

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



ALKOL DIŞI YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA KARACİĞERDE
COX-2 EKSPRESYONUNUN İMMÜNİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ ve HİSTOPATOLOJİK BULGULARLA İLİŐKİSİNİN
ARAŐTIRILMASI

Dr. Burcu ÜLKÜDEN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tez DanıŐmanı

Prof. Dr. Ulus Salih AKARCA

İç Hastalıkları Anabilim Dalı BaŐkanı

Prof.Dr. Fehmi AKÇİÇEK

İZMİR – 2010

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ALKOL DIŞI YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA KARACİĞERDE
COX-2 EKSPRESYONUNUN İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ ve HİSTOPATOLOJİK BULGULARLA İLİŐKİSİNİN
ARAŐTIRILMASI

Dr. Burcu ÜLKÜDEN
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi

Tez Danıőmanı
Prof. Dr. Ulus Salih AKARCA

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Baőkanı
Prof.Dr. Fehmi AKÇİÇEK

2010

Etik Kurul Onayı Karar No : 10-4.1/7

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.Ulus Salih AKARCA

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.Ömer ÖZÜTEMİZ

Üye : Prof.Dr.Gökhan KESER

Üye :

Üye :

Uzmanlık Tezinin kabul edildiği tarih:

TEŞEKKÜR

Başta, uzmanlık eğitimi süresince bizi her konuda destekleyen ve fırsatlar tanıyan, iyi bir hekim olarak yetişebilmemiz için özen gösteren, bilgi ve tecrübelerini sürekli aktaran, kliniğimize bilimsel çalışma ortamı kazandıran, tez çalışmamın konusunun belirlenmesinden tamamlanmasına kadar tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ulus Salih Akarca'ya ve tezimi hazırlamam ve sonuçları değerlendirmemde çok büyük yardımları olan Sayın Prof. Dr. Funda YILMAZ'a, değerli katkılarından dolayı şükranlarımı sunarım.

İmmunhistokimyasal çalışmadaki emekleri için Dilek PELVAN, Hayriye KÖKTAŞ, Süleyman TOSUN'a, vakaların sağlanmasındaki katkılarından dolayı Uzm. Dr Nalan ÜNAL'a, benden sevgilerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme; ihtisasım süresince gösterdikleri anlayış, destek,sevgi ve saygı dolu yaklaşımlarından ve beş yıllık eğitimim süresinde eğitimime olan katkılarından dolayı tüm hocalarım, uzmanlarım ve asistan arkadaşlarıma, ayrıca tezime maddi destek sağlayan Ege Karaciğer Derneği' ne teşekkür ederim.

Dr. Burcu Ülküden

2009

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL,RESİM VE TABLOLAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Alkol Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı	5
2.1.1. Tarihçe ve Tanım	5
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.2.1. İnsidans	7
2.1.2.2. Prevelans	7
2.1.3. Doğal Seyir	8
2.1.4. Etyoloji	10
2.1.5. NAYKH Patogenezi , Histopatoloji ve Sınıflaması	11
2.1.5.1. NAYKH Patogenezi	11
2.1.5.1.1. NAYKH Gelişiminde İlk Darbe: Steatoz	11
2.1.5.1.2. NAYKH Gelişiminde İkinci Darbe :Steatohepatit	13
2.1.5.1.2.1. Lipotoksisite Kavramı ve NASH	15
2.1.5.1.2.2. Apoptoz	17
2.1.5.1.2.3. İnflamasyon	18
2.1.5.1.3. İnsülin Direnci	20
2.1.5.1.4. NASH' te Hepatosit Fibrozisinin Moleküler Mekanizması	21
2.1.5.1.5. NAYKH ve Karsinogenez	26
2.1.5.2. NAYKH Histopatoloji ve Sınıflaması	32
2.1.5.2.1. NAYKH Histopatolojisi	32
2.1.5.2.2. Brunt' a Göre Sınıflama ve NAYKH Aktivite Skoru (NAS)	35
2.1.5.2.3. CRN Skorlama Sistemine Göre Sınıflaması	35

2.2.	Siklooksijenaz-2 (COX-2)	38
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1.	Amaç	42
3.2.	Hasta Seçimi	42
3.3.	Değerlendirilen Veriler	43
3.3.1.	Histopatolojik Değerlendirme	43
3.3.2.	İmmünohistokimyasal Değerlendirme	43
4.	BULGULAR	47
4.1.	Histopatolojik Bulgular	47
4.2.	İmmünohistokimyasal Bulgular	51
4.2.1.	COX-2 Ekspresyonu	57
5.	TARTIŞMA	63
6.	ÇALIŞMANIN KISITLILIKLARI	76
7.	SONUÇ VE ÖNERİLER	77
8.	ÖZET	78
9.	SUMMARY	79
10.	ÖZGEÇMİŞ	81
11.	KAYNAKLAR	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: NAYKH : Bir Hastalıklar Spektrumudur	1
Şekil 2: NAYKH Doğal Seyri	9
Şekil 3: <i>Denovo</i> Lipogenez, İnsülin Direnci ve Yağ Asidi Oksidasyonu	17
Şekil 4: İnsülin Direnci, İnflamasyon ve Oksidatif Stres	21
Şekil 5: Karaciğer Histolojisi ve Karaciğer Yıldızlı Hücre	23
Şekil 6: NASH Tedavilerinin Patofizyolojik Etkileri	26
Şekil 7: NFkappaB yolağı ve COX-2 İlişkisi	31
Şekil 8: Eikazonoitlerin Sentezi	39
Şekil 9: COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Patofizyolojik Etkileri	41
Şekil 10: COX-2 ,İnsülin Direnci ve NASH Patogenezi	69
Şekil 11: Oksidatif Stres ve NASH	71

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: H-E, Zon 3 Yağlanma, X 40	49
Resim 2: H-E, Zon 3 Yağlanma, X 100	49
Resim 3: H-E, Balonlaşma, X 400	50
Resim 4: M-T, Perisellüler Fibrozis, X 400	50
Resim 5: COX-2 Ekspresyon Şiddetinin Skorlanması X 40	59
Resim 6: COX-2 Ekspresyonunun Yoğunluğunun Skorlanması X 40	60
Resim 7: Santral ven çevresinde steatoz ve COX-2 pozitifliği X 40	61
Resim 8: Belirgin Artmış COX-2 Ekspresyonu X 40	62
Resim 9: Belirgin Steatohepatit ve Şiddetli COX-2 Ekspresyonu X 40	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1:	NAYKH Etyolojisi	11
Tablo 2:	NAYKH' da Fibrozis Mekanizmaları ve Tedavi Hedefleri	25
Tablo 3:	NASH' te Görülen Histopatolojik Lezyonlar	35
Tablo 4:	NAYKH CRN Sınıflama Sistemi	36
Tablo 5:	NAYKH Brunt Sınıflama Sistemi	37
Tablo 6:	NAYKH Aktivite Skoru (NAS Skoru)	37
Tablo 7:	Tüm Verilerin Korelasyon Analizi	52
Tablo 8:	COX-2 Boyanma Şiddeti ve Yağlanma Şiddeti İlişkisi	52
Tablo 9:	COX-2 Boyanma Yoğunluğu Ve Yağlanma Şiddeti İlişkisi	53
Tablo 10:	COX-2 Boyanma Şiddeti ve NAS Skoru İlişkisi	54
Tablo 11:	COX-2 Boyanma Yoğunluğu ve NAS Skoru İlişkisi	54
Tablo 12:	COX-2 Boyanma Şiddeti ve Balonlaşma İlişkisi	55
Tablo 13:	COX-2 Boyanma Yoğunluğu ve Balonlaşma İlişkisi	56
Tablo 14:	COX-2 Boyanma Şiddeti, Yoğunluğu ve Fibrozis İlişkisi	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

