

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Egzersiz ve Üç Tıp Diyetle İndüklenen Ülseratif Kolitten Korunma Modelinin Böbrek ve Karaciğer Üzerindeki Histopatolojik İncelenmesi Apoptoz ve Otofaji İndeksleri

Rüstem ATEŞOĞLU¹, Gülben AKCAN², Sevil ÇAYLI², Mehmet Salih KAYA¹, Fahri BAYIROĞLU¹

¹ Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Egzersiz, bireylerin sağlığının korunması ve geliştirilmesinde, çeşitli sitokinlerin, hormonların, büyüme faktörlerinin ve oksidatif stresin konsantrasyonunu etkileyen bir tür fizyolojik strestir. Ek olarak egzersiz, karbonhidratlar ve serbest yağ asitleri gibi yüksek miktarlardaki substratları harekete geçirerek ve metabolize ederek enerji dengesini etkiler. Tüm bu faktörlerin potansiyel olarak apoptoza veya otofaji ile hücrel hayatta kalmaya aracılık ettiği bilinmektedir. İlk kez grubumuz tarafından farklı beslenme uygulamaları (yüksek karbonhidrat (YK+kolit), yüksek protein (YP+kolit) ve yüksek yağlı (YY+kolit) beslenme), yüzmeye egzersizi ile kombine edilmiş ve egzersizin ülseratif kolit koruyucu etkisi ortaya konmuştur. Yapılan çalışma sonucunda bu çalışmada egzersiz ile farklı diyet bileşenlerinin (YP+kolit, YY+kolit ve YK+kolit) uygulanması sonucu ortaya çıkan metabolik ilişkinin karaciğer, böbrek enzimleri ile sağlığı nasıl etkilediği sorusuna yanıt aranmıştır. Bu çalışmada farklı diyet bileşenlerinin ve egzersizin, karaciğer ve böbrek üzerindeki etkisinin histopatolojik ve biyokimyasal analizler ile ortaya konması amaçlanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde tüm grupların karaciğer dokularında portal alan merkezinde mikroveziküler steatoz gözlenmiş ancak egzersiz sonrası gruplar arasında anlamlı azalışlar bulunmuştur. Tüm grupların böbrek histopatolojisi değerlendirildiğinde glomerüler alan, hyalin madde birikimi, interstisyel inflamasyon, medüller konjesyon ve kortikal konjesyon açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Böbrek histopatolojisinde YP+kolit gruplarında Bowman aralığında artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Apoptoz (kaspaz 3 ve kaspaz 9) ve otofaji belirteçleri (p62 ve LC3B) immünaktiviteleri egzersiz gruplarında daha yüksek bulunmuştur. YP+kolit, YY+kolit ve YK+kolit gruplarında ALT, AST ve ALP değerlerinin arttığı ancak egzersiz gruplarında düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde E+YK+kolit grubu serum ALT, AST, ALP, BUN, kreatinin, albümin değerleri ve histopatolojisi ile kontrole en yakın grup olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz. Otofaji. Yağ. Karbonhidrat ve protein yönünden zengin diyet.

Histopathological Analysis of Kidney and Liver in the Prevention Model of Exercise and Three Types of Diet-Induced Ulcerative Colitis

ABSTRACT

Exercise is a type of physiological stress that has an impact on the concentration of different cytokines, hormones in the maintenance and enhancement of people's health. Exercise also influences energy balance by metabolizing large quantities of substrates. For the first time, our lab's combination of high carbohydrate (HC+colitis), high protein (HP+colitis) and high fat (HF+colitis) nutrition with swimming exercise showed a protective effect against the onset of ulcerative colitis. As a consequence of the investigation, an answer to the question of how the metabolic relationship brought about by the application of exercise and various dietary components impacts liver and kidney enzymes and health was sought in this study. Microvesicular steatosis was discovered in the liver tissues of all groups when the data were analyzed, however there were statistically significant differences between the groups following exercise. There was no discernible change in the groups kidney histology when the glomerular area, hyaline material deposition, interstitial inflammation, medullary congestion, cortical congestion were assessed. When comparing the HP+colitis groups, a statistically significant increase in Bowman's distance was seen in the kidney histology. The exercise groups had greater levels of immunoactivity for the apoptosis and autophagy markers. In contrast to the exercise groups, it was seen that the ALT, AST, and ALP values rose in the HP+colitis, HF+colitis, and HC+colitis groups. When all the data were analyzed, it was discovered that the E+HC+colitis group had serum ALT, AST, ALP, BUN, creatinine, albumin levels, and histopathology that were the most similar to the control group.

Keywords: Apoptosis. Autophagy. Diet rich in fat. Carbohydrates and protein.

Geliş Tarihi: 10 Nisan 2023
Kabul Tarihi: 13 Temmuz 2023

Dr. Gülben AKCAN
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı, Çankaya Ankara.
Tel.: 0555 614 69 58
E-posta: gbenakcan@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:
Rüstem ATEŞOĞLU: 0009-0009-7757-6220
Gülben AKCAN: 0000-0003-3587-2725
Sevil ÇAYLI: 0000-0003-2465-5389
Mehmet Salih KAYA: 0000-0003-2468-9415
Fahri BAYIROĞLU: 0000-0002-9861-1680

Fiziksel aktivite, enerji harcanarak iskelet kaslarının kasılmasıyla meydana gelen herhangi bir bedensel hareket olarak tanımlanabilir¹. Egzersiz bazı hastalıklardan korunma veya tedavi edici olarak kullanılabilir gibi kardiyovasküler tedavisinde, kalp ve damar sağlığını koruma da, kas gücü ve dayanıklılığını, esneklik ve vücut kompozisyonunu geliştirmek amacıyla da yapılabilir². Hastalıktan korunma ve tedavi açısından bakıldığında, egzersiz-sağlık ilişkisinin araştırılması milattan önce 5. yüzyıla kadar dayanmaktadır³. Günümüzde yapılan birçok çalışma da bu ilişkiyi açığa çıkarmaktadır^{4,6}. Egzersiz, bireylerin sağlığının korunması ve geliştirilmesinde, esneklik, kas kuvveti, vücut kompozisyonu ve postürün iyileştirilmesinde, mekanik bel, boyun ve omuz ağrısı gibi baskın kas-iskelet sistemi bozuklukları, koroner arter hastalığı, osteoporoz, obezite ve kolon kanseri gibi hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde temel bir davranış olarak önerilmektedir^{2,7}. Fiziksel egzersiz sırasında iskelet kasından salınan miyokinler kardiyovasküler hastalıklar ve obezitede görülen artmış inflamasyona kısmen anti inflamatuvar etki gösterir^{8,9}. Kronik hastalıklara yakalanma riski ve/veya şiddetinin, yüksek inflamatuvar mediatörlerin varlığına bağlı olduğu belirtilmektedir^{10,11}. Egzersiz ile vücutta hormonal, metabolik ve inflamatuvar birçok değişiklik meydana gelir¹². Bu yüksek yoğunluklu aktivite (yüzme egzersizi) ile farklı diyet bileşenlerinin sistematik olarak uygulanmasıyla ortaya çıkan hormonal, metabolik ve inflamatuvar profiller arasındaki güçlü ilişkinin vurgulanması önemlidir¹³. Kas, glikozu glikojen biçiminde depolama yeteneğine sahiptir; bu, glikoz diyetten kolayca alınamadığında bile kasılma için enerji üretiminin hızlı bir şekilde başlatılmasını kolaylaştırır^{14,15}. Karaciğer ve böbrekler tarafından da paylaşılan bu depolama kapasitesi iskelet kasını, açlık sırasında tüm organların temel enerji substratlarına erişmesine yardımcı olan önemli bir metabolik organ haline getirir^{14,16}. Vücuda alınan besinlerin (karbonhidrat yükünün) %25 ila %35'inin dolaşımdan hızla çıkarıldığı ve karaciğer tarafından depolandığı bilinir^{14,16}. Geri kalan glikozun yaklaşık %40'ı kasta birikirken, yaklaşık %10'u ise böbrekten atılır^{14,16}. Egzersiz, hasarlı hücreli bileşenlerin ortadan kaldırılması ve yenilenmesi için otofajiyi harekete geçirir¹⁷. Beslenme ve enerji taleplerini karşılamak için açlık veya egzersiz gibi belirli stres uyaranları hücre içi otofajiyi artırır¹⁸. Stresörler tarafından indüklenebilen doğal doku homeostazı için hayati önem taşıyan bu etkiler, zararlı bileşiklerin ve hasarlı dokuların ortadan kaldırılmasını başlatır¹⁹⁻²¹. Serbest bırakılan amino asitler alternatif enerji substratları olarak hizmet edebileceğinden, otofajinin egzersiz sırasında ve sonrasında hücreli enerji homeostazını da destekler¹⁸. Otofaji, sitoplazmik moleküllerin geri dönüşümü, hasarlı organellerin veya toksik proteinlerin uzaklaştırılması yoluyla hücreli

homeostazın sürdürülmesi için depozit maddeleri ortadan kaldırarak çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yer alır^{22,23}. Otofajide primer rol oynayan p62 proteini, toksik hücreli atıkları tanıır²⁴. Otofajide substrat olarak rol oynayan p62 proteini, otofagozom oluşumunu sağlayan LC3-I ile etkileşime girer²⁵. Otofagozomun iç zarında bulunan LC3-II, LC3- I tarafından tutulan p62 ile seçici olarak otofagozom içine taşınır²⁵⁻²⁸. LC3 aracılığıyla p62 bağlı protein agregatları ve artık materyaller otofaji ile ortadan kaldırılır²⁸. Apoptoz da otofaji gibi hastalıklarda, homeostazda, ilaç metabolizmasında, kanser ve doku gelişiminde önemli roller oynayan düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmasıdır²⁹. Apoptotik yolda merkezi önemi olan kaspaz-9 mitokondriyal veya içsel apoptotik yolda rol oynar³⁰. Kaspaz-9, mitokondriden salınan sitokrom c ile apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) yardımıyla apoptozomda aktive edilir³⁰. Aktive olan kaspaz-9, efektör kaspaz 3 ve 7'yi ayırır. Apoptozu aktive eder^{29,30}. Bu çalışmada farklı diyet bileşenlerinin ve egzersizin, karaciğer ve böbrek üzerindeki etkisinin histopatolojik ve biyokimyasal analizler ile ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvanlar ve doku hazırlama

