

ALKOLE BAĞLI OLMAYAN HEPATİK FİBROZ MODELİNDE BETAİN TEDAVİSİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ

İlknur Bingöl*, A. Fatih Aydın*, Canan Başaran-Küçükgergin*,
Işın Doğan-Ekici**, Jale Çoban***, Semra Doğru-Abbasoğlu*,
Müjdat Uysal*

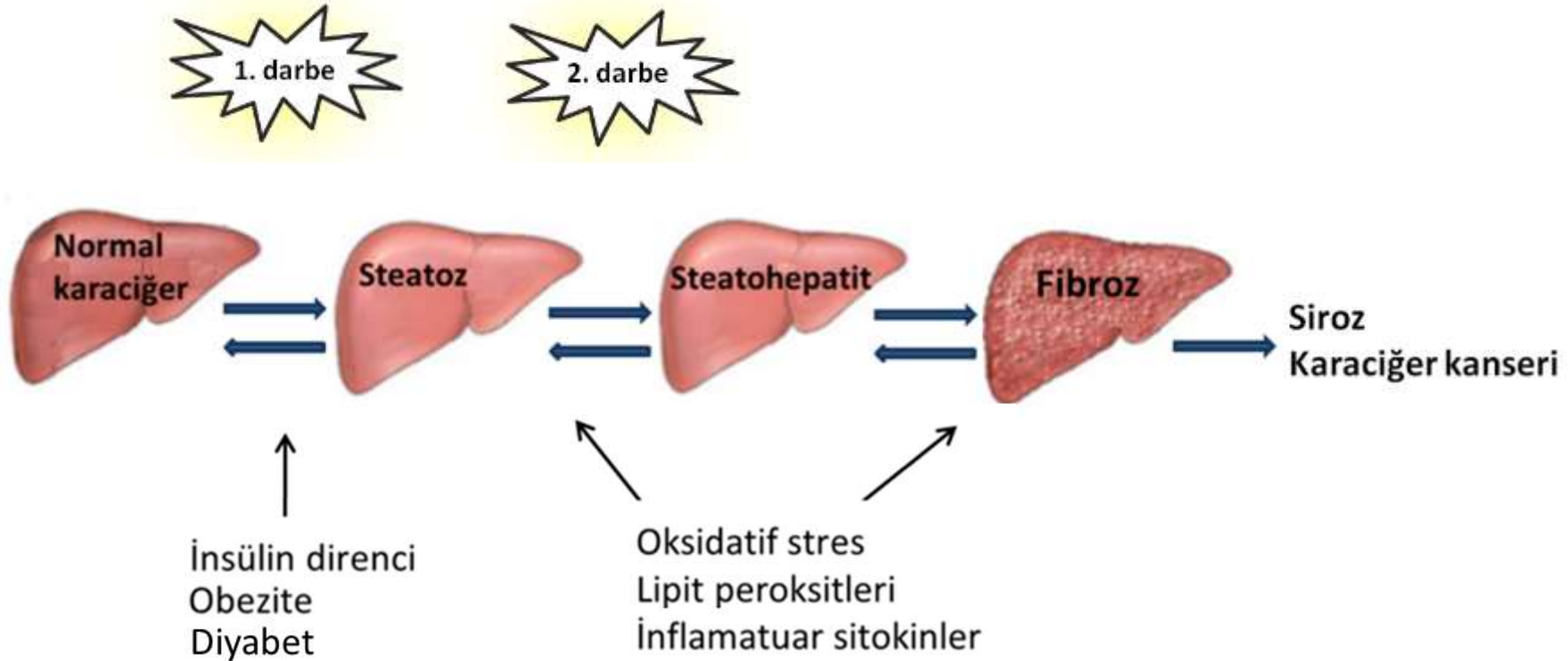
*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

***Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

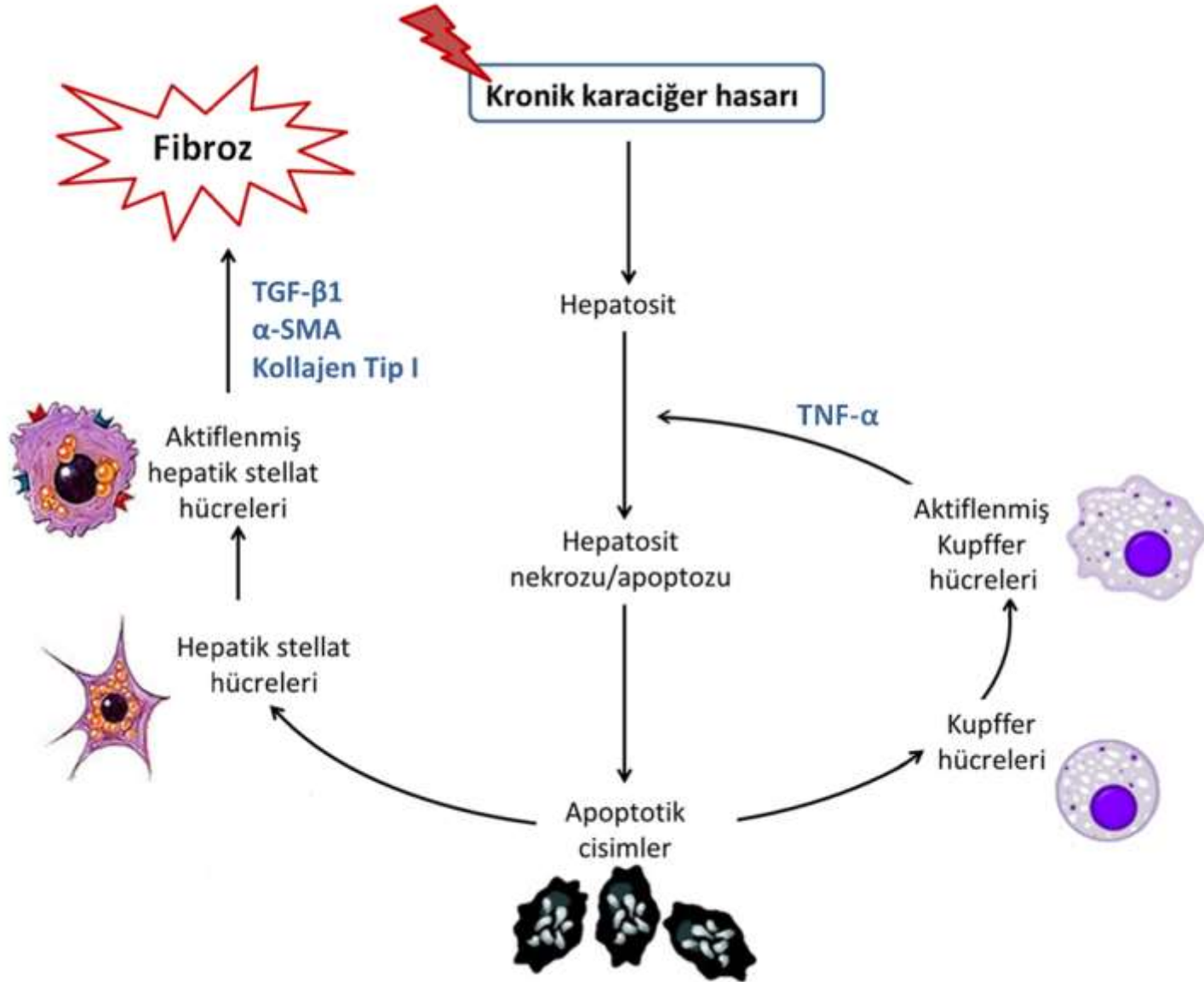
Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı

