

## Deneysel Araştırma

# Nonalkolik Steatohepatitli Ratlarda N-Asetilsistein, Rosiglitazon ve Etodolak'ın Tedavi Edici Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sedat YILMAZ<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup>Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, ratlarda yüksek yağlı diyet (HFD) ile indüklenen Nonalkolik steatohepatitin (NASH) deneysel bir modelinde N-asetilsistein (NAC), Rosiglitazon (RSG) ve Etodolak (ETD) terapötik etkilerini ve peroxisome proliferators-activated receptors- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) ile etkileşimlerini değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Sprague-Dawley erkek sıçanlar rastgele beş gruba ayrıldı: Grup 1 Standart diyet (SD) ile beslenen sıçanlar; Grup 2 HFD ile beslenen sıçanlar; Grup 3 HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca NAC ile tedavi edilen sıçanlar; Grup 4 HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca RSG ile tedavi edilen sıçanlar; Grup 5 yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca ETD ile tedavi edilen sıçanlar. Tüm grupların karaciğer malonil dialdehit (MDA), karaciğer PPAR- $\alpha$  expression değerlerini değerlendirdik.

**Bulgular:** Çalışmamızda karaciğer PPAR- $\alpha$  expression parametresinde ETD grubunda HFD grubuna göre anlamlı bir artma olduğu, karaciğer MDA parametresinde ETD grubunda HFD grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Çalışmamızda karaciğer PPAR- $\alpha$  expression parametresinde NAC grubunda HFD grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu, karaciğer MDA parametresinde NAC grubunda HFD grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü.

**Sonuç:** Bu bulgular, ETD'nin NASH tedavisinde etkili bir seçenek olabileceğini, NAC'nin NASH tedavisinde daha az etkili olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı, Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive Edilmiş Reseptörler- $\alpha$ , Malondialdehid, N-Asetilsistein, Rosiglitazon, Etodolak.

### ABSTRACT

#### Evaluation of Therapeutic Effects of N-Acetylcysteine, Rosiglitazone and Etodolac in Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis

**Objective:** The aim of this study was to assess the therapeutic effects of N-acetylcysteine (NAC), Rosiglitazone (RSG), and Etodolac (ETD) and their interactions with peroxisome proliferators-activated receptors- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in an experimental model of high-fat diet (HFD)-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in rats.

**Material and Method:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: Group 1 rats were fed with a standard diet (SD); Group 2 Rats were fed with high-fat diet (HFD); Group 3 Rats were fed with HFD and treated with NAC for 4 weeks; Group 4 rats were fed with HFD and treated with RSG for 4 weeks; Group 5 Rats were fed with HFD for twenty weeks and treated with ETD for 4 weeks. We evaluated the malondialdehyde (MDA) level, and the expression of PPAR- $\alpha$  in the liver in all groups.

**Results:** In this study, it was observed that there was a significant increase in the expression of liver PPAR- $\alpha$  in the ETD group compared to the HFD group, and there was a significant decrease in the MDA level in the ETD group compared to the HFD group. We found a significant decrease in the expression of PPAR- $\alpha$  in the NAC group compared to the HFD group; and a significant decrease of the MDA level in the NAC group compared to the HFD group in our study.

**Conclusion:** These findings indicate that ETD may be a good option for the treatment of NASH, and NAC is less effective for the treatment of NASH.

**Keywords:** Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Peroxisome Proliferators-Activated Receptors- $\alpha$ , Malondialdehyde, N-Acetylcysteine, Rosiglitazone, Etodolac.

**Bu makale atıfta nasıl kullanılır:** Yılmaz S. Nonalkolik Steatohepatitli Ratlarda N-Asetilsistein, Rosiglitazon ve Etodolak'ın Tedavi Edici Etkilerinin Değerlendirilmesi. Fırat Tıp Dergisi 2021; 26(1): 1-7.

**How to cite this article:** Yılmaz S. Evaluation of Therapeutic Effects of N-Acetylcysteine, Rosiglitazone and Etodolac in Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis. Fırat Med J 2021; 26(1): 1-7.

**N**on-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), tüm dünyada insanların %25'inde görülür. NAFLD bu oranla dünyada en yaygın karaciğer hastalığıdır (1). Nonalkolik steatohepatit NAFLD'nin daha şiddetli formudur. NASH tedavi edilmezse karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinom gibi son aşama karaciğer hastalıklarına dönüşebilir (2). NASH'de, inflamasyon ve hepatosellüler hasar gelişimi mutlaka hepatik lipid birikiminden sonra başlar ancak hepatik insülin direnci hepatik lipid birikiminden önce, sonra veya birlikte başlayabilir (3).

Obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi çeşitli predispozan faktörler, NASH'ın patogenezi ile ilişkilidir ancak fibrozis ve kronik karaciğer hastalığına ilerlemesinin kesin mekanizması hala bilinmiyor (2). Şu anda NASH tedavisinin temel dayanağı, fiziksel aktiviteyi arttırmak ve merkezi obezite ve insülin direncini düzeltmek için yaşam tarzını değiştirmektir. Metformin ve pioglitazon gibi insülin sensitize edici ajanlar sadece kısmi veya geçici etkinlik gösterir; steatozu iyileştirilebilir ancak inflamasyon veya fibrozis üzerindeki etkiler

<sup>a</sup>Yazışma Adresi: Sedat YILMAZ, Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

Tel: 0532 785 4057

Geliş Tarihi/Received: 28.07.2020

e-mail: drsedatyilmaz@hotmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 21.10.2020

çok azdır (4). Bu nedenle, NASH'i tersine çevirmek için yeni farmakolojik yaklaşımların tanımlanması önemlidir. Peroksizom proliferatörleri ile aktive edilen reseptör familyasına ait ligand ile aktive edilen transkripsiyon faktörleri, enerji ve enflamasyon düzenlenmesinde rol oynarlar (5). Özellikle, PPAR- $\alpha$  karaciğerde belirgin bir şekilde eksprese edilir, hepatik lipid katabolizmasını teşvik eder, lipogenezi baskılar ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir, bu da onu NASH için potansiyel bir tedavi mekanizması haline getirir (6, 7). RSG bir tiazolidindion olarak sınıflandırılır, pankreatik adacık  $\beta$ -hücresi fonksiyonunu ve insülin duyarlılığını artırarak plazma glikoz seviyelerini düşürür (8). RSG PPAR- $\gamma$ 'nin oldukça aktif bir agonistidir. Son zamanlarda, rosiglitazonun bazı organlarda fibrozun inhibisyonunda önemli roller oynadığı bulunmuştur (9-11). RSG'nun NASH tedavisinde etkinliğinin ve etki mekanizmasının belirlenmesi önemlidir. NAC hepatositlerde glutatyon seviyelerini arttıran bir glutatyon öncüsüdür (11). Artan glutatyon seviyeleri, sırayla, hepatosellüler hasara neden olan reaktif oksijen türlerinin üretimini sınırlar (12). NAC hücre içi oksidan-antioksidan dengesinin bozulması durumunda sıklıkla kullanılır. Oksidatif stresi azaltarak karaciğeri steatozun zararlı etkilerine karşı korur (13). NAC'in NASH tedavisinde etkinliğinin ve etki mekanizmasının belirlenmesi önemlidir. NAC NASH'i tersine çevirmek için kullanılacak yeni farmakolojik ajan olabilir. Nonsteroid anti-inflamatuar bir ajan olan ETD siklooksijenaz-2'yi inhibe eder (14). Retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) hücre çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. RXR $\alpha$  karaciğerde bol miktarda eksprese edilir ve insanlarda HBV ve HCV enfeksiyonunda hepatik steatoz ve hepatokarsinogenezde rol oynar (15, 16). ETD 'ın son zamanlarda RXR $\alpha$  'yı bağladığı ve prostat kanseri gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (17). ETD HFD ile beslenen sıçanlarda karaciğeri fibroze karşı koruduğu gösterilmiştir (14). ETD'nin NASH tedavisinde etkinliğinin ve etki mekanizmasının belirlenmesi önemlidir. ETD NASH'i tersine çevirmek için fibrozis önleyici yeni farmakolojik ajan olabilir. Bu çalışmanın amacı, ratlarda yüksek yağlı diyet ile indüklenen NASH'ın deneysel bir modelinde NAC, RSG ve ETD terapötik etkilerini ve PPAR $\alpha$  ile etkileşimlerini değerlendirmektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Diyetler ve ilaçlar

SD %15 protein, %2,5 yağ, %15 selüloz, %14 kil ve %13 su içeren standart rat-basic-diet Elâzığ yem fabrikasından satın alındı. (pelet; Bait Industry Incorporated Company, Elâzığ, Türkiye). HFD her gün 100 gr standart diyetle 25 gr tereyağı karıştırılarak kalori kaynağının %65'i yağ tarafından sağlanacak şekilde hazırlandı. Üniversite eczanesinden RSG (Rosvel) ilacı (Sanovel İlaç Sanayi), ETD (Etol) ilacı (Nobel Pharmaceutical Industry), NAC (Asist) ilacı (Hüsnü Arsan Pharmaceutical Industry) satın alındı.

