



**ENGİNAR YAPRAĞININ SULU EKSTRAKTININ
ALKOLE BAĞLI OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER
HASTALIĞI (NAFLD) ÜZERİNE *IN VIVO* VE *IN
VITRO* ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nursena YÜKSEL

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEMİR TOZLU**

2023

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ENGİNAR YAPRAĞININ SULU EKSTRAKTININ ALKOLE BAĞLI
OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI (NAFLD) ÜZERİNE *IN VIVO*
VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nursena YÜKSEL

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEMİR TOZLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

13 / 07 / 2023

Nursena YÜKSEL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENGİNAR YAPRAĞININ SULU EKSTRAKTININ ALKOLE BAĞLI OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI (NAFLD) ÜZERİNE *IN VIVO* VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nursena YÜKSEL

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEMİR TOZLU

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) karaciğerin kütesinin %5'inin üzerinde yağ oranına sahip olduğu, dünyadaki en yaygın kronik karaciğer hastalığı olup yetişkin popülasyonun %30'unda görülmektedir. NAFLD geniş bir hepatik fenotip yelpazesini kapsayan karmaşık bir hastalıktır. Bu sebepten etkili tedavi stratejileri, bitkisel ve kimyasal çeşitli ilaç destekleri bulunmamakta, geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Buna karşın bu çalışma ile terapötik ajan olarak geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan enginar yaprağının sulu ekstresinin hedef hastalığımız olan NAFLD üzerindeki potansiyel etkisi *in vitro* koşullarda HepG2 hücrelerinde oleik asitle oluşturulan NAFLD modeli üzerinde hücre canlılığı, TAS-TOS, moleküler genetik teknikler kullanılarak belirlenmiş olup ardından etkinliği belirlenen güvenli doz Sprague-Dawley ırkı ratların üzerinde yüksek yağlı diyetle beslenerek oluşturulan NAFLD modelinde biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değerlendirmeler yapılarak belirlenmiştir. Çalışmada 15 adet sıçan kullanılmıştır. Grup 1(sağlıklı kontrol n=5), Grup 2(model kontrol n=5), Grup 3(tedavi grubu n=5) olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. HepG2 hücrelerinde oleik asit maruziyetiyle oluşturulan NAFLD modelinde lipit birikimi görülmüş model ORO boyama ile doğrulanmıştır. Ayrıca tedavi uygulanan gruplarda enginar yaprağının sulu ekstresinin hücre canlılığını arttırdığı, oksidatif stresi iyileştirdiği antioksidan kapasiteyi arttırdığı belirlenmiştir. Yüksek yağlı yemle beslenen ratlarda oluşturulan NAFLD modelinde ise model kontrol gruplarında karaciğer parametreleri artmış olup tedavi sonrasında iyileşme görülmüştür. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular neticesinde enginar yaprağının sulu ekstresinin NAFLD'nin oluşturduğu metabolik bozukluklara karşı iyileştirici potansiyele sahip olduğu belirlenmiş ve bu hastalığa karşı yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine ve çeşitli farmakolojik araştırmalara katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

2023, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: NAFLD, Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, Oleik Asit, HFD, Enginar yaprağı

ABSTRACT

MS. Thesis

EVALUATION OF *IN VIVO* AND *IN VITRO* EFFECTIVENESS OF ARTICHOKE LEAF WATER EXTRACT ON NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)

Nursena YÜKSEL

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Özlem ÖZDEMİR TOZLU

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease in the world, in which the liver has a fat content of more than 5% of its mass, and is seen in 30% of the adult population. NAFLD is a complex disease that encompasses a wide spectrum of hepatic phenotypes. For this reason, effective treatment strategies, herbal and chemical various drug supports are not available and development is needed. However, in this study, the potential effect of the aqueous extract of artichoke leaf, which is widely used in traditional medicine as a therapeutic agent, on our target disease, NAFLD, was determined in vitro on the NAFLD model created with oleic acid in HepG2 cells, using cell viability, TAS-TOS, molecular genetic techniques, and then its effectiveness was determined. The determined safe dose was determined by performing biochemical, hematological and histopathological evaluations in the NAFLD model, which was created by feeding a high-fat diet on Sprague-Dawley rats. 15 rats were used in the study. Three groups were formed: Group 1 (healthy control n=5), Group 2 (model control n=5), Group 3 (treatment group n=5). Lipid accumulation was observed in the NAFLD model induced by oleic acid exposure in HepG2 cells, and the model was confirmed by ORO staining. In addition, it was determined that the aqueous extract of artichoke leaf increased cell viability, improved oxidative stress and increased antioxidant capacity in the treated groups. In the NAFLD model created in rats fed with high-fat diet, liver parameters increased in the model control groups and improved after treatment. As a result of the findings obtained as a result of this study, it was determined that the aqueous extract of the artichoke leaf has a healing potential against the metabolic disorders caused by NAFLD, and it is believed that it will contribute to the development of new treatment strategies and various pharmacological researches against this disease.

2023, 66 page

Keywords: NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease, Oleic Acid, HFD, Artichoke leaf

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, yol gösterici ve teşvik edici tavırlarıyla hayatıma önemli izler bırakan kıymetli danışmanım ve hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEMİR TOZLU'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca katkılarıyla ufukumuzu açan, yardımlarını esirgemeyen, daima desteğiyle yanımda olan, kıymetli hocam Atatürk Üniversitesi TIP Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

Tez çalışması süresince desteklerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Adem KARA'ya, bu süreçte her zaman yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen, değerli vaktini ve bilgilerini her zaman benimle paylaşan kıymetli hocam Atatürk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Cemil BAYRAM'a, katkılarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğretim Üyesi, Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Sait ERTUĞRUL'a,

Tez çalışmamın uygulamaları sırasında bana yardımcı olan Dr. Büşra YAZICILAR'a, Dr. Özel ÇAPIK'a, Dr. Neslişah BARLAK'a, Arş. Gör. Emine KARACA'ya, Arş. Gör. Mehmet Ali YÖRÜK'e, Abdurrahim KADI, Derya ULUSOY, Zaidoon AZHER'e,

Bu süreçte bana olan desteğini her zaman yanımda hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Elif DALKILINÇ ve Seher ÖZGÜN'e,

Hayatım boyunca olduğu gibi bu zorlu süreçte beni hep destekleyen, sevgisini hiç eksik etmeyen canım babam İsa Doğan YÜKSEL'e, canım annem Hatice KARLI YÜKSEL'e, kardeşlerim Betül Ebrar YÜKSEL ve Veranur YÜKSEL'e sevgilerimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nursena YÜKSEL
Temmuz 2023

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi	2
1.2. Karaciğer Yağlanması	5
1.3. Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD).....	6
1.4. Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) epidemiyolojisi	6
1.5. NAFLD etiyojisi, patofizyolojik mekanizmaları ve moleküler temeli	7
1.5.1. İnsülin direnci (IR) ve NAFLD gelişimi	8
1.5.2. Adipoz doku disfonksiyonu ve NAFLD gelişimi	10
1.5.3. Beslenme, de-nova lipogenez (DNL) ve NAFLD gelişimi	10
1.5.4. Genetik ve epigenetik faktörler ve NAFLD gelişimi.....	11
1.6. NAFLD tedavisi.....	13
1.6.1. Yaşam tarzı değişikliği.....	13
1.6.2. Farmakolojik tedavi.....	14
1.6.3. Cerrahi	14
1.7. <i>Cynara scolymus</i> (Enginar).....	14
1.7.1. Enginar yaprağı ekstresinin etkinlik potansiyeli.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Kullanılan Cihazlar	21
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	21
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	22
3.4. Enginar Yaprığı Ekstresi.....	24
3.5. HPLC-DAD Analizi.....	24

3.6. <i>In vitro</i> Çalışmalar	25
3.6.1. HepG2 hücre hattının kültüre edilmesi	25
3.6.2. NAFLD modeli oluşturmak üzere hücre kültürü ve hücre tedavisi	26
3.6.3. Yağ kırmızısı O (ORO) boyama	26
3.6.4. WST-8 testi.....	27
3.6.5. TAS-TOS analizi.....	28
3.6.6. Enginar yaprağının sulu ekstresi ile muamele edilmiş hepg2 hücre hattında oleik asitle oluşturulmuş nafld modeli üzerinde nafld ile ilişkisi belirlenen bazı genlerin ekspresyon analizi	28
3.7. <i>In vivo</i> Çalışmalar.....	32
3.7.1. <i>In vivo</i> deneysel NAFLD modelinin indüklenmesi.....	32
3.7.2. Ağırlıkların ölçülmesi ve örneklerin toplanması	34
3.7.3. Biyokimyasal analizler	34
3.7.4. Hematolojik analizler	34
3.7.5. Histopatolojik analizler	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	37
4.1. HPLC-DAD Analizi.....	37
4.2. Yağ Kırmızısı O (ORO) Boyama	38
4.3. WST-8 Testi.....	39
4.4. TAS-TOS Analizi	40
4.5. <i>In vitro</i> Koşullarda HepG2 Hücrelerinde Oluşturulan NAFLD Modelinde Moleküler Genetik Yanıtlar.....	42
4.6. <i>In vivo</i> Çalışmalar	45
4.6.1. Vücut ağırlığı değişimi	46
4.6.2. Biyokimyasal bulgular	46
4.6.3. Hematolojik bulgular.....	47
4.6.4. Histopatolojik analizler ve bulgular	48
4.6.5. İmmunohistokimyasal analizler ve bulgular.....	50
4.6.6. İmmunofloresan analizler ve bulgular.....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

cm	Santimetre
dk	Dakika
g	gram
L	Litre
mg	Miligram
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

ALE	Enginar Yaprağı Ekstresi
ALP	Alkalin Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Transaminaz
BT	Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	Komplementer DNA
CYP1A1	Sitozolik Sitokrom P450 1A1
ddH ₂ O	Çift Damıtılmış Su
DGAT	Digliserit Açıltransferaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNL	De-nova Lipogenez
EYSE	Enginar Yaprağının Sulu Ekstresi
FAS	Yağ Asidi Sentaz
GGT	Gama-Glutamiltranspeptidaz
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1
HFD	Yüksek Yağlı Diyet
IL-6	İnterlökin 6
IR	İnsülin Direnci
MAFLD	Metabolik (Disfonksiyon) İlişkili Yağlı Karaciğer Hastalığı
MetS	Metabolik Sendrom

MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NAFLD	Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	Alkolsüz Steatohepatite
ND	Normal Diyet
NRF-2	Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2
ORO	Yağ Kırmızısı O
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPAR- α	Peroksizom Proliferatör-Aktive Edici Reseptör Alfa
PPAR- γ	Peroksizom Proliferatör-Aktive Edici Reseptör Gamma
PT	Protrombin Zamanı
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SREBP1-c	Sterol Düzenleyici Element-Bağlayıcı Protein 1c
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TG	Trigliserit
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TOS	Total Oksidatif Stres
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karaciğer anatomisi	3
Şekil 3.1. Enginar yaprağının toz haline getirilmiş halinin görüntüsü	24
Şekil 4.1. Enginar yaprağı sulu ekstraktının HPLC-DAD kromatogramları	37
Şekil 4.2. Oleik Asit ile Model Oluşturulmuş HepG2 Hücreleri (a) Sağlıklı Oleik asit uygulanmayan model, (b) oleik asit uygulaması yapılan enginar yaprağı uygulanmayan model, (c) 300 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup, (d) 150 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup, (e) 100 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup, (f) 50 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup.	38
Şekil 4.3. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin etkisi.	40
Şekil 4.4. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 48 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin etkisi.	40
Şekil 4.5. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin total antioksidan seviyesi üzerindeki etkisi.	42
Şekil 4.6. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin total oksidatif stres üzerindeki etkisi.	42
Şekil 4.7. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin ppar- α ekspresyonu üzerindeki dağılımı.	43
Şekil 4.8. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin ppar- γ ekspresyonu üzerindeki dağılımı.	44
Şekil 4.9. Oleik ASİTLE HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin nrf-2 ekspresyonu üzerindeki dağılımı.	45
Şekil 4.10. Karaciğer dokusu, Hepatositlerde dejenerasyon (oklar) ve nekroz (okbaşları), H&E, Bar:20 μ m. Hepatositlerde Caspase 3 ekspresyonları	

(okbaşları), IHC-P, Bar:20µm. Hepatositlerde 8-OHdG ekspresyonları (FITC) ve JNK ekspresyonları (Texas Red), IF, Bar:50µm..... 52

şekil 4.11.Beyin dokusu, Nöronlarda dejenerasyon (oklar) ve nekroz (okbaşları), H&E, Bar:20µm. Astrositlerde GFAP 3 ekspresyonları (okbaşları), IHC-P, Bar:20µm. Nöronlarda 8-OHdG ekspresyonları (FITC) ve JNK ekspresyonları (Texas Red), IF, Bar:50µm. 52



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında yararlanılan cihazlar ve modelleri	21
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kitler	22
Çizelge 3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	22
Çizelge 3.4. cDNA sentezi için uygulanan PCR programı	30
Çizelge 3.5. cDNA reaksiyonu bileşenleri.....	30
Çizelge 3.6. PCR reaksiyonunda kullanılan genlerin primerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.	31
Çizelge 3.7. Uygulanan RT-PCR programı	31
Çizelge 3.8. RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler.....	32
Çizelge 3.9. Deney planı.....	33
Çizelge 4.1. Ratların ortalama ağırlıkları ve SEM değerleri.....	46
Çizelge 4.2. Tüm deney gruplarına ait biyokimyasal bulgular	47
Çizelge 4.3. Tüm deney gruplarına ait hematolojik bulgular.....	48
Çizelge 4.4. Karaciğer ve beyin dokularında histopatolojik bulgular ve skorlanması ...	50
Çizelge 4.5. Karaciğer dokusunda immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama bulgularının verilerini ve istatistiksel analiz verileri.	51
Çizelge 4.6. Beyin dokusunda immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama bulgularının verilerini ve istatistiksel analiz verileri.	52

1. GİRİŞ

Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD), metabolik (disfonksiyon) ilişkili yağlı karaciğer hastalığı (MAFLD) olarak da bilinmekte olan alkol kullanımını gibi başka açık bir nedeni olmaksızın karaciğerde aşırı yağ birikmesi durumunu ifade eder (Anonymous 2021; Anonymous 2022b). Dünyadaki en yaygın kronik karaciğer hastalığı NAFLD olup genel yetişkin popülasyonunun %30'unda mevcuttur. NAFLD, yetişkin popülasyonun üçte birini etkileyen başlıca risk faktörleri genetik yatkınlık, insülin direnci, obeziteye ek olarak hipertansiyon, hiperlipidemi, kardiyovasküler disfonksiyon, sistemik inflamasyon ve birçok ekstrahepatik hastalık gibi metabolik sendromun (MetS) özelliklerine sahip olan çok sistemli yaygın bir kronik karaciğer hastalığıdır (Byrne and Targher 2015; Wen et al. 2020; Buyco et al. 2021). Bu nedenle, NAFLD, hareketsiz bir yaşam tarzı ile birlikte yüksek kalori alımı nedeniyle önümüzdeki 10 yıl içinde üstel bir büyüme tahmini ile hızla dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline gelmekte, karaciğer nakli ihtiyacında giderek artan bir ihtiyaca sebep olmakta ve 2030 yılına kadar karaciğer transplantasyonunun en sık nedeni olması beklenmektedir (Rinella and Sanyal 2016; Bagherniya et al. 2018; Soret et al. 2020; Nouredin et al. 2018).

Karaciğer hastalıklarının ilerlemesini önlemenin ve iyileştirmenin tek yolu son dönemlere kadar karaciğer nakli olarak görülmekteydi. Ancak donör kişileri hastalara uydurmak son derece zor bir işlemdir. Bu nedenle, karaciğer yağlanması hastalığıyla mücadele eden hastaları iyileştirmek için alternatif yollar bulmaya acil bir ihtiyaç gelişmiştir ve NAFLD'nin karaciğer hastalıklarının ilerlemesinde kritik bir konumda bulunması sebebiyle hedeflenmesi önem arz etmektedir. Bununla birlikte, NAFLD, alkolsüz steatohepatit (NASH), karaciğer fibrozu ve inflamasyon dahil olmak üzere geniş bir hepatik fenotip yelpazesini kapsayan karmaşık bir hastalıktır ve NAFLD ilerlemesinin altında yatan mekanizmalar hala büyük ölçüde anlaşılamamıştır. Bunun bir yansıması olarak NAFLD olan hastalar için etkili tedavi stratejileri ve ilaç destekleri bulunmamaktadır (Wen et al. 2020; Tilg et al. 2021). Bu nedenden dolayı NAFLD hastalığının prognozu, tedavisi ve/veya önlenmesi için terapötik ajanların belirlenmesine önemli bir ilgi vardır. Terapötik ajan olarak geleneksel tıbbi tedavilerin oluşturabilecekleri potansiyel olumsuz etkiler nedeniyle, bitkisel ilaçlar ve fonksiyonel gıdalar (meyveler, sebzeler) gibi doğal ve güvenli ürünler olan tamamlayıcı tedaviler

1. GİRİŞ

niteliğindeki bitkilerin kuru materyal veya özlerinin potansiyel etkilerinin araştırılmasına odaklanılmıştır (Bagherniya et al. 2018).

Geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan *Asteraceae* familyasına ait otsu bir bitki olan enginar (*Cynara scolymus*), genellikle Akdeniz ülkeleri (örn. İtalya, İspanya, Fransa, Kuzey Afrika) ve Amerika'da yetiştirilmektedir (Kwon et al. 2018). Enginar'ın hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda birçok hastalık üzerine tedavi edici ve koruyucu etkileri gözlenmiş olup ayrıca lipit düşürücü ve hepatoprotektif bir ajan olarak potansiyel gösterebileceği belirlenmiştir (Panahi et al. 2018; Majnooni et al. 2021).

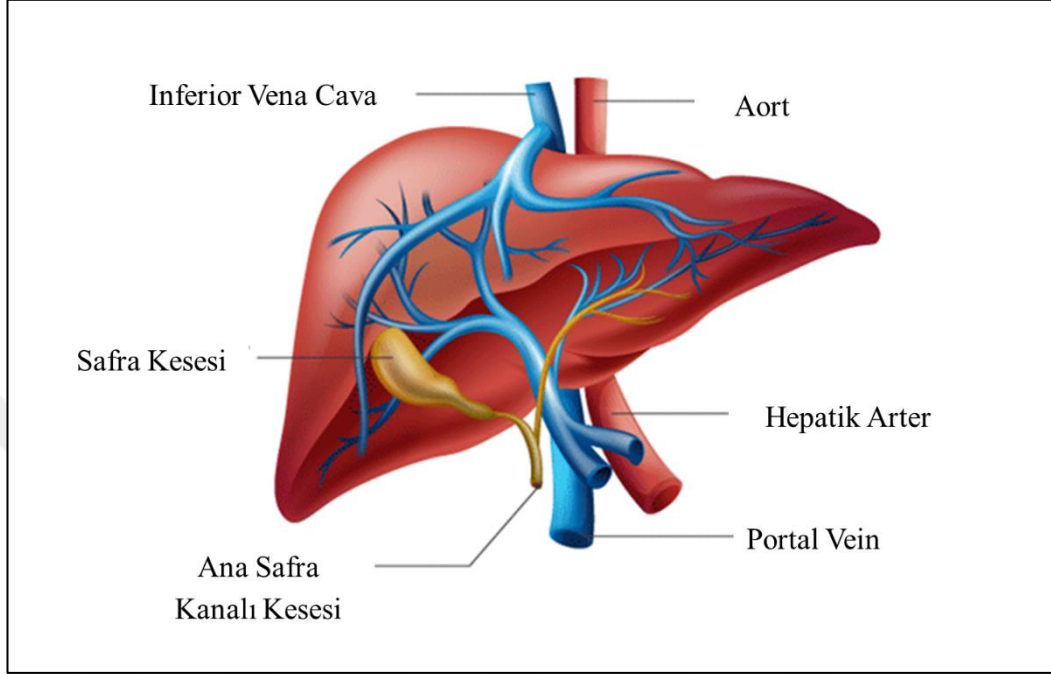
Biz bu çalışmamızda alışılmışın dışında, terapötik ajan olarak ülkemizde yetişen, mevsiminde toplanmış enginar yaprakları kullanılarak, NAFLD üzerindeki etkinliğini değerlendirdik. Literatürde yaptığımız araştırmaya göre ülkemizde yetişen enginarın hedeflediğimiz hastalık üzerine etkileri araştırılmamış olup ilk kez bizim çalışmamız ile bu bitkinin etkinlik potansiyeli hem *in vivo* hem *in vitro* olarak belirlenmiştir. NAFLD mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda bakmış olduğumuz parametreler sayesinde bu hastalık üzerindeki bilinmezliklerin kaldırılmasına, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve yeni tedavi stratejilerinin oluşturulması için ışık tutulmaktadır.

