabul gören altın standart yöntem karaciğer biyopsisidir (17). Karaciğerde yağlanmanın varlığı gösterildikten sonraki aşama ise ciddi alkol tüketiminin, karaciğerde yağlanmaya veya kronik karaciğer hastalığına yol açabilecek diğer nedenlerin dışlanmasıdır (17). Tanıda altın standart yöntem karaciğer biyopsisi olduğundan ve karaciğer biyopsisi hastaların taranması için uygun olmayan riskli bir girişimsel işlem olduğundan günümüzde NAYKH hastalarının taranmasında, takibinde ve tedavi yanıtlarının izleminde kullanılabilecek serum parametrelerine ihtiyaç söz konusudur.

NAYKH'ye yönelik tedavi stratejileri; karaciğer hastalığını tedavi etmenin yanısıra eşlik eden obezite, dislipidemi, insülin direnci ve tip 2 DM gibi metabolik bozuklukların tedavisini de kapsamalıdır. Basit yağlanma; steatohepatite ve fibrozise ilerlemediği sürece iyi prognozlu olduğundan NAYKH'ye yönelik tedavilerde özellikle biyopsi ile kanıtlanmış NASH ve NASH/fibrozis hastaları hedeflenmektedir (17). Henüz NAYKH için onay almış ilaç tedavileri kullanımda olmasa da insülin duyarlaştırıcı, antiinflamatuvar ve antioksidan ajanlarla yapılan çalışmalar umut vaat etmektedir (18).



Şekil 4.1. NAYKH patogenezi ile ilişkili potansiyel tedavi ajanları (18)

Tablo 4.3. NAYKH Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar (15)

Yaşam Tarzı Değişikliği: İlk basamak tedavide en önemli faktör. Sağlıklı beslenme ve egzersiz tüm hastalara önerilmektedir. %5 oranında kilo kaybının steatozu; %10 oranında kilo kaybının ise inflamasyon ve fibrozisi geriletmediği gösterilmiştir.
İnsülin Duyarlaştırıcılar: Tiazolidindionların NASH hastalarında karaciğerde histolojik bulguları iyileştirdiği gözlenmiştir.
Lipid Düşürücü Ajanlar: Statinlerin steatoz ve inflamasyonu iyileştirdiği gözlenmiştir. Omega-3 yağ asitlerinin ise intrahepatik trigliserid düzeylerini azalttığı gözlenmiştir.
Antioksidan ve Sitoprotektif Ajanlar: E vitamininin NASH hastalarında steatoz ve inflamasyonu azalttığı gözlenmiştir. Pentoksifilinin ise steatozu azalttığı gözlenmiştir.
Probiyotikler: Probiyotiklerin NAYKH’de lipid profili ve karaciğer fonksiyon testlerini iyileştirdiği gözlenmiştir. Ancak probiyotiklerin arasındaki doz ve formül farklılıkları nedeniyle sonuçlar yeterince açık değildir.
Obetikolik Asit: NASH tedavisinde umut vaat eden bir sentetik safra asididir. Faz-3 aşamasında çalışmalar devam etmektedir. Fibrozisi azalttığı gözlenmiştir ancak NASH rezolüsyonu etkisi izlenmemiştir.

4.2. NAYKH Patogenezi ve Lipotoksisite

NAYKH'de karaciğerde yağ birikimi farklı mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi yağ dokuda artmış lipoliz sonucu dolaşımda artan lipidlerin karaciğerde birikmesidir. Diğer önemli mekanizmalar ise karaciğerde artmış denovo lipogenez, azalmış yağ asidi oksidasyonu ve diyetle fazla miktarda yağ alımıdır (14). İnsanlarda yapılan izotopla işaretleme çalışmalarında NAYKH hastalarında denovo lipid sentezinin arttığı ancak karaciğerdeki yağ asitlerinin büyük çoğunluğunun dolaşımdaki yağ asitlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (14).

Normal şartlarda plazma serbest yağ asidi düzeyleri açlıkta artarak dokulara enerji sağlar; toklukta ise insülinin lipolizi baskılaması sonucu serbest yağ asidi düzeyleri azalır. Ancak insülin direnci söz konusu olduğunda lipoliz baskılanamaz ve dolaşımdaki serbest yağ asidi konsantrasyonu devamlı yüksek seyrederek karaciğerde lipid birikimine neden olur (14). Bir çalışmada inhibitör G proteinleri aracılığı ile yağ dokusundaki lipoliz baskılandığında yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde serum serbest yağ asidi düzeyleri ve karaciğer trigliserid düzeyleri azalmıştır (14).

Karaciğerde lipidler birikmeye başladıktan sonra başlangıçta oluşan basit yağlanmanın NASH'e ilerlemesi sürecinde en önemli belirleyiciler lipid yükünün yoğunluğu ve lipid içeriğidir. Bu noktada lipotoksisite kavramı önem kazanmaktadır. Lipotoksisite; lipid çevrenin veya hücre içi lipidlerin muhteviyatının organel disfonksiyonu, hücre hasarı ve hücre ölümüne yol açacak yönde değişmesi olarak tanımlanmaktadır (19). Lipotoksisite kronik inflamasyonla yakından ilişkilidir ve bu durum metabolik olarak tetiklenmiş inflamasyon ya da metaboinflamasyon olarak da tanımlanmaktadır (19).

Lipidler toksik etkilerini endoplazmik retikulum ve mitokondri disfonksiyonuna yol açarak ya da hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörler veya hücre içi sinyal yolları ile etkileşerek gösterebilirler (19). Bunun en tipik örneği palmitatın TLR-4'ü (toll like receptor 4) aktive ederek inflamasyonu tetiklemesidir (20). Bazı çalışmalarda triaçilgliserol sentezi inhibe edildiğinde oksidatif stres, inflamasyon ve hücre hasarının arttığı gözlenmiştir ve bu durumun lipid ara ürünlerinin hücrede birikimine bağlı olduğu düşünülmektedir (19). Bu çalışmaların sonuçları göz önünde bulundurulduğunda serbest yağ asitleri ve lipid ara ürünleri hücreler için daha toksik olduğundan bunların triaçilgliserol formunda depo edilmeleri hücre için daha güvenlidir.

Perilipinler lipid damlacıklarını çevreleyen proteinlerdir ve lipolizin düzenlenmesinde görev alırlar. Perilipin-5'ten yoksun farelerde lipolizin ve lipotoksisitenin arttığı gözlenmiştir (19). Bu durum perilipinlerin lipotoksisite açısından önemini ortaya koymaktadır.

Doymuş yağ asitleri (özellikle palmitik asit ve stearik asit), kolesterol, seramidler ve lizofosfatidil kolin lipotoksisiteye neden olan lipidler içerisinde yer alırken; çoklu doymamış yağ asitlerinin ise aksine karaciğerde hücre hasarını azalttığı gözlenmiştir (19). Bu çalışmalar lipotoksisitede lipid muhteviyatının önemini ortaya koymaktadır. Karaciğer hücrelerinde biriken lipidler için denge toksik lipidler lehine olduğunda bu durumun inflamasyon ve NASH açısından tetikleyici olabileceği düşünülmektedir (19).

Çoklu doymamış yağ asitlerinin tüketiminde ise omega-3 / omega-6 yağ asidi dengesinin korunması son derece önemlidir. Omega-6 yağ asitleri inflamasyonu tetiklerken (eikozanoidler araşidonik asitten sentezlenmektedir) ; omega-3 yağ asitleri antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler göstermektedir (21). Omega-3 / omega-6 yağ asidi dengesinin omega-6 lehine bozulması inflamasyonu tetikleyen bir faktör olduğundan NAYKH gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (21). Yine farklı bir çalışmada klinik açıdan ciddi NAYKH hastalarının linoleik asit (omega-6 yağ asidi, araşidonik asit prekürsörü) tüketimlerinin hafif dereceli NAYKH hastalarına göre daha fazla olduğu izlenmiştir (22).

Obezite ve diyabet NAYKH gelişimi açısından önemli metabolik risk faktörleridir. Perry vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada insülinin glukoneogenezi baskılamasındaki temel mekanizmanın; insülinin karaciğerde lipolizi baskılayarak asetil-KoA seviyelerini düşürmesi olduğu gözlenmiştir (23). Asetil-KoA seviyeleri düştüğünde pirüvat karboksilaz aktivitesi azalmakta ve glukoneogenez baskılanmaktadır (23). İnsülin direnci söz konusu olduğunda lipoliz baskılanamayacağından glukoneogenez yolağının aktif çalışması da plazma glukoz seviyelerinin yükselmesine katkıda bulunacaktır. Aynı çalışmada obez bireylerde IL-6 seviyelerinin arttığı, IL-6'nın beyaz yağ dokusunda lipolizi arttırdığı ve insülin direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (23). Bu çalışma NAYKH patogenezinde önemli rol oynayan obezite ve diyabet arasındaki yakın ilişkinin mekanizmasına ışık tutması açısından önem arz etmektedir.

4.3. Yeşil Kahve Çekirdeğinin İçeriği ve Organizmadaki Etkileri

Aromatik tadı ve lezzetli içimi nedeniyle günümüzde kahve; yıllık 500 milyar fincanlık bir tüketimle sudan sonra ikinci en çok tüketilen içecek haline gelmiştir (24). Kahve bitkisi yeşil yapraklı, kırmızı meyveleri olan, ortalama 5-10 metre boylarında bir ağaçtır ve kahve çekirdeği denilen yapıyı kahve bitkisine ait meyvelerin tohumları oluşturmaktadır (Coffea L.; aile: Rubiaceae) (25). Kahve bitkisinin 70'ten fazla farklı türü vardır ancak dünya genelindeki kahve üretiminin tamamına yakını iki tür üzerinden gerçekleşmektedir (25). Bunlarda birincisi C. Arabica'dır (dünya üretiminin %75'i) diğeri ise C. Caniphora (Robusta)'dır (dünya üretiminin %25'i) (25).

Yeşil kahve çekirdeği; olgunlaşmış kırmızı renkli kahve meyvelerinin dışındaki etli bölümün çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılması sonucunda elde edilmektedir (26). Siyah/kahverengi kahve çekirdekleri ise bu yeşil kahve çekirdeklerinin kavrulması ile elde edilmektedir (26). Yeşil kahve yapısında yaklaşık %60 oranında karbonhidrat, %8-18 oranında lipid, %9-16 oranında protein-peptid-serbest aminoasit, % 6-10 oranında ise polifenol içermektedir (26).

Yeşil kahvenin antioksidan özelliği içeriğinde yer alan kafein ve fenolik bileşiklere atfedilmektedir (25). Yeşil kahve çekirdeğinde tüm polifenoller içerisinde en yaygın olarak bulunan grup klorojenik asitlerdir ve bu grup içerisinde de 5-kaffeoilkuinik asit (5 CQA) en çok bulunandır (26).

Tablo 4.4. Yeşil kahve çekirdeğinin organizmadaki etkileri (25)

Organizmadaki Etkiler	Etki Mekanizması
Anti-Obezite Etki	SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein) downregülasyonu PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) aktivasyonu Lipoliz aktivasyonu Adiponektin artışı Yağ absorpsiyonunda azalma Karnitin palmitoil transferaz aktivitesinde artış
Antioksidan Etki	Reaktif oksijen türlerinin üretiminde azalma Antioksidan enzim aktivitesinde artış Glutasyon seviyelerinde artış Lipooksijenaz inhibisyonu Serbest radikallerin uzaklaştırılması Ağır metallerin şelasyonu

Anti-diyabetik Etki	İnsülin sekresyonunda artış α-glukozidaz inhibisyonu ile glukoz emiliminde yavaşlama Glukoz-6-fosfataz inhibisyonu ile glukoneogenez ve glikojenolizin azaltılması GLUT-4 aktivasyonu İnsülin duyarlaştırıcı etki
Anti-hipertansif ve Anti-aterosklerotik Etki	Nitrik oksit (NO) salınımında artış 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz (11β-HSD) inhibisyonu ile kortizol/kortizon seviyelerini azaltarak kan basıncını düşürücü etki (kavrulmuş siyah kahve 11β-HSD aktivasyonu ile hipertansif etki gösterir) Kortizol NO salınımını azalttığı için kortizol seviyelerindeki düşüş antihipertansif etkiye neden olmaktadır. Homosistein seviyelerinde azalma Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) degradasyonunda azalma
Anti-kanserojen Etki	Proapoptotik protein Bax'ın upregülasyonu Antiapoptotik olan Bcl-2'nin downregülasyonu Kaspaz-9 aktivasyonu Glutasyon sentezinde artış Kolon motilitesinde artış (karsinojenlere daha az maruziyet)
Hepatoprotektif Etki	Detoksifikasyonda görev alan faz II enzimlerinin uyarılması Karaciğer glutasyon seviyelerinde artış Karsinojen aktivasyonunda rol alan bazı sitokrom P450 enzimlerinin inhibisyonu
Nöroprotektif Etki	Beta amiloid birikiminde azalma Nöronlarda inflamasyon ve oksidatif stresin azaltılması Nöron glukoz kullanımında artış

4.4. Klorojenik Asitin Yapısı ve Organizmadaki Etkileri

Klorojenik asitler yeşil kahve çekirdeğinin yapısında yer alan polifenollerin büyük bir kısmını oluşturur (26). Yeşil kahve çekirdeğinde en yoğun olarak bulunan klorojenik asit 5-kaffeoilkuinik asittir (5 CQA) (27). Klorojenik asit ısıya maruz bırakıldığında biyolojik aktivitesinde kayıp söz konusu olmaktadır (28). Bu durum özellikle kahvenin kavrulma işlemi

açısından önemlidir. Literatürde yeşil kahve çekirdeğinin kavrulması sonucunda klorojenik asit içeriğinin %95'e kadar azalabileceğinden bahsedilmektedir (26). Bu nedenle, NAYKH ile mücadelede kavrulmuş kahve yerine klorojenik asit açısından daha zengin olan yeşil kahveye odaklanması daha uygundur.

4.4.1. Klorojenik Asitin Antioksidan Etkisi

Klorojenik asit doğal polifenolik bir antioksidandır. Yapısında yer alan aktif hidroksil ve karboksil grupları sayesinde serbest radikallerle kolayca etkileşime girip etkilerini azaltmaktadır (28). Yüksek dozlarda antioksidan gücü yüksek iken düşük konsantrasyonlarda aksine oksidasyonu teşvik edici özellik gösterebilmektedir (28).

Klorojenik asit antioksidan etkisini antioksidan enzimlerin ve Faz II detoksifikasyon enzimlerinin sentezini artırarak da gösterebilmektedir (28). Ayrıca süperoksit radikali oluşturan bir enzim olan ksantin oksidazın aktivitesini azalttığı bilinmektedir (28).

4.4.2 Klorojenik Asitin Antiinflatuar Etkisi

Farklı çalışmalarda klorojenik asitin çeşitli inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-6) düzeylerini azalttığı gözlemlenmiştir (28). Ayrıca TLR (toll like receptor) yollarını inhibe ederek de inflamasyonu baskılayabilmektedir (28).

4.4.3 Klorojenik Asitin Hipoglisemik ve Lipid Düşürücü Etkisi

Peng vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada klorojenik asitin yüksek yağlı diyet verilen ratlarda bağırsaklarda GLUT-2 (glucose transporter-2) ve SGLT-1 (sodium glucose transporter-1) ekspresyonunu azaltarak glukoz absorpsiyonunu azalttığı gösterilmiştir (29). Aynı çalışmada klorojenik asitin farklı bağırsak segmentlerinden proglukagon sentezini de azalttığı izlenmiştir (29).

Klorojenik asitin iskelet kasında GLUT-4 sentezini arttırarak; kas dokusuna glukoz alımını arttırdığı ve glukoz-6 fosfataz inhibisyonu ile glukoneogenez ve glikojenolizi azaltarak hipoglisemik etki gösterdiği gösterilmiştir (28).

Hao vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada klorojenik asitin HMG-KoA redüktaz inhibisyonu ile serum kolesterol seviyelerini düşürücü etki gösterdiği gösterilmiştir (30). Pankreatik lipaz inhibisyonu, yağ asidi sentezinin inhibisyonu diğer lipid düşürücü etkiler arasında sayılabilir (28).

4.4.4 Klorojenik Asitin Hasarlı Bölgede Ters Nötrofil Göçü Etkisi

Ters nötrofil göçü; nötrofillerin hasarlı bölgeden ya da diğer anlamıyla hasar uyarısının geldiği bölgeden uzaklaşmaları olarak tanımlanmaktadır (31). Zhang vd. (2020) tarafından zebra balığı üzerinde yapılan bir çalışmada klorojenik asitin nötrofil apoptozisini uyardığı ve ters nötrofil göçü ile nötrofillerin hasarlı bölgeden uzaklaşmasını sağladığı gösterilmiştir (31). Ters nötrofil göçü hasarlı bölgede inflamasyonun rezolüsyonu ve iyileşme açısından son derece önemlidir. Bu bulgular klorojenik asitin hepatoprotektif etkisine ışık tutabilir.

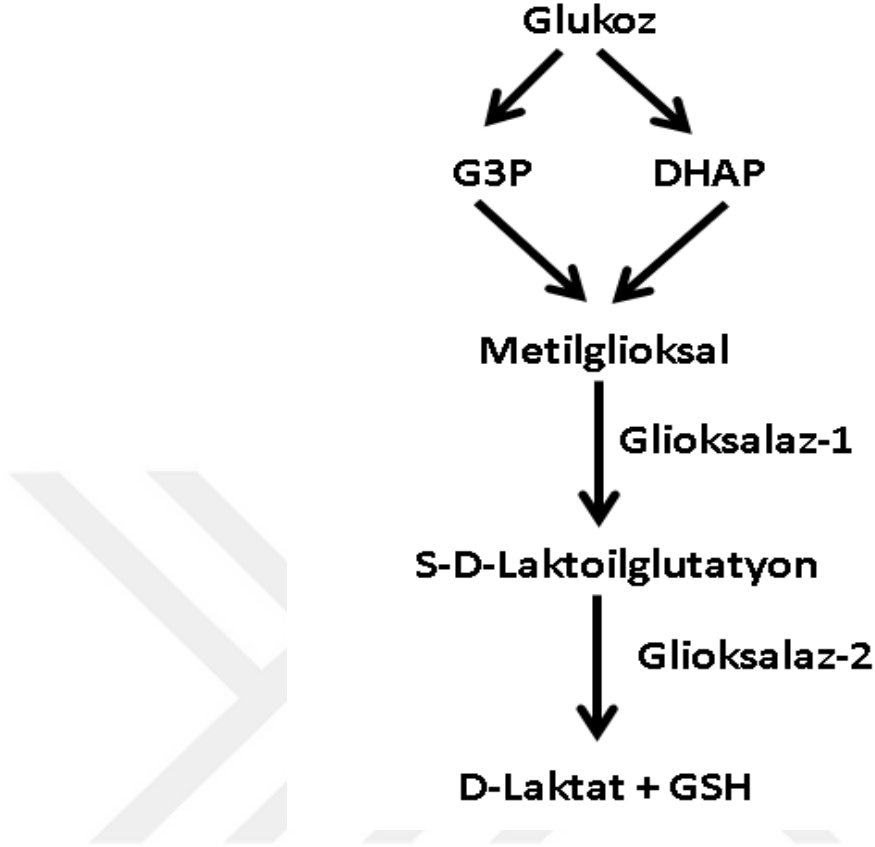
4.5. Dikarbonil Stres ve Gliksalaz Sistemi

Dikarbonil stres; reaktif dikarbonil metabolitlerinin hücre ve dokularda disfonksiyona yol açacak şekilde aşırı birikimi ile karakterize olan bir tablodur (10). Biriken dikarbonil metabolitleri proteinler ve DNA ile etkileşime girerek hücre hasarına neden olmaktadır (32). Gliksal, metilgliksal (MG), 3-deoksiglukozon ve glukozon; dikarbonil metabolitlerine örnek olarak verilebilir (33). Fizyolojik şartlarda organizmada en fazla oluşan dikarbonil metabolit MG'dir (33). MG; lipid, protein ve karbonhidrat metabolizması sırasında açığa çıkabilen oldukça reaktif bir metabolittir. Ancak büyük çoğunlukla glikoliz yolağından köken alır ve gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfattan non-enzimatik bir yolla oluşur (32). MG oluşumuna katkıda bulunan diğer yollar ise glukoz otooksidasyonu, glikozile proteinlerin yıkımı, keton katabolizması sırasında asetonun oksidasyonu, treonin katabolizması ve lipid peroksidasyonudur (32).

Organizmada MG genellikle nükleik asit ve protein yapısında yer alan aminoasit rezidüleri ile reaksiyona girer ve özellikle arginin rezidülerini tercih eder (32). Arginin rezidüleri proteinlerin fonksiyonel bölgelerinde sıklıkla yer aldığından; dikarbonil metabolitleri ile modifikasyon çoğunlukla fonksiyonel bozukluğa neden olmaktadır (33). Farklı çalışmalarda MG akümülyasyonunun protein yıkımını arttırıcı, DNA hasarı oluşturunu, sitotoksik ve karsinojenik etkileri gözlenmiştir (32).

Oksidatif stres ve dikarbonil stres birbirinden farklı yolaklar olmasına rağmen oksidatif stresteki artış GSH (glutasyon) azalmasına bağılı olarak dikarbonil stresin artışına neden olabilmektedir (33). Çünkü GSH her iki yolak için ortak bileşiktir. Dikarbonil metabolitleri ile modifikasyon sonucu oluşan bileşiklere ileri glikasyon son ürünleri adı verilmektedir (advanced glycation end products, AGE). AGE'lerin ilk etkisi reseptörlerinden bağımsız olarak proteinlerde oluşturdukları yapısal ve fonksiyonel değışiklikler aracılığıyla gerçekleşirken diğeri bir etki de RAGE'ler (AGE reseptörleri) aracılığı ile gerçekleşmektedir (34). AGE-RAGE etkileşiminin inflamasyonu, oksidatif stresi ve çeşitli kinaz yolaklarını aktive ettiğı bilinmektedir (34).

Glioksalaz-1 (Glo-1) enzimi GSH varlığında MG'yi S-D-laktoilglutatyona dönüştürür. Glioksalaz-2 (Glo-2) ise Glo-1'in katalizi sonucu oluşan S-D-laktoilglutasyonun D-laktat ve GSH'a dönüşümünü sağlar (34). Glioksalaz enzimleri organizmada dikarbonil stresin azaltılmasında önemli rol oynarlar (33).



Şekil 4.2. MG'nin gliksalaz sistemi aracılığı ile detoksifikasyonu (G3P: Gliseraldehit 3 fosfat; DHAP: Dihidroksi aseton fosfat (34))

4.6. Yeşil Kahve Çekirdeğine İlişkin Literatür Özeti

Kavrulmamış kahve çekirdeklerinden oluşan yeşil kahve çekirdeği ekstraktı; yaygın olarak tüketilen kavrulmuş kahveye göre daha yüksek oranda biyoaktif fitokimyasal içeriğine sahiptir (35). Pek çok farklı çalışmada yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit takviyesinin vücut ağırlığını ve vücut kitle indeksini (VKİ) azalttığı ve bu etkinin özellikle $VKİ \geq 25 \text{ kg/m}^2$ olan bireylerde daha belirgin olduğu gösterilmiştir (36). Dickson vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada kahve tüketiminin Tip 2 DM riskini ve NAYKH'de karaciğer yağlanma skorunu azalttığı gözlemlenmiştir (37). Roshan vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise günlük 800 mg kafeinsiz yeşil kahve çekirdeği ekstraktı tüketiminin açlık glukoz düzeylerini, insülin direncini, iştah skorunu ve vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (38). Thom (2007) tarafından yapılan bir çalışmada klorojenik asitten zengin kahve içiminin diyetel glukoz absorpsiyonunu

azalttığı; klorojenik asitten zengin olmayan normal kahve içenlerde bu etkinin görülmediği bildirilmektedir (39). Shimoda vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada ise günlük 100 ve 200 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve 60 mg/kg klorojenik asit alımının karaciğer trigliserid seviyelerini azalttığından bahsedilmektedir (40).

Yeşil kahve çekirdeğinin lipid profili üzerine etkileri incelendiğinde; bu alandaki yakın zamanlı çalışmaların çoğunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktının total kolesterol, trigliserid ve LDL-kolesterol seviyelerini azalttığı; HDL-kolesterol seviyelerini ise arttırdığı izlenmiş olup; bazı çalışmalarda ise lipid profilinde anlamlı değişiklik izlenmemiştir (41).

Yeşil kahve çekirdeğinin oksidatif strese etkileri incelendiğinde; Baeza vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve klorojenik asitin karaciğer kültür hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı izlenmiştir (42). Bu çalışmada kafeinin kültür hücrelerinde antioksidan etkisinin olmadığı belirtilmektedir (42). Çalışmada ek olarak yeşil kahve çekirdeği ekstraktının GSH seviyelerini, glutatyon peroksidaz (GPO) ve glutatyon redüktaz aktivitelerini arttırdığı; malondialdehit (MDA) oluşumunu ise azalttığı bildirilmektedir (42). Nogaim vd. (2020) tarafından ratlarda yapılan bir çalışmada ise yeşil kahvenin karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini arttırdığı; MDA düzeylerini ise azalttığı bildirilmektedir (43).

Dikarbonil stres açısından bakıldığında; çok sayıda çalışmada yeşil kahve içeriğinde bulunan farklı polifenollerin; metal şelasyonu, serbest radikallerin etkisizleştirilmesi, RAGE ekspresyonunun azaltılması, dikarbonil bileşiklerin tuzaklanması gibi farklı mekanizmalar ile dikarbonil stresi azalttığı bildirilmektedir (44).

4.7. Klorojenik Asite İlişkin Literatür Özeti

Alqarni vd. (2019) tarafından yüksek fruktozlu diyet ile ratlarda NAYKH oluşturulan bir araştırmada; klorojenik asit verilen grupta verilmeyen gruba göre hepatosit hasarının daha az olduğu bildirilmiştir (45). Bu çalışmada ayrıca klorojenik asit verilen grupta karaciğer dokusunda histolojik olarak sitoplazmik ve nükleer dejenerasyon içermeyen normal hepatositlerin varlığı bildirilmiştir (45). Araştırmada ek olarak klorojenik asit verilen grupta serum trigliserid, total kolesterol, glukoz, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyelerinin

düşük olduğu; karaciğer dokusunda ölçülen GPO ve SOD aktivitelerinin ise yüksek olarak izlendiği belirtilmektedir (45).

Liang vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile ratlarda NAYKH modeli oluşturulmuş ve 90 mg/kg/gün dozunda verilen klorojenik asitin vücut ağırlığını, serum ALT ve AST seviyelerini, karaciğer ağırlığını, karaciğer trigliserid, serbest yağ asidi ve MDA düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığı; karaciğer SOD aktivitesini ise arttırdığı gösterilmiştir (46).

Bhandarkar vd. (2019) yüksek yağlı yüksek karbonhidratlı diyet ile ratlarda NAYKH modeli oluşturmuş ve diyetle eklenen 100 mg/kg/gün dozundaki klorojenik asitin besin tüketimini, abdominal ve visseral yağlanmayı, açlık ve tokluk plazma glukoz düzeylerini, plazma ALT ve AST aktivitelerini ve sol ventrikül diyastolik sertlik indekslerini azalttığını rapor etmişlerdir (47). Çalışmada ayrıca klorojenik asitin karaciğerde yağ depolanmasını ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığı, kalp sol ventrikülünde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığı belirtilen bulgular arasındadır (47).

Oksidatif stres bulguları açısından literatür incelendiğinde; Ali vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ratlarda metotreksat ile karaciğer hasarı ve oksidatif stres indüklenmiş olup, günlük 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında klorojenik asitin serum ALT, AST, LDH düzeylerini, karaciğer MDA düzeylerini azalttığı, karaciğer glutatyon redüktaz, GPO, katalaz aktivitelerini arttırdığı bildirilmektedir (48). Çalışmada ayrıca 100 mg/kg klorojenik asitin karaciğer SOD aktivitesini arttırdığı 50 mg/kg klorojenik asitin ise anlamlı etkisinin gözlenmediği belirtilmiştir (48).

Shi vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer fibrozis modelinde 60 mg/kg/gün dozunda klorojenik asitin karaciğerde histolojik olarak fibrozis yüzdesini, karaciğerde fibrojenik genlerin ve Tip I ve Tip 3 kollajen ekspresyonunu, karaciğer MDA seviyelerini azalttığı, karaciğer SOD ve katalaz aktivitelerini ise arttırdığı izlenmiştir (49).

Du vd. (2013) tarafından yapılan farklı bir çalışmada ratlara intravenöz yolla yüksek doz klorojenik asit verildiğinde serum SOD ve katalaz aktivitelerinin azaldığı izlenmiştir (50).

Akila ve Vennila (2016) tarafından yapılan bir çalışmada rat miyokardiyumunda izoproterenol ile oksidatif stres indüklenmiş olup, 10,20 ve 40 mg/kg dozlarda verilen klorojenik asitin serum ALT, AST, kreatinin kinaz (CK) ve troponin seviyelerini azalttığı eritrosit ve kalp SOD, katalaz ve GPO seviyelerini ise arttırdığı gözlenmiştir (51). Aynı çalışmada 40 mg/kg klorojenik asitin kardiyak histolojide inflamasyonu belirgin ölçüde azalttığı belirtilmektedir (51).

Agunloye vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada ratlarda siklosporinle indüklenen bir hipertansiyon modelinde; 10 ve 15 mg/kg dozlarda verilen klorojenik asitin kalp ve plazma MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (52). Wang vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada ise ratlarda oluşturulan miyokardiyal infarktüs modelinde 100 mg/kg klorojenik asit verilmesinin plazma SOD ve katalaz seviyelerini arttırdığı bildirilmektedir (53).

Dikarbonil strese ilişkin literatür verileri incelendiğinde; Gugliucci vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada klorojenik asitin histon ve albümin proteinlerinde glikasyonu engelleyerek AGE oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (54). Preetha Rani vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise klorojenik asitin rat kalp hücre kültüründe hiperglisemik şartlarda AGE oluşumunu baskıladığı izlenmiştir (55).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Ratlarda NASH Modelinin Oluşturulması

Araştırmamızda deney gruplarındaki wistar cinsi erkek ratlara 10 hafta süre ile yüksek yağ ve yüksek kolesterol içerikli diyet (YYYK diyet) uygulanarak NASH modelinin oluşması sağlanmıştır (56, 57). Bu amaçla 56 wistar rat (ortalama ağırlık: 358 gr; 13 haftalık) randomize olarak 7 gruba ayrılmış olup, araştırmamızda 3 kontrol ve 4 deney grubu olmak üzere toplam 7 ayrı gruba yer verilmiştir (Her bir grupta 8 rat yer almaktadır). Araştırmanın başlangıcından sakrifikasyon aşamasına kadar ratların genel sağlık durumları stabil seyretmiş ve araştırma sonuna kadar ölen rat olmamıştır.

