



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**NON ALKOLİK STEATOHEPATİT İLE MTHFR A1298C
VE C677T GEN POLİMORFİZİMLERİ ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

DR. UMMUHAN COŞKUN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. FEHMİ ATEŞ

MERSİN-2013



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**NON ALKOLİK STEATOHEPATİT İLE MTHFR A1298C
VE C677T GEN POLİMORFİZİMLERİ ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

DR. UMMUHAN COŞKUN

UZMANLIK TEZİ

Bu tez, BAP TF DTB (UC) 2012-5 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. FEHMİ ATEŞ

MERSİN-2013

TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında yapıcı ve bilimsel eleştirilerini esirgemeyen, her fırsatta bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fehmi Ateş' e en içten teőekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince destek ve katkıları nedeniyle İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Orhan Sezgin başta olmak üzere çok değerli hocalarıma teőekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımları nedeniyle Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Lülüfer Gümüő ve Biyokimya Labaratuvarında çalışan laborant arkadaşlara, Biyoistatistik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Didem Derici' ye ve tezimin olgunlaşması sürecinde katkısı bulunan Gastroenteroloji Bilim Dalı çalışanlarına, uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım, hemőire ve personel arkadaşlarıma teőekkür ederim.

Hayatım boyunca tüm desteklerini yanımda hissettiğim aileme minnet dolu duygularımı sunuyorum. Her zaman yanımda olan ve varlığıyla bana destek olan biricik eőime de sevgilerimi sunuyorum.

Dr. Ummuhan Coşkun

Mersin-2013

İÇİNDEKİLER

I-ÖZET	5
II-SUMMARY	6
III-GİRİŞ	7
IV-GENEL BİLGİLER	10
A- NON ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI.....	10
B- NON ALKOLİK STEATOHEPATİT	11
C- PATOGENEZ	12
D- NON ALKOLİK STEATOHEPATİT' İN KLİNİK BULGULARI	14
E- HİPERHOMOSİSTEİNEMİ VE MTHFR GEN POLİMORFİZMLERİ	17
V-GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
VI-BULGULAR	26
VII-TARTIŞMA	34
VIII-SONUÇ.....	38
IX-KAYNAKLAR	39
X-SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	48
XI-TABLolar DİZİNİ	50
XII-ŞEKİLLER DİZİNİ	51

I-ÖZET

Nonalkolik steatohepatit (NASH), kriptojenik karaciğer sirozunun en sık nedenidir¹. NASH ile ilişkili genetik faktörlerin ortaya konması, hastalık etiyopatogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, NASH ve sonrasında gelişen karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomun (HCC) önlenmesine katkıda bulunabilir.

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), homosistein metabolizmasında anahtar enzimdir. MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimlerinin özellikle homosistein metabolizmasını etkileyerek NASH etiyopatogenezinde rol alabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konuyla ilgili literatürde yer alan klinik çalışmalar nitelik ve sayı bakımından yetersizdir.

NASH ile MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri arasındaki ilişkiyi araştırdığımız çalışmamıza karaciğer biyopsisi ile tanı almış 40 NASH hastası ve 59 sağlıklı birey alındı. NASH hastaları ve sağlıklı bireylerde MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri incelendi. Ayrıca bu polimorfizimlerle, homosistein, lipit profili, vitamin B12, folat düzeyleri, vücut kitle indeksi (VKİ), HOMA-IR (Homeostasis model assessment-insulin resistance) ve karaciğer histopatolojilerinin ilişkisi araştırıldı. NASH hastaları ile sağlıklı bireyler arasında MTHFR A1298C polimorfizimlerinin dağılımı bakımından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Bununla birlikte, MTHFR C677T polimorfizminin TT genotipi NASH' li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede sık bulundu ($OR=11,250(2,154-58,744)p=0,004$). Ayrıca obez olmayan NASH' li hastalarda MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipi, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha sık saptandı ($p=0,006$).

Bu çalışmada, NASH' li hastalarımızda MTHFR C677T polimorfizminin TT genotipinin anlamlı derecede yüksek sıklıkta bulunması, bu polimorfizimin NASH etiyopatogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca obezite ve diğer metabolik sendrom komponentleri bulunmayan NASH hastalarında da MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipinin sık bulunmuştur. Bu bulgu, NASH için iyi bilinen risk faktörlerine sahip olmayan olgularda, genetik faktörlerin önemini göstermektedir

Anahtar kelimeler: Non alkolik steatohepatit, MTHFR gen polimorfizmi

II- ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the most common cause of criptogenic liver cirrhosis¹. Determination of genetic factors related to NASH, can enlighten etiopatogenesis of disease thus can contribute to prevention of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC).

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is the key enzyme in homocysteine metabolism. It is thought that MTHFR A1298C and C677T gene polymorphisms contribute to etiopathogenesis of NASH because of their effects in homocysteine metabolism. But there is not satisfactory qualified and adequate number of clinical trials.

In this study we search the relation between NASH and MTHFR A1298C and C677T gene polymorphisms. We include 40 NASH patients that is diagnosed by help of liver biopsy and 59 healty volunteers. We search MTHFR A1298C and C677T gene polymorphisms and compare NASH patients and healty volunteers. Also we search the relation of these polymorphisms and homocysteine, lipid profiles, vitamin B12, folate levels, body mass index (BMI), HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance) and liver histopatologies. There was no statistically significant difference between diversion of MTHFR A1298C polymorphisms of NASH patients and healty volunteers ($p>0,05$). However the proportion of TT genotype of MTHFR C677T polymorphism of NASH patients is significantly higher than that of healty volunteers (OR=11,250(2,154-58,744) $p=0,004$). Also the proportion of TT genotype of MTHFR C677T polymorphism of non-obese NASH patients is significantly higher than that of healty volunteers ($p=0,006$).

In this study TT genotype of MTHFR C677T polymorphism is more often in NASH patients than that of healty volunteers. Thus we think that this mutation can affect homocysteine metabolism and contribute to NASH etiopatogenesis. In addition the proportion of TT genotype of MTHFR C677T polymorphism of NASH patients that lack of components of metabolic syndrom, is found to be high. This finding reveals that genetic factors are more important in patients without well known risk factors of NASH.

Key words: Nonalcoholic steatohepatitis, MTHFR gene polymorphisms

III-GİRİŞ VE AMAÇ

Alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, NAFLD), hafif yağlı karaciğerden, steatohepatit (NASH), hepatik fibroz, siroz ve HCC' ye kadar uzanan geniş bir yelpazeyi kapsar^{2, 3, 4}. NAFLD gelişmiş ülkelerde görülen en yaygın kronik karaciğer hastalığıdır.

Normalde hepatositlerde trigliserid içeriği %5' ten azdır. Alkol alımı olmayanlarda (kadınlarda 10 gr/gün ve erkeklerde 20 gr/gün' ün altında alan) hepatositlerin trigliserid içeriğinin %10' dan fazla olması durumunda karaciğerde yağlanmadan bahsedilir.

NAFLD, iki ayrı hastalığı bir arada ifade etmek için kullanılır: Birincisi inflamasyon ve fibrozisin eşlik etmediği sadece basit yağlı karaciğer, diğeri ise steatoz ile birlikte nekroinflamatuvar aktivitenin olduğu NASH' tir. NASH prevalansı genel popülasyonda %2-3, obezlerde %20-30 olarak bildirilmiştir. Morbid obezlerde NASH sıklığı %50' ye ulaşabilir^{5, 6, 7}.

NAFLD' dan, NASH ve siroza kadar geçen süreç aynı şekilde seyretmemektedir. NAFLD tanısı konduğu anda bile birçok hastada yerleşmiş kronik karaciğer hasarı ve hatta siroz gözlenebilmektedir. Bu hastalığın bazı bireylerde asemptomatik ve hızlı ilerleme gösterdiğini düşündürmektedir. Ancak NAFLD olan bireylerde NASH gelişiminin erken dönemde tanınması ve tedavisi siroz ve komplikasyonlarının oluşmasını engelleyebilir veya geciktirebilir.

Basit yağlanmada bir ile iki dekadın üzerinde bir sürede siroz gelişme riski %4' ün altındadır. NASH' de ise beş yıl içinde %5-8 hastada siroz gelişebilir ve tüm hastalarda siroza ilerleme oranı %20' ye ulaşabilir⁷. Son yıllarda NASH' in HCC gelişimine neden olduğu, ayrıca siroz olmaksızın NASH' de HCC gelişebileceği bildirilmiştir.

İsveç' de yapılan NAFLD' lıların benzer özellikli genel populasyon ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, NASH' lilerde sağ kalım oranının anlamlı düzeyde düşük olduğu ve bu hastaların sıklıkla kardiyovasküler ve karaciğer ile ilişkili nedenlerden öldüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada NAFLD' lı hastaların çoğunda uzun dönemde diyabet veya bozulmuş glikoz toleransı gelişebileceği gösterilmiştir. Karaciğer fibrozisine ilerlemenin insülin direnci ve anlamlı kilo artışı (5 kg) ile belirgin olarak ilişkili olduğu bulunmuştur⁸. İsveç' de yapılmış 28

yıl takip süreli başka bir çalışmada ise, NAFLD' lıların benzer yaş ve cinsiyetli toplumla karşılaştırıldığında mortalite oranının hafif derecede yüksek, NASH' lilerde ise mortalitenin anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada yine karaciğer hastalığına bağlı ölümlerin NAFLD' lılarda üçüncü en yaygın ölüm nedeni olduğu gösterilmiştir⁹.

NAFLD' nın seyrini öngörmeye nekroinflamasyon ve fibrozis derecesinin bilinmesi önemlidir. Hepatosellüler steatoz, nekroinflamasyon ve fibrozisi değerlendirmede altın standart karaciğer biyopsisidir. Karaciğer biyopsisi invazif bir yöntemdir, bazı riskleri ve komplikasyonları vardır. Karaciğer biyopsisi karaciğerin 1/50.000' ini gösterir ve belirgin yorum hatalarına neden olabilir. Karaciğer inflamasyonu ve fibrozisini değerlendirmek için bazı noninvazif testler (Biyokimyasal testler; AST/ALT oranı, hiperbilirubinemi, hipoalbuminemi, görüntüleme; ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR), biyolojik belirteçler; CRP, fibrotest, sitokin ve adipokinler, genetik testler; PNLPA3, APOC3 gibi) geliştirilmiştir^{10, 11, 12}.

Avrupa Karaciğer Araştırmaları Derneği (The European Association for the Study of the Liver, EASL) ileri fibrozis şüphesi olanlarda biyopsi yapmayı önermektedir. Yaşam tarzı değişikliğini uygulayıp kilo verme ve altta yatan insülin direncini iyileştirme potansiyeli olan, alanin aminotransferaz (ALT) ve noninvazif belirteçlerde düzelme olan hastalarda ise biyopsiden kaçınmayı önermektedir. Diğer otoriteler NASH için güçlü noninvazif önceden belirleyicilerin bulunmaması durumunda ileri yaş, diyabet, ileri obesite ve metabolik sendrom gibi ileri fibrozis risk faktörleri olan hastalarda biyopsi yapmanın mantıklı olduğunu ileri sürmektedirler¹¹.

NASH' in en önemli nedenleri; obezite, tip 2 diyabetes mellitus (DM) ve hiperlipidemidir. Etnisite, metabolik hastalıklar ve cerrahi girişimler de NASH' den sorumlu olabilir. Akut açlık, hızlı kilo kaybı, hipotiroidizm, bakteriyel aşırı çoğalma, divertikülozis, parenteral nutrisyon, pestisit, çeşitli petrokimyasal maddeler ve amiodaron, kortikosteroid, metotreksat gibi ilaçların NASH ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir¹³. Günümüzde dünya genelinde epidemik bir sorun olan obezite NASH' in bilinen en önemli nedenidir¹³.

NAFLD hastalarının çoğunda metabolik sendrom bulunmaktadır. Metabolik sendrom; visseral obesite (bel çevresi erkeklerde >94cm, kadınlarda >80 cm), hipertansiyon (>130/85 mmHg), hipertrigliseridemi (>150 md/dl),

düşük HDL (<40 mg/dl erkeklerde, <50 mg/dl kadınlarda) ve hiperglisemi (>100 mg/dl) birlikteliği olarak tanımlanmaktadır. Metabolik sendrom tanı kriterlerinden biri NAFLD' lı hastaların hemen hepsinde mevcut iken; metabolik sendrom tanısı alanlarda (en az 3 veya daha fazla kriter pozitifliğinde) NASH daha sık gözlenmektedir. Obez, 45 yaş üzerinde, diyabetik ve AST/ALT oranı 1' den fazla olanlarda da karaciğerde fibrozis daha sık gözlenir.

Hiperhomosisteinemi, metabolik sendrom ve NASH ile ilişkisi gösterilmiş önemli bir metabolik hastalıktır. Hiperhomosisteinemi, hem karaciğer yağlanmasını artırarak hem de lipit peroksidasyonunu (LP) uyarıp bazı reaktif oksijen türlerini ortaya çıkararak oto oksidasyon ile NASH' e yol açabilir^{1, 14}. MTHFR enzimi, homosistein metabolizmasında, 5,10-metilentetrahidrofolatı (MTH), 5-MTH' a dönüştüren anahtar enzimdir. MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizimi gibi sık görülen mutasyonlar, plazma homosistein düzeyinde artışa yol açar. MTHFR gen mutasyonlarıyla NASH arasında teorik olarak artmış bir ilişki olması gerekir.

Literatürde, MTHFR gen polimorfizimleriyle NASH arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma vardır¹⁵. Bu çalışmada NASH' li hastalarda, sık görülen MTHFR gen polimorfizimleri ve hiperhomosisteineminin klinik öneminin araştırılması amaçlanmıştır.

IV-GENEL BİLGİLER

A-Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı: NAFLD, alkol dışı nedenlere bağlı olarak meydana gelen karaciğer yağlanması olarak tanımlanabilir. NAFLD, karaciğere zarar verecek miktarda alkol tüketimi olmayan bireylerde (kadınlarda 10 gr/gün ve erkeklerde 20 gr/gün' ün altında alan) histolojik olarak makroveziküler yağlanmanın baskın olduğu geniş bir tabloyu içerir^{15, 16}.