1.1. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi

Karaciğer vücudumuzda bulunan en büyük organ olmakla beraber yüksek bir rejenerasyon yeteneğine sahiptir (Taşdoğan 2019; Açar 2021). Erişkin bireylerde vücut ağırlığının yaklaşık %2'lik bir kısmını oluşturmakta olup karın boşluğunun sağ üst tarafında, diyaframın hemen alt bölgesinde bulunmaktadır (Taşdoğan 2019). Kadınlarda yaklaşık olarak 1.400 gr, erkek bireylerde ise 1.800 gr'a karşılık gelmektedir. Kan beslemesi karaciğerde iki kaynak tarafından sağlanmaktadır. Bunun %80'lik bir kısmı dalak ve bağırsakları boşaltan portal ven tarafından sağlanırken, kalan %20'lik kısım oksijenli kan, hepatik arter tarafından sağlanmaktadır (Sibulesky 2013). Karaciğer, metabolik fonksiyonların düzenlenmesi, hepatobiliyer sistemin işleyişi, protein sentezi, kolesterol sentezi ve depolanması, karbonhidrat (glukoz) depolanması ve salınması, vitaminlerin depolanması (A, D, E, K ve B12), safra yapımı, üre yapımı, çeşitli ilaç ve

1. GİRİŞ

maddelerin vücut dışına atılması ve bazı hormonların metabolizması gibi önemli biyolojik süreçlerin işleyişinde aktif görev almaktadır (Taşdoğan 2019; Şentürk 2019; Açar 2021).



Şekil 1.1. Karaciğer anatomisi (Anonymous 2022a)'den değiştirilerek alınmıştır

Karaciğeri hücresel düzeyde incelediğimizde, fonksiyonel biriminin fizyolojik olarak farklı apikal ve bazolateral membranlara sahip altıgen hepatitlerden oluşan lobül dediğimiz yapılar olduğunu görürüz. Bu altıgenlerin her köşesinde portal üçgen (portal ven, hepatik arter, safra kanalı) bulunur. Hepatositler işlevlerine ve perfüzyonlarına göre üç bölgeye ayrılır.

Bölge 1: Bu, hepatositlerin periportal bölgesidir. Besleyici ve oksijen zengin kana yakın olduğu için en geçirgen ve aynı zamanda ilk yenilenen bölgedir. Yüksek perfüzyon kapasitesi nedeniyle bu bölge, beta-oksidasyon, glukoneogenez, safra oluşumu, kolesterol oluşumu ve amino asit katabolizması gibi oksidatif metabolizmada büyük ve önemli bir rol oynar.

Bölge 2: Hepatositlerin perisantral bölgesidir. Birinci ve üçüncü bölgeler arasında yer alır.

1. GİRİŞ

Bölge 3: Portal üçgenden (portal ven, hepatik arter, safra kanalı) uzak olduğu için perfüzyonun en düşük olduğu bölgedir. Bu bölge glikoliz, detoksifikasyon, ilaç biyotransformasyonu, ketogenez, lipogenez, glikojen sentezi ve glutamin oluşumunda önemli bir rol oynar. (Saxena et al. 1999; Anonymous et al. 2023b).

Karaciğerde meydana gelen ve gelebilecek olan herhangi bir fonksiyon bozukluğu, bir hastalık vücudtaki bütün sistemleri doğrudan etkilemektedir (Şentürk 2019). Karaciğerde meydana gelen hastalıklara örnek olarak viral enfeksiyonlar olan hepatit a, hepatit b, hepatit c, hepatit e, otoimmün hastalıklar olan otoimmün hepatit (AIH) ve primer biliyer siroz (PBC), alkole bağlı karaciğer hastalığı, yüksek yaygınlığa sahip olan alkolden bağımsız karaciğer yağlanması (NAFLD) ve hepatosellüler kanser örnek verilebilir (Tajiri 2013).

Karaciğerde meydana gelen fonksiyon bozukluklarının tespiti için klinisyenler çeşitli testler ve parametrelerden yararlanmaktadır. Bu parametrelerden biri protein sentezleme yeteneğidir. Albümin karaciğerin ürettiği önemli bir proteindir. Albümin seviyeleri karaciğerin nasıl çalıştığı hakkında bize fikir verir burada şuna dikkat edilir albümin seviyesi beslenme durumu ve nefrotik sendromlar gibi faktörlerden de etkilenir. Bir diğer önemsenmesi gereken durum da albüminin yarılanma ömrü 15-20 gündür bu nedenle akut karaciğer fonksiyon bozukluğunu tanımlamada yetersiz kalabilir. Bu nedenle albümin seviyeleri pıhtılaşma çalışmaları ile birleştirilir ve öyle değerlendirilir. Pıhtılaşma faktörleri faktör VIII dışında olmak üzere karaciğer tarafından üretilmektedir. Pıhtılaşma proteinleri protrombin zamanı (PT) testi ile test edilir. Bu test şu şekilde çalışır; karaciğer hastalığında albümin ve pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde bir azalma meydana gelir. Pıhtılaşma faktörleri K vitamini kullanan bir yolla karaciğerde karboksillenir. Bu da yüksek bir PT değerinin karaciğer hasarına işaret edebileceği anlamına gelir (Hoekstra et al. 2013; Anonymous et al. 2023b). Karaciğeri değerlendirmeye yardımcı olmak için karaciğerdeki çeşitli değerler dikkate alınır. Bunlar aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), bilirubin, alkalın fosfataz (ALP) ve gama-glutamiltanspeptidaz (GGT) dır. Bu parametrelerin hasarın varlığını yansıtmalarının nedeni, bu enzimlerin karaciğerin fonksiyonel birimi olan hepatositlerin hasarı üzerine dolaşıma salınan hepatositlerin bileşenleri olmasıdır. ALT ve AST, glukoneogenez için önemli enzimlerdir bununla beraber AST çeşitli dokularda bulunur

1. GİRİŞ

bunun aksine ALT karaciğer için daha spesifik bir parametredir. Bir diğer önemli enzim alkalın fosfataz (ALP) ise hem kemikte hem de safra ağacında bulunabilir, bu nedenle spesifitesi düşüktür ancak diğer değerlerle beraber kullanıldığında hepatoselüler hasar kanıtı olarak anlamlı bir sonuç verir (Hoekstra et al. 2013; Anonymous et al. 2023b). Bu parametrelerin haricinde karaciğerde meydana gelen hasar ve fonksiyon bozukluklarının tespit edilmesinde bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) cihazı ve ultrasondan yardım alınmaktadır (Scheidler et al. 1995; Brehmer et al. 2018; Anonymous et al. 2023b).

1.2. Karaciğer Yağlanması

Trigliseritler (TG'ler) karaciğerde bulunan lipidin ana bileşenleridir ve serbest yağ asitlerinin esterleşmesi yoluyla üretilir. Bu süreç şu şekilde gerçekleşir; karaciğerlerde trigliserit sentezi için kullanılan iki farklı serbest yağ asidi kaynağı kullanılır bunlar diyet yağ asitleri ve trigliserit depolarının lipolizi ile adipoz depolarından salınan yağ asitleridir. Bu serbest yağ asidi dediğimiz yapılar albümin ile paketlenir ve ardından karaciğere taşınır. Hepatositler tarafından alınır ve mitokondri, peroksizomlar veya mikrozomlar içinde oksidasyona uğrarlar ve sonunda serbest yağ asitlerimiz trigliseritlere esterleşirler. Bu özetlediğimiz süreç digliserit açiltransferaz (DGAT) tarafından katalize edilen ve birçok basamaktan oluşan bir süreçtir ve nihai olarak trigliseritler tipik olarak karaciğerden salgılanan çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) olarak çıkarlar (Choi and Diehl 2008).

TG'ler suda çözünmezler ve bu yapıları sayesinde hücreler üzerinde olumsuz ozmotik veya kolloidal etkiler göstermeksizin yüksek seviyelerde birikebilirler. Ayrıca TG'ler, karbonhidratlardan (4,5 kcal/g) veya proteinlerden (4 kcal/g) daha fazla kalori yoğunluğu (9 kcal/g) sağlar bu durumda trigliserit birikimini destekler. TG'lerin bu yapıları ile enerji talebi ve mevcudiyetindeki dalgalanmalara karşı destek vermek için tercih edilen depolama besin maddesi olarak çalışırlar ve ökaryotik canlılarda ilk ortaya çıkışları bu olayın sonucudur. Daha yüksek gelişmişlik gösteren organizmalarda ise TG'ler adipositlerde depolanır ve diğer hücre tiplerinde yalnızca olağandışı koşullar altında birikir. Buna örnek olarak; göçmen kuşlar, mevsimsel göçler sırasında uzun süreli uçuşlar gerçekleştirirler. Bu uçuşlara hazırlanırken bir enerji kaynağı olarak

1. GİRİŞ

karaciğerlerinde büyük miktarlarda TG depolarlar. Bu göçmen kuşların yararına olurken göçmen kuşlar gibi, aşırı kalori tüketen bazı insanların karaciğerlerinde yağ depolaması gerçekleşir. Ancak bu durum kuşların aksine insanlarda olumsuz etkilere sahiptir çünkü sağlıklı yetişkin bir insan karaciğeri, kütlelerinin %5'ine kadar lipit içermelidir (Brunt 2007) ve bunun üzerinde bir orana sahip yağlı karaciğer insan vücudunun işleyişi için uyumsuzdur ve ciddi klinik sonuçları doğurabilir (Choi and Diehl 2008; Cohen et al. 2011).

1.3. Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD)

Yağlı karaciğerin sebep olduğu klinik sonuçlardan biri de yaygın bir patolojik durum olan hepatositlerde lipit birikimi ile karakterize alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) dır. Basit steatozdan alkolsüz steatohepatite (NASH) ve fibrozise kadar gelişebilir ve NASH bu hastalığa sahip kişilerin dörtte birinde meydana gelen ve hastalığın ilerlediğini ifade eden aynı zamanda sirozunda ana nedeni olarak karşımıza çıkar (Xiang et al. 2013). Eğer NAFLD, NASH'a ilerlerse bu ilerlemenin sonunda sadece siroz değil buna ek olarak karaciğer kanseri, karaciğer yetmezliği veya kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli komplikasyonların geliştiği gözlenebilir (Rinella and Sanyal 2016; Anonymous 2021).

1.4. Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) epidemiyolojisi

NAFLD için bazı coğrafi farklılıklar olmakla beraber küresel ölçekte bakıldığında yetişkin popülasyonun yaklaşık %25'inde gözleendiği tahmin edilmektedir (Younossi et al. 2016). Bu durum zayıf (obez olmayan) popülasyonda %10-15'e kadar düşerken obez veya diyabetik vakaların yüksek olduğu popülasyonda %70-90'a kadar çıkmaktadır (Younossi et al. 2018; Zou et al. 2020). Bölgelerde NAFLD prevalansına bakılacak olursa Asya ülkelerinden toplanan son verilere göre %27,4'lük bir yaygınlık bildirmiştir (Seto and Yuen 2017). Bu durum Hindistan'da %9 ila %53 arasında değişen bir yaygınlık gösterirken (De and Duseja 2021) Orta Doğu ve Kuzey Afrika (MENA) için bu oran %32'dir ve dünya çapında en yüksek NAFLD prevalansına sahip olmakla beraber geleceğe dair bu oranın kötüleşme eğilimi gösterdiği belirtilmiştir (Sanai et al. 2020). Yakın zamanlarda yapılan bir meta-analize göre ise NAFLD prevalansı Kuzey

1. GİRİŞ

Amerika'da %24, Güney Amerika'da %31, Avrupa'da %23'iken Afrika'da %14 oranıyla en düşük prevalansa sahiptir (Younossi et al. 2016; Gadiparthi et al. 2020).

NAFL hastalarının %25'i NASH'a ilerlemektedir. NASH ise hepatositlerde balonlaşma ve enflamasyonun varlığını gösteren hepatik steatoz ile karakterize olan bir hastalık olup hepatik fibroz, siroz ve HCC'ye ilerleme riski daha yüksektir (Bashir et al. 2022; Muthiah et al. 2022) ve NAFLD, hareketsiz bir yaşam tarzı ile birlikte yüksek kalori alımı nedeniyle önümüzdeki 10 yıl içinde üstel bir büyüme tahmini ile hızla dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline gelmekte, karaciğer nakli ihtiyacında giderek artan bir ihtiyaca sebep olmakta ve 2030 yılına kadar karaciğer transplantasyonunun en sık nedeni olması beklenmektedir (Sanyal 2016; Rinella et al. 2018; Bagherniya et al. 2018; Soret et al. 2020).

1.5. NAFLD etiyojisi, patofizyolojik mekanizmaları ve moleküler temeli

NAFLD oluşum seyrine bakacak olursak tarihsel süreçte NAFLD'nin NASH'a ilerleyişi Day ve James'in 1998 yılında yapmış olduğu çalışmalara atfedilmiş ve bu çalışmada Day ve James ilk olarak "iki vuruş" hipotezini öne sürmüşlerdir (Day and James 1998). Bu hipoteze göre "ilk vuruş" insülin direncinin indüklediği karaciğerin ana parankim hücresi olan hepatositlerde trigliserit birikimi yoluyla hepatik steatoz gelişimi ile gerçekleşir. Bu durum gerçekleştiğinde NASH'ın inflamasyon, fibroz ve hücrel ölüm özelliklerinin gelişmesini başlatan çok sayıda olası "ikinci vuruşa" karşı karaciğerin savunma gücünü zayıflatır. İkinci vuruş ise sonucunda fibrozise yol açan oksidatif stres, proinflamatuvar sitokin aktivasyonu, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve bağırsaktan türetilen bakteriyel endotoksin gibi çeşitli faktörler olabilir (Day and James 1998; Neshat et al. 2021; RehabF 2022). Bununla birlikte, son yıllarda ulaşılan veriler bu teorisin yetersiz kaldığını ve seri şekilde bir ilerleme yerine birlikte hareket eden farklı parametreleri içeren "çoklu paralel isabet hipotezi" teorisi olarak adlandırılan daha karmaşık mekanizmalarının NAFLD mekanizmasını daha iyi açıkladığını önermiştir (Lonardo et al. 2017). Bu teoriye göre, insülin direnci, adipoz hormonları ve adipoz doku disfonksiyonunun tümü, beslenme faktörleri, genetik ve epigenetik faktörler, mitokondriyal disfonksiyon, endoplazmik retikulum stresi, mikrobiyota, kronik düşük dereceli inflamasyon gibi çoklu patojenik faktörlerin dahil olduğu NAFLD mekanizması

1. GİRİŞ

bu hastalığın hem gelişimi hem de ilerlemesinin eşzamanlı nedenlerini temsil ettiğini ifade eder (Acierno et al. 2020; Bashir et al. 2022).

1.5.1. İnsülin direnci (IR) ve NAFLD gelişimi

İnsülin direnci (IR), normalin aksine bir kişide sabit miktarda insülinin bilinen miktarda glikozu metabolize etmedeki yetersizliğini ifade eder. IR, visseral yağ ile doğrudan ilişkilidir ve abdominal obezite, artmış trigliserid seviyeleri, azalmış HDL kolesterol seviyeleri, artmış kan basıncı ve hiperglisemi gibi özelliklerden en az üç tanesinin varlığında tanımlanan metabolik sendromun (MS) temel taşıdır (Alberti et al. 2009). IR, NASH'deki ana patojenik faktörlerden biri olarak kabul görmekte ve NAFLD gelişiminde kilit bir rol oynamaktadır. Normal koşullar altında, yağ dokusu insüline yüksek duyarlılık gösterir, lipit depolar ve TG lipolizini inhibe eder. Ancak tersine, gelişen insülin direnci kısmen insülinin lipolizi baskılama yeteneğinin bozulmasına sebebiyet vererek artan dolaşımdaki serbest yağ asitleri hepatik alım ve depolama için uygun hale getirilir (Bugianesi et al. 2010; Armstrong et al. 2014). Yağ, hepatositlerde gliserol ve serbest yağ asitlerinin esterleşmesinden oluşan trigliseritler olarak birikme gösterir (Musso et al. 2013; Jacome-Sosa and Parks 2014). TG'lerin bu birikimi hepatotoksik bir mekanizmadan ziyade plazmada ki aşırı serbest yağ asiti varlığını dengeleyecek bir savunma mekanizması olarak görünür (Yamaguchi et al. 2007). Buna ek olarak süreçteki diğer biyoaktif ara ürünler (seramidler ve diasilgliserol (DAG) gibi) iltihaplanmadan karaciğer fibrozuna kadar sonuçlanan lipotoksisiteyi indükleyebilir ve sonunda NAFLD, hepatositleri lipotoksisiteden koruyan mekanizmalar tükendiğinde, bu süreçte meydana gelen disfonksiyonların etkisiyle NASH'da görülen karaciğer hasarını modüle ederek hastalığın NASH'a ilerlemesini sağlar ve bu süreci fibrozis gelişimi izler. Ayrıca NASH'ın kendi yapısı da hepatik ve periferal insülin direncini harekete geçirerek hepatik serbest yağ asiti akışı, steatoz ve enflamasyondan oluşan tekrarlayan bir kısır döngüye sebebiyet verir (Jou et al. 2008; Armstrong et al. 2014; Byrne and Targher 2015).

İnsülin direnci esnasında hepatik lipogenezi daha yakından incelediğimizde insülin reseptörü, insüline bağlandıktan sonra tirozinin fosforile olduğunu görmekteyiz ve bu da insülin reseptör substrat (IRS) proteinlerinin tirozin fosforilasyonuna neden olmasıyla sonuçlanır. IRS-1 ve IRS-2 olmak üzere iki önemli IRS vardır. IRS-1, glikoz

1. GİRİŞ

metabolizmasında başlatıcı olarak görev yapar ve fosforilasyon üzerine fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-AKT/protein kinaz B (PKB) yolunun uyarılmasını indükleyerek glukoz taşıyıcıların (GLUT) aktifleşmesine neden olmaktadır. IRS-2 ise hücrelerde lipid metabolizmasını hızlandırır ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1c (SREBP-1c) aracılığıyla de-novo lipogenezi(DNL) düzenler. İnsülin tarafından uyarılan SREBP-1c, hücrel lipid metabolizmasında temel rol oynayan, farklı izoformları bulunan bir grup transkripsiyon faktörü olan SREBP ailesinin bir üyesidir. SREB proteinleri, karaciğerdeki kolesterol ve yağ asidi sentezinin programını aktive eder (Horton et al. 2002). Ayrıca SREBP-1c izoformunun diğer önemli özelliklerinden biri asetil CoA karboksilaz (AAC) ve yağ asidi sentaz (FAS) en önemlileri olmak üzere çeşitli enzimlerin oluşumunu indükleyerek karaciğerde yağ asitleri ve TG sentezinde rol oynamasıdır (Dentin et al. 2004). Bununla beraber SREB protein ailesinin bir diğer izoformu olan SREBP-2 de hücrel kolesterol homeostazında rol oynar (Schultz et al. 2000). SREBP-1c ile indüklenen enzimlerin birçoğu lipid sentezinde önemli bir belirleyici olan, karbonhidrat yanıt elemanı bağlayıcı protein (ChREBP) tarafından düzenlenmektedir (Postic et al. 2007). ChREBP glikoz tarafından aktive edilir ve lipogenezi indükler buna karşın aynı zamanda hem trigliserit sentezi hem de serbest yağ asidi sentezi için daha fazla substrat sağlar ve IRS-2 aktivasyonu sağlandığında SREBP-1c'nin düzenleyicisi olarak görev yapabilir, böylece de novo lipogenezin gerçekleşmesi sürecine katkı sağlar (Schreuder et al. 2008). Bununla beraber IRS-2 sinyalinin sağlıklı çalıştığı IR şartlarında insülinin IRS-2 reseptörünü aşağı regüle ettiği, bununla beraberde SREBP-1c'nin aşırı ekspresyonu ve DNL'nin yukarı regülasyonu ile sonuçlanmıştır (Schreuder et al. 2008a). IR, IL-6 ve TNF- α , peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör-gama (PPAR- γ) transkripsiyon faktörleri gibi birçok mekanizmanın aktivasyonu ile daha da indüklenebilir. IR esnasında meydana gelen bozulmalar sonucunda karaciğere serbest yağ asidi akışında bir artış olur ve serbest yağ asitlerinin karaciğerde birikmesiyle serin kinazın aktivasyonu, c-jun N-terminal protein kinaz 1 (JNK1) veya nükleer faktör- κ B (NF- κ B) gibi enflamatuar sinyal transduserleri yoluyla insülin sinyal yollarında bozulmalara sebep olur. Bu durumlar lipid ve glikozun daha karmaşık metabolik bozukluklarına sebep olur ve NAFLD'ye katkı sunar (Schreuder et al. 2008; Caturano et al. 2021; RehabF 2022).

1.5.2. Adipoz doku disfonksiyonu ve NAFLD gelişimi

Adipoz doku, genellikle adipokinler olarak adlandırılan çeşitli hormon ve proinflamatuvarları salgılayan endokrin bir organ olarak kabul edilmekte olup trigliserit şeklindeki enerji fazlalığının büyük bir depo alanıdır (Kershaw and Flier 2004). Vücuttaki yeri ve işlevine göre adipoz dokular çeşitli isimlerle anılır ve homeostazi için çeşitli görevlere hizmet ederler. Ancak adipoz dokunun intraabdominal olarak birikmesi belirgin metabolik değişikliklerle güçlü bir şekilde bağlantı gösterir ve aşırı adipozite ve adiposit disfonksiyonu, çok çeşitli adipokinlerin deregülasyonuna yol açar, bu durum oldukça inflamatuvar bir tablonun gelişmesine ilaveten değişmiş lipid ve glukoz homeostazına sebep olarak çeşitli metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunur (Hauner 2005; Halberg et al. 2008).