Tablo 5.1. Çalışmada yer alan gruplar ve özellikleri

Grup Numarası	Grup Adı	Verilen Yem Türü	Oral Gavaj Yoluyla Verilen Ajan
1	Kontrol Grubu	Standart Rat Yemi	-
2	NASH Model Grubu	YYYK Yem	-
3	YYYK-YKÇ Grubu	YYYK Yem	20 mg/kg Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı
4	YYYK-KA10 Grubu	YYYK Yem	10 mg/kg Klorojenik Asit
5	YYYK-KA50 Grubu	YYYK Yem	50 mg/kg Klorojenik Asit
6	KA Kontrol Grubu	Standart Rat Yemi	10 mg/kg Klorojenik Asit
7	YKÇ Kontrol Grubu	Standart Rat Yemi	20 mg/kg Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı

YKÇ: Yeşil Kahve Çekirdeği KA: Klorojenik Asit

Ratlar Kobay Deney Hayvanları A.Ş.'den temin edilmiştir. Ratların bakımı ve çalışmaya ilişkin tüm işlemler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma

Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü diyet için literatürde daha önce NASH modeli oluşturduğu gösterilmiş olan Research Diets firmasının D09052204 kodlu özel yemi kullanılmıştır (56, 57). İçeriği ağırlıkça %50 oranında klorojenik aside standardize edilmiş yeşil kahve çekirdeği ekstraktı piyasadan hazır ticari form şeklinde temin edilmiştir (Sepe Natural Organik Ürünler San. ve Tic. AŞ.). Bu yeşil kahve çekirdeği ekstraktının saflık tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile yapılmış olup; içerdiği klorojenik asit yüzdesi %50 olarak bildirilmektedir. Projede kullanılan klorojenik asit ise Acros firmasından temin edilmiştir. Acros firmasından temin edilen klorojenik asitin saflık tayini HPLC yöntemi ile yapılmış olup; saflık yüzdesi %97,5 olarak bildirilmektedir. Verilecek klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının miktarı belirtilen dozlara uygun şekilde ratların vücut ağırlığına göre hesaplanmıştır. Ratların pellet yemleri ve suyu serbestçe (ad libitum olarak) almaları sağlanmıştır. Klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı tüm ratlarda belirtilen dozların alındığından emin olmak amacıyla oral gavaj yoluyla verilmiştir. 10 haftalık sürenin sonunda, 12 saatlik açlık sonrası ratlara genel anestezi altında intrakardiyak kan alımı ile ötenazi uygulanmış ve ratlardan karaciğer, kalp dokuları ve kan numuneleri alınmıştır.



Şekil 5.1. Ratlara oral gavaj uygulamasıyla diyetel antioksidanların verilişi

5.2 Serum ve Doku Parametrelerinin Biyokimyasal Analizi

Kan örnekleri 3000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum numunelerinde AST, ALT, total kolesterol, trigliserid, HDL-K, üre, kreatinin, amilaz, lipaz, açlık glukoz düzeyi, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri, malondialdehit ve Glo-1 düzeyleri analiz edilmiştir.

AST, ALT, total kolesterol, trigliserid, HDL-Kolesterol (HDL-K), üre, kreatinin, amilaz, lipaz, açlık glukoz düzeyleri kan alımı sonrası aynı gün içerisinde Beckman Coulter AU5800 otoanalizörü kullanılarak çeşitli spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiştir. Ratlardan alınan dokular ve kan örneklerinden aynı gün çalışılmayan numuneler analiz gününe kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Serum Glo-1 düzeyleri Elabscience marka rat Glo-1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kiti kullanılarak analiz edilmiş; tüm numuneler çift çalışılarak iki sonucun ortalaması alınmıştır. LDL-Kolesterol (LDL-K) ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (VLDL-K) düzeyleri daha önce farklı rat çalışmalarında literatürde belirtildiği gibi Friedewald formülü kullanılarak hesaplanmıştır (56, 58).

Karaciğer ve kalp dokularının ağırlıkları tartılarak 1:10 (w/v) oranında serum fizyolojik ile dilüe edilip homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 4000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilerek süpernatanda Prokollajen-III N-terminal peptid (PIIINP) düzeyleri ve oksidatif stres parametreleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ve MDA düzeyi) analiz edilmiştir. Rat karaciğer ve kalp homojenatında PIIINP düzeyleri USCNK markalı rat PIIINP ELISA kiti kullanılarak sandviç ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir. Tüm örnekler çift çalışılarak her iki çalışmanın ortalaması alınmıştır.

Serum ve doku homojenatında oksidatif stres parametrelerinden süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçümü; SOD enziminin süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırması ve nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin süperoksit tarafından indirgenmesinin engellemesi (SOD aktivitesi ile doğru orantılı olarak) prensibine dayanan bir yöntemle ölçülmüştür (59). MDA düzeyi ise MDA'nın tiyobarbitürik asitle asidik ortamda pembe renkli bileşik oluşturmaya dayanan spektrofotometrik bir yöntemle analiz edilmiştir (60). Katalaz enzim aktivitesi; katalazın hidrojen peroksiti parçalamasına eşlik eden absorbans azalması prensibine dayanan bir yöntemle tayin edilmiştir (61). Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi ise enzimin katalizlediği reaksiyonda

oluşan yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmesi sırasında NADPH'nin NADP'ye dönüşmesi sonucu NADPH absorbansındaki azalma prensibine dayanan bir yöntemle analiz edilmiştir (62).

Araştırmamızda yer alan tüm dokulara ilişkin protein miktar tayinleri Lowry yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup (Lowry vd., 1951), dokulara ilişkin tüm sonuçlar doku protein miktarına oranlanarak verilmiştir (63).

SOD Aktivitesi Ölçümüne Ait Protokol

	NUMUNE (N)	KÖR
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
SÜPERNATAN	100 µl	-
KO	50 µl	50 µl

Tüpler oda sıcaklığında 20 dk. bekletilir

CuCl₂	100 µl	100 µl
SÜPERNATAN	-	100 µl

Bir SOD ünitesi (U), NBT'nin indirgenmesini % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Kör ve numunelere ait absorbanslar spektrofotometrede 560 nm'de distile suya karşı okunduktan sonra SOD aktivitesi şu şekilde hesaplanır:

$$\text{SOD aktivitesi (U/mg)} = [(\text{ODKör} - \text{ODN}) / \text{ODKör}] \times 20 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

Reaktif 1'in Hazırlanışı: Aşağıdaki çözeltiler ayrı ayrı hazırlandıktan sonra birleştirilir. Toplam hacim 490 ml'dir.

9,1 mg ksantin, 1 N NaOH'den birkaç damla distile su içine damlatıldıktan sonra bu çözeltiliye ilave edilerek çözülür, daha sonra distile su ile hacim 200 ml'ye tamamlanır.

100 ml distile suda 25 mg EDTA çözülür.

100 ml distile suda 12,3 mg NBT çözülür.

30 ml distile suda 30 mg sığır albümini çözülür.

60 ml distile suda 2,54 g Na₂CO₃ çözülür.

En son işlem olarak tüm bu çözeltiler birleştirilerek Reaktif 1 elde edilir.

MDA Ölçümüne Ait Protokol

	NUMUNE	KÖR
SÜPERNATAN	100 µl	100 µl
ETİL ALKOL	1 ml	1 ml
FOSFAT TAMPONU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri 4000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edilir. Spektrofotometrik ölçüm sırasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konulur. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanılır (% 96; d=0,92; MA= 220,3).

TEP Molaritesinin Hesaplanması:

$$0,92 \times 1000 = 920 \text{ g (TEP çözeltisinin 1 litresinin ağırlığı)}$$

$$920 : 100 \times 96 = 883,2 \text{ g (1 litre çözeltideki TEP miktarı)}$$

$883,2 : 220,3 = 4 \text{ mol TEP (1 litre çözeltide 4 mol TEP olduğu için, çözeltideki TEP'in konsantrasyonu 4 molar (M)'dir.}$

4 M'lık çözelti etil alkolle 400.000 kat dilüe edilerek, 10 µM'lık standart çözelti elde edilir. Aynı deney protokolü standart ve standart körü için uygulanır ve spektrofotometrede absorbanslar okunur. Buna göre 'Faktör' değeri aşağıda görüldüğü şekilde 161,3 olarak hesaplanır.

$$\text{Standartın optik dansitesi (ODS)} = 0,152$$

$$\text{Standart körünün optik dansitesi} = 0,090$$

$$\Delta\text{ODS} = 0,062$$

$$\text{MDA konsantrasyonu (nmol/ml)} = \Delta\text{ODN} \times \text{Standartın konsantrasyonu} / \Delta\text{ODS}$$

$$= \Delta\text{ODN} \times 10 \text{ µM} / 0,062$$

$$= \Delta\text{ODN} \times 161,3$$

Deneyde Kullanılan Reaktiflerin İçeriği:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na₂HPO₄ ve 11,56 g KH₂PO₄ tartılarak distile suda çözüldükten sonra hacim distile suyla 1 L'ye tamamlanır.

Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v): 500 mL 0,6 N HCl içinde 100 g katı TCA çözülerek hazırlanır.

TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg katı TBA 10 mL distile suda çözülür.

Etil alkol (% 95; v/v).

GPO Aktivitesi Ölçümüne Ait Protokol

FOSFAT TAMPONU	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH REDÜKTAZ	100 µl
SODYUM AZİD	100 µl
SÜPERNATAN	100 µl

Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna ayarlanır ve fosfat tamponuyla sıfırlanır. Protokoldeki maddeler küvete konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans takip edilir ve böylece kör değeri elde edilir. Aynı işlem 100 µl H₂O₂ çözeltisi eklenerek tekrar edilir ve bu kez numune değeri bulunur. Numune ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değerinden, kör ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değeri çıkarılarak absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra GPO aktivitesi NADPH'nin molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon = 6,22.10^3 \text{ L}/(\text{mol.cm})$) kullanılarak hesaplanır. Buna göre faktör değeri 4800 olarak bulunur.

GPO aktivitesi (IU/L) :

$\Delta OD \times (1/\epsilon \text{NADPH}) \times (V_{\text{toplaml}}/V_{\text{numune}}) \times (1/\text{zaman (dk)}) \times \text{Seyreltme Faktörü}$

GPO aktivitesi (IU/L) = ($\Delta OD/\text{dk}$) x 4800

GPO aktivitesi (mIU/mg) = ($\Delta OD/\text{dk}$) x 4800 / Protein kons. (mg/ml)

Katalaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi:

2,99 ml H₂O₂ çözeltisi, 0,01 ml serum (doku çalışmalarında süpernatant) ve 0,01 ml fosfat tamponu, kuvarz küvete konulur. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbans 1 dakika süreyle izlenir. Ortaya çıkan absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra KAT aktivitesi H₂O₂'nin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplanır. Buna göre, 'Faktör' değeri 7320 olarak bulunur.

KAT aktivitesi (IU/ml) = ($\Delta OD/\text{dk}$) x 7320

Deneyde Kullanılan Reaktiflerin İçeriği:

Fosfat Tamponu: KH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ kullanılarak 50 mM, pH 7 olan fosfat tamponu hazırlanır.

H₂O₂ Çözeltisi: Stok H₂O₂ çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınır, 100 ml fosfat tamponu ile seyreltilir.

5.3 Karaciğer Dokusunda NASH Aktivitesinin Histopatolojik Açıdan Değerlendirilmesi

5.3.1 Histolojik Takip

Alınan karaciğer dokusu örnekleri %10 nötral formalin içerisine konularak 3 gün fikse edilmiştir. Sırasıyla %70, %80, %90'lık alkolde ve 2 kez saf alkolde birer saat, sonrasında ksilen solüsyonunda 15 dakika ve 30 dakika, sıvı parafinde ise 4 saat bekletilip parafin bloklara gömülmüştür. Bu bloklardan Leica RM 2125 RT microtom ile 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınmıştır. Rutin boyama için normal lam üzerine alınan kesitler deparafinize edildikten sonra genel değerlendirme için hematoksilen eozin ve masson trikrom ile boyanmıştır. Boyanan kesitler Zeiss-Axioscope A1 markalı ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

5.3.2 Histokimyasal Boyama

Hematoksilen eozin boyaması için;

1. Deparafinizasyon

- Dokular parafinden arınması için 65°C'lik etüvde 1 gece bekletildi.
- Ertesi sabah 2 saat ksilen solüsyonunda bekletilerek preparatlar temizlendi.

2. Rehidratasyon

- Saf alkolde 1 dakika
- %90 alkolde 1 dakika
- %80 alkolde 1 dakika
- %70 alkolde 1 dakika
- Çeşme suyunda yıkama

3. Boyama

- Hematoksilen 1 dakika

4. Akarsuda bolca yıkandı

5. Boyama

- Eozin 3 dakika

6. Dehidratasyon

- %70 alkolde yıkama

- %80 alkolde yıkama
 - %90 alkolde yıkama
 - Saf alkolde yıkama
7. Xylene solüsyonunda bekletildi
 8. Entellan ile kapatıldı.

Masson trikrom boyaması için;

1. Deparafinizasyon
 - a.Dokular parafinden arınması için 65°C'lik etüvde 1 gece bekletildi.
 - b.Ertesi sabah 2 saat xylene solüsyonunda bekletilerek preparatlar temizlendi.
2. Rehidratasyon
 - a.Saf alkolde 1 dakika
 - b.%90 alkolde 1 dakika
 - c.%80 alkolde 1 dakika
 - d.%70 alkolde 1 dakika
 - e.Çeşme suyunda yıkama
3. Bouin solüsyonunda 1 saat 56°C'de bekletildi.
4. Akarsuda bolca yıkandı.
5. Distile su
6. Boyama
 - Demirli Hematoksilen 5 dakika
7. Akarsuda bolca yıkandı
8. Distile su
9. Boyama
 - Biebrich Scarlet asit fuksin solüsyonunda 10 dakika
10. Distile su
11. Fosfomolibdik asit 5 dakika
12. Boyama
 - Anilin blue solüsyonunda 5 dakika
13. Distile su
14. Dehidratasyon
 - a.%90 alkolde yıkama
 - b.Saf alkolde yıkama
15. Xylene solüsyonunda bekletildi

16. Entellan ile kapatıldı.

Karaciğer dokusunda NASH aktivitesinin değerlendirilmesi için Kleiner vd. (2005) tarafından geliştirilen skarlama sistemi kullanılmıştır (64).

Tablo 5.2. Kleiner skarlama sisteminin genel özellikleri (64)

Skarlama Sisteminde Yer Ana Bölüm	Bu Bölümde Yer Alan Alt Başlıklar	Toplam Skor
Steatozis	1. Derece (0-3 Puan) 2. Lokalizasyon (0-3 Puan) 3. Mikroveziküler Yağlanma (0-1 Puan)	0-7
Fibrozis	Evre (0-4) Puan	0-4
İnflamasyon	1. Lobüler İnflamasyon (0-3 Puan) 2. Mikrogranülomlar (0-1 Puan) 3. Geniş Lipogranülomlar (0-1 Puan) 4. Portal İnflamasyon (0-1 Puan)	0-6
Karaciğer Hücre Hasarı	1. Balonlaşma (0-2 Puan) 2. Asidofil Cisim (0-1 Puan) 3. Pigmentli Makrofajlar (0-1 Puan) 4. Megamitokondriler (0-1 Puan)	0-5
Diğer Bulgular	1. Mallory Hyalin (0-1 Puan) 2. Glikojen Nüve (0-1 Puan)	0-2

Kleiner vd. (2005) tarafından NAYKH hastaları için özel olarak geliştirilen skarlama sisteminde preparatlar Tablo 6’da verilen başlıklar açısından değerlendirilmekte ve toplam puan hesaplanmaktadır (64). Bu skarlama sistemine göre hesaplanan toplam puan (NAYKH Aktivite Skoru, NAS) ≥ 5 olduğunda NASH tanısı konulmakta iken NAS < 3 olduğunda NASH tanısı dışlanmaktadır (64).

5.4. Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Araştırmamızda verilerin analizinde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır. Nicel değişkenler için iki bağımsız grup arası karşılaştırmada normal dağılım varsayımları sağlandığında Student T testi sağlanmadığında ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İkiden fazla kategoriye sahip nicel değişkenin kategorileri arasında fark olup olmadığını değerlendirmek amacıyla normal dağılım varsayımları sağlanıyorsa tek yönlü varyans analizi; normal dağılım varsayımları sağlanmıyorsa Kruskal Wallis-H testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu post-hoc testler uygulanmıştır. İki nicel değişken arası ilişki incelenmek istendiğinde normal dağılım varsayımları sağlanıyorsa Pearson; normal dağılım varsayımları sağlanmıyorsa Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Nicel değişkene etki edeceğini düşündüğümüz bağımsız değişkenleri ve etkilerini incelemek amacıyla doğrusal regresyon analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Kontrol ve Model Gruplarının Karşılaştırılması

Çalışma süresince standart yem ile beslenen kontrol grubu ve YYYYK yem ile beslenen NASH model gruplarının çeşitli parametreler açısından karşılaştırılmasında; normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamamaları göz önünde bulundurularak Student-T testi ve Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır. Sonuçlara ait ortalama (Ort) , standart sapma (SS), minimum ve maksimum değerler (min-maks) ve istatistiksel analize ait p değerleri tablolarda verilmiştir.

Tablo 6.1. Kontrol ve model gruplarının antropometrik ölçümler açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=8) Ort ± SS (min-maks)	NASH Model (n=8) Ort ± SS (min-maks)	p değeri
Başlangıç Vücut Ağırlığı (gr)	339,87 ± 30,30 (287-377)	352,37 ± 32,86 (300-386)	p>0,05
Terminal Vücut Ağırlığı (gr)	448,75 ± 45,72 (395-514)	538 ± 94,38 (352-626)	p<0,05
Terminal Karaciğer Ağırlığı (gr)	11,14 ± 1,54 (9,42-14,30)	31,01 ± 7,97 (16,70-38,76)	p<0,001
Terminal KC Ağ./Terminal Vücut Ağ. (binde; ‰)	‰ 25 ± ‰ 1,93 (‰ 20-30)	‰ 56,60 ± ‰ 6,48 (‰ 50-70)	p<0,001
Kilo Alımı (gr)	116,62 ± 26,18(72-156)	164,25 ± 51,55(58-208)	p<0,05

Kontrol grubu ve NASH model grubu antropometrik ölçümler açısından karşılaştırıldığında (Tablo 6.1); çalışmaya başlangıç vücut ağırlıkları açısından her iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Çalışma bitiminde sakrifikasyon öncesi ölçülen terminal vücut ağırlıkları incelendiğinde; NASH model grubunda terminal vücut ağırlığının anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmektedir (p<0,05). Sakrifikasyon sonrası karaciğerin total çıkarılması ile ölçülen karaciğer ağırlığının ve bu ağırlığın terminal vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen oranın yine benzer

şekilde NASH model grubunda yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$). 10 haftalık süre boyunca toplam kilo alımının da NASH model grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu dikkat çekmektedir ($p<0,05$).

Tablo 6.2. Kontrol ve model gruplarının serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=8) Ort ± SS (min-maks)	NASH Model (n=8) Ort ± SS (min-maks)	p değeri
Glukoz (mg/dL)	103,88 ± 13,56 (87-130)	167 ± 18,89 (151-200)	p<0,001
ALT (U/L)	39,50 ± 4,56 (33-46)	287,87 ± 165,81 (149-661)	p<0,001
AST (U/L)	149 ± 40,83 (100-202)	367,25 ± 176,82 (221-769)	p<0,001
Total Kolesterol (mg/dL)	47,37 ± 4,98 (42-54)	171,50 ± 42,40 (134-250)	p<0,001
HDL-K (mg/dL)	25,25 ± 3,45 (21-30)	56,25 ± 11,22 (43-71)	p<0,001
Trigliserid (mg/dL)	41,12 ± 8,21 (33-58)	70 ± 19,22 (52-101)	p<0,001
Üre (mg/dL)	40,62 ± 6,82 (34-54)	36,37 ± 4,44 (30-43)	$p>0,05$
Kreatinin (mg/dL)	0,34 ± 0,062 (0,24-0,45)	0,35 ± 0,025 (0,30-0,38)	$p>0,05$
Amilaz (U/L)	1442,75 ± 193,22 (1190-1797)	3150,12 ± 605,84 (2346-4251)	p<0,001
Lipaz (U/L)	4,87 ± 0,99 (3-6)	25,75 ± 7,88 (15-37)	p<0,001
VLDL-K (mg/dL)	8,22 ± 1,64 (6,60-11,60)	14 ± 3,84 (10,40-20,20)	p<0,01
LDL-K (mg/dL)	13,90 ± 1,92 (12,20-17,20)	101,25 ± 34,06 (70-162,40)	p<0,001

Kontrol ve NASH model grupları serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 6.2); serum glukoz, ALT, AST, trigliserid, total kolesterol, HDL-K, LDL-K, amilaz ve lipaz düzeylerinin NASH model grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmektedir ($p<0,001$). VLDL-K sonucu da NASH model grubunda istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,01$). Böbrek fonksiyon test sonuçları (üre ve kreatinin) açısından ise iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.

Tablo 6.3. Kontrol ve model gruplarının serum Glo-1 ve serum oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=8) Ort ± SS (min-maks)	NASH Model (n=8) Ort ± SS (min-maks)	p değeri
Serum Glo-1 (ng/mL)	39,94 ± 1,25 (38,57-42,01)	106,58 ± 21,49 (78,97-145,58)	p<0,001
Serum GPO (mIU/mL)	155,40 ± 46,39 (96-240)	169,20 ± 54,29 (110,40-249,60)	p>0,05
Serum Katalaz (IU/mL)	2,47 ± 0,95 (0,73-3,66)	1,37 ± 0,47 (0,73-2,20)	p<0,05
Serum MDA (pmol/ml)	229,13 ± 17,63 (206-253)	144,38 ± 13,82 (124-160)	p<0,001
Serum SOD (U/mL)	7,82 ± 0,36 (7,40-8,32)	6,31 ± 0,70 (5,58-7,69)	p<0,001

Kontrol ve NASH model grupları serum Glo-1 ve serum oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.3); NASH model grubunda Glo-1 düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir (p<0,001).

NASH model grubunda katalaz (P<0,05), MDA (p<0,001) ve SOD (p<0,001) seviyelerinin ise anlamlı ölçüde düşük olduğu dikkat çekmektedir. Serum GPO düzeyi açısından her iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.

Tablo 6.4. Kontrol ve model gruplarının karaciğer PIIINP ve karaciğer oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=8) Ort ± SS (min-maks)	NASH Model (n=8) Ort ± SS (min-maks)	p değeri
Karaciğer PIIINP (pg/mg)	616,07 ± 142,02 (458,70-835,01)	178,31 ± 66,45 (75,78-263,55)	p<0,001
Karaciğer GPO (mIU/mg)	20,21 ± 6,06 (12,79-30,70)	16,89 ± 5,20 (8,70-22,52)	p>0,05
Karaciğer Katalaz (IU/mg)	208,36 ± 15,20 (182,61-225,53)	206,22 ± 17,08 (180,27-234,90)	p>0,05
Karaciğer MDA (pmol/mg)	1470,27 ± 174,70 (1306,91-1797)	1927,90 ± 274,81 (1582,05-2441,86)	p=0,001
Karaciğer SOD (U/mg)	105,35 ± 10,86 (85,56-118,65)	102,35 ± 10,77 (84,52-120,02)	p>0,05

Kontrol ve NASH model grupları karaciğer PIIINP düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; model grubunda karaciğer PIIINP düzeylerinin anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Oksidatif stres parametrelerinden MDA düzeyinin ise model grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu dikkat çekmektedir ($p=0,001$). Karaciğer GPO, katalaz, SOD düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.4).

Tablo 6.5. Kontrol ve model gruplarının kalp PIIINP ve kalp oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=8) Ort $\pm$ SS (min-maks)	NASH Model (n=8) Ort $\pm$ SS (min-maks)	p değeri
Kalp PIIINP (pg/mg)	289,89 $\pm$ 143,98 (74,92-530,64)	488,17 $\pm$ 387,45 (126,40-1270,22)	$p>0,05$
Kalp GPO (mIU/mg)	31,61 $\pm$ 3,96 (25,64-36,34)	29,43 $\pm$ 7,79 (20-45,43)	$p>0,05$
Kalp Katalaz (IU/mg)	21,22 $\pm$ 2,26 (17,47-23,85)	31,09 $\pm$ 6,19 (26,06-43,81)	$p=0,001$
Kalp MDA (pmol/mg)	1619,35 $\pm$ 303,13 (1145,60-2033,48)	1926,51 $\pm$ 215,93 (1619,11-2306,47)	$p<0,05$
Kalp SOD (U/mg)	45,88 $\pm$ 1,81 (43,63-48,83)	48,84 $\pm$ 3,38 (45,17-53,93)	$p<0,05$

Kontrol ve NASH model grupları kalp PIIINP ve GPO düzeyleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir. Kalp katalaz, MDA ve SOD düzeyleri ise NASH model grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksektir (p değerleri sırasıyla: $p=0,001$, $p<0,05$, $p<0,05$).

Tablo 6.6. Kontrol ve model gruplarının NAYKH aktivite skoru açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=8) Ort $\pm$ SS (min-maks)	NASH Model (n=8) Ort $\pm$ SS (min-maks)
Toplam Skor	0 $\pm$ 0 (0-0)	19,13 $\pm$ 1,56 (17-22)
Steatozis Skoru	0 $\pm$ 0 (0-0)	5,88 $\pm$ 0,99 (5-7)
Fibrozis Skoru	0 $\pm$ 0 (0-0)	2,13 $\pm$ 0,83 (1-3)
İnflamasyon Skoru	0 $\pm$ 0 (0-0)	5,37 $\pm$ 0,92 (4-6)
Karaciğer Hücre Hasarı Skoru	0 $\pm$ 0 (0-0)	3,75 $\pm$ 0,46 (3-4)
Diğer Bulgular skoru	0 $\pm$ 0 (0-0)	2 $\pm$ 0 (0-2)

Kontrol ve NASH model grupları NAYKH aktivite skoru açısından karşılaştırıldığında; kontrol grubunun toplam skordan ve tüm alt skorlardan 0 aldığı izlenmektedir. Kleiner vd. (2005) tarafından NAYKH hastaları için özel olarak geliştirilen skarlama sisteminde toplam skor < 3 olduğunda NASH tanısı dışlanmaktadır (64). Dolayısıyla kontrol grubunda NASH tanısının dışlandığı açık olarak görülmektedir. NASH Model grubunun toplam skoru değerlendirildiğinde NASH tanısı aldığı görülmekle beraber toplam skor ve tüm alt skorlar bu grupta kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksektir (Tablo 6.6).

6.2 YYYYK Yem Verilen Gruplardan Diyetsetel Ajan Alan ve Almayan Grupların Karşılaştırılması

Araştırmamızda toplam dört farklı grupta YYYYK diyet ile NASH tablosunun oluşması sağlanmıştır. Bu gruplardan NASH model grubu herhangi bir diyetsetel ajan almazken, YYYYK-YKÇ grubuna çalışmanın başından itibaren YYYYK yem ve 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeğı ekstraktı; YYYYK-KA10 grubuna YYYYK yem ve 10 mg/kg klorojenik asit; YYYYK-KA50 grubuna ise YYYYK yem ve 50 mg/kg klorojenik asit eş zamanlı olarak verilmiştir. Bu grupların karşılaştırılmasında normal dağılım varsayımlarını karşılayıp karşılamamaları göz önünde bulundurularak ANOVA ve Kruskal-Wallis-H testleri kullanılmıştır. ANOVA ve Kruskal-Wallis-H testlerinde gruplar arası anlamlı farklılık izlendiğinde post-hoc testler uygulanmıştır.

Tablo 6.7. Grupların antropometrik ölçümler açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Başlangıç Vücut Ağırlığı (gr) Ort ± SS (min-maks)	Terminal Vücut Ağırlığı (gr) Ort ± SS (min-maks)	Terminal Karaciğer Ağırlığı (gr) Ort ± SS (min-maks)	Terminal KC Ağ./Terminal Vücut Ağ. (binde; ‰) Ort ± SS (min-maks)	Kilo Alımı (gr) Ort ± SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	352,37 ± 32,86 (300-386)	538 ± 94,38 (352-626)	31,01 ± 7,97 (16,70-38,76)	‰ 56,60 ± ‰ 6,48 (‰ 50-70)	164,25 ± 51,55 (58-208)
2	YYYK-YKÇ Grubu	368,37 ± 17,90 (342-399)	499,25 ± 42,85 (439-583)	24,21 ± 4,13 (19,80-33,05)	‰ 48,40 ± ‰ 5,93 (‰ 40-60)	139 ± 33,24 (101-204)
3	YYYK-KA10 Grubu	360,5 ± 23,4 (307-382)	506,37 ± 39,04 (442-559)	26,21 ± 3,32 (21,90-30,70)	‰ 51,90 ± ‰ 6,03 (‰ 40-60)	151,87 ± 23,80 (129-192)
4	YYYK-KA50 Grubu	369,62 ± 26,17 (323-401)	510,50 ± 48,42 (440-601)	27,82 ± 4,24 (21,80-33,60)	‰ 54,40 ± ‰ 5,32 (‰ 50-60)	147,12 ± 29,50 (107-200)
	p Değeri	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Antropometrik ölçüm sonuçları açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.7).

Tablo 6.8. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Glukoz (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	Total Kolesterol (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	HDL-K (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	Trigliserid (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	VLDL-K (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	LDL-K (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	167 ± 18,89 (151-200)	171,50 ± 42,40 (134-250)	56,25 ± 11,22 (43-71)	70 ± 19,22 (52-101)	14 ± 3,84 (10,40-20,20)	101,25 ± 34,06 (70-162,40)
2	YYYY-YKÇ Grubu	101,25 ± 43,57 (57-154)	136,13 ± 80,35 (56-286)	47,25 ± 26,88 (19-85)	29,25 ± 15,82719 (17-65)	5,85 ± 3,16 (3,40-13)	83,02 ± 53,68335 (31,20-194,8)
3	YYYY-KA10 Grubu	116,37 ± 21,04 (90-149)	178,62 ± 42,79 (118-222)	52,75 ± 12,08 (33-66)	31,25 ± 9,55 (21-45)	6,25 ± 1,91 (4,20-9)	119,62 ± 34,10 (70,8-159,4)
4	YYYY-KA50 Grubu	129,62 ± 20,52 (107-169)	169,37 ± 31,09 (129-213)	54,5 ± 10,45 (37-66)	35,5 ± 10,99 (21-52)	7,1 ± 2,20 (4,20-10,40)	107,77 ± 29,12 (66,4-138,6)
	p Değeri	p=0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,05 1-3:p=0,001 1-4:p=0,01 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,001 Post-Hoc 1-2: p=0,001 1-3: p<0,01 1-4:p<0,05 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p=0,001 Post-Hoc 1-2: p=0,001 1-3: p<0,01 1-4:p<0,05 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p>0,05

Serum total kolesterol, HDL-K ve LDL-K açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Serum glukoz konsantrasyonu NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla p<0,05; p=0,001; p=0,01). Serum trigliserid ve VLDL-K konsantrasyonları NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg

klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p=0,001$; $p<0,01$; $p<0,05$).