NAFLD; fibrozis ve sirozla ilişkili olabilen veya olmayabilen, eşlik eden inflamasyon veya fibrozis olmadan hepatositlerde yağ birikiminden (basit karaciğer yağlanması), nekroinflamatuvar bir bileşeni olan karaciğer yağlanmasına kadar (steatohepatit) değişen bir histolojik yelpazeyi içerir^{2, 15}.

Karaciğer yağlanması, yağların karaciğer ağırlığının %5' ten fazlasını oluşturması veya histolojik incelemede hepatositlerin %5' inden daha fazlasında yağ vakuollerinin görülmesi olarak tanımlanır. Hafif steatoz, hepatositlerin %30' undan azını içerir, ciddi steatoz ise hepatositlerin %60' ından fazlasını içerir¹⁷. Basit karaciğer yağlanması hastalığın şiddetli bir formu olan, NASH' e ilerleyebilir.

NAFLD, insülin direnci, visseral obezite, dislipidemi, diyabet, hipertansiyon gibi risk faktörlerine sahip olan ve sık görülen metabolik sendromun bir hepatik belirtisi olarak kabul edilir^{18, 19}. İnsülin direnci^{20, 21} ve sitokin üretimi^{22, 23}, karaciğer yağlanması ve belki de steatohepatite yol açan anahtar mekanizmalardır. NAFLD genetik bozukluklar ve insülin direnci ile de ilişkidir²⁴. Son çalışmalarda kadın ve erkeklerin eşit olarak etkilendiği gösterilmiştir¹³. Diyabet, dislipidemi ve özellikle obezitesi olan hastalarda belirgin olarak artmaktadır^{25, 26}. NAFLD' a yakalanma olasılığı VKİ ile doğru orantılı olarak önemli ölçüde artar²⁷.

Epidemiyolojik araştırmalarda NAFLD dünya çapında yükselen bir sağlık problemi olarak Batı ülkelerinde tahmini %20-40 prevalans ile tespit edilmektedir^{28, 29, 30}. Genel populasyon için ultrasonografi (US) veya bilgisayarlı tomografi (BT) ile yapılan çalışmalarda NAFLD' in sıklığı %15 ile %39 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir^{31, 32}. Post mortem karaciğer biyopsisi ile ilgili iki ayrı çalışmada ise NAFLD ve NASH sıklıkları sırası ile %24'e %1,2 ve %16' ya %1,2 olarak bildirilmiştir^{33, 34}. VKİ, 30 kg/m² ve üzerinde olanlarda NAFLD sıklığı

%60-95, tip 2 diyabetiklerde %28-55 ve hiperlipidemisi olanlarda %20-92 olarak bildirilmiştir^{2, 35, 36}.

B- Non Alkolik Steatohepatit: NASH; karaciğerde yağlanma ile birlikte alkolik karaciğer hastalığında olduğu gibi hepatositlerde balonlaşma, iltihabi infiltrasyon, Mallory cisimcikleri, megamitokondria ve fibrozis gibi bulguların görüldüğü bir hastalıktır.

İlk olarak 1980' de Ludwig ve arkadaşları tarafından alkol kullanımı olmayan kişilerin karaciğer biyopsilerinde karaciğerde yağlanmaya bağlı inflamasyon saptanmış ve NASH olarak isimlendirilmiştir. Ludwig ve arkadaşları bu çalışmalarında NASH' i; "karaciğer biyopsisinde belirgin yağlanma, lobuler hepatit, fokal nekroz, miks tipte iltihabi infiltrasyon bulguları, çoğu hastada Mallory cisimcikleri ve fibrozis bulunan, sıklıkla orta yaşlı ve obez, tip 2 diyabetlilerde ve kadınlarda görülen bir durum" şeklinde ifade etmişlerdir³⁶.

NAFLD' lı hastaların %10-%20' sinin NASH olduğu bilinmektedir. İnflamasyon ve/veya fibrosis hastalığın uzun dönem prognozunun belirlenmesine yardımcı olurken, steatoz tek başına prognozu belirlemek için yeterli değildir^{8, 37, 38, 39}. NASH' li hastalarda da en sık tip 2 DM, obezite ve hiperlipidemi durumlarında görülür.

NASH için bilinen risk faktörlerinin çoğu, NAFLD' in risk faktörlerine benzer. Obezite, tip 2 DM ve hiperlipidemi NASH' lilerde de en sık rastlanan risk faktörleridir. Diğer risk faktörleri arasında, total parenteral nütrisyon (TPN), ileal by-pass gibi intestinal cerrahiler, amiodaron ve metotreksat gibi ilaçlar, pestisit ve petrokimyasal maddeler sayılabilir^{13, 16, 40}.

NASH ile ilgili risk faktörlerinin hiçbirini taşımayan NASH tanılı hastalara da sıkça rastlanmaktadır. Angulo ve arkadaşlarının çalışmasında 144 adet biyopsi ile gösterilmiş NASH vakasının %29' unda obezite, diyabet veya dislipidemi gibi metabolik sendrom komponentlerinden hiçbir risk faktörü saptanmamıştır⁴¹.

Son yıllarda NAFLD' lılarda apolipoprotein C3 (APOC3) ve patatin-benzeri fosfolipaz 3 (PNPLA3) olarak isimlendirilen yeni gen polimorfizimleri tanımlanmış ve bu sayede NAFLD patogenezinin genetiğinin önemi ortaya konmuştur^{4, 7, 42}. NAFLD' lı bireylerin çocuklarında NAFLD gelişme riskinin yüksek olması, bazı ailelerde yığılma şeklinde NAFLD görülmesi ve "Hispanic"

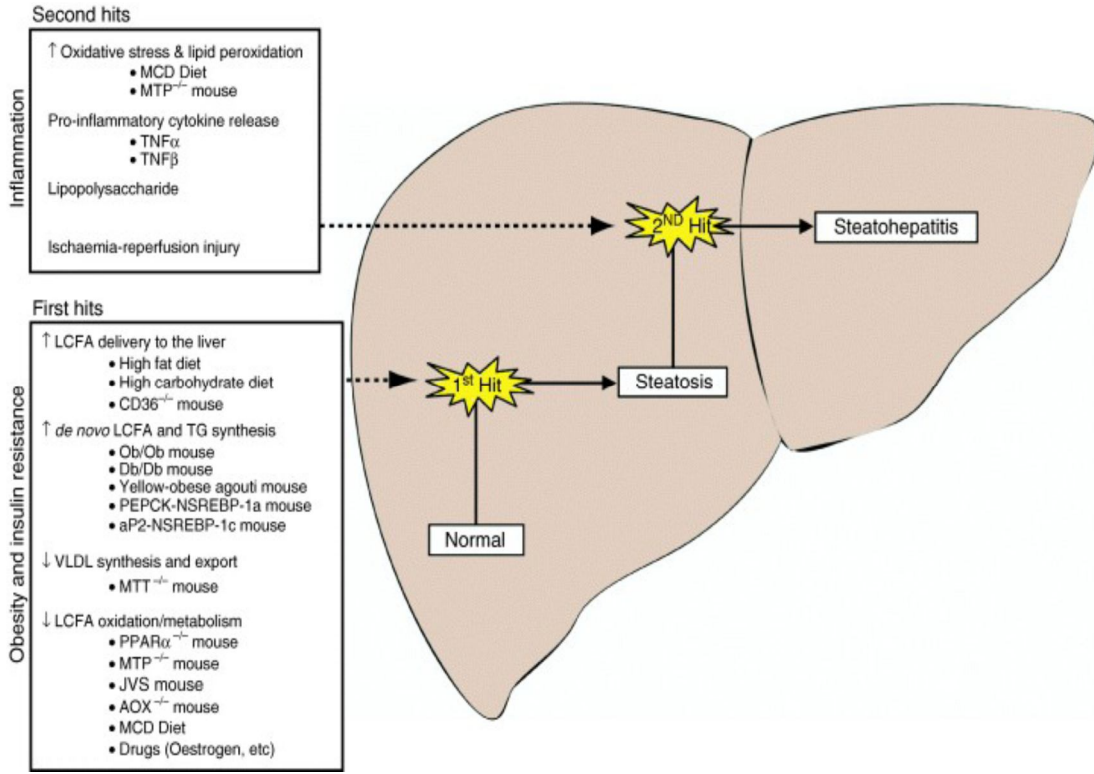
Amerikalılar' da Afrika kökenli Amerikalılar' a göre daha yüksek oranda NAFLD bulunduğunun gösterilmesi bu hastalığın patogenezinde genetiğin önemli rol oynadığını düşündürmüştür. Bunlardan yola çıkılarak yapılan araştırmalarda PNPLA3' de bulunan lipid açıl hidrolazlarla homolog olup fonksiyonu bilinmeyen bir proteini kodlayan bir allelin artmış hepatik yağ ve inflamasyon ile güçlü bir birliktelik gösterdiği, ayrıca APOC3 gen varyantlarının da NAFLD ve insülin direnci ile birliktelik gösterdiği bulunmuştur⁴².

C-Patogenez: NAFLD ve NASH patogenezinde en çok bilinen hipotez çift darbe hipotezidir. Çift darbe hipotezi (two hits) olarak bilinen ve yağlama ile neticelenen hastalık sürecinde belirleyici olan insülin direncidir(birinci darbe)⁴³. İnflamasyon ve fibrozise neden olan ikinci darbeden ise oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler ve adiponektin, leptin gibi hormonlar sorumludur^{44, 45}. İkinci darbeden sorumlu faktörlerin normal bir karaciğer üzerindeki olumsuz etkisi adaptasyon mekanizmaları ile giderilebilirken, yağlanmış bir karaciğerde bu mümkün olmaz ve hastalığın ilerleyici formlarına dönüşecek süreç başlamış olur.

Birinci darbede, insülin direnci karaciğerde yağlanmaya neden olur. Yağlanma karaciğer hücrelerini zararlı etkenlere karşı duyarlı kılar. Eğer ortamda zararlı etkenler (reaktif oksijen ürünleri, sitokinler vb.) mevcut ise ikinci darbe gerçekleşir. Sonuç olarak; hepatosit hasarı, inflamasyon ve sonunda da karaciğer fibrozisi, siroz ve HCC' ye gidebilecek bir süreç işlemeye başlar^{46, 47}.

Trigliseridlerin en önemli kaynakları yağ dokuda depolanan yağ asitleri ve karaciğerde de novo lipogenezdir⁴⁸. Serbest yağ asitlerinin (SYA), karaciğere artmış akımı hepatik glukoneogenezi ve trigliserid sentezini stimüle eder, insülinin karaciğerden glikoz çıkışını baskılamadaki yeteneğini bozar ve insülinin metabolik etkilerini değiştirir⁴⁹. Obezite, artmış visseral beyaz yağ dokusu ve periferik insülin direnci kombinasyonu; glukoneogenez artışı, visseral yağ dokudan serbest yağ asidi salınması, periferik lipoliz, serbest yağ asidinin karaciğerden artmış tutulumu ve hepatoselüler trigliserid sentezi ve birikimi ile ilişkilidir^{23, 50, 51, 52}. Bu şekilde ortaya çıkan kısır döngü insülin direnci ve karaciğer yağlanmasını artırarak, NASH ve karaciğer sirozu gelişimine uygun bir ortam hazırlar.

Şekil 1: NAFLD' da çift darbe hipotezi^{25, 47, 53}

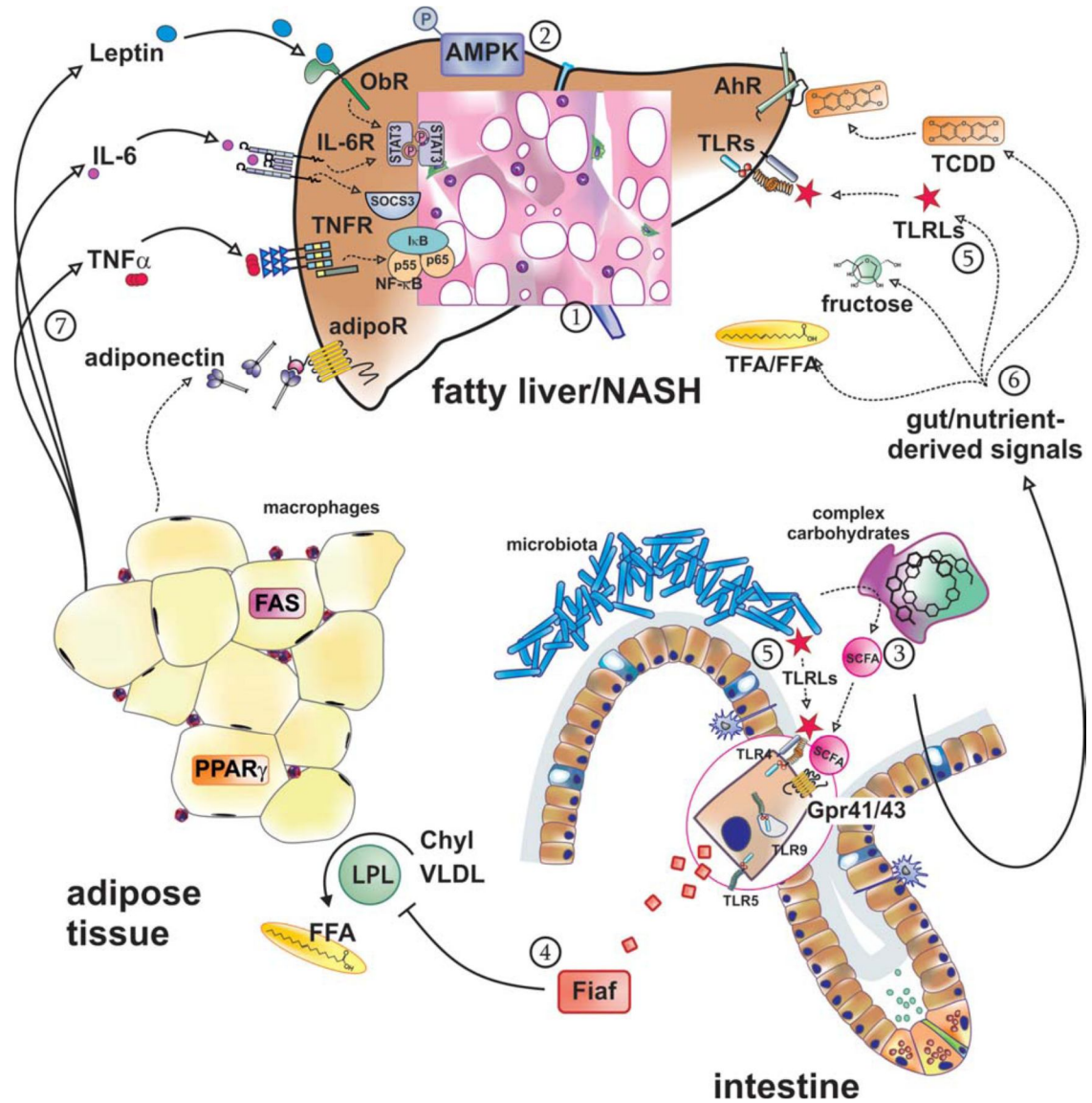


Çoklu paralel darbe modeli: Günümüzde NAFLD' in patogenezinde "çoklu paralel darbe" (multiple parallel hits) hipotezinin daha geçerli olduğu düşünülmektedir. Çoğu durumda, yağlı karaciğer inflamasyona açık kalır, yağlı karaciğere sahip olan hastaların %10-20' sinde inflamasyon ve fibrozis gelişir⁴. NASH yağlanmayı takip eden bir inflamasyon hastalığıdır veya antilipotoksik koruma yetersizliği sonucu gelişebilir. Her iki durumda da, bağırsak ve/veya yağ dokusundan gelişmiş olan karaciğer inflamasyonunu teşvik edebilen pek çok paralel darbe olabilir. Endoplazmik retikulum stresi ve ilgili sinyalizasyon ağları, (adipo)sitokinler ve doğal bağışıklık NASH patogenezinde önemli kontrol mekanizmaları olarak ortaya çıkmaktadır⁴.