(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; **NAFLD**)

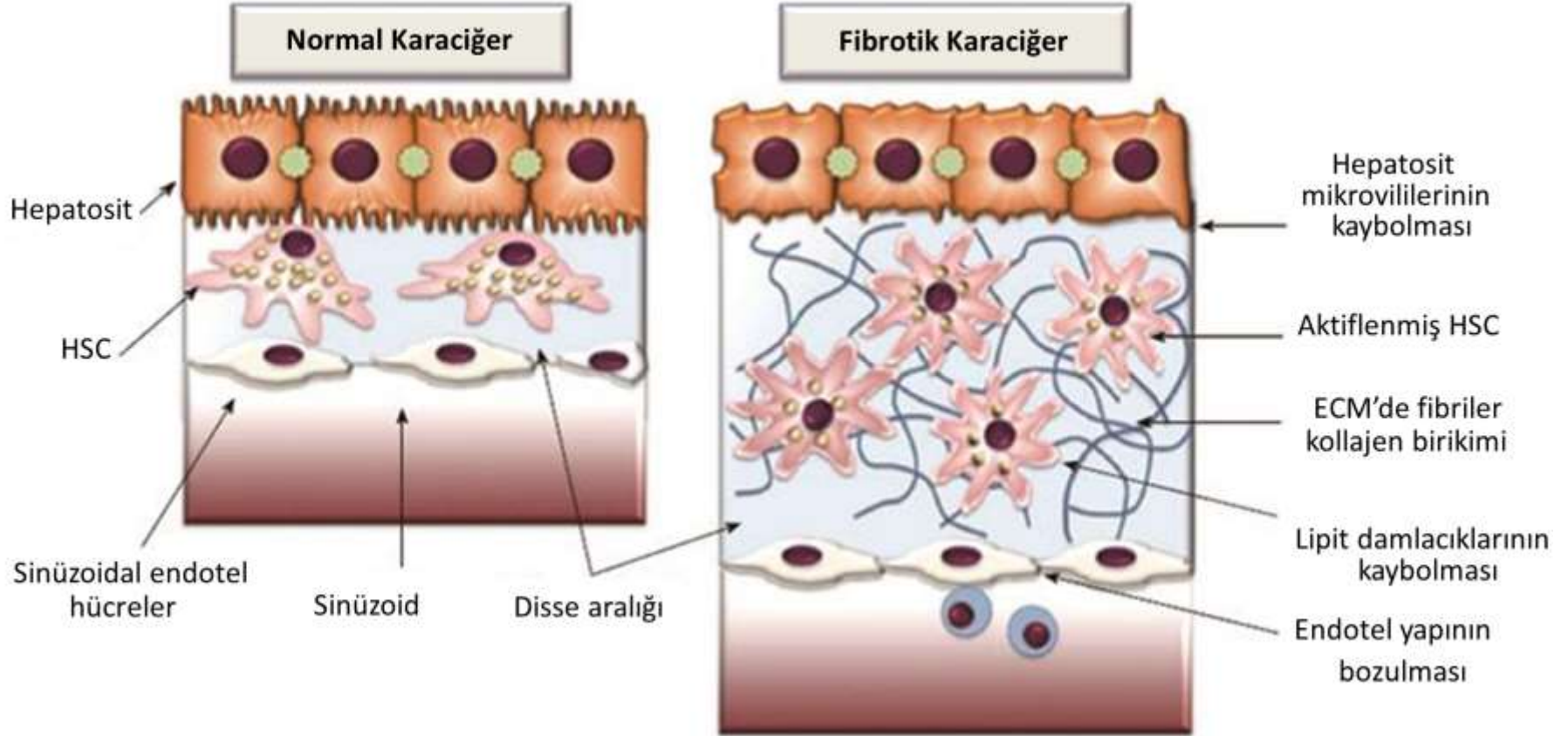


“İki-darbe” (two-hit) hipotezi

Karaciğer Fibrozu



Hepatik Stellat Hücre Aktivasyonu

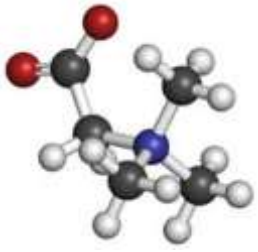


Matriks Metalloproteinazları (MMP'ler)

- Ekstraselüler matriks proteinlerinin yıkımından sorumludur.
- Hepatositler, **aktiflenmiş hepatik stellat hücrelerden** sentezlenir.
- MMP-2 ve MMP-9 → **tip IV kollajen**
- MMP -1, MMP-8, MMP-13 → **fibriler kollajenler (tip I, II, III)**

Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP 1-4)

- MMP'lerin yıkım aktivitelerini kontrol eder.



Betain (Trimetil glisin)



- Kolin metabolitidir.
- Antioksidan,
- Antiinflamatuvar,
- Antiaterojen etkilere sahiptir.
- Metil vericisidir.

- İnsülin direnci,
- Karaciğer yağlanması
- Karaciğer nekrozu
- Antifibrotik etkisini araştıran bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Etki mekanizması