Tablo 6.9. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	ALT (U/L) Ort $\pm$ SS (min-maks)	AST (U/L) Ort $\pm$ SS (min-maks)	ÜRE (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	KREATİNİN (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	AMİLAZ (U/L) Ort $\pm$ SS (min-maks)	LİPAZ (U/L) Ort $\pm$ SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	287,87 $\pm$ 165,81 (149-661)	367,25 $\pm$ 176,82 (221-769)	36,37 $\pm$ 4,44 (30-43)	0,35 $\pm$ 0,025 (0,30-0,38)	3150,12 $\pm$ 605,84 (2346-4251)	25,75 $\pm$ 7,88 (15-37)
2	YYYK-YKÇ Grubu	777,75 $\pm$ 749,02 (243-2512)	815,62 $\pm$ 871,8181 (338-2912)	33,62 $\pm$ 16,85 (13-58)	0,25 $\pm$ 0,13 (0,06-0,38)	1681,50 $\pm$ 577,9298 (743-2386)	23,625 $\pm$ 16,28266 (6-49)
3	YYYK-KA10 Grubu	1034 $\pm$ 801,74 (280-2748)	1246,50 $\pm$ 1060,635 (348-3502)	33,87 $\pm$ 6,93 (28-49)	0,40 $\pm$ 0,047 (0,34-0,47)	2047,75 $\pm$ 414,9498 (1245-2613)	29 $\pm$ 6,16 (20-36)
4	YYYK-KA50 Grubu	828,50 $\pm$ 292,82 (312-1337)	759,37 $\pm$ 348,62 (341-1272)	33,125 $\pm$ 4,25 (28-41)	0,38 $\pm$ 0,056 (0,30-0,47)	2390,75 $\pm$ 276,42 (2078-2831)	21 $\pm$ 4,27618 (15-26)
	p Değeri	p<0,01 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,01 1-4: p<0,05 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p<0,01 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p=0,01 1-4: p<0,05 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p>0,05	p=0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,001 1-3: p=0,001 1-4: p<0,05 2-3: p>0,05 2-4: p<0,05 3-4: p>0,05	p>0,05

Serum üre, kreatinin ve lipaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. NASH model grubunda serum ALT ve AST düzeyleri 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede düşük izlenmiştir (ALT için sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$; AST için sırasıyla $p=0,01$, $p<0,05$). Serum amilaz düzeyleri ise NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,001$; $p<0,05$). 50 mg/kg klorojenik asit verilen grupta serum amilaz düzeyi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

Tablo 6.10. Grupların serum Glo-1 düzeyi ve serum oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Serum Glo-1 (ng/mL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Serum GPO (mIU/mL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Serum Katalaz (IU/mL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Serum MDA (pmol/ ml) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Serum SOD (U/mL) Ort $\pm$ SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	106,58 $\pm$ 21,49 (78,97-145,58)	169,20 $\pm$ 54,29 (110,40-249,60)	1,37 $\pm$ 0,47 (0,73-2,20)	144,38 $\pm$ 13,82 (124-160)	6,31 $\pm$ 0,70 (5,58-7,69)
2	YYYK-YKÇ Grubu	216,74 $\pm$ 166,45 (64,51-557,83)	139,80 $\pm$ 39,20 (96-216)	2,47 $\pm$ 1,56 (0,73-5,86)	111,62 $\pm$ 17,07 (98-140)	6,05 $\pm$ 1,27 (4,35-8,10)
3	YYYK-KA10 Grubu	250,14 $\pm$ 165,16 (70,74-590,68)	144 $\pm$ 16,22 (115,20-163,20)	1,64 $\pm$ 1,22 (0-3,66)	114,12 $\pm$ 9,41 (99-123)	7,99 $\pm$ 0,55 (6,90-8,60)
4	YYYK-KA50 Grubu	174,07 $\pm$ 60,62 (92,81-288,92)	147 $\pm$ 24,60 (115,20-187,20)	1,92 $\pm$ 1,35 (0-3,66)	97,50 $\pm$ 9,72 (86-112)	7,58 $\pm$ 0,31 (6,95-8,00)
	p Değeri	$p<0,05$ Post-Hoc 1-2: $p>0,05$ 1-3: $p<0,05$ 1-4: $p>0,05$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p>0,05$ 3-4: $p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,001$ Post-Hoc 1-2: $p<0,05$ 1-3: $p>0,05$ 1-4: $p<0,001$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p>0,05$ 3-4: $p>0,05$	$p=0,001$ Post-Hoc 1-2: $p>0,05$ 1-3: $p<0,01$ 1-4: $p>0,05$ 2-3: $p<0,01$ 2-4: $p>0,05$ 3-4: $p>0,05$

Serum GPO ve katalaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Serum Glo-1 düzeyleri 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta NASH model grubuna göre anlamlı derece yüksektir ($p<0,05$). Serum MDA düzeyi NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grup ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruba göre anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$). Serum SOD düzeyi ise 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta NASH model grubuna ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,01$).

Tablo 6.11. Grupların karaciğer PIIINP ve karaciğer oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Karaciğer PIIINP (pg/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Karaciğer GPO (mIU/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Karaciğer Katalaz (IU/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Karaciğer MDA (pmol/ mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Karaciğer SOD (U/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	178,31 $\pm$ 66,45 (75,78-263,55)	16,89 $\pm$ 5,20 (8,70-22,52)	206,22 $\pm$ 17,08 (180,27-234,90)	1927,90 $\pm$ 274,81 (1582,05-2441,86)	102,35 $\pm$ 10,77 (84,52-120,02)
2	YYYK-YKÇ Grubu	446,80 $\pm$ 171,01 (213,34-739,80)	21,43 $\pm$ 4,99 (16,38-28,66)	189,82 $\pm$ 16,57 (163,88-209,14)	886,67 $\pm$ 319,02 (455,70-1392,89)	78,87 $\pm$ 3,87 (73,90-83,73)
3	YYYK-KA10 Grubu	533,22 $\pm$ 144,58 (353,87-756,83)	19,70 $\pm$ 4,47 (10,23-24,56)	182,60 $\pm$ 11,79 (170,12-204,46)	1155,36 $\pm$ 278,30 (696,44-1435,88)	79,78 $\pm$ 8,01 (72,25-97,48)
4	YYYK-KA50 Grubu	398,61 $\pm$ 91,38 (232,84-490,91)	20,46 $\pm$ 3,52 (14,33-26,10)	173,24 $\pm$ 17,63 (157,64-205,24)	1715,31 $\pm$ 258,47 (1281,11-1960,36)	77,45 $\pm$ 11,85 (67,35-104,69)
	p Değeri	$p<0,001$ Post-Hoc 1-2: $p=0,001$ 1-3: $p<0,001$ 1-4: $p<0,01$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p>0,05$ 3-4: $p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,01$ Post-Hoc 1-2: $p>0,05$ 1-3: $p<0,05$ 1-4: $p<0,01$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p>0,05$ 3-4: $p>0,05$	$p<0,001$ Post-Hoc 1-2: $p<0,001$ 1-3: $p<0,001$ 1-4: $p>0,05$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p<0,001$ 3-4: $p<0,01$	$p=0,001$ Post-Hoc 1-2: $p<0,05$ 1-3: $p<0,05$ 1-4: $p=0,001$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p>0,05$ 3-4: $p>0,05$

Karaciğer GPO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Karaciğer PIIINP düzeyi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$). Karaciğer katalaz aktivitesi 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen

verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde düşüktür (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). Karaciğer MDA düzeyleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak izlenmiştir ($p<0,001$). Ancak karaciğer MDA düzeyleri 50 mg/kg klorojenik asit verilen grupta yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,01$). Karaciğer SOD aktivitesi incelendiğinde ise NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı bir yükseklik söz konusu olduğu görülmektedir (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$, $p=0,001$).

Tablo 6.12. Grupların kalp PIIINP ve kalp oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Kalp PIIINP (pg/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Kalp GPO (mIU/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Kalp Katalaz (IU/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Kalp MDA (pmol/ mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Kalp SOD (U/mg) Ort $\pm$ SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	488,17 $\pm$ 387,45 (126,40-1270,22)	29,43 $\pm$ 7,79 (20-45,43)	31,09 $\pm$ 6,19 (26,06-43,81)	1926,51 $\pm$ 215,93 (1619,11-2306,47)	48,84 $\pm$ 3,38 (45,17-53,93)
2	YYYK-YKÇ Grubu	421,40 $\pm$ 343,82 (29,44-864,53)	25,34 $\pm$ 3,77 (20-30)	30,29 $\pm$ 3,14 (24,95-33,83)	1932,23 $\pm$ 247,77 (1558,01-2352,29)	42,36 $\pm$ 2,82 (36,80-45,97)
3	YYYK-KA10 Grubu	358,24 $\pm$ 275,24 (51,20-900,72)	29,20 $\pm$ 3,09 (23,64-33,64)	26,86 $\pm$ 2,23 (24,40-30,50)	2331,29 $\pm$ 1193,90 (1512,19-5025,35)	44,84 $\pm$ 2,59 (40,14-48,27)
4	YYYK-KA50 Grubu	381,57 $\pm$ 238,26 (163,39-926,84)	28,29 $\pm$ 5,79 (21,82-37,27)	26,37 $\pm$ 1,65 (24,40-29,11)	1554,19 $\pm$ 132,34 (1374,72-1726,03)	46,98 $\pm$ 1,66 (44,30-49,37)
	p Değeri	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,01$ Post-Hoc 1-2: $p>0,05$ 1-3: $p>0,05$ 1-4: $p<0,05$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p<0,05$ 3-4: $p>0,05$	$p<0,001$ Post-Hoc 1-2: $p<0,001$ 1-3: $p<0,05$ 1-4: $p>0,05$ 2-3: $p>0,05$ 2-4: $p<0,05$ 3-4: $p>0,05$

Kalp PIIINP, GPO ve katalaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. 50 mg/kg klorojenik asit verilen grupta kalp MDA düzeyi NASH model ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı ölçüde düşüktür ($p<0,05$). NASH model grubunda kalp SOD aktivitesi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit alan gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,05$). Ayrıca 50 mg/kg

klorojenik asit alan grupta kalp SOD aktiviteleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 6.13. Grupların NAYKH aktivite skoru açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Toplam Skor Ort $\pm$ SS (min-maks)	Steatozis Skoru Ort $\pm$ SS (min-maks)	Fibrozis Skoru Ort $\pm$ SS (min-maks)	İnflamasyon Skoru Ort $\pm$ SS (min-maks)	Karaciğer Hücre Hasarı Skoru Ort $\pm$ SS (min-maks)	Diğer Bulgular Skoru Ort $\pm$ SS (min-maks)
1	NASH Model Grubu	19,13 $\pm$ 1,56 (17-22)	5,88 $\pm$ 0,99 (5-7)	2,13 $\pm$ 0,83 (1-3)	5,37 $\pm$ 0,92 (4-6)	3,75 $\pm$ 0,46 (3-4)	2 $\pm$ 0 (2-2)
2	YYYK-YKÇ Grubu	11,87 $\pm$ 1,25 (10-14)	4,37 $\pm$ 0,51 (4-5)	1,75 $\pm$ 1,03 (1-3)	4,25 $\pm$ 1,16 (2-5)	1,50 $\pm$ 0,53 (1-2)	0 $\pm$ 0 (0-0)
3	YYYK-KA10 Grubu	12,75 $\pm$ 1,03 (11-14)	4,75 $\pm$ 1,48 (3-7)	2,5 $\pm$ 0,92 (1-3)	3,87 $\pm$ 0,99 (2-5)	1,62 $\pm$ 0,51 (1-2)	0 $\pm$ 0 (0-0)
4	YYYK-KA50 Grubu	11 $\pm$ 1,69 (9-13)	4,50 $\pm$ 0,92 (4-6)	1,25 $\pm$ 0,46 (1-2)	3,75 $\pm$ 1,16 (2-5)	1,50 $\pm$ 0,53 (1-2)	0 $\pm$ 0 (0-0)
	p Değeri	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,01 1-3: p>0,05 1-4: p<0,001 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p>0,05	p=0,05	p<0,05 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,05 1-4: p<0,05 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p=0,001 1-3: p<0,01 1-4: p=0,001 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,001 1-3: p<0,001 1-4: p<0,001 2-3: p>0,05 2-4: p>0,05 3-4: p>0,05

NAYKH aktivite skorları incelendiğinde toplam skorun yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 50 mg/kg klorojenik asit alan gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu izlenmektedir (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$). Steatozis ve fibrozis skorları açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. İnflamasyon skorunun 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Karaciğer hücre hasarı skoru ve diğer bulgular skorunun yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu dikkat çekmektedir (karaciğer hücre hasarı skoru için sırasıyla $p=0,001$, $p<0,001$, $p=0,001$; diğer bulgular skoru için her birinde $p<0,001$).

6.3. Standart Rat Yemi Verilen Gruplardan Diyetsetel Ajan Alan ve Almayan Grupların Karşılaştırılması

Araştırmamızda toplam üç farklı gruba standart rat yemi verilmiştir. Bu gruplardan kontrol grubu herhangi bir diyetsetel ajan almazken, KA kontrol grubuna çalışmanın başından itibaren standart rat yemi ve 10 mg/kg klorojenik asit; YKÇ kontrol grubuna ise standart rat yemi ve 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktı eş zamanlı olarak verilmiştir. Bu grupların karşılaştırılmasında normal dağılım varsayımlarını karşılayıp karşılamamaları göz önünde bulundurularak ANOVA ve Kruskal-Wallis-H testleri kullanılmıştır. ANOVA ve Kruskal-Wallis-H testlerinde gruplar arası anlamlı farklılık izlendiğinde post-hoc testler uygulanmıştır.

Tablo 6.14. Grupların antropometrik ölçümler açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Başlangıç Vücut Ağırlığı (gr) Ort ± SS (min-maks)	Terminal Vücut Ağırlığı (gr) Ort ± SS (min-maks)	Terminal Karaciğer Ağırlığı (gr) Ort ± SS (min-maks)	Terminal KC Ağ./Terminal Vücut Ağ. (binde; ‰) Ort ± SS (min-maks)	Kilo Alımı (gr) Ort ± SS (min-maks)
1	Kontrol Grubu	339,87 ± 30,30 (287-377)	448,75 ± 45,72 (395-514)	11,14 ± 1,54 (9,42-14,30)	‰ 25 ± ‰ 1,93 (‰ 20-30)	116,62 ± 26,18(72-156)
2	KA Kontrol Grubu	352,87 ± 21,91 (307-374)	448,37 ± 33,72 (392-493)	11,50 ± 1 (10,49-13,59)	‰ 26 ± ‰ 2 (‰ 20-30)	95,50 ± 15,82 (68-119)
3	YKÇ Kontrol Grubu	363,50 ± 14,41 (335-379)	453,87 ± 38,03 (403-513)	13,03 ± 1,70 (10,61-16,23)	‰ 28,70 ± ‰ 2,60 (‰ 25-30)	86,87 ± 34,57 (43-145)
	p Değeri	p>0,05	p>0,05	p<0,05 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,05 2-3: p>0,05	p<0,01 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,01 2-3: p>0,05	p>0,05

Başlangıç vücut ağırlığı, terminal vücut ağırlığı ve kilo alımı açısından gruplar arasından anlamlı fark izlenmemiştir. Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna göre

terminal karaciğer ağırlığı ve terminal KC ağırlığı/terminal vücut ağırlığı oranları anlamlı ölçüde yüksektir (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$).

Tablo 6.15. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Glukoz (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Total Kolesterol (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	HDL-K (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	Trigliserid (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	VLDL-K (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)	LDL-K (mg/dL) Ort $\pm$ SS (min-maks)
1	Kontrol Grubu	103,88 $\pm$ 13,56 (87-130)	47,37 $\pm$ 4,98 (42-54)	25,25 $\pm$ 3,45 (21-30)	41,12 $\pm$ 8,21 (33-58)	8,22 $\pm$ 1,64 (6,60-11,60)	13,90 $\pm$ 1,92 (12,20-17,20)
2	KA Kontrol Grubu	157,75 $\pm$ 29,20 (105-209)	67,25 $\pm$ 12,33 (51-82)	28,12 $\pm$ 3,60 (24-35)	63,25 $\pm$ 28,37 (33-107)	12,65 $\pm$ 5,67 (6,60-21,40)	26,47 $\pm$ 5,51 (19,20-33,80)
3	YKÇ Kontrol Grubu	170,50 $\pm$ 39,53 (119-244)	67,75 $\pm$ 18,39 (42-98)	30,37 $\pm$ 6,16 (22-42)	67 $\pm$ 24,60 (38-108)	13,40 $\pm$ 4,91 (7,60-21,60)	23,97 $\pm$ 10,32 (12,40-44,40)
	p Değeri	$p<0,001$ Post-Hoc 1-2: $p<0,01$ 1-3: $p=0,01$ 2-3: $p>0,05$	$p<0,01$ Post-Hoc 1-2: $p<0,05$ 1-3: $p<0,05$ 2-3: $p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,01$ Post-Hoc 1-2: $p<0,01$ 1-3: $p<0,05$ 2-3: $p>0,05$

Serum HDL-K, trigliserid ve VLDL-K düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. 10 mg/kg klorojenik asit verilen ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruplarda kontrol grubuna göre serum glukoz, total kolesterol, LDL-K değerleri anlamlı derecede yüksek olarak izlenmiştir (glukoz için sırasıyla $p<0,01$, $p=0,01$; total kolesterol için sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$; LDL-K için sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$).

Tablo 6.16. Grupların serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	ALT (U/L) Ort ± SS (min-maks)	AST (U/L) Ort ± SS (min-maks)	ÜRE (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	KREATİNİN (mg/dL) Ort ± SS (min-maks)	AMİLAZ (U/L) Ort ± SS (min-maks)	LİPAZ (U/L) Ort ± SS (min-maks)
1	Kontrol Grubu	39,50 ± 4,56 (33-46)	149 ± 40,83 (100-202)	40,62 ± 6,82 (34-54)	0,34 ± 0,062 (0,24-0,45)	1442,75 ± 193,22 (1190-1797)	4,87 ± 0,99 (3-6)
2	KA Kontrol Grubu	43,87 ± 6,68 (34-56)	173,12 ± 26,98 (129-220)	49 ± 7,42 (39-64)	0,34 ± 0,043 (0,30-0,41)	1620,75 ± 223,10 (1275-1964)	5,37 ± 2,06 (2-8)
3	YKÇ Kontrol Grubu	51,37 ± 8,73 (39-65)	166,50 ± 32,23 (127-217)	51,25 ± 6,49 (43-60)	0,32 ± 0,032 (0,28-0,38)	1981,12 ± 246,70 (1649-2353)	6,50 ± 1,06 (5-8)
	p Değeri	p<0,01 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,01 2-3: p>0,05	p>0,05	p<0,05 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,05 2-3: p>0,05	p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,001 2-3: p=0,01	p>0,05

Serum AST, kreatinin, lipaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Serum ALT, üre ve amilaz düzeyleri ise yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla p <0,01; p <0,05; p <0,001). Ayrıca yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta amilaz düzeyleri 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruba göre de anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (p=0,01).

Tablo 6.17. Grupların serum Glo-1 düzeyi ve oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Serum Glo-1 (ng/mL) Ort ± SS (min-maks)	Serum GPO (mIU/mL) Ort ± SS (min-maks)	Serum Katalaz (IU/mL) Ort ± SS (min-maks)	Serum MDA (pmol/ml) Ort ± SS (min-maks)	Serum SOD (U/mL) Ort ± SS (min-maks)
1	Kontrol Grubu	39,94 ± 1,25 (38,57-42,01)	155,40 ± 46,39 (96-240)	2,47 ± 0,95 (0,73-3,66)	229,13 ± 17,63 (206-253)	7,82 ± 0,36 (7,40-8,32)
2	KA Kontrol Grubu	39,36 ± 4,39 (35,42-47,85)	124,80 ± 16,22 (96-148,80)	2,10 ± 0,82 (1,46-3,66)	100,87 ± 4,54 (94-109)	7,26 ± 0,16 (7,06-7,57)
3	YKÇ Kontrol Grubu	37,05 ± 2,02 (34,37-39,75)	127,80 ± 17,19 (105,60-153,60)	1,37 ± 0,91 (0-2,93)	72,75 ± 5,06 (66-82)	7,42 ± 0,35 (6,91-7,93)
	p Değeri	p<0,05 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,05 2-3: p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,001 2-3: p>0,05	p<0,01 Post-Hoc 1-2: p<0,01 1-3: p<0,05 2-3: p>0,05

Serum GPO ve katalaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Serum Glo-1, MDA ve SOD seviyeleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptanmıştır (sırasıyla p<0,05; p<0,001; p<0,05). Ayrıca serum SOD düzeyi 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır (p<0,01).

Tablo 6.18. Grupların karaciğer PIIINP ve oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Karaciğer PIIINP (pg/mg) Ort ± SS (min-maks)	Karaciğer GPO (mIU/mg) Ort ± SS (min-maks)	Karaciğer Katalaz (IU/mg) Ort ± SS (min-maks)	Karaciğer MDA (pmol/mg) Ort ± SS (min-maks)	Karaciğer SOD (U/mg) Ort ± SS (min-maks)
1	Kontrol Grubu	616,07 ± 142,02 (458,70-835,01)	20,21 ± 6,06 (12,79-30,70)	208,36 ± 15,20 (182,61-225,53)	1470,27 ± 174,70 (1306,91-1797)	105,35 ± 10,86 (85,56-118,65)
2	KA Kontrol Grubu	498,71 ± 123,89 (306,58-683,28)	19,38 ± 4,43 (11,26-24,05)	230,40 ± 10,04 (216,17-250,50)	1784,10 ± 357,26 (1272,52-2192,51)	92,47 ± 7,24 (83-104,75)
3	YKÇ Kontrol Grubu	315,55 ± 66,85 (221,01-427,11)	17,33 ± 5,70 (8,19-26,61)	192,07 ± 17,74 (165,44-211,48)	1735,73 ± 260,76 (1263,92-2020,55)	83,14 ± 9,10 (73,14-97,77)
	p Değeri	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p>0,05 1-3: p<0,001 2-3: p<0,05	p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,05 1-3: : p>0,05 2-3: p<0,001	p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,05 1-3: : p<0,001 2-3: p>0,05

Karaciğer GPO ve MDA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Karaciğer PIIINP düzeyi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruba göre anlamlı derecede düşüktür (sırasıyla p<0,001; p<0,05). Karaciğer katalaz aktivitesi 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta kontrol grubuna ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı ölçüde yüksektir (sırasıyla p<0,05; p<0,001). Karaciğer SOD aktivitelerinin ise kontrol grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu izlenmiştir (sırasıyla p<0,05; p<0,001).

Tablo 6.19. Grupların kalp PIIINP ve kalp oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırılması

Grup Numarası	Grup Adı	Kalp PIIINP (pg/mg) Ort ± SS (min-maks)	Kalp GPO (mIU/mg) Ort ± SS (min-maks)	Kalp Katalaz (IU/mg) Ort ± SS (min-maks)	Kalp MDA (pmol/mg) Ort ± SS (min-maks)	Kalp SOD (U/mg) Ort ± SS (min-maks)
1	Kontrol Grubu	289,89 ± 143,98 (74,92-530,64)	31,61 ± 3,96 (25,64-36,34)	21,22 ± 2,26 (17,47-23,85)	1619,35 ± 303,13 (1145,60-2033,48)	45,88 ± 1,81 (43,63-48,83)
2	KA Kontrol Grubu	169,05 ± 82,92 (96,69-302,76)	24,43 ± 2,54 (19,09-27,27)	25,23 ± 1,44 (23,29-27,17)	1435,81 ± 285,64 (977,58-2016,25)	46,40 ± 2,60 (41,80-48,72)
3	YKÇ Kontrol Grubu	170,47 ± 183,82 (2,89-533,36)	26,13 ± 5,29 (21,82-37,27)	19,13 ± 2,65 (15,25-23,85)	1407,17 ± 237,81 (1191,42-1909,33)	44,96 ± 2,74 (40,03-48,11)
	p Değeri	p>0,05	p<0,01 Post-Hoc 1-2 p<0,01 1-3: p<0,05 2-3: p>0,05	p<0,001 Post-Hoc 1-2: p<0,01 1-3: : p>0,05 2-3: p<0,001	p>0,05	p>0,05

Kalp PIIINP, MDA ve SOD düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Kalp GPO aktivitesi kontrol grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır (sırasıyla p<0,01; p<0,05). Kalp katalaz aktivitesi ise 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta kontrol grubuna ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olarak izlenmiştir (sırasıyla p<0,01; p<0,001).

NAYKH aktivite skorlamasında; kontrol, KA kontrol ve YKÇ kontrol grupları toplam skordan ve tüm alt skorlardan 0 puan almışlardır. Kleiner vd. (2005) tarafından NAYKH hastaları için özel olarak geliştirilen skorlama sisteminde toplam skor < 3 olduğunda NASH tanısı dışlanmaktadır. Dolayısıyla tüm gruplarda NASH tanısı dışlanmıştır.

6.4. Kontrol ve NASH Gruplarında Serum Glo-1 Düzeyi ile Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Kontrol ve NASH gruplarında serum Glo-1 düzeyi ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin incelenmesinde Spearman korelasyon analiz testi kullanılmıştır.

Tablo 6.20. Kontrol ve NASH gruplarında serum Glo-1 ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişki

	Kontrol Grupları Serum Glo-1 (ng/mL) (n=24)	NASH Grupları Serum Glo-1 (ng/mL) (n=32)
Serum GPO (mIU/mL)	R= 0,062 p= 0,77	R= 0,032 p= 0,86
Serum Katalaz (IU/mL)	R= 0,290 p= 0,17	R= 0,125 p= 0,49
Serum MDA (pmol/ml)	R= 0,502 p= 0,01	R= - 0,327 p= 0,07
Serum SOD (U/mL)	R= 0,230 p= 0,28	R= 0,302 p= 0,09
Karaciğer GPO (mIU/mg)	R= - 0,046 p= 0,83	R= - 0,116 p= 0,53
Karaciğer Katalaz (IU/mg)	R= - 0,089 p=0,68	R= - 0,405 p= 0,02
Karaciğer MDA (pmol/mg)	R= - 0,023 p= 0,91	R= - 0,323 p= 0,07
Karaciğer SOD (U/mg)	R= 0,402 p= 0,05	R= - 0,357 p= 0,04
Kalp GPO (mIU/mg)	R= 0,380 p= 0,07	R= 0,080 p= 0,66
Kalp Katalaz (IU/mg)	R= 0,046 p= 0,83	R= 0,151 p= 0,41
Kalp MDA (pmol/mg)	R= 0,373 p= 0,07	R= 0,210 p= 0,25
Kalp SOD (U/mg)	R= 0,060 p= 0,78	R= - 0,290 p= 0,10

Tablo 6.20’de serum Glo-1 düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerine ilişkin korelasyon katsayıları (R) ve p değerleri verilmiştir. Kontrol gruplarında sadece serum MDA düzeyi ile serum Glo-1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon izlenmiştir (R= 0,502 p= 0,01). NASH gruplarında ise karaciğer katalaz ve karaciğer SOD aktiviteleri ile serum Glo-1 düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır (sırasıyla R= - 0,405 p= 0,02; R= - 0,357 p= 0,04).

6.5 NASH Gruplarında NAYKH Aktivite Skoru ile Antropometrik Ölçümler ve Serum Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

NASH gruplarında NAYKH aktivite skoru ile antropometrik ölçümler ve serum parametreleri arasındaki ilişkinin incelenmesinde Spearman korelasyon analiz testi kullanılmıştır.

Tablo 6.21. NAYKH aktivite skoru ile antropometrik ölçümler arasındaki ilişki

	NAYKH Aktivite Skoru
Başlangıç Vücut Ağırlığı (gr)	R= - 0,128 p= 0,48
Terminal Vücut Ağırlığı (gr)	R= 0,349 p= 0,05
Terminal Karaciğer Ağırlığı (gr)	R= 0,303 p= 0,09
Terminal KC Ağı./Terminal Vücut Ağı. (binde; ‰)	R= 0,249 p= 0,16
Kilo Alımı (gr)	R= 0,420 p= 0,02

Tablo 6.21 incelendiğinde antropometrik ölçümlerden sadece kilo alımı ile NAYKH aktivite skoru arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu görülmektedir (R= 0,420 p= 0,02).

Tablo 6.22. NAYKH aktivite skoru ile serum oksidatif stres parametreleri ve Glo-1 düzeyleri arasındaki ilişki

	NAYKH Aktivite Skoru
Serum Glo-1 (ng/mL)	R= - 0,367 p= 0,04
Serum GPO (mIU/mL)	R= 0,250 p= 0,17
Serum Katalaz (IU/mL)	R= - 0,311 p= 0,08
Serum MDA (pmol/ml)	R= 0,698 p<0,001
Serum SOD (U/mL)	R= -0,268 p= 0,14

Tablo 6.22 incelendiğinde serum Glo-1 ile NAYKH aktivite skoru arasında negatif korelasyon izlenirken; serum MDA ile NAYKH aktivite skoru arasında pozitif korelasyon izlendiği görülmektedir (sırasıyla R= - 0,367 p= 0,04; R= 0,698 p<0,001).

Tablo 6.23. NAYKH aktivite skoru ile serum biyokimyasal parametreleri arasındaki ilişki

	NAYKH Aktivite Skoru
Glukoz (mg/dL)	R= 0,476 p= 0,006
ALT (U/L)	R= - 0,567 p= 0,001
AST (U/L)	R= - 0,532 p= 0,002
Total Kolesterol (mg/dL)	R= 0,017 p= 0,93
HDL-K (mg/dL)	R= - 0,26 p= 0,89
Trigliserid (mg/dL)	R= 0,487 p= 0,005
Üre (mg/dL)	R=0,127 p= 0,49
Kreatinin (mg/dL)	R= 0,062 p= 0,74
Amilaz (U/L)	R= 0,407 p=0,021
Lipaz (U/L)	R= 0,112 p= 0,54
VLDL-K (mg/dL)	R= 0,487 p= 0,005
LDL-K (mg/dL)	R= - 0,013 p= 0,94

NAYKH aktivite skoru serum glukoz, trigliserid, amilaz ve VLDL-K düzeyleri ile pozitif korele iken; ALT ve AST düzeyleri ile negatif koreledir (sırasıyla R= 0,476 p= 0,006; R= 0,487 p= 0,005; R= 0,407 p=0,021; R= 0,487 p= 0,005; R= - 0,567 p= 0,001; R= - 0,532 p= 0,002).