Visseral yağ dokusu ve insülin direnci artışı ile birlikte artan serbest yağ asidi salınımı, karaciğer yağlanmasının başlangıcı ve ilerlemesinde anahtar rol oynamaktadır. Yağ dokusundan ve/veya sindirim kanalından kaynaklanan ürünler çoklu paralel darbe ile karaciğer inflamasyonunu uyarır. Karaciğerde bunun ardından gelişen inflamasyondan oksidatif stres ve LP' nun baskınlaşması, antioksidan savunmanın azalması, erken mitokondriyal

disfonksiyon gelişmesi, demir birikmesi, yağ dokusu kökenli adipokinlerin dengesinin bozulması ve kronik proinflatuvar bir tablonun oluşması sorumludur⁴.

Şekil 2: Çoklu paralel darbe modeli⁴: 1-Lipotoksiste 2- Bağırsak kaynaklı sinyaller 3-Polisakkaritlerin hatalı ürünleri 4- Açlık kaynaklı adiposit faktörü (Fiaf) 5- Toll like reseptörler (TLR) 6- Trans yağ asitleri (TFAS) 7-Adipoz doku kaynaklı sinyaller



D- Non Alkolik Steatohepatit' in Klinik Bulguları: NASH hastalarının çoğu asemptomatiktir. Hastalarda tesadüfen hepatomegali veya karaciğer fonksiyon test bozuklukları görülebilir. Hastaların büyük bir kısmında yorgunluk,

kırgınlık ve sağ üst kadranda hassasiyet veya dolgunluk gibi nonspesifik semptomlar mevcuttur⁵⁴. Tek fizik muayene bulgusu olabilen hepatomegali, hastaların yaklaşık % 25' inde saptanır⁵⁵. NASH' lilerin çoğunda sıklıkla saptanan tek anormal laboratuvar bulgusu alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) veya her ikisinde birden hafif veya orta derecede artıştır. Bazı hastalarda karaciğer enzimleri normaldir⁵⁶. AST/ALT oranı genellikle 1' in altında olup, karaciğerde fibrozisinin ilerlemesi ve siroz gelişimi ile oran 1' in üzerine çıkar^{41, 57}. Hastaların yarısına yakınında alkalin fosfataz (ALP) ve/veya γ-glutamilttransferaz (GGT) genellikle 2 kattan daha az olmak üzere, bir miktar artmış olarak bulunur⁵⁸.

Ultrasonografide karaciğerde yağ birikimi, böbrek ekolarıyla karşılaştırılarak diffüz eko artışı olarak saptanır. Karaciğerdeki yağlanmayı saptamada US' nin duyarlılığı % 89 ve özgüllüğü % 93' tür^{59, 60}. Karaciğerde yağlanma bilgisayarlı tomografide (BT) karaciğer dansitesinde azalma şeklinde saptanır⁶¹. Manyetik rezonans (MR) görüntüleme karaciğerdeki fokal yağlanmaları metastazlardan ayırmada faydalıdır.

NASH; asemptomatik transaminaz yüksekliği, başka bir nedene bağlanamayan hepatomegali ve radyolojik olarak karaciğer yağlanma bulgusu olan olgularda düşünülür. Bu bulgulara sahip olan hastalarda viral, metabolik, ilaç, otoimmün gibi diğer nedenlerin ve ciddi düzeyde alkol kullanımının olmadığına gösterilmesi ile NASH ön tanısı konulabilir⁶². Ancak hastalığın şiddetinin ortaya konması, prognozun belirlenmesi ve ayırıcı tanıların yapılabilmesi açısından karaciğer biyopsisi ile kesin verilere ulaşılır.

Özellikle yüksek fibrozis riski taşıyan hastalara mutlaka biyopsi önerilmektedir. Yüksek fibrozis riski taşıyan kişiler ise; 45 yaş üzeri, obez, tip 2 DM' u olanlar, AST/ALT oranı 1' in üzerinde olanlar ve takiplerde ALT artışı iki kattan fazla olanlar olarak bildirilmiştir¹⁶. Karaciğer fonksiyon testleri yüksek olan obez veya diyabetik hastalara karaciğer biyopsisi öncesi metabolik anormalliklerin düzeltilmesi, egzersiz, yavaş kilo kaybı ile enzimlerin normale dönmesi için tedavi uygulanmalıdır. Üç ayın üzerinde bir zaman periyodunda enzimler normale dönebilir. Karaciğer enzimleri sürekli yüksek olan hastalara mutlaka biyopsi yapılmalıdır⁶³.

NAFLD tanısı için etiyoloji kadar hastalığın evre ve sınıfını içeren histoloji de belirtilmelidir. Cleveland grubu NAFLD' ı basitçe 4 histolojik tipe ayırmıştır^{25, 53, 64}.

- Tip I: Yağlı karaciğer,
- Tip II: Yağ + lobuler inflamasyon,
- Tip III: Yağ + balonlaşma dejenerasyonu,
- Tip IV: Yağ + balonlaşma dejenerasyonu ve Mallory cisimciği veya fibrozis.

NASH' in histopatolojik olarak değerlendirilmesinde Brunt ve arkadaşları tarafından önerilen sistem en yaygın kullanılandır⁵³. (Tablo 1).

Tablo 1: NASH' te histolojik grade ve stage⁵³

A. Grade	Steatozis	Hepatositlerde balonlaşma	İnflamasyonun derecesi
1	<% 33	Minimal	Hafif
2	%34 - %66	Mevcut	İlımlı (orta)
3	>%66	Belirgin	Portal ılımlı, lobuler ılımlı
B. Stage	Fibrozis		
1	Perisinüzoidal		
2	Perisinüzoidal ve portal/peroportal		
3	Köprüleşen septalar		
4	Yaygın köprüleşme fibrozisi, siroz		

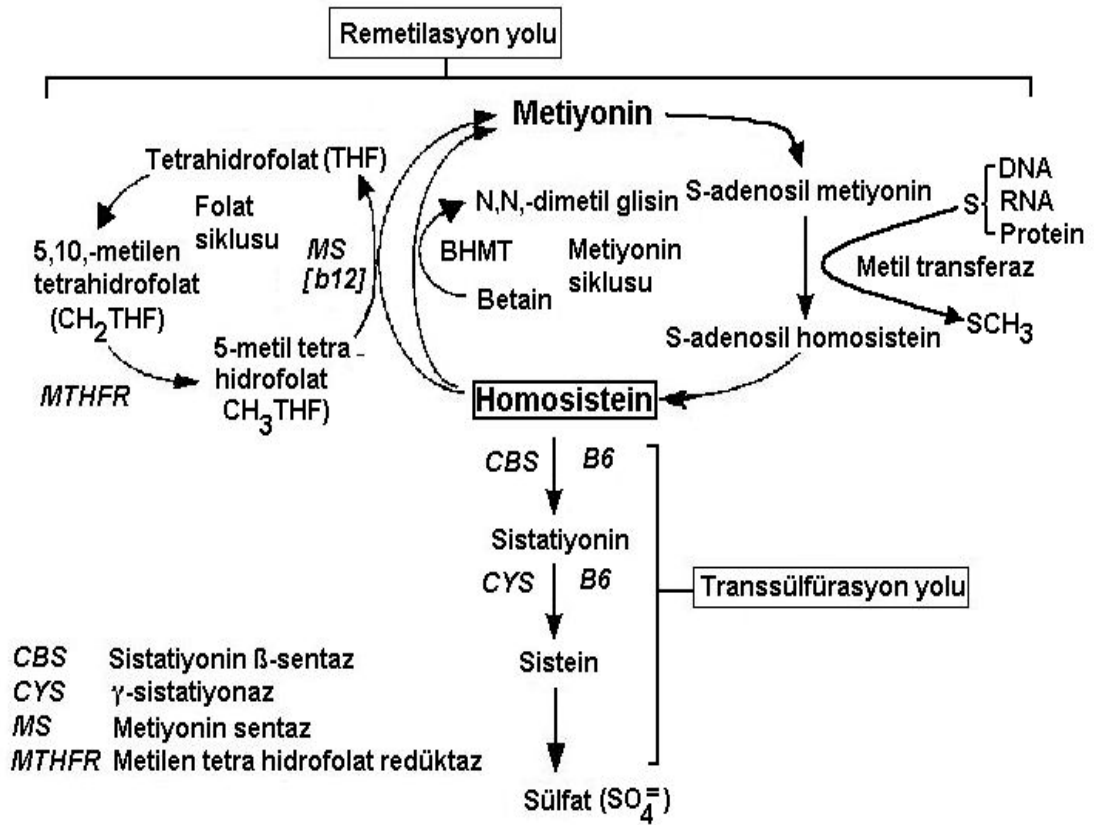
Karaciğer biyopsi bulguları yağlanma, miks iltihabi hücre infiltrasyonu, hepatositlerde balonlaşma ve nekroz, glikojen çekirdek, Mallory cisimcikleri ve fibrozisdir. Steatoz sıklıkla büyük damlacıklar veya makroveziküler yağlanma şeklinde olup Mallory cisimcikleri ve fibrozis gibi genellikle 3 no' lu asinar zona yerleşmiştir^{65, 66}. Fibrozis saptanması, ilerlemiş ve ciddi karaciğer hasarı varlığını gösterir ve teşhis sırasında NAFLD hastalarında %67 oranında bulunur. NAFLD sonucu gelişen fibrozisin karakteristik özellikleri vardır. Kollajen ilk önce santral ven çevresinde perivenüler boşluğa ve perisinüzoidal bölgeye yerleşir. NAFLD' da progresif hasar santral-portal ve porta-portal septa

oluşması ve sirozla sonuçlanır. Ciddi hepatik fibroz hastaların %25' inde, yerleşmiş sirozda %14' ünde saptanmaktadır. Sirozlu hastalarda steatoz ve nekroiltihabi aktiviteye rastlanmayabilir. NASH teşhisinde gerekli minimal bulguların ne olduğu konusunda tam bir uzlaşma henüz mevcut olmamakla birlikte yağlanma, miks mononükleer hücre infiltrasyonu, nükleer ve/veya polimorf hepatositlerde balonlaşma ve fokal nekroz alanlarının birlikte bulunması NASH' in histolojik tanısı için gereklidir^{65, 66}.

E-Hiperhomosisteinemi ve MTHFR Gen Polimorfizimleri:

Hiperhomosisteineminin hepatosteatoz ve karaciğer fibrozisiyle ilişkili olduğu bilinmektedir^{67, 68}. Homosistein, metiyonin metabolizmasında rol oynayan kükürt içeren esansiyel olmayan bir aminoasittir⁶⁹.

Şekil 3: Homosistein metabolizması⁶⁷



Karaciğer üzerinde olumsuz etkileri bilinen hiperhomosisteinemi pek çok çevresel ve genetik faktörle ilişkilendirilmiştir. Hiperhomosisteinemiden sorumlu başlıca çevresel ve genetik faktörler⁷⁰:

Çevresel faktörler:

- Folik asit, Vitamin B12, Vitamin B6, kolin, serin alım yetersizliği
- Aşırı metiyonin alımı
- Böbrek yetmezliği, hipotiroidi, hiperproliferatif bozukluklar
- Yaşlılık
- Erkek cinsiyet
- Menapoz
- Sigara, alkol, kahve

Genetik faktörler:

- Ağır hiperhomosisteinemi/homosisteinüri
 - Sistatyonin β -sentaz eksikliği
 - MTHFR eksikliği
 - Metiyonin sentaz eksikliği
- Hafif-orta hiperhomosisteinemi
 - MTHFR geni C677T mutasyonu

Üç enzim homosisteini bir substrat olarak kullanır: Metiyonin sentaz (MS) ve homosisteini metionine geri çeviren betain-homosistein metiltransferaz (BHMT) ve transsülfürasyon yolunun birinci enzimi sistatyonin β -sentaz (CBS)⁶⁹. Homosisteinin kullanımı metabolik koşullara bağlıdır: Metiyonin göreceli olarak eksik olduğunda homosistein remetilasyonu tercih edilir. Metiyonin fazlalığı durumunda ise, transsülfürasyon yolu hakimdir^{71, 69}.