### 2. Hayvanlar ve tedavileri

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarından  $300 \pm 50$  g (8 haftalık) ağırlığında 36 Sprague-Dawley erkek sıçan satın alındı ve aşağıdaki gibi rastgele beş gruba (her grup için  $n = 6$  hayvan) ayrıldı: Grup 1 yirmi hafta boyunca SD ile beslenen sıçanlar; Grup 2 yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen sıçanlar; Grup 3 yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca NAC ile tedavi edilen sıçanlar (intraperitoneal enjeksiyonla 100 mg/kg/gün). Grup 4 yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca RSG ile tedavi edilen sıçanlar (oral gavaj ile 4 mg/kg/ gün); Grup 5 yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca ETD ile tedavi edilen sıçanlar (oral gavaj ile 10 mg/kg/ gün); 20 haftadan sonra, tüm gruplar 4 hafta boyunca standart diyetle beslendi. Sıçanlar  $22 \pm 2$  °C'de oda sıcaklığında, 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde tutuldu. Sıçanlar belirtilen kemirgen diyetleri ile ad libitum beslendi ve suya serbestçe erişebildi. Çalışma protokolü, hayvanların etik tedavisi ile ilgili kurullarla uyumluydu ve Dicle üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (No: B.30.2.DİC.1H.00.00/26).

### 3. Rat ve Karaciğer ağırlıkları ve Histolojik inceleme

Yirmidördüncü haftada, 12 saatten fazla açlık ve su yoksunluğundan sonra, sıçanlara ketamin ile anestezi uygulandı ve hassas terazi (Precisa BJ610C) tartıldı. Kan örnekleri hayvan kurban edilmeden önce kardiyak delme yoluyla toplandı. Tüm hayvanlar servikal dislokasyonla kurban edildi. Hayvanların karaciğerleri çıkarıldı ve hassas terazi (Precisa BJ610C) tartıldı. Daha sonra karaciğer dokularının bir kısmı %10 formalin ile sabitlenerek parafine içine gömüldü. Gömülü karaciğer dokularından 4  $\mu$ m'lik dilimler halinde kesildi. Tüm dilimler, sırasıyla hematoksin ve ezoin (HE) ve Masson'un trikromu (Masson) ile boyandı. Beş grupta steatoz, inflammatuar infiltrasyon ve fibrozis değişiklikleri gözlemlendi. Steatoz, inflamasyon ve fibrozu analiz etmek için Brunt ve arkadaşlarının kriterleri kullanıldı (18).

### 4. Biyokimyasal Analiz

Kalp ponksiyonu ile toplanan kan numuneleri 3500 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi ve serumlar analiz zamanına kadar kadar -80 °C'de saklandı. Serum ALT ve AST değerleri Abbott Architect c16000 Auto-analyzer (Abbot Diagnostics, Inc., Lake Forest, IL, USA) kullanılarak analiz edildi. Karaciğer dokuları homojenleştirildi ve homojenatlar 3000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüjlendi. Karaciğer doku sıvısı analizi gerçekleştirilinceye kadar -80 °C'de saklandı. Bu sıvıdan MDA analizi Cayman Chemical Şirket tiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test kiti kullanılarak Shimadzu UV-160 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile gerçekleştirdi

## 5. Western blotting ile PPAR- $\alpha$ ekspresyonu

Karaciğer dokusunun gramı başına 3 ml RIPA tamponu içinde buz üzerinde sonikatör ile homojenleştirme gerçekleştirildi. Homojenat +4 °C'de 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek supernatant elde edildi. Protein konsantrasyonu Coomassie brilliant blue G-250 (Amresco Inc., Solon, OH, ABD) ile belirlendi. SDS-poliakrilamid jel içerisine 2.48  $\mu$ l örnek + 7.5  $\mu$ l Tris-HCl ve %0,002 bromofenol mavisi içeren yükleme tamponu ve 20.02  $\mu$ l distile su ile birlikte 30  $\mu$ l yükleme yapılarak elektroforez yapıldı. Blotting, bir levha jelinden bir nitroselüloz membrana (Protran nitroselüloz transfer membranına; Whatman Schleicher ve Schuell, Dassel, Almanya) proteinlerin aktarılmasıyla gerçekleştirildi. Blokaj nitroselüloz membranı bir dilue protein çözeltilisi içinde (BSA-Bovine Serum Albumin) oda sıcaklığında 1 saat sallandırarak gerçekleştirildi. Nitroselüloz membran, PPAR- $\alpha$ 'ya karşı spesifik antikolar (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA; 1: 500) çözeltilisinde gece boyu +4 °C sallayıcıda bekletildi. Membrana yıkama solüsyonu (TBS+ %0,1 Tween-20) eklenerek 3 kez 10 dakika sallayıcıya konup sallanarak yıkama yapıldı. İkincil antikor (anti-taşıyan IgG peroksidaz konjugatı) belli bir oranda sulandırıldıktan sonra nitroselüloz membran üzerine döküldü ve poşet kapatılıp sallayıcıda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Membrana yıkama solüsyonu (TBS+ %0,1 Tween-20) eklenerek 3 kez 10 dakika sallayıcıya konup sallanarak yıkama yapıldı. Eşit numune yüklemesini sağlamak için  $\beta$ -aktin proteini için western blot yapıldı. PPAR- $\alpha$  (-55 kDa) protein bantları ve X-Omat filmi (Eastman Kodak, Rochester, NY) üzerinde tarandı. Model GS-700 görüntüleme densitometresi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ile densitometrik olarak analiz edildi.