İntrahepatik TG içeriğinde artış (steatoz) ile karakterize edilen ve obezite ile çoğu zaman paralel bir ilerleme gösteren NAFLD adipoz doku disfonksiyonlarından doğrudan etkilenir. Obezite sebebiyle oluşan enflamasyonun gelişmesiyle birlikte adipositler, çeşitli proinflamatuvar kemokinlerin ve sitokinlerin salgısını artırır. Bu IL-6 ve TNF- α değişimin IR'yi desteklemesine, trigliserit lipolizine ve serbest yağların dolaşım sistemine salınmasını indükleyen bir adiposit IR durumunun başlamasına sebep olur. IR'nin NAFLD ile ilişkisi yukarıda ayrıntılı bir şekilde ifade edilmiş olup, buna ilaveten insülin duyarlılığı düzenlemesinde anahtar bir protein olan adiponektin üretiminde düzensizlikler gerçekleşir ve bu bozulmalar adipositlerden yağ kaybını uyarır ve ektopik yağ birikimini destekler ve NAFLD gelişimine katkı sunar (Cordeiro et al. 2020; RehabF 2022; Hanlon and Yuan 2022).

1.5.3. Beslenme, de-nova lipogenez (DNL) ve NAFLD gelişimi

Enerji açısından zengin gıdaların sürekli tüketimi, esterleşmemiş yağ asitlerinin plazmaya taşınması sonucu yağ hücrelerinin işleme kapasitesini zorlamaya başlar. Adipoz olmayan dokuda, özellikle kas ve karaciğerde yağ birikmesi, obezitenin ve NAFLD'nin karakteristiğidir. Obezitede adiposit taşınması meydana gelir ve bu durum ektopik lipid birikiminin artmasına katkıda bulunur. Yağların diyetle alınan yağ tüketiminin bir sonucu olarak karaciğere girmesinin bir başka yolu da çok yüksek lipid içeriğine sahip

lipoproteinler olan şilomikronlardır. Serbest yağ asitleri ve monogliseritler, bağırsak epitel hücrelerinde ayrı olarak emilir ve TG'de paketlenir. Daha sonra lipoprotein lipazın aracılık ettiği serbest yağ asitlerini yağ ve kas hücrelerine şilomikronlar olarak salgıyanırlar. Lipitlerin çoğu tükenen şilomikronlarla (şilomikron kalıntıları olarak bilinir) karaciğer tarafından emilir. Çalışmalar, karaciğere iletilen bu kalıntının, karaciğerin henüz işlemediği ve işlemesi gereken serbest yağ asitlerini hala içerebileceğini göstermiştir. Beslenme yoluyla alınan yağ, karaciğere bu iki yolla taşınır ve karaciğere verilen serbest yağ asitlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur (Unger 2003; Donnelly et al. 2005; Schreuder et al. 2008). Diyetle alınan glikoz ve yağ, yukarıda NAFLD'ye katkısını anlattığımız lipogenez ve trigliserit sentezinde yer alan genlerin ekspresyonu üzerinde uyarıcı etkiler uygulayan ChREBP ve SREBP-1c'nin aktivasyonu yoluyla de-nova lipogenez'in (DNL) önemli bir düzenleyicisidir (Iizuka et al. 2004; Biddinger et al. 2005; Lavoie and Gauthier 2006; Stefan et al. 2008). De novo lipogenez, karaciğerde asetil KoA'dan yağ asitleri ve trigliseridlerin sentezlenme süreçlerini ifade eden bir terimdir ve düzenlenmesinde ACC ile FAS gibi enzimler kilit rol oynamaktadır. Beslenme yoluyla kronikleşen karbonhidrat ve yağ alımı olduğunda, karaciğerde de novo lipogenez ve trigliserid birikimi artmaktadır ki bu durum NAFLD ile karakterize olmakla beraber doğal olarak hepatik steatoza ve/veya hipertrigliseridemiye neden olabilmektedir (Jensen-Urstad and Semenkovich 2012; Tamer and Ünal 2019).

1.5.4. Genetik ve epigenetik faktörler ve NAFLD gelişimi

Genetik faktörlerin NAFLD gelişimindeki rolü hala araştırılmaktadır. NAFLD, dünya çapındaki obezite epidemisi ile paralel olarak artmaktadır ve çevresel faktörlere ek olarak genetik faktörlerin kombinasyonu bu hastalığın ortaya çıktığı düşünülmektedir (Acay 2015; Hazer 2020). NAFLD'nin genetik yatkınlığı, hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynayabilir. Bu konuya ilişkin birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar, NAFLD'nin gelişiminde birden fazla genin etkili olduğunu göstermektedir. Bu genler arasında PNPLA3, TM6SF2 ve GCKR gibi genler yer almaktadır. Bu genlerin varlığı, NAFLD riskini artırabilir. Örneğin, TM6SF2 genindeki bir varyantın varlığı NAFLD riskini artırabilir ve hastalığın ilerlemesiyle ilişkilidir ve yine PNPLA3 genindeki bir varyantın varlığı da NAFLD riskini artırabilir ve hastalığın ilerlemesiyle ilişkilidir. PNPLA3 geninde bulunan bazı varyantların varlığı karaciğerdeki yağ asidi

1. GİRİŞ

metabolizmasını etkileyebilir, karaciğerde yağ birikmesine neden olabilir ve yağ birikmesinin ilerlemesine katkıda bulunabilir (Anstee and Day 2013; Eslam et al. 2018; Salameh et al. 2016; Sookoian and Pirola 2019; Tilson et al. 2021; Cherubini et al. 2021). Yine bu gende bulunan bir varyant karaciğerde inflamasyonu artırabilir ve bu da hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilir (Hassan et al. 2013). Bazı çalışmalarda ise GCKR genindeki bir varyantın varlığı karaciğer yağlanması azalmasına neden olabilir ve bu da NAFLD riskini azaltabilir (Kim and Park 2020). Bu genlere ek olarak SREBP1-c, PPAR- γ , PPAR- α , TNF- α , IL-6, CYP1A1, NRF-2 gibi birçok geninde NAFLD patogenezinde katkıda bulunduğu literatürde yer almaktadır. Bu konuda ki araştırmalar devam etmektedir (Zhang et al. 2014; Konger et al. 2017; Wang et al. 2021; Li et al. 2023).

Epigenetik, DNA diziliminde değişiklikler olmadan gen ekspresyonunu etkileyen kalıtsal bir fenomendir. NAFLD patogenezinde epigenetik değişikliklerin rolü hala araştırılmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, epigenetik değişikliklerin NAFLD patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Lee et al. 2017; Eslam et al. 2018; Sodum et al. 2021). Daha ayrıntılı ifade edecek olursak epigenetik mekanizmalar üç şekilde işler;

1. DNA metilasyonu,
2. Histon modifikasyonları,
3. RNA işleminin düzenlenmesi (Vickers 2014; Mohr and Mott 2015)

Bu epigenetik modifikasyonların hepatik lipid metabolizması, insülin direnci, endoplazmik retikulum stresi ile mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres yanıtı ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve bunların hepsi NAFLD'nin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (Pirola et al. 2013; Podrini et al. 2013; Lee et al. 2017). Epigenetik mekanizmalar geri dönüştürülebilir olduğu için ve lipid metabolizmasının bozulması epigenetik mekanizmalar üzerinden olabileceği için iyi bir terapötik hedef ve biyobelirteç potansiyeli göstermektedir (Lee et al. 2017).

1.6. NAFLD tedavisi

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) için onaylanmış bir ilaç tedavisi henüz bulunmamaktadır. Ancak birçok tedavi yaklaşımı vardır. İnsülin duyarlılaştırıcılar, antioksidanlar, antilipidemik ilaçlar ve antiinflamatuvar ajanlar NAFLD için umut verici etkiler göstermiştir (Paternostro and Trauner 2022; Acay 2015). NAFLD tedavisinde diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri de önemlidir. Bu değişiklikler arasında kilo kaybı, egzersiz ve sağlıklı beslenme yer alır (Sonsuz et al. 2011). Genel bir ifade kullanacak olursak NAFLD tedavi stratejileri üç başlıkta incelenir. Bunlar yaşam tarzı değişikliği, farmakolojik yaklaşımlar ve cerrahi dir.

1.6.1. Yaşam tarzı değişikliği

NAFLD için henüz ilaç tedavisi onaylanmadığı gerçeği göz önüne alındığında, yaşam tarzı değişiklikleri (diyet, fiziksel aktivite ve egzersiz) tedavisi önem arz etmektedir. Çünkü dengesiz ve düzensiz beslenme, egzersiz eksikliği NAFLD ve obeziteye neden olabilir. Bununla baş etmek ve NAFLD'nin önlenmesi ve tedavisi için; sağlıklı beslenme, kilo verme, fiziksel aktivite ve davranış değişikliklerini içeren bir yaşam tarzı değişikliği önerilir (Chalasanı et al. 2012). Bu tedavide amaç temel olarak vücut ağırlığını ve metabolik bozuklukları kontrol etmeyi amaçlar. Bunu sağlamak için metabolik kontrolün önemli bir belirleyicisi olan fiziksel aktivite ve egzersiz NAFLD'li bireylere önerilmektedir (Raza 2021). Buna ilaveten aşırı kalori tüketimi NAFLD için önde gelen bir risk faktörü olan obeziteye sebep olabilir ve NAFLD riskini artırabilir. Ayrıca vücutta yağ birikmesine neden olur ve bu da karaciğerde yağ birikmesine yol açabilir. Kalori kısıtlaması yapılarak hücrelerdeki oksidatif hasar azaltılarak metabolik yeniden programlama ve vücutta bulunan enerjinin etkin kullanımını sağlanabilir (Anderson and Weindruch 2010; Younossi et al. 2016). Yaşam tarzı düzenlemelerinin NAFLD tedavisi ve önlenmesi için önemli klinik sonuçlar ile katkısı açıklanmıştır. Egzersiz, beslenme içeriğinin ve saatinin düzenlenmesi tedavi sürecine açıkça katkıda bulunur.

1.6.2. Farmakolojik tedavi

Günümüzde NAFLD için herhangi bir sağlık otoritesi tarafından spesifik olarak kullanılması onaylanmış bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır. Ancak güncel olarak bu anlamda tedavi sürecine katkı sağlayan, katkısı muhtemel olan ve hala çalışmaları devam eden farklı ilaç ve ilaç grupları bulunmaktadır. Bunlar Metformin, Tiyazolidinediyonlar, Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) agonistleri, E vitamini, Pioglitazon, Ursodeoksikolikasid, Telmisartan, Statinler, Fibratlar, Ezetimib, Silimarin, Orlistat şeklinde ifade edilebilir. İlâveten bunlar tedavi süresince farklı süreç ve amaçlarla kullanılan ilaç grupları olarak literatürde yer almakta ve klinikte kullanım bulmaktadır. Ancak uluslararası kılavuzlarda sadece pioglitazon ve E vitamini NAFLD için ilaç olarak önerilmektedir (Anonim 2021).

1.6.3. Cerrahi

Cerrahi tedavi seçenekleri arasında bariatrik cerrahi yer alır. Bariatrik cerrahi ile kilo kaybı sağlanarak karaciğer yağlanması azaltılabilir (Anonim 2021).

1.7. *Cynara scolymus* (Enginar)

Enginar (*Cynara scolymus*) Asteraceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. *Cynara scolymus*, fenolik asitler içeren ve yaprakları kafeil kinik asit türevleri, flavonoidler, laktonlar, tanen, inülin içerir. Antioksidan içeren enginar, genellikle Akdeniz ülkelerinde yetiştirilmektedir (Öcal et al. 2019; Kılıçtaş 2021). Ancak subtropikal iklim bölgelerindeki kökeni fergetmeksizin *C. scolymus*, besinsel faydaları ve tıbbi özellikleri nedeniyle dünya çapında yetiştirilen bir bitki olmaya devam etmektedir (Lattanzio et al. 2009).

Enginar, biyoaktif ajan olarak işlev gören apigenin ve luteolin içerir. Ayrıca enginar çiçek başlarının toplam antioksidan kapasitesi, sebzeler içinde bildirilmişler arasında en yükseklerden biridir. Enginarda bulunan başka bir bileşik ise sinarindir. Sinarin'in çoğu yaprakların özünde bulunur, ancak kurutulmuş yaprakları ve sapları da sinarin içerebilir (Nassar et al. 2013; Miraj and Kiani 2016).

C. scolymus da bulunan sinarin ve klorojenik asit, 1, 3-okinik asit ile iki molekül kafeik asit 1, 3-di-okaffeoil kinik asit (sinarin) ve 5-o-kafeoil kinik asit (sirojenik asit) kombinasyonu ile oluşur. Bu bileşikler önemli antioksidanlardır (Salem et al. 2015). Enginar yaprağından elde edilen ekstraktların biyolojik bileşimi, düşük yağ içeriğine ve yüksek düzeyde minerallere (potasyum, sodyum ve fosfor), C vitamini, lifler, polifenoller, flavonlar, inülin ve hidrokisisinamatlar, kafeoilkinik asit türevleri içerir (Ceccarelli et al. 2010; Pandino et al. 2011; Salem et al. 2015).

Enginar, antik çağlardan beri, sadece sağlıklı bir besin değil aynı zamanda geleneksel tıpta ve dünya çapında bir ilaç olarak anılmaktadır. Hatta 16. yüzyıl Avrupa'sında enginar, kraliyet ve zenginler tarafından tüketilmesi amaçlanan "asil" bir sebze olarak da görülüyordu. Zaman ilerledikçe geleneksel Avrupa tıbbında ardından da 20. yy da geleneksel kullanımların modern tıbbi araştırmalarına başlanmış olup enginarın yaprak kısımları yüksek kolesterolü tedavi etmek, böbrekleri, safrayı ve karaciğeri uyarmak için ayrıyeten idrar söktürücü olarak da kullanım görmüştür (Salem et al. 2015).

1.7.1. Enginar yaprağı ekstresinin etkinlik potansiyeli

Enginar yaprağından yapılan ekstraktların etkinlik potansiyellerine dair birçok araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek verecek olursak anti-hiperlipidemik etkilerini incelemek üzere enginar ekstraktı üzerine yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda etkinliği kanıtlanmıştır (Joy and Haber 2007; Küskü Kiraz et al. 2010). Enginar ekstraktının reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde enginarın ROS ve lipit peroksidasyonunda azalmaya sebep olarak oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (Juzyszyn et al. 2008; Küskü Kiraz et al. 2010).

Aflatoksin uygulaması yapılarak sıçanlarda nörotoksisite, lipit profili, glikoz seviyesi ve insülin konsantrasyonunda düzensizlik gibi olumsuz etkiler oluşturulan bir çalışmada enginar yaprağı ekstresi ile tedavi uygulandığında aflatoksin maruz kalmanın neden olduğu histopatolojik özelliklerin hafiflediği görülmüştür (İbrahim et al. 2022).

1. GİRİŞ

Enginar ekstraktının içerdiği polifenolik bileşenler, güçlü antioksidanlar olarak günümüzde kabul görmektedir. Özellikle bu bileşenlerden kafeoilkinik türevlerinden biri olan klorojenik asit, HIV, kanser, glikoz metabolizması gibi birçok alanda etkinliği değerlendirilmiş ve klorojenik asitin sıçanlarda kolorektal kanser için kimyasal olarak indüklenen öncü lezyonlar üzerine yapılan bir çalışma sonuçlarına göre klorojenik asit uygulanan grupta bu lezyonların hem önlenmesinde hem de azaltılmasında önemli sonuçlar elde edilmiştir. Doku kültürlerinde HIV replikasyonu üzerine yapılan başka bir araştırmada ise kafeoilkinik asitlerin potansiyel olarak önemli bir HIV inhibitörleri sınıfı olduğu bulunmuştur. Bu gibi birçok çalışma klorojenik asidin kanserojen reaksiyonları önlemede etkili olduğunu ve gelecek için umut verici olabileceğini tespit etmiştir (Salem et al. 2015).

Enginar yaprağının diyabet üzerine etkinliği de merak edilmiş ve araştırılmıştır. Bu konuda yapılan bir araştırma, enginar yaprağında bulunan klorojenik asidin, diyabetik hastalarda bulunan yüksek oranlarda glikoz çıkışı riskini önleyerek glikoz metabolizmasını düzenlemeye yardımcı olduğunu tespit etmiştir (Salem et al. 2015).

Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet modeli kullanılarak hastalık modeli oluşturulan sıçanlarda enginar yaprağı ekstraktı uygulamasının ardından özellikle bu uygulamanın antioksidan etki başta olmak üzere güçlü yararlı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin muhtemelen enginar yaprağında bulunan fenolik bileşiklerinin bir sonucu olarak antioksidan etkinin yanında obezite gelişimini ve kalp hasarını azaltmada da etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları enginar yapraklarının kalp problemlerini ve obezite komplikasyonlarını önlemek için potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Salem et al. 2022).

Karaciğer yağlanması üzerine yapılan çalışmalar da mevcut olup örneğin; yüksek yağlı diyet (HFD)'le beslenen sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada enginarın yabani tipinin sıçanlarda oluşan hiperglisemiye ve yüksek serum toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerine karşı koyduğu bulunmuştur. Bu etki, HFD ile beslenen sıçanlarda görülen karaciğer yağlanmasının önemli ölçüde engellenmesi ile ilişkili olarak gerçekleşmiştir (Oppedisano et al. 2020). Başka bir çalışma ise enginar yaprağı ekstresi takviyesi uygulandığında, NAFLD gelişimi sırasında hepatositlerdeki enflamasyonun ve

1. GİRİŞ

apoptozun doğrudan baskılandığını göstererek enginar yaprağının etkinlik potansiyelini desteklemiştir (Lee et al. 2021).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Değişen diyet ve yaşam tarzı alışkanlıkları ile abdominal obezite gibi metabolik sendrom hastalıklarının prevalansında artış gözlenmektedir. Bu hastalıklara ilave olarak kronik hastalıklarda ve bir diğer metabolik sendrom bileşeni olan alkole bağlı olmayan (non-alkolik) yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) görülme sıklığında da istenmeyen bir artış görülmektedir (Araújo et al. 2018). Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), ciddi miktarda alkol tüketimi olmaksızın hepatositlerde trigliseridlerin patolojik birikimi olarak ifade edilebilir (Adams et al. 2005).

NAFLD'nin asemptomatik ilerleyişi, yüksek prevalansı ve potansiyel hepatik ve ekstrahepatik sonuçları olması nedeniyle küresel bir sağlık sorunu olarak değerlendirilmektedir (Riazi et al. 2022).

2018 de yapılan bir meta-analiz, NAFLD olan hastaların NAFLD olmayanlara göre en az iki kat daha fazla tip2 diyabet geliştirme (T2DM) riskine sahip olduklarını ve "şiddetli" NAFLD ye sahip olan hastaların T2DM geliştirme riskinin daha da çok olduğu tespit edilmiştir (Mantovani et al. 2018).

NAFLD, alkolsüz steatohepatit (NASH), karaciğer fibrozu ve inflamasyon dahil olmak üzere geniş bir hepatik fenotip yelpazesini kapsayan karmaşık bir hastalık olmakla beraber, NAFLD ilerlemesinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, NAFLD olan hastalar için etkili tedavi stratejileri ve ilaç destekleri bulunmamaktadır (Wen et al. 2020; Tilg et al. 2021).

Gorinstein et al. (2009) ve birçok araştırmacının yapmış olduğu çalışmalar göstermektedir ki çeşitli bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşiklerin obezite ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimini, ilerleyişini önlemede olumlu etkileri bulunmaktadır.

Bagherniya et al. (2018). terapötik ajan olarak geleneksel tıbbi tedavilerin oluşturabilecekleri potansiyel olumsuz etkiler nedeniyle, bitkisel ilaçlar ve fonksiyonel gıdalar gibi doğal ve güvenli sayılan ürünler olan tamamlayıcı tedaviler niteliğindeki

2. KAYNAK ÖZETLERİ

bitkilerin kuru materyal veya özlerinin potansiyel etkilerinin araştırılmasına odaklanan çalışmalarla bitkilerin farmakolojik etkinliğini araştırmayı teşvik eder.

Çeşitli farmakolojik test sistemleri üzerinde yapılan çalışmalarda enginar yaprağı ekstresinin antioksidatif, anti-HIV bütünleyici, karaciğer koruyucu, safrayı atımı sağlayan, anti-mikrobiyal ve lipid düşürücü etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Kraft 1997; McDougall et al. 1998; Llorach et al. 2002; Wang et al. 2003; Salem et al. 2015).

Panahi et al. (2018) enginar yaprağı ekstresinin yerleşik NAFLD'ye sahip hastalarda terapötik faydası olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada NAFLD yanıtı, karaciğer ultrasonu ve aspartat aminotransferaz (AST)/alanin aminotransferaz (ALT) oranı ve AST- trombosit oran indeksi (APRI) skoru ve pek çok parametre dikkate alınarak değerlendirilmiştir ve bu çalışma, NAFLD'li hastalarda ALE takviyesinin hem ultrason karaciğer parametreleri hem de karaciğer serum parametreleri üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğunu belirlemiştir.

