



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİYOASETAMİD İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARINDA TİYAMİNİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Şerife AĞIRCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR-2020

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİYOASETAMİD İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARINDA TİYAMİNİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Şerife AĞIRCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0606-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2020



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince beni sürekli yönlendiren, tez konumum oluşturulmasından yazımına kadar her aşamasında bilgi birikimini, tecrübe ve görüşlerini esirgemeyen, yetişmemde büyük önemi olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e,

Araştırmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşarak yön veren hocam Sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a, değerli zamanını ve tecrübelerini paylaşan hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK'e, özellikle laboratuvar işlemlerinin öğrenmemde büyük katkısı olan Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ'ye, eğitim ve öğretim hayatımda maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tüm zorluklarda her zaman arkamda olan aileme, teşekkürlerimi sunarım.



ETİK BEYAN

“Tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer hasarında tiyaminin koruyucu ve tedavi edici etkilerinin incelenmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu Prof. Dr. Özlem ÖZMEN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Şerife AĞIRCA

28.08.2020



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karaciğer	3
2.2.Tiyoasetamid	3
2.3.Tiyamin	4
2.4.Kaspaz-3	4
3. GEREÇ ve YÖNTEM	6
3.1. DeneySEL Prosedür	6
3.2. Histopatolojik Yöntem	7
3.3. İmmunohistokimya Yöntemi	8
3.4. Biyokimyasal Analizler	9
3.5. İstatistiksel Analizler	9
4. BULGULAR	11
4.1. Klinik Bulgular	11
4.2. Makroskobik Bulgular	11
4.3. Biyokimya Analiz Sonuçları	14
4.4. Histopatolojik Bulgular	14
4.5. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları	25
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 3.1.	Tioacetamidin intraperitoneal verilışı	6
Şekil 3.2.	Kan örneklerinin alındığı tüpler	7
Şekil 3.3.	İmmunohistokimyasal boyamaların yapılışı.	9
Şekil 4.1.	Grup 1'deki bir farenin normal görünümde karaciğerinin görüntüsü.	11
Şekil 4.2.	Grup 2'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğeri.	12
Şekil 4.3.	Grup 3'teki bir farenin soluk ve pürüzlü görünümdeki karaciğeri.	12
Şekil 4.4.	Grup 4'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğerinin görüntüsü.	13
Şekil 4.5.	Grup 5'teki bir farenin solulaşmış, pürüzlü ve şişkinleşmiş karaciğerinin görüntüsü.	13
Şekil 4.6.	Grup 1'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğeri ve vena sentralisleri (oklar), HE, Bar=200 µm.	15
Şekil 4.7.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=100 µm.	15
Şekil 4.8.	Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=50 µm.	16
Şekil 4.9.	Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=20 µm.	16
Şekil 4.10.	Grup 2'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğer dokusu, HE, Bar=200 µm.	17
Şekil 4.11.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=100 µm.	17
Şekil 4.12.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=50 µm.	18
Şekil 4.13.	Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=20 µm.	18
Şekil 4.14.	Grup 3'deki bir farenin karaciğer damarlarında şiddetli hiperemi (ince oklar) ve dejenerasyon ve yağlanmanın olduğu alanlar (kalın oklar), HE, Bar=200 µm.	19
Şekil 4.15.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (ince oklar) ve dejenere ve nekrotik hücrelerin bulunduğu alanlar (kalın oklar), HE, Bar=100 µm.	19
Şekil 4.16.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (siyah ince ok), megakaryotik hepatositler (siyah kalın oklar), piknotik çekirdekli nekrotik hepatositler (beyaz oklar), HE, Bar=50 µm.	20
Şekil 4.17.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, megakaryotik hepatositler (siyah ince oklar), nekrotik hepatositler (kalın siyah oklar) piknotik çekirdekli nekrotik hepatositler (beyaz ince ok), çift çekirdekli hepatositler (beyaz kalın ok) HE, Bar=20 µm.	20
Şekil 4.18.	Grup 4'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğeri ve vena sentralisleri (oklar), HE, Bar=200 µm.	21
Şekil 4.19.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=100 µm.	21
Şekil 4.20.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=50 µm.	22
Şekil 4.21.	Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=20 µm.	22

Şekil 4.22.	Grup 5'deki bir farenin karaciğer damarlarında şiddetli hiperemi (ince oklar) ve dejenerasyon ve yağlanmanın olduğu alanlar (kalın oklar), HE, Bar=200 µm.	23
Şekil 4.23.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (kırmızı kalın ok), yangısal hücre infiltrasyonları (beyaz kalın ok), nekrotik hepatositler (ince siyah ok), çift çekirdekli hücreler (beyaz ince oklar), megakaryotik hepatositler (kalın siyah oklar), safra pigmentleri (kırmızı ince ok) HE, Bar=100 µm.	23
Şekil 4.24.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (siyah kalın ok), yangısal hücre infiltrasyonları (beyaz kalın ok), nekrotik hepatositler (ince siyah ok), çift çekirdekli hücreler (beyaz ince oklar), safra pigmentleri (kırmızı ince ok) HE, Bar=50 µm.	24
Şekil 4.25.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, yangısal hücre infiltrasyonları (beyaz ok) ve safra pigmentleri (siyah ok) HE, Bar=50 µm.	24
Şekil 4.26.	Grup 1'deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	25
Şekil 4.27.	Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	26
Şekil 4.28	Grup 2'deki bir farenin karaciğerinde negatif kaspaz-3 ekspresyonu, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	26
Şekil 4.29	Yukarıdaki resmin yakından görünümü, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	27
Şekil 4.30	Grup 3'deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	27
Şekil 4.31	Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	28
Şekil 4.32	Grup 4'deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	28
Şekil 4.33	Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	29
Şekil 4.34	Grup 5'deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	29
Şekil 4.35	Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm	30

TABLÖLAR

Tablo 4.1.	Karaciğer panelinin serum analiz sonuçları	14
Tablo 4.2:	Kaspaz-3 immunohistokimyasal sonuçlarının istatistik analiz sonuçları	30



SİMGELER ve KISALTMALAR

ALT	: Alaninamino Transaminaz
ALB	: Albümin
ALP	: Alkalen Fosfotaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BILEA	: Bilirubin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
NEFA	: Esterleşmemiş Yağ Asidi
PBS	: Fosfat Tamponlu Solüsyon
GGT	: Gama Glutamin Transferans
g	: Gram
HE	: Hematoksilen Eozin
IP	: İntraperitoneal
kg	: Kilogram
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
NASH	: Non Alkolik Steatohepatit
/	: Oran
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNA	: Ribonükleik Asit
°C	: Santigrad Derece
SD	: Standart Sapma
TAA	: Tioacetamid
TBIL	: Total Bilirubin
TP	: Total Protein

%

: Yüzde

ÖZET

Tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer hasarında tiyaminin koruyucu ve tedavi edici etkilerinin incelenmesi

Karaciğer hasarı; viral hastalıklar, alkolik hepatit ve siroz gibi karaciğer hastalıklarını ve non alkolik steatoz ve non alkolik steatohepatitis gibi karaciğer yağlanmalarını içeren kansere kadar ilerleyen bir seri hastalık dizisidir. Karaciğer hasarının insidansını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar cinsiyet, yaş, alkol, aflatoksin, endojen ve ekzojen hormonlar, diyet, hepatit B ve hepatit C gibi viral etkenler ile şistozomiazis gibi paraziter enfestasyonları içeren çevresel faktörler; obezite, immün fonksiyon, kalıtsal hastalıklar, Diyabetes mellitus, siroz, alkolik olmayan yağlı karaciğer, gibi konakçıdan kaynaklanan faktörler olarak sıralanmaktadır. Deneysel olarak kullanılan tiyoasetamid (TAA) de önemli bir hepatotoksik maddedir. Tiyamin (B1 vitamini) önemli antioksidan maddelerden birisidir. Birçok doku ve organı özellikle sinir sistemi hücrelerini zedelenmelere karşı korur. Bu çalışmanın amacı TAA ile oluşturulan karaciğer hasarında tiyaminin koruyucu ve tedavi edici etkilerinin incelenmesidir. Çalışmada 25-40 gram ağırlığında CD-1 ırkı toplam 50 erkek fare kullanıldı ve fareler 10 ar hayvandan oluşan 5 gruba ayrıldı. Grup 1 (Kontrol grubu); normal su ile 2 ay süre ile adlibitum olarak beslendi. Grup 2 (Tiyamin grubu); günlük 50 mg/100 ml su içinde tiyamin adlibitum olarak 2 ay boyunca verildi. Grup 3 (Profilaksi grubu) 50 mg/100 ml tiyamin su içinde adlibitum 1 ay verildi ve bu süre sonunda intraperitoneal olarak haftada iki kere tioacetamid (TAA) 200 mg/kg olarak verildi. Grup 4 (Tedavi grubu) çalışma başlangıcında intraperitoneal olarak haftada iki kere 200 mg/kg tioacetamid (TAA) 1 ay süre ile uygulandı ve 1 ay sonra 50 mg/100 ml tiyamin su içinde adlibitum verildi. Grup 5 (TAA grubu) intraperitoneal olarak haftada iki kere 200 mg/kg TAA 2 ay süre ile uygulandı. Çalışma sonunda fareler anestezi altında dekapite edilerek histopatolojik inceleme için karaciğer dokusu örnekleri, biyokimyasal parametreler için de kan örnekleri alındı. Serum örneklerinde bilirubin (BILEA), total bilirubin (TBIL), total protein (TP), alkalen fosfotaz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alenin transaminaz (ALT), albümin (ALB) testlerini içeren karaciğer paneli incelendi. Nekropsi sırasında TAA grubundaki farelerde karaciğerin soluklaştığı ve kenarlarının kütleştiği gözlemlendi. Karaciğer örnekleri ise histopatolojik ve kaspaz-3 açısından immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Serum örneklerinde karaciğer panelinde incelenen tüm verilerin TAA grubunda önemli düzeyde arttığı dikkati çekti. TAA karaciğerlerde şiddetli dejenerasyon ve nekrozlara sebep olduğu gözlemlendi. Tiyamin TAA uygulaması ardından verildiğinde biyokimyasal, patolojik ve immunohistokimyasal bulguların düzelmesini sağladı. Bu çalışmanın sonuçları tiyaminin tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer hasarında sınırlı profilaktik etkisinin ancak önemli ölçüde tedavi edici etkisi olduğunu gösterdi.

* Bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 0606-YL-19).

Anahtar kelimeler: İmmunohistokimya, Patoloji, Profilaksi, Tedavi, Tiyamin, Tiyoastamid.

ABSTRACT

Investigation of the Protective and Therapeutic Effects of Thiamine in Thioacetamide-Induced Liver Injury

Liver damage; is a series of diseases that, including viral diseases, alcoholic hepatitis, cirrhosis, and lubrication such as non-alcoholic steatosis and non-alcoholic steatohepatitis and progress to cancer. There are many factors that affect the incidence of liver damage. These include sex, age, alcohol, aflatoxin, endogenous and exogenous hormones, diet, viral factors such as hepatitis B and hepatitis C, and parasitic infestations such as schistosomiasis; activities from the host such as obesity, immune function, hereditary diseases, diabetes mellitus, cirrhosis, non-alcoholic fatty liver. Experimentally used thioacetamide (TAA) is an important hepatotoxic substance. Thiamine (vitamin B1) is one of the important antioxidant substances. Tiamine protected against to damage of many tissues and organs particularly nervous system cells. The aim of this study is to examine therapeutic and prophylactic effects of TAA on thiamine induced liver damage. In this study, 50 male CD-1 mice, weighing 25-40 grams were used and mice were divided into 5 groups consisting of 10 each. Group 1 (Control group); they were fed with normal water for 2 months as adlibitum. Group 2 (Thiamine group); it was given as thiamine adlibitum in 50 mg / 100 ml water daily for 2 months. Group 3 (Prophylaxis group) was given adlibitum in 50 mg / 100 ml thiamine water for 1 month and at the end of this period, intraperitoneally, 200 mg / kg of thioacetamide (TAA) was given twice a week. Group 4 (Treatment group) was administered intraperitoneally twice weekly 200 mg / kg thioacetamide (TAA) for 1 month at the beginning of the study and adlibitum in 50 mg / 100 ml thiamine water after 1 month. Group 5 (TAA group) was intraperitoneally administered 200 mg / kg TAA twice a week for 2 months. At the end of the study, the mice were decapitated under anesthesia and liver tissue samples were taken for histopathological examination and blood samples for biochemical parameters. In serum samples, liver panel including bilirubin (BILEA), total bilirubin (TBIL), total protein (TP), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alenin transaminase (ALT), albumin (ALB) tests were examined. During necropsy, it was observed that the liver in the TAA group became pale and the edges were swollen. Liver samples were evaluated histopathologically and immunohistochemically for caspase-3 expression. It was noticed that all the data examined in the liver panel in serum samples increased significantly in the TAA group. TAA caused severe degeneration and necrosis in the livers. When thiamine was administered after TAA application, it improved the biochemical, pathological and immunohistochemical findings. The results of this study showed that thiamine has little prophylactic effect, but a significant therapeutic effect in thioacetamide induced liver injury.

*This study was supported by scientific Projects Commission of University of Mehmet Akif Ersoy (Project number: 0606-YL-19).

Key words: İmmunohistochemistry, Pathology, Prophylaxis, Treatment, Tiyoasteamid, Tiyamine.



1. GİRİŞ

Vücuda giren çeşitli ilaçlar, kimyasal toksik maddeler akciğerlerde, bağırsaklarda ve böbreklerde biyotransformasyona uğrarlar. Ancak detoksifiye edilme olayı en çok karaciğerde şekillenir. Ayrıca karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmalarında görev alan en önemli organ olup, amino asitlerden glukoz meydana gelmesi, ihtiyaç fazlası glukozun glikojen halinde depo edilmesi, yağ asidi sentezi, depo edilmesi, lipoliz yolu ile kana yağ asidi verilmesi yine karaciğerde meydana gelmektedir. Karaciğer hasarı; hepatit B ve C gibi viral iltabi hastalıklar ile karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve siroz gibi alkolik ve non- alkolik karaciğer hastalıklarını içeren kansere kadar ilerleyen bir seri hastalıklar dizisidir (McGlynn ve London, 2005; Özyalın, 2008).

2. GENEL BİLGİLER

Karaciğer hasarının insidansını etkileyen faktörler; cinsiyet, yaş, obezite, alkol tüketim miktarı, diyet, hepatit B ve C gibi viral ve şistozomiazis gibi paraziter etkenler, toksik maddeler, endojen ve ekzojen hormonlar, siroz, alkolik ve alkolik olmayan karaciğer yağlanması, Diyabetes mellitus gibi metabolik hastalıklar şeklinde sıralanabilir. Bu faktörlerin yanında deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan tiyoasetamid de (TAA) hepatotoksik bir ajandır. TAA, DNA, RNA, protein sentezini ve glutasyonu etkileyerek intrahepatik metabolik değişikliklere neden olur (Dashti ve ark., 1989; Zimmermann ve ark., 1987).

Karaciğer hasarının obezite, diyabet, hipertansiyon, hiperkolestrolemi ve hiperlipidemiye kapsayan metabolik ve insülin rezistans sendromu ile kardiyovasküler hastalıklarla çok sıkı bir birliktelik göstermesi, özellikle alkole bağımlı olmayan yağlı karaciğer (NASH) oluşumu gibi gözlenen vakalarda önemi giderek artmaktadır (Burke ve Lucey, 2004).

Son yıllarda karaciğer hastalıkları arasında karaciğer yağlanması, hem insanlarda hem de hayvanlarda, özellikle de sütçü sığırlarda önemli bir metabolik hastalık olarak yer etmiştir.