## 6. İstatistiksel analiz

Makalede araştırdığımız PPAR $\alpha$  parametresi için popülasyon sayısı bilinmediğinden örneklem büyüklüğü (n) Cochran WG'nin geliştirdiği formül [ $n = (t^2 * pq) / d^2$ ] ile hesaplandı. (p: İncelenen olayın görülme olasılığı, q: İncelenen olayın görülmemesi olasılığı, t: Belirli serbestlik derecesinde ve saptanan yanılma düzeyinde t tablosundan bulunan teorik değer, d: Olayın görülme sıklığına göre yapılmak istenen  $\pm$  sapma) (19). Örneklem büyüklüğü Cochran WG'nin formülü kullanılarak  $n = [(1,96)^2 * (0,5 * 0,5)] / (0,05)^2$  n = 381 olarak hesaplandı. Analiz için SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) için istatistiksel paketler kullanıldı. Sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık p < 0,05 düzeyinde değerlendirildi. Örneklem büyüklüğünüz parametrik analiz gerekliliğini karşılamadığı için tüm grupların değerlendirilmesinde nonparametrik Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. İkili grupların değerlendirilmesinde Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bonferroni düzeltmesi yapılmak suretiyle, istatistik anlamlılık için kullanılacak olan p değeri (0.05/5=0.01) bulundu. p < 0.01 sonucunu veren tüm ikili karşılaştırmalar (Mann-Whitney U testi sonuçları) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı kabul edildi.

## BULGULAR

### 1. İlaç tedavisinin vücut ve karaciğer ağırlığı üzerindeki etkisi

Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların vücut ve karaciğer ağırlık ortalamaları tablo 1' de gösterildiği gibi bulundu.

**Tablo 1.** Tüm sıçan gruplarının vücut ve karaciğer ağırlıkları.

	Grup HFD (ortalama $\pm$ SD)	Grup SD (ortalama $\pm$ SD)	Grup NAC (ortalama $\pm$ SD)	Grup RSG (ortalama $\pm$ SD)	Grup ETD (ortalama $\pm$ SD)
<b>Vücut ağırlıkları (g)</b>	366,8 $\pm$ 20	333,8 $\pm$ 13	362,8 $\pm$ 26	348,3 $\pm$ 21	348,3 $\pm$ 15
<b>Karaciğer ağırlıkları (g)</b>	12,7 $\pm$ 1	8,3 $\pm$ 0,3	12,6 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,6	10,4 $\pm$ 0,4

### 2. Serum transaminaz ve karaciğer MDA ve PPAR- $\alpha$ değerleri

Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların serum ALT ve AST değerleri ile karaciğer MDA

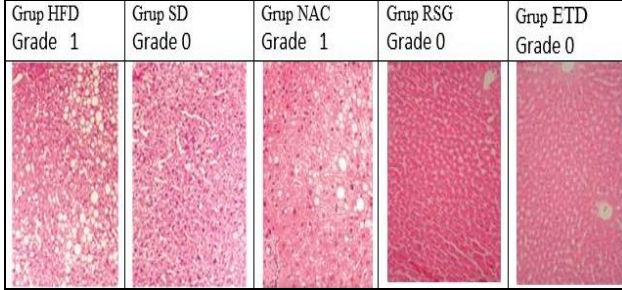
ve PPAR- $\alpha$  değerleri ortalamaları tablo 2' de gösterildiği gibi bulundu.