Yerel etik kurul onayı ((BAİBÜ, 01/08/2022, DHL-2022/29) Bolu Abant İzzet Baysal alındıktan sonra 8-10 haftalık 70 adet erkek sıçan temin edilmiştir. 70 hayvan, 10 gruba ayrılmış olup, grup başına 7 adet sıçan bakılmıştır. Hayvanların bakım ve beslenmesinde deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair yönetmeliğe uygun olarak sıcaklık kontrollü bir odada (20-23 °C), 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm sıçanlar, gruplar arası homojenizasyonu sağlamak amacıyla bir hafta süreyle standart diyetle beslenmiştir. Gruplar arası homojenizasyon sonrası 8 hafta boyunca yüksek proteinli diyet (YP), yüksek yağlı diyet (YY), yüksek karbonhidratlı diyet (YK) veya ad libitum beslenmişlerdir. Çalışmada yüzme egzersizi (E) yaptırılan gruplara birinci gün 10 dakika yüzme egzersizi uygulamasından sonra egzersiz süresi her gün 10 dakika artırılarak 1 hafta boyunca yüzme egzersizine adaptasyonları sağlanmıştır³¹. Adaptasyon sonrası 8 hafta boyunca haftada 3 gün günde 1 saat yüzme egzersizi yaptırılmıştır. Çalışma grupları şu şekildedir;

Grup 1 (Kontrol grubu): Normal diyetle beslenme

Grup 2 (Kolit grubu): Normal diyet ile beslenme + ülseratif kolit uygulaması

Grup 3 (Egzersiz grubu): Normal diyetle beslenme + yüzme egzersizi uygulaması

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli

Grup 4 (Egzersiz-kolit grubu): Normal diyet ile beslenme + yüzme egzersizi + ülseratif kolit uygulaması (E+kolit)

Grup 5 (Yüksek protein ve kolit grubu): Yüksek proteinli diyetle beslenme + ülseratif kolit uygulaması (YP+kolit)

Grup 6 (Yüksek yağ ve kolit grubu): Yüksek karbonhidratlı diyetle beslenme + ülseratif kolit uygulaması (YY+kolit)

Grup 7 (Yüksek karbonhidrat ve kolit grubu): Yüksek yağlı diyetle beslenme + ülseratif kolit uygulaması (YK+kolit)

Grup 8 (Egzersiz, yüksek protein ve kolit grubu): Yüksek proteinli diyetle beslenme + yüzme egzersizi + ülseratif kolit uygulaması (E+YP+kolit)

Grup 9 (Egzersiz, yüksek yağ ve kolit grubu): Yüksek yağlı diyetle beslenme + yüzme egzersizi + ülseratif kolit uygulaması (E+YY+kolit)

Grup 10 (Egzersiz, yüksek karbonhidrat ve kolit grubu): Yüksek karbonhidratlı diyetle beslenme + yüzme egzersizi + ülseratif kolit uygulaması (E+YK+kolit)

Grup 5 ve 8'deki hayvanlar %45 protein YP diyet ile (kazein (419 g), DL-metionin (3 g), mısır nişastası (200 g) maltodekstrin (81 g), sükröz (50 g), selüloz (50 g), mısır yağı (25g), palmiye yağı (20 g), dikalsiyum fosfat (13 g), kalsiyum karbonat (5,5 g), potasyum sitrat (16,5 g), vitamin (10 g) ve mineral miks (10 g)), grup 6 ve 9'daki hayvanlar %60 YY diyeti ile (kazein (200 g), DL-metionin (3 g), mısır nişastası (200 g) maltodekstrin (35 g), sükröz (50 g), selüloz (50 g), mısır yağı (325g), palmiye yağı (220 g), dikalsiyum fosfat (13 g), kalsiyum karbonat (5,5 g), potasyum sitrat (16,5 g), vitamin (10 g) ve mineral miks (10 g)) ve grup 7 ve 10'daki hayvanlar ise %67 YK diyeti ile (kazein (200 g), DL-metionin (3 g), mısır nişastası (315 g) maltodekstrin (35 g), sükröz (350 g), selüloz (50 g), mısır yağı (25g), palmiye yağı (20 g), dikalsiyum fosfat (13 g), kalsiyum karbonat (5,5 g), potasyum sitrat (16,5 g), vitamin (10 g) ve mineral miks (10 g)) 8 hafta boyunca beslenmişlerdir³²⁻³⁴. Yemlerin içerikleri ve oranları araştırmacılar tarafından hesaplanarak deney hayvanları yemleri satan ARDEN firmasına yaptırılmıştır. 9. haftanın sonunda tüm hayvanlar 24 saat aç bırakıldıktan sonra anestezi uygulamasını takiben kontrol ve egzersiz grubu (grup 1 ve grup 3) dışındaki deneklere 1 ml, pH 2.4, %4'lük asetik asit intrarektal olarak uygulanarak ülseratif kolit modeli oluşturulmuştur^{35,36}. Asetik asit ile kolit oluşturma modeli eskilerden günümüze kadar kolay uygulabilen, ucuz bir yöntem olması sebebi ile tarafımızdan tercih edilmiştir. Kontrol ve egzersiz grubu deneklere ise asetik asit yerine 1 ml serum fizyolojik intrarektal olarak verilmiştir. Asetik asit veya serum fizyolojik uygulamasından 48 saat sonra tüm sıçanların ketamin

ve ksilazin (80-100 mg/kg, i.p.) anestezisi altında servikal dislokasyon sonrası sakrifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Her hayvandan hızlı bir şekilde karaciğer ve böbrek dokuları alındıktan sonra en az 48 saat %10 tamponlu formalinde fikse edilmiştir.

Histopatolojik değerlendirme

Fikse edilen dokular çeşme suyu altında 2 saat yıkandıktan sonra artan alkol serisi ile dehidre edilmiştir (%70, %80, %96 ve %100'lük alkolden). Her alkol serisinde 2 saat bekletilmiş ve son olarak 20 dakika ksilen ile şeffaflanmaya bırakılarak 60 °C'de ısıtılıp sıvı hale getirilmiş parafin (katı parafin) içerisine gömülmüştür. Bir gece oda sıcaklığında dondurulmuş ve kesit alana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen parafin bloklardan adeziv lamlara 4 mikronluk kesitler alınmıştır. Alınan kesitler kurutulduktan ve bir gece deparafinizasyon için etüvde bekletildikten sonra boyamaya hazır hale getirilmiştir. Hematoksilen-eozin boyaması için 30 dakika ksilen solüsyonu içerisinde bekletilen kesitler azalan alkol serilerinde (%100, %96, %75) bekletilerek rehidrate edilmiştir. Rehidratasyondan sonra sudan geçirilerek hematoksilen boyasında (Merck, Almanya, kod:105174) 3 dakika, eozin boyasında (Eosin Y-solution 0.5% sulu, Merck, Almanya, kod: 109844) 2 dakika bekletilmiştir. Boyama sonrası preparatlar entellan ile kapatılmıştır. Böbreğe ait kesitlerde glomerüller alan, hiyalin madde birikimi, interstisyel inflamasyon, Bowman aralığı mesafesi, medullar konjesyon, kortikal konjesyon ve yaygın lökosit infiltrasyonu açısından karaciğere ait kesitlerde hepatosit yapılarına, sinüzoid genişlemeleri, portal alanda fibrozis, mikroveziküler steatoz değerlendirilmiştir³⁷⁻³⁹.

İmmünohistokimyasal değerlendirme

İmmünohistokimyasal analiz için adeziv lamlara (Microcult, Türkiye) 4 µm kalınlığında seri kesitler alınmış ve gece boyunca 60 °C'de bekletilmiştir. Deparafinize edilmiş olan kesitler azalan alkol serisi (%100, %90, %80 ve %70) ile rehidrate edilmiştir. Kesitler daha sonra antijen geri kazanımı için (pH 6.0) 10 mM sitrat tamponu içerisinde mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Fosfat tamponlu salin (PBS) içinde üç yıkamadan sonra endojen peroksidaz aktivitesi, 30 dakika boyunca %3'lük hidrojen peroksit ile inaktive edilmiştir. Kesitler daha sonra spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için bir protein bloke edici (Ultra V Block, TA-125-UB; Thermo Fisher Scientific, Japonya) ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, kesitler birincil antikörlerle gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir: poliklonal anti-LC3B (ab48394, 1:50, Abcam, UK), poliklonal anti-SQSTM1/p62 (ab91526, 1:50, Abcam, UK), poliklonal aktif kaspaz 3 (STJ90011, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, ABD), poliklonal aktif kaspaz 9 (STJ90005, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, ABD).

Ertesi gün kesitler PBS içinde yıkanmış ve biyotinlenmiş UltraVision Plus Anti-Polyvalent, HRP (kod: 14896; Thermo Fisher Scientific, Japonya) ile 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS ile üç yıkamadan sonra antijen-antikor kompleksleri, 30 dakika boyunca bir streptavidin-peroksidaz kompleksi (TA-125-HL; Thermo Fisher, Japonya) ile muamele edilmiştir. Bağlı HRP enzimi, aminoetil karbazol (AEC, kod: 001122) (Thermo Fisher Scientific, Japonya) kromojeni ile kesitler geliştirilmiştir. Mayer's hematoksilen (Beslab, Türkiye) ile zıt boyanmış ve su bazlı permount (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, ABD) ile kapatılmıştır. Fotoğraflar Olympus (Nussloch, Almanya) marka BX43 model ışık mikroskopunda, DP74 model kamera ile çekilmiştir.

H-skor analizi

İmmünohistokimyasal işaretlemenin değerlendirilmesi, daha önce tarif edildiği gibi H-skor analizleri kullanılarak yapılmıştır⁴⁰. p62, LC3B, kaspaz 3 ve kaspaz 9 immünaktivitelerinin yoğunlukları, 0+ (boyama yok), 1+ (zayıf ancak saptanabilir boyama), 2+ (orta veya belirgin boyama) ve 3+ (yoğun boyama) puanlandırma sistemi kullanılarak yarı niceliksel olarak değerlendirilmiştir. H-skoru her preparatta, immünaktivitelerin yoğunluk puanları ile boyanan hücrelerin yüzdeleri çarpılarak hesaplanmıştır. Her preparatta rastgele seçilen 5 alan ışık mikroskobu (X40 objektif) altında değerlendirilmiş ve bu alanlardaki her yoğunluk için hücre yüzdesi, çift-kör 2 araştırmacı tarafından farklı zamanlarda belirlenmiştir. Her iki gözlemcinin ortalama puanı kullanılmıştır.

Biyokimyasal analiz

Sıçanların serumlarında çeşitli böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri ölçülmüştür. Çalışmada yapılandırılmış biyokimyasal testler Fuji Dri-Chem NX700V tam otomatik veteriner biyokimya analiz cihazında (Fuji, Japonya) ölçülmüştür. Bu cihazın ticari kitleri ile albümin, kreatinin, BUN, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalın fosfat (ALP) testleri çalışılmıştır.