Yağlı karaciğer sendromu, özellikle verimi yüksek süt ineklerinde, kuru dönemde fazla ve yüksek enerjili yemlerle beslenme veya laktasyonun başlangıç dönemindeki negatif enerji balansı sebebiyle, vücudun enerji ihtiyacının organizmanın yağ depolarından karşılanması nedeniyle şekillenmektedir. Fazla miktarda depo yağın serbest hale geçerek hepatositlerde yoğun olarak birikmesi nedeniyle oluşan karaciğer yağlanması ticari işletmelerde önemli ekonomik kayıplara sebep olan bir problemdir (Öztürk, 2008).

Süt verimi yüksek ineklerde insidansı ve prevalansı oldukça yüksek bir metabolik hastalık olan karaciğer yağlanması, özellikle doğum sonrası dönemde etkili olmakta ve laktasyonun ilk dönemlerinde retensiyon sekondinarum, metritis, abomasum

deplasmanı, ketozis, immun sistem cevabının ve fertilitenin azalması gibi birçok komplikasyona sıklıkla sebep olmaktadır (Ingvarsen 2006; Öztürk, 2008).

2.1.Karaciğer

Karaciğerde, hepatositler, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, stellat hücreleri, safra kanalı epitel hücreleri olmak üzere beş tip hücre bulunmaktadır. Bunlardan hepatositler, yağ asitleri, fosfolipidler, trigliseridlerin metabolizmasında ve kolesterol ile safra asitleri yapımında görev alır. Monositlerden köken alan kupffer hücreleri, lokal makrofajlardır. Bu hücreler hepatik dolaşımdaki tümör hücrelerini kendilerine çekerek fagosit etme yeteneğine sahiptir (Kan ve ark., 1995). Yüksek miktarda retinol içeren stellat hücreleri, disse aralığına kollojen salgılayarak fibroz dokunun şekillenmesine neden olur. Endotel hücreleri ise, çeşitli kimyasal maddeler ve zararlı mikroorganizmalar için bir süzgeç görevi üstlenir.

Karaciğer vücutta hem endokrin hem de ekzokrin göreve sahip bir organdır. Bu yönüyle bazı maddelerin sentezini yapar ve depo ederken bazılarını da detoksifiye eder ya da taşır (Noyan A, 2011). Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında görev alır. Vitamin A, D ve B12'nin yanı sıra apoferritin-ferritin sistemi ile de demirin depo edilmesini sağlar. Ayrıca karaciğer safra tuzlarının tek üretim yeridir ve karaciğer hücreleri devamlı olarak safra üretilir.

2.2 Tiyoasetamid

Tiyoasetamid (TAA), karaciğer hasarına neden olan ve kanserojen etkiye sahip thiono-sülfür içeren bir bileşiktir (Kizer ve ark., 1985; Landon ve ark., 1986). Uzun zamandan beri deri, motor yakıtı, tekstil, kağıt, yiyecek ve içecek endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Watson ve Preedy2012). Ayrıca fungusit (mantar öldürücü) olarak da kullanılmaktadır (Özyalın, 2008). Çoğunlukla hayvanlarda fulminant hepatik yetmezlik ve karaciğer sirozu gibi deneysel modelleri oluşturmak için kullanılır (Bruck ve ark., 2002; Li ve ark., 2002). Düşük dozlarda TAA'nın verilmesi akut hepatik toksisiteye neden olurken, kronik maruz kalma hepatik siroz ve karaciğer

tümörlerinin olası gelişmesine neden olur. Öldürücü dozlarda verilmesi halinde ise karaciğerde şiddetli sentrilobüler nekroza neden olur.

TAA'nın sitokrom P450 ile metabolik aktivasyonu, TAA-ara maddeleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. TAA- ara maddeleri, biyolojik olarak önemli molekülleri kovalent olarak bağlayan ve hücrel oksidatif stresi, lipid peroksidasyonunu artıran ve glutatyonu artıran mediatörlerdir (Pallottini ve ark., 2006).

Uygulamadan kısa bir süre sonra TAA çok reaktif bir bileşik olan asetamid ve tiyoasetamid S-dioksite metabolize olur. Bu metabolitin doku makromoleküllerine bağlanması hepatik nekroz üretiminden sorumlu olabilir (Chieli ve Malvaldi, 1984).

2.3.Tiyamin

Suda eriyen bir vitamin olan tiyamin (B1 vitamini) karbonhidrat metabolizmasında çok fazla önemli bir yer işgal eden pirüvat dehidrogenaz, a-keto-glutarat dehidrogenaz, transketolaz enzimlerinin kofaktörüdür. Bu sebeple tiyamin eksikliğinde çok çeşitli hastalıklar şekillenir. Tiyamin, bir pirimidin ve bir tiyazolün metilen köprüsü ile birleşmesiyle oluşur. Doğada serbest vitamin ya da tiyamin pirofosfat halinde bulunur. Tiyamin, beyinde ve karaciğerde, tiyamin difosfokinaz katalizörlüğünde aktif formu olan tiyamin pirofosfat (TPP)'ye dönüştürülmektedir (Victor ve ark., 1989).

2.4.Kaspaz-3

Kaspazlar sistein-proteaz grubu enzimler olup bir çeşit planlı hücre nerozu olan apoptotik hücre ölümü sırasında çok önemli rol oynarlar. Kaspazlar inaktif proteinler şeklinde sentezlenirler ve değişik yollarla aktive edildikten sonrasında, etkilerini gösterir (Nicholson ve ark., 1995). Kaspaz-3 apoptotik hücrede hem ekstrinsik (ölüm ligandı) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollarla aktive edilir (Salvesen, 2002). Kaspaz-3 için zimojen özellik (inaktiflik) gereklidir, aktif olduğunda hücreleri ayırım gözetmeden öldürme kapasitesi vardır (Boatright ve Salvesen, 2003).

Bu çalışmada tiyaminin, karaciğer hasarına yol açan ve kanserojen aktiviteye sahip bir bileşik olan tiyoasetamid tarafından farelerde deneysel olarak oluşturulan karaciğer hasarı üzerine olası koruyucu ve tedavi edici etkileri araştırılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Prosedür

Çalışmada 5 grupta toplam 50 CD-1 erkek fare kullanıldı. Çalışmada 10'ar fareden oluşan ve aşağıda açıklanan işlemler uygulanan gruplar üzerinde 2 ayda tamamlandı.

Grup 1 kontrol grubu hiçbir işlem yapılmadı. Grup 2 (tiyamin grubu) günlük (50 mg/100 ml) su içinde adlibitum çalışma süresince verildi. Grup 3 (proflaksi grubu) tiyamin (50 mg/100 ml) su içinde adlibitum 1 ay verildi bu süre sonunda intraperitoneal olarak haftada iki kere tioacetamid (200 mg/kg) olarak verildi. Grup 4 (tedavi grubu) çalışma başlangıcında intraperitoneal olarak haftada iki kere tioacetamid (200 mg/kg) 1 ay süre ile verildi ve 1 ay sonra tiyamin (50 mg/100 ml) su içinde adlibitum verildi. Grup 5 (TAA grubu), intraperitoneal olarak haftada iki kere tioacetamid (200 mg/kg) 2 ay süre ile verildi.



Şekil 3.1: Tioacetamidin intraperitoneal verililişi

Çalışma sonucunda fareler intraperitoneal (IP) 90 mg/kg ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) ve 10 mg/kg ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV) anestezisi ile ötenazi edilerek kan ve karaciğer örnekleri toplandı. Serum örneklerinde karaciğer hasarını değerlendirmek için karaciğer paneli incelendi. Karaciğer örnekleri histpatolojik ve kaspaz-3 ekspresyonları açısından immunohistokimyasal olarak incelendi.



Şekil 3.2: Kan örneklerinin alındığı tüpler

3.2. Histopatolojik Yöntem

Nekropsi sırasında alınan karaciğer örnekleri %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Bir gün formaldehidde bekletilen dokular trimlenerek takip kasetlerine alındı. Ertesi gün akşam kasetler tam otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yerleştirildi. Dokular gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek organlardaki yağın alınması ve sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Ertesi gün sabah dokular parafine gömülerek blokajları yapıldı. Bloklardan 4-5 saat

soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Normal lama alınan kesitler hematoksilin eozin ile boyandı. İmmunohistokimyasal olarak kaspaz-3 aktivitesi incelenmesi için de polilizinli lamlara iki takım kesit alındı.

Normal lamlara çekilen doku kesitleri parafinin uzaklaştırılması için 30'ar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Ardından sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkollerden geçirilerek dokulara su verildi. Daha sonra hematoksilinle 15 dakika ve ardından eozinle 3 dakika boyandı. Bunun ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilen dokuların suyu alındı. Ksilolde parlatılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı ve mikroskop altında incelendi.

3.3. İmmunohistokimya Yöntemi

Polilizinli lamlara çekilerek hazırlanan kesitler immunoperoksidaz yöntem için streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemine göre boyandı. İmmunohistokimyasal inceleme için Abcam (UK) firmasının hazır kitleri kullanıldı. Kesitler kaspaz-3 [anti-caspase-3 antibody (ab4051), Abcam, 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için immunohistokimyasal olarak boyandı. Bu amaçla kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Dokular 10 dakika süreyle suda yıkandı. Daha sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla kesitler %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika muamele edildi. Ardından sitrat buffer solüsyonu içinde 2 defa 5 dakika süreyle kaynatıldı. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle phosphate buffered saline (PBS)'de yıkandı. Daha sonra nonspesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle PBS'te yıkandı, takiben streptoavidin ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'te 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemten sonra dokular biotinli serum ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı, hazırlanmış olan DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojen ile boyandı. Sekonder kit olarak BioVision

firmasının ready to use IHC/ICC kit (Biotin free), one step HRP polymer anti-mouse, rat & rabbit IgG with DAB (Catalog K405-50) kullanıldı. Karşıt boyama için Harris hematoxilen ile boyandı ve preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Negatif kontrol için kesitlere primer antikor konulmadan aynı yönteme göre boyandı.

 mmunohistokimyasal boyanmalar 0-3 arasında skorlandı. 0= boyama yok, 1= hafif boyanma, 2= orta şiddette boyama ve 3= şiddetli boyama olarak değerlendirildi. Elde edilen skorlar istatistik olarak incelendi ve tabloladıtırıldı.



Şekil 3.3:  mmunohistokimyasal boyamaların yapılışı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

Serum örneklerinde karaciğer paneli (bilirubin (BILEA), total bilirubin (TBIL), total protein (TP), alkalin fosfotaz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alenin transaminaz (ALT), albümin (ALB)) düzeyleri otoanaliz  ihazında ölçüldü (Gesam chem 200 Gesam Production srl, Campobello, Italya).

3.5 İstatik Analizler

Çalışmada biyokimyasal bulgular ve immunohistokimyasal skorların istatistik analizi One-way ANOVA testi ile SPSS 15.00 paket programda yapıldı. Gruplar arası

farklar Duncan testi ile karşılaştırıldı. $P<0.05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Çalışma süresince Grup 1 ve Grup 2’de hiç ölüm saptanmazken, Grup 3’te 2, Grup 4’te 1 Grup 5’te ise 5 fare öldü. TAA grubundaki farelerin hareketlerinin yavaş ve genelde durgun oldukları dikkati çekti. Tiyamin ile tedavi edilen veya profilaksi uygulanan gruplarda klinik semptom saptanmadı. Sadece tiyamin verilen gruptaki hayvanların klinik olarak hareketli ve daha aktif oldukları dikkati çekti.

4.2. Makroskopik Bulgular

Nekropsi sırasında tüm gruplardaki farelerin karaciğerleri dikkatlice incelendi. Grup 1,2 ve 4’teki farelerin karaciğerleri normal görünümde iken grup 3 ve 5’teki farelerin karaciğerleri soluklaşmış ve karaciğer parankimi pürüzlü bir görünümdeydi. En belirgin farklılık grup 5’teki farelerin karaciğerlerinde saptandı. Bu gruptaki hayvanların karaciğerleri soluk ve gevrekleşmişti (Şekil 4.1- 4.5).



Şekil 4.1: Grup 1’deki bir farenin normal görünümde karaciğerinin görüntüsü.



Şekil 4.2: Grup 2'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğeri.



Şekil 4.3: Grup 3'teki bir farenin soluk ve pürüzlü görünümdeki karaciğeri.



Şekil 4.4: Grup 4'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğerinin görüntüsü.



Şekil 4.5: Grup 5'teki bir farenin solulaşmış, pürüzlü ve şişkinleşmiş karaciğerinin görüntüsü.

4.3. Biyokimya Analiz Sonuçları

Nekropsi sırasında alınan kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve safra asitleri, total protein, GGT, total bilirubin, ALT, ALP ve albümin değerleri incelendi ve gruplar arasındaki değerler istatistik olarak karşılaştırıldı. Tüm verilerde en yüksek değerler Grup 5'te saptandı. Ardından diğer yüksek değerler Grup 3'te gözlemlendi. Karaciğer verilerinin istatistik analiz sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Karaciğer panelinin serum analiz sonuçları

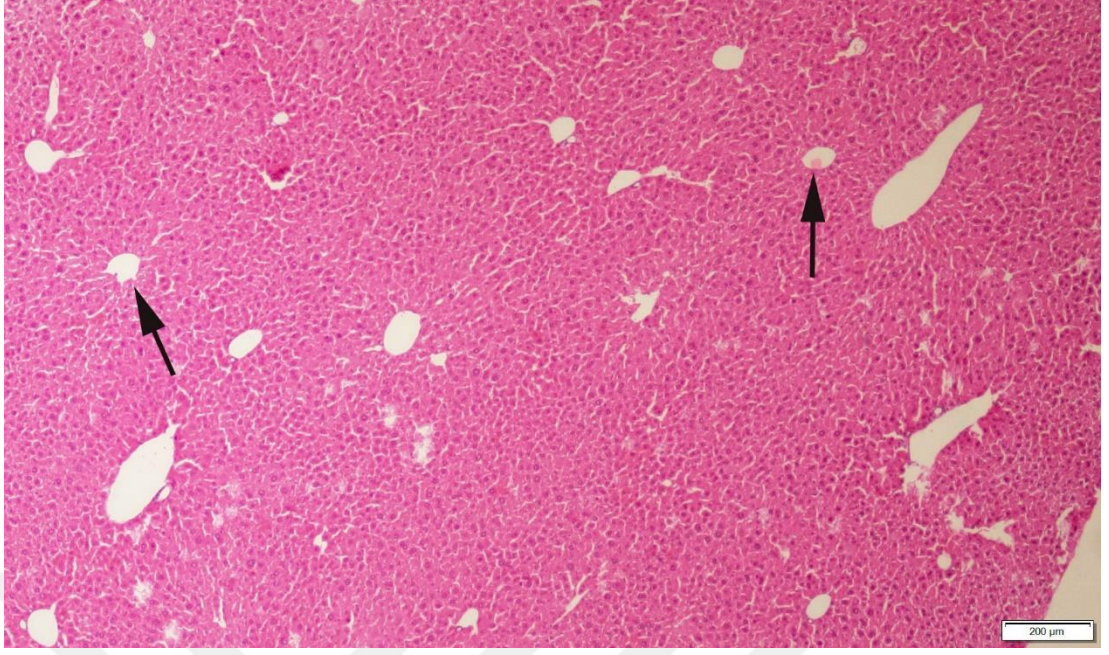
Gruplar	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	P
Safra a	3.34±2.06 ^a	0.74±0.27 ^b	10.62±5.89 ^c	4.48±2.62 ^a	40.35±30.57 ^d	<0.001
T.Prot.	4.60±0.21 ^a	4.68±0.29 ^a	5.55±0.87 ^b	5.35±0.65 ^b	5.72±0.75 ^b	<0.001
GGT	2.77±0.74 ^a	3.90±0.91 ^b	4.37±0.77 ^c	2.50±0.90 ^a	5.22±0.79 ^d	<0.001
T.Bil.	0.09±0.03 ^a	0.11±0.03 ^{ab}	0.15±0.07 ^b	0.13±0.02 ^{ab}	0.15±0.06 ^b	<0.001
ALT	67.98±46.40 ^a	62.58±42.75 ^a	103.35±23.90 ^b	108.85±48.13 ^b	152.05±17.19 ^c	<0.001
ALP	52.33±16.04 ^a	62.30±11.48 ^a	67.25±13.96 ^a	55.75±14.03 ^a	91.77±37.82 ^b	<0.001
Album	2.96±0.10 ^{ac}	2.96±0.21 ^{ac}	3.29±0.15 ^b	2.88±0.08 ^a	3.13±0.14 ^c	<0.05