**Tablo 2.** Tüm sıçan gruplarının serum transaminazları ve karaciğer MDA ve PPAR- $\alpha$  değerleri.

	Grup HFD (ortalama $\pm$ SD)	Grup SD (ortalama $\pm$ SD)	Grup NAC (ortalama $\pm$ SD)	Grup RSG (ortalama $\pm$ SD)	Grup ETD (ortalama $\pm$ SD)
<b>ALT(U/L)</b>	109,2 $\pm$ 9	54,3 $\pm$ 2	74,2 $\pm$ 5	59,1 $\pm$ 5	99,0 $\pm$ 7
<b>AST(U/L)</b>	223 $\pm$ 6	76,4 $\pm$ 3	170,0 $\pm$ 14	148 $\pm$ 17	154,2 $\pm$ 7
<b>Liver MDA (nmol/ml)</b>	19,0 $\pm$ 0,6	11,2 $\pm$ 0,9	12,3 $\pm$ 0,7	13,1 $\pm$ 0,9	14,0 $\pm$ 0,9
<b>PPAR-<math>\alpha</math> (OD)</b>	30,6 $\pm$ 17	59,1 $\pm$ 8	4,9 $\pm$ 2	27,7 $\pm$ 9	59,7 $\pm$ 5

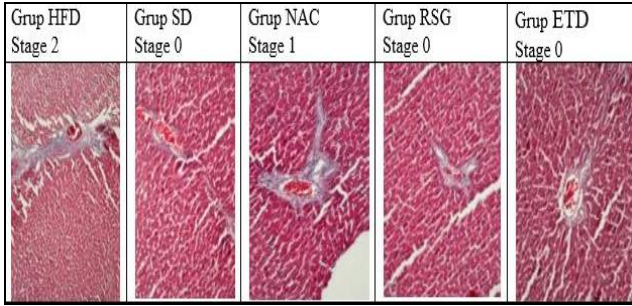
### 3. Histopatolojik inceleme

Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların karaciğerleri HE ile boyanarak steatosis derecelendirmesi Brunt ve arkadaşlarının kriterlerine göre yapıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Tüm sıçan gruplarının karaciğerlerinde steatoz değerlendirilmesi.

Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların karaciğerleri Masson ile boyanarak fibrosis derecelendirmesi Brunt ve arkadaşlarının kriterlerine göre yapıldı (Şekil 2).



Şekil 2. Tüm sıçan gruplarının karaciğerlerinde fibrosis değerlendirilmesi.

Yirmi dört hafta boyunca SD ile beslenen sıçanlardan alınan karaciğer kesitleri hem steatosis hemde fibrosis açısından normal morfolojik görünümdeydi (Tablo 3). Yirmi dört hafta boyunca HFD ile beslenen sıçanlardan alınan karaciğer kesitlerinde 5 rat steatosis grade 1 evresinde, bir rat steatosis grade 2 evresinde bulunuyordu. Bu ratların 4 tanesinde stage 2 aşamasında 2 tanesinde stage 1 aşamasında fibrosis bulunuyordu (Tablo 3). Yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca NAC ile tedavi edilen sıçanlardan alınan karaciğer kesitlerinde 4 rat steatosis grade 1 evresinde, bir rat steatosis grade 2 evresinde, bir rat da steatosis grade 0 evresinde bulunuyordu. Bu ratların 4 tanesinde stage 1 aşamasında, bir tanesinde stage 2 aşamasında, bir tanesinde stage 0 aşamasında fibrosis bulunuyordu (Tablo 3). Yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta boyunca RSG ile tedavi edilen sıçanlardan alınan karaciğer kesitlerinde 5 rat steatosis grade 0 evresinde, bir rat steatosis grade 1 evresinde bulunuyordu. Bu ratların 5 tanesinde stage 0 aşamasında, bir tanesinde stage 1 aşamasında, aşamasında fibrosis bulunuyordu (Tablo 3). Yirmi hafta boyunca HFD ile beslenen ve sonrasında 4 hafta

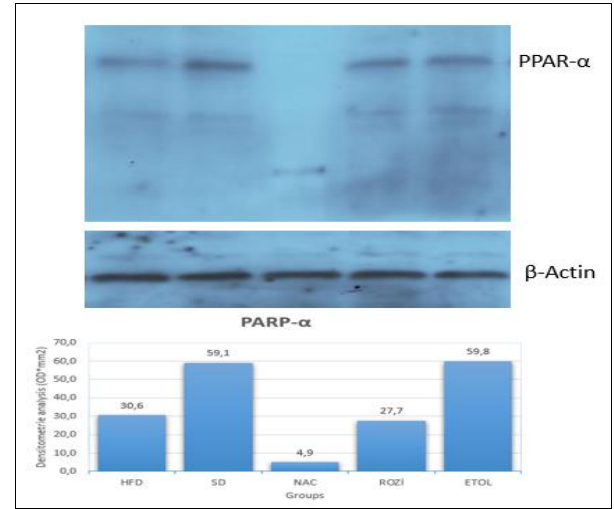
boyunca ETD ile tedavi edilen sıçanlardan alınan karaciğer kesitlerinde 5 rat steatosis grade 0 evresinde, bir rat steatosis grade 1 evresinde bulunuyordu. Bu ratların 5 tanesinde stage 0 aşamasında, bir tanesinde stage 1 aşamasında, fibrosis bulunuyordu (Tablo 3).