- Erman F ve ark., 2004
- Kim SK ve ark., 2009
- Tsai MT ve ark., 2015

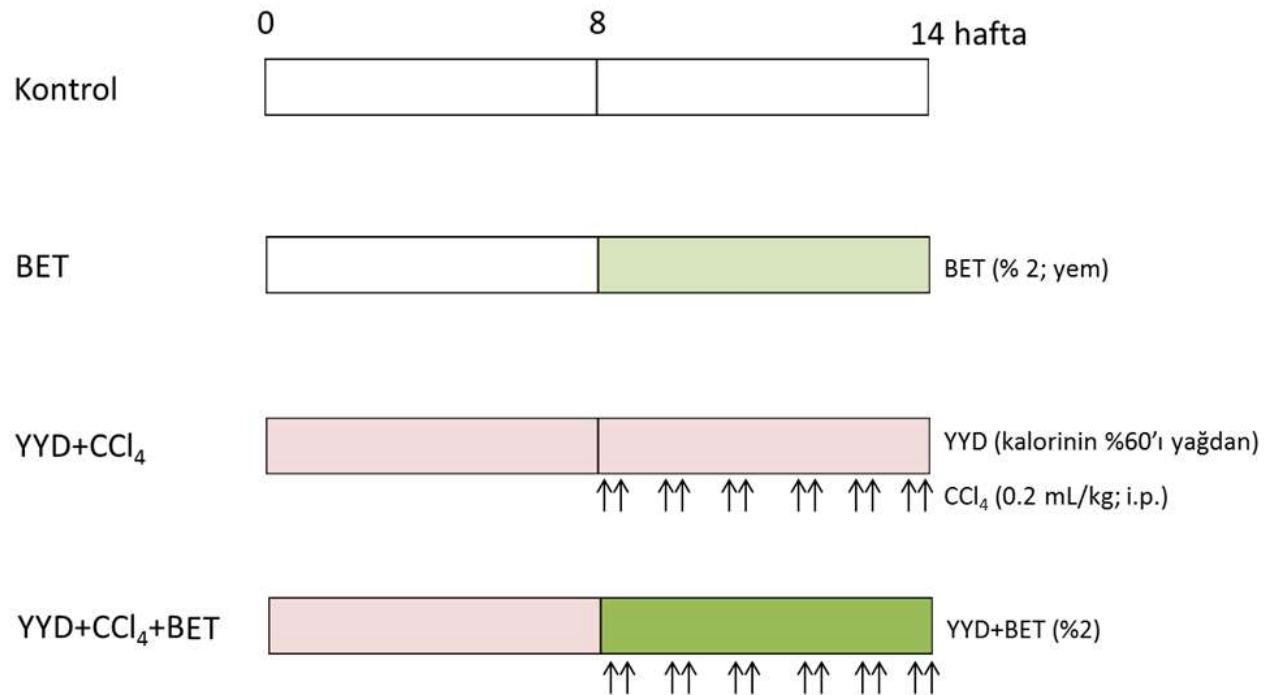
Amaç

- BET'in karaciğer fibrozu oluşumu üzerine azaltıcı/engelleyici bir etkisi olup olmadığı ve eğer böyle bir etkisi var ise mekanizmasını aydınlatmaktır.



Gereç & Yöntem

- Sprague Dawley ♀



Yöntemler

- **Serumda yapılan incelemeler**

ALT, AST, LDH

Glikoz

İnsülin

İnsülin direnci (HOMA)

Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) → ELISA

Cobas Integra 8000 otoanalizör

- **Karaciğerde yapılan incelemeler**

Trigliserit (TG)

Hidroksiprolin (HYP)

Reaktif oksijen türleri (ROS)

Malondialdehit (MDA)

Protein karbonil (PK)

Histopatolojik incelemeler → H&E ve MTC boyamaları

Spektrofotometrik yöntem

Yöntemler

Protein ekspresyonları

Transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1)

α -Düz kas aktini (α -SMA)

Kollajen 1 α 1 (KOL1A1)

İmmünohistokimyasal
yöntem

mRNA ekspresyonları

Matriks metalloproteinazı-2 (MMP-2)

Metalloproteinaz doku inhibitörü-1 (TIMP-1)

Metalloproteinaz doku inhibitörü-2 (TIMP-2)

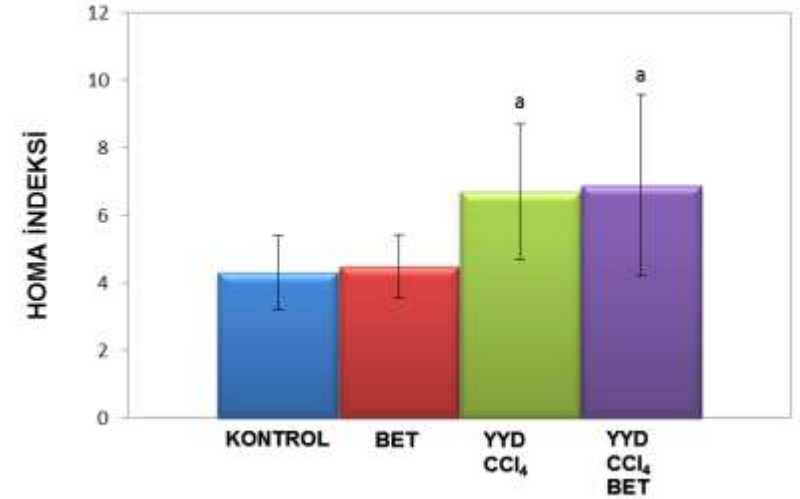
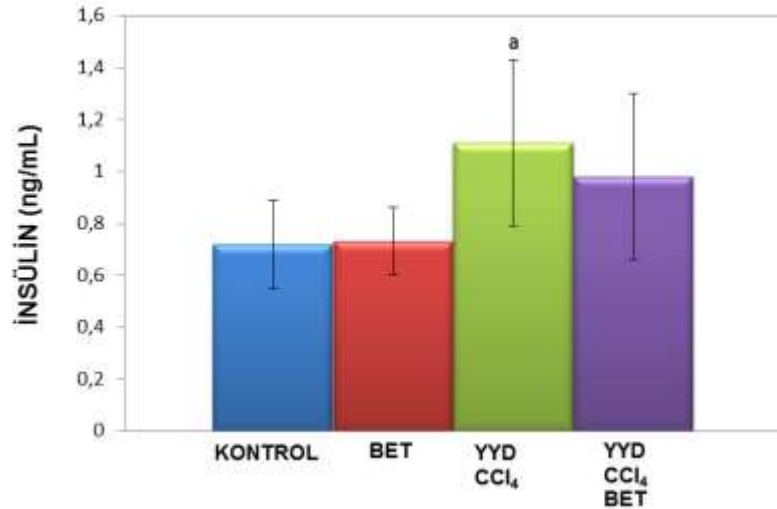
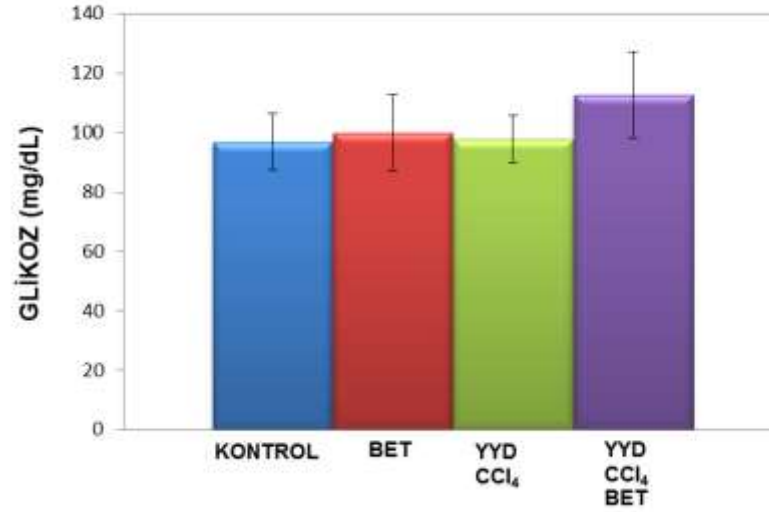
Real Time-PCR