S-adenozilmetiyonin (Ado-Met), metiyoninin ilk metabolitidir. Bu metabolik yollar boyunca homosistein akışını düzenler. Ado-Met düzeylerinde artış, CBS' yi aktive eder ve MS ve BHMT aktivitesini inhibe eder^{69, 72}. Homosisteinin remetilasyonu veya transsülfürasyonunun eksikliği hiperhomosisteinemiye yol açar. Metiyonin sentaz, sistatyonin β -sentaz veya MTHFR enzimlerindeki genetik defektlerin bir sonucu olarak hiperhomosisteinemi gelişebilir^{71, 73}. B6 vitamini, folik asit, vitamin B12, kolin ve

serinin diyetle alımındaki yetersizlikler, böbrek fonksiyon bozukluğu ile birlikte hiperhomosisteinemiye yol açabilir^{71, 74}. Transmetilleme için tüm vücut kapasitesinin yaklaşık %85' inin bulunduğu, diyetle alınan metiyoninin çoğunluğunun karaciğerde metabolize olduğu gerçeği göz önüne alındığında, karaciğer homosistein sentez ve metabolizmasında merkezi bir rol oynar^{69, 72}. Garcia-Tevijano ve arkadaşları, karaciğer fibrozisi gelişiminde hiperhomosisteineminin rolü olduğunu saptamışlardır⁷⁵.

Homosistein metabolizma enzimleri eksik olan transgenik farelerde steatohepatit ve ciddi karaciğer yağlanması gösterilmiştir⁷⁶. Kronik hepatit C' li hastalarda, hiperhomosisteineminin yağlanma ve hatta fibrozis için bağımsız bir risk faktörü olduğu bilinmektedir⁷⁷. Diğer taraftan, etiyojisi ne olursa olsun hiperhomosisteinemi ve insülin direnci arasında güçlü bir ilişki vardır^{78, 79, 80}. Son zamanlarda, hiperhomosisteineminin endoplazmik retikulum (ER) stres mekanizmalarının dahil olduğu bir mekanizma yoluyla steatohepatite yol açtığı gösterilmiştir⁸¹. Homosistein indüklediği ER stres sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 (SREBP-1) aktivasyonu yoluyla lipid biyosentezini ve lipidlerin karaciğere alımını artırır⁸². Ayrıca homosistein SREBP-1' in aşırı ekspresyonuna neden olarak da karaciğer yağlanması yapabilir⁸³. Yağlanmış karaciğerde, nükleer faktör kappa B gibi proinflamatuvar sitokinler NASH gelişimine neden olur^{84, 85}. Homosistein ayrıca, doku inhibitörü metalloproteinazları (TIMP) -1' i uyararak fibrozis gelişim sürecini başlatabilir⁸⁶. Sonuç olarak, hiperhomosisteinemi, yağlı karaciğer, inflamasyon ve/veya fibrozise yol açabilir.

Plazma homosistein düzeyi standardize edilmemiş olmakla birlikte, genellikle 5-15 $\mu\text{mol/l}$ düzeyi normal olarak kabul edilmekte ve 16 $\mu\text{mol/l}$ 'nin üzerindeki değerler hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir⁸⁷. Yaşa bağlı olarak homosistein plazma seviyesi hafif artma eğilimi gösterir. MTHFR C677T homozigot mutasyonlu hastaların plazma homosistein seviyeleri genelde 20-40 $\mu\text{mol/L}$ arasındadır⁸⁸.

MTHFR Gen Polimorfizimleri: Hiperhomosisteineminin önemli bir nedeni MTHFR enzim eksikliğidir⁸⁹. MTHFR homosisteinin metionine metilasyonunun hız kısıtlayıcı basamağını katalizleyen folat bağımlı 656 aminoasitten oluşan bir enzimdir^{90, 91, 92}. MTHFR geni 1. Kromozomda bulunur

(1p36.3)⁹³. Enzim sitoplazmik bir protein olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır⁹⁴. İnsanlarda yapılan Western analizler sonucu 2 izoformunun olduğu açıklanmıştır^{92, 95}. Bu izoformlar dokulara özgü olup, 70 kDa' luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa' luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan pürifiye edilmiştir^{92, 95}.

MTHFR genindeki fonksiyonel polimorfizimler azalmış enzim aktivitesinin yaygın bir nedenidir. Genel populasyonun %15-20' si, MTHFR A1298C veya C677T varyantlarından biri açısından heterozigottur⁹⁶. MTHFR geninin en iyi bilinen A1298C ve C677T polimorfizimlerinin total plazma homosistein seviyesini artırıcı etkileri mevcuttur. MTHFR polimorfizimlerinin sık rastlanan polimorfizimler olduğu bilinmektedir. Bu polimorfizimin prevalansı etnik gruplara göre değişkenlik gösterir. Beyaz ırkın % 60' ı MTHFR allelini taşır ve bunun %5-15' i homozigottur⁹⁷. MTHFR C677T polimorfiziminin TT genotipinin genel popülasyonda %12-%15 sıklıkta olduğu, MTHFR A1298C CC genotipinin % 1-12 sıklıkta olduğu bildirilmiştir. Türk toplumunda MTHFR C677T CT genotipinin sıklığı %47,4 iken MTHFR C677T TT genotipi sıklığı %9,6 olarak saptanmıştır⁹⁸. Bu alleli heterozigot (TT) formda taşıyan bireylerde plazma homosistein düzeyi intermediyer aralıklardadır⁹⁹. Emiroğulları ve arkadaşları MTHFR A1298C CC genotipinin Türkiye' deki sıklığını %6 olarak bildirmişlerdir⁹³.

Daha önceki çalışmalarda, MTHFR A1298C ve C677T polimorfizimlerinin, hiperhomosisteineminin, düşük vitamin B12 ve düşük plazma folat düzeylerinin^{100, 101}; nörovasküler hastalıklar(iskemik veya hemorajik stroke)^{102, 103}, psikiyatrik bozukluklar^{104, 105}, nörodejeneratif hastalıklar¹⁰⁶ ve meme kanseriyle¹⁰⁷ ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

Adinolfi LE ve arkadaşlarının bir çalışmasında MTHFR C677T polimorfizimi TT genotipinin neden olduğu hiperhomosisteineminin, kronik hepatit C hastalarında ileri derecede steatoz ve fibrozise neden olduğu gösterilmiştir. Daha şiddetli yağlanma gelişmesi için rölatif risk CT genotipi olan hastalarda 6 kat ve TT genotipi olanlarda 20 kat yüksek saptanmıştır⁷⁷.

MTHFR, homosistein metabolizmasında, daha sonra homosisteinden metiyonine remetilasyonda da kullanılan; 5,10-Metilen tetrahidrofolat (MTH)→5-MTH' a dönüştüren anahtar enzimdir¹⁰⁸. Homosisteinin remetilasyon ile metiyonine dönüşümünde 5-MTH metil donörü olarak, vitamin B12 ise kofaktör olarak rol alır⁶⁷. DNA metilasyonu, hücrel farklılaşma sırasında gen

ekspresyonunu ve genomik bütünlüğü düzenleyen DNA' nın esansiyel temel epigenetik bir özelliğidir, evrensel metil donörü olarak, S-adenozil-L metiyonin kullanılmaktadır. Bu tepkimede, metiltransferaz katalizör enzimdir¹⁰⁹. Genomik DNA metilasyonu, folik asit düzeyleri ile doğru, plazma homosistein düzeyleri ile ise ters orantılı bir değişim gösterir.

MTHFR A1298C Polimorfizimi: MTHFR geninde, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan A (Adenin) ile C (Sitozin)' nin yer değiştirmesi sonucu, MTHFR proteinindeki Glutamin' in→ Alanin' e değişimine neden olan nokta mutasyonudur ve enzimin C-uç regülatör bölgesinde etkilidir^{94, 110, 111}. MTHFR A1298C polimorfiziminde, AA (Glutamin/Glutamin) homozigot normal (wild tip), AC (Glutamin/Alanin) heterozigot ve CC (Alanin/Alanin) homozigot mutant genotipler olarak görülmektedir. Bu mutasyonda MTHFR aktivitesi azalır^{110, 111}. MTHFR A1298C polimorfiziminin, plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı MTHFR C677T polimorfizimi kadar etkilemediğini ileri süren çalışmalar olmakla birlikte kesin bir kanıya varmak için henüz erkendir^{110, 111, 112}. İn-vitro koşullarda MTHFR A1298C alleli homozigot (CC) olan bireylerde enzim aktivitesi %40 kadar azalmıştır ancak plazma homosistein düzeyleri kontrollere göre yüksek değildir¹¹³. Lievers ve arkadaşları MTHFR A1298C mutasyonunda MTHFR enzim aktivitesinde azalma olduğunu ancak bu durumun homosistein düzeyinde önemli bir etki yapmadığını göstermişlerdir¹¹⁴.

MTHFR C677T mutasyonu: MTHFR geninin 677 no' lu nükleotidi olan Sitozin (C) ile Timin' in (T) yer değiştirmesi 222. aminoasit olan Alanin' in→Valin' e dönüşümüyle sonuçlanmaktadır. Bu değişim enzimi termolabil hale getirir ve MTHFR enziminde aktivite azalır ve özellikle düşük folik asitli diyetle birlikte hiperhomosisteinemiye neden olabilir^{67, 77, 115}. İn-vitro koşullarda MTHFR enzim aktivitesini homozigotlarda %70, heterozigotlarda ise %35 oranında azaltır¹¹³. MTHFR C677T polimorfizimi, MTHFR proteinin N-terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelir^{116, 117}. MTHFR' nin C677T polimorfiziminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal (wild tip), CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir^{118, 119}.

MTHFR A1298C ve C677T polimorfizmlerinin birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin % 50-60' ı kadardır¹²⁰. Bu aktivite, MTHFR C677T heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür¹²⁰.

Sonuç olarak, mutant MTHFR genleri, homosistein düzeylerini artırarak karaciğer yağlanması, NASH ve karaciğer sirozu gelişiminde rol alabilir.

V-GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmaya başlanmadan önce etik kurul onayı alındı. 2000-2012 yılları arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji B.D. polikliniğine başvuran ve karaciğer biyopsisiyle NASH tanısı konan 135 hasta retrospektif olarak tarandı. Alkol kullanma öyküsü (> 20 gr/gün) ve HBsAg veya Anti HCV seroloji pozitifliği, otoimmün hepatit, Wilson hastalığı ve hemakromatozis gibi metabolik karaciğer hastalığı olanlar çalışma dışında bırakıldı. Çalışmaya alınma kriterlerine uygun, karaciğer biyopsileriyle NASH tanısı almış 40 hasta, MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri ve homosistein düzeyleri bakımından 59 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

Hasta dosyalarından, hastaların boyları, kiloları, hemogram, açlık kan şekeri, insülin, total kolesterol, LDL, trigliserid, HDL, vitamin B12, folik asit, ALT, AST, ALP, GGT, total bilirubin, direkt bilirubin, CRP, homosistein, MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri, VKİ, HOMA-IR düzeyleri ve karaciğer biyopsi sonuçları kaydedildi. Tüm NASH hastalarının karaciğer biyopsileri Brunt sınıflandırmasına uygun olarak değerlendirilip skorlanmıştı.

Sağlıklı kontrol grubu, alkol kullanımı öyküsü, diyabetes mellitusu, hipertansiyonu, koroner arter hastalığı, hiperlipidemisi, obezitesi, batın ultrasonografisinde karaciğer yağlanma bulgusu olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan ve viral hepatit belirteçleri negatif gönüllü kişilerden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubu çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra aydınlatılmış onam formları imzalatılarak rızaları alındı. Sağlıklı kontrol grubundaki bireyler, hemogram, açlık kan şekeri, insülin, total kolesterol, LDL, trigliserid, HDL, vitamin B12, folik asit, ALT, AST, ALP, GGT, total bilirubin, direkt bilirubin, CRP, homosistein, MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri bakımından değerlendirildi. VKİ ve HOMA-IR düzeyleri ölçüldü.

HOMA, (açlık kan şekeri mg/dl x açlık insülin seviyesi µU/ml)/405 formülüyle hesaplandı. Genel kabul gördüğü şekilde, HOMA-IR değerinin >2,5 olması "insülin direnci" olarak kabul edildi^{121, 122}.

Tüm batın ultrasonografileri, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği'nde, abdominal ultrasonografi konusunda deneyimli aynı gastroenterolog (F. A.) tarafından uygulandı.

Vücut kitle indeksi 1835 yılında, Qutelet tarafından ilk kez tanımlandığı şekilde boy ve ağırlık ölçümlerinden yararlanılarak hesaplandı¹²³.

VKİ: Ağırlık(kg) / Boy(m)² formülü ile hesaplandı. Genel olarak VKİ' nin 30 kg/m² üzerinde bulunması obezite olarak kabul edildi.

Tablo 2: VKİ değerlerine göre aşırı kilolu ve obezite sınıflandırması¹²⁴:

Sınıflandırma	VKİ(kg/m ²)
Düşük kilolu	<18,5
Normal	18,5-24,9
Aşırı kilolu	25-30
Obez sınıf I	>30,0

Numune Toplanması: Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniğine gelen ve kontrol grubuna seçilen tüm katılımcılardan 10 saatlik açlık sonrası alınan kanlar EDTA' lı ve düz biyokimya tüplerine aktarıldı.

Düz biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri 20 dakika pıhtılaşması için bekletildi. EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri ve düz biyokimya tüpünde pıhtılaşan kan örnekleri 4000 G' de 10 dakika santrifüj edildi. Biyokimya tüpüne ayrılan serumlardan aynı gün kreatinin, AST, ALT, ALP, GGT, CRP, AKŞ, vitamin B12, folik asit ve insülin düzeyleri çalışıldı. EDTA' lı tüpten ayrılan plazmadan homosistein düzeyleri çalışıldı. MTHFR A1298C ve C677T mutasyon analizi için alınan EDTA' lı kan örnekleri ise tam kan sayımı yapıldıktan sonra DNA izolasyon aşamasına kadar +4°C' de saklandı.