*: Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

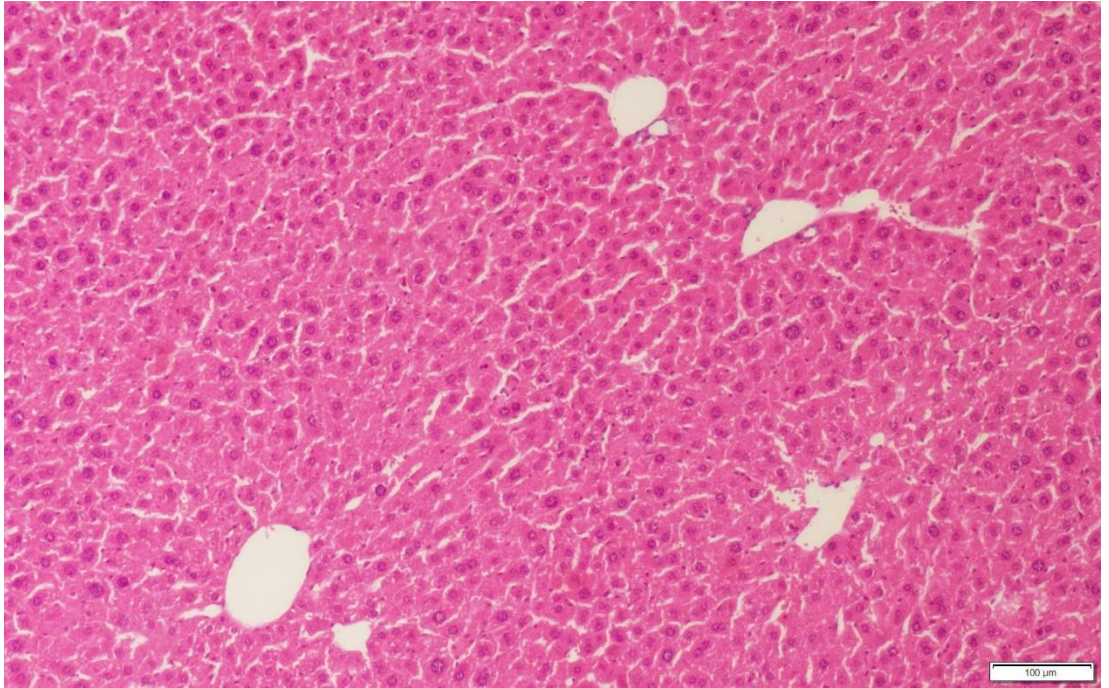
** : Aynı satırda üst simgeleri aynı olan gruplar istatistik olarak benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistik olarak önemlidir.

4.4. Histopatolojik Bulgular

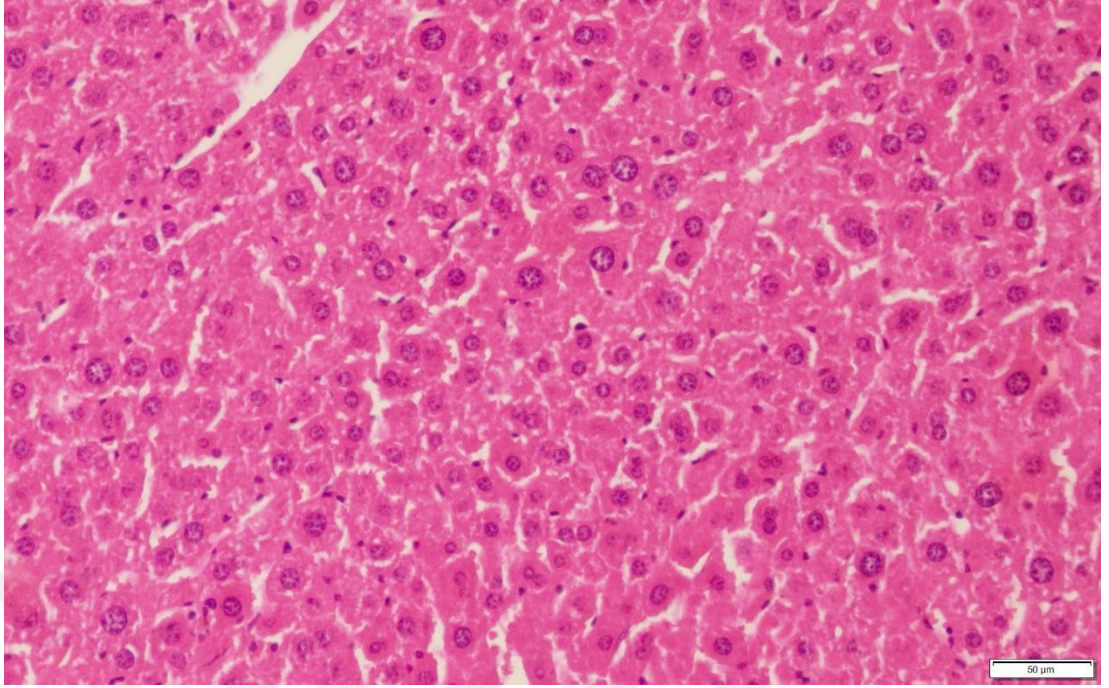
Karaciğerlerin histopatolojik incelemesinde Grup 1 ve 2'deki farelerin karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinde normal histolojik görünüm saptandı. Grup 4'te ise normale çok yakın bir histolojik görünüm dikkati çekti. Grup 3'te hiperemi ve dejeneratif odaklar görüldü. Hepatositlerde megalositozis ve çok yoğun şekilde çift çekirdekli hepatositlere rastlandı. Ancak en belirgin patolojik veriler Grup 5'te saptandı. Bunların arasında şiddetli hiperemi, dejeneratif ve nekrotik hepatositler, yer yer safra pigmenti birikimleri ile megalokaryozis ve çift çekirdekli hücreler bulunmaktaydı. Yer yer odaklar halinde yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çekti. Birçok hepatositte yağlı değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.6 - 4.25).



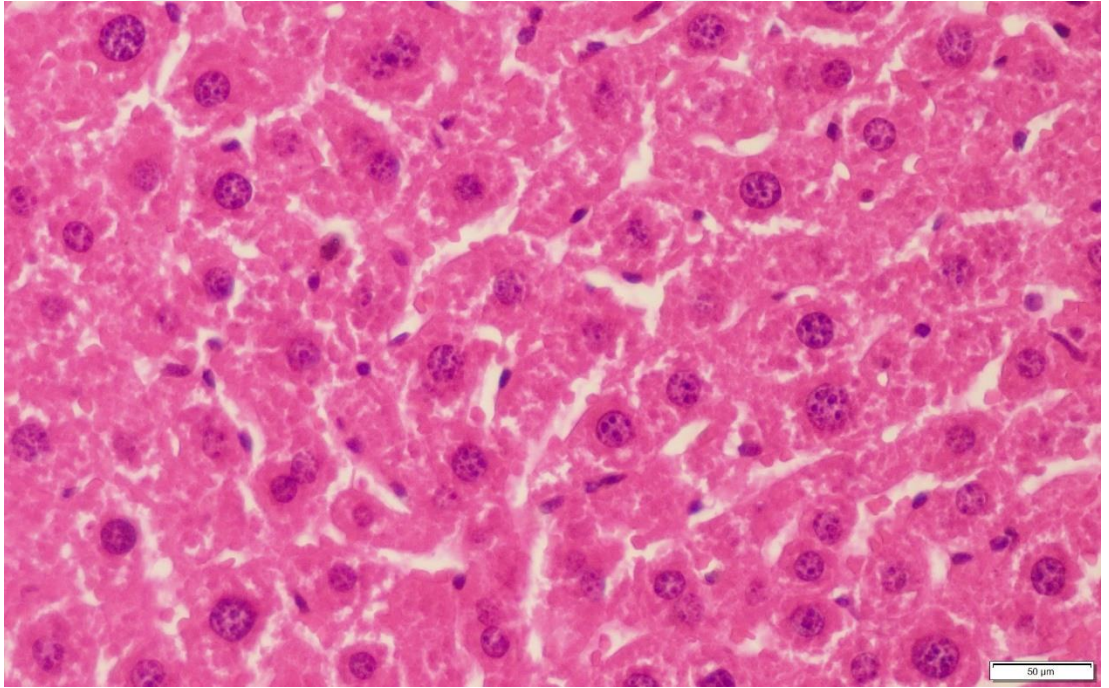
Şekil 4.6: Grup 1'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğeri ve vena sentralisleri (oklar), HE, Bar=200 µm.



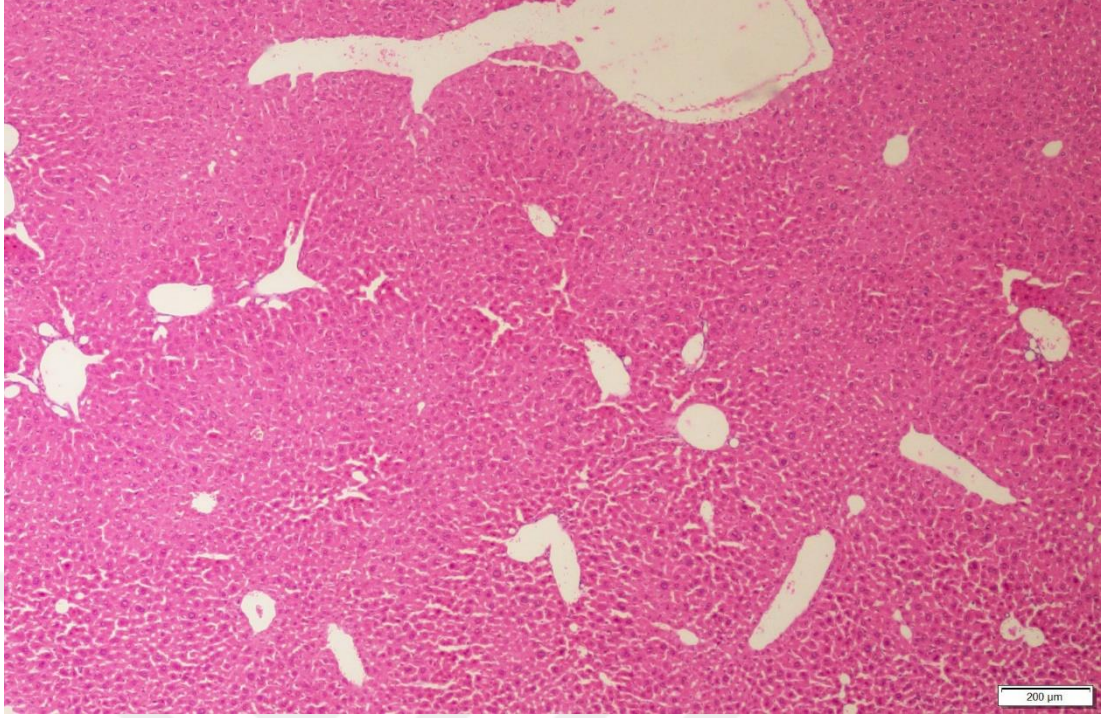
Şekil 4.7: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=100 µm.



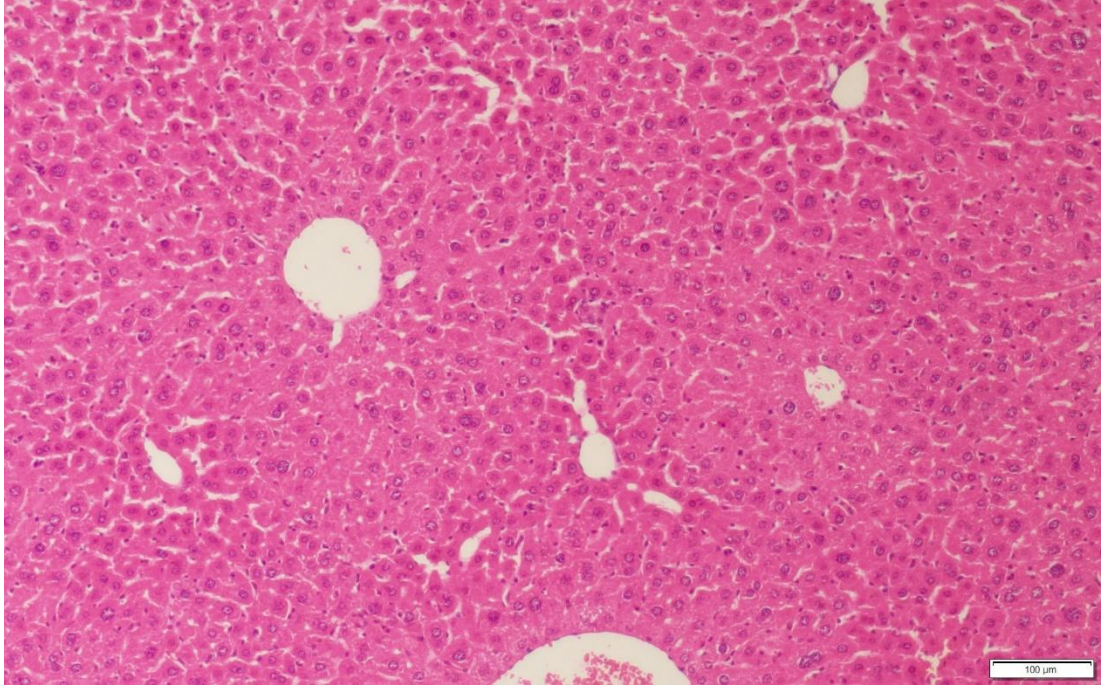
Şekil 4.8: Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=50 µm.



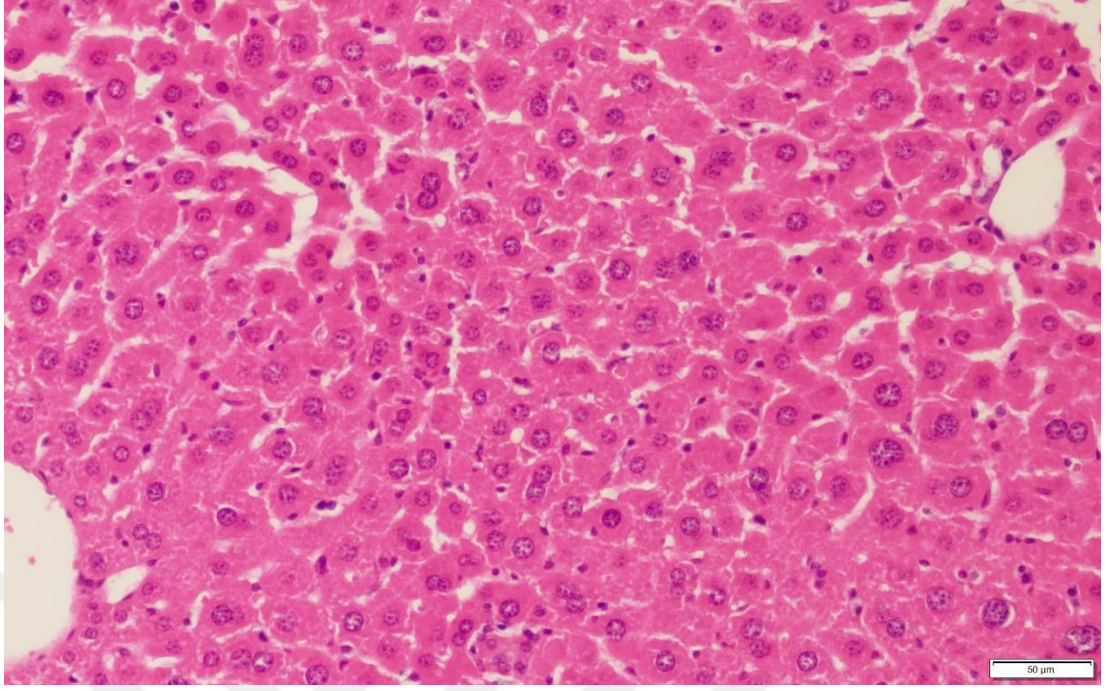
Şekil 4.9: Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=20 µm.