- **İstatistik değerlendirmeler**

One-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD testleri

Kruskal-Wallis ve post-hoc Mann-Whitney U testleri

Serum Bulguları



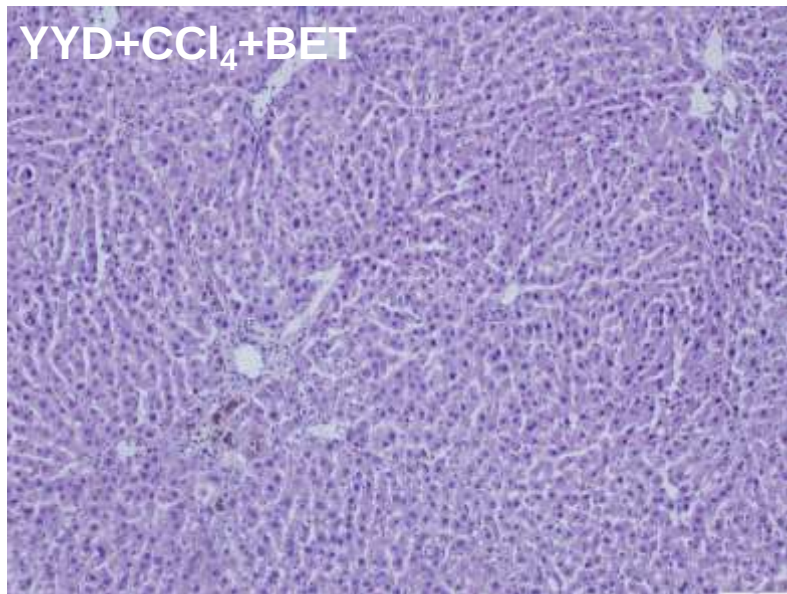
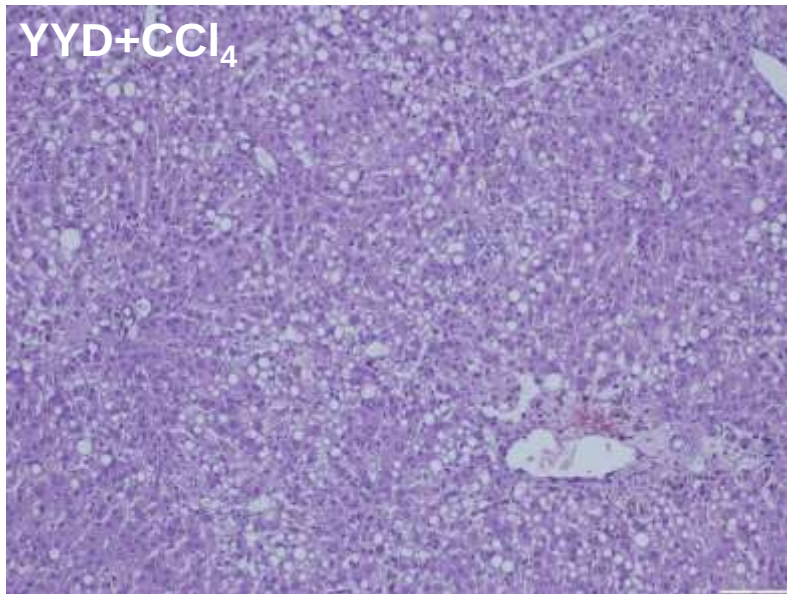
^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

Serum Bulguları

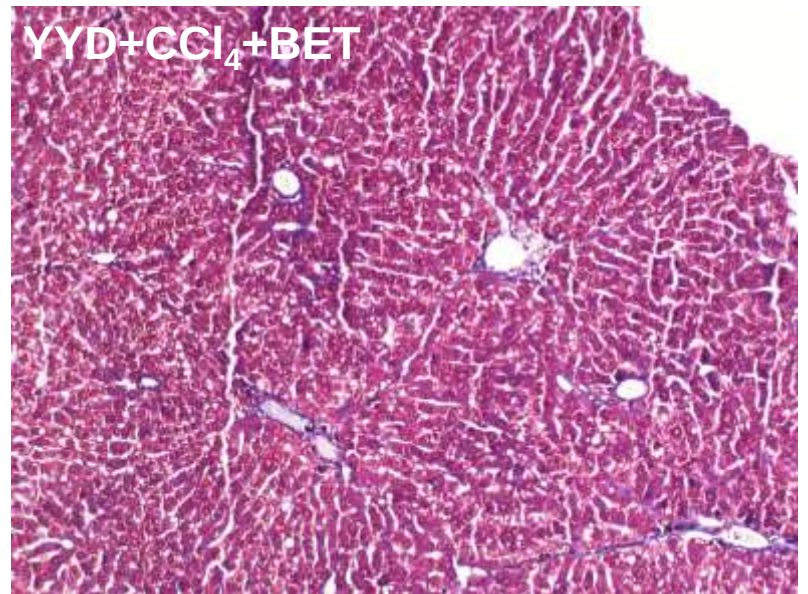
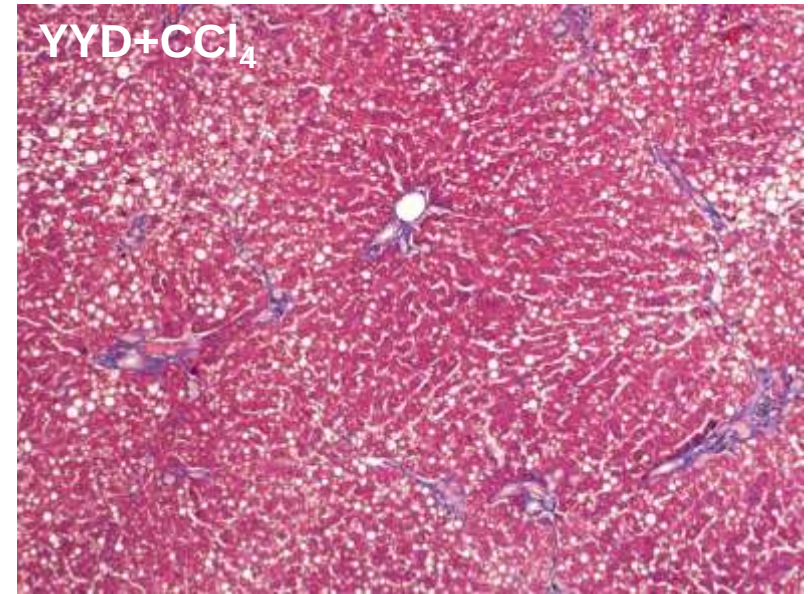
	KONTROL (n=6)	BET (n=6)	YYD+CCl₄ (n=8)	YYD+CCl₄+BET (n=8)
ALT (U/L)	55.3±14.5	54.7±12.2	105.9±33.3^a	57.3±10.2^b
AST (U/L)	115.0±16.6	105.7±20.4	197.2±63.8^a	135.2±33.2^b
LDH (U/L)	869.5±137.5	733.5±319.5	1411±302.0^a	923.7±289.2^b
TNF-α (pg/mL)	6.61±1.32	6.80±0.54	10.9±1.95^a	11.2±3.35^a