Castellino et al. (2019) metabolik sendromlu deneklerde klorojenik asit ve türevleri ile luteolin ve türevlerini içeren Altilix® ile 6 aylık uygulanan takviyenin kardiyovasküler risk ve hepatik belirteçler üzerindeki etkilerini belirlemek üzere yapılan bir çalışmada hepatik ve kardiyo-metabolik parametrelerin iyileştiği tespit edilmiştir.

Oppedisano et al. (2020) çalışmasına göre *Cynara Cardunculus* vahşi tip yaprak özütü ile yaptıkları çalışmada, dört haftalık bir süre boyunca HFD ile beslenen sıçanlarda yaprak özütünün hiperglisemi ve yüksek serum toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerine karşı koyduğu bulunmuştur.

Lee et al. (2021)'un yapmış olduğu çalışmalar enginar yaprağı takviyesinin, NAFLD gelişimi sırasında hepatositlerdeki enflamasyonu ve apoptozu direk baskılamaya yardımcı olduğunu göstermektedir.

Majnooni et al. (2021) yapmış olduğu bir çalışmada, enginar yaprağı ekstresi takviyesinin metformin ve E vitamini ile birlikte uygulaması yapılmıştır ve sonuçlar

2. KAYNAK ÖZETLERİ

NAFLD'li hasta bireylerde karaciğer fonksiyon komplikasyonlarını iyileştirme üzerine etkinliği tespit edilmiştir.

Piccinini et al. (2022) *Cynara cardunculus* yaprağıyla elde edilen etanol ekstraktının, NAFLD gibi bir metabolik sendrom parametresi olan obezite üzerine olan etkinliği için yaptıkları çalışmada, yüksek yağlı diyetle indüklenen obez farelerin hipotalamus, prefrontal korteks, hipokampus, striatum, serebral korteks ve karaciğerdeki enflamatuar ve oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisini inceledi ve hayvanlarda oluşan enflamatuar ve oksidatif hasar parametrelerinde oluşan olumsuz değişiklikleri ve antioksidan savunmadaki zayıflatılmış değişiklikleri kısmen tersine çevirdiği görüldü.

Acquaviva et al. (2023) çalışmasına göre enginarın vahşi tipi olan *Cynara cardunculus* dan elde edilen ekstrakt antioksidan savunmada yer alan bazı proteinlerin (Nrf2, Gpx ve SOD1) mRNA ekspresyonunu arttırdı ve modifiye edilen enflamatuar sitokinlerin (IL-6, TNF- α ve IL-1 β) mRNA seviyelerini düşürdü.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışması süresince kullanılan cihazların listesi aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında yararlanılan cihazlar ve modelleri

CİHAZ ADI	MODELİ
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
Analitik Terazi (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
CO ₂ 'li İnkübatör	ESCO Celculture
Derin dondurucu	– 86 Esco, uus-439b
Isıtılıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Otoklav	JSR, JSAC-60
PCR Cihazı	SensoQuest
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Real-time PCR Cihazı	Qiagen Rotor-Gene Q
pH Metre	OHAUS ST3100F

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kitler ve kimyasalların listesi aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasal/Kit	Firma
RPMI-1640	Gibco®
Tripan Blue	Sigma-Aldrich®
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich®
PBS	BİOSHOP
CVDK-8 Kit	Ecotech Biotechnology®
DMSO	Sigma-Aldrich®
Etanol	Sigma-Aldrich®
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco®
Sybr Green Master Mix	Ampigene® qPCR Green Mix
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™®

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Bu tez çalışması süresince kullanılan çözeltilerin listesi ve hazırlanış protokolleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

ÇÖZELTİ ADI	HAZIRLANIŞI
1. RPMI-1640 Besiyeri	Hazırlanması planlanan medium miktarının %10'u kadar FBS, %1'i kadar penisilin/streptomisin içeren RPMI besiyeri içerisine eklenerek, full medium olacak şekilde hazırlandı ve kullanım süresince +4°C'de muhafaza edilmiştir.
2. PBS	PBS bir tablet için 100 mL dH ₂ O kullanılarak hazırlanmıştır. Ardından otoklavlanarak kullanılmıştır.
3. Freezing Besiyeri	%10 FBS içeren full RPMI besiyerine %10 oranında DMSO eklenerek hazırlanmaktadır.
4. Oleik Asit İçeren Besiyeri	Yukarıda ifade edilen şekilde hazırlanmış %10 FBS içeren 50 mL full medium'un içine 0,1 mM oleik asit eklenerek hazırlanmıştır ve kullanımdan önce 0,22 uM sterile filtreden geçirilmiştir.

Çizelge 3.3. (devam)

<p>5. %4 Paraformaldehit Çözeltisi</p>	<p>25 mL %4'lül paraformaldehit hazırlamak için ısıtıcıly manyetik karıştırıcının üzerine bir cam behere 24 mL 1X PBS eklenir v ardından yaklaşık 60°C'ye kadar karıştırılarak ısıtılır. Kaynamamasına dikkat edilir. Isıtılmış PBS çözeltisine 1 g paraformaldehit tozu eklenir. Toz hemen çözelti içinde çözülmez. Çözelti berraklaşana kadar bir pipet yardımıyla damla damla 1 N NaOH ekleyerek pH'ı yavaşça yükseltilir bu işlem şeffaflaşma görüldüğü anda kesilir. Çözülme sağlandıktan sonra çözelti soğutulmalı ve filtrelenmelidir. Ardından çözelti hacmi 1X PBS ile 25 mL'ye tamamlanır. pH'ı kontrol edilir ve az miktarda seyreltik HCl ile pH yaklaşık 6,9'a ayarlanır. Bu çözelti 2-8°C'de bir aya kadar saklanabilir (Anonymous 2023a).</p>
<p>6. %0,35 Stok ORO Boya Solüsyonu</p>	<p>10 mL stok %0,35 ORO solüsyonu hazırlamak için öncelikle 35 mg toz ORO boyası tartılır. 10 mL saf izopropanol içerisinde çözülür. 0,22 um boyutunda filtre kullanılarak iki kez filtreden geçirilir. Kullanımdan önce (3:2) ddH₂O kullanılarak seyreltilir (Alkhatatbeh et al. 2016).</p>
<p>7. %60 İzopropanol</p>	<p>50 mL %60 izopropanol solüsyonu hazırlamak için 30 mL saf izopropanol üzerine 20 mL ddH₂O eklenerek hazırlanır.</p>
<p>8. Enginar Yaprağı Sulu Ekstresi</p>	<p>Kuru enginar yaprakları toz haline getirildikten sonra ddH₂O eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. Ardından süzülüp, 0,22 um filtreden geçirilip, sterilizasyonu sağlanmıştır.</p>
<p>9. 70%'de Etanol (300 mL için);</p>	<p>Deney süresince sterilizasyonun sağlanması amacıyla kullanılmış. 210 mL Etil Alkol dH₂O ile 300 mL ye tamamlanarak hazırlanmıştır.</p>

3.4. Enginar Yaprağı Ekstresi

Laboratuvar ortamında kurutulan enginar yaprakları Bursa'dan toplanmıştır ve laboratuvar ortamında toz haline getirilmiştir. Ardından istenen konsantrasyonlarda hazırlanmak üzere yaprakların üzerine ddH₂O eklenmiş, oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve süzölmüştür. Ardından sterilizasyonun sağlanması amacıyla 0,22 uM filtreden geçirilmiştir ve bu çalışmada kullanılan en yüksek doz olan 300 mg/L konsantrasyon hazırlanmıştır. Elde edilen en yüksek konsantrasyondan seyreltilerek diğer dozlar (150-100-50 mg/L) elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Enginar yaprağının toz haline getirilmiş halinin görüntüsü

3.5. HPLC-DAD Analizi

Bitkinin fenolik bileşik analizleri HPLC (Agilent 1260 infinity series) ile yapılmıştır. Hareketli fazlar A %83 (%0,1 suda fosforik asit) ve C %17 (%100 asetonitril) idi. Akış hızı 0.8 ml/dk idi. Enjeksiyon hacmi 10 ml idi. Sıcaklık 30 °C'ye ayarlandı. Analiz için Ace Generix (4,6 mm×250,5 µm) C18 kolonu kullanıldı. Elüsyon gradyanı 0-7 dakikaydı; %83 A %17 C, 7-20 dk; %85 A %15 C, 20-24 dk; %80 A, %20 C, 24-28 dk; %75 A, %25 C, 28-30 dk; %70 A, %30 C, 30-32 dk; %60 A, %40 C, 32-36 dk; %50 A, %50 C, 36-40 dk; %30 A, %70 C, 40. dk; %83 A, %17 C. Saptama 300/200 nm'de gerçekleştirildi (Çayan et al. 2020; Çelikezen et al. 2022).

3.6. *In vitro* Çalışmalar

3.6.1. HepG2 hücre hattının kültüre edilmesi

Bu tez çalışması için, insan karaciğer (HepG2 (ATCC, US)) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler RPMI-1640 besin ortamı kullanılarak, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren tamamlanmış besiyeri olarak hazırlanmıştır. T-25 ve T-75 flasklar kullanılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Hücre yoğunluğuna bakılarak ve deneysel şartlar gözetilerek flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşıncaya kadar her 2-3 günde bir, hücrelerin besiyeri değiştirilmiştir (Gaafar et al. 2013).

Deneylei gerçekleştirmek üzere kuyucuklu plakalara ekim yapmak, PCR'gerçekleştirmek, hücreleri çoğaltmak amacıyla pasajlamak ve hücrelerin stoklanması için dondurmak üzere bir dizi adım gerçekleştirilir. Öncelikle flasklardan besiyerleri uzaklaştırılarak PBS (Phosphate Buffered Saline) kullanılarak yıkama işlemi yapılır ve ardından kültür kaplarına, 25'lik kültür kapları için 500 ul, 75'lik kültür kapları için 1,5 mL olacak şekilde tripsin-EDTA (0,25) ilave edildi ve 37°C'de 3-5 dakika inkübasyon yapılarak hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması sağlandı. Tripsin etkinliği daha sonra, kullanılan tripsin-EDTA miktarının en az iki katı büyüme besiyeri eklenerek inhibe edildi ve toplanan hücreler 15 ya da 50 mL'lik steril tüplere alınarak 1.500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj cihazı kullanılarak çöktürüldü. Çöktürme sağlandıktan sonra falkonlar sarsmadan alındı, süpernatant atıldı sonra hücreler, hangi amaçla kaldırılmışsa ona uygun, belirlenen miktarlarda tamamlanmış RPMI besiyeri içerisinde yeniden süspanse edildi.

Hücreleri dondurmak için ise yukarıda ifade edildiği şekilde hücreler flasklardan kaldırılarak %10 oranında DMSO içeren full besiyeri ile hazırlanan freezing besiyeri içerisinde alınarak kriyo tüplere aktarılırlar ve kademeli olarak +4°C'de yarım saat, -20°C'de 50-90 dk boyunca bekletildikten sonra -80°C'de saklanmıştır. Ardından sıvı azotta muhafaza edilmiştir.

3.6.2. NAFLD modeli oluşturmak üzere hücre kültürü ve hücre tedavisi

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin solüsyonu ile desteklenmiş RPMI ortamında kültürlenmiştir. Kültür, nemlendirilmiş %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edilmiştir. *In vitro* koşullar altında hepatik steatozda aşırı lipit birikimini indüklemek için HepG2 hücrelerinde model oluşturulmuştur. Bu şu şekilde yapıldı hücreler 6 gruba ayrıldı:

- (1) Sağlıklı Kontrol (K),
- (2) NAFLD Grubu (M),
- (3) Enginar yaprağı ekstresi içeren tedavi grubu (300 mg/mL),
- (4) Enginar yaprağı ekstresi içeren tedavi grubu (150 mg/mL),
- (5) Enginar yaprağı ekstresi içeren tedavi grubu (100 mg/mL),
- (6) Enginar yaprağı ekstresi içeren tedavi grubu (50 mg/mL)

Gruplar belirlendikten sonra kuyulara kuyu başına 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla %5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubu (1) hariç, kalan hücre grupları 48 saat boyunca 0,1 mM oleik asit maruziyetine bırakılmıştır. Enginar yaprağı, dH₂O içinde çözülmüş, 0,22 uM filtreden geçirilmiş ve sterilizasyonu sağlanmış olup hücrelere uygulanan 48 saatlik oleik asit tedavisinin son 24 saati boyunca farklı konsantrasyonlarda (50-100-150-300 mg/mL) enginar yaprağının sulu ekstresi ile inkübe edilmiştir (Xia et al. 2019).

3.6.3. Yağ kırmızısı O (ORO) boyama

İzopropanol içinde %0,35 Oil Red O (ORO) içeren bir stok solüsyon çözeltisi hazırlanmıştır. 0,22 um'lik bir filtre kullanılarak iki kez süzölmüş ve kullanımdan önce çift damıtılmış H₂O (ddH₂O) içinde 3:2 oranında seyreltilmiştir. Hücresel lipit birikimini ölçmek için oleik asit ile tedavi edilmiş HepG2 hücreleri PBS ile hafifçe yıkaması sağlandı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca %4 paraformaldehit kullanılarak sabitlenmiştir. Daha sonra, hücrelerden paraformaldehit çekilip atılmış ve ddH₂O

kullanılarak iki kez yıkanmıştır. Ardından oda sıcaklığında 20 dakika boyunca Oil Red O solüsyonu ile boyama yapılmıştır. Boya kuyulardan çıkarıldıktan sonra arka planda oluşan kirliliği gidermek adına hücreler %60 izopropanol solüsyonu ile 5 dakika boyunca yıkama yapılmıştır. Mikroskop altında izlenerek lipid damlacığı birikimi saptanmıştır. Hücre içi lipid birikimini ölçmek için ise kuyulara saf izopropanol eklenerek ORO ekstre edildi ve optik yoğunluk bir spektrofotometre kullanılarak 510 nm'de saptandı (Alkhatatbeh et al. 2016).

3.6.4. WST-8 testi

Hücre canlılığı, üreticinin kılavuzuna göre CVDK-8 (Ecotech Biotechnology, Türkiye) kiti kullanılarak ölçülmüştür. Bunun için aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1. Öncelikle hücreler 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 1×10^3 - 1×10^4 hücre olacak şekilde Thoma lamı yardımıyla sayılarak ekilmiştir ve hücre tutunmasını desteklemek için 24 saat boyunca uygun kültür koşulları altında (37°C , %5 CO_2) tutulmuştur.
2. Daha sonra kuyular boşaltılmış ve HepG2 hücreleri oleik asit varlığında hazırlanan medium ortamıyla 48 saat süreyle inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyonun son 24 saatinde kuyulara farklı konsantrasyonlarda (50-100-150-300 mg/L) Enginar Yaprağı sulu ekstresi eklenmiştir. Her konsantrasyon için 4 tekrar olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak tamamlanmış RPMI besiyerinden 100 μL , negatif kontrol olarak oleik asit içeren full besiyeri ve pozitif kontrol olarak H_2O_2 içeren, oleik asitli full RPMI besiyerinden 100 μL ilave edildi. Ardından 37°C 'de %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa protokolde belirtilen oranda CVDK-8 reaktifi eklenmiştir ardından 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca saat başı her örneğin absorbansı bir mikropłaka okuyucuda (Synergy-HT; BioTek Winooski, VT, ABD) 450 nm'de ölçülmüştür. Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Xia et al. 2019; Tanas et al. 2022).

%Hücre Canlılığı= (Deney grubunun OD değeri /Kontrol grubunun OD değeri x 100).

3.6.5. TAS-TOS analizi

Toplam antioksidan kapasite ve total oksidatif durumun belirlenmesi için TAS-TOS (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanılmıştır ve üreticinin kitle önerdiği protokol takip edilerek önce örnekler ardından kitle bulunan reaktif 1 ve reaktif 2 kuyulara eklenmiştir. Oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında kitle belirtilen absorbans değerleri dikkate alınarak spektrofotometrede ölçüm alınmıştır.

3.6.6. Enginar yaprağının sulu ekstresi ile muamele edilmiş hepg2 hücre hattında oleik asitle oluşturulmuş nafld modeli üzerinde nafld ile ilişkisi belirlenen bazı genlerin ekspresyon analizi

HepG2 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Enginar yaprağı sulu ekstresi ile muamele edilen hücrelerden RNA izolasyonu Ecotech Biotechnology®'nin EcoPURE total RNA kiti kullanılarak kitin içinde bulunan üreticinin önerdiği protokole göre yapılmıştır. RNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır;

1. HepG2 hücreleri tripsin-EDTA (0.25) kullanılarak kaldırılmıştır. Ardından 1.200 rpm de oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür.
2. Ardından süpernatant atılır. Dipte kalan pelletin üzerine 500 ul PBS eklenerek yıkama yapılır. Tekrar santrifüj edildi ve süpernatant atılmıştır.
3. Pelletlenmiş hücrelere her grup için, her 400 ul için 4 ul B-merkaptoetanol eklenmiş EcoPURE parçalama/bağlama tamponu eklenmiştir. Yavaşça pipetaj yapılır ve ardından tamamen çözülene kadar 10 saniye vortekslenmiştir.
4. Elimizde bulunan lizata 400 ul (%96-100) etanol eklendi ve 10 saniye vortekslenmiştir.
5. Ardından EcoPURE kolonu toplama tüpüne yerleştirildi ve elimizde bulunan totalde 800 ul lizattan 700 ul alınıp kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında, 30 saniye boyunca masaüstü santrifüjde maksimum hızda santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda kalan 100 ul lizatta kolona eklenmiş ardından tekrar santrifüj edilmiştir. Bu adım ihtiyaç duyulması halinde tekrarlanmıştır.

6. Tüpte biriken sıvı atılır ve EcoPURE kolonuna kitte bulunan 400 ul EcoPURE yıkama tamponu 1 eklenmiştir. Oda sıcaklığında, 30 saniye boyunca masaüstü santrifüjde maksimum hızda santrifüj edildi. Altta biriken sıvı atılmıştır.
7. Kit protokolüne göre 32 mL %100 etanol eklenerek hazırlanmış EcoPURE yıkama tamponu 2 kolona 500 ul olacak şekilde eklendi. Ardından oda sıcaklığında, 30 saniye boyunca masaüstü santrifüjde maksimum hızda santrifüj edildi. Altta biriken sıvı atılmıştır.
8. Ardından kolona 200 ul EcoPURE yıkama tamponu 2 eklenmiştir ve kalan yıkama tamponunu tamamen çıkarmak için oda sıcaklığında, masaüstü santrifüjde maksimum hızda 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
9. EcoPURE kolonu temiz, RNaz içermeyen 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış.
10. Ardından kolon membranının merkezine pipetle damla damla olacak şekilde 50-100 ul EcoPURE elüsyon tamponu eklendi ve kolon oda sıcaklığında 1-3 dakika inkübe edildi. Sonrasında 30 saniye boyunca, oda sıcaklığında, masaüstü santrifüjde maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
11. Kolon atıldı. Kısa süreli kullanım için -20 derecede, uzun süreli kullanım için ise 1 seneye kadar -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Spektrofotometrik RNA Ölçümü

İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı Epoch cihazı ile belirlendi. RNA miktarı $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçüldü. cDNA sentezi için tüm RNA'lar $500 \mu\text{g/mL}$ 'ye eşitlendi.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi için "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems™) kullanılmıştır ve üreticinin önerdiği prosedür izlenmiştir. Buna göre cDNA sentezi için kısaca aşağıdaki basamaklar izlenmiştir;

3. MATERYAL ve YÖNTEM

1. İzole edilen RNA'lar buz üzerine alındı. Kitten çıkan maddelerde buz üzerine dizildi.
2. Total miktar 20 µl olacak şekilde RNA ve otoklavlanmış ultrapure su miktarları RNA miktarları eşitlenerek hesaplanmıştır.
3. Kitte bulunan 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0,8 µl 25XdNTP mix, ve en son olarak 1µl MultiScribe™Reverse Transcriptase enzimi kullanılarak bir mix hazırlanmıştır.
4. Hazırlanan PCR tüplerine örnek adlarıyla etiketleme yapılır. Önce su ardından RNA ardından hazırlanan mix karışımından her tüpe 5,8 µl paylaşmıştır.
5. Hazırlanan örnekler termal döngü cihazına yerleştirilerek 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde planlanan programa göre yapılmıştır.
6. PCR sona erdikten sonra örneklerin üzerine 60 µl olacak şekilde ultrapure otoklavlı su eklenir. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.4. cDNA sentezi için uygulanan PCR programı

cDNA Sentezi İçin Uygulanan PCR Programı				
PZR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Çizelge 3.5. cDNA reaksiyonu bileşenleri

cDNA Reaksiyonu Bileşenleri	
Bileşik	Hacim (µl)
10X RT Tamponu	2,0
25X dNTP karışımı (100mM)	0,8
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1,0
10XRT Random Primer	2,0
Nükleaz içermeyen H₂O	14,2-x
Örnek RNA	x
Reaksiyon Toplamı	20,0

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Enginar yaprağı sulu ekstresi ile muamele edilen hücrelerden elde edilen RNA'lerden sentezlenen cDNA'lar ile seçilen genlere ait mRNA seviyelerinin belirlenmesi için spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifiye edildi. Amplifiye edilen genlere ait primerlerin sekansları aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. PCR reaksiyonunda kullanılan genlerin primerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Primerler		
Gen Sembolü	Forward	Reverse
PPAR- γ	ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGA	ATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT
PPAR- α	TGCAAACCTGGACTTGAACG	TGATGTCACAGAACGGCTTC
NRF-2	TGACAAGCTGGTTGAGAC	AGAGGATGCTGCTGAAGG

Real Time-PCR iki tekrarlı olarak aşağıdaki plana göre yapılmıştır. Aşağıdaki plan uygulanmıştır.