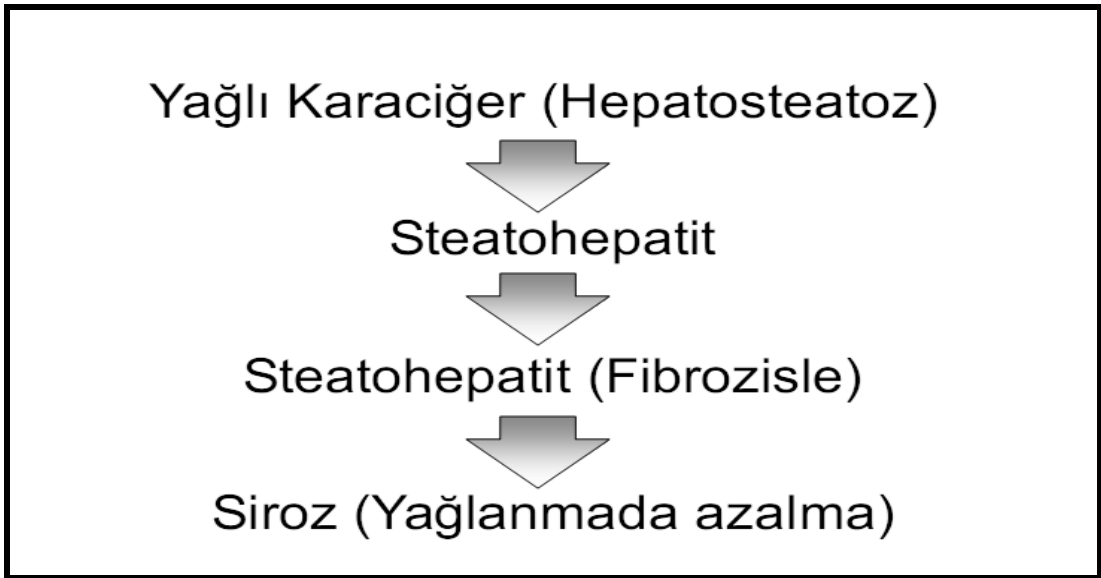
NAYKH	:	Alkol-Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	:	Alkol Dışı Steatohepatit
VKİ	:	Vücut Kitle İndeksi
DGAT	:	Açıl-Koenzim A: Diaçilgliserol Açıltransferaz
SYA	:	Serbest Yağ Asitleri
COX-2	:	Siklooksijenaz-2
LPS	:	Lipopolisakkarit
TNF α	:	Tümör Nekroz Faktör A
IL-6	:	İnterlökin 6
IL-1	:	İnterlökin 1
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
NAS Skoru	:	Alkol Dışı Yaşlı Karaciğer Hastalığı Aktivite Skoru
TIMP-1	:	Metalloproteinazların Doku İnhibitörü-1
TURDEP	:	Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması
NASH CRN	:	Alkol Dışı Steatohepatit için Klinik Araştırma Ağı
TZD	:	Tiazolidindion
PPAR gama	:	Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör Gama
UCP-2	:	Ayırıcı Protein-2
ER	:	Endoplazmik Retikulum
RAS	:	Renin Anjiyotensinojen Sistemi
TGF- β 1	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta1
HE	:	Hematoksilen Eozin
MT	:	Masson-Trikrom
MCD	:	Metiyonin Ve Kolinden Fakir Diyet
4-HNE	:	4 -Hidroksinonenal
CB 1& 2	:	Kannabioid Bağlayan Reseptör 1 ve 2
(SREBP) 1c	:	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein 1c
FATP	:	Yağ Asidi Taşıyıcı Ve Bağlayıcı Protein
ROS	:	Reaktif Oksijen Radikalleri
TLR-4	:	Toll Benzeri Reseptör 4
NF κ B	:	Nükleer Faktör Kappa B
SCD1	:	Stearol-Koenzim A Desatüraz 1
HSC	:	Karaciğer Yıldızsı Hücresi
TRAIL	:	Tumor nekroz faktör(TNF)-ilişkili apoptoz-arttırıcı ligand
IKK2	:	İnhibitör Kinaz Kappa 2
PG	:	Prostaglandin
LT	:	Lökotrien
JNK	:	Jun N-Terminal Kinaz
AP-1	:	Aktive Edici Protein 1

VLDL	:	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
DAG	:	Diaçilgliserol
CPT-I	:	Karnitin Palmitoil Transferaz I
MTP	:	Mikrozomal Trigliserid Transfer Protein
MAPK	:	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar
NEMO	:	Nükleer Faktör Kappa B Essential Modulator
HFD	:	Çok Yağlı Diyet
IRS-1ve 2	:	İnsülin Reseptör Substrat 1 ve 2
PI3 Kinaz	:	Fosfatidilinositol3-Kinaz
Akt	:	Alfa Serin/Treonin-Protein Kinaz
GSK-3	:	Glikojen Sentaz Kinaz 3
PKC	:	Protein Kinaz C
CTGF	:	Bağ Doku Büyüme Faktörü
ATII	:	Anjiyotensinojen II
AT 1 res	:	Anjiyotensin 1 reseptörü
Hh	:	Hedgehog sinyal ileti yolu
TNFR1	:	Tümör nekroz faktör reseptörü 1
IHC	:	İmmünohistokimya
NHANES III:	:	Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme Taraması
USG	:	Ultrasonografi
AA	:	Araşidonik Asid
TXA2	:	Tromboksan A2
15 HETE	:	15-Hidroksi Eikosa Tetra Enoik Asit
LXA4	:	15-Epi-Lipoksin A4
15&12 LO	:	15 ve 12 lipoksijenaz
Kd	:	Kilodalton
H.P	:	Helikobakter Pylori
CMV	:	Sitomegalovirüs
HSV	:	Herpes Simpleks Virüs
HBV	:	Hepatit B Virüs
PG	:	Prostaglandinler
E.Ü.T.F	:	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
ASH	:	Alkolik Steatohepatit
PBS	:	Fosfatla Tamponlanmış Salin
DAB	:	Diaminobenzen
ERK1/2	:	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1 ve 2
NSAID	:	Steroid Yapıda Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar
ASA	:	Asetilsalisilik Asit
SOCS3	:	Sitokin Sinyalleme Supresörü 3
JAK-STAT	:	Janus Kinaz-Transkripsiyon Sinyal İndükleyicileri
Ras-Raf	:	Ras ve Raf bir proto-onkogen ailesi ve kodlayan gen
MEKK	:	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz

mRNA : Mesajcı Ribonükleid Asit
RT-PCR : Eş Zamanlı- Polimeraz Zincir Reaksiyonları
MDA : Malondialdehit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkol Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAYKH), herhangi bir yangı olmayan basit steatozdan (yağlı karaciğer), belirgin fibrozis ve hatta siroz ile birlikte olan şiddetli yangısal bulgulara kadar değişen histopatolojik durumları kapsayan bir kronik karaciğer hastalığıdır [52,59] (Şekil 1) NAYKH' nın tanısında aşırı alkol kullanımı (kadınlarda 20 mg/gün, erkeklerde 40 mg/gün ve üzeri) mutlaka dışlanmalıdır [1,250].



Şekil 1:NAYKH bir hastalıklar spektrumudur

Yağlı karaciğerin patolojik tanımı, karaciğer kuru ağırlığının %5' ini aşacak şekilde karaciğerde lipid birikimi veya histopatolojik incelemede hepatositlerin %5' inden fazlasında makroveziküler yağlanma görülmesi olarak tanımlanabilir [2]. Bir sonraki aşama Alkol-dışı Steatohepatit (Nonalkolik Steatohepatit=NASH)' tir. Karaciğerde yağlanmaya (steatoz) ilaveten karaciğerde

zon III (sentrizonal) hepatositlerde aşağıdaki 3 özellikten ikisi varsa NASH tanısı konur [3,4,29].

1. lobüler yangı (mononükleer hücreler ve/veya nötrofiller ile birlikte nekroinflamatuvar odak olması)
2. mallory cismi ile beraber veya mallory cismi olmaksızın hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu
3. perisellüler fibrozis.

Yağlı karaciğer ve siroz gibi fibrotik karaciğer hastalıklarının altında yatan belli başlı nedenler obezite ve insülin direncidir [9,20,66]. Günümüzde erişkinlerde obezite ve insülin direncinin prevalansı giderek artmaktadır. Bu durum da, NAYKH' nı erişkinlerde potansiyel olarak en yaygın görülecek karaciğer hastalığı yapmaktadır [62]. Bu nedenle progresif seyreden ve ciddi etkileri olan NAYKH 'nın altında yatan patofizyolojik mekanizmaları anlamak ve etkin tedavi stratejileri geliştirmek önemlidir.

Yağlı karaciğerin en sık nedenleri aşırı kilo, alkol, hiperlipidemi ve Tip 2 Diyabetes mellitus(DM)'tur [8]. Bütün dünyada yaklaşık 120 milyon insanın klinik olarak asırı kilolu olduğu (BMI≥30 kg/m²) ve ayrıca 210 milyon insanın da fazla kilolu (BMI 25–29,9 kg/m²) olduğu bulunmuştur. Asırı kilolu kisilerin (BMI≥30 kg/m²) % 60–90' ında yağlı karaciğer vardır [11]. Ayrıca BMI (Vücut Kitle İndeksi) normal olan ama bel-kalça çevresi artmış kisilerde yağlı karaciğer gelisebilmektedir [13,201]. Asırı kalorili beslenme, ilaç alımı, metabolizma bozuklukları, kronik hastalıklar, infeksiyonlar, endokrinopatiler karaciğer

yağlanmasına sebep olabilmektedir [8]. Son yıllarda yapılan TURDEP çalışmasının sonuçlarına dayanarak erişkin Türk toplumunun %7.2'sinin tip 2 diyabetli ve %33.9' unun obez (genelde %33.9, kadınlarda 39.6, erkeklerde %28) olduğu gerçeği göz önüne alındığında ,ülkemizde NAYKH sıklığının küçümsenmeyecek oranlarda olması gerektiği görülmektedir [18,19].