Biyokimyasal Analizler: Tüm ölçümler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirildi. Tam kan sayımları Sysmex XT2000i (Sysmex Asia Pacific Pte Ltd and Sysmex Corporation of Japan) otomatik kan sayım cihazında yapıldı. Serum kreatinin, AST, ALT, ALP, GGT, CRP, AKŞ düzeyleri Integra 800 biyokimya otoanalizöründe (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim) ticari kitler (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim) kullanılarak yapıldı. Vitamin B12, folik asit ölçümleri ADVIA Centaur XP otoanalizöründe (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, 10591-5097, USA) kemiluminesan enzim immünoassay metodu ile çalışıldı.

Serum insülin ölçümleri ise İmmulite 2000 otoanalizöründe (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd. Llanberis, Gwynedd LL55 4EL, United Kingdom) çalışıldı. Plazma homosistein ölçümü homosistein (Chromsystem, Germany) kiti kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (high pressure liquid chromatography; HPLC) yöntemi ile çalışıldı.

Homosistein için HPLC koşulları:

Enjeksiyon hacmi: 30 ml

Akış hızı: 1,7 mL/dk

Oda sıcaklığı: 25° C

Dalga boyu: EX 385 nm, M 515 nm

DNA izolasyonu ve MTHFR A1298C ve C677T Mutasyon Analizi:

EDTA' lı tüplere alınan kan örneklerinden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Mannheim Germany) kullanılarak genomik DNA izole edildi. MTHFR A1298C ve C677T Mutasyon Analizleri LightCycler® 480 II Real-Time PCR Sistemi (Roche Mannheim Germany) kullanılarak gerçek zamanlı PCR (real-time polymerase chain reaction; RT-PCR) yöntemiyle çalışıldı. MTHFR A1298C ve C677T gen mutasyonlarını heterozigot veya homozigot şekilde taşıyan hastalar kaydedildi.

Materyal-Metot: Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygun dağılıp dağılmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelendi. Normal dağılıma uygun dağılan değişkenler ortalama±standart sapma, normal dağılıma uygun dağılmayan değişkenler ise medyan[minimum-maximum] şeklinde özetlendi. Kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde cinsinden ifade edildi. Dağılım varsayımı sağlandığı durumda iki grup karşılaştırılmasında independent sample t test kullanılırken, dağılım varsayımı sağlanmadığı durumda Mann Whitney u testi kullanıldı. İkiden fazla grup karşılaştırılmalarında ise normallik varsayımı altında ANOVA uygulanırken, varsayım sağlanmadığı durumda Kruskal Wallis testi kullanıldı. Genotip dağılımlarının karşılaştırılmasında Hardy Weinberg denge kontrolü yapıldıktan sonra, ki kare testi uygulandı. Bu test sonucuna göre odds oranı hesaplandı. Analizler SPSS v.11.5 ve Med Calc v.12.3 paket programları ile yapıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

VI-BULGULAR

Çalışmamıza 22 ile 67 yaşları arasında, 26' sı erkek, 14' ü kadın toplam 40 NASH hastası alındı. Sağlıklı kontrol grubuna ise, 22 ile 67 yaşları arasında 31' i erkek ve 28' i kadın toplam 59 kişiden oluşturuldu. NASH hastalarının ortalama yaşları 44 [22-67] yıl, sağlıklı kontrol grubunun ise 34 [22-67] yılıdır.

NASH grubunda yaş, VKİ, ALT, AST, GGT, ALP, Total bilirubin, CRP, Total kolesterol, Trigliserid, LDL, HOMA, Folik asit, Vitamin B12, Homosistein düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek, HDL ise düşük saptandı. Her iki grubun, HDL, LDL ve Total bilirubin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$); VKİ, ALT, AST, GGT, ALP, CRP, Total kolesterol, Trigliserit, HOMA, Folik asit ve Vitamin B12 düzeyleri arasında ise ileri derecede anlamlı bir fark ($p<0,001$) saptandı. Homosistein ve direkt bilirubin düzeyleri bakımından ise iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).**(Tablo 3)**

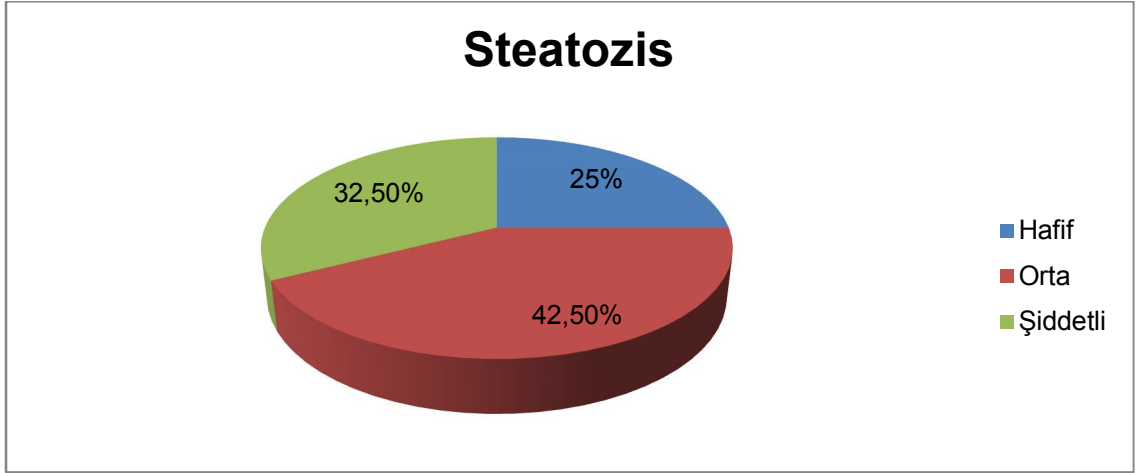
Tablo 3- NASH hastalarının ve sağlıklı kontrol grubundaki kişilerin başlangıç karakteristik özellikleri

Özellikler	Hastalar (n = 34)	Kontrol(n=59)	p değeri
Yaş (yıl)	44 [22-67]	34 [22-67]	<0,001
Cinsiyet (E/K)	26/14	31/28	-
Diyabetes mellitus	%12,5	0	-
VKİ (kg/m ²)	29,80±4,47	23,85±2,7	<0,001
ALT (IU/L)	99,40±61,01	17,74±6,79	<0,001
AST(IU/L)	55 [19-248]	17 [12-33]	<0,001
ALP (IU/L)	89,5 [46-258]	58 [29-148]	<0,001
GGT (IU/L)	53 [17-245]	12 [0,7-44]	<0,001
Total bilirubin (mg/dl)	0,5 [0,17-2,1]	0,4 [0,07-1,1]	0,006
Direkt bilirubin (mg/dl)	0,10[0,01-0,30]	0,10[0,02-0,50]	0,865
CRP	3 [0,17-21]	0,6 [0-16]	<0,001
Total Kolesterol (mg/dl)	196,2±36,75	174,35±26,57	0,001
Trigliserit (mg/dl)	148 [47-489]	98 [46-280]	<0,001
HDL (mg/dl)	42,35±12,45	49,52±12,50	0,006
LDL (mg/dl)	121,23±33,61	104,51±26,87	0,008
HOMA	3,46 [0,77-15,84]	0,6 [0,38-3,93]	<0,001
Folik asit (ng/dl)	9,65±3,99	6,59±1,75	<0,001
Vitamin B12 (pg/dl)	341 [170-664]	220 [113-520]	<0,001
Homosistein (µmol/L)	17 [8-32]	15 [6-39]	0,269

Tüm katılımcılar VKİ' ne göre değerlendirildiğinde, NASH hastaları arasında aşırı kilolu veya obez birey sıklığı, kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla idi ($p<0,05$). NASH grubunun ortalama VKİ 29,80 kg/m² iken, kontrol grubunun ortalama VKİ 23,85 kg/m² saptandı.

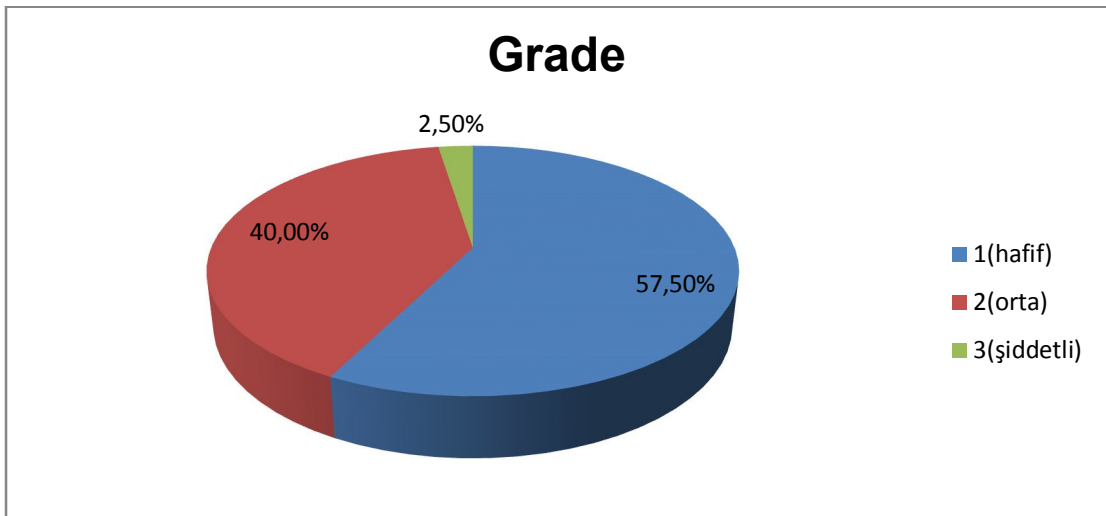
Tüm NASH hastalarının karaciğer biyopsileri, steatoz derecesi, histolojik grade ve stage bakımından Brunt sınıflamasından aldıkları skora göre değerlendirildi. Buna göre;

Şekil 4: NASH hastalarının karaciğer biyopsilerindeki steatoz düzeylerine göre dağılımı



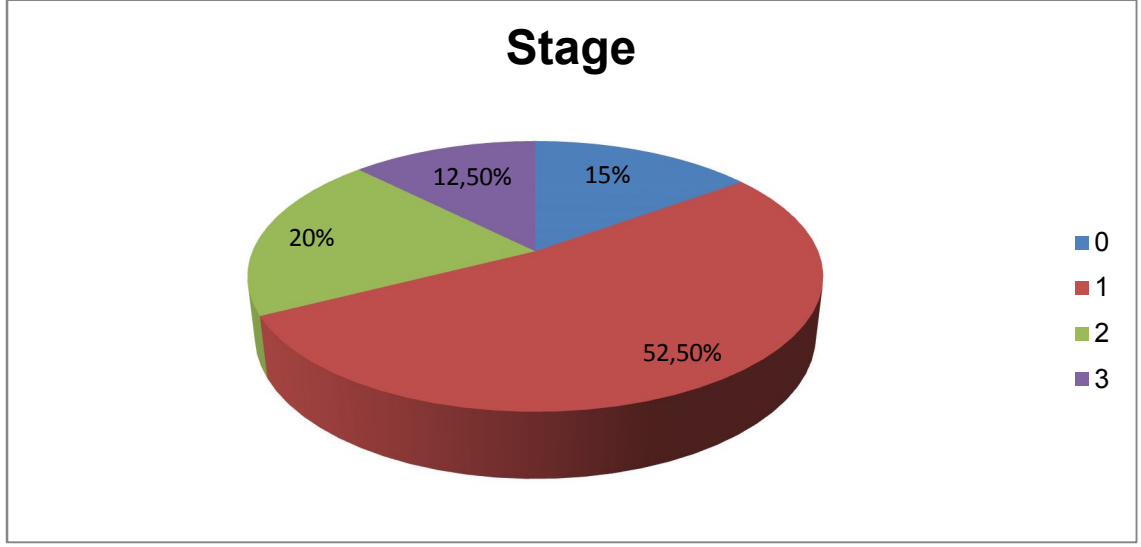
NASH' li hastaların karaciğer biyopsilerinin %32,5' inde şiddetli steatoz (>%66), %42,5' inde orta derecede steatoz (%33-%66 arasında), %25' inde hafif derecede steatoz (%5-33) saptandı. (**Şekil 4**)

Şekil 5: NASH hastalarının karaciğer biyopsilerinin histolojik gradelerinin dağılımı



NASH grubunun karaciğer biyopsileri Brunt sınıflamasına göre değerlendirildiğinde, %2,5' inde grade 3, %40' ında grade 2, %57,5' inde grade 1 NASH saptandı.(**Şekil 5**)

Şekil 6: NASH hastalarının karaciğer biyopsilerinin histolojik stagelerinin dağılımı



NASH hastalarının %15' inin karaciğer biyopsisinde fibrozis saptanmadı, %12,5' inde köprüleşme fibrozisi (stage 3), %20' sinde perisinuzoidal ve portal/periportal fibrozis (stage 2), %52,5' inde periportal veya perisinuzoidal fibrozis (stage 1) saptandı. Karaciğer biyopsilerinde siroz (stage 4) olan hiç hasta yoktu.(**Şekil 6**)

NASH hastalarının karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade ve stage) ile cinsiyet, yaş ve VKİ ve diğer tüm laboratuvar bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri ayrı ayrı araştırıldı. NASH hastaların ve sağlıklı kontrol grubunda MTHFR A1298C gen polimorfizimlerinin sıklıklarının dağılımı Tablo 4' de verilmektedir.

Tablo 4: NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda MTHFR A1298C gen polimorfizimleri

MTHFR A1298C genotip	Hasta (n=40)	Kontrol (n=59)	Odds ratio (%95 GA)	P değeri
CC	7 (%17,5)	13 (%22,0)	0,673(0,204-2,217)	0,515
AC	21 (%52,5)	31 (%52,5)	0,847(0,331-2,167)	0,729
AA	12 (%30,0)	15 (%25,5)	-----	

MTHFR A1298C gen polimorfizimi için de NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda Hardy Weinberg denge kontrolü yapıldı, NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda popülasyon dengede bulundu ($p=0,673$, $p=0,689$). MTHFR A1298C polimorfizimi için genotip dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,808$).

Hastaların ve sağlıklı kontrol grubunda MTHFR C677T gen polimorfizimlerinin sıklıklarının dağılımı Tablo 5' de verilmektedir.