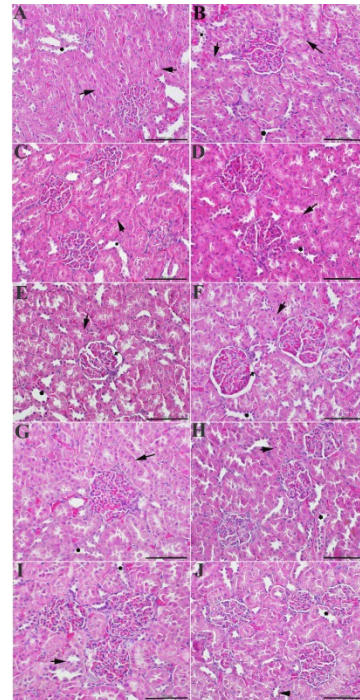
İstatistiksel analiz

Tüm veriler doğrudan Microsoft Office Excel 2007'ye (Microsoft; Redmond) aktarılmıştır ve istatistiksel analiz SigmaPlot 12 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA) tarafından yapılmıştır. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA, ardından Dunnett testi ve Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Seçilen deneylerde, ikili karşılaştırmalar için Student t testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak tanımlanmıştır. Tüm veriler, 3 bağımsız deneyin ortalama \pm standart hata değeri olarak ifade edilmiştir.

Bulgular

Histopatolojik Değerlendirme

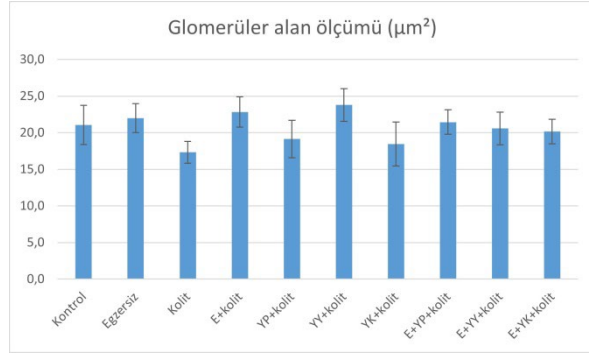
Böbreğe ait kesitler glomerüler alan, hiyalin madde birikimi, interstisiyel inflamasyon, Bowman aralığı mesafesi, medullar konjesyon, kortikal konjesyon ve yaygın lökosit infiltrasyonu açısından değerlendirilmiştir. Gruplarda hiyalin madde birikimi, interstisiyel inflamasyon, medullar konjesyon, kortikal konjesyon ve yaygın lökosit infiltrasyonu açısından herhangi bir bulguya rastlanılmamış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 1). Bunlara ek olarak distal ve proksimal tübüllerde de herhangi bir patolojiye rastlanılmamıştır. Glomerüler alan ölçümü gerçekleştirilmiş olup egzersiz ve beslenme grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 2). YP+kolit ve E+YP+kolit gruplarında, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında Bowman aralığının arttığı gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, Şekil 1- E, F; Şekil 3).



Şekil 1:

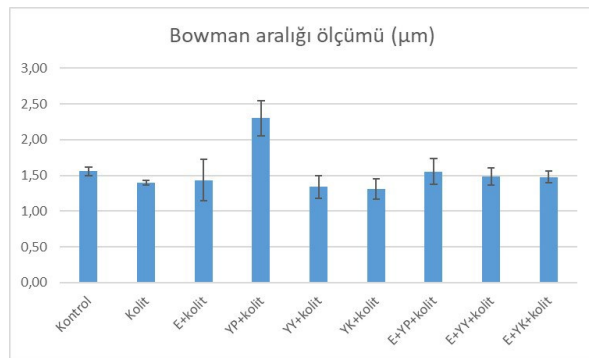
Böbrek histolojisi: Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP+kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Boya: Hematoksilen-eozin. Bar: 200 μ m. Ok ile böbrek proksimal tübülleri, poligonol şekil ile böbrek distal tübülleri ve yıldız işareti ile de artan Bowman aralığı gösterilmiştir.

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli



Şekil 2.

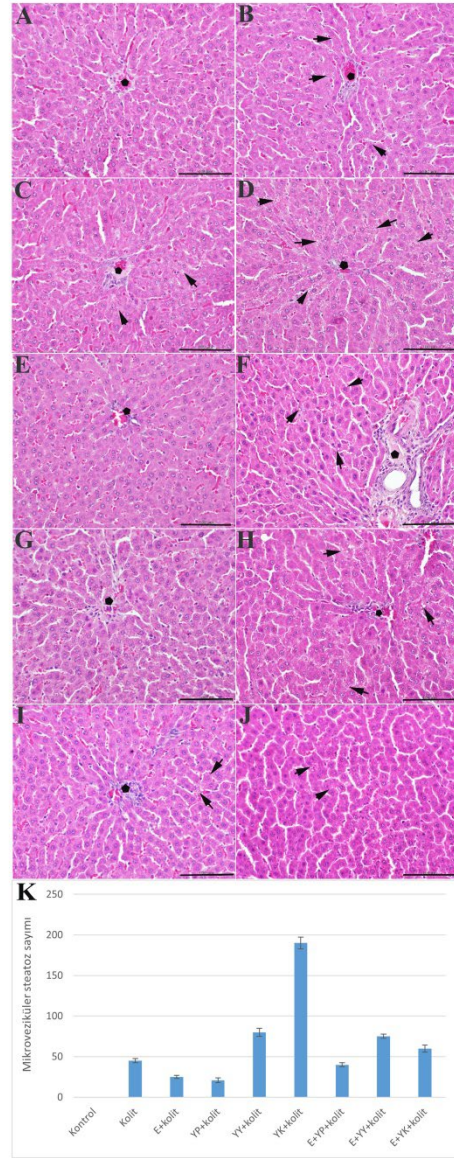
Gruplar arasında glomerüler alan ölçümü (E:egzersiz, YP:yüksek protein, YY:yüksek yağ, YK:yüksek karbonhidrat)



Şekil 3.

Gruplar arası Bowman aralığı ölçümü

Karaciğer histopatolojisine bakıldığında, preparatlarda farklı hepatosit yapılarına, sinüzoid genişlemelerine ve portal alanda fibrozis bulgusuna rastlanılmamıştır. Ancak portal alana yakın yerleşimli hepatositlerde hemen hemen her grupta (kontrol grubu haricinde) mikroveziküler steatoz gözlemlenmiştir (Şekil 4). Semi-kantitatif bir yöntemle hepatik asinüsün tüm metabolik zonlarını içerecek şekilde her preparatta en az 10 bölge portal alanda mikroveziküler steatoz sayılmıştır (Şekil 4). E+kolit grubuna kıyasla kolit grubunda mikroveziküler steatoz sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir. Artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). YP+kolit grubuna kıyasla E+YP+kolit grubunda mikroveziküler steatoz sayısında artış olduğu gözlemlenmiş ancak artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). YY+kolit grubuna kıyasla E+YY+kolit grubunda mikroveziküler steatoz sayısında azalma olduğu gözlemlenmiş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). YK+kolit grubuna kıyasla E+YK+kolit grubunda mikroveziküler steatoz sayısında azalma olduğu gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$).

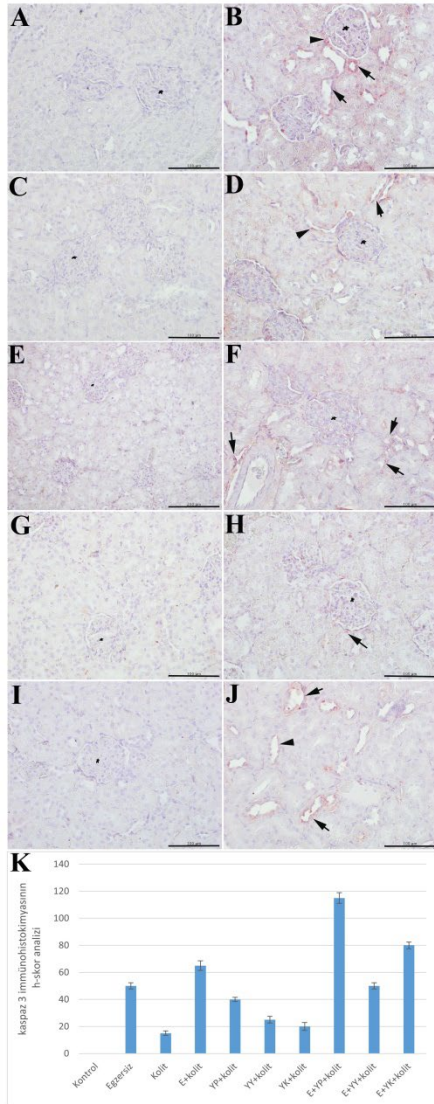


Şekil 4.

Karaciğer histolojisi: Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP+kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400) karaciğer histopatolojileri hematoksilen eozin boyalı preparatlar ışık mikroskop altında incelenmiştir. Yıldız ile işaretli alan santral kanalı, çokgen şekil ise portal alanı göstermektedir. Karaciğerde semi-kantitatif mikroveziküler steatoz sayımı (K) gösterilmiştir.

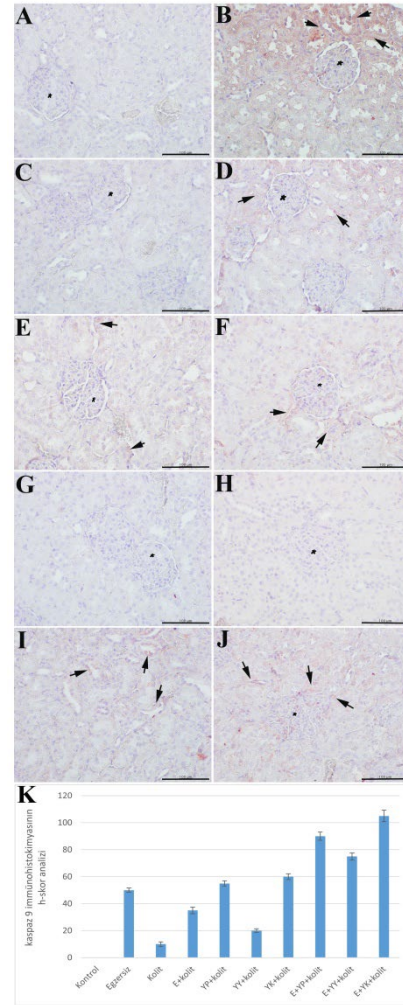
Böbreğe ait preparatlar apoptoz değerlendirmesi için kaspaz 3 ve kaspaz 9, otofaji değerlendirmesi için p62 ve LC3B antikorları ile boyanmıştır (Şekil 5-6). Kaspaz 3 ve kaspaz 9 immünaktiviteleri egzersiz grubu ve egzersiz yapan tüm farklı beslenme gruplarında (E, E+YP+kolit, E+YY+kolit ve E+YK+kolit) Bowman kapsülü, özellikle glomerüle

yakın yerleşimli hem proksimal hem de distal tübüllerde gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5-6). Egzersiz yapan grup ile E+kolit grubu arasında kaspaz 9 antikoru immünaktivitesi açısından anlamlı fark bulunmazken ($p>0.05$), kaspaz 3 antikoru immünaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubunda ve farklı diyetle beslenen kolit gruplarında kaspaz 3 ve kaspaz 9 immünaktiviteleri gözlemlenmemiştir (Şekil 5/6-A/C/E/G/I).