Tablo 3. NASH olan sıçanlarda NAC, RSG, ETD'nin karaciğer histolojisi üzerine etkileri (skorlar).

Gruplar	n	Steatosis Skoru			Fibrosis Skoru				
		0	1	2	3	0	1	2	3
SD	6	6				6			
HFD	6		5	1			2	4	
NAC	6	1	4	1		1	4	1	
RSG	6	5	1			5	1		
ETD	6	5	1			5	1		

### 4. Farmakolojik tedavilerin PPAR- $\alpha$ ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların karaciğerlerinde western blotting ile PPAR- $\alpha$  ekspresyonu şekil 3' de gösterildiği gibi bulundu.



Şekil 3: Tüm sıçan gruplarının karaciğerlerinde western blotting ile PPAR- $\alpha$  ekspresyonları

Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların karaciğer ağırlığı, karaciğer MDA, karaciğer PPAR- $\alpha$  değerleri ile serum ALT ve AST değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu bulundu (sırası ile  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ). Çalışmamızdaki beş grup Sprague-Dawley erkek sıçanların vücut ağırlıklarının istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ( $p = 0,052$ ). Bu çalışmaya katılan grup HFD ile grup SD arasında karaciğer ağırlığı, karaciğer MDA, karaciğer PPAR- $\alpha$  değerleri ile serum ALT değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu bulundu (sırası ile  $p = 0,004$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,004$ ). Çalışmamızdaki grup HFD ile grup SD arasında vücut ağırlığı ve AST değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (sırası ile  $p = 0,013$ ,  $p = 0,010$ ). Bu çalışmaya katılan grup HFD ile grup NAC arasında karaciğer MDA, karaciğer

PPAR- $\alpha$  değerleri ile serum ALT ve AST değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu bulundu (sırası ile  $p = 0,004$ ,  $p = 0,006$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,004$ ). Çalışmamızdaki grup HFD ile grup NAC arasında vücut ağırlığı ve karaciğer ağırlığı istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (sırası ile  $p = 0,631$ ,  $p = 0,873$ ). Bu çalışmaya katılan grup HFD ile grup RSG arasında karaciğer ağırlığı, karaciğer MDA değerleri ile serum ALT ve AST değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu bulundu (sırası ile  $p = 0,004$ ,  $p = 0,003$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,004$ ). Çalışmamızdaki grup HFD ile grup RSG arasında vücut ağırlıkları ve karaciğer PPAR- $\alpha$  değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (sırası ile  $p = 0,092$ ,  $p = 1,000$ ). Bu çalışmaya katılan grup HFD ile grup ETD arasında karaciğer ağırlığı, karaciğer MDA, karaciğer PPAR- $\alpha$  değerleri ile serum AST değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu bulundu (sırası ile  $p = 0,004$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,006$ ,  $p = 0,004$ ). Çalışmamızdaki grup HFD ile grup ETD arasında vücut ağırlığı ve serum ALT değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (sırası ile  $p = 0,128$ ,  $p = 0,037$ ).

## TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda NAC grubunda (12,3 nmol/ml) karaciğer MDA parametresinde HFD grubuna (19 nmol/ml) göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Thong-Ngam ve ark. (13), Sprague-Dawley erkek sıçanların 6 haftalık çalışma sonunda NASH + NAC20 grubu sıçanlarda (150,1  $\mu$ mol/g protein) NASH grubu sıçanlara (209,9  $\mu$ mol/g protein), kıyasla MDA parametresinde azalma bulmuşlardır. Çalışmamızda NAC grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer MDA parametresinin azalması Thong-Ngam ve ark. (13), sonuçları ile benzerdir. Çalışmamızda Sprague-Dawley erkek sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda NAC grubunda (74,2, 170) serum ALT ve AST parametrelerinde HFD grubuna (109,2, 223) göre istatistiksel anlamlı bir azalma görüldü. Thong-Ngam ve ark. (13), Sprague-Dawley erkek sıçanların 6 haftalık çalışma sonunda NASH + NAC20 grubu sıçanlarda (25,4, 65,6) NASH grubu sıçanlara (23, 53,6), kıyasla serum ALT ve AST parametrelerinde artma bulmuşlardır. Çalışmamızda NAC grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda serum ALT ve AST parametrelerinin azalması Thong-Ngam ve ark. (13), sonuçları ile çalışmamızda Sprague-Dawley erkek sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer PPAR- $\alpha$  parametresinde NAC grubunda (4,9 OD) ile HFD grubuna (30,6 OD) göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda vücut ağırlığı parametresinde HFD grubu (366,8g) ile NAC grubu (362,8g) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer ağırlığı parametresinde HFD grubu (12,7g) ile NAC grubu (12,6 g) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Çalışmamız-