Normal karaciğer dokusunda görülmemesi ve NAYKH patogenezinde de oynayan TNF α , IL-6, IL-1 gibi yangısal sitokinlerle ve oksidatif stese yol açan NOS gibi enzimlerle uyarılabilmesi nedeniyle NAYKH progresyonunda moleküler bir belirleyici olduğunu düşündüğümüz COX-2' nin NAYKH' da karaciğerde ekspresyonuna odaklanmış sadece birkaç çalışma vardır. Mingbo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçan karaciğerinde deneysel NAYKH modelinde karaciğerde COX-2 ekspresyonunun karaciğerde inflamasyon ve hasarın derecesine paralel olarak arttığı bulunmuştur [27]. Bizim çalışmamıza ışık tutan bu çalışma dışında insan NAYKH nda COX-2 ekspresyonu ve patogenik etkilerine odaklanan çalışma bildiğimiz kadarı ile yoktur. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmaların NAYKH patogenezinin anlamadaki rolü büyüktür, çünkü insanda bu amaçla karaciğer biyopsisi gibi girişimsel yöntemler genelde uygulanmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, karaciğer iğne biyopsilerinde, NASH fibrogenezinde önemli rol oynama ihtimali olan COX-2' nin immünohistokimyasal olarak yoğunluğunu ve dağılımını araştırmak, normal karaciğer dokusu ve NASH' teki histopatolojik değişkenlerle karşılaştırmaktır. Bu amaçla kurumumuzda daha önce yapılmış 50 NAYKH ve 4 normal olgunun karaciğer biyopsilerini histopatolojik olarak

inceledik, Brunt NAYKH Evreleme sistemine göre evrelendirdik, NAYKH Aktivite Skoru' na (NAS) göre skorladık ve grupları immunhistokimyasal olarak COX-2 ile boyadık. Elde ettiğimiz veriler arasındaki farkları ve bağlantıları istatistiksel olarak inceledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Alkol Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı

2.1.1.Tarihçe ve Tanım

Geçtiğimiz yüzyılda otopsi serilerine dayanarak, obez hastalarda nedeni bilinmeyen bir siroz olabileceği zaman zaman dikkat çekmişti. Ama bunun bir neden sonuç ilişkisinde olduğu ve oluş mekanizması aydınlatılmamıştı. İlk kez 1962 yılında H. Thaler tarafından anlamlı miktarda alkol kullanmayan, fakat alkolik steatohepatit ile uyumlu histolojik özelliklere sahip bir vaka bildirilmiştir [30]. Psödoalkolik karaciğer hastalığı, alkol-benzeri hepatit, diyabetik hepatit, nonalkolik Laennec's hastalığı ve steatonekroz gibi farklı terimler kullanılmıştır [31]. 1980 yılında Mayo Klinik'ten Ludwig ve arkadaşları anormal karaciğer testleri olan ve alkol hikayesi olmadığı halde alkolik hepatite benzer histolojik bulguları olan 20 adet orta yaşlı hastada görülen karaciğer hastalığını tanımlamak için nonalkolik steatohepatit (NASH) tanımlamasını kullanmışlardır [204]. 1986 yılında bu hastalığın "Alkol Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı" olarak adlandırılması önerilmiştir; çünkü NAYKH , bu tablo bir ucunda basit karaciğer yağlanması olduğu diğer ucunda ise sirozun yer aldığı geniş bir spektrumdur ve NASH bu spektrumun sadece bir bölümünü oluşturmaktadır.

1998 yılında Day ve James ileri sürülen "iki darbe" hipotezine göre [33], birinci darbeden sorumlu etken ile karşılaşan karaciğerde yağlanma süreci

başlamakta ve hasta başka bir ek faktörle karşılaşmadıkça bu süreç yağlanma olarak sebat etmektedir. Yağlanma ile duyarlı hale gelmiş olan karaciğer ikinci darbe ile karşılaştığında iltihabi infiltrasyon ve fibrozis süreci başlamaktadır [33]. Bu modelde birinci darbeden sorumlu tutulan faktör insülin direncidir [34]. Karaciğer yağlanması; hangi nedene bağlı olursa olsun lipidlerin karaciğer ağırlığının %5'inden fazlasını oluşturması veya histopatolojik incelemede hepatositlerin %5'ten fazla yağ vakuolü içermesi olarak tanımlanmaktadır [35]. NAYKH alkole bağlı olmayan tüm karaciğer yağlanmalarını kapsar. Bu tanım içerisinde yer alan basit yağlanma selim seyirlidir, yangı gelişmemiştir. NASH hiç alkol kullanmayan veya az miktarda (günde 20-30 gr'ın altında) alkol kullanan, histopatolojik olarak alkolik karaciğer hastalığından ayırt edilemeyen, yağlanma ve birlikte nekroinflamasyon ve/veya fibrozisin eşlik ettiği kronik seyirli klinikopatolojik tabloyu ifade eder [36]. Histopatolojisinde karışık tipte iltihabi infiltrasyonun dışında, hepatositlerde balonlaşma ve/veya Mallory cisimleri (zon-3' te balonlaşmış hepatositler içinde yer alan asidofilik yapılar) ve/veya fibrozis gibi bulgular vardır. Basit yağlanma ve NASH birbirinden farklı gibi görünse de, basit yağlanma klinik spektrumun ilk basamağını oluşturmaktadır [5-8]. NASH; dünya genelinde sıklığı giderek artan, patogenezinde hayat tarzı ve genetik faktörlerin önemli rol oynadığı karmaşık bir metabolik durum olan NAYKH' nın en ciddi formudur. Kronik karaciğer hastalığı ve siroza ilerleyebilmesi hastalığın önemini giderek artırmaktadır [7,14,10,34,37,54].Deneyimli bir patolog tarafından incelenen karaciğer biyopsisi NAYKH ve NASH ayırımında, nekroinflamasyon şiddeti ve fibrozisin varlığı ve yaygınlığını belirlemede mut-

laka gerekli bir tanı yöntemidir. Fakat NAYKH için henüz etkili bir tedavi yönteminin henüz bulunmamış olması, sadece tanının doğrulanması amacıyla karaciğer biyopsisi yapılması anlaşılabilir rahatsızlık yaratmaktadır.

2.1.2.Epidemiyoloji

NAYKH şu anda dünyanın birçok bölgesinde kronik karaciğer hastalığının en sık görülen formudur. NAYKH epidemiyolojisi halen yoğun araştıma alanıdır. NASH tanısında girişimsel olmayan testlerin tanı için kısıtlı olması nedeniyle NASH insidansı ve prevelansı tam olarak bilinmemektedir. NAYKH' nda karaciğer enzimleri yüksek veya normal olabilir. NAYKH ve normal karaciğer enzimleri olan bazı olguların biyopsilerinde bazı çalışmalarda NASH ve hatta siroz saptanmıştır.[38,39].

2.1.2.1.İnsidans

NAYKH insidansı tam bilinmemektedir ve bu konuda yapılmış çalışma sayısı görece olarak azdır. Japonya' da Suzuki ve arkadaşları [40] hükümet çalışanlarının rutin sağlık verilerinden yararlanarak bir saha çalışması yapmıştır. Nedeni bilinmeyen serum aminotransferaz yüksekliği baz alınarak, yıllık NAYKH insidansı 31/1000 kişi olarak hesaplanmıştır. Yine Japonya' da, rutin sağlık kontrolünde 3147 sağlıklı olguda 414 günlük takip süresinde, 308 yeni NAYKH olgusu rapor edilmiştir [41]. Bu tahmini yıllık insidans hızının %10 olarak saptandığı çalışma çeşitli sınırlılıklarla birlikte, NAYKH insidansının değerlendirildiği ilk prospektif çalışmadır.

2.1.2.2.Prevelans

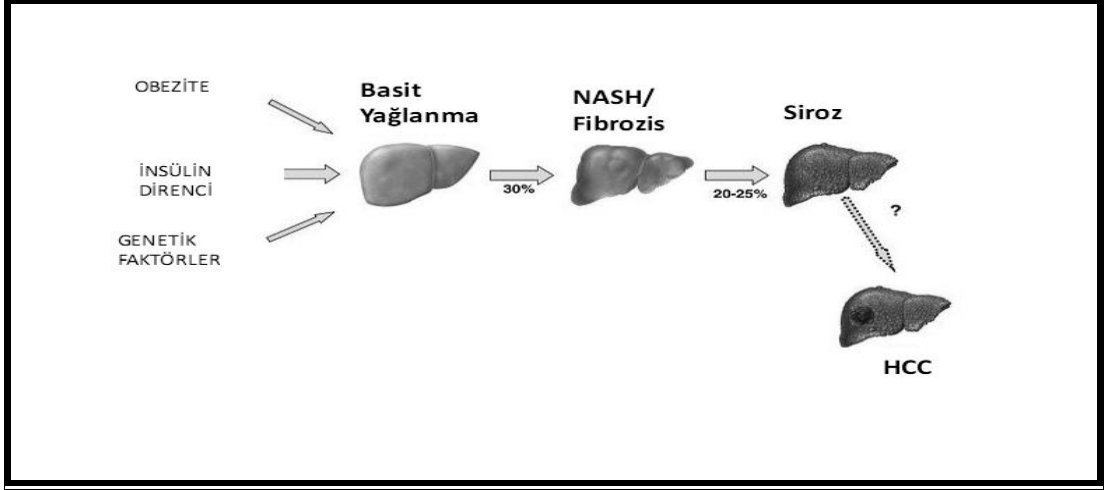
NAYKH' nin prevalansı, üzerinde çalışılan nüfusa ve kullanılan tarama testine bağlı değişir. Seçilmiş vaka gruplarında (DM, morbid obez) yapılan çalışmalarda NAYKH prevalansı yüksek bulunurken, seçilmemiş popülasyonlarda düşük saptanmıştır. Genel popülasyonda NAYKH prevalansı değişik çalışmalarda %3-37 saptanmıştır.

Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme Taraması' nda (NHANES III), Amerikalıların % 23' nde NAYKH olduğunu göstermiştir. [42-44]. Bu çalışma sonucunda NAYKH' nin erişkinde en sık transaminaz yüksekliği nedeni olduğu sonucuna varılmıştır [11-17,41,45-51]. NAYKH prevalansı risk faktörlerinin (örn. obezite,DM) prevalansındaki artışına paralel seyretmektedir [10,53]. NAYKH prevalansı diyabetik olgular arasında %63, obezite cerrahisi geçirenlerde %96'dır [39,54,55]. Obezite cerrahisi geçiren hastalarda NAYKH prevalansı %96, NASH prevalansı %12 ile %25 arasındadır [39,55,56]. Falck-Ytter ve arkadaşları, genel popülasyonda USG ile yapılan çalışmalarda NAYKH prevalansı % 16-23, otopsi serilerinde NAYKH prevalansı % 16-24, NASH prevalansı % 2.1-2.4, karaciğer biyopsi serilerinde NAYKH prevalansı % 15-39, NASH prevalansı % 1.2- 4.8 arasında bulunmuştur [57].

2.1.3.Doğal Seyir

Son on yıl içinde NAYKH' nin doğal seyrini anlamada bir artış olmuştur [62]. Şekil 2 de NAYKH' nin doğal seyri özetlenmektedir. NAYKH doğal seyrinin tanı anındaki histolojik alt tipe bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Tanı anında yağlı karaciğer yada nonspesifik inflamasyonla birlikte yağlı karaciğer genelde selim seyrederken, tanı anında NASH ilerleyici fibrozis gösterebilir.

İlerleyici hastalığın kesin oranı ve ilerleyici hastalık belirteçleri hala araştırma konusudur. NASH-ilişkili siroz karaciğer yetmezliği ve HCC' ye ilerleyebilmektedir. (Şekil 2)



Şekil 2: NAYKH Doğal Seyri

Siroz öncesi aşamada, fibrosizin durması ve hatta iyileşmesi mümkündür. Yapılan bir çalışmada, az sayıda NASH olgusunun takipte basit yağlanmaya intikal ettiği gözlenmiştir [36].

NAYKH' nın doğal seyrini incelemek için eşleştirilmiş biyopsi çalışmaları kullanılmaktadır. Bu çalışmaların bir takım sınırlılıkları vardır. Bunlar;

1. biyopsi için seçilen hastalar, özellikle seri biyopsiler için seçilenler seçilmeyenlere göre farklı olabilir;
2. biyopsiler arasındaki takip süresi değişken uzunlukta olabilir;
3. karaciğer biyopsisi örnekleme değişkenlik gösterebilir;
4. bazal biyopsilere sirozlu hastalar da dahil edilmiş olabilir;
5. NAYKH' nın metabolik risk faktörlerinin zaman içindeki değişimini bilinemeyebilir. Bu sınırlılıklara rağmen, bu çalışmalar NAYKH' nın doğal sey-

rinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Çalışmalarda, 3.5-5 yıllık takipte NASH olgularının % 50' sinde fibrozisin ilerlediği, % 20' sinde siroz geliştiği görülmüştür [62]. NASH olgularının % 50' sinde fibrozis değişmez ya da düzelir [62]. Daha geniş ve daha iyi tanımlanmış kohortlarda 3.2-5.6 arasında medyan takipte NASH olgularının % 26-37 sinde fibrozisin ilerlediği saptanmıştır [36,63,64]. Aynı takip süresinde iki çalışmada NASH olgularının % 9' unda siroz gelişmiştir [60,61]. Siroz için bağımsız risk faktörleri diyabet ve tanı anındaki fibrozistir [58,65]. NASH ilerleme ya da gerilemesini belirlemek için karaciğer biyopsisi gereklidir ve biyopsi tercihen en az dört yıl aradan sonra yapılmalıdır [36].

NAYKH' nın kriptojenik sirozun çoğunun altında yatan neden olduğu düşünülmektedir [20]. Kriptojenik sirozların %70' ten fazlası son dönem NASH ile açıklanabilir [20,21]. Şekil 3' te NAYKH doğal seyri özetlenmiştir.

2.1.4.Etyoloji

NAYKH birçok klinik durum ve/veya hastalıkla ilişkili olabilir. Bu nedenle hastalığı primer ve sekonder olarak ikiye ayırmak mümkündür.

Primer NAYKH	Sekonder NAYKH	
<u>İnsülin Direnci Sendromu Olanlar</u> DM Obezite Hiperlipidemi Metabolik Sendrom Leptin Eksikliği veya Direnci	<u>İlaçlar</u> Glukokortikoidler Sentetik Östrojenler Fosfor Amiodaron Perheksilin Kalsiyum Kanal Blokerleri Tetrasiklin Tamoksifen Metotreksat Antiviral ilaçlar Valproik asit Kokain alışkanlığı Nükleozid analogları Organik çözücüler <u>Cerrahi nedenler</u> Gastropleksi Jejunoileal Bypass İnce barsak rezeksiyonu Biliyopankreatik diversiyon Bakteriye aşırı çoğalma	<u>Metabolik hastalıklar</u> Galaktozemi Tirozinemi Fruktoz İntoleransı Sistinüri Sandhoff Hastalığı Sistemik karnitin eksikliği Wilson Hastalığı <u>Sistemik Hastalıklar</u> Kaşeksi Isı çarpması İnflamatuvar barsak hast. Weber-Christian Hastalığı Kistik Fibrozis HBV, HCV <u>Genetik Hastalıklar</u> Abetalipoproteinemi Ailesel Hipobetalipoproteinemi Tıp 1 Glikojen Depo Hastalığı Hızlı Kilo kayıpları

Tablo 1: NAYKH Etiyolojisi

2.1.5.NAYKH Patogenezi , Histopatoloji ve Sınıflaması

2.1.5.1.NAKYK Patogenezi

2.1.5.1.1.NAYKH Gelişiminde İlk Darbe: Steatoz

NAYKH patogenezi kesin olarak bilinmemektedir [67]. İnsülin Direncinin (IR) temel neden olduğu büyük ölçüde kabul görmüştür [67,68]. NAYKH' de olgularında sistemik insülin direnci vardır, ama özellikle beyaz yağ doku (WAT) ve kas doku insülin direncinin patogenezi belirleyici olduğu düşünülmektedir [67]. Karaciğer nakli sonrası NAYKH' nin yinelenmesi [69], bu düşünceyi doğrulamaktadır. Periferik IR, WAT lipolizinde artma, karaciğere

serbest yağ asitlerinin(SYA) akışında artmayla sonuçlanır [205]. İzotop işaretleme yöntemiyle WAT lipolizi sonucu elde olunan serum SYA' lerinin karaciğer trigliserit deposunun % 60' ından sorumlu olduğu görülmüştür [72]. Azalmış periferik insülin etkisi, hiperinsülinemi oluşmasına yol açar. Oluşan hiperinsülineminin karaciğer üzerine etkisi *denovo* lipogenezi artırma yönündedir [70,71,206]. *Denovo* lipogenez,karaciğer trigliserit deposunun % 25' inden sorumludur ve sterol düzenleyici element-bağlayıcı protein-1c (SREBP-1c) ve karbonhidrata yanıt veren element-bağlayıcı protein (ChREBP) ve peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptör gama (PPAR)- γ gibi transkripsiyon faktörlerinin karaciğerde artmış aktivitesinin sonucudur [73]. Bozulmuş karaciğer yağ asidi oksidasyonu ve/ve ya çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) bozulmuş sentez ya da sekresyonu daha az önemli yollardır. Esas olarak visseral WAT karaciğere SYA akışının ana kaynağıdır [73,74,]. NAYKH patogenezinde yağ dokusundan kaynaklanan hormonların etkisi yakın geçmişte büyük önem kazanmıştır [74]. Vücudun en büyük endokrin organı olan WAT en az bir düzine protein salgılar. Bu proteinler topluca **adipokinler** veya **adipositokinler** olarak isimlendirilirler ve insülin duyarlılığı üzerinde etkileri vardır. NAYKH' nda adiponektin, leptin ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)' nın rolü ile ilgili önemli düzeyde kanıt elde edilmiştir [75-76]. Adipokin dengesinde bozulma (adiponektin düzeyi azalırken, TNF- α düzeyinin ve karaciğer leptin direncinin artması) karaciğerde TG birikimine katkıda bulunmaktadır. Leptin ve Adiponektin dışında diğer adipokinler örn;Resistin, Visfatin ve Apelin de NAYKH patogenezinden sorumludur [76]. Diyetel faktörler de steatoza katkıda bulunabilir [77]. Kilolu diyabetik olmayan olgularda,