Şekil 5.

Böbrek kaspaz 3 immünohistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 μ m. Aynı panelde tüm gruplara ait kaspaz 3 immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.



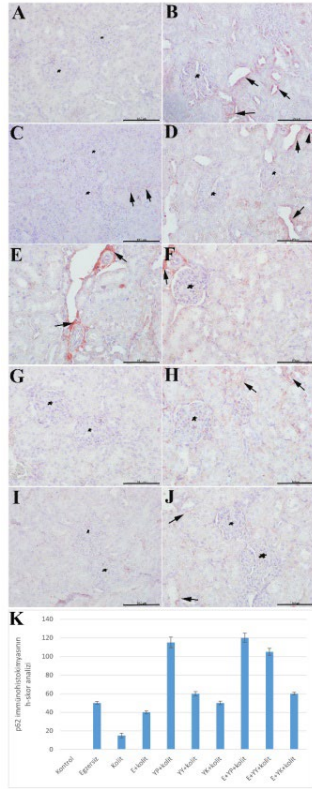
Şekil 6.

Böbrek kaspaz 9 immünohistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 μ m. Aynı panelde tüm gruplara ait kaspaz 9 immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.

Böbreğe ait kesitler otofaji varlığını tespit edebilmek için p62 antikoru ile boyanmış ve H-skor değerleri hesaplanmıştır (Şekil 7). p62, otofagozom oluşumu için otofajide kilit elemandır. Boyanma sonucunda egzersiz ve kolit grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). Kolit grubu ile E+kolit grubu karşılaştırıldığında p62 ekspresyonu açısından özellikle glomerül çevresi distal tübüllerde farklılık olduğu gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). YP+kolit grubu ile E+YP+kolit grubunda özellikle damar çevresi bağ dokusunda p62 reaksiyonunun oldukça fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 7-E/F). Ancak gruplar

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli

arasındaki fark p62 immünaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). YY+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YY+kolit grubunda p62 antikoru immünaktivitesinin oldukça fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 7-H) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). YK+kolit grubuna kıyasla E+YK+kolit grubunun p62 immünaktivitesi açısından (Şekil) ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Gruplara ait H-skor analizi yapılmış olup, grafik olarak paylaşılmıştır (Şekil 7-K).

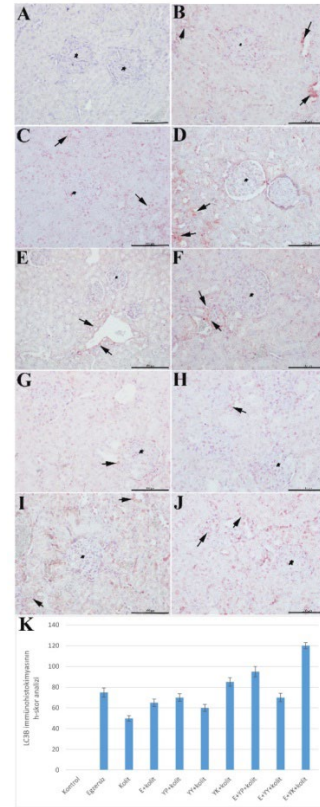


Şekil 7.

Böbrek p62 immünhistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 μ m. Aynı panelde tüm gruplara ait p62 immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.

Böbreğe ait preparatlar otofaji varlığını tespit edebilmek için p62'nin yanısıra LC3B antikoru ile de boyanmıştır (Şekil 8). LC3B ve p62 birlikte hareket ederek otofagozom oluşumu için otofajide önemli rol oynarlar. Boyanma sonucunda E+kolit grubuna karşılık egzersiz yapan grubun ve kolit grubunun LC3B immünaktivitesi glomerüllerin sitoplazma ve çekirdeklerinde, Bowman kapsülünde, glomerüllere

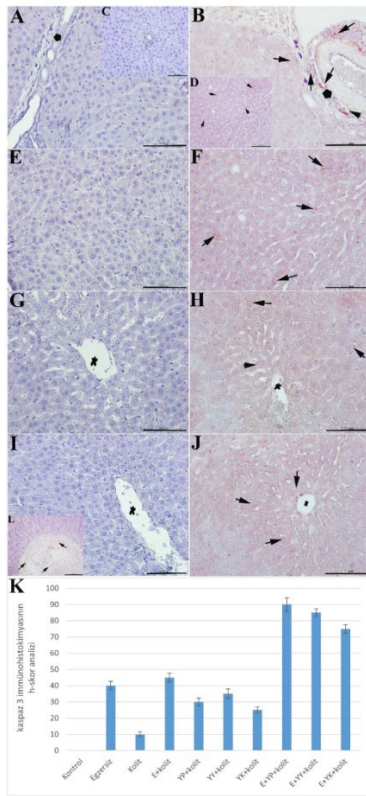
yakın distal ve proksimal tübüllerde gözlemlenmiş ve (Şekil 8-D-F-J) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). YP+kolit grubuna kıyasla E+YP+kolit grubu LC3B immünaktivitesinin fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 8-F) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). YY+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YY+kolit grubunda LC3B reaksiyonunun oldukça düşük olduğu gözlemlenmiş ve (Şekil 8-G/H) gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). YK+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YK+kolit grubunda böbrek dokusu preparatlarındaki glomerüllerin hem sitoplazma hem de çekirdeklerinde LC3B reaksiyonunun oldukça fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 8-I/J) ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplara ait H-skor analizi yapılmış olup, grafik olarak paylaşılmıştır (Şekil 8-K).



Şekil 8.

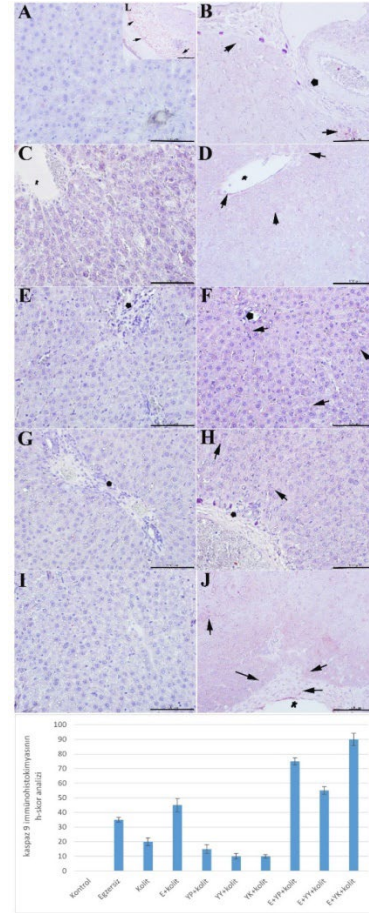
Böbrek LC3B immünhistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 μ m. Aynı panelde tüm gruplara ait LC3B immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.

Karaciğer preparatları da apoptoz değerlendirmesi için kaspaz 3 ve kaspaz 9, otofaji değerlendirmesi için p62 ve LC3B antikoru ile boyanmıştır. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 immünaktiviteleri egzersiz grubu ve egzersiz yapan tüm farklı beslenme gruplarında (E, E+YP+kolit, E+YY+kolit ve E+YK+kolit) gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kolit grubu ile E+kolit grubu arasında kaspaz 3 ve kaspaz 9 boyanması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubunda ve farklı diyetle beslenen kolit gruplarında (YP+kolit, YY+kolit ve YK+kolit) kaspaz 3 ve kaspaz 9 immünaktiviteleri gözlemlenmemiştir (Şekil 9/10). Egzersiz yapan grup ile E+kolit grubu arasında kaspaz 3 antikoru immünaktivitesi açısından anlamlı fark bulunmazken ($p>0.05$), kaspaz 9 antikoru immünaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Antikorların pozitif kontrolü olarak kolon dokusu immünaktivitesi de gösterilmiştir (Şekil 10-L/11-L).



Şekil 9.

Karaciğer kaspaz 3 immünhistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 µm. Aynı panelde tüm gruplara ait kaspaz 3 immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.



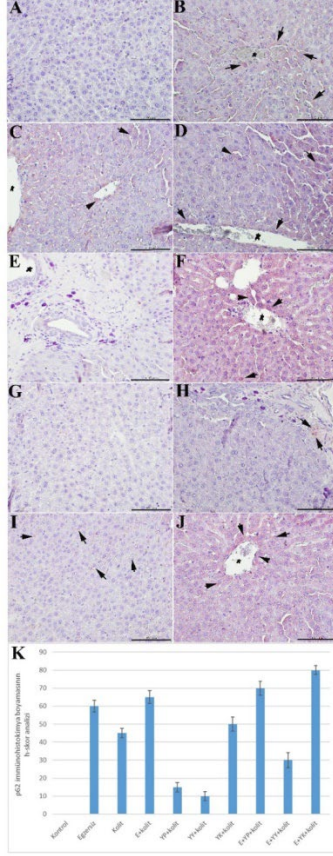
Şekil 10.

Karaciğer kaspaz 9 immünhistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 µm. Aynı panelde tüm gruplara ait kaspaz 9 immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.

Karaciğer preparatları otofajinin değerlendirilmesi için p62 antikoru ile boyanmıştır (Şekil 11). Boyanma sonucunda kolit grubuna karşılık E+kolit grubunun boyanma derecelerinde farklılık olmadığı, hepatositlerin sitoplazmalarında ve damar çevresi bağ dokusunda p62 ekspresyonu gözlemlendiği (Şekil 11-D) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). YP+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YP+kolit grubunda p62 reaksiyonunun oldukça fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 11-F) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). YY+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YY+kolit grubunda p62 reaksiyonunun fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 11 G/H) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). YK+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YK+ kolit grubunda

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli

p62 reaksiyonunun oldukça fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 11-J) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplara ait H-skor analizi yapılmış olup, grafik olarak paylaşılmıştır (Şekil 11-K).



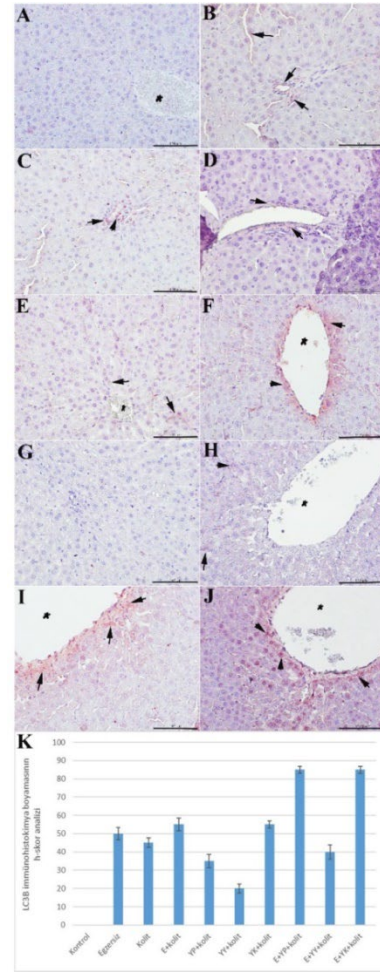
Şekil 11.