Çizelge 3.7. Uygulanan RT-PCR programı

RT-PCR X 40 döngü				
	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	95°C	95°C	58°C	72°C
Zaman	3dk	5sn	10sn	15sn

Her bir örnek için 2 μ l cDNA, 3 μ l Sybr Green Master Mix (Ampigene® qPCR Green Mix), 4,4 μ l nükleaz içermeyen su ve ayrı ayrı 0,3 μ l primer olacak şekilde RT-PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım vortekslendi ve örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini spin cihazında 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Çizelge 3.8. RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşik	Hacim(μ l)
cDNA	2,0
Forward Primer	0,3
Reverse Primer	0,3
Sybr Green Mix	3,0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,4
Reaksiyon Toplamı	10,0

Hazırlanan örnekler Qiagen Rotor-Gene Q Real-Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. Isı koşulları 95°C’de 3 dakika, 95°C’de 5 saniye 58°C’de 10 saniye ve 72°C’de 15 saniye 40 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanılmıştır. RT-PCR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında 2- $\Delta\Delta$ CT metodu kullanıldı.

3.7. In vivo Çalışmalar

3.7.1. In vivo deneysel NAFLD modelinin indüklenmesi

Bu çalışmada kullanılan ratlar Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (ATADEM) temin edilmiş olup deneyde yetişkin 200-300 gram ağırlığında Sprague Dawley ırkı toplam 15 adet dişi rat kullanılmış. Deney başlangıçta olduğu gibi yine 15 adet rat ile tamamlanmıştır. Hayvanlar standart ışık 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ve 25°C ısıda, ad-bilitum olarak su ve yeme erişim sağlayarak standart plastik kafeslerde deney sonuna kadar bekletilmiştir. Çalışmanın tüm uygulamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından verilen 31.05.2022 tarihli ve E-75296309-050.01.04-2200160418 sayılı yazısı ve 103 nolu karar ile onaylanmıştır.

Deneysel NAFLD modeli oluşturulacak sıçanlar rastgele olarak normal diyet (ND) veya yüksek yağlı diyet (HFD) alan iki diyet rejimine ayrılmıştır. Normal diyet (ND) grubu (Grup 1), (n=5) düzenli bir yemek diyeti ile beslenmiştir ve HFD grubu (Grup 2) (n=10) 3 hafta süreyle yüksek oranda yağ içeren diyet ile beslenmesi sağlanmıştır. 3

3. MATERYAL ve YÖNTEM

haftalık HFD beslemenin ardından sıçanlar test bileşiği olan enginar yaprağı sulu ekstresi ile tedavi edilmiştir. Hayvanlara 2 hafta boyunca HFD uygulamasıyla eş zamanlı olarak günde bir kez oral yoldan (gavaj) musluk suyu içinde çözülmüş enginar yaprağı süspansiyonu uygulanmıştır. Deney için çalışma grupları ve hayvan sayıları aşağıda belirtildiği şekilde planlanmıştır.

Çizelge 3.9. Deney planı

Deney Grupları	Hayvan Sayıları(n)	Uygulanan Madde	Uygulanan Doz	Uygulama Süresi	Diyet Tipi
Sağlıklı Kontrol Grubu	5	-	-	5 hafta	Normal
NAFLD Grubu	5	Yüksek yağlı yem		5 hafta	HFD
EYSE Grubu	5	Enginar yaprağı sulu ekstresi	100 mg/L	5 hafta	HFD

Sağlıklı Kontrol Grubu: Ratlara herhangi bir işlem uygulanmamış olup, günlük yaşamlarını devam ettirmişlerdir.

NAFLD Grubu: Ratlarda NAFLD modeli oluşturmak için çalışma grubunda bulunan ratlar deney süresince yüksek yağlı diyetle beslenmiştir. Yüksek yağlı yeme ad-bilitum olarak erişim sağlamışlardır.

EYSE Grubu: Ratlara 3 hafta HFD besleme ardından eş zamanlı olarak 2 hafta daha enginar yaprağı sulu ekstresi oral yoldan gavaj yardımıyla her gün uygulanmıştır.

5 hafta sonra tüm ratlara intraperitoneal olarak ketamin, ksilazin ve sevofluran anestezipleri uygulanmıştır. Batın açılıp yaklaşık 5 ml kan abdominal aorttan alınarak EDTA'lı tüplere konulmuştur.

3.7.2. Ağırlıkların ölçülmesi ve örneklerin toplanması

Tüm gruplardaki ratların enginar yaprağı uygulamaları öncesinde ve süresince vücut ağırlıkları kaydedilmiştir. Vücut ağırlıkları deney süresince haftalık olarak takip edilmiştir, farklılıklar belirlenmiştir. 5 hafta sonunda tüm hayvanlara anestezi uygulanmıştır ve abdominal aorttan kan örnekleri alınmıştır. Karaciğer, beyin gibi istenilen iç organlar hemen çıkarılmış ve daha sonra değerlendirilmek üzere sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.3. Biyokimyasal analizler

Ketamin, ksilazin ve sevofluran anestezisi altına alınan tüm gruplardaki ratların batını açılıp yaklaşık 5 ml kan biyokimyasal analizlerde değerlendirilmek üzere intrakardiyak yöntemle alınarak EDTA'lı tüplere konulmuştur. Alınan örneklerin biyokimyasal analizleri Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya laboratuvarından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. Hematolojik analizler

Ketamin, ksilazin ve sevofluran anestezisi altına alınan tüm gruplardaki ratların batını açılıp enjektörle yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntemle alınarak heparinli tüplere konulmuştur. Alınan örneklerin hematolojik analizleri Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya laboratuvarından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.5. Histopatolojik analizler

Histopatolojik inceleme

Deney bitiminde alınan doku örnekleri %10' luk formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edilip, rutin doku takip işlemleri sonunda parafin bloklara gömüldü. Her blokta 4 µm kalınlığında kesitler alınıp histopatolojik inceleme için hazırlanan

preparatlar hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Olympus BX 51, JAPONYA). Kesitler histopatolojik özelliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal inceleme

İmmunoperoksidaz inceleme için adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan doku kesitleri deparafinize ve dehidre edilmiştir. Ardından % 3'lük H₂O₂ de 10 dk tutularak endojen peroksidaz inaktive edilmiştir. Daha sonra dokular %1' lik antiijen retrieval (sitrat buffer (pH+6,1) 100X) solüsyonunda kaynatıldı ve oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Dokularda non-spesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından dokulara primer antikor (Caspase 3 Kat No: sc-56053, Sulandırma Oranı: 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edilmiştir. Dokularda kromojen olarak 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kromojeni kullanılmıştır. Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Zeiss AXIO ALMANYA) ile incelenmiştir.

Double immunofloresan inceleme

İmmunoperoksidaz inceleme için adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan doku kesitleri, deparafinize ve dehidre edilmiştir. Ardından %3'lük H₂O₂ de 10 dk tutularak endojen peroksidaz inaktive edilmiştir. Daha sonra dokular %1' lik antiijen retrieval (sitrat buffer (pH+6,1) 100X) solüsyonunda kaynatılmış ve oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Dokularda nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından dokulara primer antikor (8-OHdG Kat No: sc-66036, Sulandırma Oranı: 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edilmiştir. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikor kullanılıp (FITC Cat No: ab6785 Dilüent Oranı: 1/100) karanlık ortamda 45 dk bekletilmiştir. Ardından dokulara ikinci primer antikor (JNK Kat No: sc-514539, Sulandırma Oranı: 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edilmiştir. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikor kullanılıp (Texas Red Cat No: ab6719 Dilüent Oranı: 1/1000 UK) karanlık ortamda 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra kesitlere mounting medium' lu DAPI (Kat no: D1306 Sulandırma Oranı: 1/200 UK) damlatılıp 5 dk karanlık

ortamda bekletildikten sonra kesitler lamel ile kapatılmıştır. Boyanan kesitler floresans ataçmanlı mikroskopta incelenmiştir (Zeiss AXIO ALMANYA). Kesitler immun pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analiz

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi histopatolojik analizler dışında GraphPad Prism 9.5.1 versiyonu ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için çift yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

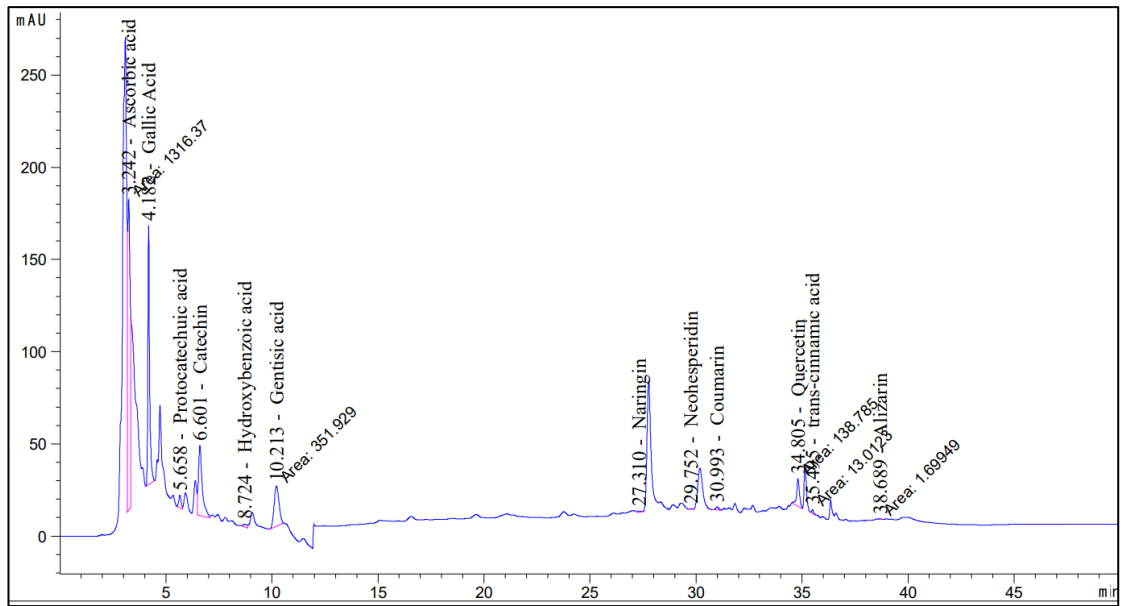
Histopatolojik incelemelerde ise istatistiksel analiz için SPSS 13.0 programı kullanılmış ve $p<0,05$ anlamlı kabul edilerek veriler değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırılmada Duncan testi kullanılmıştır. Grup etkileşiminin saptanmasında non parametrik Kruskal-Wallis testi, gruplar arasındaki farklılıkları belirlenmesi için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

İmmunohistokimyasal ve İmmunofloresan boyamalar sonucu elde edilen resimlerden pozitif boyanmaların yoğunluğunu belirlemek amacıyla; her resimden 5 adet rastgele alan seçildi ve ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirmeleri yapılmıştır. Veriler, alan %'si için ortalama ve standart sapma ($\text{ortalama} \pm \text{SD}$) cinsinden istatistiksel olarak tanımlanmıştır. Pozitiflik veren immünoreaktif hücreleri ve immünopozitif boyanmış alanları sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak için one-way ANOVA ve ardından Tukey testi yapılmıştır. Test sonucunda $p<0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi ve veriler ortalama \pm SD olarak sunulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. HPLC-DAD Analizi

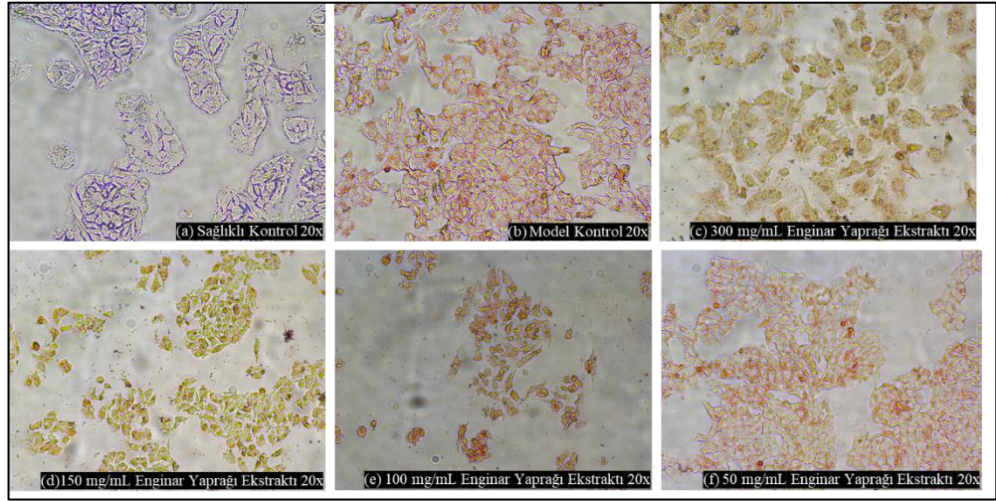
Enginar yaprağı sulu ekstraktının HPLC analizi ana bileşenlerimizin %44,39 Gallik asit, %21,58 Kateşin, %16,25 Askorbik asit, %10,90 Gentisik asit, %3,36 Kuersetin, %1,61 Protokatekuik asit olduğunu gösterdi. HPLC-DAD analizinin spektrumu Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Enginarda bulunan fenolik maddeler, reaktif oksijen türlerine (ROS) ve serbest radikallere karşı etkinlik gösterir ve proteinler, lipitler ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasara karşı koruyucu bir kalkan olarak görev yapar (Ceccarelli et al. 2010). Gallik asit, güçlü anti-oksidatif ve anti-obezite aktivitesine sahip olduğu bilinen sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunan, bizimde ekstremizde en fazla miktarda bulunduğunu analiz ettiğimiz fenolik bir bileşiktir. Yapılan bir çalışmada HFD ile indüklenen NAFLD fareleri üzerinde hepatik steatoz, obezite, hiperkolesterolemi ve insülin direncine karşı koruyucu bir etki saptanmış olup NAFLD patogenezinde meydana gelen vücuttaki hasarları kısmen tersine çevirdiği bildirilmiştir (Chao et al. 2014). Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup gallik asit düzeyinin yüksek bulunduğu bitkisel ajanımız EYSE’nin NAFLD üzerinde ki tedavi edici etkisi açığa çıkarılmış olup yapılan uygulamaların sonuçları diğer bölümlerde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.



Şekil 4.1. Enginar yaprağı sulu ekstraktının HPLC-DAD kromatogramları

4.2. Yağ Kırmızısı O (ORO) Boyama

Steatoz, hepatositlerde %5 den fazla lipit damlacıklarının görünür birikimini ifade eder. Oleik asit tedavisi ise *in vitro* şartlarda HepG2 hücrelerinin sitoplazmasında lipit damlacıkları birikimine sebep olmakta ve steatozu taklit etmektedir (Cui, Chen, and Hu 2010). HepG2 hücrelerinde lipit birikiminin derecesini incelemek ve NAFLD model kontrolünü teyit etmek amacıyla 0,1 mM oleik asit maruziyetine bırakılan HepG2 hücrelerinde yağ kırmızısı O boyaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, HepG2 hücrelerine oleik asit eklendikten sonra lipit birikiminde bir artma olduğunu (a) ancak enginar yaprağının sulu ekstresiyle tedavi uygulanması sonrasında lipit birikiminde doza bağlı kademeli bir azalma gözlemlendiğini tespit edilmiştir (b-f). Xia et al. (2019), yapmış olduğu çalışmada oleik asite maruz bırakılan HepG2 hücrelerinin NAFLD gelişimini modellediği gösterilmiş olup sonuçlarımız da bu çalışmalarını destekler niteliktedir ve oleik asit maruziyetiyle NAFLD gelişimini amaçlayan çalışmalarla paralel sonuçlar göstermiştir. Bu durum model oluşumunun gerçekleştiğini ve enginar yaprağının sulu ekstresinin NAFLD’de görülen lipit birikimini taklit eden *in vitro* NAFLD modelinde lipit birikimini iyileştirdiğini gösterir.



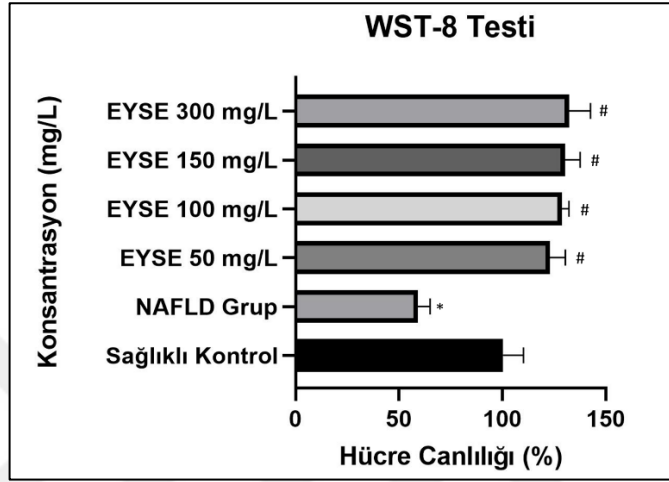
Şekil 4.2. Oleik Asit ile Model Oluşturulmuş HepG2 Hücreleri (a) Sağlıklı Oleik asit uygulanmayan model, (b) oleik asit uygulaması yapılan enginar yaprağı uygulanmayan model, (c) 300 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup, (d) 150 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup, (e) 100 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup, (f) 50 mg/mL enginar yaprağının sulu ekstresi uygulanan grup.

4.3. WST-8 Testi

WST-8 canlı hücre sayısının belirlenmesi için kolorimetrik bir testtir ve in vitro hücre proliferasyonunun indüksiyonunu veya inhibisyonunu incelemek için kullanılır. Bu kit, hücresel tetrazolyum tuzu WST-8'in dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile suda yüksek oranda çözünür, turuncu-sarı renkli bir formazana indirgenmesine dayanır. Hücrelerdeki dehidrogenazların aktiviteleri ile üretilen formazan kristallerinin miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. WST-8'in saptama hassasiyeti, MTT, XTT, MTS veya WST1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarından daha yüksektir (Özdemir Tozlu 2018). Bu amaçla çalışmamızda WST-8 miktarını belirlemek için ticari olarak satılan CVDK-8 kiti kullanılmıştır.

HepG2 hücrelerinde NAFLD modeli oluşturulması için 0,1 mM oleik asit kullanılmıştır (Xia et al. 2019). Hücre tutunmasının ardından 48 saat boyunca oleik asit maruziyetine bırakılan hücrelerde NAFLD modeli gözlenmiş ve ardından NAFLD tedavisi için enginar yaprağının sulu ekstresi kullanılarak tedavi uygulanmıştır. Tedavi 48 saatlik inkübasyon süresinin son 24 saatinde uygulanmıştır ve enginar yaprağının sulu ekstresinin çalışma dahilinde kullanılan tüm dozlarının (300, 150, 100, 50 mg/L) hücreler için sitotoksik olmadığı saptanmıştır. Tedavi uygulanan gruplarda konsantrasyona bağlı bir iyileştirici etki saptanmıştır. Elde edilen bulgular şunu ifade etmektedir; enginar yaprağının sulu ekstresiyle tedavi uygulanan gruplarda oleik asit uygulanan model grubuna göre hücre canlılığı artmıştır. Konsantrasyona bağlı hücre canlılık oranında artış gözlenmektedir. Oleik asitle NAFLD modeli oluşturulan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı kontrol grubuna göre azalma göstermiş %74'e düşerek %26'lık bir azalmaya sebep olmuştur. Enginar yaprağının sulu ekstresiyle tedavi uyguladığımız gruplarda ise hücre canlılığı oleik asit uygulanan modele göre artmış sırasıyla 50 mg/L de %122, 100 mg/L de %129, 150 mg/L de %129, 300 mg/L de %132 hücre canlılığı göstererek kontrol grubuna kıyasla dahi anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.3). Bulgular neticesinde oleik asit maruziyeti ile karaciğer yağlanması erken evresini taklit eden in vitro NAFLD modelinde oluşan hasar üzerine enginar yaprağının tedavi edici, iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu tespit ettik ve Acquaviva et al. (2023) 'nın yapmış olduğu çalışmalara paralel sonuçlar elde ederek bulguların birbirini desteklediği belirlenmiştir.