yüksek yağlı diyetin sadece 10 gün içinde karaciğer yağ içeriğinde % 35 artış yaptığı görülmüştür [78]. Hayvan modellerinde özellikle fruktoz gibi basit karbonhidratlar ve yağ, karaciğerde *denovo* lipogenezi arttırarak yağlanmaya yol açmıştır [79]. Bu durum diyetsel fruktozun *denovo* lipogenezi ChREBP aktivasyonu yoluyla arttırması ile açıklanmıştır [80,81,207]. Aşırı diyetsel fruktoz tüketimi NAYKH için bir risk faktörüdür [80,81]. TG sentezinin son basamağını katalizleyen enzim açıl-koenzimA:diaçilgliserol açıltransferaz'ın (DGAT) antisens oligonükleotidlerle spesifik inhibisyonu obez, diyabetik farelerde yağlanmayı azaltmış, fakat ilerleyici NAYKH sonuçlandığı saptanmıştır [24,93]. TG depolanmasının NAYKH' da karaciğer hasarını (NASH) ve fibrozis gelişimini sınırlandırdığı ileri sürülmüştür [25,26,86,88,202,203,]. TG sentezinin düzenlenmesindeki bireysel farklılıklar, neden sadece bazı NAYKH olgularında ilerleyici karaciğer hastalığı geliştiğini açıklayabilir [8]..

2.1.5.1.2.NAYKH Gelişiminde İkinci Darbe:Steatohepatit

Genetik ve çevresel faktörler dahil olmak üzere farklı belirleyicilerin etkileşimi sonucu NAYKH gelişmektedir [209,210]. 1998 yılında Day ve James tarafından ortaya atılan '*çift hasar hipotezi*, ne göre ilk hasar İnsülin Direnci tarafından gerçekleştirilmektedir [33]. Yağlanan hepatositler ikinci hasara daha hassas hale gelir ve ikinci hasarla (oksidatif stres, ER stres, mitekondriyal fonksiyon bozukluğu, endotoksin aracılı hasar,v.b) NASH gelişmektedir. Yağ asidi metabolizmasından beta oksidasyon yolu ile üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), hepatosit hasarının temel nedenidir. Nekroz ve

apoptoz, karaciğer inflamasyonunun ve karaciğer yıldız hücrelerinin (HSC) aktivasyonu sonucu oluşan fibrojenin tetiğini çeker. 'Çift Hasar Teorisi, birkaç kez gözden geçirilmiştir. Steatohepatite yol açtığı deneysel olarak kanıtlanmış etkenlerin yağlanma da yaptığı verisinden yola çıkarak, steatoz ve steatohepatite neden olan tek bir mekanizma olasılığı üzerinde durulmuş [82], lipotoksisite kavramı ortaya atılmıştır [84]. Bu kavramı açıklamak için visseral yağ dokudan karaciğere SYA akışı, SYA karaciğerde trigliserit olarak depolayan "iyi yağ depolayanlar" ve karaciğerde TG dışı lipid depolayan "kötü yağ depolayanlar" olarak iki gruptan bahsedilebilir [91]. Lipotoksisite kavramını destekleyen karaciğer yağ içeriğiyle ilgili genetik olarak belirlenmiş bireysel farklılıkların varlığı Romeo ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir [83]. İyi yağ depolayanlar da ancak eşlik eden ikinci bir hasar varlığında NASH gelişebilir, eğer ikinci hasar gerçekleşmezse sadece yağlanma sebat eder [84]. Kötü yağ depolayanlar da kaçınılmaz olarak NASH gelişir, bu neden yağlanmanın genellikle azaldığını ve kaybolduğunu açıklamaya yardımcı olabilir [85]. İn vitro hepatosit/hücre kültürü modelleri, benzer miktarda yağlanmaya neden olmalarına rağmen doymuş SYA' nin (palmitik veya stearik asit) tekli-doymamış SYA' nden (palmitoleik veya oleik asit) daha hepatotoksik olduğunu göstermiştir [87]. Oleik asitten zengin diyet karaciğerde TG birikimi ile sonuçlanır, oysa fazla palmitik asit TG oluşumu ile zayıf ilişkisi nedeniyle karaciğerde lipoapoptoza neden olur [86]. Doymuş SYA, doymamışlara göre daha fazla ER strese yol açmaktadır [211].

2.1.5.1.2.1.Lipotoksisite Kavramı ve NASH

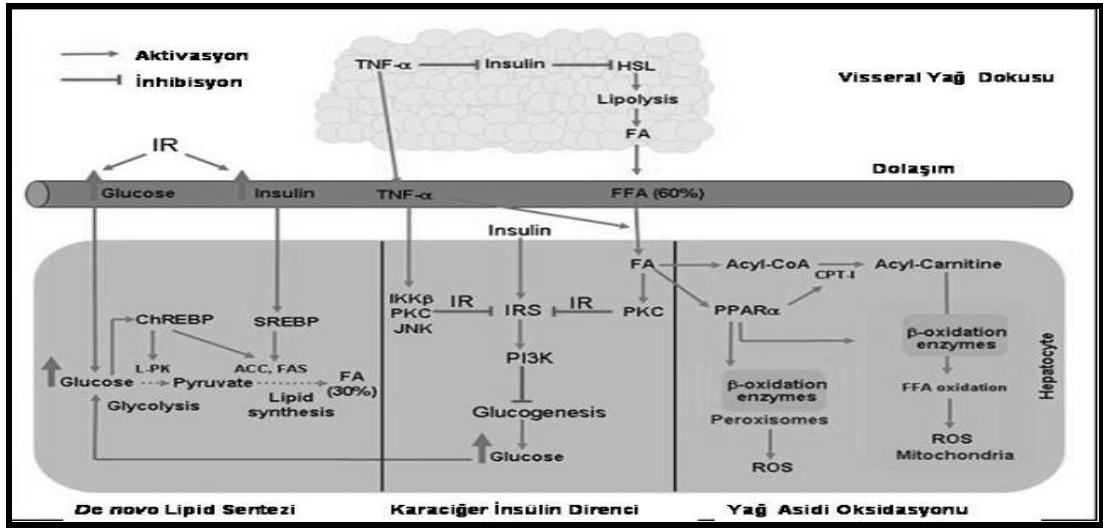
Karaciğer lipotoksisitesi karaciğerin SYA depolama kapasitesinin aşılması ile ortaya çıkar [90]. NASH gelişimi ve ilerleyici karaciğer hastalığı, karaciğer lipotoksisitesinin doğal bir sonucu olarak görülüyor olabilir [73,89]. Yağ dokusu dışındaki hücre ve dokuların yüksek konsantrasyonlarda SYA, TG ve kolesterole kronik maruziyeti IR, tip II DM ve metabolik sendrom patogenezine katkıda bulunan lipotoksisiteyi tetikler [90,91]. Karaciğerin artmış SYA içeriği, farklı mekanizmalar ile lipidlerin karaciğerden uzaklaştırılması yoluyla dengelenmeye çalışılır. Bu mekanizmalardan biri artırılan SYA oksidasyonudur. SYA oksidasyonu mitokondride, peroksizomlarda ve mikrozomlarda olur. Kısa ve orta zincirli SYA sadece mitokondride okside olur [95]. Uzun ve çok uzun zincirli SYA, ilk önce mikrozom ve peroksizomlarda kısalırlar ve daha sonra mitokondride okside olurlar. Karaciğerin yağlanmaya karşı adaptasyon mekanizmalarından biri de artmış SYA' nin mitokondriye girişlerini arttırmaktır. Bu durum mitokondri dışı membranında bulunan ve uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri içine alınmasını sağlayan karnitin palmitoil transferaz I (CPT-I) enziminin ekspresyonunun artması ve bu enzimin inhibitörü olan malonil Co-A'nın azalması yoluyla olur [212].

Genetik olarak obez olan ob/ob farelerde ve NASH olgularında SYA mitokondriyel yollar ve/veya mitokondri-dışı yollarla (mikrozom, peroksizom) oksidasyonunun arttığı gösterilmiştir [213]. Mitokondri sadece SYA oksidasyonunda ve enerji üretiminde rol oynamaz, aynı zamanda ROS' ların ana kaynağıdır. Mitokondriyel beta oksidasyon kapasitesinin aşılmasıyla lipid per-

oksidasyon ürünleri solunum zincirini bozar fakat NAYKH' nda mitokondriyel solunum zinciri aktivitesi, artan şekilde devam eder [87,97] ve ROS oluşumu daha da artar [95]. Mitokondriyel fonksiyon bozukluğu (aşırı mitokondriyal ROS oluşumu yoluyla) steatozun steatohepatite progresyonuyla yakından ilişkilidir [85,94-96]. Li ve arkadaşları, invitro ve invivo yaklaşımlar kullanarak deneysel NASH' de mitekondriyel SYA oksidasyonunun taşması, lizozomal bozulma, katepsin B ve mitokondriyal disfonksiyon arasında potansiyel bir bağlantıyı göstermiştir [98]. SYA karaciğerden uzaklaştırılmasında ikinci yol, karaciğerden VLDL atılımı yoluyla [214 ERve golgi aparatının lümeninde bulunan mikrozomal trigliserid transfer protein (MTP), apolipoprotein B' nin VLDL partikülü içine katılımını sağlar.