Karaciğer P62 immünohistokimyası: Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 µm. Aynı panelde tüm gruplara ait p62 immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.

Karaciğer preparatları otofaji varlığını tespit edebilmek için LC3B antikoruna ile de boyanmıştır (Şekil 12). Boyanma sonucunda kolit grubuna karşılık egzersiz yapan ve E+kolit grubunun boyanma derecelerinde farklılık olmadığı, hepatositlerin sitoplazma ve çekirdeklerinde LC3B ekspresyonu gözlemlendiği (Şekil 12-B/D) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). YP+kolit grubuna kıyasla E+YP+kolit grubunda LC3B reaksiyonunun oldukça fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 12-E/F) ve istatistiksel olarak

anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). YY+kolit grubuna kıyasla E+YY+kolit grubunda LC3B reaksiyonunun oldukça düşük olduğu gözlemlenmiş ve (Şekil 12-G/H) gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). YK+kolit oluşturulmuş gruba kıyasla E+YK+kolit grubu karaciğer preparatlarında, hepatositlerin hem sitoplazma hem de çekirdeklerinde LC3B reaksiyonunun oldukça fazla olduğu gözlemlenmiş (Şekil 12-I/J) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplara ait H-skor analizi yapılmış olup, grafik olarak paylaşılmıştır (Şekil 12-K).

Tüm immünohistokimyasal bulguların istatistiksel değerlendirmesi Tablo I ve Tablo II'de detaylı olarak sunulmuştur.

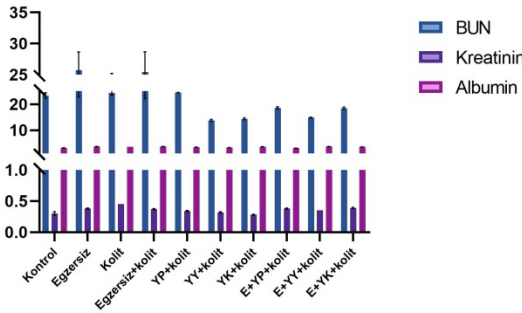


Şekil 12.

Karaciğer LC3B immünohistokimyası : Kontrol grubu (A, X400), egzersiz grubu (B, X400), kolit grubu (C, X400), E+kolit grubu (D, X400), YP +kolit grubu (E, X400), E+YP+kolit grubu (F, X400), YY+kolit grubu (G, X400), E+YY+kolit grubu (H, X400), YK+kolit grubu (I, X400) ve E+YK+kolit grubu (J, X400). Bar: 200 µm. Aynı panelde tüm gruplara ait LC3B immünaktivitesinin H-skor analizine yer verilmiştir (K). Yıldız ile işaretli alan glomerülü, siyah oklar immünaktiviteyi göstermektedir.

Biyokimyasal Bulgular

Böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının daha iyi incelenebilmesi için histopatolojik incelemenin yanı sıra biyokimya ölçümlerine de yer verilmiştir. Böbrek fonksiyon testleri için BUN, kreatinin, albümin bakılırken karaciğer fonksiyon testleri için ALT, AST ve ALP enzimlerine bakılmıştır (Şekil 13). Tüm gruplar açısından BUN değerine baktığımız zaman sadece egzersiz grubu ile tüm farklı beslenme grupları ve egzersiz yapan tüm farklı beslenme grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Kolit grubunun kreatinin değeri ile tüm farklı beslenme grupları ve bu grupların egzersiz yapanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (Tablo III). YK ile beslenen kolit grubu ile egzersiz yapan YK ile beslenen kolit grubu arasında da istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. Kolit oluşturulması ve YK tüketimi kreatinin düzeyini arttırmıştır. Albümin değerlerine bakıldığında, gruplar arasında bir fark olmadığı bulunmuştur. YP+kolit grubunun albümin değerinin hem egzersiz yapan grupla hem de farklı diyet türleri ve egzersiz yapan gruplar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo III).



Şekil 13.

Böbrek fonksiyon tayini için biyokimya ölçümleri

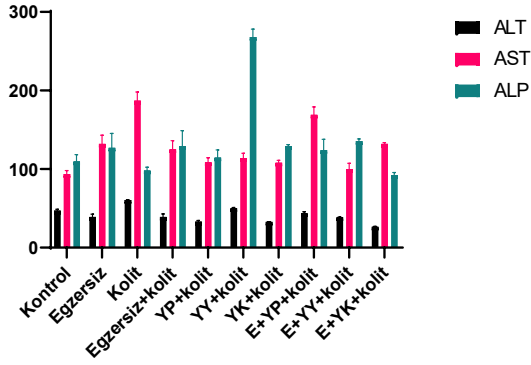
Tablo I. Böbrek immünohistokimya istatistikleri

Böbrek kaspaz 3 immünaktivitesi istatistiği	Aradaki fark	t	p değeri
E+YP+kolit vs. kontrol	94,167	20,756	<0,001
E+YP+kolit vs. kolit	85,833	18,919	<0,001
E+YP+kolit vs. YK+kolit	84,167	18,552	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	81,667	18,001	<0,001
E+YK+kolit vs. kontrol	64,167	14,143	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	60	13,225	<0,001
E+YK+kolit vs. kolit	55,833	12,307	<0,001
E+YK+kolit vs. YK+kolit	54,167	11,939	<0,001
egzersiz+kolit vs. kontrol	52,5	11,572	<0,001
E+YP+kolit vs. E+YY+kolit	52,5	11,572	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	51,667	11,388	<0,001
E+YP+kolit vs. egzersiz	50,833	11,204	<0,001
egzersiz+kolit vs. kolit	44,167	9,735	<0,001
egzersiz vs. kontrol	43,333	9,551	<0,001
egzersiz+kolit vs. YK+kolit	42,5	9,368	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	41,667	9,184	<0,001

E+YP+kolit vs. egzersiz+kolit	41,667	9,184	<0,001
egzersiz+kolit vs. YY+kolit	40	8,817	<0,001
egzersiz vs. kolit	35	7,715	<0,001
YP+kolit vs. kontrol	34,167	7,531	<0,001
Böbrek kaspaz 9 immünaktivitesi istatistiği			
E+YK+kolit vs. kontrol	89,167	20,936	<0,001
E+YK+kolit vs. kolit	83,333	19,567	<0,001
E+YP+kolit vs. kontrol	80	18,784	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	75	17,61	<0,001
E+YP+kolit vs. kolit	74,167	17,414	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	65,833	15,458	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz+kolit	59,167	13,892	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	56,667	13,305	<0,001
YK+kolit vs. kontrol	50,833	11,936	<0,001
E+YY+kolit vs. kolit	50,833	11,936	<0,001
E+YP+kolit vs. egzersiz+kolit	50	11,74	<0,001
E+YK+kolit vs. YP+kolit	49,167	11,544	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz	46,667	10,957	<0,001
YK+kolit vs. kolit	45	10,566	<0,001
egzersiz vs. kontrol	42,5	9,979	<0,001
E+YY+kolit vs. YY+kolit	42,5	9,979	<0,001
YP+kolit vs. kontrol	40	9,392	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	40	9,392	<0,001
E+YK+kolit vs. YK+kolit	38,333	9,001	<0,001
Böbrek p62 immünaktivitesi istatistiği			
YP+kolit vs. kontrol	101,667	19,185	<0,001
E+YP+kolit vs. kontrol	100	18,87	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	96,667	18,241	<0,001
YP+kolit vs. kolit	87,5	16,511	<0,001
E+YP+kolit vs. kolit	85,833	16,197	<0,001
E+YY+kolit vs. kolit	82,5	15,568	<0,001
YP+kolit vs. egzersiz+kolit	64,167	12,108	<0,001
E+YP+kolit vs. egzersiz+kolit	62,5	11,794	<0,001
E+YY+kolit vs. egzersiz+kolit	59,167	11,165	<0,001
YP+kolit vs. egzersiz	58,333	11,008	<0,001
E+YP+kolit vs. egzersiz	56,667	10,693	<0,001
YP+kolit vs. YK+kolit	56,667	10,693	<0,001
E+YP+kolit vs. YK+kolit	55	10,379	<0,001
YY+kolit vs. kontrol	55	10,379	<0,001
E+YK+kolit vs. kontrol	54,167	10,221	<0,001
Böbrek LC3B immünaktivitesi istatistiği			
E+YP+kolit vs. kontrol	85,833	23,78	<0,001
YK+kolit vs. kontrol	81,667	22,626	<0,001
egzersiz vs. kontrol	67,5	18,701	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	65	18,009	<0,001
E+YK+kolit vs. kolit	60,833	16,854	<0,001
YP+kolit vs. kontrol	60,833	16,854	<0,001
egzersiz+kolit vs. kontrol	60	16,623	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	54,167	15,007	<0,001
YY+kolit vs. kontrol	52,5	14,545	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz+kolit	46,667	12,929	<0,001
kolit vs. kontrol	45,833	12,698	<0,001
E+YK+kolit vs. YP+kolit	45,833	12,698	<0,001
E+YK+kolit vs. E+YY+kolit	41,667	11,544	<0,001
E+YK+kolit vs. YK+kolit	25	6,926	<0,001
E+YK+kolit vs. E+YP+kolit	20,833	5,772	<0,001
E+YY+kolit vs. kolit	19,167	5,31	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	33,333	9,235	<0,001
YK+kolit vs. YY+kolit	29,167	8,081	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	25	6,926	<0,001

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli

Karaciğer enzimlerinden ALT ve AST değerlerine baktığımız zaman tüm farklı beslenme gruplarının (E+YK+kolit harici) ALT değerlerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 14). Kolit grubunun ALT, AST değerlerinde, kolitli farklı diyet grupları ile farklı diyetleri içeren egzersiz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). E+YK+kolit grubunun ALT ve AST değeri YP+kolit, YY+kolit, E+YP+kolit ve E+YY+kolit gruplarına göre istatistiksel olarak düşük çıkmıştır ($p<0.05$). YY+kolit grubunun AST değerinin özellikle arttığı gözlemlenmiştir. YP+kolit grubu ile E+YP+kolit grubunun AST değeri diğer tüm gruplar ile istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmıştır. YY+kolit grubunun albümin değeri diğer tüm gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır (Tablo III).



Şekil 14.