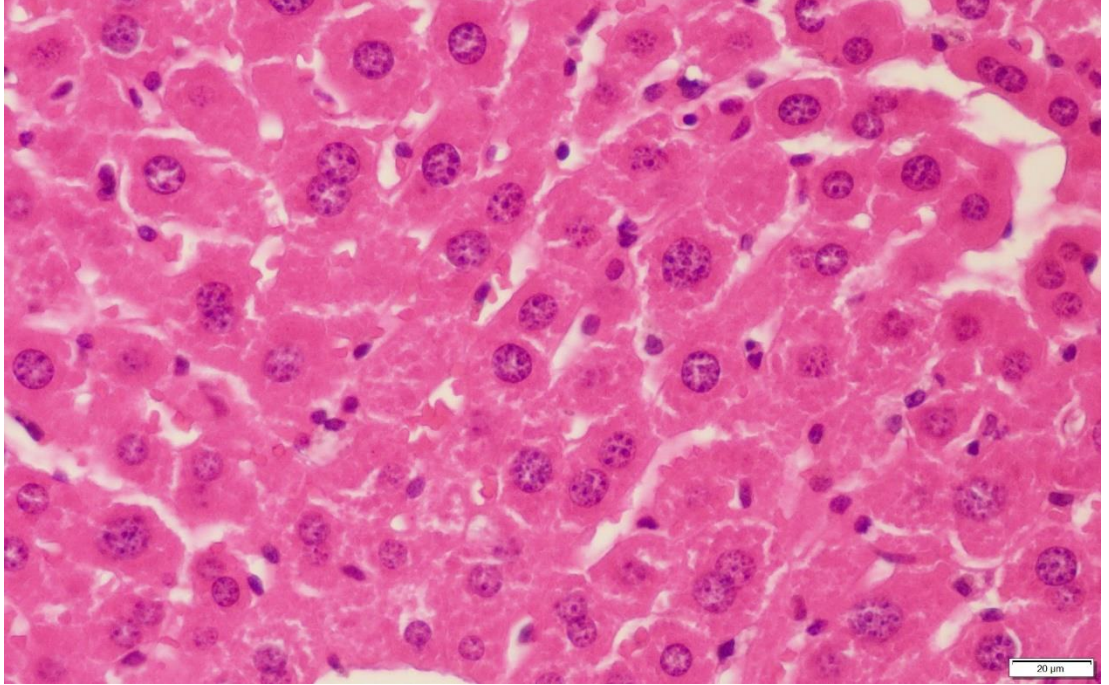
Şekil 4.10: Grup 2'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğer dokusu, HE, Bar=200 µm.



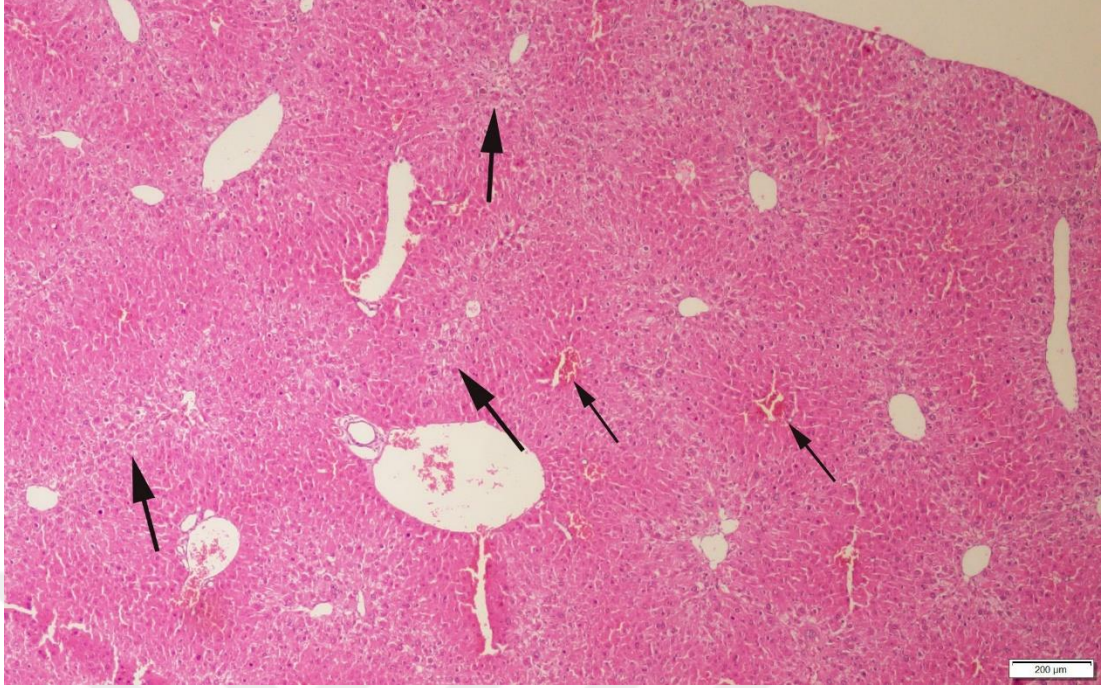
Şekil 4.11:Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=100 µm.



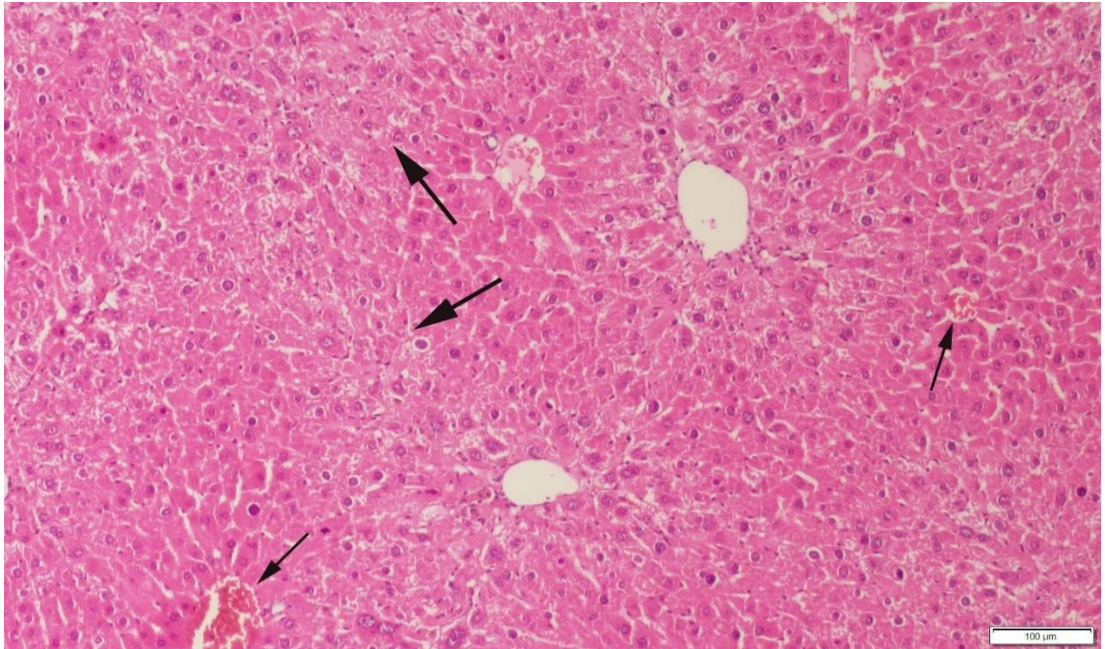
Şekil 4.12: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=50 µm.



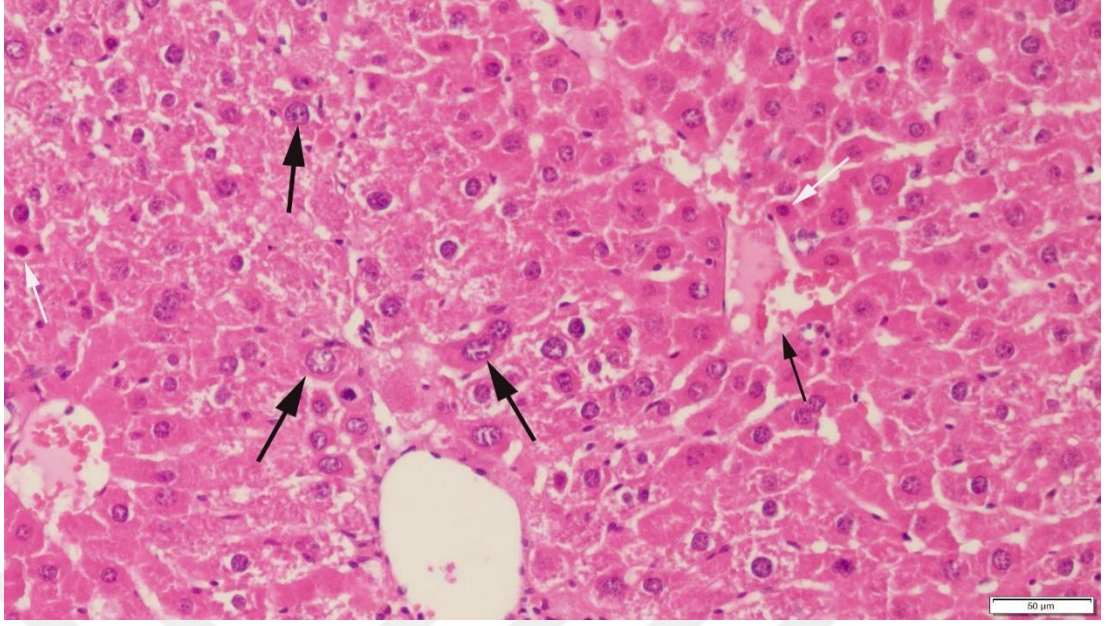
Şekil 4.13:Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=20 µm.



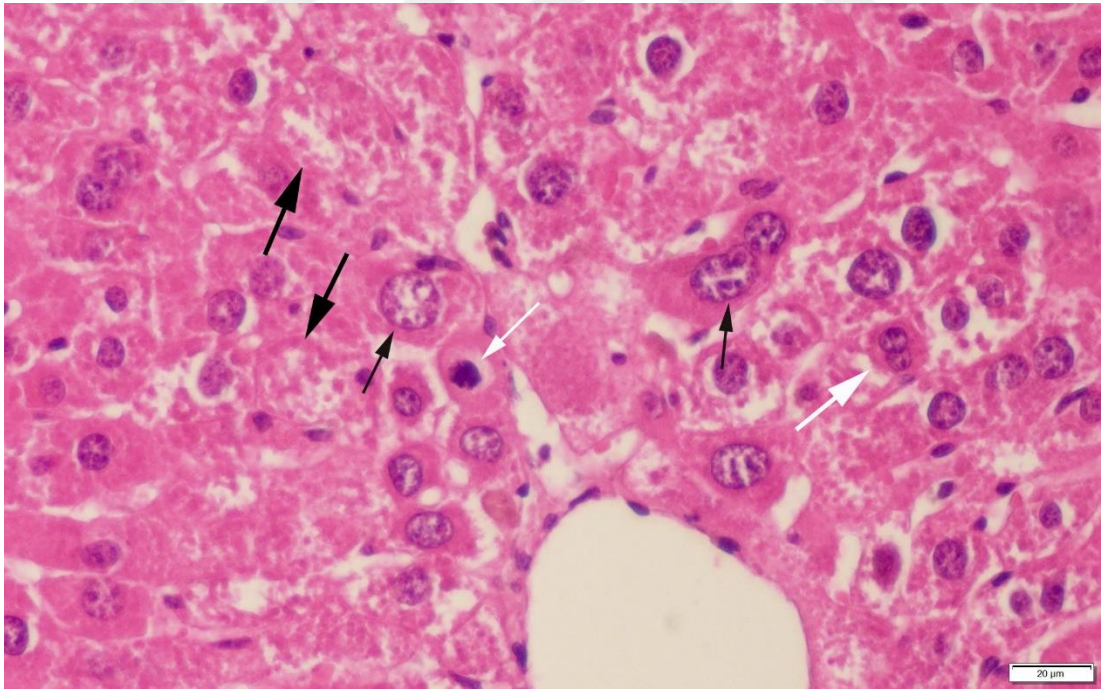
Şekil 4.14: Grup 3'deki bir farenin karaciğer damarlarında şiddetli hiperemi (ince oklar) ve dejenerasyon ve yağlanmanın olduğu alanlar (kalın oklar), HE, Bar=200 µm.



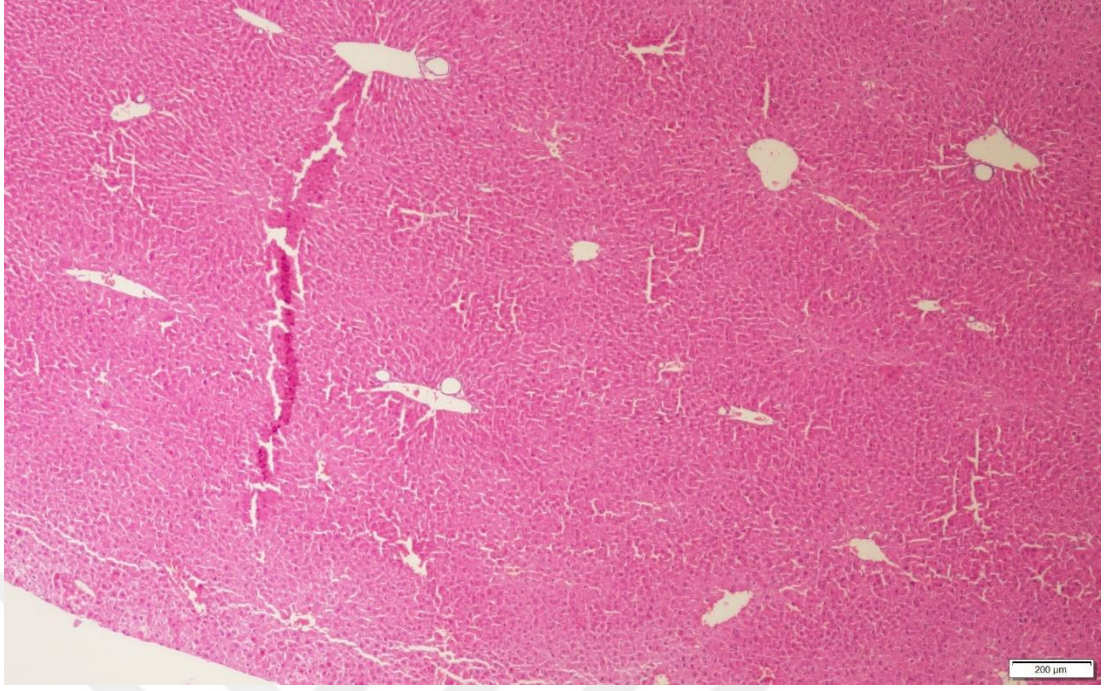
Şekil 4.15: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (ince oklar) ve dejenere ve nekrotik hücrelerin bulunduğu alanlar (kalın oklar), HE, Bar=100 µm.