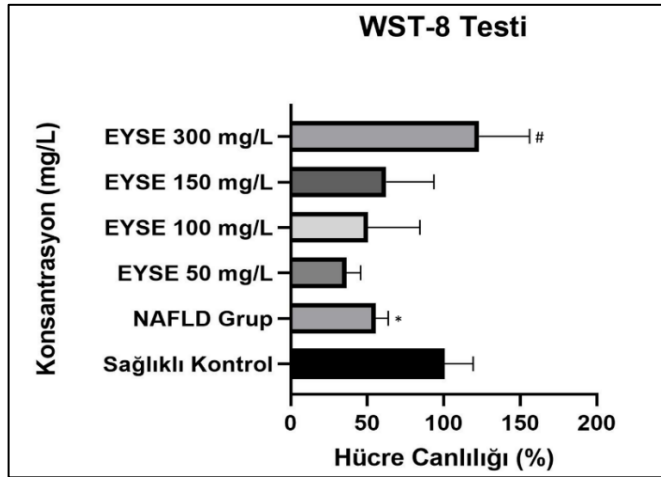
24 saatlik EYSE tedavisinde çıkan olumlu etkilere ek olarak 48 saatlik oleik asit maruziyetine karşı EYSE tedavisinde etkinlik potansiyeli gösteren doz 300 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Diğer dozlarda istatistik olarak bir anlamlılık belirlenmemiştir. Bu EYSE'nin etkinliğinin zamanla azaldığını, en yüksek etkinliğin 24 saatte alınacağını göstermektedir.



Şekil 4.3. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin etkisi.

NAFLD grubu ile oleik asite karşı tedavi amaçlı verilen EYSE grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

*Sağlıklı kontrol grubu ile NAFLD grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.4. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 48 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin etkisi.

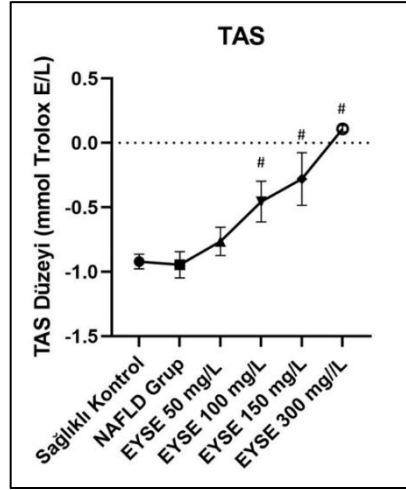
NAFLD grubu ile oleik asite karşı tedavi amaçlı verilen EYSE grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

*Sağlıklı kontrol grubu ile NAFLD grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

4.4. TAS-TOS Analizi

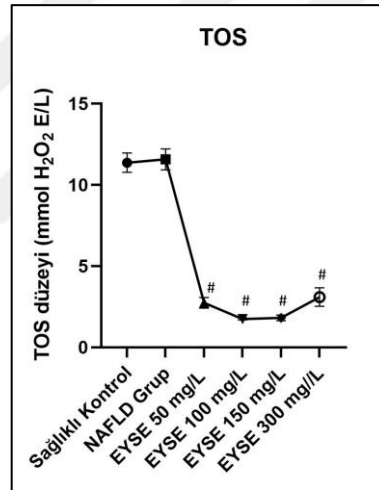
Enginar yağrağının sulu ekstresinin 0,1 mM oleik asit kullanılarak HepG2 hücrelerinde NAFLD modeli indüklenmiş gruptan alınan süpernatant örneklerinde total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidatif stres (TOS) seviyeleri üzerindeki etkileri belirlenmiş olup sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Sonuçlar EYSE'nin 100, 150, 300 mg/L konsantrasyonlarda uygulanan dozlarının TAS seviyelerini desteklediğini ortaya çıkarmıştır. EYSE tedavisi in vitro koşullarda NAFLD modeli oluşturmak için kullanılan oleik asit maruziyetine karşı TAS düzeylerinde ifade edilen konsantrasyonlar için sırasıyla yaklaşık olarak 0,49; 0,67 ve 1,05 kat artışa sebep olmuştur. TOS seviyesinde ise oleik asit uygulanan hücre grubunda hiçbir şey uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla total oksidatif stres düzeyinde bir artış görülmekte olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermemiştir. Bununla beraber EYSE ile tedavi uygulanan tüm grupta önemli seviyede TOS düzeyinde bir azalmaya rastlanmıştır. Bu sonuçlar şunu ifade etmektedir; EYSE'nin bu çalışmada kullanılan tüm dozları uygulama yapılmayan sağlıklı kontrol grubu ve oleik asit grubu ile karşılaştırıldığında TOS seviyesinde anlamlı ($p<0,05$) bir azaltıcı etkiye sahip olduğu ve in vitro NAFLD modelinde oksidatif stresin hafifletilmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Oksidatif stresin NAFLD mekanizmasının altında yatan bir özelliği olduğu varsayılmaktadır (Klisic et al. 2021). Serbest yağ asitlerinin alımı da reaktif oksijen türlerini ve NF- κ B'yi aktive ederek karaciğerde proinflamatuvar sitokinleri ve NAFLD patogenezinde önemli bir yeri olan insülin direncini artırabilir (Zeng et al. 2014). Darvish Damavandi et al. (2023) yapmış olduğu güncel bir çalışmada semizotu'nun NAFLD üzerinde'ki etkisi incelenmiştir. Çalışmaların sonuçlarında NAFLD üzerinde olumlu etkiler tespit edilmiştir. Bitkilerin tıbbi ve farmakolojik potansiyelleri hastalıklar için ümit vericidir. Bizim çalışmamızda benzer sonuçları doğrulamış olup EYSE tedavisinin TAS aktivitesini desteklediği TOS aktivitesini ise iyileştirdiği saptanmıştır. Bununla beraber hiçbir şey uygulanmayan kontrol grubu ile oleik asitle model indüklenen grup arasında sayısal bir artış-azalış ilişkisi bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak TAS için de TOS içinde kontrol grubuna kıyasla dahi anlamlı iyileştirici bir etki saptanmıştır. Bu da EYSE'nin NAFLD patogenezinde olumlu katkıları sunabileceğini ifade etmektedir.



Şekil 4.5. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin total antioksidan seviyesi üzerindeki etkisi.

Oleik Asitle model oluşturulan NAFLD model grubu ile EYSE ile tedavi edilen gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.6. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin total oksidatif stres üzerindeki etkisi.

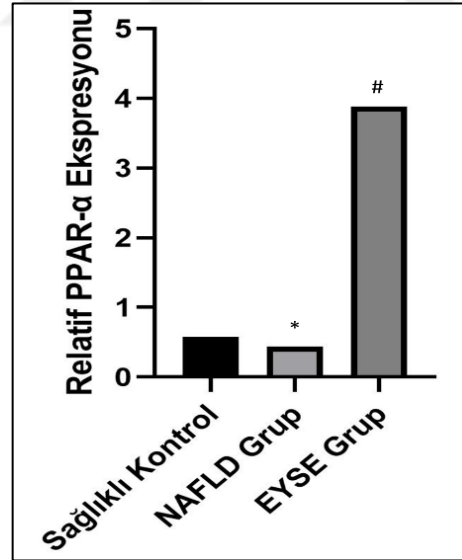
Oleik Asitle model oluşturulan NAFLD model grubu ile EYSE ile tedavi edilen gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

4.5. *In vitro* Koşullarda HepG2 Hücrelerinde Oluşturulan NAFLD Modelinde Moleküler Genetik Yanıtlar

Yapılan araştırma sonuçlarına göre NAFLD gelişimi için oleik asit tarafından indüklenen HepG2 hücrelerinde enginar yaprağının sulu ekstresinin iyileştirici etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmaları

bulabilmek için seçilen genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu amaçla HepG2 hücrelerinden RNA izole edilmiş ve elde edilen RNA örneklerinden ters transkripsiyon ile cDNA sentezlenmiştir. Bu cDNA örnekleri belirlenen genlere ait spesifik primerler varlığında kantitatif PCR ile çoğaltılmıştır.

Oleik asit daha önceki çalışmalarda ifade edildiği gibi HepG2 hücrelerinde trigliserid birikimine neden olur. Bununla birlikte karaciğerde yüksek oranda eksprese edilen bir nükleer reseptör olarak PPAR- α , da yağ asidi oksidasyonu, alımı ve enflamasyonu ile ilgili genler üzerinde transkripsiyonel düzenleme sağlamasının yanında, lipit oksidasyonunun anahtar geni olarak görünür ve oleik asit tedavisi PPAR- α , üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir (Ren et al. 2017; Montagner et al. 2016; Yu et al. 2018). Bu araştırmada da bu sonuçlara paralel olarak oleik asitle tedavi edilen grup sağlıklı kontrole göre anlamlı bir azalma göstermiştir. EYSE ile tedavi uygulanan grupta ise bu azalmaya karşı anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Bu durum PPAR- α 'nın neden olduğu NAFLD gelişimine sebep olan süreçlerde EYSE tedavisinin etkili olduğunu ortaya çıkarır. Sonuçlara dair grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.7).

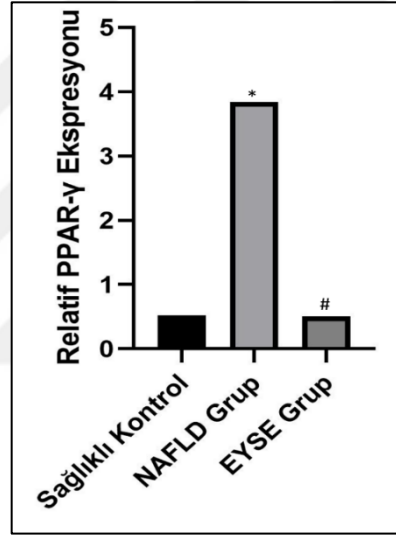


Şekil 4.7. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin ppar- α ekspresyonu üzerindeki dağılımı.

* Sağlıklı kontrol ile NAFLD grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,0001$).

Oleik Asitle model oluşturulan NAFLD model grubu ile EYSE ile tedavi edilen grup arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,0001$).

NAFLD üzerine oktil galat ile yapılan başka bir çalışmada ise adipogenezde ve bununla birlikte lipit depolama ve sentezinde görev alan PPAR- γ 'nin ekspresyonu incelendiğinde oktil galatın sebep olduğu lipit birikiminde PPAR- γ 'nin gen ekspresyonunun yaklaşık 6 kat arttırdığını göstermiştir (Lima et al. 2020). Bu tez çalışmasında da oleik asitle lipit birikimi hedeflenmiş olup yapılan muamele sonrasında PPAR- γ 'nin gen ekspresyonunun 7 kat artmasını gözlenmiş olup bu çalışmayı desteklemiştir. Oleik asitin sebep olduğu lipit birikimi üzerine tedavi edici etkisini saptadığımız EYSE ise artan ekspresyon seviyesini önemli ölçüde tersine çevirmiştir. Bu EYSE'nin NAFLD üzerindeki tedavi edici etkisini pekiştirmektedir. Sonuçlara dair grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.8).



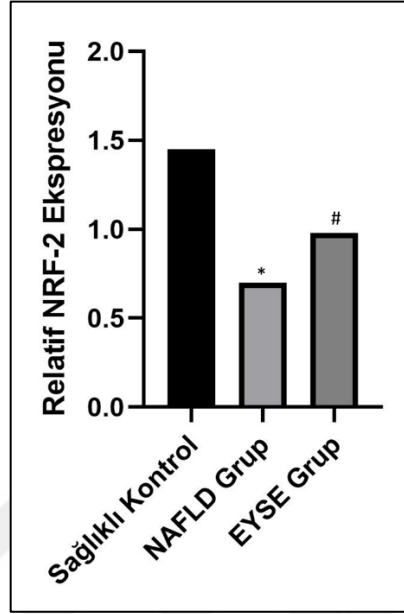
Şekil 4.8. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin ppar- γ ekspresyonu üzerindeki dağılımı.

* Sağlıklı kontrol ile NAFLD grubu arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,0001$).

Oleik Asitle model oluşturulan NAFLD model grubu ile EYSE ile tedavi edilen grup arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,0001$).

Yapılan bir çalışmada serbest yağ asitlerine maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde birçok gene ek olarak Nrf-2'nin mRNA ekspresyon seviyesi önemli ölçüde azalırken enginarın yabani tipinden elde edilen özle uygulanan bir tedavi incelenen tüm genleri doza bağlı olarak artırarak serbest yağ asiti kaynaklı hepatik oksidatif stresi etkili bir şekilde modüle etmiştir (Acquaviva et al. 2023). Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup oleik asit maruziyetine bırakılan hücrelerde Nrf-2'nin ekspresyonu

önemli ölçüde azalmıştır. EYSE tedavisi uygulanan grupta ise ekspresyon anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Sonuçlara dair grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Oleik asitle HepG2 hücrelerinde oluşturulan NAFLD modeline karşı uygulanan 24 saatlik enginar yaprağının sulu ekstresinin nrf-2 ekspresyonu üzerindeki dağılımı.

* Sağlıklı kontrol ile oleik asit ile model oluşturulan grup arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,0001$).

Oleik Asitle model oluşturulan NAFLD model grubu ile EYSE ile tedavi edilen grup arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,0001$).

4.6. *In vivo* Çalışmalar

In vitro çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak enginar yaprağının sulu ekstresinin *in vivo* olarak sıçanlar üzerindeki etkinlik potansiyeli araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda çıkan bulgulara göre IC20 değeri hesaplanmıştır ve literatürde de benzer dozların çalışıldığı görülmüş olup hesaplama neticesinde ulaştığımız doz olan 100 mg/L dozunda hazırlanan ekstreyi 5 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle besleme yaparak NAFLD gelişimini indüklediğimiz sıçanlarda bu sürenin son iki haftasında gavaj yoluyla uygulama yaparak tedavi uygulanmıştır. 5 sağlıklı kontrol, 5 model kontrol (HFD Grup), 5 de tedavi grubu olmak üzere 15 sıçanla deneye başlanmış ve aynı sayıda hayvanla deney sonlandırılmıştır.

4.6.1. Vücut ağırlığı değişimi

5 hafta süresince yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanların ve kontrol grubunun canlı vücut ağırlıkları ve tüy dökme durumları haftalık olarak takip edilerek, değişimler kayıt altına alınmıştır. Yapılan takip neticesinde tespit edilen vücut ağırlıklarının gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiş olup deney gruplarının hiçbirinde tüy dökülmesi gözlenmemiştir. Vücut ağırlıklarının ortalama \pm SEM değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ratların ortalama ağırlıkları ve SEM değerleri

	Sağlıklı Kontrol		NAFLD Grup		EYSE Grup	
	Ortalama Ağırlık	SEM	Ortalama Ağırlık	SEM	Ortalama Ağırlık	SEM
1.Hafta	298,67	14,77	306,67	19,19	269,80	10,44
2.Hafta	325,33	7,88	345,33	17,74	320,00	21,43
3.Hafta	346,00	1,15	345,67	26,18	308,80	10,17
4.Hafta	356,67	5,81	358,00	26,03	326,20	11,02
5.Hafta	367,00	4,36	366,00	21,07	333,60	11,43

4.6.2. Biyokimyasal bulgular

Ratlardan alınan kan örnekleri biyokimyasal analizlere tabii tutulmuştur. Her bir gruba ait biyokimyasal veriler aşağıdaki çizelgede (Çizelge 4.2.) verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre istatistiki açıdan anlamlı sonuç verenler “*” işareti ile çizelgede belirtilmiştir. Analizlere göre anlamlı sonuçlar veren parametreler ALP ve LDH olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Tüm deney gruplarına ait biyokimyasal bulgular

Parametre	Sağlıklı Kontrol	NAFLD Grup	EYSE Grup
ALP	160,67	499,20*	420,00
AST	130,33	140,60	258,00
ALT	55,67	45,40	77,80
LDH	866,00*	931,80*	1.422,60*
TRİGLİSERİD	66,00	106,00	99,80
TOTAL KOLESTEROL	45,67	57,22	61,60
HDL K.	29,00	40,40	39,20
LDL KOL.	10,00	12,38	17,00
TOTAL PROTEİN	5,81	6,19	5,58
ALBÜMİN	3,72	3,77	3,62
TOTAL BİLİRUBİN	0,02	0,03	0,03
GLUKOZ	156,33	232,92	181,00
KREA.	0,29	0,37	0,35
ÜRİK ASİT	1,37	1,62	1,18
BUN	15,57	15,30	12,78

İstatistik olarak anlamlı olan sonuçlar * ile belirtilmiştir

Biyokimyasal parametreler olan ürik asit, trigliserit, HDL, ALT, AST'nin ortalama değerleri NAFLD'li hastalarda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek seyrederek (Şenyiğit et al. 2018). Bu değerlere ek olarak yüksek yağlı yem içeriğiyle beslenen ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada da total kolesterol, LDL değerlerinin yağlı yemle beslenen gruplarda arttığı saptanmıştır (Doğan 2016). Ratlarda yapılan başka bir NAFLD çalışmasında ise ALT değerlerinin de model grubunda sağlıklı gruba göre ciddi manada arttığı ifade edilmiştir (Xu et al. 2006). Böbrek fonksiyon parametreleri ürik asit, BUN ve krea NAFLD hastalarında varlık göstermekte ve insülin direnciyle ilişkilendirilmektedir (Feng et al. 2014). Bulgularımız bu çalışmalarla paralel olup, daha uzun HFD uygulaması yapılması sağlanarak NAFLD modelinin ileri bir versiyonu ortaya çıkarılabilir ve bu parametreler NAFLD gelişimi gösteren hastalarda yüksek çıkmakta ve karaciğer hastalıklarıyla ilişkilendirilmektedir. Uygulanan EYSE tedavisi karaciğer parametrelerinde olumlu bir etkiye sahip olsa da istatistik açıdan bir anlamlılık görülmemiştir. EYSE'nin daha yüksek dozları veya daha uzun bir tedavi süresi biyokimyasal parametreler üzerinde daha olumlu sonuçlara sebep olabilir.

4.6.3. Hematolojik bulgular

Ratlardan alınan kan örnekleri hematolojik analizlere tabii tutulmuştur. Her bir gruba ait hematolojik veriler aşağıdaki çizelgede (Çizelge 4.3.) verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre istatistik açıdan anlamlı sonuç verenler “*” işareti ile çizelgede

belirtilmiştir. Analizlere göre anlamlı sonuç veren hematolojik parametre PLT olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Tüm deney gruplarına ait hematolojik bulgular

Parametre	Sağlıklı Kontrol	NAFLD Grup	EYSE Grup
WBC	10,09	12,28	11,09
RBC	7,07	8,75	10,35
HGB	12,00	14,78	18,16
HCT	40,89	49,49	59,42
MCV	57,64	56,94	57,60
MCH	16,72	16,54	17,60
MCHC	29,18	29,14	30,56
PLT	484,20*	570,60*	1.118,00*

İstatistiki olarak anlamlı olan sonuçlar * ile belirtilmiştir

Yapılan çalışmalarda NAFLD hastalarının WBC'si, RBC'si sağlıklı kontrollere göre daha yüksek çıkmıştır (Eheim et al. 2014). WBC, inflamasyonun bir belirteçidir ve metabolik bozukluklarda yükselir. Hepatik steatoz da karaciğerde sadece fokal yağ birikimi değil, aynı zamanda sistemik bir inflamasyonu ifade eder (Lee et al. 2010). RBC, HGB ve HCT, NAFLD'de WBC gibi benzer bir artış eğilimine sahiptir. Bu hematolojik parametreler, insülin direnci, serebrovasküler hasar ve metabolik sendrom ile güçlü bir şekilde ilişki gösterir (Tabara et al. 2013). NAFLD'li hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada hastalarda MCH, MCV düzeyleri artarken MCHC sağlıklı gruplara kıyasla azalma göstermiştir (Das et al. 2008). Bir diğer parametre olan PLT'nin ise karaciğer hastalıklarında sayısının azaldığı uzun zamandır bilinmektedir. Bir çalışmada, orta-şiddetli NAFLD'ye sahip hastaların, daha hafif NAFLD formuna göre daha yüksek PLT sayılarına sahip olduğu bildirilmiştir (Garjani et al. 2015). Çalışmamızda EYSE ile tedavi ettiğimiz grupta PLT değerlerinin tedavi sonrasında arttığını gözlemlemekteyiz. Bu sonuçta literatürdeki çalışmaları desteklemektedir. Daha uzun süre uygulanan bir HFD, modeli daha da geliştirir ve ayrıca daha uzun uygulanan bir tedavi ya da daha yüksek dozlarda uygulanan bir EYSE tedavisi de etkinliği arttıracaktır.