Karaciğer fonksiyon tayini için biyokimya ölçümleri

Tablo II. Karaciğer immünohistokimya istatistikleri

Karaciğer kaspaz 3 immünaktivitesi istatistiği	Aradaki fark	t	p değeri
E+YP+kolit vs. kontrol	83,333	17,001	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	82,5	16,831	<0,001
E+YK+kolit vs. kontrol	73,333	14,96	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	77,5	20,431	<0,001
E+YK+kolit vs. YP+kolit	74,167	19,552	<0,001
E+YK+kolit vs. kolit	71,667	18,893	<0,001
E+YP+kolit vs. kontrol	66,667	17,575	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz	64,167	16,916	<0,001
E+YP+kolit vs. YK+kolit	57,5	15,158	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	54,167	14,28	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	50,833	13,401	<0,001
E+YP+kolit vs. kolit	48,333	12,742	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz+kolit	45,833	12,083	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	45,833	12,083	<0,001
E+YK+kolit vs. E+YY+kolit	44,167	11,643	<0,001
egzersiz+kolit vs. kontrol	44,167	11,643	<0,001
E+YP+kolit vs. egzersiz	40,833	10,765	<0,001
E+YY+kolit vs. YK+kolit	36,667	9,666	<0,001
egzersiz+kolit vs. YK+kolit	35	9,227	<0,001
E+YY+kolit vs. YY+kolit	33,333	8,787	<0,001

Karaciğer kaspaz 9 immünaktivitesi istatistiği			
E+YK+kolit vs. kontrol	90	23,726	<0,001
E+YK+kolit vs. YK+kolit	80,833	21,31	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	77,5	20,431	<0,001
E+YK+kolit vs. YP+kolit	74,167	19,552	<0,001
E+YK+kolit vs. kolit	71,667	18,893	<0,001
E+YP+kolit vs. kontrol	66,667	17,575	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz	64,167	16,916	<0,001
E+YP+kolit vs. YK+kolit	57,5	15,158	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	54,167	14,28	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	50,833	13,401	<0,001
E+YP+kolit vs. kolit	48,333	12,742	<0,001
E+YK+kolit vs. egzersiz+kolit	45,833	12,083	<0,001
E+YY+kolit vs. kontrol	45,833	12,083	<0,001
E+YK+kolit vs. E+YY+kolit	44,167	11,643	<0,001
egzersiz+kolit vs. kontrol	44,167	11,643	<0,001
E+YP+kolit vs. egzersiz	40,833	10,765	<0,001
E+YY+kolit vs. YK+kolit	36,667	9,666	<0,001
egzersiz+kolit vs. YK+kolit	35	9,227	<0,001
E+YY+kolit vs. YY+kolit	33,333	8,787	<0,001
Karaciğer p62 immünaktivitesi istatistiği			
E+YK+kolit vs. kontrol	13,333	7,749	<0,001
E+YP+kolit vs. kontrol	11,667	6,78	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	11,667	6,342	<0,001
E+kolit vs. kontrol	10	6,277	<0,001
E+YK+kolit vs. YP+kolit	10,833	5,889	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	10	5,436	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	9,167	4,983	<0,001
YK+kolit vs. kontrol	8,333	4,843	<0,001
E+kolit vs. YY+kolit	8,333	4,843	<0,001
E+YK+kolit vs. E+YY+kolit	8,333	4,53	<0,001
E+kolit vs. YP+kolit	7,5	4,359	0,002
kolit vs. kontrol	6,875	4,316	0,002
E+YK+kolit vs. kolit	6,458	3,753	0,011
E+YP+kolit vs. E+YY+kolit	6,667	3,624	0,015
YK+kolit vs. YY+kolit	6,667	3,624	0,015
Karaciğer LC3B immünaktivitesi istatistiği			
E+YP+kolit vs. kontrol	12,5	7,339	<0,001
E+YK+kolit vs. YY+kolit	10,833	6,36	<0,001
E+YP+kolit vs. YY+kolit	10,833	6,36	<0,001
E+YP+kolit vs. YP+kolit	8,333	4,892	<0,001
E+YK+kolit vs. YP+kolit	8,333	4,892	<0,001
YK+kolit vs. kontrol	7,5	4,403	0,002
E+kolit vs. kontrol	7,5	4,403	0,002
E+YK+kolit vs. E+YY+kolit	7,5	4,403	0,002
E+YP+kolit vs. E+YY+kolit	7,5	4,403	0,002
E+YP+kolit vs. kolit	6,667	3,914	0,008
E+YK+kolit vs. kolit	6,667	3,914	0,008
kolit vs. kontrol	5,833	3,425	0,031
E+kolit vs. YY+kolit	5,833	3,425	0,03
YK+kolit vs. YY+kolit	5,833	3,425	0,029

Tablo III. Çalışma gruplarında biyokimya analiz değerleri. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilir. $p < 0.05$ değeri, Tek yönlü varyans analizi [ANOVA];

Gruplar	ALT (U/l)	AST (U/l)	ALP (U/l)	BUN (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	Albümin(g/dl)
Kontrol	47 \pm 2	93,5 \pm 4,6 ^{b,c}	109,5 \pm 8,9 ^f	23,3 \pm 1,1	0,3 \pm 0,02 ^{b,c,h,i}	3,15 \pm 0,05 ^{e,i}
Egzersiz	39 \pm 3,8 ^b	125 \pm 11,2 ^a	127 \pm 18,5 ^f	25,7 \pm 2,9 ^{f,g,h,i}	0,37 \pm 0,007 ^{a,b}	3,65 \pm 0,09 ^{a,d}
Kolit	61 \pm 0,2 ^e	187 \pm 11 ^{a,b,c,e}	98 \pm 4,4 ^{b,f}	24,4 \pm 0,9 ^{f,g}	0,45 \pm 0,003 ^{c,e,f,h}	3,5 \pm 0,01 ^{b,d,e,h}
E+kolit	39 \pm 3,7 ^d	125 \pm 11,1 ^b	129 \pm 19,7 ^f	25,4 \pm 3,3 ^{f,h,i,j}	0,36 \pm 0,013 ^{b,g}	3,65 \pm 0,09 ^{a,d}
YP+kolit	33 \pm 1,5 ^{a,b}	109 \pm 5,8 ^b	115 \pm 9,9 ^f	24,5 \pm 0,01 ^{e,f}	0,34 \pm 0,009 ^b	3,45 \pm 0,05 ^{a,b,h}
YY+kolit	50 \pm 1,1 ^f	114 \pm 6,3 ^b	268 \pm 9,9 ^f	13,8 \pm 0,4 ^{a,b,c}	0,32 \pm 0,01 ^{b,j}	3,25 \pm 0,05 ^{e,i}
YK+kolit	33 \pm 0,4 ^{a,b,e}	108 \pm 3,1 ^b	129 \pm 1,8 ^f	14,4 \pm 0,3 ^{a,d}	0,28 \pm 0,009 ^{b,c,d}	3,58 \pm 0,04 ^{a,e}
E+YP+kolit	43 \pm 2	169 \pm 10,1 ^{a,c}	124 \pm 13,8 ^{f,i}	18,6 \pm 0,4 ^{e,i}	0,37 \pm 0,013 ^b	3,07 \pm 0,03 ^{d,g}
E+YY+kolit	39 \pm 0,6 ^{b,f}	100 \pm 7,4 ^b	135 \pm 2,9 ^{b,f}	14,9 \pm 0,2 ^{a,b,d}	0,35 \pm 0,001 ^b	3,65 \pm 0,05 ^{a,f}
E+YK+kolit	27 \pm 0,7 ^{a,b,f}	132 \pm 1,7 ^a	92 \pm 3,5 ^f	18,5 \pm 0,4 ^d	0,39 \pm 0,007 ^{b,f,g}	3,51 \pm 0,04 ^f

^a Kontrol grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark;

^b Kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^c Egzersiz grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^d Egzersiz+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^e YP+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^f YY+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^g YK+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^h E+YP+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

ⁱ E+YY+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

^j E+YK+kolit grubu ile diğer grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil etmiştir.

ALT, alanin aminotransferaz; AST, aspartat aminotransferaz; ALP, alkalen fosfataz; BUN, üre.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada farklı diyet (YP (%45 protein içeren yem), YY (%60 yağ içeren yem) ve YK (%67 karbonhidrat içeren yem)) ve egzersizin (yüzme egzersizi) ülseratif kolite karşı koruyucu önlemler için oluşturulan deney modelinin karaciğer ve böbrek sağlığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Böbrek ve karaciğer histopatolojisi ışık mikroskop altında incelenirken, farklı diyet ve egzersizin böbrek ve karaciğer üzerindeki apoptoz ve otofaji yollarına etkisi analiz edilmiştir. Bu histopatolojik incelemenin yanı sıra bulguların desteklenmesi, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının daha iyi tahlil edilebilmesi için ALT, AST, ALP karaciğer enzimleri ile BUN, kreatinin ve albümin ölçümü yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan farklı diyetlerin içerik oranları hali hazırda diyabet ve obezite çalışmalarında en çok kullanılan oranlardır. Çalışmamızın ana fikri bir önceki ülseratif kolit koruması modeli oluşturulmasının devamı niteliğindedir. Bu sebeple tek başına sadece YP, YY ve YK gruplarını içermemesi

çalışmamızın en büyük eksiğidir. Kolitin tek başına karaciğer ve böbrek üzerindeki etkisi sadece egzersiz içeren grubumuzla açıklamaya çalışılsa da farklı diyet bileşenlerinde göstermek mümkün olmamıştır. Tek başına farklı diyet bileşenlerinin çalışmamızdaki eksikliği bu bölümde literatürde yer alan farklı diyet bileşeni sonuçları ile derlenmeye çalışılmıştır. Çünkü sonuçlarımıza bakıldığında sadece kolit oluşturulan grubumuzda da AST, ALT ve kreatinin değerlerini arttırdığı ve karaciğer histopatolojisinde mikroveziküler steatoz varlığı gözlemlenmiştir. Her ne kadar anlamlı olmasa da apoptoz ve otofaji belirteçlerinin immünohistokimya sonuçlarında immünaktiviteleri gözlemlenmiştir.