Hepatoselüler TG depolaması tek başına doğrudan hepatotoksik gibi görünmemekle birlikte hepatositin potansiyel toksik SYA maruz kaldığının bir göstergesi olabilir [91,92,215]. Bunun yanısıra, deneysel NAYKH/NASH modelleri ve insan NASH' inde, mitokondriyel yapısal değişiklikler tanımlanmıştır [99]. Bu yapısal değişiklikler boyuna ya da küresel balonlaşmalar ve elektron mikroskopik incelemede mitekondri içinde yer alan kristal inklüzyonlarından oluşmaktadır. Bu kristal inklüzyonlarının fosfolipid türevi olduğu ve muhtemelen oksidatif stres göstergesi olduğu düşünülmektedir [216,270]. Ancak yapısal değişiklikler ve mitekondriyel fonksiyon bozukluğu arasındaki hassas ilişkiler iyi anlaşılammıştır. Özetle, mevcut veriler mitekondriyel disfonksiyonun yağlı karaciğerde hasarın başlamasından ve NASH' e progresyonundan sorumlu olay olabileceğini düşündürmektedir [212].

NAYKH patogenezinde ER stres için deneysel kanıtlar son zamanlarda oluşmaya başlamıştır. Uzun zincirli doymuş SYA' ne kronik maruziyet ER stresine ve hepatosit ölümüne yol açmaktadır [100]. Öte yandan,ER stresi, Apo B100 sentezini inhibe ederek, VLDL yoluyla hepatik TG atılımını azaltır ve steatozu kötüleştirir [101]. Son veriler ER stresin ve *denovo* lipogenezin transkripsiyonel kontrolünü gösteren bağlantı ortaya çıkarmıştır [102].



Şekil 3: *Denovo* Lipogenez, Karaciğer İnsülin Direnci Ve Yağ Asidi Oksidasyonu

2.1.5.1.2.2. Apoptoz

Hepatosit apoptozu NASH' in önemli bir histopatolojik özelliğidir ve ilerleyici inflamasyon ve fibrozis ile ilişkilidir [90]. Apoptoza duyarlılık basit yağlanmadan NASH'i ayırmaktadır [90]. Artmış serum sitokeratin-18 parçaları (hepatosit apoptozis belirteçleri olarak) NASH' te artmıştır ve basit karaciğer yağlanması ve NASH' i ayırmak için kullanılmaktadır [103,104,105]. Son zamanlarda SYA, TLR-4 ligandı olarak çeşitli karaciğer dışı hücrelerde bu membran reseptör birleşmesinde görev almaktadır [90,91,106]. Doymuş SYA Fas ve TRAIL gibi hücre içi ölüm reseptörlerini aktive ederek apoptoza yol

açmaktadır [107,108]. Doymuş SYA, NFκB ve TNF-α aktivasyonu ile katepsin B nin serbestleşmesine, lizozom stabilizasyonunun bozulmasına ve c-jun N-terminal kinaz bağımlı proapoptotik bir protein olan Bax' ın aktivasyonuna neden olur [87,98,109-111].Doymuş uzun zincirli SYA lipoapoptozu indükleme kapasitesi doymamış SYA' ne göre daha fazladır [91] Apoptoz, karaciğer hasarına katkıda bulunsa da, inflamasyon ve fibrozisin apoptozla beklenen ya da öngörülenden daha hafif olması beklenebilir. NAYKH ve lipotoksisite kavramı içinde apoptozun hastalık ilerleyişindeki tam rolü keşfedilmeyi beklemektedir.

2.1.5.1.2.3.İnflamasyon

İnflamasyon ve İnsülin Direnci, NAYKH ve NASH patogenezinde rol oynar.İnflamasyon, NASH ve basit steatozu birbirinden ayıran anahtar faktörlerden biridir [114]. JNK-AP-1(C-Jun N-terminal kinaz –Aktive edici Protein-1) ve IKK-NFκB (İnhibitör Kinaz Kappa B–Nükleer Faktör-Kappa B)' den oluşan iki ana inflamatuvar yolun steatohepatit gelişiminde sorumlu olduğu düşünülmüştür [114]. JNK mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) ailesinin bir üyesidir ve serum SYA veya endotoksinle etkinleştirilmektedir. JNK çeşitli obezite hayvan modellerinde aktivitesi artan bir transkripsiyon faktörüdür ve NASH' te de aktivitesinin arttığı saptanmıştır [87,135,115–119]. Farklı JNK izoformlarının, JNK1 veya JNK2, karaciğere özel olarak yok edilmesiyle sistemik ve karaciğer insülin duyarlılığının artırılabilceğine yönelik kanıtlar elde edilmiştir[118–120]. Tek başına JNK1 inhibisyonu yağlanmayı azaltmış, JNK2 inhibisyonunun yağlanma üzerinde etkisi

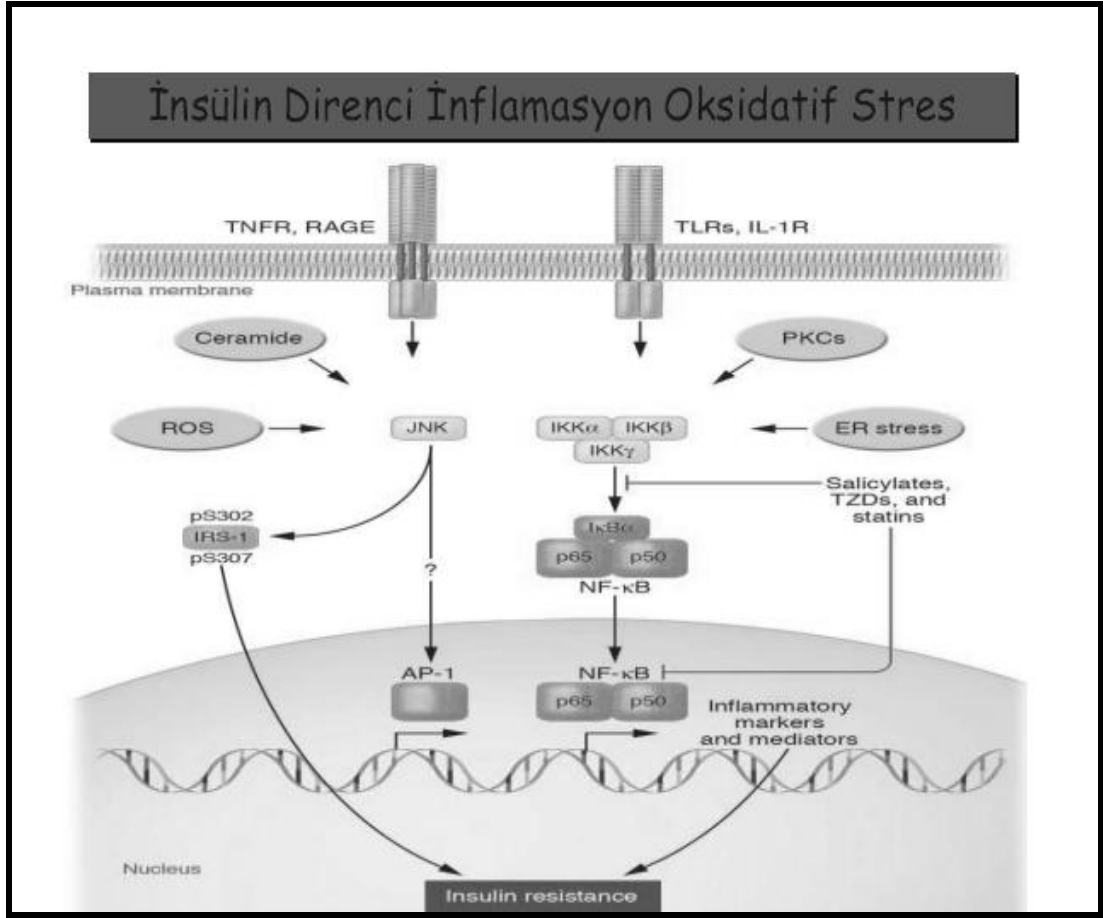
görülmemiştir [118,119]. JNK1 inhibisyonu ile serum TG düzeylerinde belirgin bir artış saptanmıştır, bu sonuç JNK1'in IR' den bağımsız olarak karaciğer lipid metabolizmasına etki ettiğini düşündürmektedir [120–122]. JNK yanısıra, NFκB yolu NAYKH hayvan modellerinde en önemli patogenetik mekanizmalardan biridir [123]. NFκB inflamasyonun düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörüdür. IKK2 akut inflamasyon sırasında gerekli olan NFκB aktivasyonu için en önemli düzenleyici proteindir [124]. IKK2' nin aşırı ekspresyonunun NFκB nin süregelen aktivitesine yol açarak, karaciğerde belirgin, periferde ılımlı bir İnsülin Direnci' ne yol açar [125]. Tersine hepatosite özgü IKK2 yokedilmiş fareler yüksek yağlı diyetle maruz bırakıldıklarında karaciğerde insülin duyarlılığı korunur, kas ve yağ dokusunda IR gelişir. IKK2' nin sistemik inhibisyonu, diyetle uyarılan NASH modelinde yağlanmanın NASH' e ilerlemesini engellemiştir [127]. NFκB inhibisyonunun derecesi karaciğer hasarını belirleyebilir[130]. Buna örnek olarak NFκB aktivitesi tamamen bitirilmiş, NEMO (NFκB essential modulator/IKKγ) yokedilmiş hayvanlarda, IKK2 inhibisyonu aksine klasik ve alternatif yolların tamamen durdurulmasına bağlı olarak artmış apoptoz, inflamasyon ve iskemi/reperfüzyon ilişkili karaciğer hasarı, NASH ve HCC gelişimi artmıştır[128,129]. NAYKH patogenezindeki inflamatuvar yolları aktive etmekle sorumlu mekanizmalar gün geçtikçe daha iyi anlaşılabilir. Önce de bahsedildiği gibi, karaciğere SYA akımının karaciğerde inflamasyonu tetikleyebilecek sayısız etkileri vardır. Örneğin, ER stres-UPR (Unfolded Protein Responce) aktivasyonu ve inflamatuvar bir yolak başlatan transkripsiyon proteini JNK birbiri ile ilişkilendirilmiştir [121].