^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

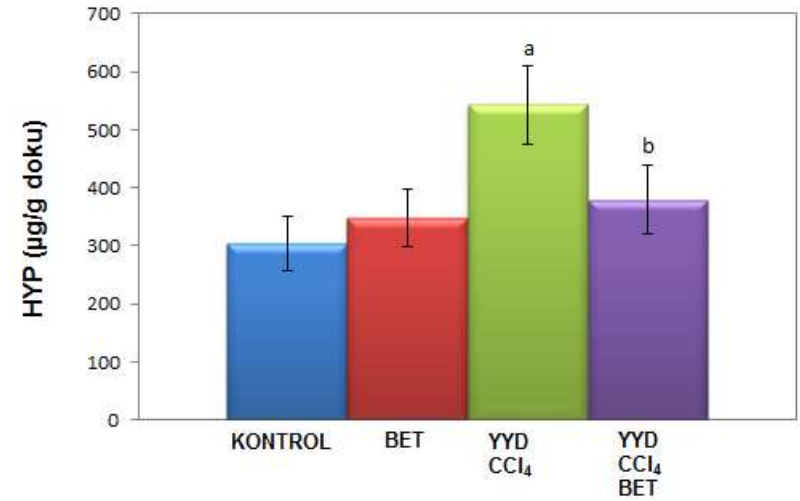
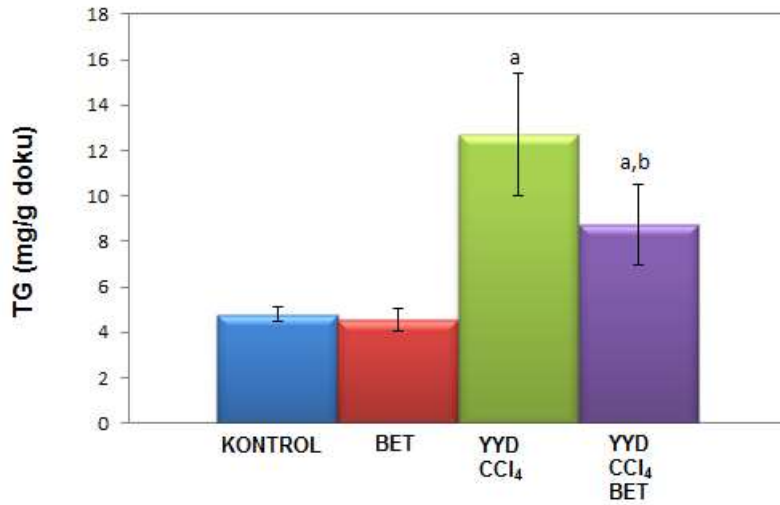
Hematoksilen & Eozin (H&E)



Masson Trikrom (MTC)

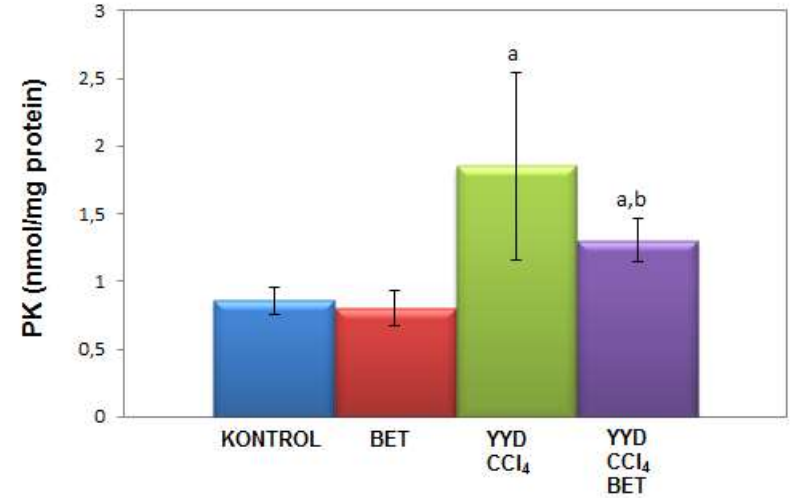
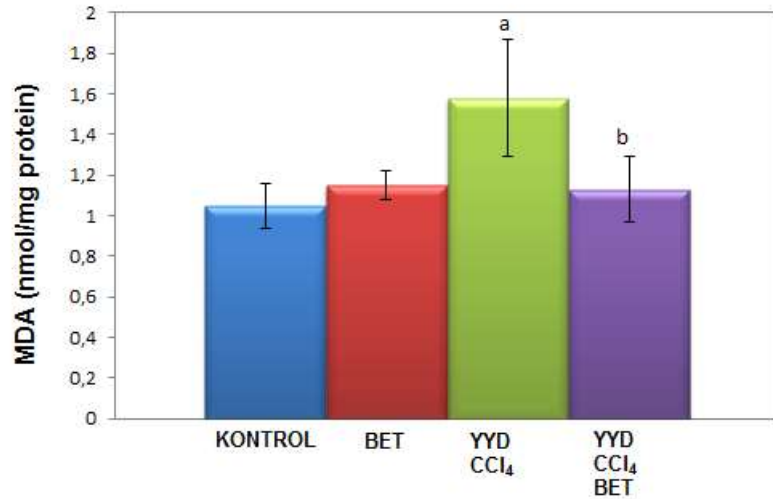
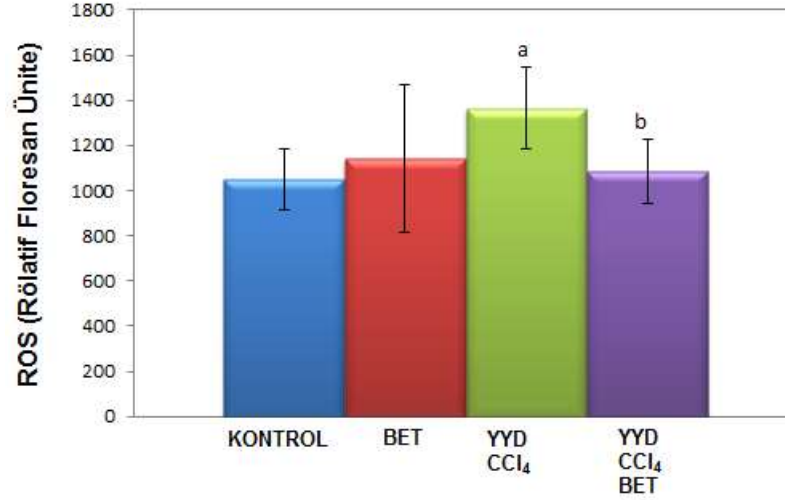