Literatürde diyetlerin, kas hipertrofisi ve egzersiz sonrası için sıkça kullanılan yüksek protein diyetleri ile uzun süre beslenmenin böbrek hastalığına yol açıp açmadığının belirsiz olduğu birçok çalışma da belirtilmiştir⁴¹⁻⁴⁴. Yüksek proteinli diyetler haricinde ortalama protein gereksiniminin 0,6 g/(kg·gün) olarak ayarlanması gerektiği sonucuna varılmış olup daha yüksek protein içerikli protein diyetlerinin glomerüler filtrasyon hızını (GFR) yükselttiği belirtilmiştir^{41,42,45,46}. Bazı deneysel ve gözlemsel insan çalışmaları artan proteinüriye bağlı olarak yüksek protein tüketimi ve yüksek yağlı diyetin⁴⁷ glomerüler filtrasyon hızını arttırdığı, ilişkili kan basıncı değişiklikleri ile birlikte diürez ve kronik böbrek hastalığının (KBH) hızlanmasını teşvik edebileceğini öne sürmektedir^{48,49}. Aşırı protein alımının, protein karbamilasyonunu artırarak ve reaktif oksijen türleri üretmekle dolaşımda yüksek BUN seviyelerine, oksidatif strese ve endotel disfonksiyonuna sebep olduğu söylenebilir⁵⁰. Mekanik olarak, yüksek protein alımının insanlarda böbrek hacminde ve ağırlığında artışlara yol açabileceği⁵¹ ve bir fare modelinde tübülointerstisyel fibrozis ile mezengiyal matriksi genişlettiği gösterilmiştir⁵². Çalışmamızda literatür ile eş bir biçimde hem yüksek proteinli diyetle beslenen grupta hem de yüksek proteinli diyetle beslenip egzersiz yapan grupta Bowman aralığının arttığı yani glomerüler kapiller geçirgenliğinin arttığı ancak kontrole kıyasla BUN seviyesinin anlamlı bir şekilde artmadığı bulunmuştur. Yüksek protein ile beslenmede apoptoz ve otofaji belirteç immünoaktivitesonuçları ile biyokimyasal analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde egzersizin böbrek sağlığı açısından herhangi bir fark yaratmadığı gözlemlenmiştir. Yüksek karbonhidratlı diyetin önceden böbrek hastalığı olmayan veya obez erişkinlerde böbrek fonksiyonunun klinik belirteçlerini olumsuz etkilemediği çalışmada gösterilmiştir⁵³. Hatta insanlar üzerinde yapılan 1000 kişiyi içeren bir meta analizde düşük karbonhidrat içeren diyetle, kronik böbrek rahatsızlığı olmayan aşırı kilolu ve obez bireylerde kontrol diyetine kıyasla GFR'deki artışın daha fazla olduğu belirlenmiştir⁵⁴. Bizim

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli

sonuçlarımızda böbrek histopatolojisi açısından hiçbir patolojik bulguya rastlanılmayan YK+kolit grubunda kreatinin ve albümin seviyeleri kontrole oranla aynı olduğu için 8 haftalık YK+kolit ve E+YK+kolit gruplarında böbrek sağlığı açısından bir problem olmadığı gözlemlenmiştir. 20 hafta %60 yağ içeren yüksek yağlı diyet beslenme modeli içeren bir çalışmada serum ALT ve AST seviyelerindeki artışların yanı sıra artan karaciğer ağırlığı, daha yüksek oranda mikroveziküler ve makroveziküler stenatozların varlığı dahil olmak üzere karaciğer patolojisi gösterilmiştir^{55,56}. Bizim çalışmamızda ise %60 YY+kolit modelinde yüksek ALP değeri oldukça dikkat çekmiş ancak E+YY+kolit grubunda ALP değerinin oldukça düştüğü görülmüştür. 9 hafta boyunca YY beslenen rat böbreklerinde renal glomerüller hücrelerde ve tübüler epitel hücrelerinde artmış bir karboksimetilizin birikimi, oksidatif DNA hasarı ve renal podosit kaybı gözlenmiştir⁵⁵. Bizim çalışma verilerimizle korele bir şekilde düzenli egzersizin, bu lipoksidasyon yükünü inhibe ettiği ve oksidatif stresle ilişkili böbrek hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir⁵⁷. Çalışmamızda literatüre eş bulgular gözlemlenmiş olup yüksek protein, karbonhidrat ve yağ diyetlerinin karaciğer enzimlerini (ALT, AST, ALP) arttırmalarının yanı sıra amino asit alımı/metabolizması sonrası lipit sentezinin artması, hepatik triaçilgliserolu biriktirmeye teşvik ettiğini göstermiştir^{58,59} AST, ALT değerleri açısından kolit grubu ile farklı diyetler ve farklı diyetleri içeren egzersiz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak makroveziküler steatoz ve mikroveziküler steatoza karşılık hepatositlerde küçülme gözlemlenmiştir⁶⁰. Literatürde bizim sonuçlarımızdaki gibi yüksek proteinli diyetle karaciğerde makroveziküler ve mikroveziküler steatozların sayısının azaldığı gözlemlenmiştir⁶¹ 8 hafta boyunca yüksek karbonhidrat (nişasta) ve düşük yağ diyeti denen bir başka çalışmada bizim çalışma sonuçlarımızda rastlanılmasa da hepatik inflamasyon bulgusuna da rastlanıldığı rapor edilmiştir⁶². Egzersizin ise farklı diyetler kullanarak alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) olan tüm hastalar için faydalı olduğu belirtilmiştir⁶³ Bizim de sonuçlarımızda yüksek protein, yüksek yağ ve yüksek karbonhidrat içeriklerinin karaciğerde mikroveziküler steatoz birikimlerini egzersizin azalttığı gözlemlenmiştir. Egzersiz, çeşitli sitokinlerin, hormonların, büyüme faktörlerinin ve oksidatif durumun konsantrasyonunu etkileyen bir tür fizyolojik strestir¹⁷. Bu nedenle, egzersizle indüklenen apoptoz sinyali, prosurvival ve proapoptotik faktörler arasındaki kritik dengeyi ve ayrıca apoptoz direncine katkıda bulunan hücre içi koruma sistemlerini etkileyen egzersiz yoğunluğuna ve süresine bağlıdır⁶⁴. Tüm gruplarımız için hem apoptoz başlatıcı aktif kaspaz 9 hem de aktif kaspaz 3 için immünpozitif yanıt gözlemlenmiştir. Otofaji ile

ilgili genlerin ve proteinlerin ekspresyonunun, egzersiz sonrasında insanlarda vastus lateralis kas örneklerinde düzenlendiği ve ifadelerinin arttığı bulunmuştur^{65,66}. Dahası egzersizin özellikle NAYKH'nin klinik sonuçlarını iyileştirdiği de bilinmektedir⁶⁷. Ülseratif kolitten korunma adına yaptırılan yüzme egzersizi ile tüm gruplarda yüksek protein, yüksek karbonhidrat ve yüksek yağ ile beslenip oluşan karaciğer mikroveziküler steatoz birikimlerinin sitoplazmadan otofaji yoluyla azaldığı tarafımızca gösterilmiştir. Egzersiz yaptırılan gruplarda p62 ve LC3B ifadeleri artmıştır. Özellikle p62 proteininin mikroveziküler steatoz birikimleri üzerinde immünpozitifliği gözlemlenmiştir. Mikroveziküler steatozların otofaji ile yıkımı sonucu homeostazın sağlandığı hem immünhistokimya boyamaları ile hem de düşen serum ALT, AST ve ALP değerleri ile tarafımızca ortaya konmuştur.

8 haftalık düzenli beslenme süreci YP+kolit grubu haricinde E+YK+kolit ve E+YY+kolit gruplarımızda ülseratif kolit koruması sağladığı (Ateşoğlu ark. yayınlanmamış veri) bulunmuşken hem histopatolojik hem de serum biyokimya değerlendirmeleri ile E+YK+kolit grubunda karaciğer ve böbrek sağlığında korunduğu bulunmuştur. Ancak böbrek ve karaciğer sağlığı açısından 8 haftadan daha uzun süreli yüksek karbonhidratlı beslenme ve egzersiz koşulları sağlandığı zaman hakkında yorum yapabilmek için daha uzun süre planlanmış deney çok verilerine ihtiyaç vardır. Literatürde egzersizin ve sağlıklı ilişkisinin incelenmesi adına makale yer alsa da çok az histopatolojik inceleme yapan yayın olması sebebiyle çalışmamız bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Onay Tarihi: 01/08/2022
Karar No: 2022/29

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: G.A., R.A., S.Ç., M.K., F.B.; Veri toplama ve işleme: G.A., R.A.; Analiz ve verilerin yorumlanması: G.A., R.A., S.Ç., M.K., F.B.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: G.A. Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar 2438 nolu proje kapsamında AYBÜ Bilimsel Araştırmalar Proje birimi tarafından desteklenmiştir.

Yazarlar Dr. Öğretim Üyesi Hilal NAKKAŞ'a bu makaleye katkılarından dolayı teşekkür etmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence, *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 2006, 174(6): 801.
2. Physical activity, <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/physical-activity> (accessed 8 Apr2023).