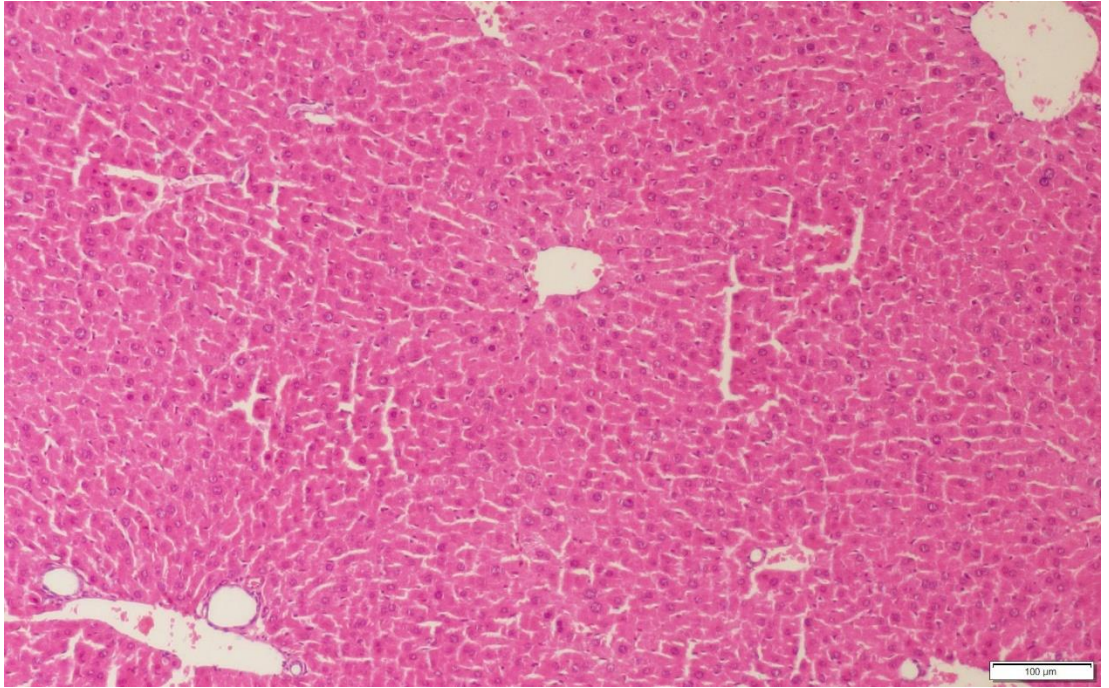
Şekil 4.16: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (siyah ince ok), megakaryotik hepatositler (siyah kalın oklar), piknotik çekirdekli nekrotik hepatositler (beyaz oklar), HE, Bar=50 µm.



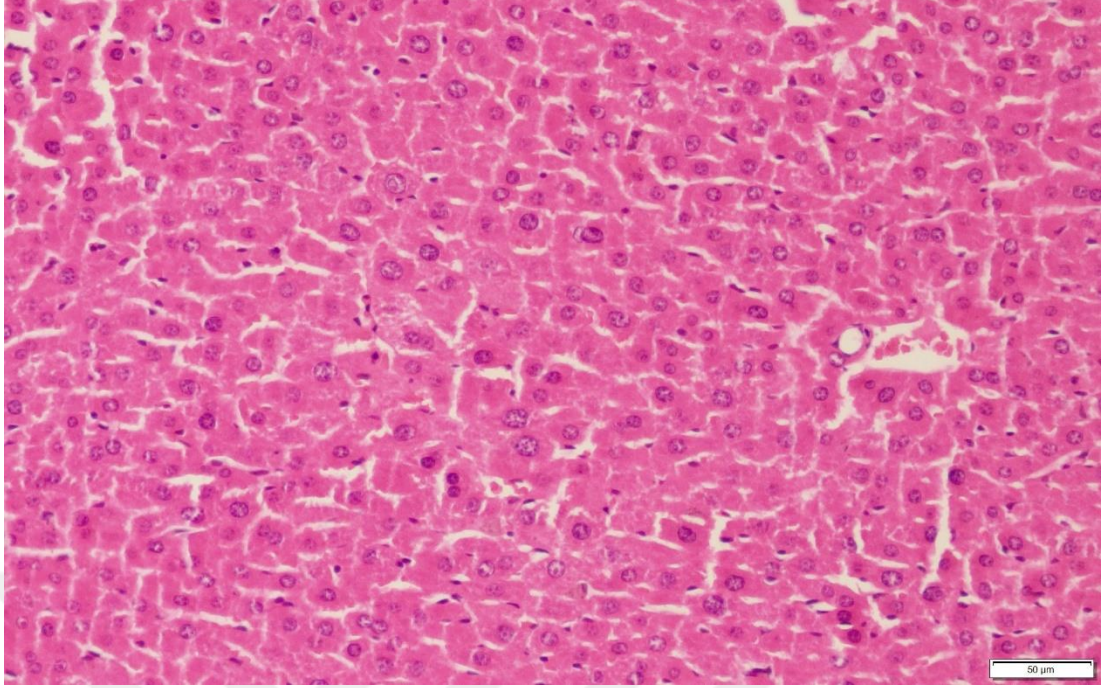
Şekil 4.17: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, megakaryotik hepatositler (siyah ince oklar), nekrotik hepatositler (kalın siyah oklar) piknotik çekirdekli nekrotik hepatositler (beyaz ince ok), çift çekirdekli hepatositler (beyaz kalın ok) HE, Bar=20 µm.



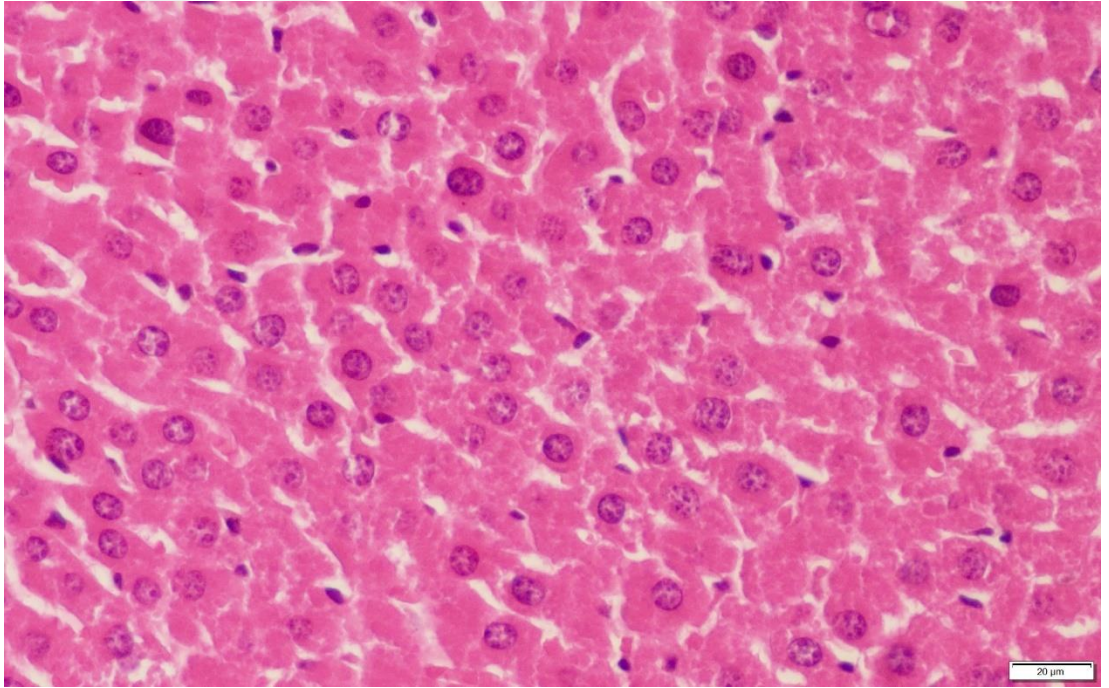
Şekil 4.18: Grup 4'deki bir farenin normal görünümdeki karaciğeri ve vena sentralisleri (oklar), HE, Bar=200 µm.



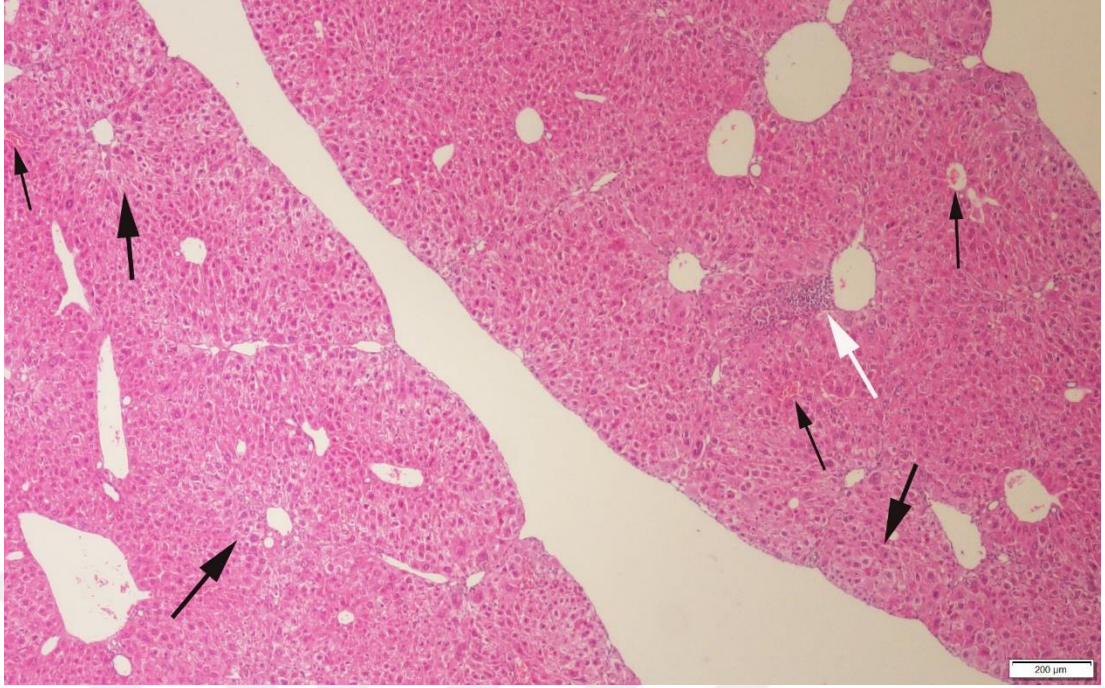
Şekil 4.19: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=100 µm.



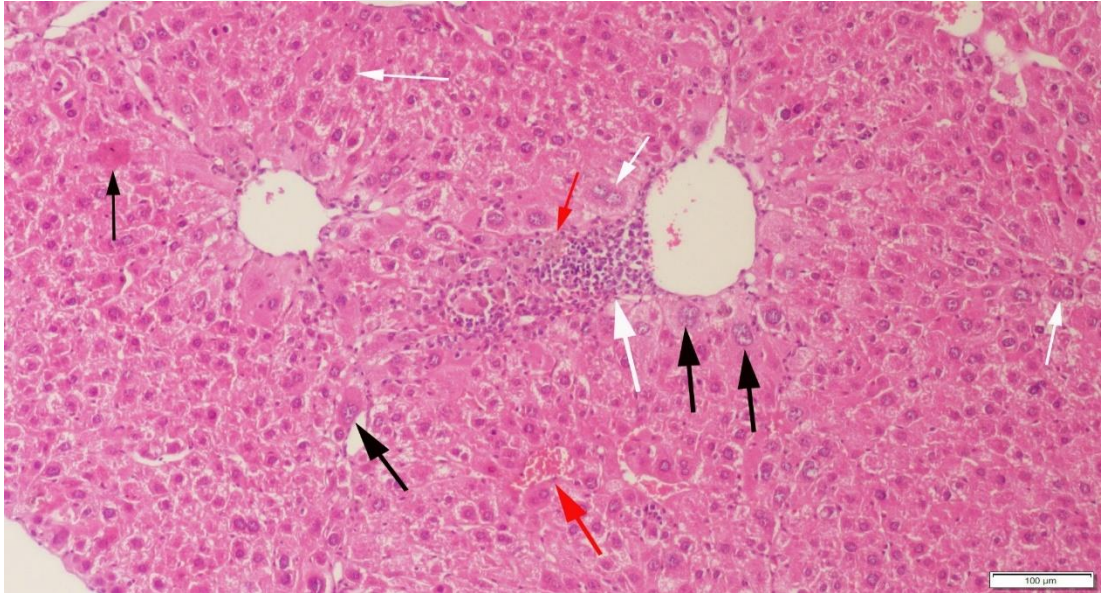
Şekil 4.20: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=50 µm.



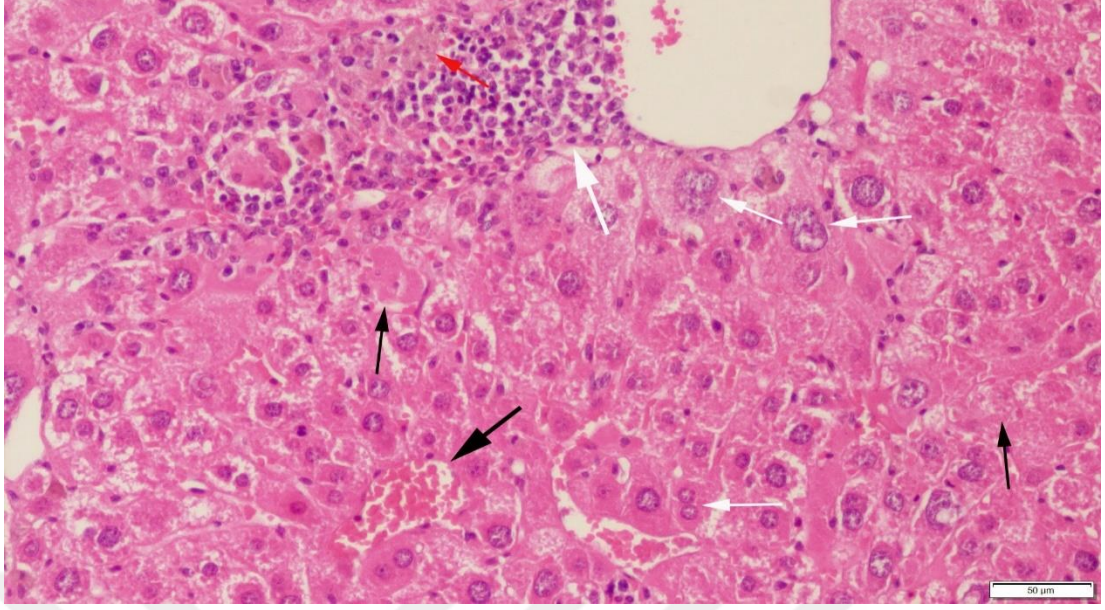
Şekil 4.21: Yukarıdaki karaciğerin büyütülmüş görünümü, HE, Bar=20 µm.