6.6 NAYKH Aktivite Skorunu Serum Parametreleri ile Öngörebilmek Üzere Oluşturulan Bir Regresyon Modeli

NAYKH aktivite skorunun serum parametreleri ile ilişkisi incelenerek çoklu lineer regresyon modelleri oluşturulmuştur. NAYKH aktivite skorundaki varyansı en yüksek oranda açıklayan istatistiksel açıdan anlamlı model uygun model olarak seçilmiş ve aşağıda verilmiştir.

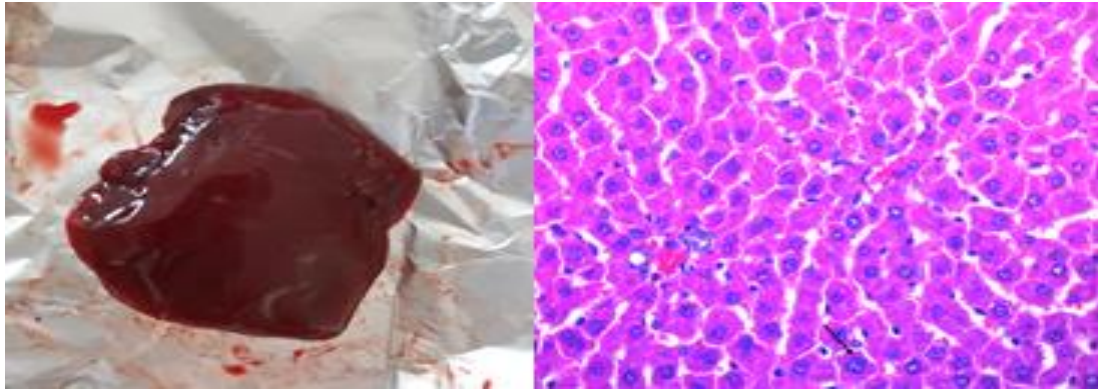
Tablo 6.24. NAYKH aktivite skoruna ilişkin bir lineer regresyon modeli

Değişkenler	NAYKH Aktivite Skoru		
	Standart β Katsayısı	p Değeri	R ²
Serum MDA Düzeyi (pmol/ml)	0,607	p<0,001	0,758
Serum Trigliserid Düzeyi (mg/dL)	0,432	p<0,001	

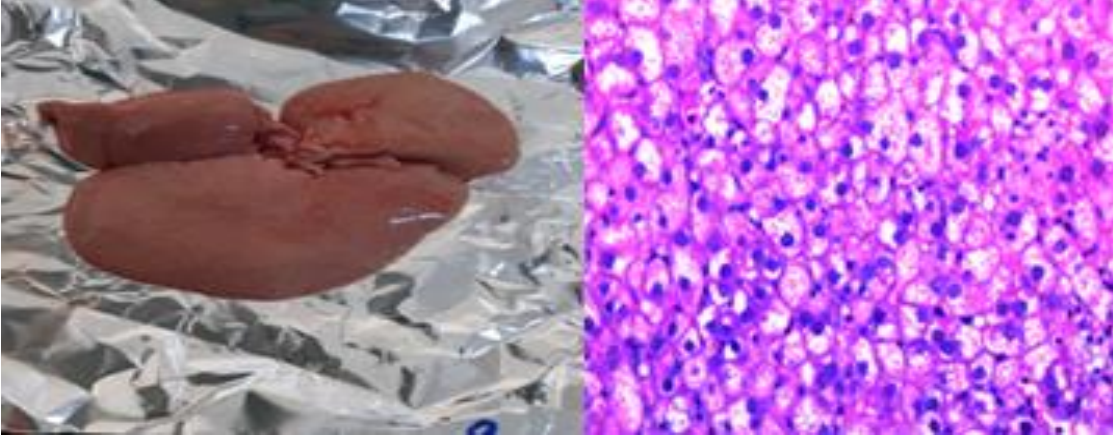
Tablo 6.24 incelendiğinde serum MDA ve serum trigliserid düzeylerinin NAYKH aktivite düzeylerini beraberce pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Serum MDA ve serum trigliserid düzeyi değişkenleri NAYKH aktivite skorunun öngörülmesinde istatistiksel açıdan anlamlıdır (p<0,001).

6.7. Ratların Karaciğer Histopatolojisinin Değerlendirilmesi

Araştırmamızda rat karaciğerinde histopatolojik olarak NAYKH aktivite skorunun hesaplanmasının yanı sıra tüm kesitler histopatolojik açıdan ayrıca değerlendirilip bulgular açıklanmıştır. Bu bölüm çalışmada yer alan tüm gruplara ait karaciğer dokularının, Hematoksilin Eozin (H-E), Masson trikrom ve periyodik asit–Schiff (PAS) boyamalarına ilişkin kesitlerinin ayrı ayrı ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi ve histopatolojik açıdan incelenmesi sonucu elde edilen verileri içermektedir.



Şekil 6.1. Normal karaciğerin makroskopik (solda) ve mikroskopik görünümü (sağda), hepatosit (↑)

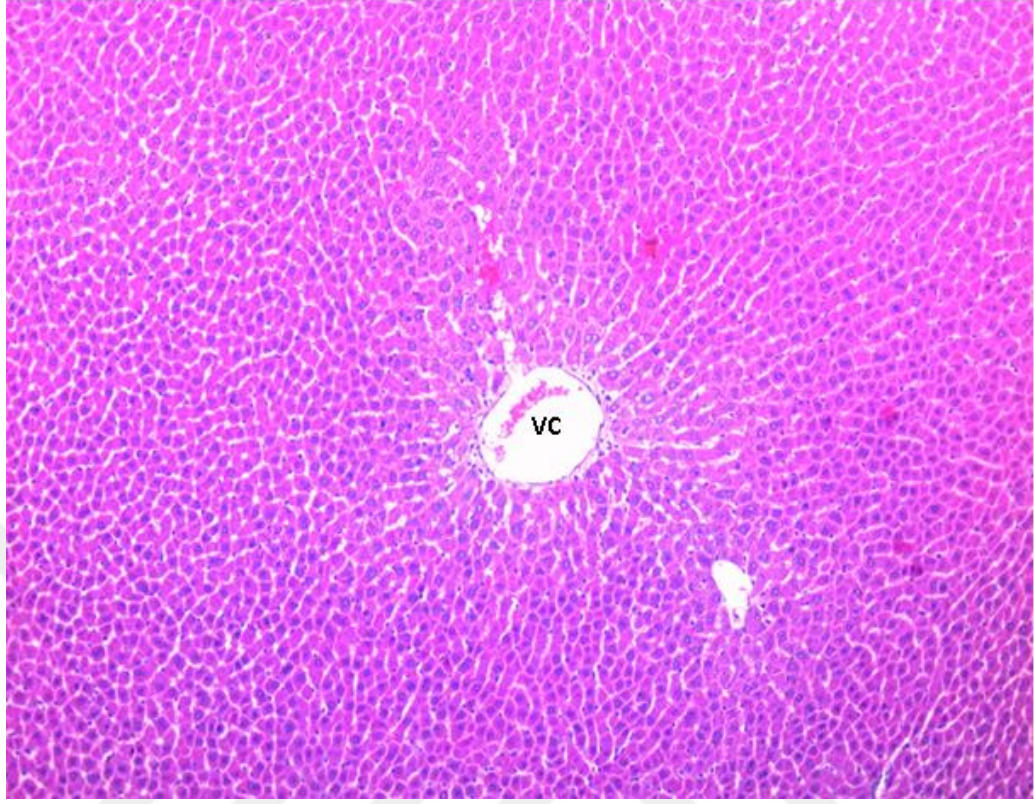


Şekil 6.2. NASH modeli, karaciğerin makroskopik görünümü (solda) ve mikroskopik görünümü (sağda)

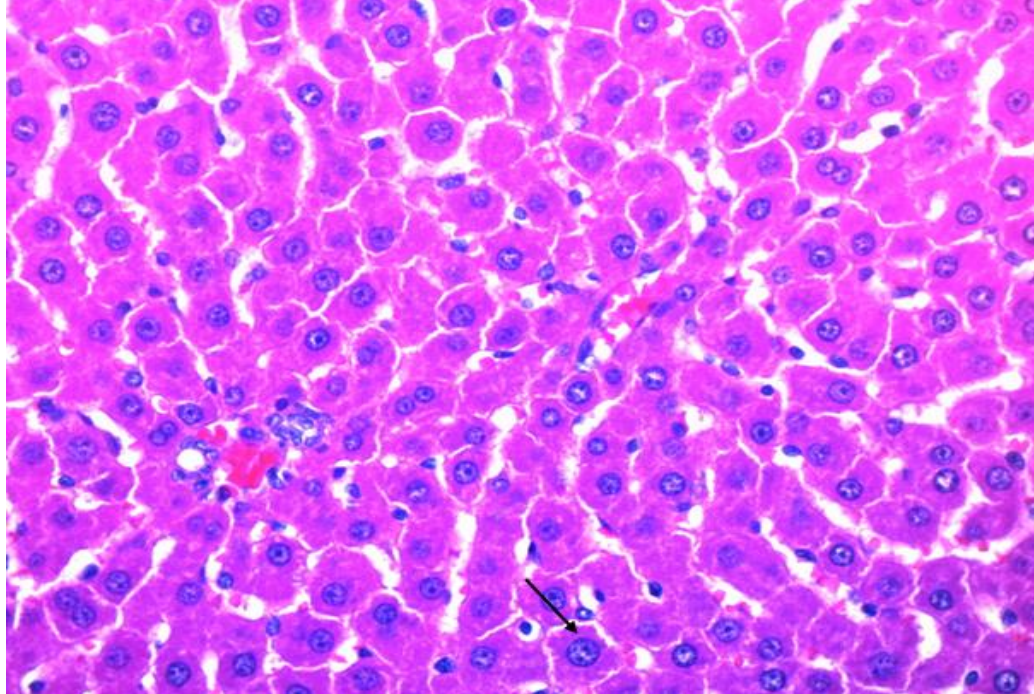
6.7.1. Kontrol Grubu

H-E ile boyanan kontrol grubu karaciğer dokusunun kesitleri ayrı ayrı ışık mikroskobu altında değerlendirildiğinde; karaciğerin histolojik yapısının normal bir görünüme sahip olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda vena centralis (VC) ve çevresinde hepatositlerin ışınsal düzende dizildiği, sinüzoidlerin ve hepatik plakların genel histolojik yapısının normal görünümde olduğu izlenmiştir (Şekil 6.3 ve Şekil 6.4).

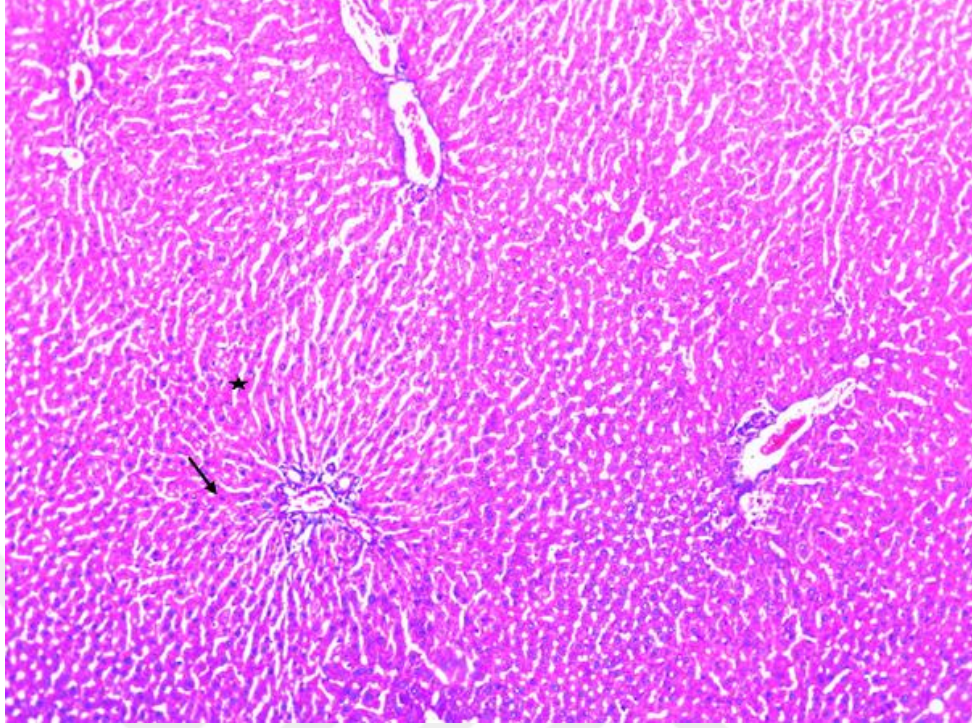
Masson trikrom ile boyanan kontrol grubu karaciğer dokusunun histolojik incelenmesinde hepatositler ve sinüzoidler normal görünümde olup bağ dokusunda herhangi bir artış gözlenmemiştir (Şekil 6.5). PAS boyamada ise hepatositlerde glukojen dağılımı normal olarak izlenmiştir (Şekil 6.6).



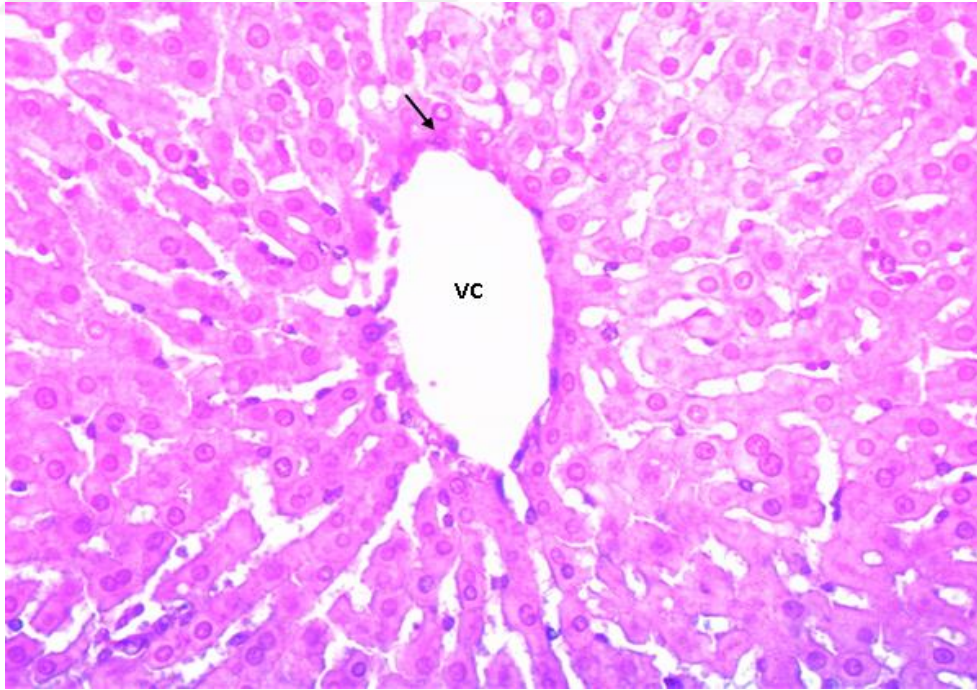
Şekil 6.3. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (VC: vena centralis) (H-E X10)



Şekil 6.4. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Hepatosit (↑) (H-E X40)



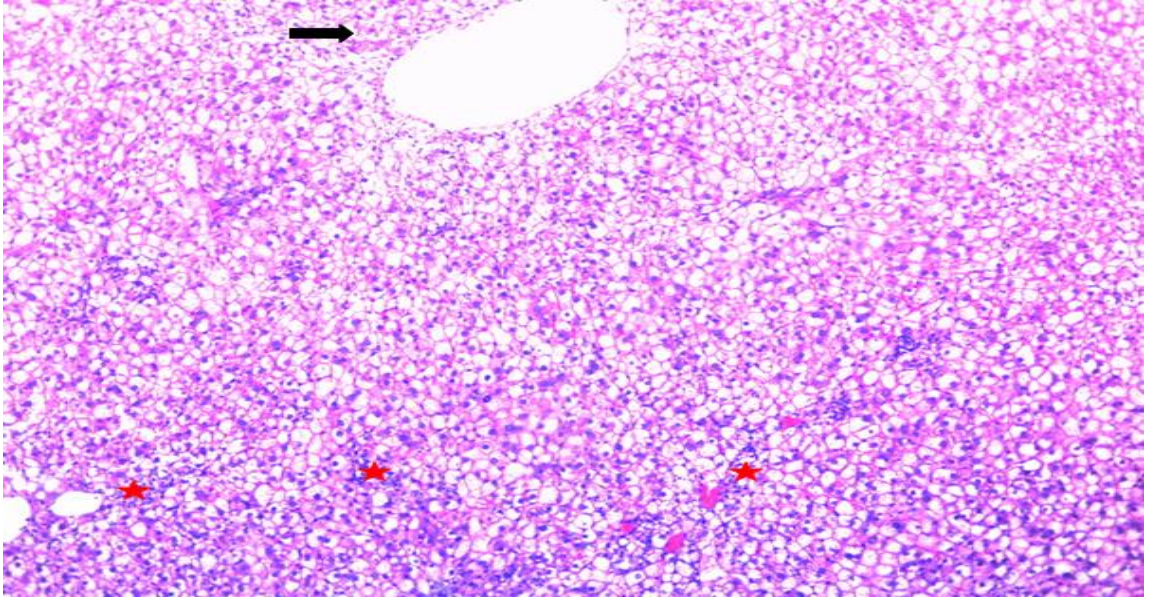
Şekil 6. 5. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Hepatosit (↑), sinüzoid (★) (Masson trikrom X10)



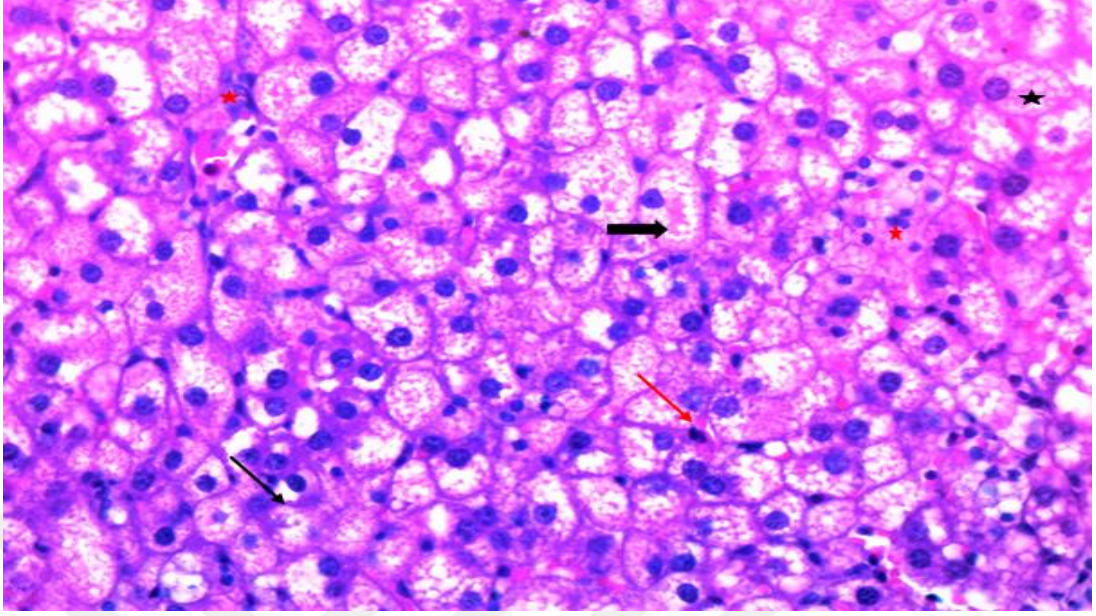
Şekil 6.6. Kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (VC: vena centralis) Glikojen (↑) (PAS X40)

6.7.2. NASH Model Grubu

H-E ile boyanan NASH model grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik incelemesinde; karaciğer dokusunun tüm zonlarında hepatositler içerisinde mikroveziküler ve makroveziküler yağ damlacıkları gözlenmiştir. Mikroveziküler steatoziste, hepatosit çekirdeğini çevreleyen birçok küçük yağ damlacığı, hepatosit köpüksü ve veziküler bir görünüm vermektedir. Makroveziküler steatoziste ise bir veya birkaç tane yuvarlak yağ damlacığının, hepatosit çekirdeğinin hücrenin periferine doğru yer değiştirmesine neden olduğu görülmüştür. Ayrıca hepatosit dejenerasyonu ve hepatik plakların yapısal bütünlüğünde dejenerasyon belirgin olarak izlenmiştir (Şekil 6.7). Lobüler inflamasyon fokal odaklar tarzında tüm alanlarda görülmüştür. Megamitokondriyon ve Mallory cisimciği görülmektedir (Şekil 6.7 ve Şekil 6.8).

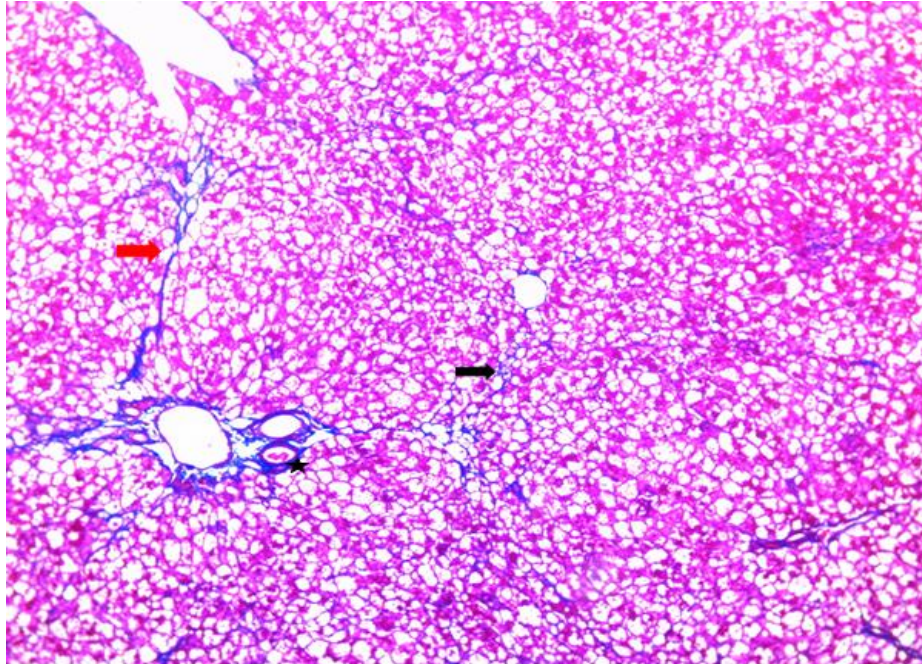


Şekil 6.7. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Mallory cisimciği (**↑**), lobüler inflamasyon (**★**) (H-E X10)

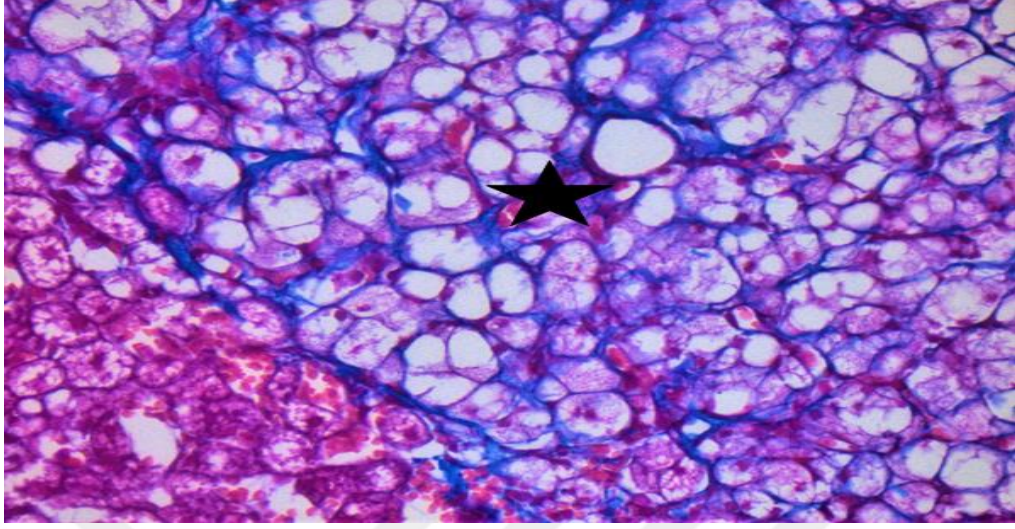


Şekil 6.8. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Mikroveziküler yağlanma (★), makroveziküler yağlanma (↑), Mallory cisimciği (↑), megamitokondriyon (↑), lobüler inflamasyon (★) (H-E X40)

Masson trikrom boyamada hayvanların yarısında lipogranülom yapısı gözlenmiştir. Fibrozis perisinüzoidal/ periportal alanlarda görülmüş, köprüleşme ise sadece 2 ratta görülmüştür (Şekil 6.9, Şekil 6.10).

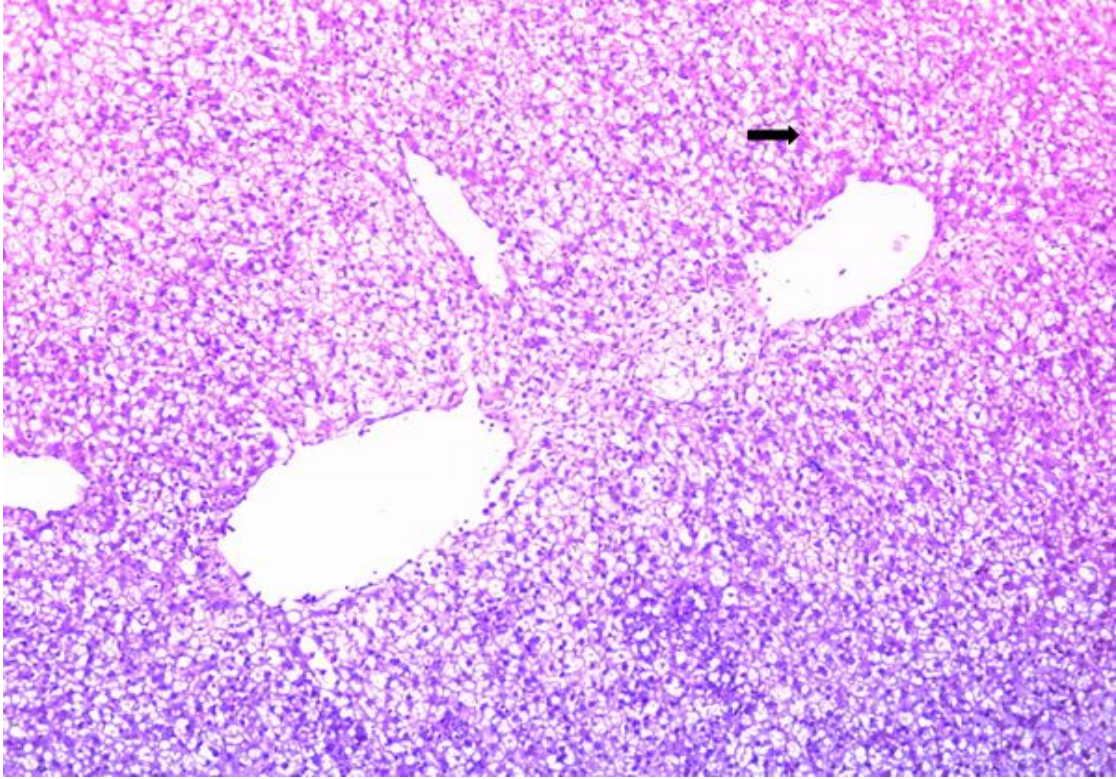


Şekil 6.9. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Perisinüzoidal fibrozis (↑), periportal fibrozis (★), köprüleşme (↑) (Masson trikrom X10)



Şekil 6. 10. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Lipogranülom (★) (Masson trikrom X40)

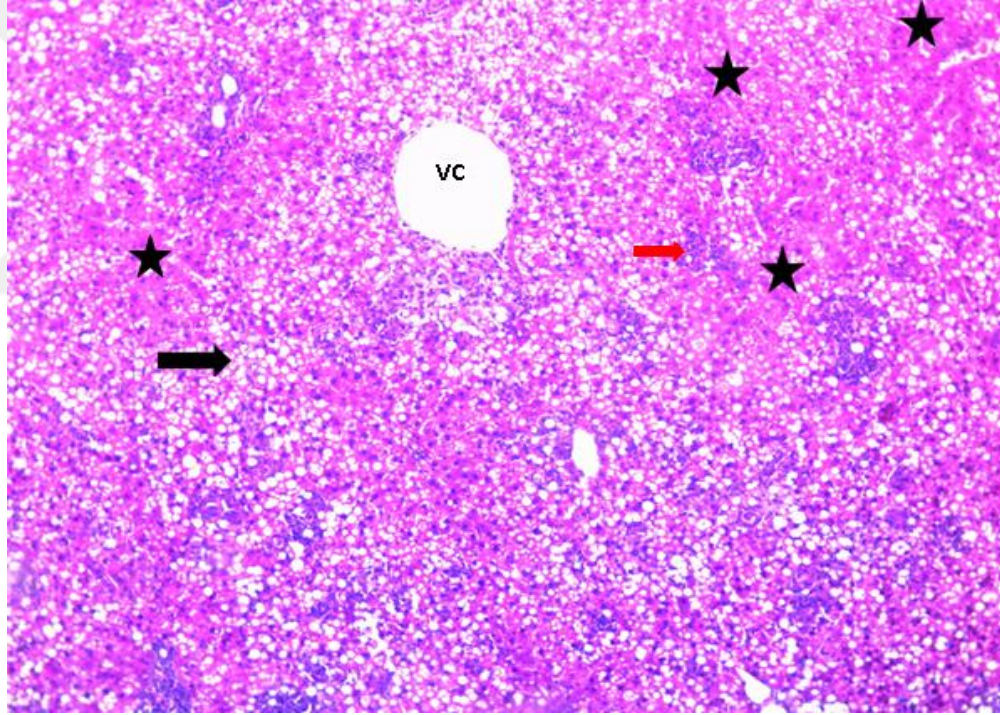
PAS boyamada hepatositlerde yağlanma artışından dolayı glikojen granülleri gözlenememiş olup, yağlanma derecesi az olan hepatositlerde az miktarda glikojen birikimi izlenmiştir (Şekil 6.11).