4.6.4. Histopatolojik analizler ve bulgular

Enginar yaprağının sulu ekstresinin HFD ile indüklenerek NAFLD oluşumu sağlanması hedeflenen sıçanlardan alınan karaciğer ve beyin örneklerinde yapılan histopatolojik bulguların değerlendirilmesinde kontrol grubunda bulunan sağlıklı

sıçanların dokularının normal histolojik yapıda oldukları gözlenmiştir. Yüksek yağlı diyet uygulanan HFD grubunda bulunan sıçanların karaciğer ve beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, hepatositlerde şiddetli dejenerasyon, koagulasyon nekroz, şiddetli steatozis ve damarlarda şiddetli hiperemi saptanmıştır (Şekil 4.10). Benzer şekilde beyin dokularında da nöronlarda şiddetli dejenerasyon ve nekroz damarlarda şiddetli hiperemi gözlenmiştir (Şekil 4.11). Enginar yaprağı ekstresi ile tedavi edilen sıçan grubunda yapılan histopatolojik değerlendirme de ise hepatositlerde orta şiddette dejenerasyon, hafif düzeyde koagulasyon nekrozu, orta seviyede steatozis ve damarlarda şiddetli hiperemi saptandı (Şekil 4.10). HFD besleme yapılan model grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Beyin dokularında ise bu grupta nöronlarda orta düzeyde dejenerasyon ve hafif düzeyde nekroz damarlarda orta şiddette hiperemi saptandı (Şekil 4.11). HFD grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$). NAFLD'nin ana klinik tezahürü olan metabolik işlev bozukluğu ve karaciğer hasarlarının yanı sıra, NAFLD hastalarında azalmış beyin hacmi ve patolojik değişiklikler gözlenir (Filipović et al. 2018). Yapılan bir hayvan çalışmasının sonuçları da şunu gösterir ki NAFLD yapılan sıçanların beyinlerinde oksidatif stres ve nörotransmitter aktivitelerinde bozukluklar meydana gelmiştir (Ghareeb et al. 2011). Sonuçlarımız bu açıdan da anlamlı bir değere sahiptir. Ayrıca mekanizmaları tam anlayamamış olsada NAFLD ile nöropsikiyatrik bozukluklar, bozulmuş öğrenme ve hafızanın davranışsal performansı arasında yakın bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Weinstein et al. 2019). Bununla birlikte hastalık grubuyla kıyaslandığında elde ettiğimiz veriler enginar yaprağının sulu ekstresinin NAFLD üzerinde iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen histopatolojik bulgular Çizelge 4.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Karaciğer ve beyin dokularında histopatolojik bulgular ve skorlanması

		Sağlıklı Kontrol	NAFLD Grup	EYSE Grup
KARACİĞER	Hepatositlerde dejenerasyon	-	+++	++
	Hepatositlerde koagulasyon nekrozu	-	+++	+
	Steatozis	-	+++	++
	Damarlarda hiperemi	-	+++	+++
BEYİN	Nöronlarda dejenerasyon	-	+++	++
	Nöronlarda nekroz	-	+++	+
	Damarlarda hiperemi	-	+++	++

4.6.5. İmmünohistokimyasal analizler ve bulgular

Enginar yaprağının sulu ekstresinin HFD ile indüklenerek NAFLD oluşumu sağlanması hedeflenen sıçanlardan alınan karaciğer ve beyin örneklerinde yapılan immünohistokimyasal incelemelerin bulgularının değerlendirilmesinde kontrol grubunda bulunan sağlıklı sıçanların Kaspaz 3 ekspresyonları negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.10). Kaspazlar, apoptozun son aşamasını yürüten bir sistein-proteaz ailesidir. Özellikle kaspaz 3, apoptozun son adımları olan kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması için çok önemli bir kaspazdır (Porter and Jänicke 1999; Li and Yuan 2008). Ayrıca NASH patogenezinde kaspaz tutulumu gösterdiğinden önemli bir parametredir (Akazawa and Nakao 2018). Beyin dokuları immünohistokimyasal olarak incelendiğinde; GFAP ekspresyonları negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.11). HFD beslenen model hastalık grubunda ise karaciğer ve beyin dokuları immünohistokimyasal olarak incelendiğinde; hepatositlerde şiddetli seviyede intrasitoplazmik Caspase 3 ekspresyonları saptandı (Şekil 4.7). Beyin dokularında; astrositlerde şiddetli seviyede GFAP ekspresyonları tespit edildi (Şekil 4.11). Enginar yaprağının sulu ekstresi ile tedavi uygulanan grupta ise karaciğer ve beyin dokuları immünohistokimyasal olarak incelendiğinde; hepatositlerde orta düzeyde sitoplazmik Caspase 3 ekspresyonları görüldü (Şekil 4.10). Beyin dokularında; astrositlerde orta düzeyde GFAP ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 4.11). Bu durum enginar yaprağının sulu ekstresinin NAFLD üzerinde olumlu etkilere sahip olduğunu ifade

etmektedir. Karaciğer ve beyin dokularında immunohistokimyasal renk değişim düzeyi ölçülerek (W/sr) analiz sonuçları ve istatistiksel bulguları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6' da ifade edilmiştir.

4.6.6. İmmunofloresan analizler ve bulgular

Enginar yaprağının sulu ekstresinin HFD ile indüklenerek NAFLD oluşumu sağlanması hedeflenen sıçanlardan alınan karaciğer ve beyin örneklerinde yapılan immunofloresan boyama yöntemi incelemesinin bulgularının değerlendirilmesinde sağlıklı kontrol grubu hayvanlarından alınan karaciğer ve beyin dokularında 8-OHdG ve JNK ekspresyonları negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Model kontrol grubunda ise karaciğer ve beyin dokuları immunofloresan boyama yöntemi ile incelendiğinde; hepatositlerde ve nöronlarda şiddetli düzeyde sitoplazmik 8-OHdG, JNK ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 4.10). Tedavi grubunda ise karaciğer ve beyin dokuları incelendiğinde; hepatositlerde ve nöronlarda orta seviyede intrasitoplazmik 8-OHdG ve JNK ekspresyonları saptandı (Şekil 4.11). Bu veriler enginar yaprağının sulu ekstresinin karaciğer üzerinde olumlu etkilerini göstermiştir. Karaciğer ve beyin dokularında immunofloresan ışımaya düzeyi ölçülerek (W/sr) analiz sonuçları ve istatistiksel bulguları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6' da ifade edildi.

Çizelge 4.5. Karaciğer dokusunda immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama bulgularının verilerini ve istatistiksel analiz verileri.

	Caspase 3 W/sr	8-OHdG W/sr	JNK 1/3 W/sr
Sağlıklı Kontrol	18,59±0,11 ^a	20,16±0,26 ^a	19,32±0,18 ^a
NAFLD Grup	69,11±2,58 ^b	83,49±2,25 ^b	74,59±2,94 ^b
EYSE Grup	43,58±1,85 ^c	51,66±2,33 ^c	47,84±1,23 ^c

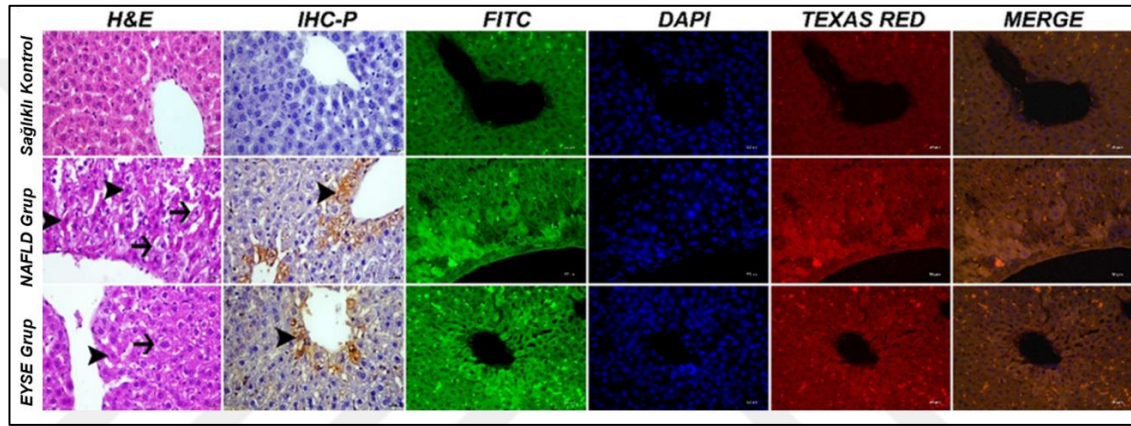
Değerler ortalama ± SE' yi gösterir (n = 5). Sütun boyunca kontrol, a'dan farklı üst simgeye sahip değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

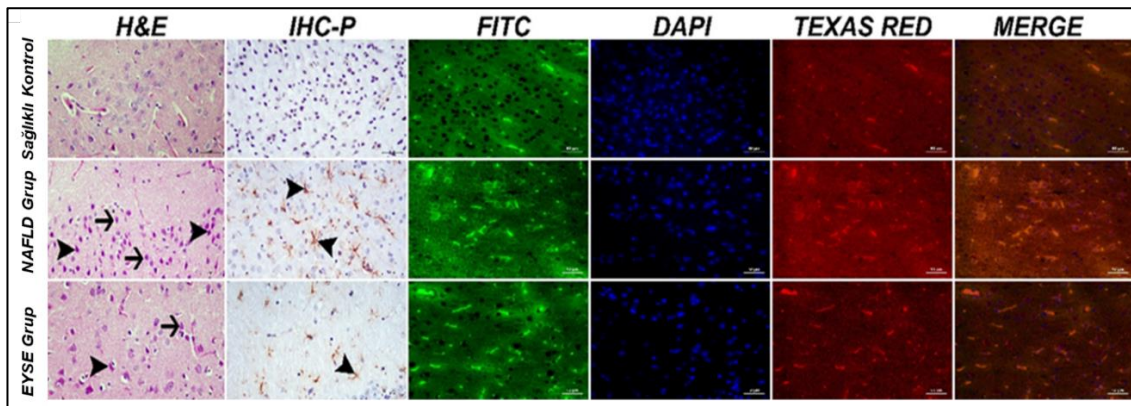
Çizelge 4.6. Beyin dokusunda immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama bulgularının verilerini ve istatistiksel analiz verileri.

	GFAP W/sr	8-OHdG W/sr	JNK 1/3 W/sr
Sağlıklı Kontrol	16,51±0,47 ^a	21,98±0,64 ^a	20±0,09 ^a
NAFLD Grup	87,54±3,66 ^b	88,33±3,97 ^b	76,68±2,74 ^b
EYSE Grup	53,16±1,28 ^c	57,12±2,61 ^c	53,39±2,38 ^c

Değerler ortalama ± SE' yi gösterir (n = 5). Sütun boyunca kontrol, a'dan farklı üst simgeye sahip değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05).



Şekil 4.10. Karaciğer dokusu, Hepatositlerde dejenerasyon (oklar) ve nekroz (okbaşları), H&E, Bar:20µm. Hepatositlerde Caspase 3 ekspresyonları (okbaşları), IHC-P, Bar:20µm. Hepatositlerde 8-OHdG ekspresyonları (FITC) ve JNK ekspresyonları (Texas Red), IF, Bar:50µm.



Şekil 4.11. Beyin dokusu, Nöronlarda dejenerasyon (oklar) ve nekroz (okbaşları), H&E, Bar:20µm. Astrositlerde GFAP 3 ekspresyonları (okbaşları), IHC-P, Bar:20µm. Nöronlarda 8-OHdG ekspresyonları (FITC) ve JNK ekspresyonları (Texas Red), IF, Bar:50µm.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlarımıza göre bu araştırmada yaptığımız analizler neticesinde enginar yaprağının sulu ekstresinin NAFLD'nin oluşturduğu patolojik etkilere karşı iyileştirici bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalarla HepG2 hücrelerinde oleik asitin indüklediği erken hepatik steatoz üzerine enginar yaprağının gösterdiği iyileştirici etkilerin yanında *in vivo* olarak ratlar üzerinde yaptığımız çalışmaların neticelerinde elde ettiğimiz sonuçlarda EYSE'nin önemli tedavi edici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ülkemizden toplanan enginarın yapraklarından elde edilen sulu ekstrenin NAFLD üzerinde ki etkinliği ilk kez çalışmamızda rapor edilmiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler neticesinde enginar yaprağının düşük dozları dahi (100 mg/L) hem model oluşturulmuş HepG2 hücreleri üzerine hem de yüksek yağlı diyetle model gelişmesi sağlanmış ratlar üzerinde olumlu etkiler göstermiş ve hastalığın iyileşmesine katkı sunmuştur. Ayrıca çalışmamızda kullanılan dozların hiçbirinde bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Bu sebepten ötürü enginar yaprağı karaciğer hastalıklarının gelişimini engellemek için koruyucu bir etkinlik ve tedavi edici bir özellik gösterebilir ve bu amaçla kullanılabilir. Araştırma sonuçlarımızdan yola çıkarak ifade edebiliriz ki henüz etkin bir tedavi stratejisi bulunmayan ve gelecekte ciddi bir halk sağlığı problemine dönüşme riski öngörülen NAFLD'ye karşı geliştirilecek olan tedavi stratejilerinde enginar yaprağı önemli bir rol oynayabilir. Çalışmamız söz konusu bitkinin etkinlik potansiyelini ve etki mekanizmasının biraz daha aydınlatılmasına yönelik yapılacak olan çalışmalarda önemli bir basamak görevi görecektir. Ayrıca bu çalışma hedef hastalığa yönelik yapılacak olan farmakolojik çalışmalara da katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

- Acay, A. 2015. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında güncel medikal tedavi. Kocatepe Tıp Dergisi, 16(1), 67-76.
- Acierno, C., Caturano, A., Pafundi, P. C., Nevola, R., Adinolfi, L. E., Sasso, F. C. 2020. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: pathophysiological mechanisms shared between the two faces of the same coin. Exploration of Medicine, 1(5), 287-306.
- Acquaviva, R., Malfa, G. A., Santangelo, R., Bianchi, S., Pappalardo, F., Taviano, M. F., Miceli, N., Di Giacomo, C., Tomasello, B. 2023. Wild artichoke (*Cynara cardunculus subsp. Sylvestris*, *Asteraceae*) leaf extract: phenolic profile and oxidative stress inhibitory effects on hepg2 cells. Molecules, 28(6), 2475.
- Adams, L. A., Lymp, J. F., St. Sauver, J., Sanderson, S. O., Lindor, K. D., Feldstein, A., Angulo, P. 2005. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population based cohort study. Gastroenterology, 129(1), 113-121.
- Akazawa, Y., Nakao, K. 2018. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. Journal of Gastroenterology, 53(8), 893-906.
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr, International Diabetes Federation (IDF) Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), American Heart Association (AHA), World Heart Federation (WHF), International Atherosclerosis Society (IAS), International Association for the Study of Obesity (ASO). 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; american heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. Circulation, 120(16), 1640-1645.
- Alkhatatbeh, M. J., Lincz, L. F., Thorne, R. F. 2016. Low simvastatin concentrations reduce oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells: An in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. Experimental and Therapeutic Medicine, 11(4), 1487-1492.
- Anderson, R. M., Weindruch, R. 2010. Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM, 21(3), 134.
- Açar, G. 2021. Karaciğer anatomisi. Hepatology. Akademisyen Kitabevi, 1-118, Konya.
- Anonim, 2021. Web Sitesi: <https://www.tkad.org.tr/2021/07/naflid-klinik-rehberi-2021.pdf>, Erişim Tarihi: 22.11.2021.
- Anonymous, 2021. Web Sitesi: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/naflid-nash/all-content>, Erişim Tarihi: 24.12.2022.

- Anonymous, 2022a. Web Sitesi: <https://byjus.com/biology/liver-diagram/>, Erişim Tarihi: 22.11.2022.
- Anonymous, 2022b. Web Sitesi: <https://icd.who.int/browse11/1-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/1912806631>, Erişim Tarihi: 22.09.2022.
- Anonymous, 2023a. Web Sitesi: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/protocol-making-4-formaldehyde-solution-pbs>, Erişim Tarihi: 22.09.2022.
- Anonymous, 2023b. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>, Erişim Tarihi: 22.05.2023.
- Anstee, Q. M., Day, C. P. 2013. The genetics of NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(11), 645-655.
- Araújo, A. R., Rosso, N., Bedogni, G., Tiribelli, C., Bellentani, S. 2018. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 38(1), 47-51.
- Armstrong, M. J., Hazlehurst, J. M., Hull, D., Guo, K., Borrow, S., Yu, J., Gough, S. C., Newsome, P. N., Tomlinson, J. W. 2014. Abdominal subcutaneous adipose tissue insulin resistance and lipolysis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Obesity and Metabolism*, 16(7), 651-660.
- Bagherniya, M., Nobili, V., Blesso, C. N., Sahebkar, A. 2018. Medicinal plants and bioactive natural compounds in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A clinical review. *Pharmacological Research*, 130, 213-240.
- Bashir, A., Duseja, A., De, A., Mehta, M., Tiwari, P. 2022. Non-alcoholic fatty liver disease development: A multifactorial pathogenic phenomena. *Liver Research*, 6(2), 72-83.
- Ben Salem, M., Affes, H., Dhouibi, R., Charfi, S., Turki, M., Hammami, S., Ayedi, F., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., Ksouda, K. 2022. Effect of Artichoke (cynara scolymus) on cardiac markers, lipid profile and antioxidants levels in tissue of HFD-induced obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128(1), 184-194.
- Biddinger, S. B., Almind, K., Miyazaki, M., Kokkotou, E., Ntambi, J. M., Kahn, C. R. 2005. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-coa desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 54(5), 1314-1323.
- Brehmer, K., Brismar, T. B., Morsbach, F., Svensson, A., Stål, P., Tzortzakakis, A., Voulgarakis, N., Fischer, M. A. 2018. Triple arterial phase ct of the liver with radiation dose equivalent to that of single arterial phase ct: initial experience. *Radiology*, 289(1), 111-118.
- Brunt, E. M. 2007. Pathology of fatty liver disease. *Modern Pathology*, 20(1), 40-48.

- Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M. F., Marchesini, G. 2010. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16(17), 1941-1951.
- Buyco, D. G., Martin, J., Jeon, S., Hooks, R., Lin, C., Carr, R. 2021. Experimental models of metabolic and alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 27(1), 1-18.
- Byrne, C. D., Targher, G. 2015. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62(1), 47-64.
- Castellino, G., Nikolic, D., Magán-Fernández, A., Malfa, G. A., Chianetta, R., Patti, A. M., Amato, A., Montalto, G., Toth, P. P., Banach, M., Cicero, A. F. G., Rizzo, M. 2019. Altilix® supplement containing chlorogenic acid and luteolin improved hepatic and cardiometabolic parameters in subjects with metabolic syndrome: a 6 month randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, 11(11), 2580.
- Caturano, A., Acierno, C., Nevola, R., Pafundi, P. C., Galiero, R., Rinaldi, L., Salvatore, T., Adinolfi, L. E., Sasso, F. C. 2021. Non-alcoholic fatty liver disease: From pathogenesis to clinical impact. *Processes*, 9(1), 1-18.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., Giovannetti, M. 2010. Globe artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(3), 197-201.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., Charlton, M., Sanyal, A. J. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(6), 2005-2023.
- Chao, J., Huo, T. I., Cheng, H. Y., Tsai, J. C., Liao, J. W., Lee, M. S., Qin, X. M., Hsieh, M. T., Pao, L. H., Peng, W. H. 2014. Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice. *PloS one*, 9(6), e96969.
- Cherubini, A., Casirati, E., Tomasi, M., Valenti, L. 2021. PNPLA3 as a therapeutic target for fatty liver disease: the evidence to date. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(12), 1033-1043.
- Choi, S. S., Diehl, A. M. 2008. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Lipidology*, 19(3), 295-300.
- Cohen, J. C., Horton, J. D., Hobbs, H. H. 2011. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 332(6037), 1519-1523.
- Cordeiro, A., Costa, R., Andrade, N., Silva, C., Canabrava, N., Pena, M. J., Rodrigues, I., Andrade, S., Ramalho, A. 2020. Does adipose tissue inflammation drive the development of non-alcoholic fatty liver disease in obesity?. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 44(4), 394-402.