Tablo 5: NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda MTHFR C677T gen polimorfizimleri

MTHFR C677T genotip	Hasta (n=40)	Kontrol (n=59)	Odds ratio (%95 GA)	p değeri
TT	9/40 (%22,5)	2 (%3,4)	11,250(2,154-58,744)	0,004
CT	17/40 (%42,5)	21 (%36,2)	2,024 (0,831-4,931)	0,121
CC	14/40 (%35)	35 (%60,4)	-----	----
TT veya CT	26/40 (%65)	22/59 (%37)	-----	----

MTHFR C677T gen polimorfizimi için NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda Hardy Weinberg denge kontrolü yapıldı, NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda popülasyon dengede bulundu ($p=0,388$, $p=0,590$). MTHFR C677T gen polimorfizimi TT genotipi dağılımı bakımından NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı

($p=0,004$). NASH' lilerde mutant genotip (TT) oranı, kontrol grubuna göre 11,250 kat daha sık belirlendi (OR=11,250, (2,154-58,744), $p=0,004$).

MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri olan NASH hastaları folik asit düzeyleri bakımından değerlendirildiğinde, MTHFR C677T geninde homozigot mutant (TT) genotipi olan sadece bir hastada folik asit düşüklüğü saptandı. Diğer tüm NASH hastalarının folik asit düzeyleri, yaşlarıyla uyumlu normal değer aralıklarındaydı. Bununla birlikte sağlıklı kontrol grubunda folik asit düşüklüğü olan tüm bireylerde ($n=7$) heterozigot veya homozigot MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimlerinden en az birine rastlandı. Sağlıklı kontrol grubundan folik asit düşüklüğü saptanan 3 bireyde MTHFR A1298C geninde homozigot (TT) mutasyon, 2 bireyde MTHFR A1298C geninde heterozigot (AC) mutasyon, 3 bireyde MTHFR C677T geninde heterozigot (CT) mutasyon ve 1 bireyde ise hem MTHFR C677'de heterozigot (CT) hem de MTHFR A1298 geninde heterozigot (AC) mutasyon mevcuttu.

NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunun MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimlerinin allel sıklıklarının karşılaştırılması Tablo 6' da sunulmuştur.

Tablo 6: NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunun MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimlerinin allel sıklıklarının karşılaştırması

----- Allel sıklığı-----				
MTHFRC677T	MTHFRA1298C	Hasta	Kontrol	OR; %95 GA; p
CC	AA	1 (%2,5)	3 (%5,1)	0,478 (0,048-4,778) $p=0,530$
CC	AC	8 (%20)	20 (%33,9)	0,487 (0,189-1,253) $p=0,136$
CC	CC	5 (%12,5)	13 (%22,1)	0,559 (0,180-1,734) $p=0,314$
CT	AA	6 (%15)	10 (%16,9)	0,864 (0,287-2,604) $p=0,796$
CT	AC	10 (%25)	11 (%18,6)	1,454 (0,551-3,838) $p=0,449$
CT	CC	1 (%2,5)	0	4,519 (0,179-113,765) $p=0,359$
TT	AA	5 (%12,5)	2 (%3,4)	4,071 (0,749-22,331) $p=0,104$
TT	AC	3 (%7,5)	0	11,107 (0,558-221,148) $p=0,114$
TT	CC	1 (%2,5)	0	4,519 (0,179-113,765) $p=0,359$

NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunun MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimlerinin allel sıklıkları açısından aralarında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 7: Obez olan NASH hastalarıyla sağlıklı kontrol grubu arasında MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimi genotip sıklıklarının karşılaştırılması

MTHFR		NASH'li Obez (n=13)	Kontrol (n=59)	Odds ratio (%95 GA)	p değeri
A1298C	CC	1 (%2,5)	13 (%22,0)	0,295 (0,035-2,484)	0,261
	AC	10 (%25)	31 (%52,5)	3,011 (0,752-12,060)	0,119
	AA	2 (%5)	15 (%25,5)	0,533 (0,106-2,686)	0,446
C677T	TT	2 (%5)	2 (%3,4)	5,091 (0,646-40,097)	0,122
	CT	5 (%12,5)	21 (%36,2)	1,101 (0,319-3,802)	0,879
	CC	6 (%15)	35 (%60,4)	0,563 (0,168-1,890)	0,343

Obez olan ve obez olmayan NASH hastaları ile sağlıklı kontrol grubu MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri genotip sıklıkları açısından karşılaştırıldı. MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimi genotip sıklıkları bakımından obez olan NASH hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (**Tablo 7**). MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipi, obez olmayan NASH hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha sık saptandı ($p=0,006$). Ayrıca MTHFR C677T CC (wild, normal) genotipi obez olmayan NASH hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha az sıklıkta saptandı ($p=0,012$). Obez olmayan NASH hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında MTHFR C677T polimorfizimi CT genotipi ve MTHFR A1298C genotipleri bakımından anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (**Tablo 8**). Ayrıca homosistein düzeyleri bakımından obez olan ve obez olmayan NASH hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,587$).

Tablo 8: MTHFR A1298C ve C677 gen polimorfiziminin obez olmayan NASH hastalarıyla sağlıklı kontrol grubu arasında genotip sıklıklarının karşılaştırılması

MTHFR		NASH'li Obez olmayan (n=27)	Kontrol (n=59)	Odds ratio (%95 GA)	p değeri
A1298C	CC	6 (%15)	13 (%22)	1,011 (0,337-3,026)	0,984
	AC	11 (%27,5)	31 (%52,5)	0,621 (0,247-1,562)	0,311
	AA	10 (%25)	15(%25,5)	1,725 (0,650-4,581)	0,273
C677T	TT	7 (%17,5)	2 (%3,4)	9,975 (1,911-52,04)	0,006
	CT	12 (%30)	21 (%36,2)	1,448 (0,573-3,660)	0,434
	CC	8 (%20)	35 (%60,4)	0,289 (0,109-0,766)	0,012

Tablo 9: NASH hastalarında MTHFR A1298C gen polimorfizimi ile karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade, stage) arasındaki ilişki

MTHFR1298/ Steatozis	%5-%33	%33-%66	>%66	p	
CC	2 (%20,0)	3 (%17,6)	2 (%15,4)	0,552	
AC	7 (%70,0)	8 (%47,1)	6 (%46,2)		
AA	1 (%10,0)	6 (%35,3)	5 (%38,4)		
MTHFR1298/ Grade	1	2	3	p	
CC	5 (%21,7)	1 (%6,3)	1 (%100,0)	0,147	
AC	13 (%56,5)	8 (%50,0)	0 (%0,0)		
AA	5 (%21,7)	7 (%43,7)	0 (%0,0)		
MTHFR1298/ Fibrozis skoru	yok	periportal veya perisinuzoidal fibrozis	perisinuzoidal ve portal/periportal fibrozis	köprüleşme fibrozisi	p
CC	1 (%16,7)	3 (%14,3)	2 (%25,0)	1 (%20,0)	0,653
AC	3 (%50,0)	12 (%57,1)	5 (%62,5)	1 (%20,0)	
AA	2 (%33,3)	6 (%28,6)	1 (%12,5)	3 (%60,0)	

Tablo 10: NASH hastalarında MTHFR C677 gen polimorfizimi ile karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade, stage) arasındaki ilişki

MTHFR677/ Steatozis	%5-%33	%33-%66	>%66	p	
TT	4 (%40,0)	3 (%17,6)	2 (%15,4)	0,615	
CT	4 (%40,0)	7 (%41,2)	6 (%46,2)		
CC	2 (%20,0)	7 (%41,2)	5 (%38,5)		
MTHFR677/ Grade	1	2	3	p	
TT	7(%30,4)	2(%12,5)	0(%0,0)	0,176	
CT	7(%30,4)	10(%62,5)	0(%0,0)		
CC	9(%39,2)	4 (%25,0)	1(%100,0)		
MTHFR677/ Fibrosis skoru	yok	periportal veya perisinuzoidal fibrosis	perisinuzoidal ve portal/periportal fibrosis	köprüleşme fibrozisi	p
TT	3(%50,0)	2(%9,5)	1(%12,5)	3(%60,0)	0,172
CT	1(%16,7)	11(%52,4)	4(%50,0)	1(%20,0)	
CC	2(%33,3)	8(%38,1)	3(%37,5)	1(%20,0)	

NASH hastalarında MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleriyle karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade, stage) ve diğer tüm laboratuvar bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$). (Tablo 9 ve Tablo 10)

VII-TARTIŞMA

NAFLD gelişmiş ülkelerde görülen en yaygın kronik karaciğer hastalığıdır. NAFLD spektrumu içerisinde ilk basamakta yer alan basit karaciğer yağlanmasına nekroinflamatuvar aktivitenin eklenmesi sonucu gelişen NASH, karaciğer sirozu ve HCC' ye yol açabilen morbiditesi ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır². Günümüzde kriptojenik karaciğer sirozunun en sık nedeninin NASH olduğu kabul edilmektedir¹. NASH' e neden olan metabolik hastalıkların gelişiminde çevresel faktörler kadar genetik faktörler de sorumlu tutulmaktadır¹²⁹.

Genetik faktörlerin başlıca LP ve homosistein üzerinden NASH gelişimine katkıda buldukları iddia edilmektedir^{125, 126, 127}. MTHFR gen polimorfizimleri, hiperhomosisteinemi nedenlerinden birisidir^{71, 73}. Hiperhomosisteinemi de NAFLD ve karaciğer fibrozisi risk faktörleri arasında yer almaktadır^{67, 68, 77}. Homosistein plazmaya karıştığında kolayca okside edilir ve sülfidril grubunun oksidasyonu sırasında, süperoksit anyon radikalleri ve hidrojen peroksit ortaya çıkar^{128, 129}. Bu oksidasyon stresi, hem endotel hücre yüzeyini hem de plazmadaki lipoprotein partiküllerini etkileyerek LP' nu başlatır^{130, 131}. Genetik çeşitlilik, NAFLD gelişiminde insülin direnci, lipid birikimi, LP, inflamatuvar kaskat ve fibrozis gibi bir veya daha fazla basamağı etkileyebilir. Hiperhomosisteinemi insülin direnci yoluyla da NAFLD patogenezinde rol oynamaktadır. İnsülin direnci hem NAFLD hem de metabolik sendromun önemli bir bileşenidir^{20, 40}.

MTHFR gen polimorfizimlerinin NASH gelişiminde rol oynayabileceğine dair elimizde güçlü teorik kanıtlar bulunmasına rağmen, literatürde NASH ve MTHFR gen polimorfizimleri arasındaki ilişkiyi araştıran klinik çalışma sayısı yetersizdir^{24, 132}. MTHFR A1298C ve C677T polimorfizimlerine ikincil olarak gelişen hiperhomosisteinemi oksidatif stres etkisiyle basit karaciğer yağlanmasının NASH' e ilerlemesinde belirleyici bir faktör olabilir.

Schwahn ve arkadaşları, MTHFR' den yoksun farelerde gelişen orta ve şiddetli hiperhomosisteineminin karaciğer yağlanmasına neden olduğunu göstermişlerdir^{76, 133}. Gülşen M. ve arkadaşları ise plazma homosistein düzeylerinin NASH' li hastalarda, basit karaciğer yağlanması olan hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir¹³⁴. Yine aynı

çalışmada NASH hastalarının plazma homosistein düzeylerinin, nekroinflamatuvar aktivite şiddeti ile anlamlı derecede korelasyon gösterdiği bulunmuş ve yüksek homosistein düzeylerinin NAFLD hastalarında karaciğer biyopsisi için bir endikasyon olabileceği bildirilmiştir¹³⁴. Huang ve arkadaşları folik asit düşüklüğü ve hiperhomosisteininin rat karaciğerinde oksidatif stres mekanizmalarını çalıştırarak NASH' e neden olduğunu bildirmişlerdir¹³⁵. Bizim çalışmamızda NASH hastalarının homosistein düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Bunun nedeni hasta sayımızın az olması olabileceği gibi, sağlıklı kontrol grubunun folik asit ve vitamin B12 düzeylerinin NASH grubuna göre ileri derecede anlamlı düzeyde düşük olması olabilir ($p<0,01$). Düşük vitamin B12 ve folik asit düzeylerinin homosistein düzeylerini artırdığı bilinmektedir. Harmon DL. ve Frederiksen J. iki ayrı çalışma ile folik asit eksikliği olmayan MTHFR gen polimorfizimli olgularda homosistein düzeylerinin normal olduğunu bildirmişlerdir¹³⁶.

137

Daha önce Sazcı A. ve arkadaşları MTHFR A1298C polimorfiziminin NASH hastalarında anlamlı derecede fazla bulunduğunu ancak, NASH ile MTHFR C677T gen polimorfizimi arasında herhangi bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir²⁴. Diğer bir çalışmada ise Serin ve arkadaşları; MTHFR C677T polimorfiziminin NASH için bir risk faktörü olarak görülmediğini bildirmişlerdir¹³². Serin ve arkadaşlarının bu çalışmasında katılımcıların homosistein düzeylerinin çalışılmamış olması bu çalışmanın eksik yönlerinden biri olarak kabul edilebilir. Ayrıca bu iki çalışmada da sağlıklı kontrol grubu batın ultrasonografisiyle değerlendirilmemiştir. Bu durum, her iki çalışmanın sağlıklı kontrol grubunda da hepatosteatozlu bireyler olabileceği için eleştirilebilir. Bizim çalışmamızda kontrol grubuna alınması planlanan tüm bireylere batın ultrasonografisi uygulanmış, hepatosteatozun ultrasonografik bulgularına rastlananlar çalışmaya alınmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda da NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunun yaşları arasında anlamlı bir fark olması eleştiri konusu olabilir ($p<0,001$). Bu durum, dışlama kriterlerine sahip olmaları nedeniyle kontrol grubunda çalışmaya alınmasından vazgeçilen bireylerin genellikle ileri yaşta olmasından kaynaklanmıştır.