Şekil 6.11. NASH model grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Glikojen (↑) (PAS X10)

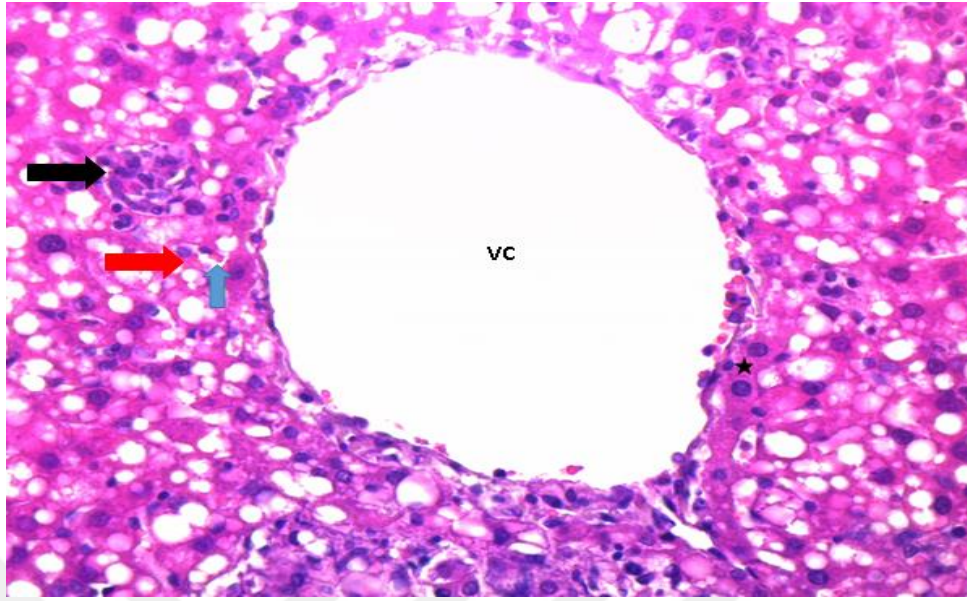
6.7.3. YYYYK-YKÇ Grubu

H-E ile boyanan karaciğer dokusunun histolojik açıdan incelenmesi sonucu; YYYYK-YKÇ grubunda NASH model grubu ile karşılaştırıldığında hepatositlerde balonlaşmanın azaldığı ancak makroveziküler ve mikroveziküler yağlanmanın devam ettiği gözlenmiştir. Yağlanmanın belirgin olduğu bölge zon 1 olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte adacık tarzında ve damar çeperleri çevresinde normal hepatosit görünümüne kavuşan karaciğer hücrelerinin varlığı gözlenmiştir. Lenfosit infiltrasyonu mevcut olup NASH model grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Mallory cisimcikleri azalmış olup, megamitokondriyon yapılanması varlığını korumaktadır (Şekil 6.12, Şekil 6.13, Şekil 6.14, Şekil 6.15).

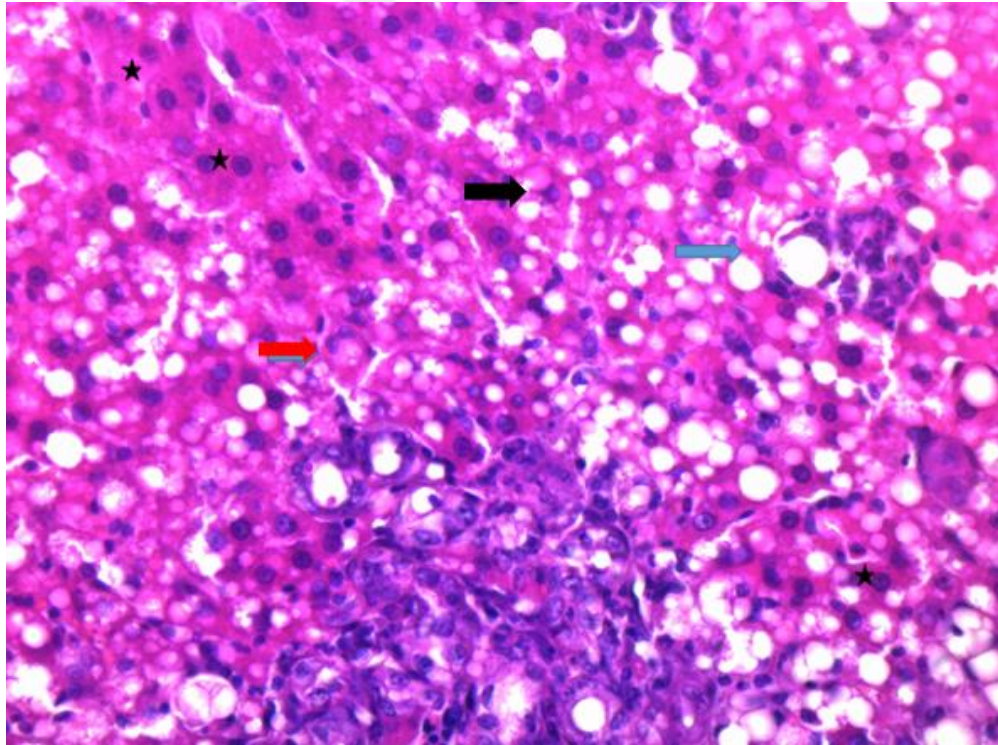


Şekil 6.12. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (VC: vena centralis)

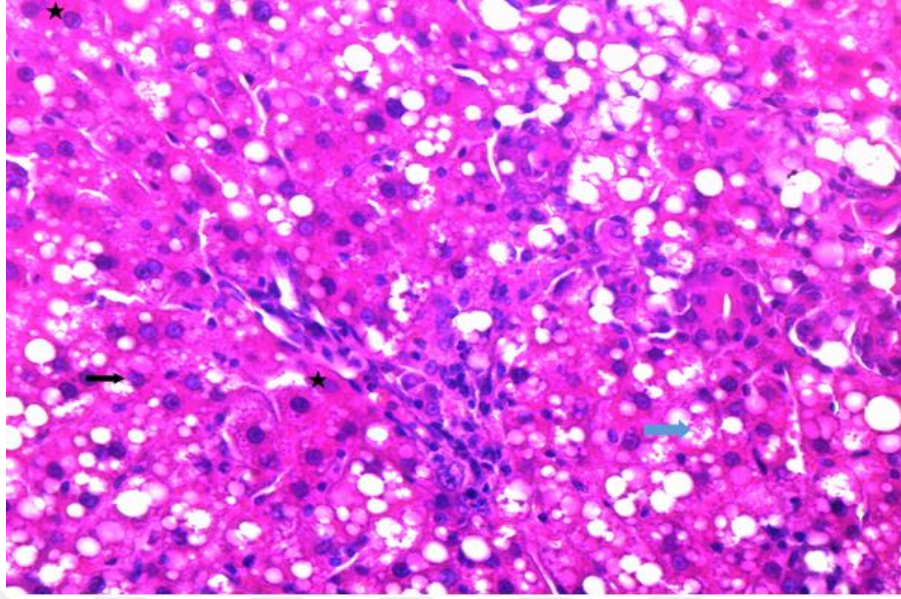
Makroveziküler yağlanma (**↑**), lobüler inflamasyon (**↑**), normal görünümüne kavuşan hepatositler (**★**)
(H-E X10)



Şekil 6.13. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (VC: vena centralis) Lobüler inflamasyon (↑), normal görünümüne kavuşan hepatositler (★), Mallory cisimciği (↑), megamitokondriyon (↑) (H-E X40)

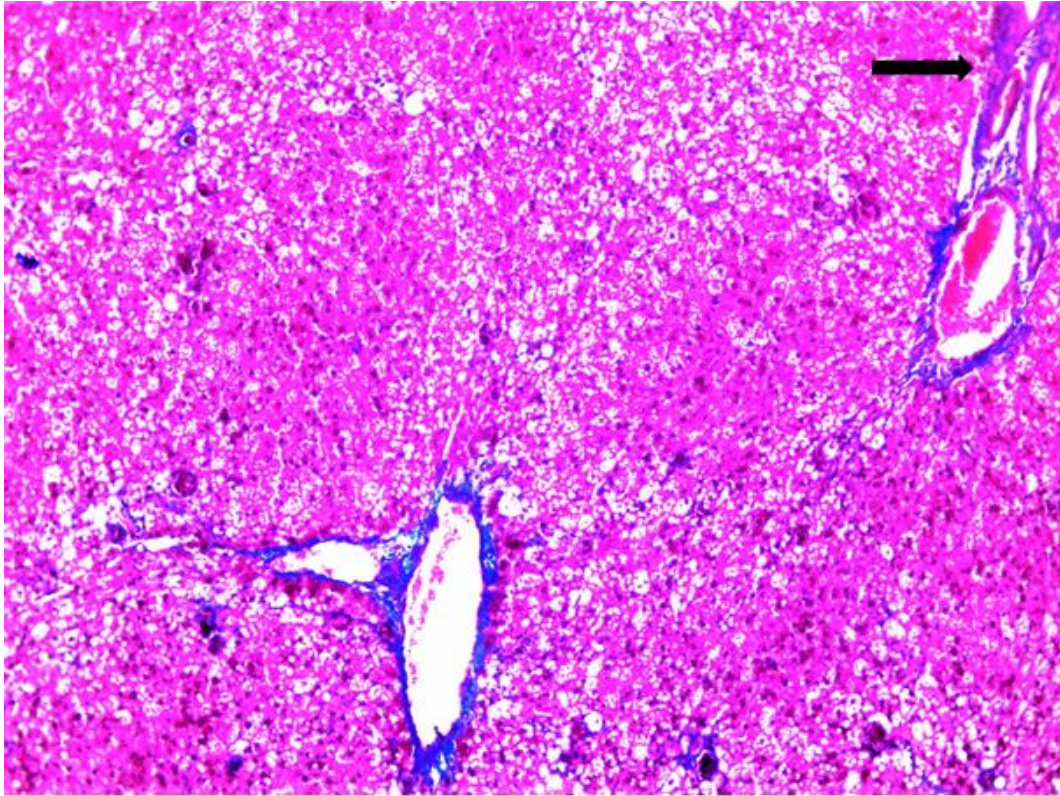


Şekil 6.14. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Normal görünümüne kavuşan hepatositler (★), balonlaşma (↑), Mallory cisimciği (↑), megamitokondriyon (↑) (H-E X40)



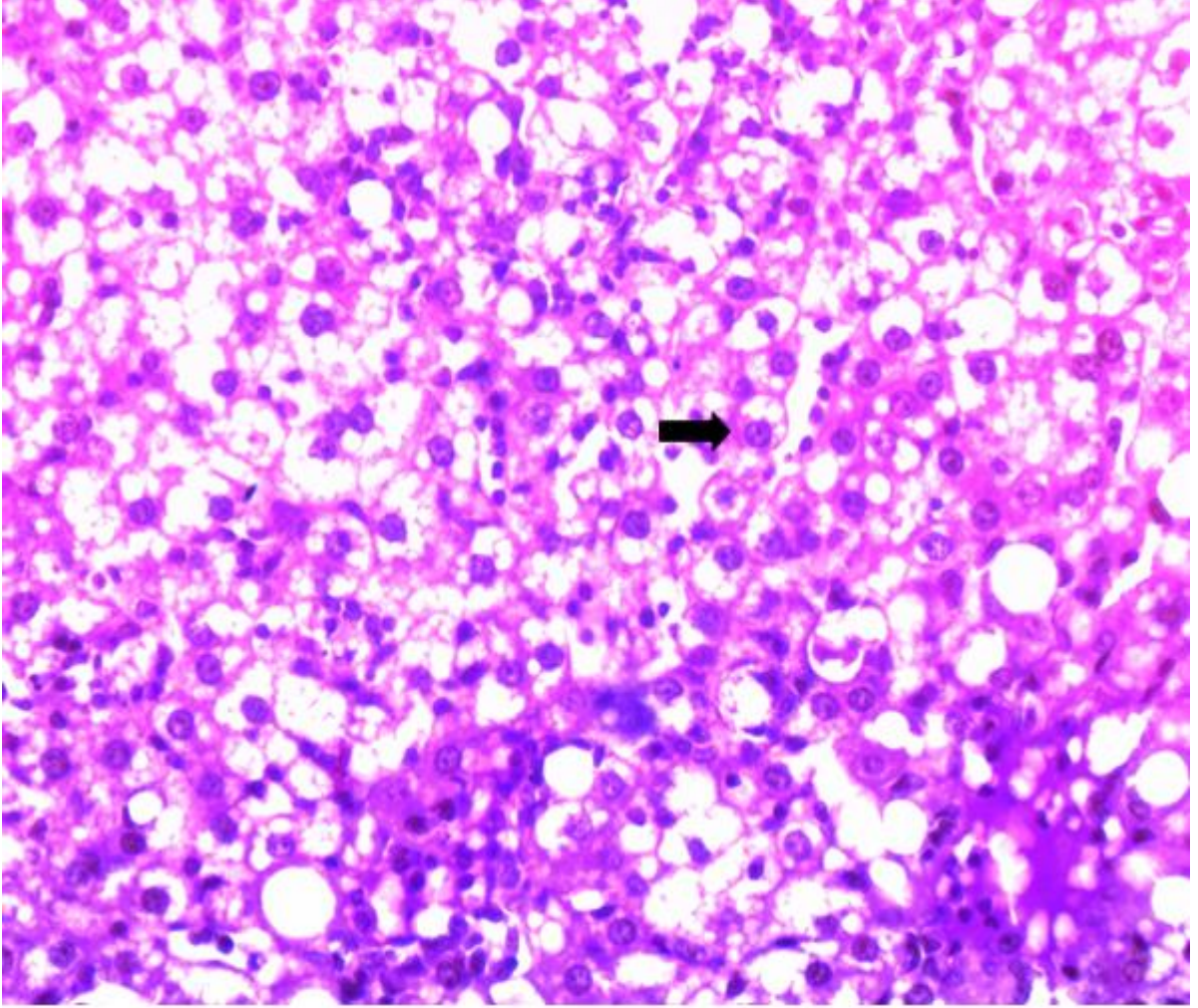
Şekil 6.15. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Normal görünümüne kavuşan hepatositler (★), balonlaşma (↑), Mallory cisimciği (⬆) (H-E X40)

Masson trikrom boyamada fibrozis derecesi değerlendirildiğinde ratların çoğunda hafif ve ılımlı derecede fibrozisin portal ve periportal alanlarda mevcut olduğu görülmüştür.



Şekil 6.16. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Portal ve periportal fibrozis (↑) (Masson Trikrom X10)

PAS boyamada NASH model grubunda olduğu gibi hepatositlerde yağlanmanın varlığından dolayı glikojen granülleri net olarak izlenmemiştir. Adacık tarzında normal görünüme sahip olan hepatositlerde az da olsa granül yapısı gözlenmiştir (Şekil 6.17)

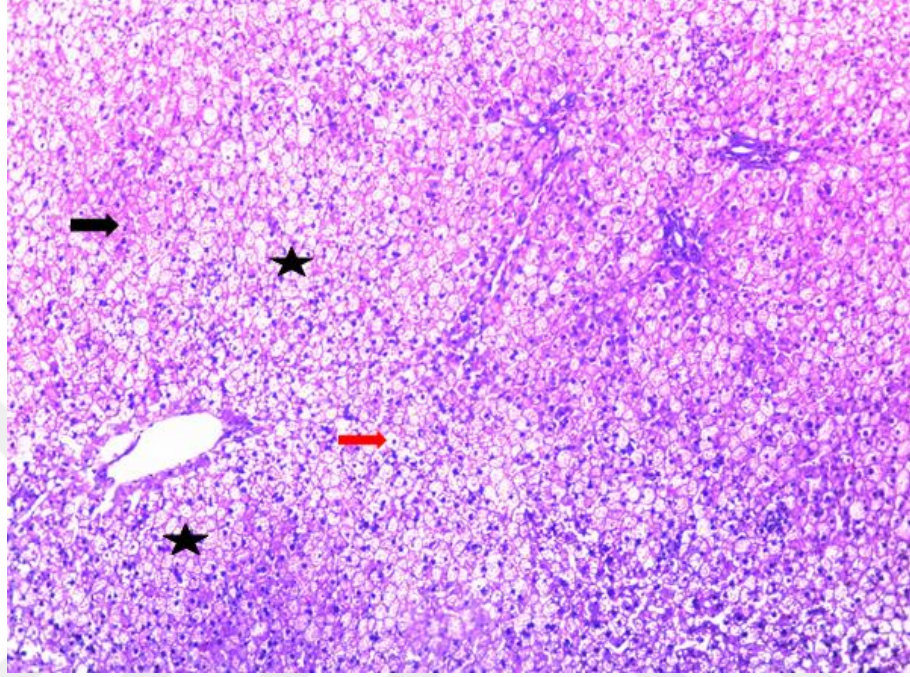


Şekil 6.17. YYYYK-YKÇ grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Glikojen (↑) (PAS X40)

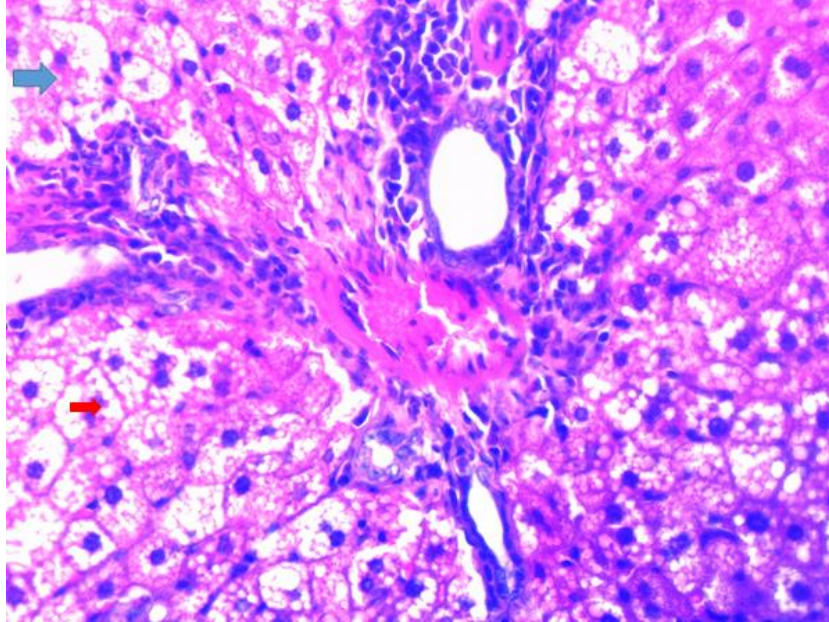
6.7.4. YYYYK-KA 10 Grubu

H-E ile boyanan kesitlerde hepatositlerde balonlaşmanın azaldığı ancak mikroveziküler ve makroveziküler yağlanmanın devam ettiği gözlenmiştir. Steatozis yaygın olarak zone 1’de izlenmiştir (Şekil 6.18). Mallory hyalin cisimciklerinde azalma izlenmiştir. Megamitokondriyon sayısında anlamlı değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 6.19). Masson trikrom boyamada YYYYK-YKÇ grubuna göre fibrozis derecesinde artış olduğu, fibrozisin perisinüzoidal, periportal

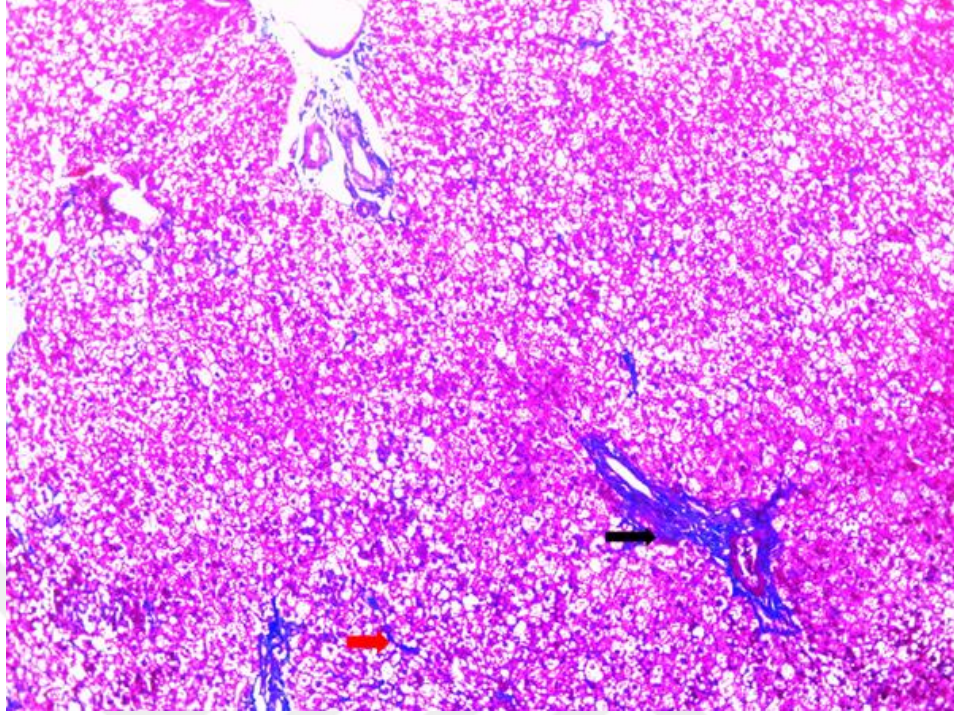
alanlarda lokalize olduğu izlenmiştir. Köprüleşmelere rastlanmıştır (şekil 6.20). PAS boyamasında ise hepatositlerde yağlanmanın varlığından dolayı glikojen granülleri net olarak izlenmemiştir.



şekil 6.18. YYYK-KA 10 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Steatozis (★), mikroveziküler yağlanma (↑), makroveziküler yağlanma (↑) (H-E X10)



şekil 6.19. YYYK-KA 10 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Mallory cisimciği (↑) megamitokondriyon (↑) (H- E X40)

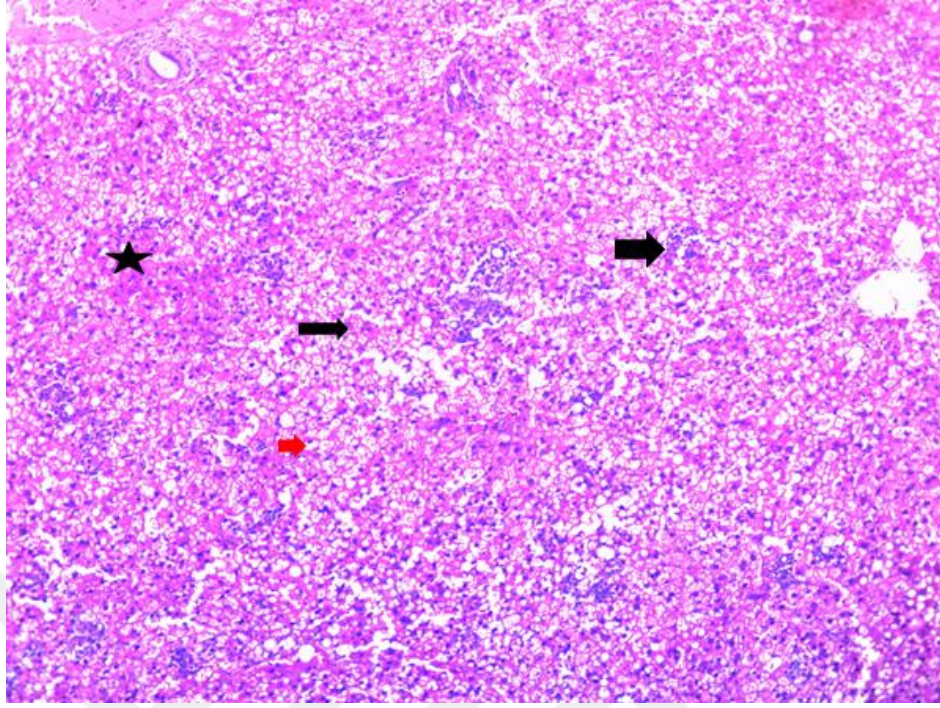


Şekil 6.20. YYYYK-KA 10 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Perisinüzoidal fibrozis (↑), periportal fibrozis (↑) (Masson trikrom X10)

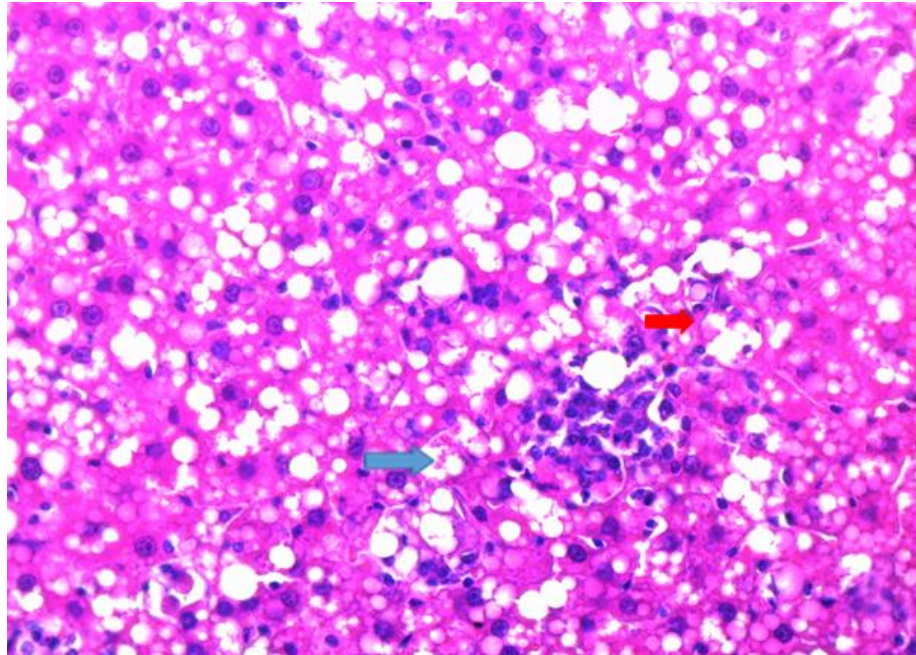
6.7.5. YYYYK-KA 50 Grubu

H-E ile boyanan kesitlerde ışık mikroskopik bulguların YYYYK-YKÇ grubuna benzer olduğu gözlenmiştir. Hepatositlerde yağlanmanın zone 1 bölgesinde olduğu, balonlaşmanın devam ettiği, mikroveziküler ve makroveziküler yağlanmanın azaldığı, normal hepatosit görünümüne sahip hücrelerin varlığı gözlenmiştir. Lenfosit infiltrasyonunun NASH model grubuna göre azaldığı izlenmiştir. Mallory cisimcikleri azalmış olup, megamitokondriyon yapılanması varlığını korumaktadır (Şekil 6.21 ve Şekil 6.22).

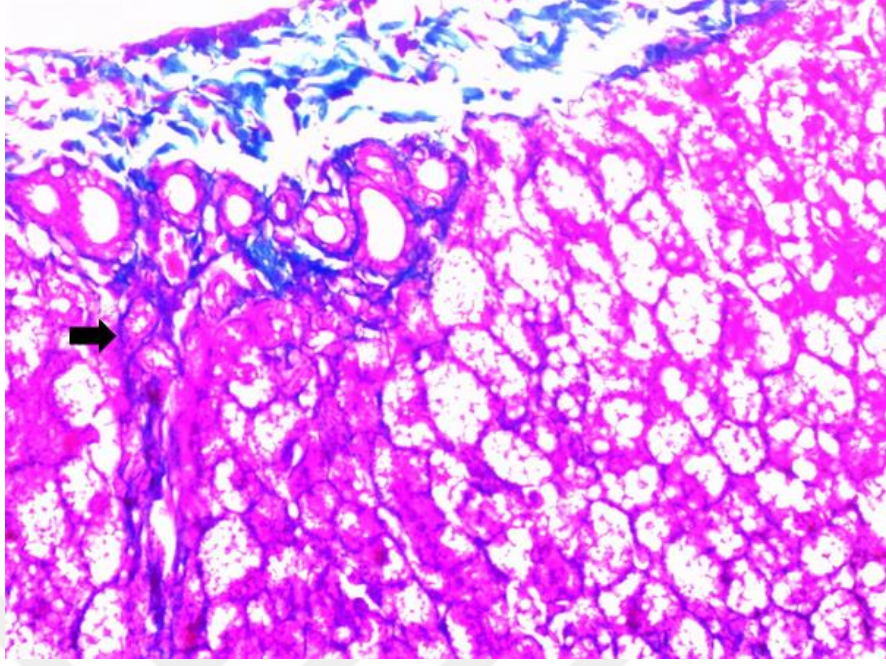
Masson trikrom boyamada fibrozisin hafif ve ılımlı derecede sinüzoidal, perisinüzoidal alanlarda mevcut olduğu görülmüştür (Şekil 6.23). PAS boyamasında hepatositlerde yağlanmanın varlığından dolayı glikojen granülleri net olarak izlenmemiştir (Şekil 6.24).