- Cui, W., Chen, S. L., Hu, K. Q. 2010. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 95–104.
- Çayan, F., Deveci, E., Tel Çayan, G., Duru, M. E. 2020. Identification and quantification of phenolic acid compounds of twenty-six mushrooms by HPLC–DAD. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1690-1698.
- Çelikezen, F. Ç., Türkez, H., Firat, M., Arslan, M. E., Öner, S. 2022. In vitro evaluation of selective cytotoxic activity of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. on cultured human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurotoxicity Research*, 40(5), 1360-1368.
- Darvish Damavandi, R., Shidfar, F., Najafi, M., Janani, L., Masoodi, M., Heshmati, J., Ziaei, S. 2023. Effect of *Portulaca oleracea* (purslane) extract on inflammatory factors in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 102, 105465.
- Das, S. K., Balakrishnan, V., Mukherjee, S., Vasudevan, D. M. 2008. Evaluation of blood oxidative stress related parameters in alcoholic liver disease and non alcoholic fatty liver disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(4), 323-334.
- Day, C. P., James, O. F. W. 1998. Steatohepatitis: A tale of two “hits”?. *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.
- De, A., Duseja, A. 2021. Nonalcoholic fatty liver disease: Indian perspective. *Clinical Liver Disease*, 18(3), 158-163.
- Dentin, R., Pégrier, J.-P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, M. A., Girard, J., Postic, C. 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20314-20326.
- Doğan, İ. 2016. Fruktöz ile nonalkolik karaciğer yağlanması oluşturulan sıçanlarda *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum* ekstraktının bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana bilim Dalı, 69, Adıyaman.
- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., Parks, E. J. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343-1351.
- Eheim, A., Medrikova, D., Herzig, S. 2014. Immune cells and metabolic dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 36(1), 13-25.
- Eslam, M., Valenti, L., Romeo, S. 2018. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*, 68(2), 268-279.
- Feng, R. N., Du, S. S., Wang, C., Li, Y. C., Liu, L. Y., Guo, F. C., Sun, C. H. 2014. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal

- weight Chinese population. *World Journal of Gastroenterology* : WJG, 20(47), 17932.
- Filipović, B., Marković, O., Urić, V., Filipović, B. 2018. Cognitive changes and brain volume reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018.
- Gaafar, A. A., Salama, Z. A., El Baz, F. K. 2013. Antioxidant and antiproliferative effects on human liver HEPG2 epithelial cells from artichoke (*Cynara scolymus L.*) by-products. In *Journal of Natural Sciences Research*, 3(10), 17-24.
- Gadiparthi, C., Spatz, M., Greenberg, S., Iqbal, U., Kanna, S., Satapathy, S. K., Broder, A., Ahmed, A. 2020. NAFLD epidemiology, emerging pharmacotherapy, liver transplantation implications and the trends in the united states. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 8(2), 215-221.
- Garjani, A., Safaeiyan, A., Khoshbaten, M. 2015. Association between platelet count as a noninvasive marker and ultrasonographic grading in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatitis Monthly*, 15(1), 244-49.
- Ghareeb, D. A., Hafez, H. S., Hussien, H. M., Kabapy, N. F. 2011. Non-alcoholic fatty liver induces insulin resistance and metabolic disorders with development of brain damage and dysfunction. *Metabolic Brain Disease*, 26(4), 253-267.
- Gorinstein, S., Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Park, Y.-S., Heo, B.-G., Cho, J.-Y., Bae, J.-H. 2009. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control*, 20(4), 407-413.
- Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., Scherer, P. E. 2008. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(3), 753-768.
- Hanlon, C. L., Yuan, L. 2022. Nonalcoholic fatty liver disease: the role of visceral adipose tissue. *Clinical Liver Disease*, 19(3), 106-110.
- Hassan, M. M., Kaseb, A., Etzel, C. J., El-Serag, H., Spitz, M. R., Chang, P., Hale, K. S., Liu, M., Rashid, A., Shama, M., Abbruzzese, J. L., Loyer, E. M., Kaur, H., Hassabo, H. M., Vauthey, J.-N., Wray, C. J., Hassan, B. S., Patt, Y. Z., Hawk, E., Soliman K. M., Li, D. 2013. Genetic variation in the PNPLA3 gene and hepatocellular carcinoma in USA: risk and prognosis prediction. *Molecular Carcinogenesis*, 52(1), 139-147.
- Hauner, H. 2005. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(2), 163-169.
- Hazer, İ. 2020. The association of hypolipidemia and hyperlipidemia with non-alcoholic fatty liver disease in obese children. *Türk Pediatri Arşivi*, 55(3), 263-269.
- Hoekstra, L. T., de Graaf, W., Nibourg, G. A. A., Heger, M., Bennink, R. J., Stieger, B., Van Gulik, T. M. 2013. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests. *Annals of Surgery*, 257(1), 27-36.

- Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125-1131.
- Ibrahim, E. A., Yousef, M. I., Ghareeb, D. A., Augustyniak, M., Giesy, J. P., Aboul-soud, M. A. M., El Wakil, A. 2022. Artichoke leaf extract-mediated neuroprotection against effects of aflatoxin in male rats. *BioMed Research International*, 1-14.
- Iizuka, K., Bruick, R. K., Liang, G., Horton, J. D., Uyeda, K. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7281-7286.
- Jacome-Sosa, M. M., Parks, E. J. 2014. Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Current Opinion in Lipidology*, 25(3), 213-220.
- Jensen-Urstad, A. P. L., Semenkovich, C. F. 2012. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(5), 747-753.
- Jou, J., Choi, S., Diehl, A. 2008. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 28(04), 370-379.
- Joy, J. F., Haber, S. L. 2007. Clinical uses of artichoke leaf extract. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 64(18), 1904-1909.
- Juzyszyn, Z., Czerny, B., Pawlik, A., Drożdżik, M. 2008. The effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on ROS generation in HUVEC cells. *Phytotherapy Research : PTR*, 22(9), 1159-1161.
- Kershaw, E. E., Flier, J. S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548-2556.
- Kılıçtaş, Ş. 2021. Enginar (*Cynara scolymus*): Besin değeri ve olası sağlık etkileri. *Uluslararası Sosyal Bilimler Akademi Dergisi*, 3(5), 6-22.
- Kim, D. Y., Park, J. Y. 2020. Genetic risk factors associated with NAFLD. *Hepatoma Research*, 6, 85.
- Klasic, A., Kavacic, N., Ninic, A., Kotur-Stevuljevic, J. 2021. Oxidative stress and cardiometabolic biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*, 11(1), 18455.
- Konger, R. L., Derr Yellin, E., Travers, J. B., Ocana, J. A., Sahu, R. P. 2017. Epidermal PPAR γ influences subcutaneous tumor growth and acts through TNF- α to regulate contact hypersensitivity and the acute photoresponse. *Oncotarget*, 8(58), 98184-98199.
- Kraft, K. 1997. Artichoke leaf extract recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine*, 4(4), 369-378.

- Küskü Kiraz, Z., Mehmetçik, G., Doğru Abbasoğlu, S., Uysal, M. 2010. Artichoke leaf extract reduces oxidative stress and lipoprotein dyshomeostasis in rats fed on high cholesterol diet. *Phytotherapy Research*, 24(4), 565-570.
- Kwon, E. Y., Kim, S., Choi, M. S. 2018. Luteolin-enriched artichoke leaf extract alleviates the metabolic syndrome in mice with high-fat diet-induced obesity. *Nutrients*, 10(8), 979.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131-144.
- Lavoie, J. M., Gauthier, M. S. 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: Link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(12), 1393-1409.
- Lee, J., Kim, Y., Friso, S., Choi, S. W. 2017. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 54, 78-88.
- Lee, M., Kim, D., Park, S. J., Kim, K. S., Park, G. D., Kim, O. K., Lee, J. 2021. Artichoke extract directly suppresses inflammation and apoptosis in hepatocytes during the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Medicinal Food*, 24(10), 1083-1091.
- Lee, Y. J., Lee, H. R., Shim, J. Y., Moon, B. S., Lee, J. H., Kim, J. K. 2010. Relationship between white blood cell count and nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*, 42(12), 888-894.
- Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206.
- Li, X., Yin, S., Li, H., Yang, Y., Chen, X., Song, B., Wu, S., Wu, Y., Wang, H., Li, J. 2023. PPAR- γ alleviates the inflammatory response in TNF- α -induced fibroblast-like synoviocytes by binding to p53 in rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 44(2), 454-464.
- Lima, K. G., Levorse, V. G. S., Garcia, M. C. R., Basso, B. de S., Costa, B. P., Antunes, G. L., Luft, C., Haute, G. V., Xavier, L. L., Donadio, M. V. F., de Oliveira, J. R. 2020. Octyl gallate induces hepatic steatosis in HepG2 cells through the regulation of SREBP-1c and PPAR-gamma gene expression. *EXCLI Journal*, 19, 962.
- Llorach, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F. 2002. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3458-3464.
- Lonardo, A., Nascimbeni, F., Maurantonio, M., Marrazzo, A., Rinaldi, L., Adinolfi, L. E. 2017. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World Journal of Gastroenterology*, 23(36), 6571-6592.
- Majnooni, M. B., Ataee, M., Bahrami, G., Heydarpour, F., Aneva, I. Y., Farzaei, M. H., Ahmadi Juoibari, T. 2021. The effects of co-administration of artichoke leaf extract supplementation with metformin and vitamin E in patients with

- nonalcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6324-6334.
- Mantovani, A., Byrne, C. D., Bonora, E., Targher, G. 2018. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 41(2), 372-382.
- McDougall, B., King, P. J., Wu, B. W., Hostomsky, Z., Reinecke, M. G., Robinson, W. E. 1998. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 140-146.
- Miraj, S., Kiani, S. 2016. Study of therapeutic effects of *Cynara scolymus L.*: A review. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (9),168-173.
- Mohr, A. M., Mott, J. L. 2015. Overview of microRNA biology. *Seminars in Liver Disease*, 35(1), 3-11.
- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., Iroz, A., Bertrand Michel, J., Saati, T. Al, Cano, P., Mselli Lakhel, L., Mithieux, G., Rajas, F., Lagarrigue, S., Pineau, T., Loiseau, N., Postic, C., Langin, D., Wahli W., Guillou, H. 2016. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut*, 65(7), 1202-1214.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. 2013. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 175-191.
- Muthiah, M. D., Cheng Han, N., Sanyal, A. J. 2022. A clinical overview of non-alcoholic fatty liver disease: A guide to diagnosis, the clinical features, and complications: What the non-specialist needs to know. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 24(2), 3-14.
- Nassar, M. I., Mohamed, T. K., Elshamy, A. I., El Toumy, S. A., Lateef, A. M. A., Farrag, A. R. H. 2013. Chemical constituents and anti-ulcerogenic potential of the scales of *Cynara scolymus* (artichoke) heads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2494-2501.
- Neshat, S. Y., Quiroz, V. M., Wang, Y., Tamayo, S., Doloff, J. C. 2021. Liver disease: induction, progression, immunological mechanisms, and therapeutic interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6777.
- Noureddin, M., Vipani, A., Bresee, C., Todo, T., Kim, I. K., Alkhouri, N., Setiawan, V. W., Tran, T., Ayoub, W. S., Lu, S. C., Klein, A. S., Sundaram, V., Nissen, N. N. 2018. NASH Leading cause of liver transplant in women: updated analysis of indications for liver transplant and ethnic and gender variances. *The American Journal of Gastroenterology*, 113(11), 1649-1659.
- Oppedisano, F., Muscoli, C., Musolino, V., Carresi, C., Macrì, R., Giancotta, C., Bosco, F., Maiuolo, J., Scarano, F., Paone, S., Nucera, S., Zito, M. C., Scicchitano, M., Ruga, S., Ragusa, M., Palma, E., Tavernese, A., Mollace, R., Bombardelli, E.

- Mollace, V. 2020. The protective effect of cynara cardunculus extract in diet-induced nafld: Involvement of OCTN1 and OCTN2 transporter subfamily. *Nutrients*, 12(5), 1435.
- Öcal, N., Kondaş Aşkar, T., Büyükleblebici, O., Tok, D., Dölarıslan, M., Gülerüzlü, Z. 2019. The effect of artichoke supplement on lipid metabolism in rats subjected to experimental acute exercise model. *Eurasian Journal of Health Sciences*, 2(3), 114-119.
- Panahi, Y., Kianpour, P., Mohtashami, R., Atkin, S. L., Butler, A. E., Jafari, R., Badeli, R., Sahebkar, A. 2018. Efficacy of artichoke leaf extract in non-alcoholic fatty liver disease: A pilot double-blind randomized controlled trial. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1382-1387.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G. 2011a. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, 126(2), 417-422.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G. 2011b. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 148-153.
- Paternostro, R., Trauner, M. 2022. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Internal Medicine*, 292(2), 190-204.
- Piccinini, A., Oliveira, M. P., Silva, M. R., Bett, G. S., Becker, I. B., Mendes, T. F., Salla, D. H., Silva, L. E., Vilela, T. C., Moraes, F. M., Moterle, D., Damiani, A. P., Dagostin, L. S., Tietbohl, L. T., Bittencourt, J. V. S., Biehl, E., Denicol, T. L., Bonfante, S. R., Andrade, V. M., Silveira, P.C.L., Prophiro, J.S., Ferreira, G.K., Petronilho, F., Kanis, L.A., Rezin, G. T. 2022. Effects of ethanolic extract of *Cynara cardunculus* (artichoke) leaves on neuroinflammatory and neurochemical parameters in a diet-induced mice obesity model. *Neurochemical Research*, 47(7), 1888-1903.
- Pirola, C. J., Fernández Gianotti, T., Burgueño, A. L., Rey-Funes, M., Loidl, C. F., Mallardi, P., Martino, J. S., Castaño, G. O., Sookoian, S. 2013. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*, 62(9), 1356-1363.
- Podrini, C., Borghesan, M., Greco, A., Paziienza, V., Mazzoccoli, G., Vinciguerra, M. 2013. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Current Pharmaceutical Design*, 10(19), 2737-2746.
- Porter, A. G., Jänicke, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(2), 99-104.
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P. D., Girard, J. 2007. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 27(1), 179-192.

- Raza, S. 2021. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Frontiers in Bioscience*, 26(2), 4892.
- RehabF, A. R. 2022. Non alcoholic fatty liver disease: epidemiology, pathophysiology and an update on the therapeutic approaches. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 12(3), 99-114.
- Ren, T., Zhu, J., Zhu, L., Cheng, M. 2017. The combination of blueberry juice and probiotics ameliorate non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by affecting SREBP-1c/PNPLA-3 pathway via PPAR- α . *Nutrients*, 9(3), 198.
- Riazi, K., Azhari, H., Charette, J. H., Underwood, F. E., King, J. A., Afshar, E. E., Swain, M. G., Congly, S. E., Kaplan, G. G., Shaheen, A. A. 2022. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 7(9), 851-861.
- Rinella, M. E., Sanyal, A. J. 2016. Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 13(4), 196-205.
- Salameh, H., Hanayneh, M. Al, Masadeh, M., Naseemuddin, M., Matin, T., Erwin, A. Singal, A. K. 2016. PNPLA3 as a genetic determinant of risk for and severity of non-alcoholic fatty liver disease spectrum. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 4(3), 175-191.
- Salem, M. Ben, Affes, H., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., Zeghal, K. M. 2015. Pharmacological studies of artichoke leaf extract and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 441-453.
- Sanai, F. M., Abaalkhail, F., Hasan, F., Farooqi, M. H., Nahdi, N. A., Younossi, Z. M. 2020. Management of nonalcoholic fatty liver disease in the Middle East. *World Journal of Gastroenterology*, 26(25), 3528-3541.
- Saxena, R., Theise, N. D., Crawford, J. M. 1999. Microanatomy of the human liver exploring the hidden interfaces. *Hepatology*, 30(6), 1339-1346.
- Scheidler, J., Fink, U., Steiner, W., Steitz, H. O. 1995. 3-phase spiral CT--a new noninvasive procedure for the differentiation of multifocal liver lesions. *Aktuelle Radiologie*, 5(1), 15-18.
- Schreuder, T. C., Verwer, B. J., Nieuwkerk, C. M., Mulder, C. J. 2008. Nonalcoholic fatty liver disease: An overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 14(16), 2474.
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., Shan, B. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development*, 14(22), 2831-2838.
- Seto, W.-K., Yuen, M.-F. 2017. Nonalcoholic fatty liver disease in Asia: emerging perspectives. *Journal of Gastroenterology*, 52(2), 164-174.
- Sibulesky, L. 2013. Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*, 2(1), 1-3.

- Sodum, N., Kumar, G., Bojja, S. L., Kumar, N., Rao, C. M. 2021. Epigenetics in NAFLD/NASH: Targets and therapy. *Pharmacological Research*, 167, 105484.
- Sonsuz, A., Baysal, B., Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İ. ve Hastalıkları-Gastroenteroloji Bilim Dalı, İ. 2011. Karaciğer yağlanması ve non alkolik steatohepatit. *Güncel Gastroenteroloji*, 98-106.
- Sookoian, S., Pirola, C. 2019. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to therapeutics. *Seminars in Liver Disease*, 39(02), 124-140.
- Soret, P.-A., Magusto, J., Housset, C., Gautheron, J. 2020. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease: a critical appraisal. *Journal of Clinical Medicine*, 10(1), 36.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Häring, H. U. 2008. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocrine Reviews*, 29(7), 939-960.
- Şentürk, M. 2019. Hepatektomi ve karaciğer rejenarasyonu. Sonçağ Yayıncılık, Matbaacılık, Rek. San. Ltd. Şti, 53, Çanakkale.
- Şenyiğit, A., Yaprak, B., Orhanoğlu, T. 2018. An investigation of degrees and possible biomarkers of non-alcoholic fatty liver (NAFL) disease. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi*, 23(2), 73-78.
- Tabara, Y., Igase, M., Saito, I., Nishida, W., Kohara, K., Sakurai, S., Kawamura, R., Okada, Y., Hitsumoto, S., Onuma, H., Nagai, T., Takata, Y., Uetani, E., Takita, R., Kido, T., Ochi, N., Osawa, H., Tanigawa, T., Miki, T. 2013. Association of hematological parameters with insulin resistance, insulin sensitivity, and asymptomatic cerebrovascular damage: The J-SHIP and toon health study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 55(3), 297-311.
- Tajiri, K. 2013. Liver physiology and liver diseases in the elderly. *World Journal of Gastroenterology*, 19(46), 8459.
- Tamer, F., Nergiz Ünal, R. 2019. Non-alcoholic hepatic steatosis and dietary saturated fatty acids: a current overview of possible mechanisms. *Akdeniz Tıp Dergisi*, 6 (2), 154-167.
- Tanas, A., Tozlu, Ö. Ö., Gezmiş, T., Hacimüftüoğlu, A., Abd El-Aty, A. M., Ceylan, O., Mardinoğlu, A., Türkez, H. 2022. In vitro and in vivo neuroprotective effects of sarcosine. *BioMed Research International*, 2022, 1–11.
- Taşdoğan, B. E. 2019. Karaciğer nasıl bir organdır? Vücutta ne yapar?. *Gastroenteroloji Kliniği, Adana Şehir Hastanesi*, 1, 1-4.
- Tilg, H., Adolph, T. E., Moschen, A. R. 2021. Multiple parallel hits hypothesis in nonalcoholic fatty liver disease: revisited after a decade. *Hepatology*, 73(2), 833–842.
- Tilson, S. G., Morell, C. M., Lenaerts, A. S., Park, S. B., Hu, Z., Jenkins, B., Koulman, A., Liang, T. J., Vallier, L. 2021. Modeling PNPLA3-associated nafld using human-induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 74(6), 2998–3017.

- Tozlu Özdemir, Ö. 2018. Serin diyet uygulamalarının deneysel alzheimer modelinde nöroprotektif etkilerinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana bilim Dalı, 101, Erzurum.
- Unger, R. H. 2003. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 14(9), 398–403.
- Vickers, M. 2014. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients*, 6(6), 2165–2178.
- Wang, J., Conti, D. V., Bogumil, D., Sheng, X., Nouredin, M., Wilkens, L. R., Le Marchand, L., Rosen, H. R., Haiman, C. A., Setiawan, V. W. 2021. Association of genetic risk score with nafld in an ethnically diverse cohort. *Hepatology Communications*, 5(10), 1689–1703.
- Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q.-Y., Tadmor, Y. 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 601–608.
- Weinstein, G., Davis-Plourde, K., Himali, J. J., Zelber-Sagi, S., Beiser, A. S., Seshadri, S. 2019. Non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis score and cognitive function in middle-aged adults: The framingham study. *Liver International*, 39(9), 1713–1721.
- Wen, X., Yamanaka, M., Terada, S., Kamei, K. I. 2020. In vitro nonalcoholic fatty liver disease model with cyclo-olefin-polymer-based microphysiological systems. *Organs on a Chip*, 3, 100010.
- Xia, H., Zhu, X., Zhang, X., Jiang, H., Li, B., Wang, Z., Li, D., Jin, Y. 2019. Alphanaphthoflavone attenuates non-alcoholic fatty liver disease in oleic acid-treated HepG2 hepatocytes and in high fat diet-fed mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 118, 109287.
- Xiang, Z., Chen, Y. peng, Ma, K. fen, Ye, Y. fang, Zheng, L., Yang, Y. da, Li, Y. Ming, Jin, X. 2013. The role of Ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review. *BMC Gastroenterology*, 13(1), 140.
- Xu, P., Zhang, X. G., Li, Y. M., Yu, C. H., Xu, L., Xu, G. Y. 2006. Research on the protection effect of pioglitazone for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7(8), 627–633.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., Bhanot, S., Monia, B. P., Li, Y. X., Diehl, A. M. 2007. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6), 1366–1374.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M. 2016. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84.

- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., Bugianesi, E. 2018. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(1), 11–20.
- Yu, Q., Liu, Y., Wu, Y., Chen, Y. 2018. Dihydrocurcumin ameliorates the lipid accumulation, oxidative stress and insulin resistance in oleic acid-induced L02 and HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1327–1336.
- Zeng, L., Tang, W. J., Yin, J. J., Zhou, B. J. 2014. Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: a mini-review. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(7), 1624.
- Zhang, Y., Yang, X., Bian, F., Wu, P., Xing, S., Xu, G., Li, W., Chi, J., Ouyang, C., Zheng, T., Wu, D., Zhang, Y., Li, Y., Jin, S. 2014. TNF- α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: crosstalk between NF- κ B and PPAR- γ . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 72, 85–94.
- Zou, Z. Y., Wong, V. W., Fan, J. G. 2020. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in non-obese populations: Meta-analytic assessment of its prevalence, genetic, metabolic, and histological profiles. *Journal of Digestive Diseases*, 21(7), 372–384.