Obezitedeki barsak mikrobiyal flora değişiklikleri [131,132], önemli bir endotoksin kaynağıdır [122,274].Çok yağlı diyet (HFD), plazma lipopolisakarid(LPS) düzeylerini artırır.HFD ve LPS artışı yağlanma ve karaciğer IR üzerine benzer etkilere sahiptir [121].Barsak kaynaklı bakteriyel ürünler veya doğrudan yüksek SYA düzeyleri sonucunda aktive olan TLR-4 bu mekanizmadan sorumludur. Bu sonuca CD14 (TLR-4 eş reseptörü) mutant farelerin LPS ve HFD ile uyarılmış NAYKH' na dirençli olduğu gözleminde yola çıkılarak varılmıştır [133]. Ek olarak, yağlanma ve karaciğer hasarı TLR-4 mutant, metiyonin ve kolinden fakir diyetle (MCD) beslenen farelerde,aynı diyetle beslenen normal farelere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur [133,269]. Kupffer hücreleri karaciğerdeki en önemli TLR-4 barındıran hücre grubudur [133].Ayrıca, TLR-4 yokken, adiposit ve makrofajlarda lipotoksistenin azaldığı gösterilmiştir [134].

2.1.5.1.3.İnsülin Direnci

NAYKH ve IR arasındaki ilişki iyi bilinmektedir, fakat hangisinin sebep-sonuç olduğu konusu tartışmalıdır [70,139,172].NAYKH/NASH kronik inflamatuvar durum dışında, insülin sinyal sistemi ile ilişkilidir.GPAT (gliserol-3-fosfat açıltransferaz) yok edilmiş farelerde azalmış diaçilgliserol(DAG) düzeyinin karaciğer IR' ni azalttığı gösterilmiştir [140]. Karaciğer yağlanması, insülin reseptör substrat 1 (IRS)-1ve IRS-2' nin tirozin fosforilasyonunu azaltarak, sırayla (PI3kinaz,Akt,GSK-3) aktivitesini azaltmaktadır [141]. Yağlanma insülin sinyal yolağı üzerindeki etkilerini PKC, JNK ve IKK2 aktivasyonu ile sağlar. Bu 3 mediatör IR' ini PI3 kinazı etkinleştirerek sağlamaktadır

[141,141]. SYA ilişkili ER stres IR gelişimi ile bağlantılıdır [138], kimyasal şaperonlar, krom, genetik değişiklikler (BiP/GRP78,adenovirus) kullanılarak ER stres ilişkili NAYKH modelleri geliştirilmektedir [138,143,144]. İnsülin Direnci, inflamasyon ve oksidatif stres ilişkisi Şekil 4' te gösterilmektedir.



Şekil 4: İnsülin Direnci, İnflamasyon Ve Oksidatif Stress

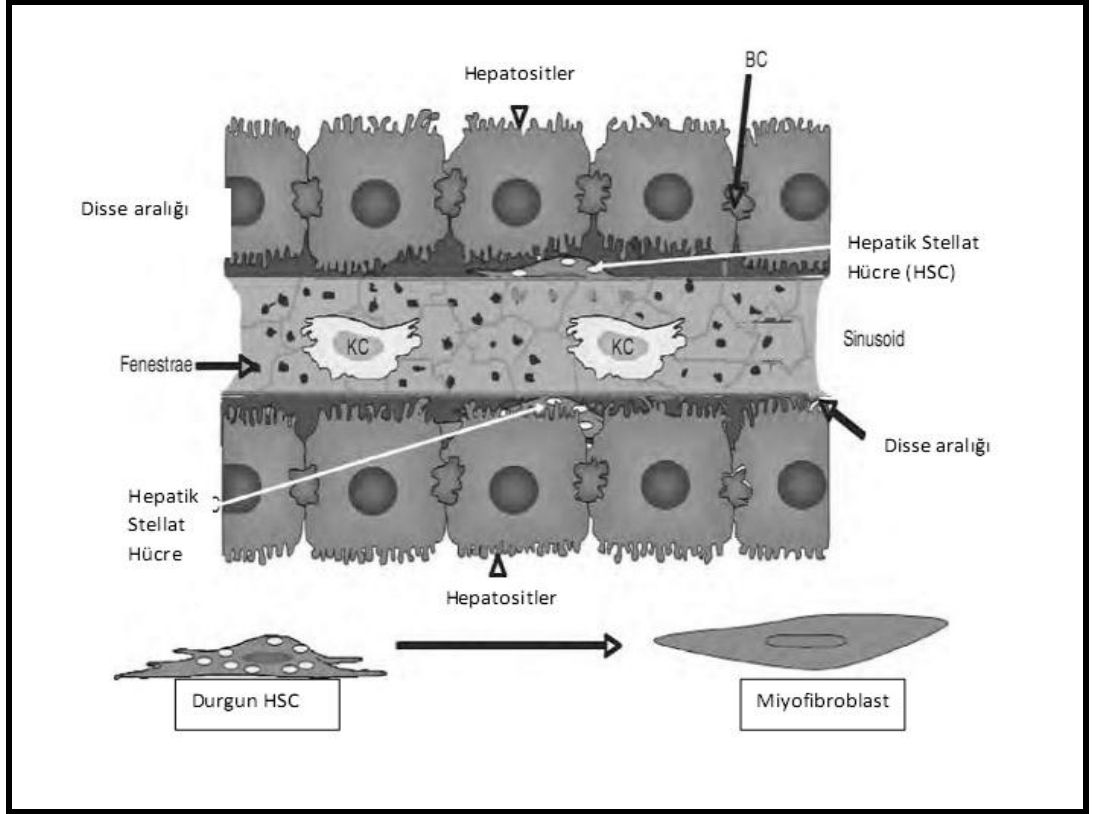
2.1.5.1.4.NASH'te Hepatosit Fibrozisinin Moleküler Mekanizması

Kronik karaciğer hastalığının çoğunda olduğu gibi, NASH' teki tekrarlayan hasarlar karaciğer fibrozisi ve sirozla sonuçlanır. Karaciğer fibrozisi, karaciğerin yara iyileşme yanıtıdır ve esas olarak aktive HSC(hepatik yıldız)

hücreleri) tarafından üretilen yüksek yoğunluklu hücre dışı matriks proteinlerinden(kollajen,proteoglikan,glikoprotein,glikozaminoglikan) oluşur [145,146].