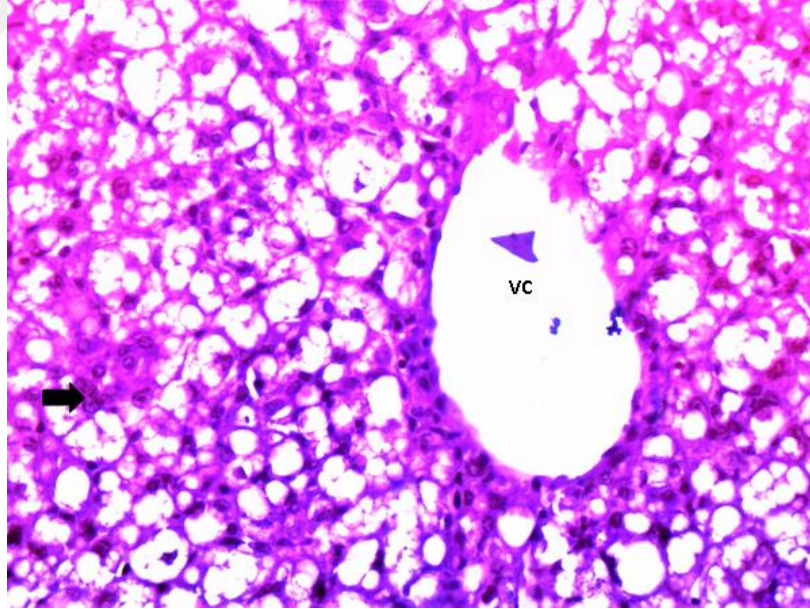
Şekil 6.21. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Normal görünümüne kavuşan hepatositler (★), mikroveziküler yağlanma (↑), makroveziküler yağlanma (↑), lenfosit infiltrasyonu (↑) (H-E X10)



Şekil 6.22. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Mallory cisimciği (↑), megamitokondriyon (↑) H-E X40)



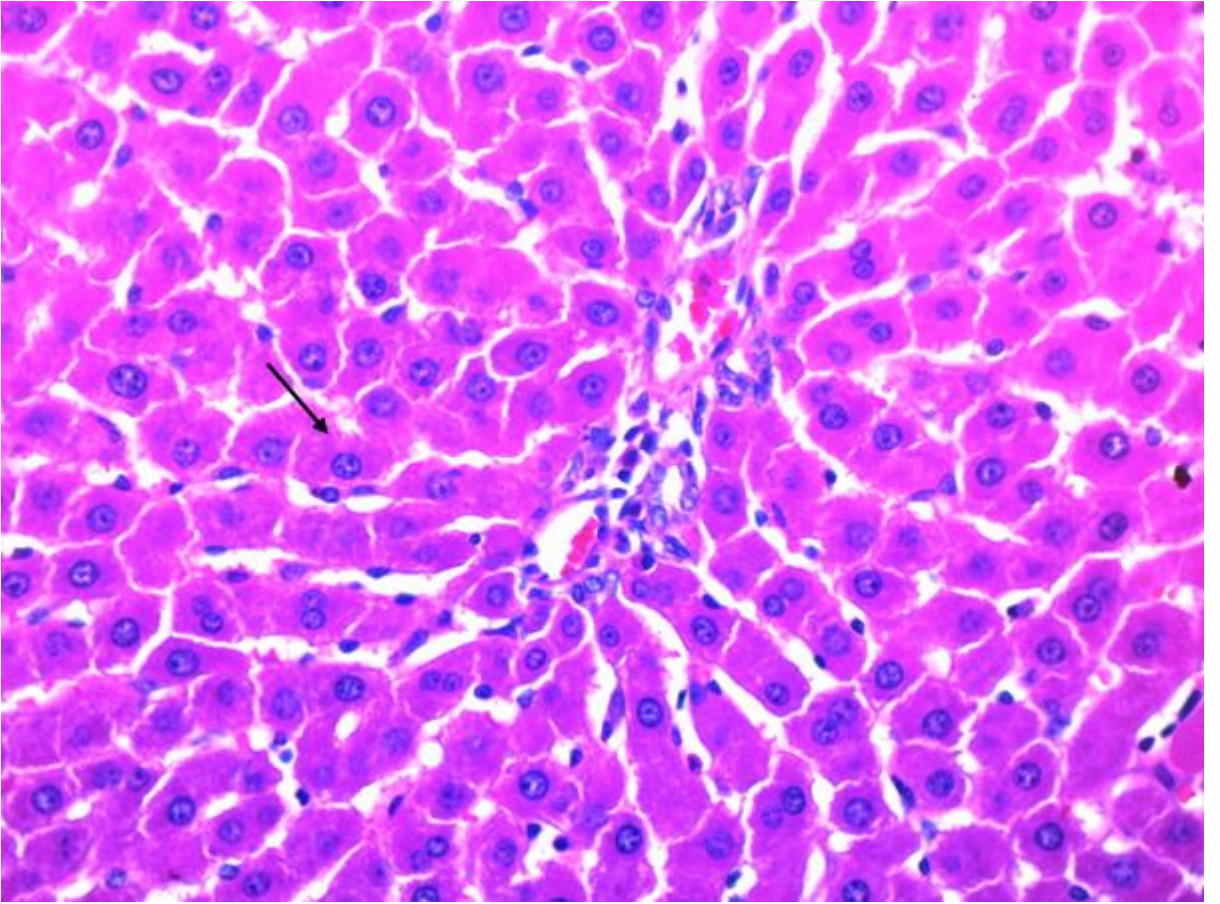
Şekil 6.23. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Perisinüzoidal fibrozis (↑)
(Masson trikrom X40)



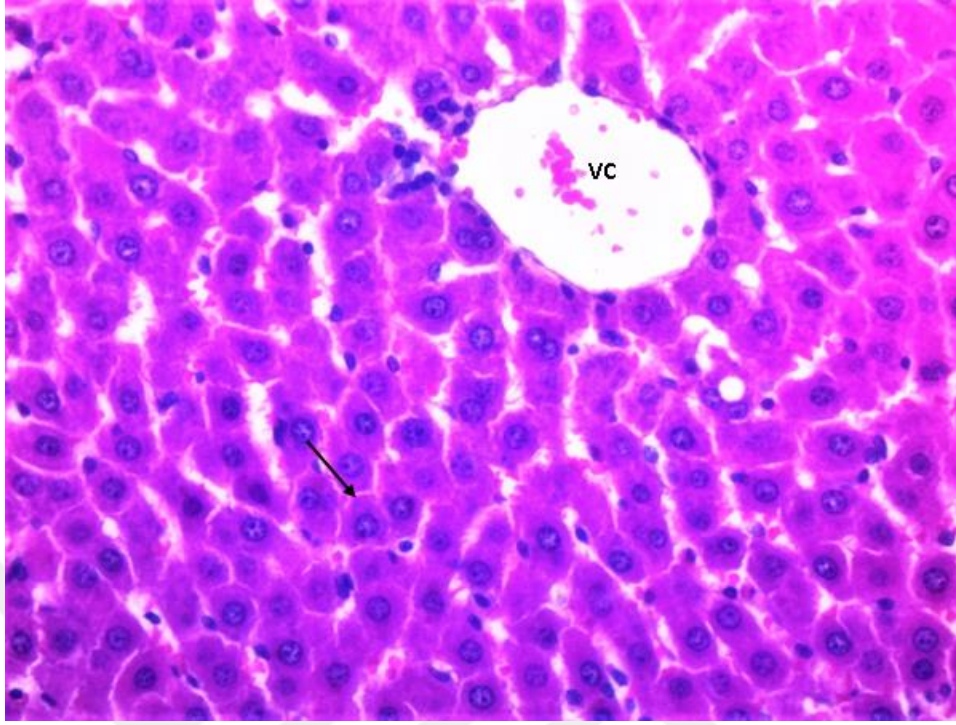
Şekil 6.24. YYYYK-KA 50 grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (VC: vena centralis) Glikojen (↑)
(PAS X40)

6.7.6. KA Kontrol ve YKÇ Kontrol Grupları

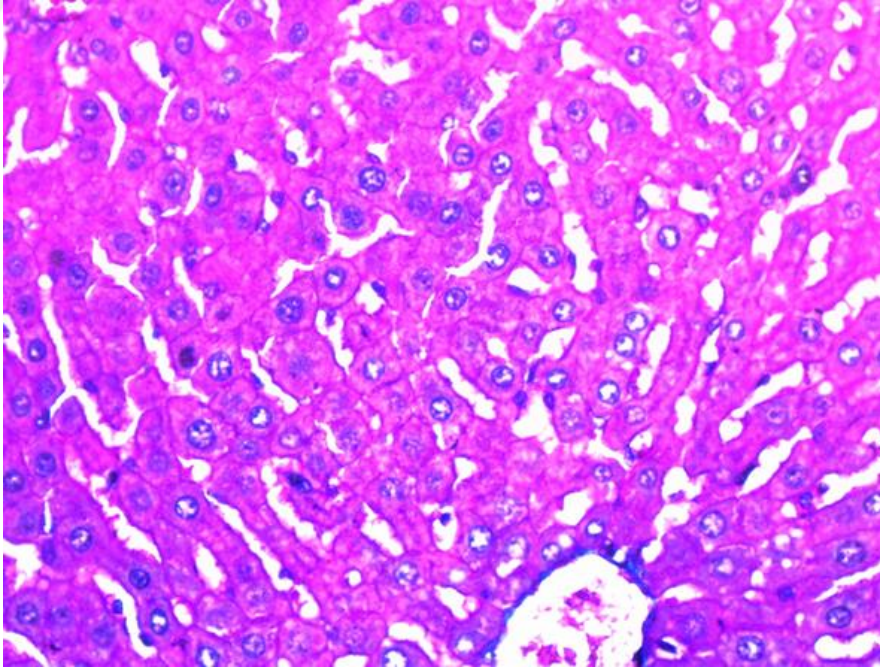
H-E ile boyanan normal yem ile beslenmiş, 10 mg/kg klorojenik asit ve 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktı alan iki grubun karaciğer dokusunun kesitleri ayrı ayrı ışık mikroskobu altında değerlendirildiğinde; ışınsal düzeydeki hepatositlerin vena centralis etrafında konumlandığı ve aralarında normal görünümlü sinüzoidlerin varlığı izlenmiştir (Şekil 6.25, Şekil 6.26). Masson trikrom boyamada her iki grup için bağ dokusunda artış gözlenmemiştir (Şekil 6.27, Şekil 6.28) PAS boyamada glikojen dağılımı normal olarak izlenmiştir (Şekil 6.29, Şekil 6.30)



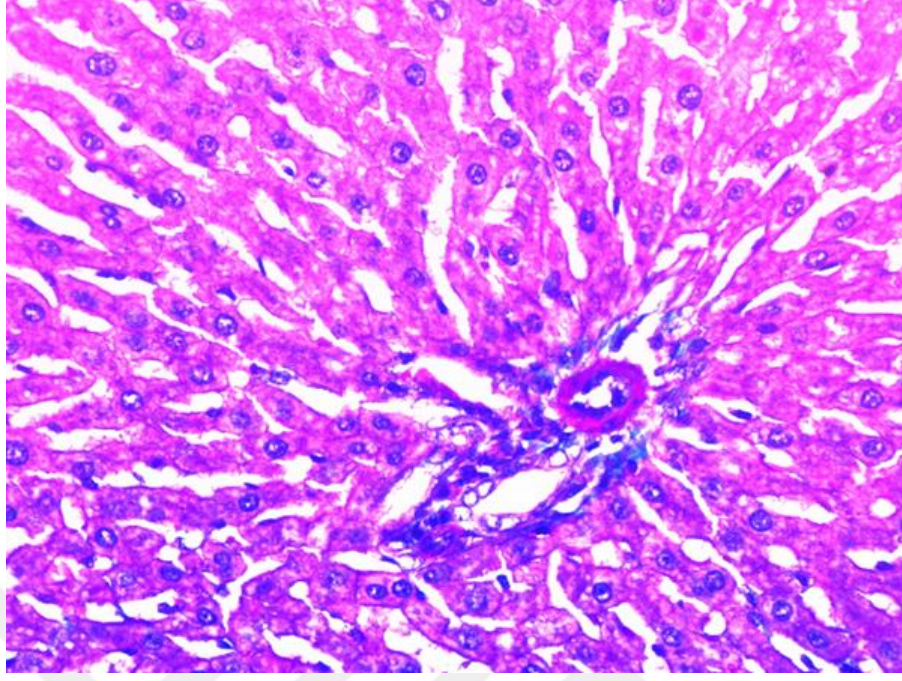
Şekil 6.25. KA kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Hepatosit (↑) (H-E X40)



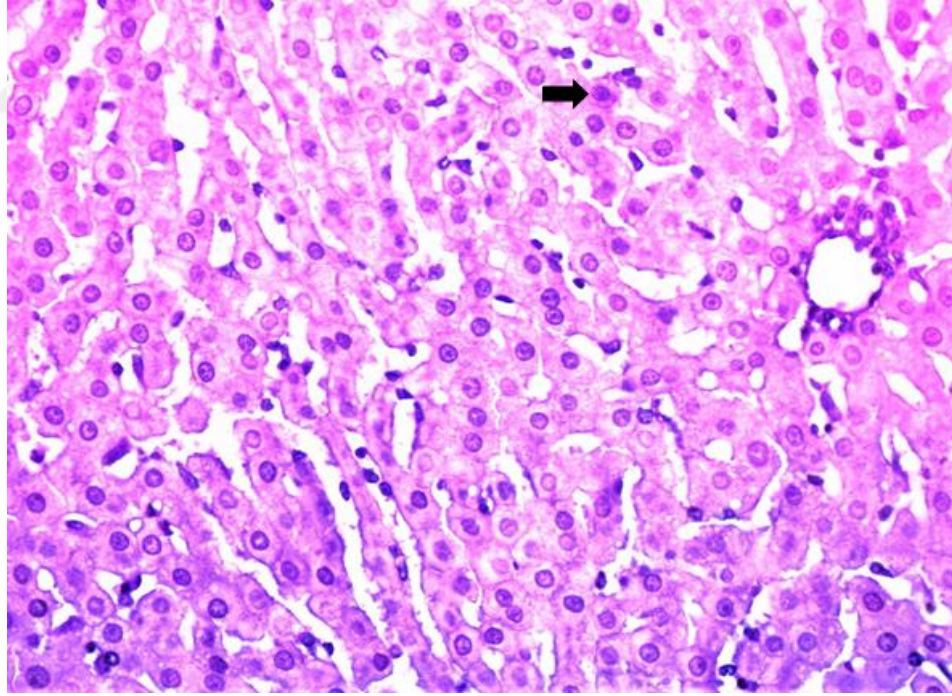
Şekil 6.26. YKÇ kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (VC: vena centralis) Hepatosit (↑) (H-E X40)



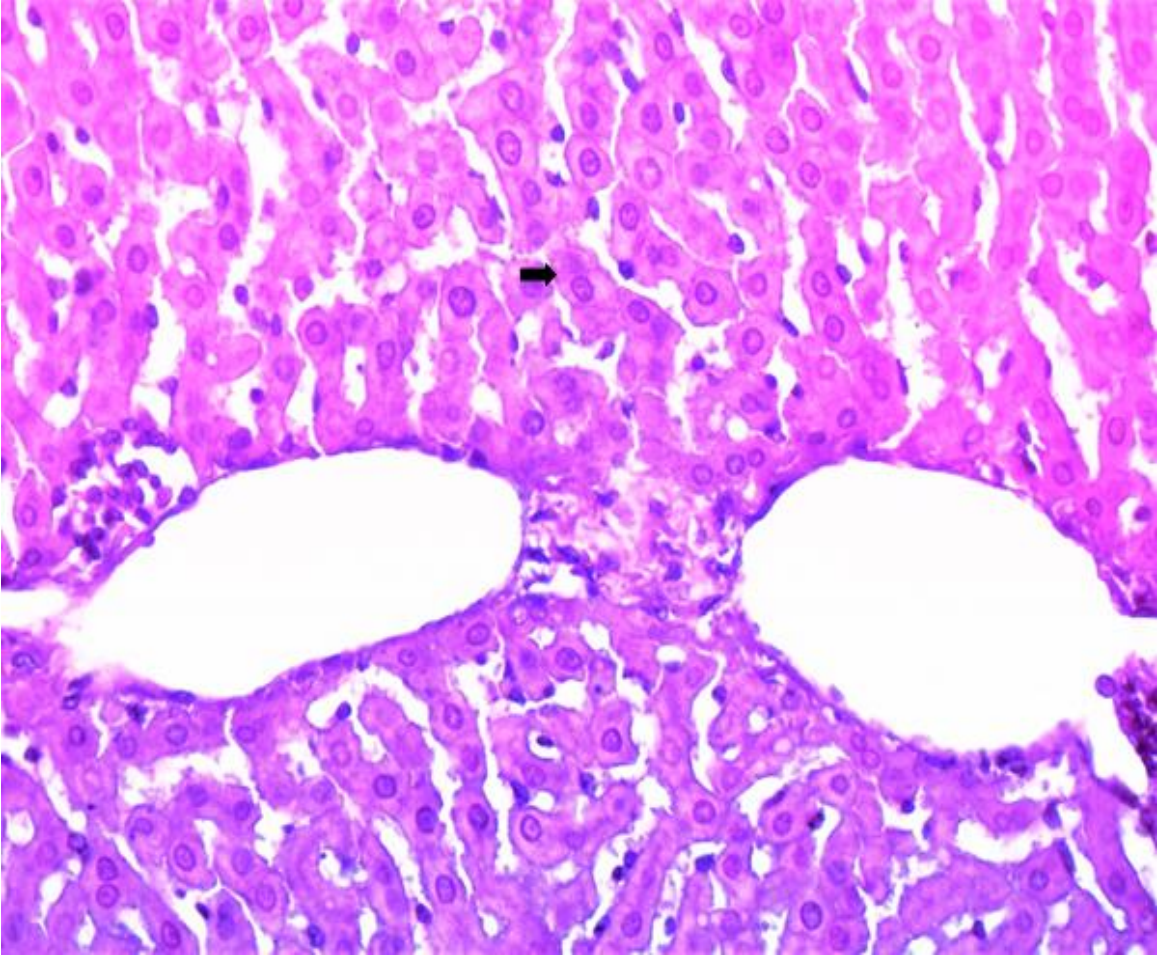
Şekil 6.27. KA kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (Masson trikrom X40)



Şekil 6.28. YKÇ kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. (Masson trikrom X40)



Şekil 6.29. KA kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Glikojen (↑) (PAS X40)



Şekil 6.30. YKÇ kontrol grubu ratlarda karaciğer dokusunun görünümü. Glikojen (↑) (PAS X40)

7. TARTIŞMA

Araştırmamızda YYYYK diyet verilen tüm ratlarda NASH modelinin oluştuğu; normal yem ile beslenen ratların tamamında ise histopatolojik olarak NASH tanısının dışlandığı gösterilmiştir. Bulgularımızda öncelikle diyetset ajan almayan, sadece normal yem ile beslenen kontrol grubu ile sadece YYYYK yem ile beslenen ve diyetset ajan almayan NASH model grubunu istatistiksel olarak karşılaştırarak modelimizin genel özelliklerini tanımayı ve NASH tablosunun araştırdığımız parametreler üzerine etkisini gözlemlemeyi amaçladık. Daha sonra hasta gruplarının tamamını birlikte ele alan karşılaştırmalar yaptık ve buradaki temel amacımız hasta gruplarında diyetet eklenen yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve farklı dozlardaki klorojenik asitin NASH gelişimini ve araştırdığımız parametreleri ne ölçüde etkilediğini ortaya koymaktı. Ayrıca kontrol gruplarını da kendi içinde karşılaştırıp yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve klorojenik asitin sağlıklı bireylerdeki olası etkilerini gözlemlemeyi amaçladık. Yaptığımız korelasyon analizleri ile dikarbonil stres yolağında görev alan bir enzim olan Glo-1 ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık. Ayrıca verilerimizin NAYKH aktivite skoru ile korelasyonlarını inceledik ve bu bilgiler ışığında NAYKH aktivitesinin serum parametreleri kullanılarak öngörülmesinde yararlı olabilecek bir regresyon modeli oluşturmayı hedefledik.

7.1. NASH Modelimizin Kontrol Grubundan Ayrılan Özellikleri ve NASH Tablosunun Araştırdığımız Parametrelere Etkisi

Kontrol grubu ve NASH model grubu antropometrik ölçümler açısından karşılaştırıldığında (Tablo 6.1); çalışmaya başlangıç vücut ağırlıkları açısından her iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Başlangıç ağırlıkları arasında farklılık olması sonuçları etkileyebileceğinden obezite ve NASH hayvan modeli çalışmalarında istenmeyen bir durumdur. Araştırmamızda bu durum dışlanmıştır.

Çalışma bitiminde sakrifikasyon öncesi ölçülen terminal vücut ağırlıkları incelendiğinde; NASH model grubunda terminal vücut ağırlığının ve 10 haftalık süre boyunca toplam kilo alımının anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Yüksek yağlı beslenme aynı zamanda obeziteyi tetikleyen bir faktör olduğundan model grubumuzda terminal vücut ağırlığının

ve kilo alımının yüksek olması beklenen bir durumdur (65). Sakrifikasyon sonrası karaciğerin total çıkarılması ile ölçülen karaciğer ağırlığının ve bu ağırlığın terminal vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen “terminal karaciğer ağırlığı/terminal vücut ağırlığı” oranının yine benzer şekilde NASH model grubunda yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Christensen vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada araştırmamızda kullandığımız aynı marka ve kodlu YYYYK yem ile NASH modeli geliştirilmiş ve 4 hafta sonunda ratların total karaciğer ağırlıklarının ve “terminal karaciğer ağırlığı/terminal vücut ağırlığı” oranının kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat arttığı gözlemlenmiştir (56). Bizim çalışmamızda bu artış oranları sürenin daha uzun olmasına bağlı daha yüksektir ve sonuçlarımız bu bulgularla uyumludur.

Kontrol ve NASH model grupları serum biyokimyasal parametreleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 6.2); serum glukoz, ALT, AST, trigliserid, total kolesterol, HDL-K, LDL-K, amilaz ve lipaz düzeylerinin NASH model grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). VLDL-K düzeyi de NASH model grubunda istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,01$). Böbrek fonksiyon test sonuçları (üre ve kreatinin) açısından ise iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.

NASH tablosu insülin direnci ve diyabet ile yakından ilişkili bir klinik tablodur (1). Ayrıca yüksek yağlı diyet insülin direncini tetikleyen önemli bir faktördür (66). Model grubumuzda glukoz düzeylerinin yüksek olmasının yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü beslenme ile tetiklenen insülin direncinin bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Model grubumuzda gelişen steatohepatit tablosunda hepatosit hücre hasarına bağlı olarak ALT ve AST değerleri de kontrol grubuna göre yüksek izlenmiştir. Ayrıca model grubumuzda trigliserid, total kolesterol, LDL-K, VLDL-K gibi lipid profili parametrelerindeki yüksekliğin hem yüksek yağlı beslenmenin hem de zamanla gelişen insülin direncinin ortak sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Christensen vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada da aynı tür YYYYK yem kullanılmış ve lipid profili parametrelerinin NASH grubunda benzer şekilde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (56).

Pankreas lipotoksisteden önemli ölçüde etkilenen organlardan biridir (67). Model grubumuzda yükselen amilaz ve lipaz düzeyleri yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü diyet sonucu gelişen lipotoksiste tablosundan pankreasın da etkilendiğini göstermektedir.

Kontrol ve NASH model grupları serum Glo-1 ve serum oksidatif stres parametreleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 6.3); NASH model grubunda serum Glo-1 düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Glo-1 dikarbonil bileşikler arasından

fizyolojik şartlarda organizmada en fazla oluşan MG'yi detoksifiye ederek dikarbonil stresin azaltılmasında görev alan bir enzimdir (33). NAYKH hastalarında artan dikarbonil stresin yağlanmanın şiddetini arttırdığı bilinmektedir ancak Glo-1'in NAYKH patogenezindeki rolü halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (11). Yaptığımız literatür taramasında NAYKH hastalarında serum Glo-1 düzeylerini analiz eden çalışmaya rastlanmamıştır. Spanos vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada Apo E defektli farelerde yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü beslenmenin karaciğerde Glo-1 downregülasyonuna yol açtığı bildirilmektedir ancak burada serum Glo-1 düzeylerine ilişkin bilgi verilmemesinin yanısıra çalışma Apo E defektli farelerde gerçekleştirildiğinden bizim modelimizden farklılık göstermektedir (11). Rat obezite modellerindeki Glo-1 düzeyleri açısından literatür incelendiğinde ise yüksek yağlı beslenmenin Glo-1 seviyelerini arttırdığını ve azalttığını ifade eden çelişkili sonuçlar görmek mümkündür (12). Bu sonuçlar neticesinde literatürde NAYKH hastalığında serum Glo-1 düzeylerini analiz eden çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Biz çalışmamızda artan serum Glo-1 düzeylerinin NAYKH hastalığında artan dikarbonil stresle başa çıkmak için organizmanın bir yanıtı olabileceğini düşünmekteyiz. Nitekim Rabbani ve Thornalley (2018) diyabet ve obezitede Glo-1'in düzenlenmesini inceledikleri çalışmalarında obez bireylerde artmış Glo-1 sentezinin obezitenin olumsuz sağlık getirilerini hafifletmede yararlı olabileceğinden bahsetmektedirler (12).

NASH model grubunda serum katalaz ($P<0,05$), MDA ($p<0,001$) ve SOD ($p<0,001$) seviyelerinin ise anlamlı ölçüde düşük olduğu dikkat çekmektedir. Serum GPO açısından her iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Literatürde NAYKH hastalarında serum oksidatif stres parametrelerini değerlendiren çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Swiderska vd. (2019) tarafından NAYKH hastalarında yapılan bir çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde hasta grubunda kontrol grubuna göre serum katalaz düzeylerinin düşük olduğu bildirilmektedir (68). Ancak bu çalışmada erken NAYKH hastalarında kontrol grubuna göre serum SOD ve GPO aktivitelerinin yükseldiği hastalık ilerledikçe ise seviyelerin düştüğü görülmektedir (68). Bizim çalışmamızda serum SOD aktivitelerinin düşmesi ve GPO aktivitesinin kontrol grubuna yaklaşmasının ileri hastalık evresinin bir sonucu olabileceğini düşünmekteyiz. Stiuso vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise NAYKH hastaları ve kontrol grupları arasında oksidatif stres parametreleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır ve bu durum örneklem boyutunun küçüklüğünün yanısıra değişkenlerin artmış bireyler arası varyasyonuna bağlanmıştır (69). Chen vd. (2020) tarafından kaleme alınan bir derlemede NAYKH'da serum SOD düzeylerinin azaldığı

veya arttığı farklı çalışmalardan bahsedilmektedir (70). Aynı çalışmada NASH tablosunda serum MDA'nın kontrol guruplarına göre anlamlı değişiklik göstermediği bildirilmiştir (70). Literatürdeki bu farklı bulguların hastaların değerlendirildiği dönemdeki hastalık evresi ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü organizmada oksidatif stresin doğası gereği başlangıçta antioksidan savunma sistemi uyarılarak antioksidan enzim düzeyleri artarken; oksidan maddelerin miktarı arttıkça ve süreç uzadıkça antioksidan sistem transkripsiyon faktörlerindeki düzenlemelerin de etkisiyle antioksidan sistem enzimleri azalmakta ve hastalık tablosu daha da ilerlemektedir (71).

NASH model grubunda karaciğer oksidatif stres parametrelerinden MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu dikkat çekmektedir ($p=0,001$). Karaciğer GPO, katalaz, SOD düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.4). MDA lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan ve NAYKH'da ileri fibrozis ile ilişkili bir oksidatif stres belirtecidir (72). Chen vd. (2020) tarafından kaleme alınan ve oksidatif stresin NAYKH'daki rolünü araştıran bir derlemede bulgularımızla uyumlu bir şekilde NAYKH'da karaciğer MDA düzeylerinin yükseldiği bildirilmektedir (70). NAYKH temelde bir lipid metabolizması bozukluğu olduğundan ve hastalığı tetikleyen en önemli faktör karaciğerde artan lipid yükü olduğundan; karaciğerde bir lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA'nın diğer karaciğer oksidatif parametrelerine nazaran ön plana çıkmış olması dikkate değerdir. Araştırmamızda ayrıca model grubunda karaciğer MDA düzeyi kontrol gurubuna göre bu denli yüksekken serum MDA düzeyinin kontrol grubuna göre neden düşük seyrettiğini araştırdığımızda; literatürde ileri evre NAYKH hastalarında serumda anti-MDA antikörlerin varlığından bahsedildiğini gördük (72). İleri evre hastalıkta MDA'ya karşı gelişen bu immün yanıtın serum MDA düzeylerini interfere ederek düşük ölçüm sonuçlarına yol açabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla serum MDA düzeylerini ve Anti-MDA'nın etkisini birlikte ele alan çalışmalara ihtiyaç vardır.

NAYKH karaciğer dışındaki diğer doku ve organları etkileyen multisistemik bir hastalıktır ve NAYKH'ye bağlı diğer organ tutulumları arasında prognostik açıdan en önemli olan kardiyak tutulup olup; NAYKH'ye bağlı ölümlerin büyük kısmının kardiyovasküler hastalığa bağlı olduğu bildirilmektedir (6). Bu nedenle araştırmamızda karaciğerde değerlendirdiğimiz parametrelerin aynı zamanda kalp düzeylerini de değerlendirmeyi amaçladık. Kontrol ve model grupları kalp GPO düzeyleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir. Kalp katalaz, MDA ve SOD düzeyleri ise NASH model grubunda kontrol grubuna göre anlamlı

ölçüde yüksektir (p değerleri sırasıyla: $p=0,001$, $p<0,05$, $p<0,05$). Yaptığımız literatür taramasında NAYKH hastalarında kalp dokusunda oksidatif stres parametrelerini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde bu alanda çalışmalara ihtiyaç vardır. Araştırmamızda NAYKH'da kalp dokusunun da oksidatif streten etkilendiği ve oksidatif strese yanıt olarak katalaz ve SOD gibi antioksidan enzim düzeylerinin arttığı, GPO'nun ise anlamlı ölçüde etkilenmediği görülmektedir. Karaciğere benzer şekilde kalp dokusunda da MDA düzeylerinin yükselmiş olması kardiyak yağlanma ve artmış lipid peroksidasyonuna işaret edebileceğinden özellikle önem arz etmektedir.

Normal bir karaciğerde hepatositler, sinüzoidal endotelyal hücreler ve hepatik lipositler (ito hücreleri, stellat hücre) kollajen sentezleyebilmektedirler ancak kollajenin büyük çoğunluğu ito hücreleri sentezlemektedir (73). Karaciğer toksik maddelere maruz kaldığında ito hücrelerinin uyarılması ile fibrozis süreci başlamaktadır (74). Karaciğer fibrozisinin hakim olduğu patolojik durumlarda ito hücreleri fenotipik değişimler göstererek miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşmektedirler (75). Prokollajen-III N-terminal peptid (PIIINP); prokollajen-III'ün enzimatik yıkım ile tip III kollajene dönüşümü sırasında açığa çıkan bir yan üründür ve karaciğer fibrozisi için önemli bir belirteçdir (5). Yaptığımız literatür taramasında NAYKH'da karaciğer PIIINP düzeylerini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak PIIINP'nin serum düzeylerinin NAYKH hastalarında kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (8, 76). Tip III kollajen aynı zamanda kardiyak fibroziste rol oynayan kollajen tiplerinden biridir ve serum PIIINP düzeylerinin kardiyak patolojilerde de yükseldiği bildirilmektedir (7). Literatürde aynı zamanda plazma PIIINP düzeylerinin rat miyokardit modellerinde de yükseldiği bildirilmektedir (77). Lipid metabolizmasındaki disfonksiyon NAYKH'yı kardiyovasküler hastalıklara bağlayan önemli bir faktördür ve NAYKH'da karaciğer dışında etkilenen majör organlardan biri de kalptir (78). Tüm bu nedenlerle araştırmamızda NAYKH'da serumda yükselen PIIINP'nin olası kaynakları olabilecek olan kalp ve karaciğerin PIIINP düzeylerini birlikte ele almayı amaçladık.