da NAC grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer PPAR- $\alpha$  parametresinin azalması, vücut ağırlığı ve karaciğer ağırlığı parametrelerinin HFD grubu ile farklılık göstermemesi NAC'ın NASH tedavisinde etkili bir seçenek olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer MDA parametresinde RSG grubunda (13,1 nmol/ml) ile HFD grubuna (19 nmol/ml) göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Zhao ve ark. (20), Sprague-Dawley erkek sıçanların 12 haftalık çalışma sonunda Pioglitazon tedavisi grubu sıçanlarda (26,5 nmol/ mg protein) NASH grubu sıçanlara (33,5 nmol/ mg protein) göre MDA parametresinde anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır. Çalışmamızda RSG grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer MDA parametresinin azalması Zhao ve ark. (20), sonuçları ile çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda serum ALT ve AST parametrelerinde RSG grubunda (59.1, 148) ile grup HFD grubuna (109,2, 223) göre anlamlı bir azalma görüldü. Zhao ve ark. (20), Sprague-Dawley erkek sıçanların 12 haftalık çalışma sonunda Pioglitazon tedavisi grubu sıçanlarda (77) NASH grubu sıçanlara (108,3), kıyasla serum ALT parametresinde anlamlı olarak azaldığını bulmuşlardır. Çalışmamızda RSG grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda serum ALT ve AST parametrelerinin azalması Zhao ve ark. (20), sonuçları ile benzerdir. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer ağırlığı parametresinde HFD grubunda (12,7g) ile grup RSG grubuna (10,1 g) göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Çalışmamızdaki HFD grubu ile RSG grubu arasında vücut ağırlıkları ve karaciğer PPAR- $\alpha$  değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamızda RSG grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda vücut ağırlıkları ve karaciğer PPAR- $\alpha$  değerlerinde anlamlı bir fark olmaması RSG'nin NASH tedavisinde etkili bir seçenek olmadığını ancak karaciğer ağırlığı parametresinde anlamlı bir azalma olması RSG'nin NASH tedavisinde etkili bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda vücut ağırlığı parametresinde HFD grubu (366,8g) ile ETD grubu (348,3 g) arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Nakamura ve ark. (14), fatty liver Shionogi (FLS) fareleri 18 aylık çalışma sonunda vücut ağırlığı parametresinde kontrol (37.9), düşük doz ETD tedavi grubu (36.88), yüksek doz ETD tedavi grubu (35.56) arasında anlamlı fark bulmamışlardır. Çalışmamızda ETD grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda vücut ağırlığı parametrelerinin HFD grubu ile farklılık göstermemesi Nakamura ve ark. (14), sonuçları ile benzerdir. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer ağırlığı parametresinde ETD grubunda (10,4g) HFD grubuna (12,7g) göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Nakamura ve ark. (14), fatty liver Shionogi (FLS) fareleri 18 aylık çalışma sonunda karaciğer ağırlığı parametresinde kontrol, düşük doz ETD tedavi grubu, yüksek doz ETD tedavi grubu arasında anlamlı fark bulmamışlardır. Çalışmamızda ETD grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer ağırlığı

parametrelerinin HFD grubuna göre azalma göstermesi Nakamura ve ark. (14), sonuçları ile çelişmektedir. 15. Moriya ve ark. ve Tsutsumi ve ark. (15, 16), RXR $\alpha$  hücre çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ve RXR $\alpha$  karaciğerde bol miktarda ekspresye edildiğini ve insanlarda HBV ve HCV enfeksiyonunda hepatik steatoz ve hepatokarsinogeneizde rol oynadığını belirtmişlerdir. Nakamura ve ark. (14), fatty liver Shionogi (FLS) fareleri 18 aylık çalışma sonunda RXR $\alpha$  ekspresyonunun düşük doz ETD tedavi grubunda (11,65) ve yüksek doz ETD tedavi grubunda (10,98) kontrol (27,28) grubuna göre anlamlı düşük bulmuşlardır. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer PPAR- $\alpha$  parametresinde ETD grubunda (59,7 OD) HFD grubuna (30,6 OD) göre anlamlı bir artma olduğu görüldü. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer MDA parametresinde ETD grubunda (14 nmol/ml) HFD grubuna (19 nmol/ml) göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda serum AST parametrelerinde ETD grubunda (154,2) HFD grubuna (223) göre anlamlı bir azalma görüldü. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda ALT parametresinde HFD grubu (109,2) ile ETD grubu (99) arasında anlamlı bir