Trigliserit (TG) ve Hidroksiprolin (HYP) Düzeyleri



^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

Oksidatif Stres Bulguları



^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

TGF- β 1

α -SMA

KOL1A1

YYD+CCl₄

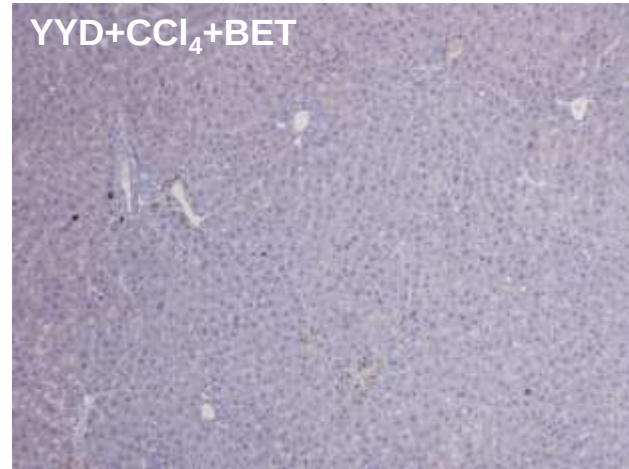
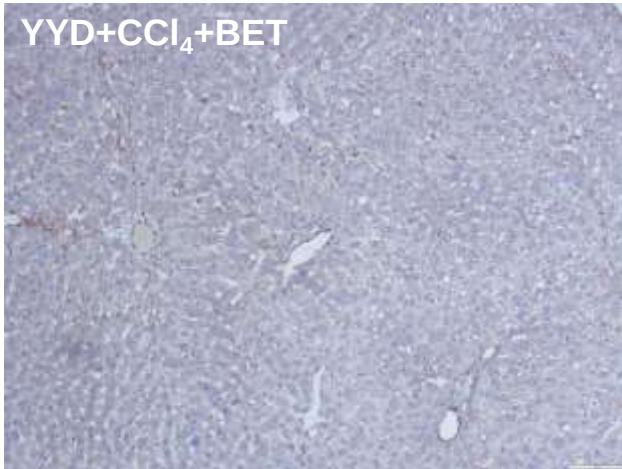
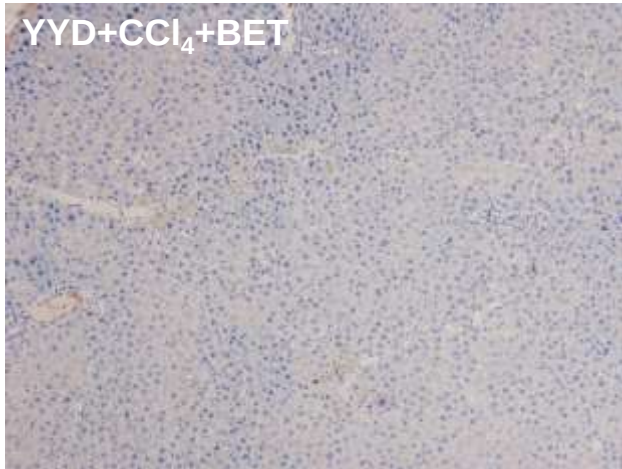
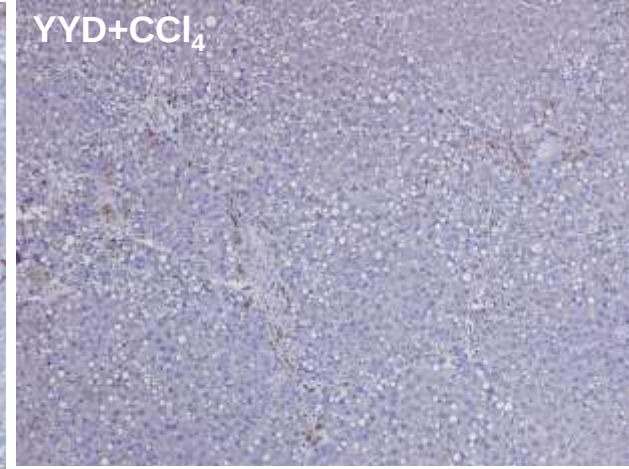
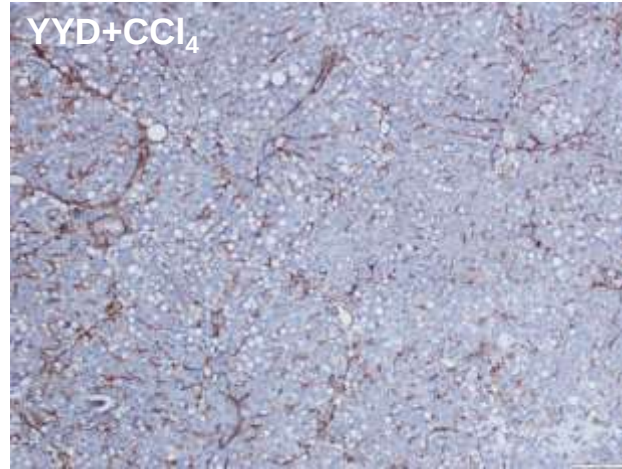
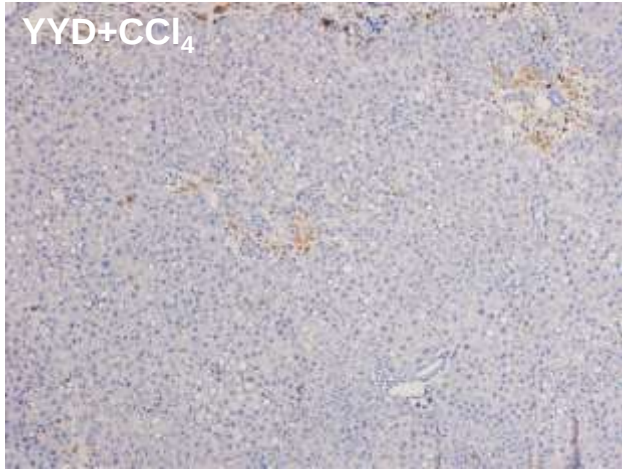
YYD+CCl₄