3. Berryman JW. The art of medicine: Motion and rest: Galen on exercise and health, *The Lancet*, 2012, 380(9838): 210–211.
4. Rueggsegger GN, Booth FW. Health Benefits of Exercise, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 8(7): a029694.
5. Exercise and well-being: a review of mental and physical health: Current Opinion in Psychiatry, https://journals.lww.com/psychiatry/Abstract/2005/03000/Exercise_and_well_being_a_review_of_mental_and.13.aspx (accessed 8 Apr2023).
6. Murphy MH, Blair SN, Murtagh EM. Accumulated versus continuous exercise for health benefit: A review of empirical studies, *Sports Medicine*, 2009, 39(1): 29–43.
7. Elmagd MA. Benefits, need and importance of daily exercise, *International Journal of Physical Education, Sports and Health*, 2016, 3(5): 22–27.
8. Seldin MM, Peterson JM, Byerly MS, Wei Z, Wong GW. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis, *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(15): 11968–11980.
9. Otaka N, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kambara T, Enomoto T *et al*. Myonectin is an exercise-induced Myokine that protects the heart from ischemia-reperfusion injury, *Circ Res*, 2018, 123(12): 1326–1338.
10. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease, *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(9): 607–610.
11. O’Gorman DJ, Krook A. Exercise and the Treatment of Diabetes and Obesity, *Medical Clinics of North America*, 2011, 95(5): 953–969.
12. Jacob N, Novaes JS, Behm DG, Vieira JG, Dias MR, Vianna JM. Characterization of Hormonal, Metabolic, and Inflammatory Responses in CrossFit® Training: A Systematic Review, *Front Physiol*, 2020, 11(August). doi:10.3389/fphys.2020.01001.
13. Feito Y, Patel P, Redondo AS, Heinrich KM. Effects of eight weeks of high intensity functional training on glucose control and body composition among overweight and obese adults, *Sports*, 2019, 7(2). doi:10.3390/sports7020051.
14. Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Rodríguez-Mañas L. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease, *J Am Med Dir Assoc*, 2016, 17(9): 789–796.
15. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease, 2018, (February): 475–482.
16. Meyer C, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE. Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(2 45-2): 419–427.
17. Mooren FC, Krüger K. Exercise, Autophagy, and Apoptosis, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 135: 407–422.
18. Mooren FC, Krüger K. Exercise, Autophagy, and Apoptosis, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 135: 407–422.
19. Farré JC, Subramani S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: Lessons from yeast, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(9): 537–552.
20. Walter KM, Schöenberger MJ, Trötzmüller M, Horn M, Elsässer HP, Moser AB, Lucas MS, Schwarz T, Gerber PA, Faust PL, Moch H, Köfeler HC, Krek W, Kovacs WJ. Hif-2 α Promotes degradation of mammalian peroxisomes by selective autophagy, *Cell Metab*, 2014, 20(5): 882–897.
21. Wang X, Li S, Liu Y, Ma C. Redox regulated peroxisome homeostasis, *Redox Biol*, 2015, 4: 104–108.
22. da Rocha AL, Pinto AP, Morais GP, Marafon BB, Rovina RL, Veras ASC, Teixeira GR, Pauli JR, de Moura LP, Cintra DE, Ropelle ER, Rivas DA, da Silva ASR. Moderate, but not excessive, training attenuates autophagy machinery in metabolic tissues, *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 1–21.
23. Rocchi A, He C. Regulation of Exercise-Induced Autophagy in Skeletal Muscle, *Curr Pathobiol Rep*, 2017, 5(2): 177–186.
24. Rusten TE, Stenmark H. P62, an autophagy hero or culprit?, *Nat Cell Biol*, 2010, 12(3): 207–209.
25. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy, *Semin Immunopathol*, 2010, 32(4): 431–436.
26. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S], *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(33): 24131–24145.
27. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y shin, Ueno T, Hara T *et al*. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice, *Cell*, 2007, 131(6): 1149–1163.
28. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death, *Journal of Cell Biology*, 2005, 171(4): 603–614.
29. Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, Jin H, Xu H, Chen Q. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis, *Protein Cell*, 2010, 1(5): 468–477.
30. Allan LA, Clarke PR. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation, *FEBS Journal*, 2009, 276(21): 6063–6073.
31. Gobatto CA, De Mello MAR, Sibuya CY, De Azevedo JRM, Dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise, *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 2001, 130(1): 21–27.
32. Jean C, Rome S, Mathé V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, Achagiotis CL, Tomé D. Metabolic Evidence for Adaptation to a High Protein Diet in Rats, *J Nutr*, 2001, 131(1): 91–98.
33. Gray RS, Olefsky JM. Effect of a glucosidase inhibitor on the metabolic response of diabetic rats to a high carbohydrate diet, consisting of starch and sucrose, or glucose, *Metabolism*, 1982, 31(1): 88–92.
34. Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, Goodyear LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(2): 495–504.
35. E. Renata Fabia; R. Willén; A. Ar’Rajab; R. Andersson; B. Åhrén; S. Bengmark. Acetic Acid-Induced Colitis in the Rat: A Reproducible Experimental Model for Acute Ulcerative Colitis, *European Surgical Research*, 1992, 24(4): 211–215.
36. Elbaz EM, Essam RM, Ahmed KA, Safwat MH. Donepezil halts acetic acid-induced experimental colitis in rats and its associated cognitive impairment through regulating inflammatory/oxidative/apoptotic cascades: An add-on to its anti-dementia activity, *Int Immunopharmacol*, 2023, 116. doi:10.1016/J.INTIMP.2023.109841.
37. Elmansy RA, Seleem HS, Mahmoud AR, Hassanein EHM, Ali FEM. Rebamipide potentially mitigates methotrexate-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress and inflammation: A molecular and histochemical study, *Anatomical Record*, 2021, 304(3): 647–661.
38. Elmansy RA, Seleem HS, Mahmoud AR, Hassanein EHM, Ali FEM, Turlin B *et al*. Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats, *Anatomical Record*, 2009, 39(3): 1122–1131.
39. Turlin B, Ramm GA, Purdie DM, Lainé F, Perrin M, Deugnier Y, Macdonald GA. Assessment of hepatic steatosis:

Ülseratif Kolitten Korunma Modeli

- Comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies, *Liver International*, 2009, 29(4): 530–535.
40. Akcan G, Alimogullari E, Abu-Issa R, Cayli S. Analysis of the developmental expression of small VCP-interacting protein and its interaction with steroidogenic acute regulatory protein in Leydig cells, *Reprod Biol*, 2020, 20(1): 88–96.
 41. Juraschek SP, Appel LJ, Anderson CAM, Miller ER. Effect of a high-protein diet on kidney function in healthy adults: Results from the omnihart trial, *American Journal of Kidney Diseases*, 2013, 61(4): 547–554.
 42. Cuenca-Sánchez M, Navas-Carrillo D, Orenes-Piñero E. Controversies surrounding high-protein diet intake: Satiating effect and kidney and bone health, *Advances in Nutrition*, 2015, 6(3): 260–266.
 43. Jenkins DJA, Kendall CWC, Vidgen E, Augustin LSA, Van Erk M, Geelen A, Parker T, Faulkner D, Vuksan V, Josse RG, Leiter LA, Connelly PW. High-protein diets in hyperlipidemia: Effect of wheat gluten on serum lipids, uric acid, and renal function, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 74(1): 57–63.
 44. van Elswyk ME, Weatherford CA, McNeill SH. A systematic review of renal health in healthy individuals associated with protein intake above the US recommended daily allowance in randomized controlled trials and observational studies, *Advances in Nutrition*, 2018, 9(4): 404–418.
 45. Pierre Amarenco, Julien Bogousslavsky, Alfred Callahan 3rd, Larry B Goldstein, Michael Hennerici, Amy E Rudolph, Henrik Sillesen, Lisa Simunovic, Michael Szarek, K M A Welch, Justin A Zivin SP by AR in CL (SPARCL) I. Comparison of Weight-Loss Diets with Different Compositions of Fat, Protein, and Carbohydrates, *New England Journal of Medicine*, 2011, 365: 687–696.
 46. Ko GJ, Rhee CM, Kalantar-Zadeh K, Joshi S. The effects of high-protein diets on kidney health and longevity, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2020, 31(8): 1667–1679.
 47. Rouhani MH, Najafabadi MM, Esmailzadeh A, Feizi A, Azadbakht L. Direct association between high fat dietary pattern and risk of being in the higher stages of chronic kidney disease, <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000260>, 2019, 89(5–6): 261–270.
 48. Friedman AN. High-protein diets: Potential effects on the kidney in renal health and disease, *American Journal of Kidney Diseases*, 2004, 44(6): 950–962.
 49. Kamper AL, Strandgaard S. Long-Term Effects of High-Protein Diets on Renal Function, *Annu Rev Nutr*, 2017, 37(June): 347–369.
 50. Granqvist AB, Ericsson A, Sanchez J, Tonelius P, William-Olsson L, Dahlqvist U, Andersson AK, Tomic TT, Hudkins K, Alpers CE, Pellegrini G, Söderberg M. High protein diet accelerates diabetes and kidney disease in the BTBR ob/ob mouse, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318(3): F763–F771.
 51. Skov AR, Toubro S, Bülow J, Krabbe K, Parving HH, Astrup A. Changes in renal function during weight loss induced by high vs low-protein low-fat diets in overweight subjects, *Int J Obes*, 1999, 23(11): 1170–1177.
 52. Kalantar-Zadeh K, Fouque D. Nutritional Management of Chronic Kidney Disease, *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(18): 1765–1776.
 53. Hashim K, Chin K. The Mechanism of Kelulut Honey in Reversing Metabolic Changes in Rats Fed with High-Carbohydrate High-Fat Diet, *Molecules*, 2023, : 28.
 54. Tay J, Thompson CH, Luscombe-Marsh ND, Noakes M, Buckley JD, Wittert GA, Brinkworth GD. Long-Term effects of a very low carbohydrate compared with a high carbohydrate diet on renal function in individuals with type 2 diabetes: A randomized trial, *Medicine (United States)*, 2015, 94(47): e2181.
 55. Juszcak F, Vlassembrouck M, Botton O, Zwakhals T, Decarmoncle M, Tassin A, Caron N, Declèves AE. Delayed exercise training improves obesity-induced chronic kidney disease by activating ampk pathway in high-fat diet-fed mice, *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 1–20.
 56. De Castro UGM, Dos Santos RAS, Silva ME, De Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats, *Lipids Health Dis*, 2013, 12(1): 1–11.
 57. Park S, Kim CS, Lee J, Kim JS, Kim J. Effect of Regular Exercise on the Histochemical Changes of D-Galactose-Induced Oxidative Renal Injury in High-Fat Diet-Fed Rats, *Acta Histochem Cytochem*, 2013, 46(4): 111–119.
 58. Díaz-Rúa R, Keijer J, Palou A, van Schothorst EM, Oliver P. Long-term intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats, *J Nutr Biochem*, 2017, 46: 39–48.
 59. Liu Y, Lu Q, Xi L, Gong Y, Su J, Han D, Zhang Z, Liu H, Jin J, Yang Y, Zhu X, Xie S. Effects of Replacement of Dietary Fishmeal by Cottonseed Protein Concentrate on Growth Performance, Liver Health, and Intestinal Histology of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*), *Front Physiol*, 2021, 12: 2308.
 60. Mashmoul M, Azlan A, Mohtarrudin N, Mohd Yusof BN, Khaza'ai H, Khoo HE, Farzadnia M, Boroushaki MT. Protective effects of saffron extract and crocin supplementation on fatty liver tissue of high-fat diet-induced obese rats, *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 1–7.
 61. French WW, Dridi S, Shouse SA, Wu H, Hawley A, Lee SO, Gu X, Baum JI. A High-Protein Diet Reduces Weight Gain, Decreases Food Intake, Decreases Liver Fat Deposition, and Improves Markers of Muscle Metabolism in Obese Zucker Rats, *Nutrients* 2017, Vol 9, Page 587, 2017, 9(6): 587.
 62. Romano N, Fischer H, Rubio-Benito MM, Overtuf K, Sinha AK, Kumar V. Different dietary combinations of high/low starch and fat with or without bile acid supplementation on growth, liver histopathology, gene expression and fatty acid composition of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2022, 266: 111157.
 63. Younossi ZM, Corey KE, Lim JK. AGA Clinical Practice Update on Lifestyle Modification Using Diet and Exercise to Achieve Weight Loss in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Expert Review, *Gastroenterology*, 2021, 160(3): 912–918.
 64. Exercise-induced leukocyte apoptosis - PubMed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24974724/> (accessed 8 Apr2023).
 65. Jamart C, Benoit N, Raymackers JM, Kim HJ, Kim CK, Francaux M. Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise, *Eur J Appl Physiol*, 2012, 112(8): 3173–3177.
 66. Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frère D, Féasson L. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running, *J Appl Physiol*, 2012, 112(9): 1529–1537.
 67. Chun SK, Lee S, Yang MJ, Leeuwenburgh C, Kim JS. Exercise-Induced Autophagy in Fatty Liver Disease, *Exerc Sport Sci Rev*, 2017, 45(3): 181.