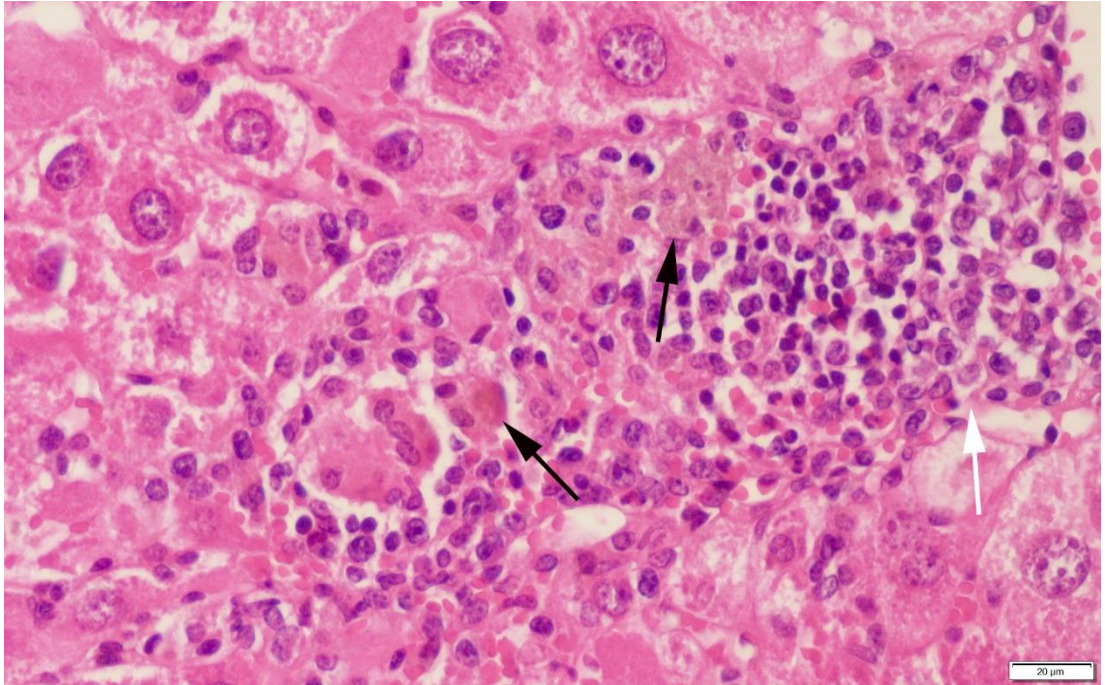
Şekil 4.22: Grup 5’deki bir farenin karaciğer damarlarında şiddetli hiperemi (ince oklar) ve dejenerasyon ve yağlanmanın olduğu alanlar (kalın oklar), HE, Bar=200 µm.



Şekil 4.23: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (kırmızı kalın ok), yangısal hücre infiltrasyonları (beyaz kalın ok), nekrotik hepatositler (ince siyah ok), çift çekirdekli hücreler (beyaz ince oklar), megakaryotik hepatositler (kalın siyah oklar), safra pigmentleri (kırmızı ince ok) HE, Bar=100 µm.



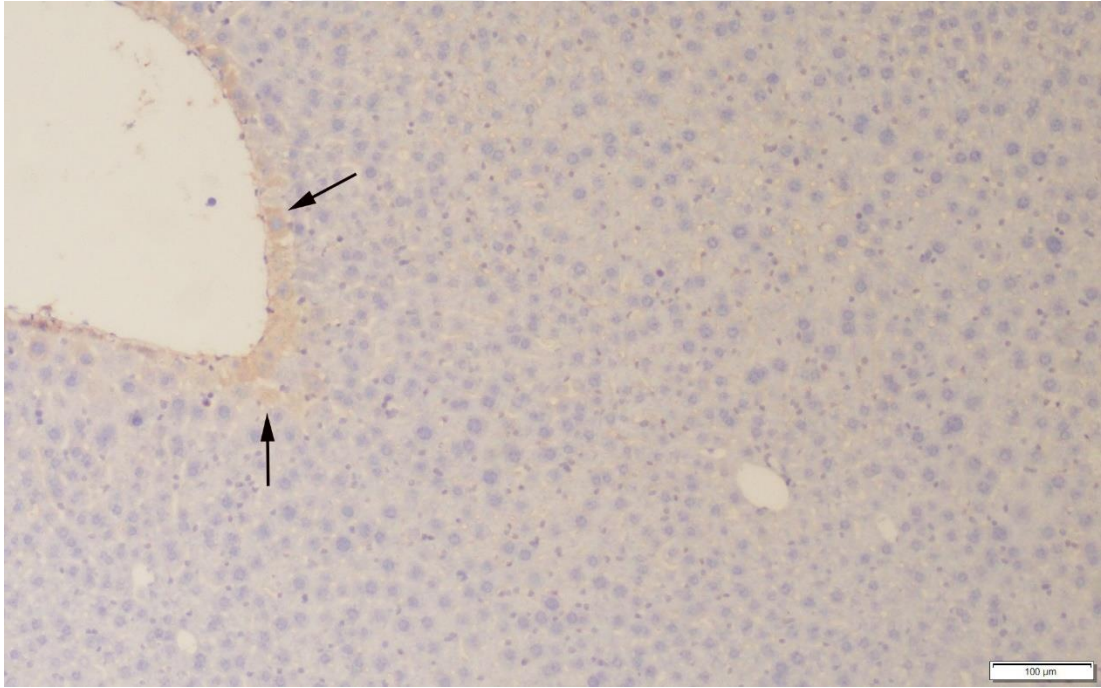
Şekil 4.24: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (siyah kalın ok), yangısal hücre infiltrasyonları (beyaz kalın ok), nekrotik hepatositler (ince siyah ok), çift çekirdekli hücreler (beyaz ince oklar), safra pigmentleri (kırmızı ince ok) HE, Bar=50 µm.



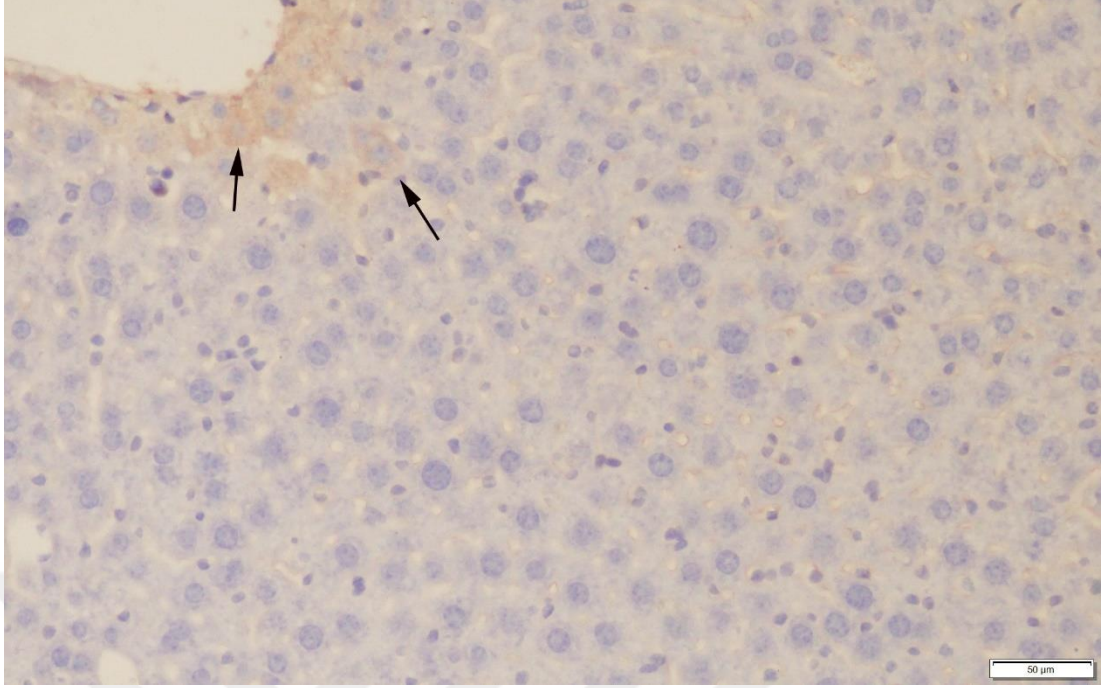
Şekil 4.25: Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü, yangısal hücre infiltrasyonları (beyaz ok) ve safra pigmentleri (siyah ok) HE, Bar=50 µm.

4.5. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları

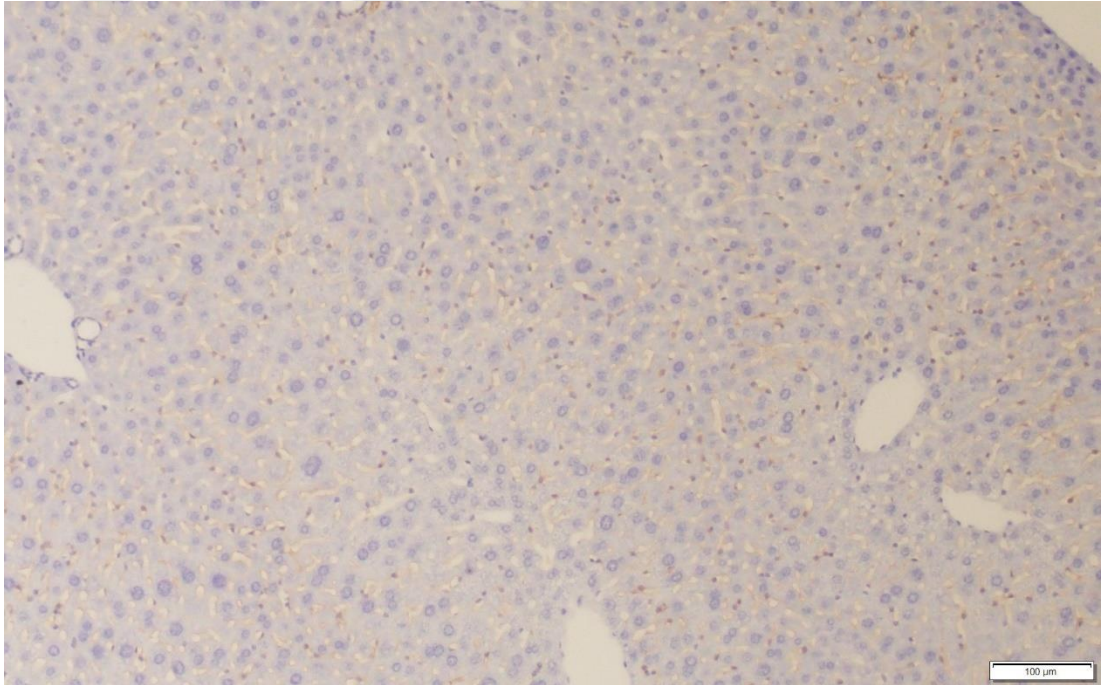
Karaciğerlerin kaspaz-3 açısından immunohistokimyasla incelemesinde Grup 1’deki farelerin karaciğerinde perisentral bölgelerde az sayıda hepatositte ve hafif şiddette pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Grup 2’deki farelerin birçoğunda karaciğerlerde negatif kaspaz-3 immunoreaksiyonu saptandı. Grup 3’te bazı hepatositlerde belirgin reaksiyon saptandı. Grup 4’te ise perisentral bölgelerde az sayıda hücrede ve çok hafif düzeyde reaksiyon dikkati çekti. Grup 5’teki hepatositlerde yaygın şekilde ve şiddetli kaspaz-3 pozitif çok sayıda hepatosit saptandı (Şekil 4.26 – 4.35). Kaspaz-3 immunohistokimyasal skorlarının istatistik analiz sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.



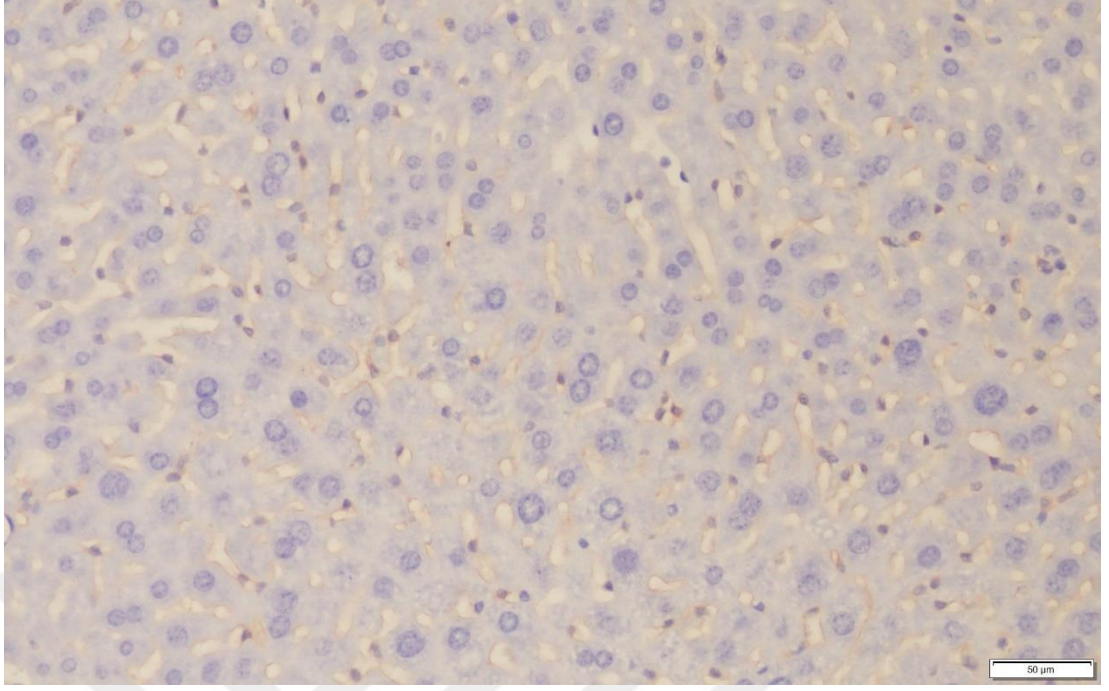
Şekil 4.26: Grup 1’deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



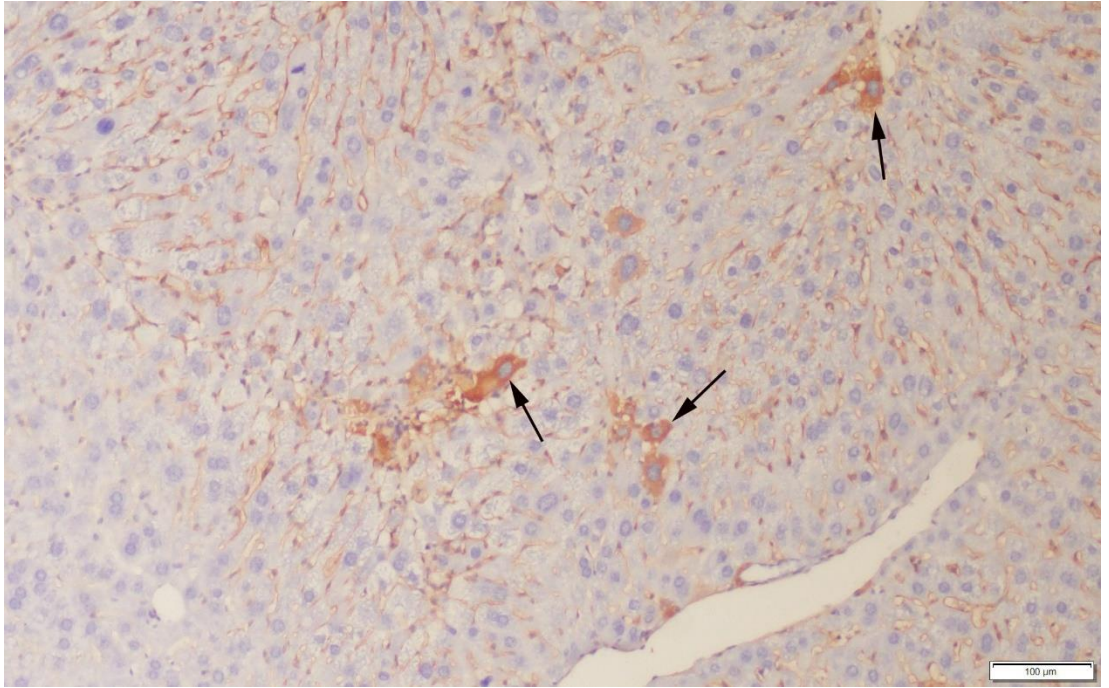
Şekil 4.27: Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