Bizim çalışmamızda NASH' li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre MTHFR A1298C gen polimorfizimi açısından anlamlı bir ilişki saptanmadı

($p>0,05$). Ancak MTHFR C677T gen polimorfiziminin homozigot TT genotipi açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,004$). NASH' lilerde homozigot TT genotipi oranı, kontrol grubuna göre 11,250 kat daha sık belirlendi (OR=11,250, (2,154-58,744), $p=0,004$). Bizim çalışmamızda olduğu gibi, Adinolfi L. E. ve arkadaşlarının çalışmasında da Kronik Hepatit C' li hastalarda MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipi NASH ile ilişkili bulunmuştur⁷⁷. NASH hastalarında MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleriyle karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade ve stage) arasında ise bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Bu sonuç NASH' li hasta grubunda sık olarak saptadığımız MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipinin, hastalığın şiddetinden çok etiopatogenezinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda NASH' in tipik laboratuvar bulgularıyla uyumlu şekilde ALT, AST, ALP, GGT, Total bilirubin, CRP, Total kolesterol, Trigliserid, LDL düzeyleri anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). Karaciğer fibrozisinin ilerlemesi ve siroz gelişimi ile 1' in üzerine çıkan AST/ALT oranları bizim hastalarımızda siroz ve ileri fibroz olmaması nedeniyle 1' in altında bulundu^{41, 57}. NASH hastalarında ALP ve/veya GGT genellikle normal değerlerin üst sınırının 2 katından daha az olmak üzere, bir miktar artmış olarak bulunmakta olup⁵⁸, bizim çalışmamızda da NASH hastalarının ALP, GGT ortalama düzeyleri aynı şekilde ılımlı yüksekti.

NASH gelişiminden en sık obezite ve metabolik sendromun diğer komponentleri sorumlu tutulmaktadır. VKİ, 30 kg/m² ve üzerinde olanlarda NAFLD sıklığı %60-95, tip 2 diyabetiklerde %28-55 ve hiperlipidemisi olanlarda %20-92 olarak bildirilmiştir^{2, 35, 36}. NASH prevalansının ise, genel popülasyonda %2-3, obezlerde %20-30 olduğu bilinmektedir^{5, 6, 7}. Bizim çalışmamızdaki NASH hastalarının %32,5' i obez iken, %12,5' inde tip 2 diyabetes mellitus, %15' inde hiperlipidemi bulunmaktaydı. İnsülin direncini gösteren HOMA düzeyi NASH hastalarında normal sınırdan fazla (medyan değeri 3,46 [0,77-15,84]); sağlıklı bireylerde ise normal sınırlarda (medyan değeri 0,6 [0,38-3,93]) idi. NASH hastalarının HOMA düzeyi sağlıklı bireylerin HOMA düzeyinden anlamlı olarak yüksekti($p<0,001$). Bu verilerden anlaşılacağı gibi, bizim NASH' li hastalarımızda da, başta obezite ve ona ikincil gelişen insülin direnci olmak

üzere, metabolik sendromun tüm komponentleri en sık rastlanan risk faktörleriydi.

Bununla birlikte obez olmayan bir grup NASH hastasının varlığı da uzun süredir dikkat çekmektedir. Bu hasta grubunda NASH gelişiminde çevresel faktörlerden çok genetik faktörlerin rol oynayabileceğini düşünerek, çalışmamızdaki obez ve obez olmayan NASH hastalarını MTHFR gen polimorfizimleri bakımından karşılaştırdık. Obez NASH hastaları ile sağlıklı bireyler arasında MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimleri genotip sıklıkları ve homosistein düzeyleri bakımından anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak, obez olmayan NASH hastalarında MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipi, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha sık saptandı ($p=0,006$). Ayrıca MTHFR C677T CC (wild, normal) genotipi obez olmayan NASH hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha az sıklıktaydı ($p=0,012$). Obez olmayan NASH'li hastalarda, NASH için iyi bilinen risk faktörlerinden; dislipidemi, diyabetes mellitus ve insülin direnci de yoktu. Bu bulgu genetik faktörlerin, diğer çevresel faktörlerden bağımsız olarak NASH gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

VIII-SONUÇ

40 NASH hastası ve 59 sağlıklı bireyden oluşan, toplamda 99 katılımcıyı içeren, geniş yaş aralığına sahip (22 yaş-67 yaş) çalışmamızın sonucunda şu kanılara varıldı;

- NASH' li hastalarda başta obezite olmak üzere metabolik sendrom komponentleri en önemli risk faktörleridir.

- Hiperhomosisteinemi NASH gelişiminden sorumlu tutulan diğer önemli bir risk faktörüdür. Ancak, vitamin B12 ve folik asit eksikliği başta olmak üzere pek çok durumdan etkilenebilir.

- NASH' li hastalarımızda MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipinin, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek sıklıkta bulunması, homosistein metabolizmasını etkileyen bu mutasyonun NASH etiopatogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

- Obez olmayan NASH hastalarında MTHFR C677T gen polimorfiziminin TT genotipi, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha sık saptanmış bu hasta grubunda NASH için iyi bilinen risk faktörlerinden; dislipidemi, diyabetes mellitus ve insülin direnci de belirlenmemiştir. Bu bulgu genetik faktörlerin, iyi bilinen diğer risk faktörleri olmadan da NASH gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir.

- NASH ve NASH'e ikincil olarak gelişen karaciğer sirozu ve HCC etiopatogenezinde çevresel faktörler kadar genetik faktörlerin de belirleyici olduğu düşünülmektedir. Yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden bu hastalıkların önlenmesi için, NASH ile ilişkili genetik risk faktörlerinin iyi bilinmesi gerekir. Bu nedenle NASH etiopatogezinde genetik risk faktörlerini araştıran daha kapsamlı ve geniş katılımlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

IX-KAYNAKLAR

1. Angulo P, L.K., *Nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1221-31.
2. Matteoni, C.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1413-9.
3. Younossi, Z.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations*. Mod Pathol, 1998. **11**(6): p. 560-5.
4. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1836-46.
5. Dowman, J.K., J.W. Tomlinson, and P.N. Newsome, *Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2011. **33**(5): p. 525-40.
6. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update*. Obes Rev, 2010. **11**(6): p. 430-45.
7. Krawczyk, M., L. Bonfrate, and P. Portincasa, *Nonalcoholic fatty liver disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(5): p. 695-708.
8. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes*. Hepatology, 2006. **44**(4): p. 865-73.
9. Soderberg, C., et al., *Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 595-602.
10. Fierbinteanu-Braticevici, C., et al., *Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(38): p. 4784-91.
11. Adams, L.A. and A.E. Feldstein, *Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis*. J Dig Dis, 2011. **12**(1): p. 10-6.
12. Miller M. H., F.M.A., Dillon JF. , *Systematic review of performance of non-invasive biomarkers in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease*, in *Liver Int*. 2011. p. 461-473.
13. Kopec, K.L. and D. Burns, *Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy*. Nutr Clin Pract, 2011. **26**(5): p. 565-76.
14. Kalhan, S.C., et al., *Methionine and protein metabolism in non-alcoholic steatohepatitis: evidence for lower rate of transmethylation of methionine*. Clin Sci (Lond), 2011. **121**(4): p. 179-89.
15. Falck-Ytter, Y., et al., *Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 17-26.
16. Younossi, Z.M., A.M. Diehl, and J.P. Ong, *Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 746-52.
17. Ploeg R. J., D.A.A., Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al, *Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis*. Transplantation, 1993. **55**: p. 807–13.

18. *Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults . Final Report. (Adult Treatment Panel III), in Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP)2002. p. 3143–421.*
19. Shulman A.I., M.D.J., *Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome.* N Engl J Med, 2005. **353**: p. 604-15.
20. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.* Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-92.
21. Vigano M., V.A., Trombini P., Paleari F, Piperno A., *Insulin resistance influence iron metabolism and hepatic steatosis in type II diabetes.* Gastroenterology, 2000. **118**: p. 986–7.
22. Tilg, H.D., A. M., *Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.* N Engl J Med, 2000. **343**(20): p. 1467-76.
23. Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, *Obesity, inflammation, and insulin resistance.* Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2169-80.
24. Sazci, A., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH).* Cell Biochem Funct, 2008. **26**(3): p. 291-6.
25. McCullough, A.J., *Update on nonalcoholic fatty liver disease.* J Clin Gastroenterol, 2002. **34**(3): p. 255-62.
26. Clark, J.M., *The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults.* J Clin Gastroenterol, 2006. **40 Suppl 1**: p. S5-10.
27. Haslam D.W., J.W.P., *Obesity.* Lancet, 2005. **366**: p. 1197–209.
28. Neuschwander-Tetri, B.A. and B.R. Bacon, *Nonalcoholic steatohepatitis.* Med Clin North Am, 1996. **80**(5): p. 1147-66.
29. Loguercio C, D.S.T., D'Auria MV, de S, I, Federico A, Tuccillo C, et al. , *Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver. . Dig Liver Dis 2004. 36: p. 398–405.*
30. Loguercio C., D.G.V., De Sio I., Tuccillo C., Ascione A., Baldi F., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects.* J Hepatology, 2001. **35**: p. 568–74.
31. Alexander, W.S., et al., *Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6.* Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 605-8.
32. El-Hassan AY, I.E., Al-Mulhim FA et al. , *Fatty infiltration of the liver: analysis of prevalence, radiological and clinical features and influence on patient management.* Br J Radiol, 1992. **65**: p. 774-778.
33. Hilden M., C.P., Juhl E, Dalgaard JB., *Liver histology of a normal population examinations of 503 consecutvie fatal traffic casualties.* Scand J Gastroenrol 1977. **12**: p. 593-597.
34. Ground K E, *Liver patology in aircrew.* Aviad Space Environ Med, 1982. **53**: p. 14-18.
35. Lee, R.G., *Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients.* Hum Pathol, 1989. **20**(6): p. 594-8.
36. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.* Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.

37. Adams, L.A., et al., *The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies*. J Hepatol, 2005. **42**(1): p. 132-8.
38. Dam-Larsen S, F.M., Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sorensen TI, et al., *Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death*. Gut Liver, 2004. **53**: p. 750-755.
39. Feldstein A E, C.P., Treeprasertsuk S, Benson JT, Enders FB, Angulo P, *The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years*. Gut Liver, 2009. **58**: p. 1538-1544.
40. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1844-50.
41. Angulo, P., et al., *Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1356-62.
42. Tilg, H. and A. Moschen, *Update on nonalcoholic fatty liver disease: genes involved in nonalcoholic fatty liver disease and associated inflammation*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(4): p. 391-6.
43. Abdelmalek, M.F. and A.M. Diehl, *Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance*. Med Clin North Am, 2007. **91**(6): p. 1125-49, ix.
44. Ma, X. and Z. Li, *Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)*. Chin J Dig Dis, 2006. **7**(1): p. 7-11.
45. Day C, S.S., *Non-alcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2002. **17**: p. 377–S384.
46. Powell, E.E., et al., *The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years*. Hepatology, 1990. **11**(1): p. 74-80.
47. Day C P, J.O.F.W., *Steatohepatitis: a tale of two hits?* Gastroenterology 1998. **114**: p. 842-845.
48. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1343-51.
49. Kahn BB, F.J., *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**: p. 473–81.
50. Jensen MD, H.M., Rizza RA, Cryer PE, Miles JM. , *Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity*. J Clin Invest 1989. **83**: p. 1168–73.
51. Parekh, S. and F.A. Anania, *Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2191-207.
52. Gastaldelli A, C.K., Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R et al., *Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects*. Gastroenterology 2007. **133**: p. 496–506.
53. Brunt, E.M., *Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 3-16.
54. Bacon, B.R., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1103-9.
55. Diehl, A.M., *Nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(2): p. 221-9.

56. Garcia-Monzon C, M.-P.E., Iacono OL et al. , *Characterization on of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity*. J Hepatology, 2000. **33**: p. 716-724.
57. Palck-Ytter Y, Y.Z., Marchesini G et al. , *Clinical features and natural history non alcoholic steatosis syndrommes*. Semin Liver Dis 2001. **21**: p. 17-26.
58. Pinto, H.C., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients*. Dig Dis Sci, 1996. **41**(1): p. 172-9.
59. Siegelman ES, R.M., *Imaging of hepatic steatosis*. Semin Liver Dis 2001. **21**: p. 71-80.
60. Joseph AEA, S.S., Al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD, *Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease*. Clin Radiol, 1991. **43**: p. 26-31.
61. Bydder GM, K.L., Chapman RW, Harry D, Sherlock S, Bassan L. , *Accuracy of computed tomography in diagnosis of fatty liver*. BMJ Case Rep, 1980. **281**: p. 1042
62. Becker U, D.A., Sorenson TL et al., *Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study*. Hepatology 1996. **23**: p. 1025-1029
63. Chitturi, S. and G.C. Farrell, *Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 27-41.
64. *AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease*. in *Gastroenterology*. 2002.
65. Angulo P, L.K., *Non-alcoholic fatty liver disease: Quadrennial review*. The Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2002. **17**: p. 186-S190.
66. Yazıcı H, H.V., Sonsuz A., *Karaciger yağlanması ve nonalkolik steatohepatit*. Cerrahpasa İç Hastalıkları . İstanbul Medical Yayıncılık. 2005. 920-926.
67. Ji C, K.N., *Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury* World J Gastroenterol 2004. **10**: p. 1699–708.
68. Gaull G, S.J., Schaffner F., *Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: enzymatic and ultrastructural studies*. J Pediatr. , 1974 Mar; **84**(3): p. 381-90.
69. JD., F., *Methionine metabolism in mammals*. J Nutr Biochem, 1990. **1**: p. 228-36.
70. Castro R, e.a., *Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview*. J Inherit Metab Dis, **2006**. **29**(1): p. 3-20.
71. Refsum H, U.P., Nygard O, Vollset SE. , *Homocysteine and cardiovascular disease*. Annu Rev Med 1998. **49**: p. 31-62.
72. Mato JM, A.L., Ortiz P, Pajares MA, *S-Adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications*. Pharmacol Ther 1997. **73**: p. 265-80.
73. Mayer EL, J.D., Robinson K. , *Homocysteine and coronary atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol 1996. **27**: p. 517-27.
74. Selhub J, J.P., Wilson PW, et al. , *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly populations*. J Am Med Assoc 1993. **270**: p. 2693-8.