Kontrol ve NASH model grupları karaciğer PIIINP düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; model grubunda PIIINP düzeylerinin anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Karaciğer fibrozisinin hakim olduğu patolojik durumlarda kollajenin ana kaynağı olan ito hücrelerinin fenotipik değişimler göstererek miyofibroblast benzeri hücrelere dönüştüğü bilinmektedir (75). Araştırmamızda karaciğerde kollajen sentezinin majör kaynağı olan ito hücrelerinin bu karakter değişiminin; NASH grubunda karaciğerde PIIINP sentezinin

azalmasında önemli bir mekanizma olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak literatürde bu tablonun açıklığa kavuşması için farklı çalışmalara ihtiyaç söz konusudur.

Kontrol ve NASH model grupları kalp PIIINP düzeyleri açısından karşılaştırıldığında ise NASH grubunda PIIINP ortalamasının yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir. Bu durum örneklem boyutunun küçük olması ve/veya kalp PIIINP düzeylerinin bireyler arası varyasyonunun yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. NASH model grubunda karaciğer PIIINP düzeyleri kontrol grubuna göre düşük saptandığından kalp dokusu serum PIIINP için önemli bir kaynak teşkil ediyor olabilir. Ancak literatürde NAYKH'da kalp PIIINP düzeylerini araştıran bir çalışmaya rastlamadığımızdan ve kalp PIIINP düzeylerinin bireyler arası varyasyonu yüksek olduğundan bu alanda daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

7.2. Klorojenik Asit ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktının NAYKH Aktivite Skoru ve Araştırdığımız Diğer Parametrelere Etkisi

Başlangıç vücut ağırlığı açısından NASH model grubu ve YYYYK-YKÇ, YYYYK-KA50 ve YYYYK-KA10 grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı izlenmiştir. Çalışmanın bitiminde ölçülen terminal vücut ağırlığı, terminal karaciğer ağırlığı, terminal karaciğer ağırlığı/terminal vücut ağırlığı oranı ve kilo alımı açısından NASH model grubu ile yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.7). Farklı bir çalışmada yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit takviyesinin vücut ağırlığını ve vücut kitle indeksini (VKİ) azalttığı ve bu etkinin özellikle $VKİ \geq 25$ kg/m² olan bireylerde daha belirgin olduğu gösterilmiştir (36). Araştırmamızda ratlar çalışmaya normal vücut ağırlığı ile başladıklarından yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asit kullanımı ile kilo alımında anlamlı azalma izlenmemiş olabilir.

Serum total kolesterol, HDL-K ve LDL-K açısından NASH model grubu ile yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Serum glukoz konsantrasyonu NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p < 0,05$; $p = 0,001$; $p = 0,01$). Literatürde yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve klorojenik asitin insülin direncini azalttığı ve hipoglisemik etki gösterdiği belirtilmektedir (25, 29).

Çalışmamızda klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeğinin hipoglisemik etkisi gözlenmiş olup bu etki açısından klorojenik asitin farklı dozları ya da yeşil kahve çekirdeği ile klorojenik asit arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.8).

Serum trigliserid ve VLDL-K konsantrasyonları NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p=0,001$; $p<0,01$; $p<0,05$). Klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı hipolipidemik etki gösteren diyetel ajanlardır. Pankreatik lipaz inhibisyonu ve yağ asidi sentezinin inhibisyonu klorojenik asitin lipid düşürücü etkileri arasında sayılabilir (28). Ayrıca yeşil kahve çekirdeğinin lipid absorpsiyonunu azalttığı bilinmektedir (25). Araştırmamızda hem yeşil kahve çekirdeği hem de klorojenik asit NASH hastalığında hipolipidemik etki göstermiş olup bu etki açısından klorojenik asitin farklı dozları ya da yeşil kahve çekirdeği ile klorojenik asit arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.8).

Serum üre, kreatinin ve lipaz düzeyleri açısından NASH model grubu ile yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.9). Serum ALT ve AST düzeylerinin ortalamasının NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplara nazaran düşük olduğu dikkat çekmektedir. NASH model grubunda serum ALT ve AST düzeyleri özellikle 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük izlenmiştir (ALT için sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$; AST için sırasıyla $p=0,01$, $p<0,05$). Kronik hepatosellüler hasarda AST ve ALT başlangıçta yükselirken fibrozis ilerledikçe düşüşe geçer (79). Araştırmamızda histopatolojik değerlendirme sonucunda hesaplanan NAYKH aktivite skorlarına bakıldığında NASH model grubumuzda hastalık aktivite skorunun yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asit verilen gruplara göre yüksek olduğu dikkat çekmektedir (Tablo 6.13). Yüksek yağlı diyet ile eş zamanlı verdiğimiz klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı hastalık aktivitesini azalttığından ve NASH model grubu siroza daha yakın ileri bir aşamada olduğundan ALT ve AST aktivitelerinin düşüş trendine geçiş yaptığını ve bu nedenle model grubumuzda düşük izlendiğini düşünmekteyiz. ALT ve AST'nin kronik karaciğer hasarına yanıtta başlangıçta yükselip ileri hastalık evresinde düşüşe geçmesi bu iki değerli transaminazın NAYKH hastalarında prognostik anlamda ve tedavi yanıtının izleminde kullanımını sınırlamaktadır ve bu nedenle özellikle ileri hastalık evrelerinin erken tanınmasında yol gösterici olabilecek yeni serum parametrelerine ihtiyaç vardır.

Serum amilaz düzeyleri incelendiğinde NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,001$; $p<0,05$). 50 mg/kg klorojenik asit verilen grupta serum amilaz düzeyi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$) (Tablo 6.9). Hiperlipideminin pankreatit gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (80). NAYKH'da lipotoksisteden büyük oranda etkilenen organlardan biri de pankreasır. Araştırmamızda NASH tablosunda kontrol grubuna göre pankreas enzimlerinin yükseldiğini ve klorojenik asit veya yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilmesi ile amilaz düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir. Ek olarak özellikle yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verildiğinde amilaz düşürücü etki ön plana çıkmaktadır. Literatürde NAYKH'da yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asitin pankreas koruyucu etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlamadığımızdan bu bulguların yeni çalışmalara ışık tutması açısından önem arz ettiğini düşünmekteyiz.

Serum Glo-1 düzeyleri 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta NASH model grubuna göre anlamlı derece yüksektir ($p<0,05$) (Tablo 6.10). Glo-1 dikarbonil bileşikler arasında fizyolojik şartlarda organizmada en fazla oluşan MG'yi detoksifiye ederek dikarbonil stresin azaltılmasında görev alan bir enzimdir (33). Ayrıca Rabbani ve Thornalley (2018) diyabet ve obezitede Glo-1'in düzenlenmesini inceledikleri çalışmalarında obez bireylerde artmış Glo-1 sentezinin obezitenin olumsuz sağlık getirilerini hafifletmede yararlı olabileceğinden bahsetmektedirler (12). Araştırmamızda NASH model grubunda kontrol grubuna göre serum Glo-1 seviyelerinin arttığından ve bu durumun dikarbonil stresi azaltmakta yararlı bir mekanizma olabileceğinden bahsetmiştik. Özellikle 10 mg/kg dozda verilen klorojenik asitin Glo-1 seviyelerini hasta grupta anlamlı derecede yükseltmesi bu anlamla dikkate değer bir bulgudur. Serum Glo-1 seviyelerini arttırmada klorojenik asitin yeşil kahve çekirdeğine nazaran daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız literatür taramasında yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin serum Glo-1 düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamış olduğundan bu bulguların literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Serum GPO ve katalaz düzeyleri açısından NASH model grubu ile yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir (Tablo 6.10). Serum MDA düzeyleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşüktür (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$). Tablo 6.11 incelendiğinde karaciğer MDA düzeylerinin de yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asit verilen

gruplarda düşük olduğu görülmektedir. Araştırmamızda yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve klorojenik asitin NASH'te karaciğer MDA düzeylerini azaltması serum MDA düzeylerinin düşüşüne katkı sağlamış olabilir.

Serum SOD düzeyi 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta NASH model grubuna ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,01$). Literatürde klorojenik asitin serum antioksidan enzim seviyelerine etkisini inceleyen çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Du vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ratlara intravenöz yolla yüksek doz klorojenik asit verildiğinde serum SOD ve katalaz aktivitelerinin azaldığı izlenmiştir (50). Bizim bulgularımızdan farklılık göstermesi bu çalışmada klorojenik asitin intravenöz yolla ve yüksek dozda verilmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Wang vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada ise ratlarda oluşturulan miyokardiyal infarktüs modelinde 100 mg/kg klorojenik asit verilmesinin plazma SOD ve katalaz seviyelerini arttırdığı bildirilmektedir ancak bu çalışma da miyokardit modeli olması nedeniyle çalışmamızdan farklılık göstermektedir (53).

Karaciğer PIIINP düzeyi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$) (Tablo 6.11). Araştırmamızda NASH model grubunda karaciğer PIIINP düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğunu gözlemlemiştik. Verdiğimiz klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının hastalığın histolojik aktivitesini azaltmasının yanısıra karaciğerin PIIINP düzeyini arttırmaları dikkate değerdir. Ancak literatürde bu alanda yeterince çalışma yoktur. Bu bulguların geçerliliğinin artması için farklı çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

Karaciğer GPO düzeyleri açısından NASH model grubu ile yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Karaciğer katalaz aktivitesi 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde düşüktür (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). Karaciğer MDA düzeyleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak izlenmiştir ($p<0,001$). Ancak karaciğer MDA düzeyleri 50 mg/kg klorojenik asit verilen grupta yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,01$). Karaciğer SOD aktivitesi incelendiğinde ise NASH model grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı bir yükseklik söz konusu olduğu görülmektedir (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$, $p=0,001$). Baeza vd.

(2014) tarafından yapılan bir çalışmada yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve klorojenik asitin karaciğer hücrelerinde reaktif oksijen türlerini azalttığı izlenmiştir (42). Bu çalışmada ek olarak yeşil kahve çekirdeği ekstraktının karaciğerde malondialdehit (MDA) oluşumunu azalttığı bildirilmektedir ve bu bulgu bizim çalışmamız ile uyumludur (42). Nogaim vd. (2020) tarafından ratlarda yapılan bir çalışmada ise yeşil kahvenin karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini arttırdığı; MDA düzeylerini ise azalttığı bildirilmektedir ancak bu çalışmada okratoksin A ile karaciğerde oksidatif stres indüklenmesi söz konusu olduğundan ve daha kısa süreli etki incelendiğinden araştırmamızdan farklılık göstermektedir (43). Liang vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise yüksek yağlı diyet ile ratlarda NAYKH modeli oluşturulmuş ve 90 mg/kg/gün dozunda verilen klorojenik asitin karaciğer MDA düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığı; karaciğer SOD aktivitesini ise arttırdığı gösterilmiştir (46). Ancak bu çalışmanın süresi 4 hafta olup bizim araştırmamızın süresinden kısadır. Araştırmamızda 10 haftalık sürede daha ileri evre hastalık tablosu olduğundan bulguların farklılık arz ettiğini düşünmekteyiz.

Kalp PIIINP düzeyleri açısından NASH model grubu ile yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asit alan gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Ancak kalp PIIINP ortalamalarının yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit verilen gruplarda daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum örneklem boyutunun küçük olması ve/veya kalp PIIINP düzeylerinin bireyler arası varyasyonunun yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. Literatürde bu alanda yeterince çalışma bulunmadığından yeni çalışmalara ihtiyaç söz konusudur.

Kalp GPO ve katalaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. 50 mg/kg klorojenik asit verilen grupta kalp MDA düzeyi NASH model ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı ölçüde düşüktür ($p<0,05$). NASH model grubunda kalp SOD aktivitesi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit alan gruplara göre anlamlı derecede yüksek izlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,05$). Ayrıca 50 mg/kg klorojenik asit alan grupta kalp SOD aktiviteleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Agunloye vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada ratlarda siklosporinle indüklenen bir hipertansiyon modelinde; 10 ve 15 mg/kg dozlarda verilen klorojenik asitin kalp ve plazma MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (52). Araştırmamızda bu çalışmadan farklı olarak 10 mg/kg dozda klorojenik asitle kalp MDA düzeyinde anlamlı azalma olmazken 50 mg/kg klorojenik asit kullanımı ile kalp MDA düzeyleri anlamlı ölçüde azalmıştır. Wang vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada ise ratlarda oluşturulan miyokardiyal

infarktüs modelinde 100 mg/kg klorojenik asit verilmesinin plazma SOD ve katalaz seviyelerini arttırdığı bildirilmektedir (53). Ancak araştırmamız rat NASH modelinde gerçekleştirildiğinden bu çalışmadan farklılık göstermektedir.

NAYKH aktivite skorları incelendiğinde toplam skorun yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 50 mg/kg klorojenik asit alan gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu izlenmektedir (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$). Steatozis ve fibrozis skorları açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir. İnflamasyon skorunun 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Karaciğer hücre hasarı skoru ve diğer bulgular skorunun yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu dikkat çekmektedir (karaciğer hücre hasarı skoru için sırasıyla $p=0,001$, $p<0,001$, $p=0,001$; diğer bulgular skoru için her birinde $p<0,001$).

Araştırmamızda deney gruplarından NASH model grubuna 10 hafta süresince sadece YYYYK yem verilirken; YYYYK-YKÇ, YYYYK-KA50 ve YYYYK-KA10 gruplarına eş zamanlı olarak sırasıyla %50 klorojenik asite standardize edilmiş 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktı, 10 mg/kg klorojenik asit ve 50 mg/kg klorojenik asit verilerek NASH gelişiminde hastalık aktivitesine nasıl etki edeceklerinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. NAYKH aktivite skorları incelendiğinde özellikle yeşil kahve çekirdeği ekstraktı alan ve 50 mg/kg dozda klorojenik asit alan grupta hastalığın aktivite skoru anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Bu bulgular koruyucu hekimlik alanında diyetsetel ajanlarla NASH aktivitesini azaltmak hedeflendiğinde yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ya da 50 mg/kg klorojenik asit kullanımının daha yararlı olabileceğine dikkat çekmektedir. Araştırmamızda kullandığımız 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktı da %50 oranında klorojenik asit içerdiğinden 10 mg/kg klorojenik asit içermektedir. Ancak tek başına 10 mg/kg klorojenik asit alımında aktivite skorunda anlamlı değişiklik izlenmemiştir. Yeşil kahve çekirdeği klorojenik asit dışında çok farklı sayıda polifenol grubu bileşik içermektedir. Bu bulgular yeşil kahve çekirdeğinin içeriğinde yer alan diğer polifenollerin NASH aktivitesini azaltmada klorojenik asitin etkisini potansiyelize ettiğini desteklemektedir. Araştırmamızda ayrıca hem 10 mg/kg klorojenik asit alımının hem de 50 mg/kg klorojenik asit alımının karaciğer inflamasyon skorunu anlamlı ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı kullanımında inflamasyon skoru NASH model grubuna göre ortalama olarak düşük olsa da istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermemiştir.

Bu bulgular klorojenik asitin NASH patogenezinde antiinflamatuvar etkisinin yeşil kahve çekirdeğine nazaran daha ön planda olduğuna işaret etmektedir.

Dickson vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada kahve tüketiminin Tip 2 DM riskini ve NAYKH karaciğer yağlanma skorunu azalttığı gösterilmiştir ancak burada bahsedilen skora sistemi görüntüleme yöntemi ve serum belirteçlerinden oluşmakta olup araştırmamızdaki skora sistemi histopatolojik incelemelere dayanmaktadır (37). Araştırmamızda Kleiner vd. (2005) tarafından geliştirilen son derece detaylı ve çok sayıda parametre içeren bir histolojik skora sistemi kullanılmıştır (64). Literatür taramamızda yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin NASH gelişiminde histopatolojik aktivite skoruna etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamış olup araştırmamızın bu alanda diğer çalışmalar açısından yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

7.3. Klorojenik Asit ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktının Standart Yemle Beslenen Sağlıklı Ratlara Etkisi

Başlangıç vücut ağırlığı, terminal vücut ağırlığı ve kilo alımı açısından sadece standart rat yemi alan kontrol, standart rat yemi ile 10 mg/kg klorojenik asit alan KA kontrol ve standart rat yemi ile 20 mg/kg %50 klorojenik asite standardize edilmiş yeşil kahve çekirdeği ekstraktı alan YKÇ kontrol grupları arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.14). Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna göre terminal karaciğer ağırlığı ve terminal KC ağırlığı/terminal vücut ağırlığı oranları anlamlı ölçüde yüksektir (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,01$). Yaptığımız literatür taramasında yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı ratlarda veya sağlıklı insanlarda karaciğer ağırlığına etkisine ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır.

Serum HDL-K, trigliserid ve VLDL-K düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.15). 10 mg/kg klorojenik asit verilen ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruplarda kontrol grubuna göre serum glukoz, total kolesterol, LDL-K değerleri anlamlı derecede yüksek olarak izlenmiştir (glukoz için sırasıyla $p<0,01$, $p=0,01$; total kolesterol için sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$; LDL-K için sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$). Literatürde yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı bireylerdeki etkisini araştıran çok sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır. Suzuki vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada klorojenik asitten zengin yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı erkeklerde damar sertliği ile ilişkisi araştırılmış olup bu

çalışmada 2 haftalık süre ile verilen yeşil kahve çekirdeği ekstraktının kan glukoz, total kolesterol, LDL seviyelerini anlamlı değiştirmedeği görülmüştür (81). Literatürde yeşil kahve çekirdeği ekstraktının etkileri daha çok fazla kilolu/obez hastalarda, dislipidemik hastalarda veya NAYKH hastalarında araştırılmış olup sağlıklı bireylerdeki etkilerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Serum AST, kreatinin, lipaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.16). Serum ALT, üre ve amilaz düzeyleri ise yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla $p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,001$). Ayrıca yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta amilaz düzeyleri 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruba göre de anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p=0,01$). Suzuki vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada 2 hafta süreyle verilen yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı erkeklerde serum ALT ve AST düzeylerini anlamlı ölçüde değiştirmedeği bildirilmektedir (81). Ancak insan hayatında 2 haftalık süre daha çok kısa süreli bir etkiyi ortaya koymaya yönelik olup klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı bireylerdeki daha uzun süreli etkilerini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır.

Serum GPO ve katalaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 6.17). Serum Glo-1, MDA ve SOD seviyeleri yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptanmıştır (sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,05$). Ayrıca serum SOD düzeyi 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p < 0,01$). Literatürde yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı bireylerde serum Glo-1 ve oksidatif stres parametrelerine etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır.

Karaciğer PIIINP düzeyi yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen grupta kontrol grubuna ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruba göre anlamlı derecede düşüktür (sırasıyla $p < 0,001$; $p < 0,05$). Araştırmamızda hasta grupta da karaciğer PIIINP düzeyleri kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır. Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı ratlarda PIIINP düzeyini hasta gruba benzer yönde etkilemesi dikkat çekicidir.

Karaciğer GPO ve MDA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Karaciğer katalaz aktivitesi 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta kontrol grubuna ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı ölçüde yüksektir (sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,001$). Karaciğer SOD aktivitelerinin ise kontrol grubunda yeşil kahve çekirdeği

ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu izlenmiştir (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$). Baeza vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada yeşil kahve çekirdeği ekstraktının karaciğer kültür hücrelerinde oksidatif stresin etkilerini azalttığı kafeinin ise anlamlı etkisinin olmadığı gözlenmiştir (42). Ancak bu çalışma hücre kültürü çalışması olması nedeniyle sağlıklı popülasyona ait bireyleri yeterince temsil edemeyebilir. Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asitin sağlıklı bireylerdeki karaciğer oksidatif stresine etkisine yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kalp PIIINP, MDA ve SOD düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Kalp GPO aktivitesi kontrol grubunda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 10 mg/kg klorojenik asit verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$). Kalp katalaz aktivitesi ise 10 mg/kg klorojenik asit verilen grupta kontrol grubuna ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olarak izlenmiştir (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,001$).

Sağlıklı ratlarda 10 mg/kg klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının kontrol grubuna göre serum glukoz, total kolesterol, LDL-K'ü arttırması ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının üre, ALT ve amilaz düzeylerini arttırması ilginç bulgularımız arasındadır. Bu bulgular klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının sağlıklı bireylerde hasta bireylerden farklı yönde etki gösterebileceğini desteklemektedir. Literatürde bu ajanların etkileri sıklıkla hasta gruplarında tedavi edici/önleyici etkinlik şeklinde araştırılmış olup sağlıklı bireylerdeki olası yan etkilere yönelik yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu ajanlar doğal diyetel ajanlar olarak kabul edildiğinden bir hekim tarafından reçete edilmeden sağlıklı bireyler tarafından da ulaşım ve kullanıma açık ajanlardır. Araştırmamızın bulguları bu ajanların sağlıklı bireylerde farklı etkileri olabileceğine dolayısı ile bu ajanların bir hekim gözetiminde kullanılmasının daha doğru olacağına da dikkat çekmektedir.

Araştırmamızda klorojenik asitin hem kalp hem de karaciğer katalaz aktivitesini arttırması dikkat çekicidir. Ayrıca hem tek başına klorojenik asit hem de yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilmesi serum ve karaciğer SOD aktivitelerini baskılamıştır. Ek olarak yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit her ikisi de kalpte GPO aktivitelerini baskılamışlardır. Bu sonuçlarda yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin sağlıklı bireylerde farklı antioksidan enzimleri farklı yönde etkileyebileceği görülmektedir.

Polifenol grubu bileşikler yağda çözünür olduklarından yüksek yağlı diyet alan bireylerde bahsi geçen ajanların kana geçişi ve biyoyaralanımı daha fazla olabilir. Normal diyet alan bireylerde ise aksine biyoyaralanım az olabileceği gibi bağırsaklarda uzamış etki söz konusu

olabilir. Yeşil kahve çekirdeği polifenollerden zengin bir karışımdır ve klorojenik asit de yeşil kahve çekirdeğinin içeriğinde yer alan polifenol grubu bileşiklerdendir. Polifenol grubu bileşiklerin serbest hidroksil grupları ile metalleri, reaktif oksijen türlerini, serbest radikalleri bağlayabildiği bilinmektedir (25). Dolayısıyla bu bileşiklerin bağırsakta uzamış etkileri söz konusu olduğunda besinlerde yer alan eser elementlerin emilimini ne ölçüde etkileyecekleri önemlidir. Dashti vd. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada ratlara bakırdan fakir diyet verildiğinde karaciğer SOD aktivitelerinin azaldığı gözlemlenmiştir (82). Çünkü bakır SOD'nin aktivite gösterebilmesi için gerekli olan bir kofaktördür. Sonuç olarak antioksidan enzimlerin aktivitesi kofaktör eksikliğinden de etkilenebilmektedir dolayısıyla hasta ve sağlıklı bireylerde yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin biyoyararlanımını ve bağırsaklarda eser elementlerin emilimini ne ölçüde etkilediğini araştıran çalışmalara da ihtiyaç vardır.

7.4. Dikarbonil Stres ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki

Glo-1 dikarbonil bileşikler arasından fizyolojik şartlarda organizmada en fazla oluşan MG'yi detoksifiye ederek dikarbonil stresin azaltılmasında görev alan bir enzimdir (33). Oksidatif stres ve dikarbonil stres birbirinden farklı yollarla oluşmasına rağmen oksidatif streste artış GSH (glutatyon) azalmasına bağlı olarak dikarbonil stresin artışına neden olabilmektedir (33). Çünkü GSH her iki yolak için ortak bileşiktir. Ayrıca yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü diyetle beslenme hem oksidatif stres hem de dikarbonil stres için önemli bir tetikleyicidir (83, 84).

Araştırmamızda dikarbonil stres yolağının önemli enzimlerinde Glo-1 ile oksidatif stres parametrelerimiz arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yaptığımız korelasyon analizlerinin sonuçları incelendiğinde (Tablo 6.20); kontrol gruplarında sadece serum MDA düzeyi ile serum Glo-1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon izlenmiştir ($R = 0,502$ $p = 0,01$). NASH gruplarında ise karaciğer katalaz ve karaciğer SOD aktiviteleri ile serum Glo-1 düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır (sırasıyla $R = -0,405$ $p = 0,02$; $R = -0,357$ $p = 0,04$). Bu bulgular sağlıklı bireylerde oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olan serum MDA düzeyleri arttıkça serum Glo-1 aktivitesinin de arttığını; NASH hastalarında ise serum Glo-1 düzeylerinin daha çok karaciğerdeki antioksidan enzimler ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Karaciğerde katalaz ve SOD aktiviteleri arttıkça serum Glo-1 azalmaktadır. Karaciğer antioksidan enzim

düzeyleri ile serum Glo-1 arasında ters yönlü bir ilişki olduğu görülmektedir. Karaciğerde antioksidan savunma arttıkça oksidatif streste azalmaya bağlı Glo-1 düzeylerinin azalmış olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü oksidatif stres azaldıkça her iki yolak için ortak bileşik olan GSH'nın tüketimi azalacak ve durum dikarbonil stresin azalmasıyla sonuçlanacaktır. Literatürde NAYKH'da dikarbonil stres ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran yeterince çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamızın bu alanda literatüre katkı sağlayacağını umut etmekteyiz.

7.5. NAYKH Aktivitesi ile İlişkili Parametrelerin İncelenmesi ve NAYKH Aktivitesini Öngörmede İstatistiksel Açıdan Anlamlı Bir Regresyon Modelinin Oluşturulması

NAYKH tanısında kabul gören altın standart yöntem karaciğer biyopsisidir (17). Karaciğer biyopsisi hastaların taranması için uygun olmayan riskli bir girişimsel işlemdir ve bu nedenle NAYKH'da hastalarının taranmasında, takibinde ve tedavi yanıtlarının izleminde kullanılabilecek non-invazif serum parametrelerine ihtiyaç söz konusudur.

Araştırmamızda NAYKH aktivite skoru daha yüksek olmasına rağmen NASH model grubumuzda; diyetel ajan alan ve NAYKH aktivitesi daha düşük gruplara göre ALT ve AST düzeylerinin daha düşük olduğunu gözlemlenmiştir. ALT ve AST'nin kronik karaciğer hasarına yanıtta başlangıçta yükselip hastalık siroza doğru ilerledikçe düşüşe geçmesi bu iki değerli transaminazın NAYKH hastalarında prognostik anlamda ve tedavi yanıtının izleminde kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle özellikle ileri hastalık evrelerinin erken tanınmasında yol gösterici olabilecek yeni serum parametrelerine ihtiyaç olduğu dikkat çekmektedir.

Araştırmamızda öncelikle NAYKH aktivite skorunun hastaların non-invazif olarak değerlendirilmelerinde kullanılabilecek vücut ağırlığı gibi ölçümler ve araştırdığımız serum parametreleri ile ilişkisini inceledik.

Korelasyon verilerimiz incelendiğinde antropometrik ölçümlerden sadece kilo alımı ile NAYKH aktivite skoru arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu görülmektedir ($R= 0,420$ $p= 0,02$) (Tablo 6.21).

Tablo 6.22 incelendiğinde ise serum Glo-1 düzeyi ile NAYKH aktivite skoru arasında negatif korelasyon izlenirken; serum MDA ile NAYKH aktivite skoru arasında pozitif korelasyon izlendiği görülmektedir (sırasıyla $R= - 0,367$ $p= 0,04$; $R= 0,698$ $p<0,001$).

Rutin biyokimyasal parametreler incelendiğinde NAYKH aktivite skoru serum glukoz, trigliserid, amilaz ve VLDL-K düzeyleri ile pozitif körele iken; ALT ve AST düzeyleri ile negatif körele olduğu görülmektedir (sırasıyla $R= 0,476$ $p= 0,006$; $R= 0,487$ $p= 0,005$; $R= 0,407$ $p=0,021$; $R= 0,487$ $p= 0,005$; $R= - 0,567$ $p= 0,001$; $R= - 0,532$ $p= 0,002$) (Tablo 6.23)

Araştırmamızda NAYKH aktivite skorunun serum parametreleri ile ilişkisi incelenerek çoklu lineer regresyon modelleri oluşturulmuştur. Farklı regresyon modelleri içerisinde NAYKH aktivite skorundaki varyansı en yüksek oranda açıklayan model; uygun model olarak seçilmiştir. Tablo 6.24 incelendiğinde oluşturduğumuz regresyon modelinde serum MDA ve serum trigliserid düzeylerinin NAYKH aktivite düzeylerini beraberce pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Serum MDA ve serum trigliserid düzeyi değişkenleri NAYKH aktivite skorunun öngörülmesinde istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$). Bu iki serum parametresi beraberce histopatolojik NAYKH aktivite skorundaki varyansın %75,8'ini açıklamaktadırlar ($R^2=0,758$).

Araştırmamızda istatistiksel açıdan anlamlı bulunan ve histopatolojik aktivite skorundaki değişkenliği büyük oranda açıklayan regresyon modelinin lipid metabolizması ile ilişkili parametrelerden oluşması dikkat çekicidir. Serum trigliserid düzeyi bozulan lipid metabolizmasının serumdaki yansıması iken; serum MDA artan oksidatif stresin sonucu olarak artan lipid peroksidasyonunu temsil etmektedir. NAYKH temelde bir lipid metabolizması bozukluğu olduğundan ve hastalığı tetikleyen birincil faktör karaciğer hücrelerinde lipid yükünün artışı ve bu durumun oksidatif stres ve inflamasyonu tetiklemesi olduğundan modelimiz hastalığın patogenezi ile de yakından ilişkilidir. Ancak araştırmamız ratlarda gerçekleştirildiğinden bu modelin insan çalışmalarında da validasyonu gereklidir.

7.6. Grupların Histopatolojik Açıdan Değerlendirilmesi

Araştırmamızda rat karaciğerinde histopatolojik olarak NAYKH aktivite skorunun hesaplanmasının yanı sıra tüm kesitler histopatolojik açıdan ayrıca değerlendirilip dikkat çeken bulgular özetlenmiştir.

Kontrol, KA kontrol ve YKÇ kontrol gruplarının karaciğer dokularının histolojik değerlendirilmesinde; hepatositler ve sinüzoidlerin genel histolojik yapısı normal görünümde izlenmiş olup, Masson trikrom boyamada bağ dokusunda herhangi bir artış gözlenmemiştir. PAS boyamada ise hepatositlerde glukojen dağılımı normal olarak izlenmiştir

NASH model grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik incelemesinde; karaciğer dokusunun tüm zonlarında hepatositler içerisinde mikroveziküler ve makroveziküler yağ damlacıkları gözlenmiştir. Ayrıca hepatosit dejenerasyonu ve hepatik plakların yapısal bütünlüğünde dejenerasyon belirgin olarak izlenmiştir. Lobüler inflamasyon fokal odaklar tarzında tüm alanlarda görülmüştür. Perisünizoidal, ve periportal alanlarda fibrozis görülmüştür.