YYD+CCl₄

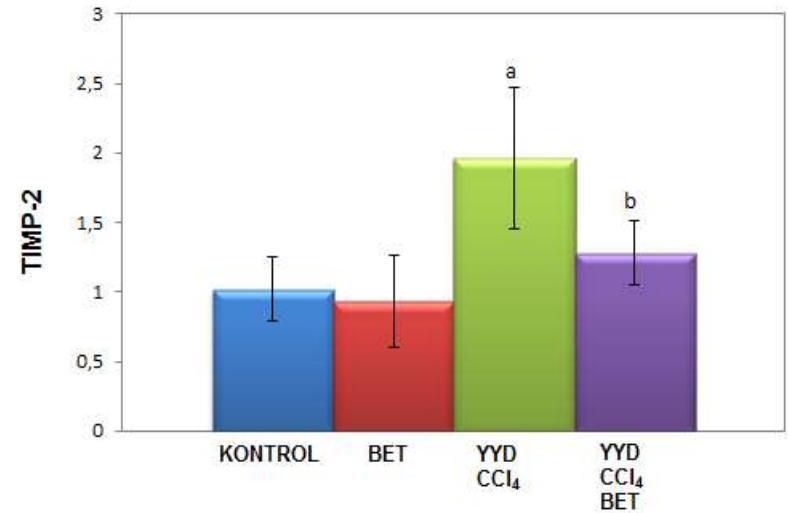
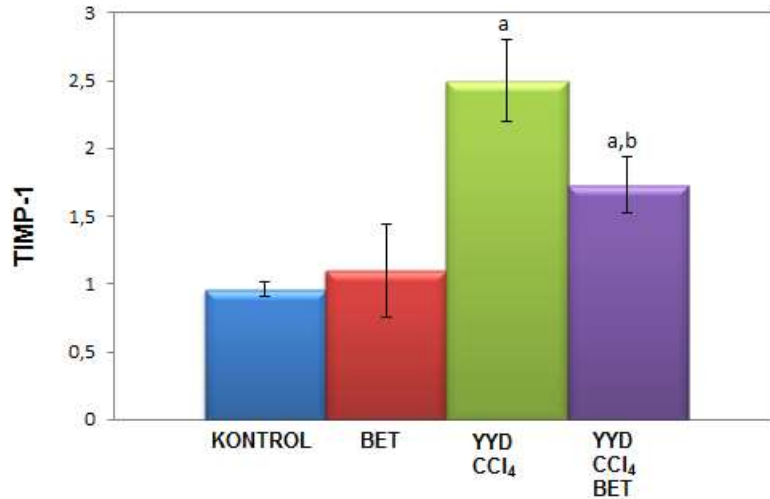
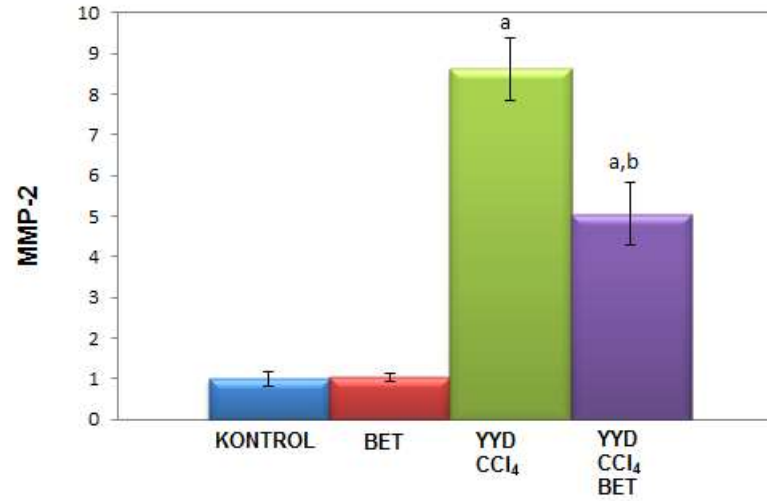
YYD+CCl₄+BET

YYD+CCl₄+BET

YYD+CCl₄+BET



Ekstraselüler Matriks Yapısı



^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

SONUÇ

Betainin,

- Hepatik fibroz modelinde fibroz oluşumu üzerine azaltıcı/engelleyici bir etkisinin olduğu,
- Antifibrotik etkisinin antioksidan ve antiinflamatuvar potansiyeli ile ilişkili olduğu,
- Hepatik stellat hücre aktivasyonunu azaltıcı ve böylece ekstraselüler matriks yapısını düzeltici etkisinin de önemli bir rol oynadığı ilk kez saptandı.



- **Erman ve ark., 2004.**
 - 4 hafta, sıçan
 - %5 etanol, içme suyu
 - CCl₄ (0.2 mL/kg; i.p.), haftada 2 kez
 - %1 BET, içme suyu (aynı zaman diliminde)
 - Serum ALT, AST azaldı.
 - Karaciğer MDA, DK azaldı.
 - Fibrotik değişiklikler azaldı.
- **Kim ve ark., 2009.**
 - 4 hafta, sıçan
 - DMN (10 mg/kg; i.p.), haftada 3 kez
 - %1 BET, içme suyu(DMN'den 2 hafta önce başlanmış; 6 hafta)
 - Serum ALT, AST, Bilirubin azaldı.
 - Karaciğer MDA, GSSG/GSH azaldı, GSH arttı.
 - Karaciğer HYP azaldı.
 - Fibrotik değişiklikler azaldı.
- **Tsai ve ark., 2015.**
 - 2 hafta, civciv
 - CCl₄ (0.2 mL/kg, i.p.) 1 ve 3. günlerde, 2 hafta
 - %1 BET, içme suyu
 - Lipit peroksitleri, inflamasyon, fibroz azaldı.
 - TGF- β , KOL1A1 azaldı.

DENEYSEL YAKLAŞIMLAR

NAFLD/Steatoz

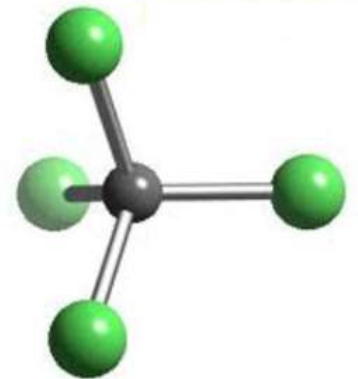
- Früktozca zengin diyet
- Metyonin ve kolinçe eksik diyet
- Yüksek yağlı diyet

NAFLD/Fibroz

- Yüksek yağlı diyet+CCl₄

Karbon tetraklorür (CCl₄)

- Güçlü bir hepatotoksindir.
- Karaciğerde sitokrom P-450 aracılığı ile CCl₄'den triklormetil radikali oluşur.
- Bu radikal gerek lipid peroksidasyonunu uyararak ve gerekse makromoleküllere çeşitli kovalan bağlanmalar yaparak etki gösterir.
- Deneysel karaciğer fibrozu/sirozu oluşturmada yaygın olarak kullanılmaktadır.



HİSTOPATOLOJİK SKORLAMA

Steatoz skorlaması

- 0= <% 5 (steatoz negatif),
- 1= % 5-33 (hafif steatoz),
- 2= % 33-66 (orta derecede steatoz),
- 3= >% 67 (şiddetli steatoz).