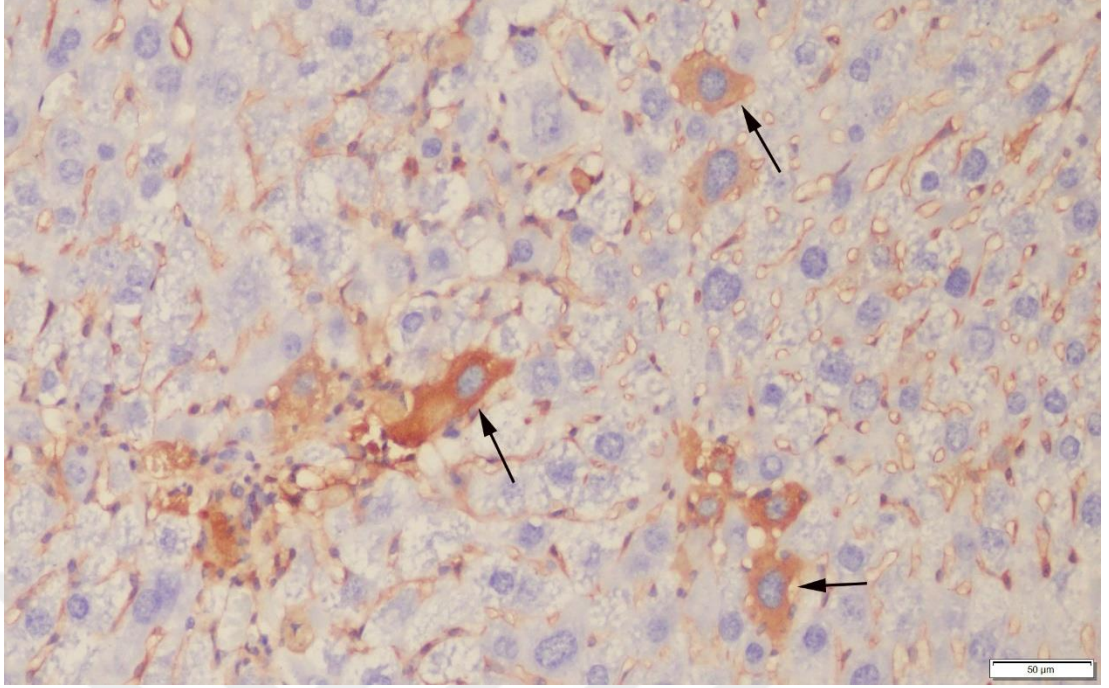
Şekil 4.28: Grup 2'deki bir farenin karaciğerinde negatif kaspaz-3 ekspresyonu, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



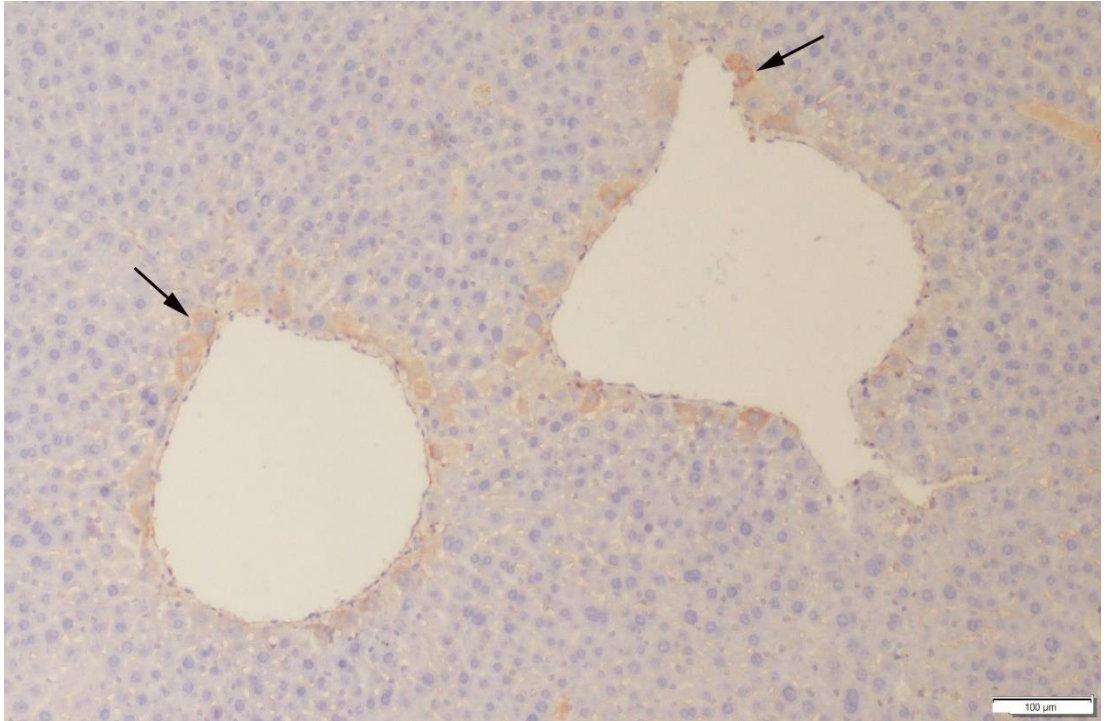
Şekil 4.29: Yukarıdaki resmin yakından görünümü, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



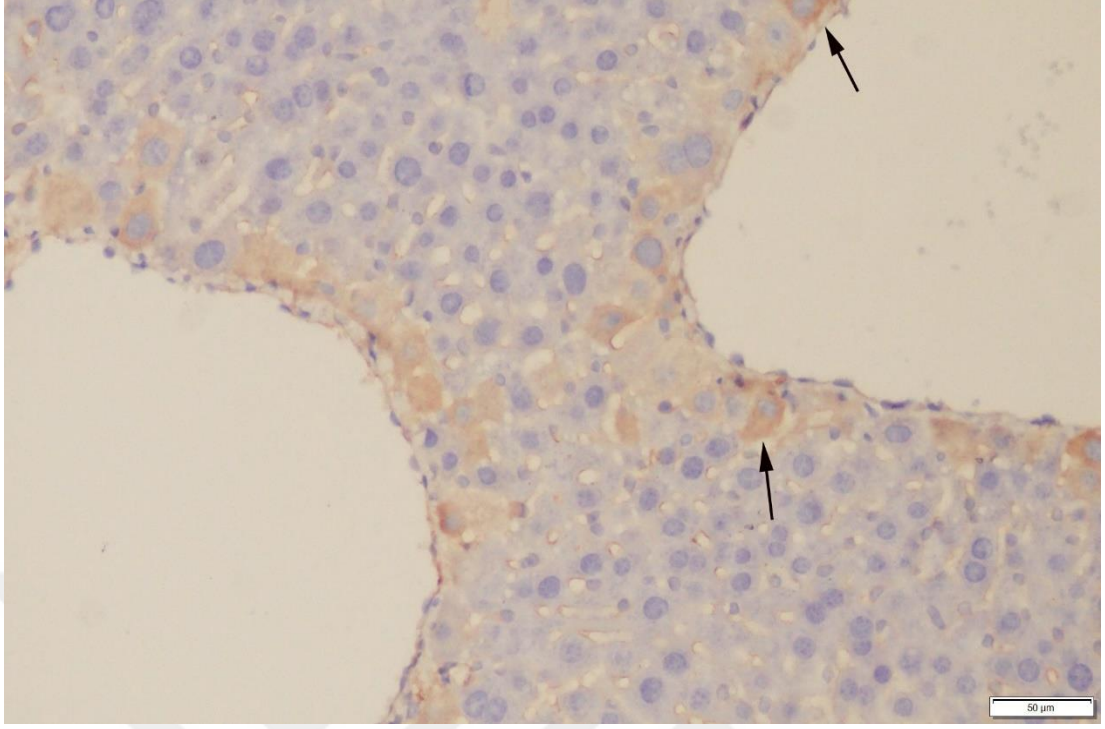
Şekil 4.30: Grup 3'deki bir farenin karaciğerinde kazpaz-3 espresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



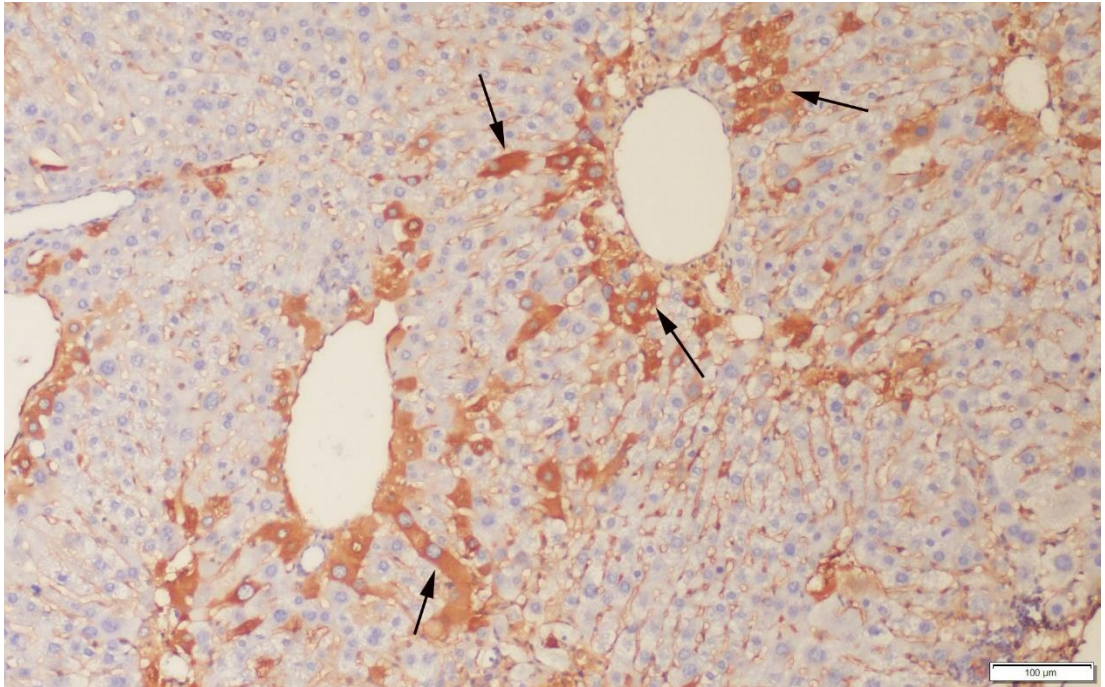
Şekil 4.31:Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



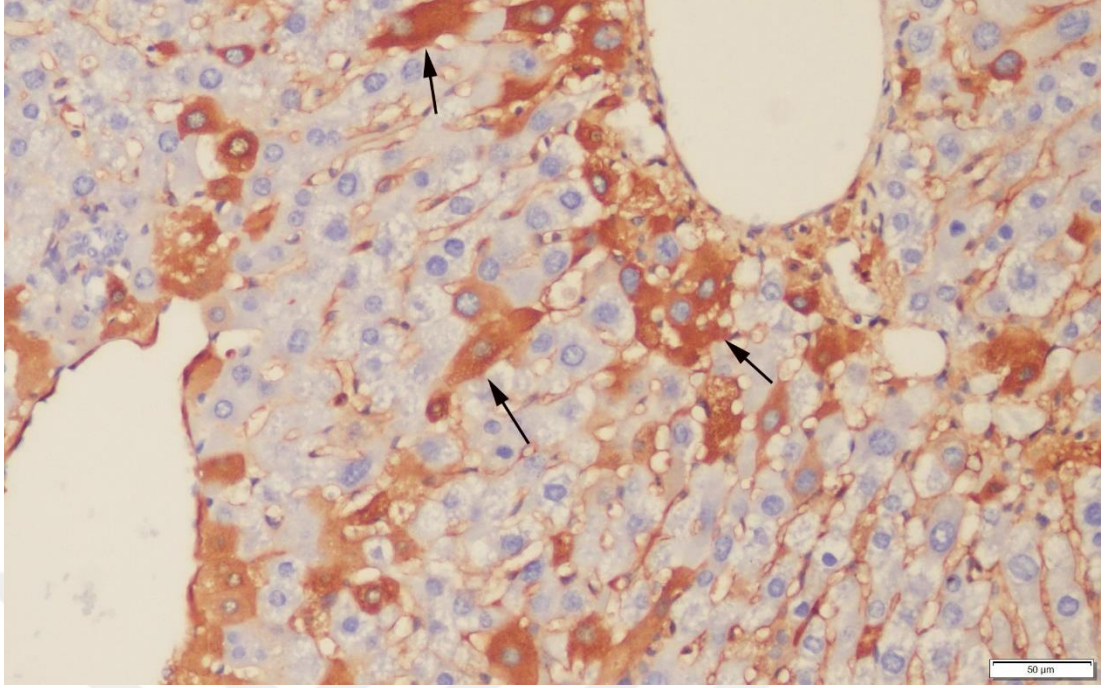
Şekil 4.32: Grup 4'deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



Şekil 4.33: Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



Şekil 4.34: Grup 5'deki bir farenin karaciğerinde kaspaz-3 ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



Şekil 4.35: Yukarıdaki resmin yakından görünümü, kaspaz-3 eksprese eden hücreler (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm

Tablo 4.2: Kaspaz-3 immunohistokimyasal sorlarının istatistik analiz sonuçları

Gruplar	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	P
Kaspaz-3	0.22±0.14 ^a	0.00±0.00 ^a	1.37±0.26 ^b	0.87±0.22 ^c	2.22±0.14 ^d	<0.001

*:Veriler mean ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

** : Aynı satırda üst simgeleri aynı olan gruplar istatistik olarak benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistik olarak önemlidir.

Bu çalışmanın sonuçları tiyaminin tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer hasarında profilaktik etkisinin olmadığı ancak önemli ölçüde tedavi edici etkisi olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Karaciğer vücuda alınan birçok maddenin detoksifiyasyonunu gerçekleştirme yanı sıra gerekli birçok maddenin de sentezini yapan ve yaşam için önemli organlardan birisidir. Bu görevleri ve yoğun çalışması sebebiyle sıklıkla zedeleyici etkilere maruz kalmakta ve bunlardan etkilenmektedir. Karaciğerin en sık karşılaşılan zedelenme yanıtı yağlanma şeklinde olmaktadır. Bu çalışmada TAA ile karaciğer zedelenmesi oluşturulmuş ve tiyaminin etkileri incelenmiştir.

Yağlı Karaciğer Sendromu özellikle yüksek verimli süt ineklerinin en önemli metabolizma hastalıklarından biridir (Gruffat ve ark., 1996; Goff ve Horst, 1997). Vücuttaki depo yağları aşırı şekilde mobilize olarak karaciğer parankim hücrelerinde yağın birikimine sebep olduğunda bu durum karaciğer yağlanması (Fatty Liver, hepatik lipidozis) olarak isimlendirilir (Başoğlu ve Sevinç, 2004). Esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA) konsantrasyonunun kanda doğuma yakın dönemde artışı; günlük yem tüketiminde azalmaya, doğum sonrası artışı ise hormonal denge ve laktogenezis için adipoz dokudan şekillenecek yağ mobilizasyonuna bağlıdır (Grummer, 1993). NEFA mobilizasyonu, periparturient dönem hastalık insidansını artırır. Karaciğer yağlanmasının önemli sebeplerinden birisi de ilaç ve toksik maddelerdir. (Başoğlu ve Sevinç, 2004). İnsanlarda da karaciğer yetmezliği öldürücü bir durumdur ve akut hepatitisin ciddi bir komplikasyonudur. İnsanlarda karaciğer yetmezliği sebepleri arasında en başta geleni alkol tüketimidir. Bunu ilaç hepatotoksitesisi ve viral hepatit gibi çeşitli durumlar izler. Değişik etiyolojilerle şekillenen akut karaciğer yetmezliğinin patogenezinde glutatyon depleksyonu, proinflamatuvar sitokinlerin artması, reaktif oksijen radikallerinin artması, nitrik oksit ve NF-KB'nin aktivasyonu sayılabilir (Slatter ve ark, 1991; Machlin ve Bendich, 1987; Mayer ve ark, 1993). Bu çalışmada karaciğer yağlanması toksik olarak gerçekleştirilmiş ve bilinen önemli hepatotoksik maddelerden TAA bu toksikasyonun geliştirilmesi için kullanılmıştır. Gerek klinik olarak en yüksek ölüm oranının bu grupta olması, gerekse biyokimyasal, makropatolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme sonuçları TAA ile hepatotoksitesite oluşturulduğunu göstermiştir.