YYYK-YKÇ grubunda NASH model grubu ile karşılaştırıldığında hepatositlerde balonlaşmanın azaldığı ancak makroveziküler ve mikroveziküler yağlanmanın devam ettiği gözlenmiştir. YYYK-KA 50 grubunda ise NASH model grubuna göre yağlanmanın azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte YYYK-YKÇ ve YYYK-KA50 gruplarında adacık tarzında ve damar çeperleri çevresinde normal hepatosit görünümüne kavuşan karaciğer hücrelerinin varlığı histolojik açıdan dikkat çeken bulgularımızdandır. Alqarni vd. (2019) tarafından yüksek fruktozlu diyet ile ratlarda NAYKH oluşturulan bir araştırmada; klorojenik asit verilen grupta karaciğer dokusunda histolojik olarak sitoplazmik ve nükleer dejenerasyon içermeyen normal hepatositlerin varlığı bildirilmiştir (45). Araştırmamızda normal görünüme kavuşan hepatositler hem yeşil kahve çekirdeği ekstraktı hem de klorojenik asit verilen grupta izlenmiştir. Bu bulgular yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ya da klorojenik asit gibi diyetel ajanların karaciğerin rejenerasyon kapasitesini arttırmasına işaret ediyor olabilir.

Lenfosit infiltrasyonu yine YYYK-YKÇ ve YYYK-KA50 gruplarında NASH model grubuna göre azalmıştır. YYYK-KA 10 grubunda hepatositlerde balonlaşmanın azalmasının yanısıra model grubuna göre fibrozisin artışı dikkat çekmektedir. Araştırmamızda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve 50 mg/kg klorojenik asit alan gruplarda NAYKH aktivite skorları NASH model grubuna göre anlamlı derecede düşük iken 10 mg/kg klorojenik asit alan grupta anlamlı farklılık izlenmemiştir. Bu bulguya ek olarak YYYK-KA10 grubunda fibrozisin artmış olarak gözlenmesi dikkat çekicidir. Ancak literatürde bu bulguyu açıklayabilecek bir çalışmaya rastlanmamıştır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Glo-1 dikarbonil stresin azaltılmasında görev alan bir enzim olup NAYKH patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Araştırmamızda NASH model grubunda serum Glo-1 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek izlenmiştir. Bu açıdan Glo-1 hasta bireyleri sağlıklı bireylerden ayırmada önemli bir serum parametresidir ve NAYKH hastalığının tanısında ve hasta taramalarında non-invazif bir serum göstergesi olarak kullanılabilir. Ancak bu alanda daha geniş çaplı insan topluluklarında gerçekleştirilecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Glo-1 artışı NAYKH’da artan dikarbonil stresle başa çıkmada önemli bir savunma mekanizmasıdır. Araştırmamızda ayrıca serum Glo-1 düzeyi ile NAYKH aktivite skoru arasında negatif korelasyon izlenmiştir. Yani Glo-1 düzeyleri arttıkça NAYKH aktivitesi azalmaktadır. Dikarbonil stres yolağı tedavi açısından da önemli bir hedef olabilir. Glo-1 düzeylerini arttıran ajanların hastalığın aktivitesinin azaltılmasında yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Araştırmamızda özellikle 10 mg/kg dozda verilen klorojenik asitin Glo-1 seviyelerini hasta grupta anlamlı derecede yükseltmesi bu anlamla dikkate değer bir bulgudur. Bu nedenle serum Glo-1 seviyelerini arttırmada klorojenik asitin yeşil kahve çekirdeğine nazaran daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin serum Glo-1 düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamış olduğundan bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Serumda ölçülebilen antioksidan enzimler ve MDA gibi lipid peroksidasyon göstergeleri bizim çalışmamızda olduğu gibi literatürde pek çok çalışmada; hasta gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir. Ancak bu parametreler erken NAYKH’da artıp hastalık ilerledikçe düşüş gösterebildiğinden bu parametlerin hastalığın farklı evrelerindeki eşik değerlerini, artış-azalış paternlerini ele alan geniş çaplı insan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar neticesinde hastalığın farklı evrelerindeki örneklemelerden kaynaklandığını düşündüğümüz literatürdeki çelişkili sonuçların açıklığa kavuşturulabileceğini ve hatta bu parametrelerin hastalığın evrelendirilmesinde non-invazif yöntem olarak kullanımlarının önünün açılabilceğini düşünmekteyiz.

NAYKH temelde bir lipid metabolizması bozukluğudur. Hastalığı tetikleyen en önemli faktör karaciğerde artan lipid yükü ve bu durumun indüklediği lipotoksisitedir. Araştırmamızda karaciğerde bir lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA’nın NASH grubunda diğer karaciğer

oksidatif stres parametrelerine nazaran ön plana çıkmış olması dikkate değerdir. Dolayısıyla yoğun oksidatif stresin bir getirisi olan lipid peroksidasyonu NAYKH patogenezinde önemli bir faktördür. NAYKH alanında yapılacak olan non-invazif serum parametresi çalışmalarında lipid peroksidasyonu ürünlerine odaklanılmasının olumlu getirileri olacağını düşünmekteyiz.

Araştırmamızda ayrıca NASH model grubunda karaciğer MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekken; serum MDA düzeyinin kontrol grubuna göre neden düşük seyrettiğini araştırdığımızda; literatürde ileri evre NAYKH hastalarında serumda anti-MDA antikörlerin varlığından bahsedildiğini gördük. İleri evre hastalıkta MDA'ya karşı gelişen bu immün yanıtın serum MDA düzeylerini interfere ederek düşük ölçüm sonuçlarına yol açabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu durumun netliğe kavuşması için serum MDA düzeylerini ve Anti-MDA'nın etkisini birlikte ele alan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda NAYKH'da kalp dokusunun da oksidatif stresten etkilendiği ve oksidatif strese yanıt olarak kalpte katalaz ve SOD gibi antioksidan enzim düzeylerinin arttığı, GPO'nun ise anlamlı ölçüde etkilenmediği gözlenmiştir. Karaciğere benzer şekilde kalp dokusunda da MDA düzeylerinin yükselmiş olması kardiyak yağlanma ve kalpte artmış lipid peroksidasyonuna işaret edebileceğinden özellikle önem arz etmektedir. NAYKH hastalarında kalp dokusunda oksidatif stres parametrelerini inceleyen yeterince çalışma bulunmadığından bu alanda çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda NASH model grubunda karaciğer PIIINP düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir. Karaciğer fibrozisinin hakim olduğu patolojik durumlarda ito hücrelerinin fenotipik değişimler göstererek miyofibroblast benzeri hücrelere dönüştüğü bilinmektedir. Araştırmamızda karaciğerde kollajen sentezinin majör kaynağı olan ito hücrelerinin bu karakter değişiminin; NASH grubunda karaciğerde PIIINP sentezinin azalmasında önemli bir mekanizma olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak literatürde bu tablonun açıklığa kavuşması için farklı çalışmalara ihtiyaç söz konusudur.

Araştırmamızda NASH model grubunda kalp PIIINP düzeylerinin ortalama olarak kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmemiştir. Bu durum örneklem boyutunun küçük olması ve/veya kalp PIIINP düzeylerinin bireyler arası varyasyonunun yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. NASH model grubunda karaciğer PIIINP düzeyleri kontrol grubuna göre düşük saptandığından; kalp dokusu serum PIIINP için önemli bir kaynak teşkil ediyor olabilir. Ancak literatürde NAYKH'da kalp PIIINP düzeylerini

araştıran bir çalışmaya rastlamadığımızdan ve kalp PIIINP düzeylerinin bireyler arası varyasyonu yüksek olduğundan bu alanda daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Serum PIIINP'nin ana kaynağının belirlenmesi için radyoizotopla işaretleme çalışmaları bu anlamda yararlı olabilir.

Kronik hepatosellüler hasarda AST ve ALT başlangıçta yükselirken fibrozis ilerledikçe düşüşe geçmektedir. Araştırmamızda yüksek yağlı diyet ile eş zamanlı verdiğimiz klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı histopatolojik hastalık aktivitesini azalttığından; ALT ve AST daha ileri hastalık evresinde olan NASH model grubumuzda diyetel ajan alan gruplara nazaran daha düşük olarak izlenmiştir. ALT ve AST'nin kronik karaciğer hasarına yanıtta başlangıçta yükselip ileri hastalık evresinde düşüşe geçmesi bu iki değerli transaminazın NAYKH hastalarında prognostik anlamda ve tedavi yanıtının izleminde kullanımını sınırlamaktadır. Araştırmamızın bulguları da bu duruma dikkat çekmektedir. Bu nedenle özellikle ileri hastalık evrelerinin erken tanınmasında yol gösterici olabilecek yeni serum parametrelerine ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda NASH tablosunda kontrol grubuna göre amilaz düzeylerinin yükseldiği ve klorojenik asit veya yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilmesi ile amilaz düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir. Ek olarak özellikle yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verildiğinde amilaz düşürücü etki ön plana çıkmaktadır. Literatürde NAYKH'da yeşil kahve çekirdeği veya klorojenik asitin pankreas koruyucu etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlamadığımızdan bu bulguların yeni çalışmalara ışık tutması açısından önem arz ettiğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda NASH model grubunda karaciğer PIIINP düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğunu gözlenmiştir. Verdiğimiz klorojenik asit ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktının hastalığın histolojik aktivitesini azaltmasının yanısıra karaciğerin PIIINP düzeyini arttırmaları dikkate değerdir. Bu haliyle PIIINP literatürde bahsedildiği gibi karaciğer fibrozisinde artan kollajen sentezine bağlı düzeyleri artan bir parametre olmaktan ziyade karaciğer fonksiyonları bozuldukça sentezi azalan ve tedavi ile sentezi iyileşen bir parametre gibi durmaktadır. Ancak literatürde bu alanda yeterince çalışma yoktur. Bu bulguların geçerliliğinin artması için farklı çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

Araştırmamızda yeşil kahve çekirdeği ekstraktı alan ve 50 mg/kg dozda klorojenik asit alan grupta hastalık aktivite skoru anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Bu bulgular koruyucu hekimlik alanında diyetel ajanlarla NASH aktivitesini azaltmak hedeflendiğinde yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ya da 50 mg/kg dozunda klorojenik asit kullanımının daha yararlı olabileceğine dikkat

çekmektedir. Kullandığımız 20 mg/kg yeşil kahve çekirdeği ekstraktı da %50 oranında klorojenik asit içerdiğinden 10 mg/kg klorojenik asit içermektedir. Ancak tek başına 10 mg/kg klorojenik asit alımında aktivite skorunda anlamlı değişiklik izlenmemiştir. Yeşil kahve çekirdeği klorojenik asit dışında çok farklı sayıda polifenol grubu bileşikler içermektedir. Bu bulgular yeşil kahve çekirdeğinin içeriğinde yer alan diğer polifenollerin NASH aktivitesini azaltmada klorojenik asitin etkisini potansiyelize ettiğine; yani sinerjistik bir etkileşim olduğuna işaret etmektedir. Araştırmamızda ayrıca hem 10 mg/kg klorojenik asit alımının hem de 50 mg/kg klorojenik asit alımının karaciğer inflamasyon skorunu anlamlı ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı kullanımında inflamasyon skoru NASH model grubuna göre ortalama olarak düşük olsa da istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu bulgular klorojenik asitin NASH patogenezinde antiinflamatuvar etkisinin yeşil kahve çekirdeğine nazaran daha ön planda olduğuna işaret etmektedir.

Araştırmamızda Kleiner vd. (2005) tarafından geliştirilen son derece detaylı ve çok sayıda parametre içeren bir histolojik skorlama sistemi kullanılmıştır. Literatür taramamızda yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin NASH gelişiminde histopatolojik aktivite skoruna etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamış olup araştırmamızın bu alanda diğer çalışmalar açısından yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

Lipid metabolizmasındaki disfonksiyon NAYKH'yı kardiyovasküler hastalıklara bağlayan önemli bir faktördür ve NAYKH'da karaciğer dışında etkilenen majör organlardan biri de kalptir. Literatürde NAYKH'da kullanılmak üzere karaciğer için geliştirilmiş farklı histopatolojik skorlama sistemlerine rastlamak mümkündür. Ancak yaptığımız literatür araştırmasında NAYKH'da kardiyak patolojiyi değerlendiren bir histopatolojik skorlama sistemine rastlamamış bulunmaktayız. Kardiyak patoloji prognostik açıdan son derece önemli olup bu alanda da standardize edilmiş histopatolojik skorlama sistemlerine ihtiyaç vardır.

10 mg/kg klorojenik asit verilen ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen sağlıklı ratlarda kontrol grubuna göre serum glukoz, total kolesterol, LDL-K değerlerinin anlamlı derecede yüksek oluşu; serum ALT, üre ve amilaz düzeylerinin ise yeşil kahve çekirdeği ekstraktı verilen sağlıklı ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek oluşu araştırmamızın ilginç bulgularındandır. Bu durum bahsi geçen diyetsetel ajanların hasta gruplarında olumlu etkileri ön planda iken sağlıklı bireylerde bazı beklenmeyen etkilerin görülebileceğine işaret etmektedir. Literatürde yeşil kahve çekirdeği ekstraktının ve klorojenik asitin etkileri daha çok fazla kilolu/obez hastalarda, dislipidemik hastalarda veya NAYKH hastaları gibi çeşitli hasta

gruplarında araştırılmış olup sağlıklı bireylerdeki etkilerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bu ajanlar doğal diyetel ajanlar olarak kabul edildiğinden bir hekim tarafından reçete edilmeden sağlıklı bireyler tarafından da ulaşma ve kullanıma açık ajanlardır. Araştırmamızın bulguları bu ajanların sağlıklı bireylerde farklı etkileri olabileceğine dolayısı ile bu ajanların bir hekim gözetiminde kullanılmasının daha doğru olacağına da dikkat çekmektedir.

Polifenol grubu bileşikler yağda çözünür olduklarından yüksek yağlı diyet alan bireylerde bahsi geçen ajanların kana geçişi ve biyoyaralanımı daha fazla olabilir. Normal diyet alan bireylerde ise aksine biyoyaralanım az olabileceği gibi bağırsaklarda uzamış etki söz konusu olabilir. Ayrıca antioksidan enzimlerin aktivitesi kofaktör eksikliğinden de etkilenebilmektedir. Dolayısıyla hasta ve sağlıklı bireylerde yeşil kahve çekirdeği ve klorojenik asitin biyoyaralanımını ve bağırsaklarda eser elementlerin emilimini ne ölçüde etkilediğini araştıran çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bu gibi çalışmalar bahsi geçen diyetel ajanların sağlıklı ve hasta bireylerde gösterdiği farklı etkilere ışık tutabilir.

Oksidatif stres ve dikarbonil stres birbirinden farklı yollarla olmasına rağmen oksidatif streste artışı GSH (glutasyon) azalmasına bağlı olarak dikarbonil stresin artışına neden olabilmektedir. Araştırmamızda sağlıklı bireylerde oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olan serum MDA düzeyleri arttıkça serum Glo-1 aktivitesinin de arttığı; NASH hastalarında ise serum Glo-1 düzeylerinin daha çok karaciğerdeki antioksidan enzimler ile ilişkili olduğu ve karaciğerde katalaz ve SOD aktiviteleri arttıkça serum Glo-1 düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak NAYKH patogenezinde iki önemli yola olan oksidatif stres ve dikarbonil stres birbiri ile yakın ilişki içerisindedir. Literatürde bu alanda yeterince çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamızın bu anlamda da literatüre katkı sağlayacağını umut etmekteyiz.

Araştırmamızda oluşturduğumuz istatistiksel açıdan anlamlı bir regresyon modelinde serum MDA ve serum trigliserid düzeyleri beraberce histopatolojik NAYKH aktivite skorundaki varyansın %75,8'ini açıklamaktadır. Bu model NAYKH aktivitesinin öngörülmesinde özellikle lipid profili parametrelerine ve lipid peroksidasyon ürünlerine dikkat çekmektedir. Benzer modeller insan çalışmalarında da oluşturulabilir ve geçerli bulunması halinde NAYKH'nın non-invazif serum parametreleri ile değerlendirilmesinde yararlı olabilir. NAYKH serum parametreleri ile değerlendirildiğinde riskli, invazif ve sık uygulanması mümkün olmayan karaciğer biyopsisine ihtiyacın azalacağını düşünmekteyiz.

Araştırmamızda yüksek yağlı diyetle ek olarak yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ve klorojenik asit verilen gruplarda NASH model grubundan farklı olarak dejeneratif hücrelerin yanısıra histolojik açıdan normal görünüme kavuşan hepatosit grupları izlenmiştir. Bu bulgular yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ya da klorojenik asit gibi diyetel ajanların karaciğerin rejenerasyon kapasitesini arttımasına işaret ediyor olabilir. Ancak mevcut NAYKH karaciğer skorum sistemlerinde karaciğerin rejenerasyon kapasitesine yönelik bir değerlendirme yapılmamaktadır. Bu alanda bir değerlendirmenin histolojik skorum sistemlerine eklenmesinin özellikle antioksidan ajanlara yanıtın değerlendirilmesinde yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.



9. KAYNAKLAR

1. European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, European Association for the Study of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.
2. Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J Hepatol.* 2018;68(2):238-50.
3. Chen K, Ma J, Jia X, Ai W, Ma Z, Pan Q. Advancing the understanding of NAFLD to hepatocellular carcinoma development: From experimental models to humans. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018;1871(1):117-25.
4. Hu KC, Wang HY, Liu SC, Liu CC, Hung CL, Bair MJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: updates in noninvasive diagnosis and correlation with cardiovascular disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(24):7718-29.
5. Hamza Rasha T, Ahmed Alaa Y, Rezk Doaa G, Hamed Amira I. Dietary fructose intake in obese children and adolescents: relation to procollagen type III N-terminal peptide (P3NP) and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2016. p. 1345.
6. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S47-64. Epub 2015/04/29.
7. Mansour IN, Bress AP, Groo V, Ismail S, Wu G, Patel SR, et al. Circulating Procollagen Type III N-Terminal Peptide and Mortality Risk in African Americans With Heart Failure. *J Card Fail.* 2016;22(9):692-9.
8. Tanwar S, Trembling PM, Guha IN, Parkes J, Kaye P, Burt AD, et al. Validation of terminal peptide of procollagen III for the detection and assessment of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2013;57(1):103-11.
9. Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol.* 2013;59(2):236-42.
10. Rabbani N, Thornalley PJ. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2018;93(4):803-13.
11. Spanos C, Maldonado EM, Fisher CP, Leenutaphong P, Oviedo-Orta E, Windridge D, et al. Proteomic identification and characterization of hepatic glyoxalase 1 dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Proteome Sci.* 2018;16:4.
12. Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. *Antioxid Redox Signal.* 2018.

13. Gaens KH, Niessen PM, Rensen SS, Buurman WA, Greve JW, Driessen A, et al. Endogenous formation of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine is increased in fatty livers and induces inflammatory markers in an in vitro model of hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2012;56(3):647-55.
14. Bence KK, Birnbaum MJ. Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 2020;101143.
15. Makri E, Goulas A, Polyzos SA. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch Med Res.* 2021;52(1):25-37.
16. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol.* 2018;68(2):305-15.
17. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;67(1):328-57.
18. Ibrahim MA, Kelleni M, Geddawy A. Nonalcoholic fatty liver disease: current and potential therapies. *Life Sci.* 2013;92(2):114-8.
19. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol.* 2018;68(2):280-95.
20. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276(20):16683-9.
21. Tutino V, De Nunzio V, Caruso MG, Bonfiglio C, Franco I, Mirizzi A, et al. Aerobic Physical Activity and a Low Glycemic Diet Reduce the AA/EPA Ratio in Red Blood Cell Membranes of Patients with NAFLD. *Nutrients.* 2018;10(9).
22. Lopez-Bautista F, Barbero-Becerra VJ, Rios MY, Ramirez-Cisneros MA, Sanchez-Perez CA, Ramos-Ostos MH, et al. Dietary consumption and serum pattern of bioactive fatty acids in NAFLD patients. *Ann Hepatol.* 2020;19(5):482-8.
23. Perry RJ, Camporez JG, Kursawe R, Titchenell PM, Zhang D, Perry CJ, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell.* 2015;160(4):745-58.
24. Yesil A, Yilmaz Y. Review article: coffee consumption, the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(9):1038-44.
25. Garg SK, Shukla A, Choudhury S. Green coffee beans. *Nutraceuticals* 2021. p. 725-48.
26. Ludwig IA, Clifford MN, Lean MEJ, Ashihara H, Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & Function.* 2014;5(8):1695-717.

27. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:67-74.
28. Miao M, Xiang L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Adv Pharmacol.* 2020;87:71-88.
29. Peng BJ, Zhu Q, Zhong YL, Xu SH, Wang Z. Chlorogenic Acid Maintains Glucose Homeostasis through Modulating the Expression of SGLT-1, GLUT-2, and PLG in Different Intestinal Segments of Sprague-Dawley Rats Fed a High-Fat Diet. *Biomed Environ Sci.* 2015;28(12):894-903.
30. Hao S, Xiao Y, Lin Y, Mo Z, Chen Y, Peng X, et al. Chlorogenic acid-enriched extract from *Eucommia ulmoides* leaves inhibits hepatic lipid accumulation through regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells. *Pharm Biol.* 2016;54(2):251-9.
31. Zhang W, Piao L, Liu X. Chlorogenic acid suppresses neutrophil recruitment to tumors by inducing apoptosis and reverse migration. *Journal of Functional Foods.* 2020;75.
32. He Y, Zhou C, Huang M, Tang C, Liu X, Yue Y, et al. Glyoxalase system: A systematic review of its biological activity, related-diseases, screening methods and small molecule regulators. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110663.
33. Rabbani N, Xue M, Thornalley PJ. Dicarbonyl stress and the glyoxalase system. *Oxidative Stress* 2020. p. 759-77.
34. Vıcıl S, Ulutaş E. Metilglioksal ve İleri Glikasyon Son Ürünleri. *Bozok Vet Sci.* 2020;1 (1-2):74-9.
35. Esquivel P, Jiménez VM. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International.* 2012;46(2):488-95.
36. Gorji Z, Varkaneh HK, Talaei S, Nazary-Vannani A, Clark CCT, Fatahi S, et al. The effect of green-coffee extract supplementation on obesity: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine.* 2019;63:153018.
37. Dickson JC, Liese AD, Lorenzo C, Haffner SM, Watkins SM, Hamren SJ, et al. Associations of coffee consumption with markers of liver injury in the insulin resistance atherosclerosis study. *BMC Gastroenterol.* 2015;15:88.
38. Roshan H, Nikpayam O, Sedaghat M, Sohrab G. Effects of green coffee extract supplementation on anthropometric indices, glycaemic control, blood pressure, lipid profile, insulin resistance and appetite in patients with the metabolic syndrome: a randomised clinical trial. *Br J Nutr.* 2018;119(3):250-8.
39. Thom E. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *The Journal of international medical research.* 2007;35(6):900-8.

40. Shimoda H, Seki E, Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2006;6:9.
41. Nikpayam O, Faghfour AH, Tavakoli-Rouzbehani OM, Jalali SM, Najafi M, Sohrab G. The effect of green coffee extract supplementation on lipid profile: A systematic review of clinical trial and in-vivo studies. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(5):1521-8.
42. Baeza G, Amigo-Benavent M, Sarriá B, Goya L, Mateos R, Bravo L. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. *Food Research International.* 2014;62:1038-46.
43. Nogaim QA, Sai Pratyusha Bugata L, Pv P, Reddy UA, P MG, S IK, et al. Protective effect of Yemeni green coffee powder against the oxidative stress induced by Ochratoxin A. *Toxicol Rep.* 2020;7:142-8.
44. Gonzalez I, Morales MA, Rojas A. Polyphenols and AGEs/RAGE axis. Trends and challenges. *Food Res Int.* 2020;129:108843.
45. Alqarni I, Bassiouni YA, Badr AM, Ali RA. Telmisartan and/or chlorogenic acid attenuates fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats: Implications of cross-talk between angiotensin, the sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate pathway, and TLR4 receptors. *Biochem Pharmacol.* 2019;164:252-62.
46. Liang H, Yang J, Tang J, Wu C, Li H, Chen S. Optimization of dosage ratio of chlorogenic acid and gardenia glycosides in the treatment of rats with fatty liver disease induced by high-fat feed. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan.* 2016;36(5):683-8.
47. Bhandarkar NS, Brown L, Panchal SK. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. *Nutr Res.* 2019;62:78-88.
48. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed F, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chem Biol Interact.* 2017;272:80-91.
49. Shi H, Shi A, Dong L, Lu X, Wang Y, Zhao J, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clin Nutr.* 2016;35(6):1366-73.
50. Du WY, Chang C, Zhang Y, Liu YY, Sun K, Wang CS, et al. High-dose chlorogenic acid induces inflammation reactions and oxidative stress injury in rats without implication of mast cell degranulation. *J Ethnopharmacol.* 2013;147(1):74-83.
51. Akila P, Vennila L. Chlorogenic acid a dietary polyphenol attenuates isoproterenol induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An in vivo study. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:208-14.
52. Agunloye OM, Oboh G, Ademiluyi AO, Ademosun AO, Akindahunsi AA, Oyagbemi AA, et al. Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid:

- Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:450-8.
53. Wang D, Tian L, Lv H, Pang Z, Li D, Yao Z, et al. Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110773.
 54. Gugliucci A, Bastos DH, Schulze J, Souza MF. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia.* 2009;80(6):339-44.
 55. Preetha Rani MR, Anupama N, Sreelekshmi M, Raghu KG. Chlorogenic acid attenuates glucotoxicity in H9c2 cells via inhibition of glycation and PKC alpha upregulation and safeguarding innate antioxidant status. *Biomed Pharmacother.* 2018;100:467-77.
 56. Christensen CU, Glavind E, Thomsen KL, Kim YO, Heeboll S, Schuppan D, et al. Niemann-Pick type C2 protein supplementation in experimental non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2018;13(3):e0192728.
 57. Thomsen KL, Gronbaek H, Glavind E, Hebbard L, Jessen N, Clouston A, et al. Experimental nonalcoholic steatohepatitis compromises ureagenesis, an essential hepatic metabolic function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(3):G295-301.
 58. Rotimi OA, Olayiwola IO, Ademuyiwa O, Balogun EA. Effects of fibre-enriched diets on tissue lipid profiles of MSG obese rats. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(11):4062-7.
 59. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry.* 1988;34(3):497.
 60. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J, Johnson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res.* 1993;55(5):553-8.
 61. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edition); Academic Press; 1974. p. 673-84.
 62. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1967;70(1):158-69.
 63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
 64. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
 65. Dudek M, Kolodziejwski PA, Pruszyńska-Oszmałek E, Sassek M, Ziarniak K, Nowak KW, et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression

- in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. *Neuropeptides*. 2016;56:41-9.
66. Shi Y, Liu Z, Gai L, Gao Y, He Y, Liu C, et al. The preventive effect of total saponins from *Panax japonicus* on inflammation and insulin resistance in adipose tissue of mice induced by a high-fat diet. *Journal of Functional Foods*. 2021;78:104369.
 67. Aloui F, Charradi K, Hichami A, Subramaniam S, Khan NA, Limam F, et al. Grape seed and skin extract reduces pancreas lipotoxicity, oxidative stress and inflammation in high fat diet fed rats. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:2020-8. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.017.
 68. Świdarska M, Maciejczyk M, Zalewska A, Pogorzelska J, Flisiak R, Chabowski A. Oxidative stress biomarkers in the serum and plasma of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Can plasma AGE be a marker of NAFLD? Oxidative stress biomarkers in NAFLD patients. *Free Radical Research*. 2019;53(8):841-50.
 69. Stiuso P, Scognamiglio I, Murolo M, Ferranti P, De Simone C, Rizzo MR, et al. Serum Oxidative Stress Markers and Lipidomic Profile to Detect NASH Patients Responsive to an Antioxidant Treatment: A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2014:169216.
 70. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020;152:116-41.
 71. Gonzalez A, Huerta-Salgado C, Orozco-Aguilar J, Aguirre F, Tacchi F, Simon F, et al. Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020:1617805.
 72. Zelber-Sagi S, Ivancovsky-Wajcman D, Fliss-Isakov N, Hahn M, Webb M, Shibolet O, et al. Serum Malondialdehyde is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver and Related Liver Damage Differentially in Men and Women. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(7):578.
 73. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(24):8681-5.
 74. Yin L, Zhang Y, Shi H, Feng Y, Zhang Z, Zhang L. Proteomic profiling of hepatic stellate cells in alcohol liver fibrosis reveals proteins involved in collagen production. *Alcohol*. 2020;86:81-91.
 75. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *Journal of hepatology*. 1995;23(3):307-17.
 76. Younossi ZM, Page S, Rafiq N, Birerdinc A, Stepanova M, Hossain N, et al. A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis. *Obesity surgery*. 2011;21(4):431-9.

77. Tao H, Cao W, Yang JJ, Shi KH, Zhou X, Liu LP, et al. Long noncoding RNA H19 controls DUSP5/ERK1/2 axis in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25(5):381-9.
78. Deprince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab.* 2020;42:101092.
79. Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology.* 2008;47(4):1363-70.
80. Gan SI, Edwards A-L, Symonds C-J, Beck P-L. Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis: A case-based review. *World J Gastroenterol.* 2006;12(44):7197-202.
81. Suzuki A, Nomura T, Jokura H, Kitamura N, Saiki A, Fujii A. Chlorogenic acid-enriched green coffee bean extract affects arterial stiffness assessed by the cardio-ankle vascular index in healthy men: a pilot study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2019;70(7):901-8.
82. Dashti SI, Thomson M, Mameesh MS. Effects of copper deficiency and Cu complexes on superoxide dismutase in rats. *Nutrition.* 1995;11(5 Suppl):564-7.
83. Arhan M, Ozturk HS, Turhan N, Aytac B, Guven MC, Olcay E, et al. Hepatic oxidant/antioxidant status in cholesterol-fed rabbits: Effects of garlic extract. *Hepatol Res.* 2009;39(1):70-7.
84. Ozturk B, Ozer O, Durak ZE, Billur D, Kizil S, Durak I, et al. High cholesterol diet leads to oxidant load and peroxidation in the rabbit kidney tissue. *Bratisl Lek Listy.* 2016;117(4):235-41.