fark olmadığı görüldü. Çalışmamızda ETD grubu sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer PPAR- $\alpha$  değerlerinde, karaciğer MDA parametresinde, serum AST parametrelerinde anlamlı bir fark olması ETD'nin NASH tedavisinde etkili bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Yirmi dört hafta boyunca HFD ile beslenen sıçanlardan alınan karaciğer kesitlerinde 5 rat steatoz grade 1 evresinde, bir rat steatoz grade 2 evresinde bulunuyordu. Bu ratların 4 tanesinde stage 2 aşamasında iki tanesinde stage 1 aşamasında fibrosis bulunuyordu. Yani HFD ile beslenen sıçanlarda beklediğimiz düzeyde steatoz ve fibrosis oluşmadığından farmakolojik ajanların tedavi edici etkisi istenilen düzeyde gözlenemedi. Bu durum çalışmamızın zayıf tarafıdır. Çalışmamızda sıçanların 24 haftalık çalışma sonunda karaciğer PPAR- $\alpha$  parametresinde ETD grubunda (59,7 OD) HFD grubuna (30,6 OD) göre anlamlı bir artma olduğunun görülmesi ve ETD PPAR- $\alpha$  üzerinde olumlu etkisi olduğunun bulunması çalışmamızın önemini gösterir. Üstelik ETD grubunun PPAR- $\alpha$  (59,7 OD) expression değeri SD grubunun PPAR- $\alpha$  (59,1 OD) expression değeri ile aynı düzeyde bulunmuştur. **Finansal açıklama:** Bu çalışma, Dicle Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri koordinasyonu ile TIPF-BAP 09-TF-34 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology* 2020; 158: 1851-64.
2. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatoz to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112.
3. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010; 52: 774-88.
4. Ratzliff V, Caldwell S, Neuschwander-Tetri BA. Therapeutic trials in nonalcoholic steatohepatitis: insulin sensitizers and related methodological issues. *Hepatology* 2010; 52: 2206-15.
5. Reddy JK. Nonalcoholic steatoz and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: 1333-9.
6. Arsov T, Larter CZ, Nolan CJ et al. Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in Alms1 mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 1152-9.
7. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S et al. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 846-60.
8. Lingvay I, Raskin P, Szczepaniak LS. Effect of insulin-metformin HCl combination on hepatic steatoz in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2007; 21: 137-42.
9. Jin GY, Bok SM, Han YM et al. Effectiveness of rosiglitazone on bleomycin-induced lung fibrosis: assessed by microcomputed tomography and pathologic scores. *Eur J Radiol* 2012; 81: 1901-06.

10. Samah M, El-Aidy AER, Tawfik MK, Ewais MMS. Evaluation of the anti-fibrotic effect of fenofibrate and rosiglitazone on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 689: 186-93.
11. Honglei Zhang H, Lin You L, Min Zhao M. Rosiglitazone attenuates paraquat-induced lung fibrosis in rats in a ppar gamma-dependent manner. *Eur J Pharmacol* 2019; 851: 133-43.
12. Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997; 27: 363-70.
13. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5127-32.
14. Liu W, Nakamura H, Tsujimura T et al. Chemoprevention of spontaneous development of hepatocellular carcinomas in fatty liver Shionogi mice by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Sci* 2006; 97: 768-73.
15. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J General Virol* 1997; 78: 1527-31.
16. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T et al. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 2002; 35: 937-46.
17. Kolluri SK, Corr M, James SY et al. The R-enantiomer of the nonsteroidal antiinflammatory drug etodolac binds retinoid X receptor and induces tumor-selective apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2525-30.
18. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
19. Cochran, WG. *Sampling Techniques*. 2nd Ed., New York: John Wiley and Sons, Inc, 1963.
20. Zhao JS, Zhu FS, Liu S, Yang C-Q, Chen X-M. Pioglitazone Ameliorates Nonalcoholic Steatohepatitis by Down-Regulating Hepatic Nuclear Factor-Kappa B and cyclooxygenases-2 Expression in Rats. *Chin Med J* 2012; 125: 2316-21.