Thioacetamide (TAA), deneysel karaciğer hasarı oluşturmak için sıklıkla kullanılmakta olup; veriliş süresi ve kullanılan doza bağlı olarak karaciğer yağlanması, hepatositlerde nekroz veya siroza sebep olmaktadır. TAA'nın karaciğer hasarı oluşturan başlıca mekanizmaları arasında; lipid peroksidasyonuna sebep olması, protein oksidasyonu ve doku antioksidan düzeylerini değiştirerek oksidatif stresin artmasına neden olması sayılabilir (Lu ve ark., 1999; Bruck ve ark, 1999; Bruck ve ark., 2002). Bu çalışmada TAA ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve histopatolojik incelemelerde TAA verilen grupta yaygın dejenerasyon ve nekrozlar saptanmıştır. Anti oksidan olarak kullanılan tiyaminin lezyonları azaltması TAA'nın karaciğer toksikasyonuna serbest radikaller olan oksidan maddelerle sebebiyet verdiğini göstermiştir.

Tiyamin (B1 vitamini) suda eriyen ve yüksek oranda antioksidan kapasiteye sahip bir vitamindir. Karbonhidrat metabolizmasında çok etkili bir yeri olan pirüvat dehidrogenaz, a-keto-glutarat dehidrogenaz, transketolaz enzimlerinin kofaktörü olarak görev yapan tiyamin özellikle merkezi sinir sistemi hücreleri başta olmak üzere birçok hücreyi zedelenmeye karşı koruyucu olarak kullanılır. Bu nedenle tiyamin'in eksikliğinde birçok hastalık ve hücre yıkımı görülür (Victor ve ark., 1989). Tiyamin genellikle nöroprotektif olarak kullanılmakta ve karaciğer hasarında tiyamin kullanımı ile ilgili pek fazla veri bulunmamaktadır. Bu çalışma ile tiyaminin karaciğer zedelenmesinde iyileştirici etkileri gözlenmiştir.

TAA sebebiyle oluşturulan karaciğer hasarında, hidroksil radikal temizleyici dimetilsülfoksit ve dimetiltiyoüre'nin (Bruck ve ark, 1999) güçlü bir serbest radikal temizleyici olan melatonin'in (Bruck ve ark., 2002), bir antioksidan olan curcumin'in (Shapiro ve ark, 2006) hayatta kalma süresini uzatırken, oksidatif stresi, karaciğer hücrelerinde yıkımı ve hepatik nekroinflamasyonu azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmada tiyaminin yüksek anti oksidan kapasitesinin karaciğerlerde şekillenen toksik değişikliklerde önemli ölçüde onarıcı etkisi bulunduğu gözlenmiştir.

Apoptozis, “programlanmış hücre ölümü” olarak bilinir ve vücuda zarar vermeden ömrünü tamamlamış, ihtiyaç olmayan veya normal fonksiyonunu kaybetmiş olan hücrelerin ortadan kaldırmak için çalışan bir hücre yıkım mekanizmasıdır.

Hücrede apoptozis gelişimi sırasında bazı morfolojik farklılıklar gözlenir. Bunlar plazma membranında değişiklikler, sitoplazmada büzüşme ve hacim azalması şeklindedir, en son aşamada DNA kümeleşme ve parçalanma şekillenir. Apoptozis ilerledikçe şekillenen sitoplazmik kabarcıklar, ölüme doğru giden hücrede membrandan ayrılarak sitoplazma içinde apoptotik cisimler halini alır. Hücrede apoptozis şekillenirken, intraselüler maddeler dışarı salınmadığı için yangısal reaksiyon da oluşmaz. Apoptozisin hücre hemostazisi, hücre gelişimi ve immun sistemde önemli görevler üstlenen hücrelerin yenilenmesi için gerekli bir mekanizmadır. Apoptozis, kanserden otoimmun ve nörodejeneratif bozukluklara kadar farklı hastalıkların iyileşmesi açısından elzem sayılabilir. Bu durumlarda hücre içindeki ve dışındaki uyarıların iletilmesiyle apoptozis indüklenir ve prokaspazlar aktiveleşir. Hedef proteinlerin yıkımı, aktiveleşen kaspazlar tarafından gerçekleştirilir (Haunstätter ve Izumo, 1998). Bu çalışmada TAA uygulanan gruplarda kaspaz-2 ekspresyonları ile karakterize apoptotik aktivite artışı gözlemlendi. Bu bulgular TAA'nın karaciğer hücrelerini nekroza uğrattırken apoptotik aktiviteyi de kullandığını gösterdi.

Kaspazlar kendi aralarında, başlatıcı (kaspaz-2, 8,9, 10), uygulayıcı (kaspaz-3, 6, 7) ve yangısal (kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) kaspazlar olarak gruplanır (Hökelek, 2009). Bir diğer gruplandırma göre apoptotik aktivite sırasındaki aktivasyon sırasına göre başlatıcı ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Earnshaw ve ark., 1999). Kaspazların başlatıcı olan gruplarında kaspaz-8 ve kaspaz-9; uygulayıcı olan gruplarında ise kaspaz-3 ve kaspaz-6 önemli rollere sahiptir (Pop ve Salvase, 2009). Bu çalışmada uygulayıcı kaspazlardan kaspaz-3'ün TAA'nın oluşturduğu karaciğer hasarındaki rolü araştırılmış ve aktivitesinin bu toksikasyonda önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Yine aynı düşünce ile tiyaminin profilaktik ve tedavi edici etkileri incelendiğinde, profilaktik olarak nispeten az ancak tedavi edici olarak oldukça önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer hasarının iyileştirilmesinde yağlı diyet (Shirai ve ark., 2013), quercetin (Ashkani-Esfahania ve ark., 2017), Kynurenin Acid (Marciniak ve ark., 2018), krosin (Algendaby, 2018) gibi birçok yöntem denenmiş ve

iyileştirici etkileri saptanmıştır. Tedavi amacıyla kullanılan bu maddelerin bazıları anti oksidan olarak işlev görmekte olup bizim çalışmamızda kullandığımız tiyamin ile aynı etki mekanizması ile iyileşme sağlamıştır. Bu sonuçlar da bizim çalışmamızın bulgularını desteklemiştir.

Tiyamin özellikle sinir hücrelerini parakuat ve β amiloid gibi bazı toksikasyonlardan korumak amacıyla kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Sambon ve ark., 2019). Tiyamin aşırı egzersizin hücreler üzerindeki zedeleyici etkilerinde de iyileştirici etkiler göstermiştir (Huang ve ark., 2018). Bu çalışma da tiyaminin birçok hücre üzerinde hücre hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu gibi karaciğer hücrelerini de TAA toksikasyonuna karşı belirli bir düzeyde koruyucu ama önmeli düzeyde tedavi edici etkisi olduğunu göstermiştir. Sonuç biyokimyasal, patolojik ve immunohistokimyasal veriler ile ortaya konulmuştur.

Bu çalışma ile TAA ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda tiyamin profilaktik olarak pek etkili bulunmamıştır. Bunun tiyaminin suda eriyen bir vitamin olması ve idrarla atılarak vücutta depo edilmemesi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Ancak karaciğerde hasar oluştuğunda tedavi için oldukça etkili olduğu ve bu amaçla kullanılabileceği saptanmıştır. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalar ile daha fazla bilgi edinilebileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada TAA ile oluşturulan hepatotoksistide tiyaminin etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler tiyaminin karaciğer toksikasyonlarında tedavi edici olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Karaciğer hastalıkları hem insanlarda hemde hayvanlarda önemli problemlerdendir. Bu problem doğal gıdaların gitgide azaldığı günümüzde daha da artan karaciğer hasarı şekillendirmekte ve hergün karaciğer hasarına neden olan yeni maddeler hayatımıza girmektedir.

Karaciğer hasarının artmaya başlaması hem insan hemde hayvanlarda karaciğeri koruyucu ve özellikle tedavi edici maddeler arayışını gündeme getirmiştir. Bu çalışmanın sonuçları tiyaminin bu maddelerden biri olabileceğini göstermiştir. Özellikle karaciğer enzim düzeyleri yükselen bireylerde veya karaciğer hasarına predispozisyon yaratan durumlarda kullanılabilecek güvenli ve zararsız bir seçenek tiyamin olabilecektir. Bu çalışma bu konuda yapılacak çalışlara öncülük yapacaktır. Özellikle klinik hekimlerinin karaciğer hasarında tiyamini reçetelerine eklemelerinin yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Algandaby MM (2018).** Antifibrotic effects of crocin on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 747-754.
- Ashkani-Esfahania S, Bagheria F, Azarpirab N, Esmaeilzadeha E, Emamia Y, Hassanabadia N, Keshtkarc M (2017).** Protective effects of quercetin on thioacetamide-induced acute liver damage and its related biochemical and pathological alterations. *J. Intern. Med.* **28**, 123–127.
- Başoğlu A, Sevinç M (2004).** Evcil Hayvanlarda Metabolik ve Endokrin Hastalıklar. Pozitif Matbaacılık, Konya, /Türkiye.
- Boatright KM, Salvesen GS (2003).** Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* **15**, 725–731.
- Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A (2004).** Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol.* **40**, 86-93.
- Bruck R, Aeed H, Schey R, Matas Z, Reifen R, Zaiger G, Avni Y (2002).** Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *J. of Hepatol.* **36**, 370-377.
- Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z (1999).** The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol.* **31**, 27-38.
- Burke A, Lucey MR (2004).** Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *American Journal of Transplantation.* **4**, 686-693.
- Chieli E, Malvaldi G (1984).** Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicol.* **31**, 41-52.
- Dashti H, Jeppsson B, Hägerstrand I, Hultberg B, Srinivas U, Abdulla M, Bengmark S (1989).** Thioacetamide-and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *European surgical research.* **21**, 83-91.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999).** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* **68**, 383-424.
- Goff JP, Horst RL (1997).** Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci*, **80**, 1260-1268.

Gruffat D, Durand D, Graulet B, Bauchart D (1996). Regulation of VLDL synthesis and secretion of the liver. *Reprod Nutr Dev.*, **36**, 375-389.

Grummer RR (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3882.

Hadeer AA, AL-Kaisie AI (2018). Pathological and biochemical study on liver of male mice intoxicated with thioacetamide *J. Entomol. Zool. Stud.* **6**, 1436-1441.

Haunstetter A, Izumo S (1998). Apoptosis: Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.*, **82**, 1111-1129.

Hökelek M(2009). Patogenez ve apoptozis (hücre sel hasar mekanizmaları, programlanmış hücre ölümü).Editörler: Özcel MA, Tanyuksel M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. Meta Basım, İzmir, s:31-47.

Huang W, Huang H, Hsu Y, Su W, Shen S, Lee M, Lin C, Huang C (2018). The effects of thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide on physiological adaption and exercise performance improvement. *Nutrients.* **10**, 851.

Ingvartsen KL (2006). Feeding and management-related diseases in the transient cow physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology.* **126**, 175-213.

Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey P A, McCuskey RS, Wallace S (1995). In vivo microscopy of hepatic metastases: dynamic observation of tumor cell invasion and interaction with Kupffer cells. *Hepatology.*, **21**, 487-494.

Kizer DE, Clouse JA, Ringer DP, Hanson-Painton O, Vaz AD, Palakodety RB, Griffin MJ (1985). Assessment of rat liver microsomal epoxide hydrolase as a marker of hepatocarcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 1795-1800.

Landon EJ, Naukam RJ, Sastry BR (1986). Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 697-705.

Li X, Benjamin IS, Alexander B (2002). Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J. of hepatol.*, **36**, 488-493.

Lu SC, Huang ZZ, Yang H, Tsukamoto H (1999). Effect of thioacetamide on the hepatic expression of gamma-glutamylcysteine synthetase subunits in the Rat. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **15**, 159:161-8.

Machlin LJ, Bendich A (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, **1**, 441-5.

Marciniak S, Wnorowski A, Smolińska K, Walczyna B, Turski W, Kocki T, Paluszkiewicz P, Parada-Turska J (2018). Kynurenic Acid Protects against Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats. *Anal. Cell. Pathol.* Article ID 1270483. 11 pages.

Mayer MP, Prestwich GD, Dolence JM, Bond PD, Wu HY, Poulter CD (1993). Protein farnesyltransferase: production in *Escherichia coli* and immunoaffinity purification of the heterodimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.*, **30**, 132:41-7.

McGlynn KA, London WT (2005). Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Clin gastroenterol.*, **19**, 3-23.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.*, **376**, 37-43.

Noyan A (2011). *Yasamda ve Hekimlikte Fizyoloji* 19. Baskı, Ankara: Palme Yayınevi, s:953-956.

Öztürk, AS (2008). *Boraks' ın karaciğer yağlanması yol açan patojenik mekanizmalara etkileri.* Doktora Tezi, Konya Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya/Türkiye.

Özyalın F (2008). *Tiyoasetamid ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda genisteinin oksidatif sistem üzerine etkilerinin araştırılması/The investigation of the effect on oxidative system of genistein in thioacetamide induced liver damage in rats.* Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ/Türkiye.

Pallottini V, Martini C, Bassi AM, Romano P, Nanni G, Trentalance A (2006). Rat HMGCoA reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content. *J. of Hepatol.*, **44**, 368-374.

Pop C, Salvaseen GS, (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.*, **284**, 21777-21781.

Salvesen GS (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.*, **9**, 3-5.

Sambon M, Napp A, Demelenne A, Vignisse J, Wins P, Fillet M, Bettendorffa L (2019). Thiamine and benfotiamine protect neuroblastoma cells against paraquat and β -amyloid toxicity by a coenzyme-independent mechanism. *Heliyon.*, **5**, e01710.

Shapiro H, Ashkenazi M, Weizman N, Shahmurov M, Aeed H, Bruck R (2006). Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol.*, **21**, 358-66.

Shirai M, Arakawa S, Miida H, Matsuyama T, Kinoshita J, Makino T, Kai K, Teranishi M (2013). Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J. Toxicol. Pathol.*, **26**,175-186.

Slatter JG, Rashed MS, Pearson PG, Han DH, Baillie TA (1991). Biotransformation of methyl isocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate-mediated toxicities. *Chem Res Toxicol.*, **4**, 157-61.

Victor M, Adams RD, Collins GH (1989). The Wernicke-Korsakoff syndrome and related neurologic disorders due to alcoholism and malnutrition, 2nd edn. Davis, Philadelphia.

Watson RR, Preedy VR. (Eds.) (2012). *Bioactive food as dietary interventions for liver and gastrointestinal disease: bioactive foods in chronic disease states.* Academic Press.

Zimmermann T, Müller A, Machnik G, Franke H, Schubert H, Dargel R (1987). Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. *Zeitschrift für Versuchstierkunde.*, **30**, 165-180.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı : Şerife AĞIRCA
Doğum Yeri ve Yılı : BURDUR/1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruk : T.C
Telefon No : 05532189574
Elektronik Posta : vethekserifeagirca@gmail.com
Ehliyet : Yok
İletişim adresi : Kozluca Köyü/BURDUR

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2018
Yüksek Lisans : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, 2018-Devam Ediyor