Fibroz skorlaması

- 0= yok,
- 1=bazı portal alanlarda fibröz genişleme, ince fibrözsepta var/yok,
- 2=portal alanların çoğunda fibröz genişleme, ince fibröz septa var/yok,
- 3= portal alanların çoğunda fibröz genişleme ve nadir P-P köprüleşme,
- 4=portal alanların çoğunda fibröz genişleme ve belirgin P-P ve aynı zamanda P-S köprüleşmeler,
- 5=belirgin köprüleşmeler ve nadir nodül oluşumu (tamamlanmamış siroz),
- 6=siroz, olası veya kesin.

Nekroinflamasyon skorlaması

- 0= görünür hücre hasarı yok,
- 1= dokunun %25'inden daha azında fokal (odaksal) hasar var (hafif),
- 2= dokunun %26-50'sinde fokal hasar var (orta-ılımlı),
- 3= dokunun %51'inden fazlasında yaygın hasar var (şiddetli),
- 4=global lezyon (global-geniş çaplı).

Bulgular

	KONTROL (n=6)	BET (n=6)	YYD+CCl ₄ (n=8)	YYD+CCl ₄ +BET (n=8)
Steatoz	0	0	2.80±0.42 ^a	1.20±1.03 ^{a,b}
Fibroz	0	0	3.50±1.17 ^a	0.70±0.48 ^{a,b}
Nekroinflamasyon	0	0	1.50±0.52 ^a	0.50±0.52 ^{a,b}
KC TG (mg/g doku)	4.78±0.33	4.53±0.49	12.7±2.69 ^a	8.75±1.78 ^{a,b}
KC HYP (µg/g doku)	304.0±45.8	348.3±50.7	543.3±68.1 ^a	378.8±59.2 ^b

^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

Bulgular

	KONTROL (n=6)	BET (n=6)	YYD+CCl₄ (n=8)	YYD+CCl₄+BET (n=8)
FRAP (nmol/mg protein)	63.7±6.74	55.9±7.83	76.9±10.8^a	68.2±7.03
GSH (nmol/mg protein)	25.2±2.82	22.8±1.78	47.7±8.58^a	46.3±8.92 ^a
SOD (U/mg protein)	24.8±2.78	26.6±3.85	17.3±2.72^a	18.9±2.52 ^a
CAT (μmol/min/mg protein)	248.7±23.7	236.2±30.8	268.1±60.4	221.0±14.0
GSH-Px (nmol/min/mg protein)	638.1±58.7	630.8±67.7	474.0±65.2^a	454.8±69.7 ^a
GST (nmol/min/mg protein)	488.9±49.6	472.6±42.2	378.9±52.7^a	411.2±67.9

^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

Serum Bulguları

	KONTROL	BET	HFD+CCl ₄	HFD+CCl ₄ +BET
Glikoz (mg/dL)	96.8±9.51	99.8±12.8	97.8±7.88	112.6±14.5
İnsülin (ng/mL)	0.72±0.17	0.73±0.13	1.11±0.32^a	0.98±0.32
HOMA İndeksi	4.30±1.10	4.48±0.94	6.70±2.00^a	6.89±2.69^a

^ap<0.05 tüm gruplar kontrol grubu ile; ^bp<0.05 YYD+CCl₄+BET grubu YYD+CCl₄ grubu ile karşılaştırıldı.

Collagenases

MMP1
MMP8
MMP13

Matrilysin

MMP7
MMP26

Metalloelastase

MMP12

Gelatinases

MMP2
MMP9

Enamelysin

MMP20

Stromelysins

MMP3
MMP10
MMP11

Other

MMP19
MMP21
MMP23A
MMP23B
MMP27
MMP28

Membrane-type MMPs

MMP14
MMP15
MMP16
MMP17
MMP24
MMP25

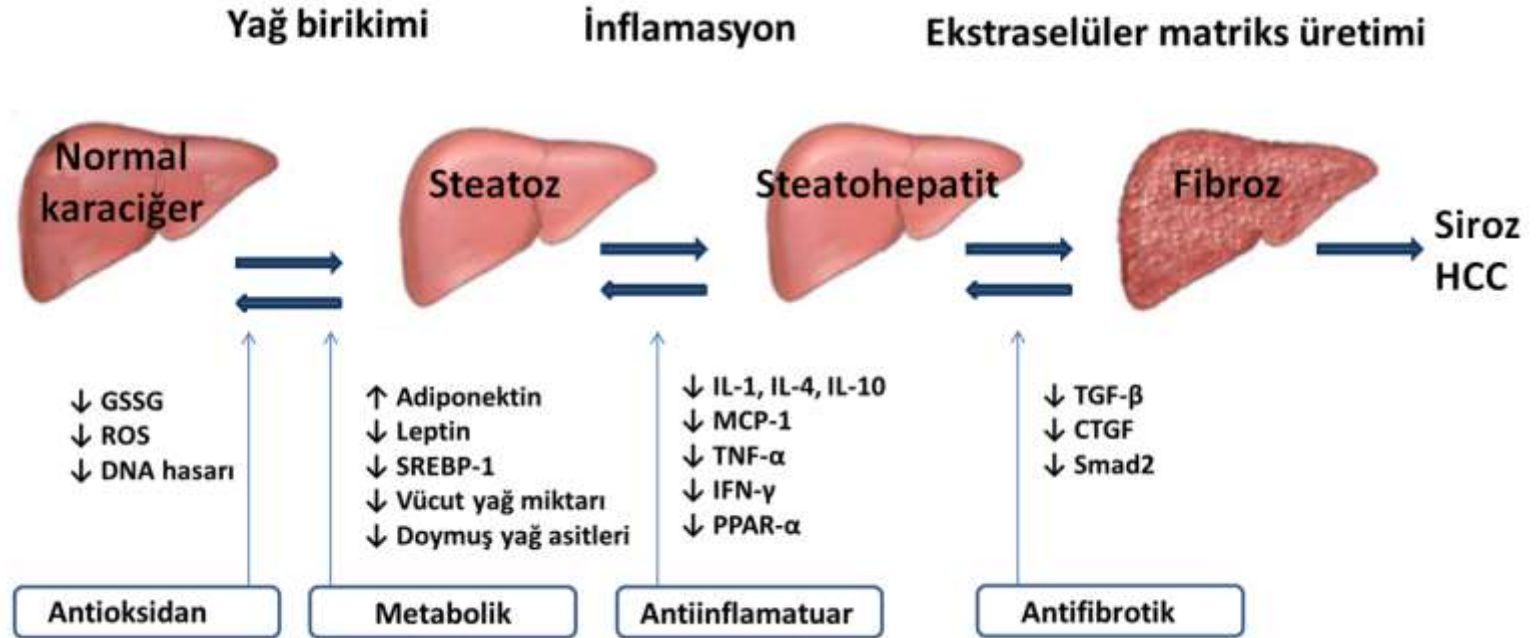
Inhibitors

TIMP1
TIMP2
TIMP3
TIMP4

Potential Inducers of Transcription

BSG
TCF20
TNF

TEDAVİ YAKLAŞIMLARI



Hepatik Stellat Hücre Aktivasyonu