75. Garcia-Tevijano ER, B.C., Rodríguez JA, et al., *Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis*. Hypertension, 2001. **38**: p. 1217-21.
76. Watanabe M, O.J., Aratani Y, et al. , *Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocysteinemia*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 1585-9.
77. Adinolfi LE, I.D., Cesaro G, et al., *Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients*. Hepatology 2005. **41**: p. 995-1003.
78. Golbahar J, A.M., Kassab SE, Omrani GR. , *Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats*. Diabetes Res Clin Pract 2007. **76**: p. 1-5.
79. Altinova AE, T.F., Bukan N, et al., *Decreased plasma adiponectin is associated with insulin resistance and HDL cholesterol in overweight subjects*. Endocr J, 2007. **54**: p. 221-6.
80. Meigs JB, J.P., Selhub J, et al. , *Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham Offspring Study*. Diabetes Care, 2001. **24**: p. 1403-10.
81. Ji C, K.N., *Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice*. Gastroenterology 2003. **124**: p. 1488–99.
82. Yahagi N, S.H., Hasty AH et al. , *Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice*. J. Biol. Chem, 2002. **277**(19): p. 353– 7.
83. Ascencio C, T.N., Isoard-Acosta F, et al, *Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats*. J Nutr Biochem, 2004. **134**: p. 522-9.
84. Giltay EJ, H.E., Elbers JM, Gooren LJ, Asscheman H, Stehouwer CD, *Insulin resistance is associated with elevated plasma homocysteine levels in healthy, nonobese subjects*. Atherosclerosis 1998. **139**: p. 197– 8.
85. Wang G, S.Y., O K, *Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a possible role for protein kinase C*. Biochem J, 2000. **352**: p. 817-26.
86. Torres L, G.-T.E., Rodríguez JA, et al., *Induction of TIMP-1 expression in rat hepatic stellate cells and hepatocytes: a new role for homocysteine in liver fibrosis*. Biochim Biophys Acta 1999. **1455**: p. 12-22.
87. Utku U, Ç.Y., *İnmede etyoloji, sınıflandırma ve risk faktörleri*. Serebrovasküler Hastalıklar, ed. B. S. Vol. 3. 2009, Ankara: Güneş Kitabevi
88. Hademenos J, A.M., Awad I, Mayberg M, Shephard T, Jagoda A, et al., *Advances in the genetics of cerebrovascular diseases and stroke*. Neurology 2001. **56**: p. 997-1008.
89. Ho GYH, E.J., Hankey GJ, Wong CR, Tan SL, Chan JBC, et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and homocysteine-lowering effect of vitamin therapy in Singaporean stroke patients*. Stroke 2006. **37**: p. 456-60.

90. Wu Y, T.M., Sumino K, *Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese*. Kobe J Med Sci, 2001. **47**: p. 255-62.
91. Rosenblatt D S, *Methylenetetrahydrofolate reductase*. Clin Invest Med, 2001. **24**: p. 56-59.
92. Homberger G, L.M., Winter C, et al., *Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**: p. 725-729.
93. Emiroğulları EF, S.Ç., Ünal A, Özkul Y, *Arteriyovenöz fistül trombozu gelişen ve gelişmeyen kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda metilentetrahidrofolate redüktaz polimorfizmlerinin araştırılması*. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2007. **16**(3): p. 121-8.
94. Sibani S, C.B., O'ferrall E, et al, *Characterization of six novel mutations in the methylenetetra-hydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria*. Hum Mutat 2000. **27**(15): p. 280-7.
95. Rozen R, *Methylenetetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer*, in *IV.Reunion, Metiyonin metabolism, molecular mechanisms and clinical implications*1998: University of Navarra and Granada, Spain.
96. Weisberg I, T.P., Christensen B, Sibani S, Rozen R, *A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity*. Mol Genet Metab 1998. **64**: p. 169-72.
97. Li Z, S.L., Zhang H, Liao Y, Wang D, Zhao B, Zhu Z, Zhao J, Ma A, Han Y, Wang Y, Shi Y, Ye J, Hui R, *Elevated Plasma Homocysteine Was Associated With Hemorrhagic and Ischemic Stroke, but Methylenetetrahydrofolat Reductase Gene C677T Polymorphism Was a Risk Factor Thrombotic Stroke*. Stroke, 2003. **34**(9): p. 2085-2090.
98. Sazcı A, E.E., Kaya G, Kara I, *Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey*. Cell Biochem Funct 2005. **23**(1): p. 51-4.
99. Ucar F, S.M., Ovali E, Ozmenoglu M, Karti SS, Yilmaz M, et al, *MTHFR C677T polymorphism and its relation to ischemic stroke in the Black Sea Turkish population*. Am J Hematol 2004. **76**: p. 40-3.
100. Robertson KD, W.A., *DNA methylation in health and disease*. Nat Rev Genet 2000. **1**: p. 11-19.
101. Frosst P, B.H., Milos R, et al. , *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat Genet, 1995. **10**: p. 111–113.
102. Kara I, S.A., Ergul E, Kaya G, Kilic G, *Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk*. Mol Brain Res 2003. **111**: p. 84–90.
103. Sazci A, E.E., Tuncer N, Akpinar G, Kara I, *Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: dual effect of MTHFR polymorphisms C677T and A1298C*. Brain Res Bull 2006. **71**: p. 45–50.
104. Sazci A, E.E., Guzelhan Y, Kaya G, Kara I, *Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with schizophrenia*. Mol Brain Res 2003. **117**: p. 104–107.

105. Sazci A, E.E., Kucukali I, Kara I, Kaya G, *Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene with schizophrenia: association is significant in men but not in women.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005. **29**: p. 1113–1123.
106. Sazci A, E.E., Bayulkem K, *Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with essential tremor in Turkey.* Mov Disord 2004. **19**: p. 1472–1476.
107. Ergul E, S.A., Utkan Z, Canturk NZ, *Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer.* Tumor Biol, 2003. **24**: p. 286–290.
108. Rozen R, *Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).* Thromb Haemost 1997. **78**: p. 523–526.
109. Jones PA, G.M., *Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**: p. 2103–2105.
110. Botto LD, Y.Q., *5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies.* Am J Epidemiol, 2000. **151**: p. 862-77.
111. Shpichinetsky V, R.I., Friedlander Y, et al, *The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients.* J Nutr, 2000. **130**: p. 2493- 2497.
112. Szczeklik A, S.M., Jankowski M, et al, *Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: Risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia.* Am J Med Genet, 2001. **101**: p. 36-39.
113. Tepeli E, M.M., Uludağ A, Atlı E, Uzun D, Artan S, *Eskişehir ilinde idiyopatik tekrarlayan gebelik kayıpları ile MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri arasındaki ilişki.* Osmangazi Tıp Dergisi, 2007. **29**(1): p. 1-11.
114. Choi BO, K.N., Kim SH, Kang MS, Lee S, Ahn JY, Kim OJ, Kim S, Oh D, *Homozygous C677T mutation in the MTHFR gene as an independent risk factor for multiple small-artery occlusions.* Thrombosis Research, 2003. **111**: p. 39-44.
115. Kaplowitz, N., et al., *Endoplasmic reticulum stress and liver injury.* Semin Liver Dis, 2007. **27**(4): p. 367-77.
116. Rady PL, T.S., Hundnall SD, et al, *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): The incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population.* Am J Med Genet, 1999. **86**: p. 380-384.
117. Tonetti C, B.A., Bories D, et al, *Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: A clinical, biochemical, and molecular study of the family.* Am J Med Genet, 2000. **91**: p. 363- 367.
118. Stern LL, B.P., Rosenberg IH, et al, *Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate- adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene.* J Nutr, 2000. **130**: p. 2238-2242.
119. Molloy AM, D.S., Mills JL, et al, *Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations.* The Lancet, 1997. **49**: p. 1591-1593.
120. Fodinger M, H.W.S.-P.G., *Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase.* J Nephrol 2000. **13**(1): p. 20-33.

121. Osei K, G.T., Rhinesmith S, Schuster D, *Impaired insulin sensitivity, insulin secretion and glucose effectiveness predict future development of 48 impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in pre-diabetic african americans*. Diabetes Care 2004. **27**: p. 1439-1446.
122. Jaber LA, B.M., Hammad A, Zhu Q, Herman WH, *The prevalence of the metabolic syndrome among arab americans*. Diabetes Care 2004. **27**: p. 234-238.
123. Seidell JC, D.P., Hatvast JG, *Obesity and fat distribution, in relation to health. Current insights and recommendations*. World Rev Nutr Diet 1987. **50**: p. 57-91.
124. Organization, W.H. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic Report of a WHO Consultation on Obesity*. in WHO/NCD/98.1. 1998. Geneva: World Health Organization.
125. Bonkovsky, H.L., et al., *Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 1999. **31**(3): p. 421-9.
126. Valenti, L., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 274-80.
127. Namikawa, C., et al., *Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 2004. **40**(5): p. 781-6.
128. Mansoor MA, B.C., Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM, *Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995. **15**: p. 232–240.
129. Heinecke JS. Alan R. Liss, *Superoxide mediated oxidation of low density lipoproteins by thiols*. In: Cerutti PA, Cerutti JM, McCord I, Fridovich I (eds) *Oxy-radicals in molecular biology and pathology*. 1988. **3186**: p. 433–447.
130. Hayden MR, T.S., *Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation*. Nutr J, 2004. **10**: p. 1–23.
131. Setola E, M.L., Galluccio E, Palloschi A, Fragasso G, Paroni R, Magni F, Sandoli EP, Lucotti P, Costa S, Fermo I, Galli-Kienle M, Origgi A, Margonato A, Piatti P, *Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia*. Eur J Endocrinol 2004. **151**: p. 483–489.
132. Serin, E., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and nonalcoholic fatty liver disease*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(5): p. 1183-6.
133. Schwahn BC, C.Z., Laryea MD, et al. , *Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*. FASEB J 2003. **17**: p. 512–514.
134. Gulsen M, Y.Z., Bagci S, et al, *Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol 2005. **20**: p. 1448–1455.

135. Huang R F, H.Y.C., Lin H L, Yang F L, *Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers*. J. Nutr 2001. **131**: p. 33–38.
136. Harmon DL, D.R., Meleady R, Doyle M, Shields DC, Barry R, et al, *Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999. **19**: p. 208-11.
137. Frederiksen J, J.K., Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al, *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case control studies from the Copenhagen City Heart Study*. Blood Cells, 2004. **104**: p. 3046-51.

X-SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı: NAFLD
Non alkolik steatohepatit: NASH
Hepatoselüler karsinoma: HCC
Real-time polymerase chain reaction: RT-PCR
High pressure liquid chromatography: HPLC
Homeostasis model assessment-insulin resistans: HOMA-IR
The European Association for the Study of the Liver: EASL
Diabetes Mellitus: DM
Alanin aminotransferaz: ALT
Aspartat aminotransferaz: AST
High density lipoprotein: HDL
Low density lipoprotein: LDL
Metilentetrahidrofolik asit redüktaz: MTHFR
Metilen tetrahidrofolat: MTH
Vücut kitle indeksi: VKİ
Ultrasonografi: US
Bilgisayarlı Tomografi: BT
Total parenteral nütrisyon: TPN
Apolipoprotein C3: APOC3
Patatin-benzeri fosfolipaz 3: PNPLA3
Tümör nekrozis faktör: TNF
Serbest yağ asitleri: SYA
Lipit peroksidasyonu: LP
Açlık kaynaklı adiposit faktörü: Fiaf
Toll like reseptörler: TLR
Transyağ asitleri: TFAS
Alkalen fosfataz: ALP
γ-glutamiltransferaz: GGT
Manyetik rezonans: MR
Metiyonin sentaz: MS
Betain-homosistein metiltransferaz: BHMT
Sistatyonin β-sentaz: CBS

S-adenzilmetiyonin: Ado-Met

Stres sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1: SREBP-1

Doku inhibitörü metalloproteinazları: TIMP

Deoksiribonükleik asit: DNA

Sitozin-guanin: CpG

S-adenozilhomosistein : SAH

KiloDalton: kDa

Çok düşük yoğunluklu lipoprotein: VLDL

Glisin methyltransferase: GNMT

Adenin: A / Sitozin: C / Guanin: G / Timin: T

Quantitative Insulin Sensitivity Index: QUICKI

C reaktif protein: CRP

XI-TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: NASH' te histolojik grade ve stage.....	16
Tablo 2: VKİ değerlerine göre aşırı kilolu ve obezite sınıflandırması.....	24
Tablo 3: NASH hastalarının ve sağlıklı kontrol grubundaki kişilerin başlangıç karakteristik özellikleri.....	26
Tablo 4: Hasta ve kontrol grubunda MTHFR A1298C gen polimorfizimleri.....	29
Tablo 5: Hasta ve kontrol grubunda MTHFR C677T gen polimorfizimleri.....	29
Tablo 6: NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubunun MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizimlerinin allel sıklıklarının karşılaştırması	30
Tablo 7: Obez olan ve obez olmayan NASH hastalarıyla sağlıklı kontrol grubu arasında MTHFR A1298C gen polimorfizimi genotip sıklıklarının değerlendirilmesi.....	31
Tablo 8: MTHFR C677 gen polimorfiziminin obez olan ve obez olmayan NASH hastalarıyla sağlıklı kontrol grubu arasında genotip sıklıklarının değerlendirilmesi	32
Tablo 9: NASH hastalarında MTHFR A1298 gen polimorfizimi ile karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade, stage) arasındaki ilişki.....	32
Tablo 10: NASH hastalarında MTHFR C677 gen polimorfizimi ile karaciğer biyopsi bulguları (steatozis, histolojik grade, stage) arasındaki ilişki.....	33

XII-ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: NAFLD' da çift darbe hipotezi.....	13
Şekil 2: Çoklu paralel darbe modeli.....	14
Şekil 3: Homosistein metabolizması.....	17
Şekil 4: NASH hastalarının karaciğer biyopsilerindeki steatozis düzeylerine göre dağılımı.....	27
Şekil 5: NASH hastalarının karaciğer biyopsilerinin histolojik gradelerinin dağılımı.....	27
Şekil 6: NASH hastalarının karaciğer biyopsilerinin histolojik stagelerinin dağılımı.....	28