EMT ile portal miyofibroblastlar gibi diğer mezenkimal hücre tipleri, kemik iliği kaynaklı hücreler ve fibroblastlar da ekstraselüler matriks kaynağı olarak karaciğer fibrozisine katkıda bulunabilir, ama genel uzlaşısı HSC'lerin ana kaynak olduğu yönündedir [147]. HSC disse aralığında yerleşmiş, sitokin ve büyüme faktörü sentez ve sekresyon kabiliyetine sahip özelleşmiş hücrelerdir. (Şekil 5) Kupffer hücreleri, hepatositler, safra kanalı epitelyum hücreleri, trombositler ve sinüzoidal endotel hücreler karaciğer fibrozisinden sorumlu ekstraselüler matriks protein ve kollajen sentezler. Oksidatif stres, TGF- β 1(transforme edici büyüme faktörü- β 1), CTGF(bağ doku büyüme faktörü) gibi moleküller yıldız hücreleri aktive eder. Yıldız hücreler zon III' te perivenüler bölgede daha fazla bulunurlar. TGF- β 1, Kupffer hücrelerinden ve de yıldız hücrelerden salınabilmektedir ve NASH fibrozisinden sorumlu önemli sitokinlerden biri olarak kabul edilmektedir [145,146,148,149].İnsülin, SYA , adipokinler (başta leptin ve adiponektin) ve ileri glikolizasyon ürünleri NASH fibrojeniz sürecini düzenleyen mediatörlerdir [149]. IR, temel tetikleyici olmanın yanında aynı zamanda pro-inflamatuvar bir ortam oluşturmaktadır. Hiperinsülineminin, TGF- β ' yı ve CTGF' nü uyarak fibrojenizi başlatabildiği gösterilmiştir [150,151]. IR' nin neden daha şiddetli hastalıkla seyrettiğini ve Tip 2 DM ve NASH birlikteliğinin hızlı ilerleyiş ve kötü prognozla ilişkili olduğu bu şekilde açıklanabilir [152]. SYA, TGF- β 1 ve TIMP-1 (Metallo-

proteinazların Doku İnhibitörü-1) gibi profi brotik proteinleri arttırarak fibro-
geneze katkıda bulunabilir [149,153]. Son çalışmalarda, WAT miktarının
NASH şiddeti ile korelasyon göstermesi bunu doğrulamaktadır [147].



Şekil 5:Karaciğer Histolojisi Ve Karaciğer YıldızsıHücre

Hiperglisemi, lipid oksidasyonu enzimsel olmayan glikolizasyon proteinlerinin ve AGE oluşmasıyla sonuçlanır. Veriler invitro olarak gliseraldehit kaynaklı AGE' ne maruz kalan HSC'lerin AGE reseptörleri eksprese ettiklerini göstermiştir [154]. Çözünebilir AGE reseptörü plazma düzeyi NASH' te belirgin olarak azalmaktadır, bu da karaciğer ve diğer dokularda AGE düzeyi ve aktivitesinin artışı yönünde yorumlanmıştır [155,268]. Diğer NASH' e özgü fibrotik mekanizma adipokin dengesizliğidir [300]. NAYKH hastalarında genel-

likle artmış leptin düzeyleri ve azalmış adiponektin düzeyleri gösterilmiştir[76]. Leptin çeşitli mekanizmalar aracılığıyla; HSC aktifleştirerek (bu hücreler leptin reseptörü de eksprese eder) fibrogenez sürecine katkıda bulunur. [151]. Leptin eksikliği veya leptinin bozulmuş sinyal yolağı ile obezite oluşturulan kemirgenlerde, karaciğerde fibrotik uyaranlar olmadan belirgin fibrozis gelişmediği gözlenmiştir [157,158]. Bu sonuç fibrogenezin çok faktörlü karmaşık bir mekanizma ile oluştuğunu göstermektedir. Deneysel veriler, adiponektinin insülin duyarlılığını arttırıcı, antiinflamatuvar özellikleri yanı sıra, antifibrotik özellik de gösterdiğini ileri sürmektedir [76]. Adiponektin eksikliği olan farelerde karaciğerde artmış fibrozis gözlenirken, karbon tetraklorür ile uyarılan fibrozisin adiponektin eklenmesi ile gerilediği gözlenmiştir[159,160]. Leptin ve adiponektinin fibrozis gelişiminde önemli rol oynadığı sonucuna varılmaktadır [161,271]. Ek olarak, renin-anjiyotensinojen sisteminin(RAS) fibrogenezdeki rolüne dair kanıtlar dikkat çekmektedir [162]. Anjiyotensinojen II' nin (ATII), Anjiyotensin1 (AT1) reseptörüne bağlandıktan sonra HSC aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir [162-168]. Mevcut veriler sınırlıdır ve desteklenmesi gerekmektedir [169]. Yapılan bir çalışmada, HSC ve portal miyofibroblast hücrelerinde CB2(Kannabinoid reseptör 2) ekspresyonunun normal karaciğerde ve fibrozis olmayan NASH' de yokken fibrozisle seyreden NASH' te olduğu gözlenmiştir [173,174,224] Son kanıtlar, Hedgehog(Hh) sinyal iletim yolunun NASH' te fibrozis sürecine katkısını göstermektedir [170,171,186,187]. Hh, gelişimde anahtar düzenleyicilerden biridir ve safra duktus hücrelerinde Epitelden-mezenkime dönüşümü düzenlediği gösterilmiştir [170]. Syn ark. deneysel NASH modelinde [171], Hh yolağının

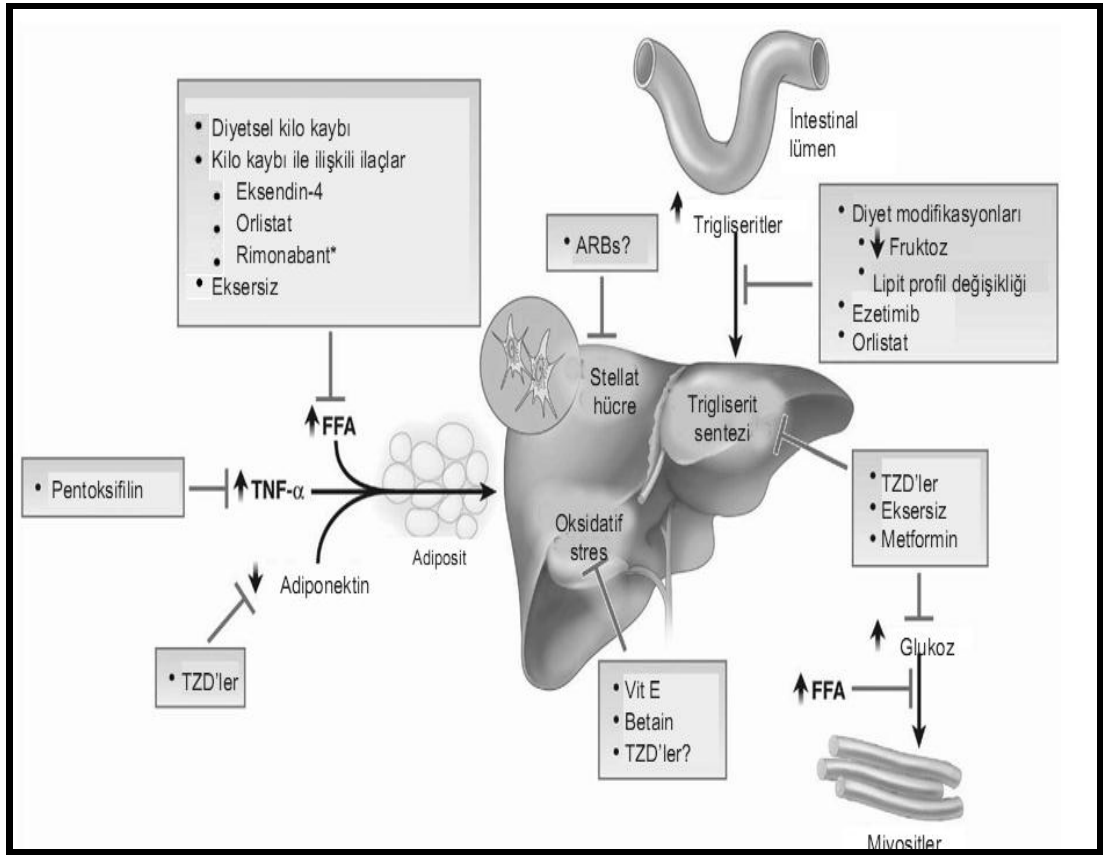
duktus hücrelerde EMT dönüşümünü göstermiştir [171,186,187]. İn-vitro deneylerde siklopamin ile Hh inhibisyonu TGF- β seviyesinde azalma ve yağlı karaciğer hasarında azalma ile sonuçlanmıştır [175]. Bu bulguları doğrulamak için daha fazla araştırma gereklidir. Tablo 2’de NASH fibrozisinin tüm yönleri ve mevcut tedavi hedefleri açıklanmaya çalışılmaktadır.

Adiponektin	A d i p o n e k t i n k a r a c i ğ e r hasarında düzelleme sağlar. Toksik karaciğer hasarından sonra fibrogenezisi durdurur.	Adiponektin reseptörleri NASH’te gelecek çalışmalar için hedef konulardan bir diğeridir.
Endojen Kannabinoid sistem	(Kannabinoidler) CB1 ve CB2 reseptörleri ile etkisini gösterir. CB2 antifibrotik etkilidir. CB1 fibrozisin inaktivasyonu, karaciğerde fibrojenik hücrelerin birikimini ve hepatik TGF-B’yı azaltarak fibrogenezisi önler.	CB1 reseptör antagonistleri, NASH’te gelecek çalışmalar için hedef konulardan biridir.
İnsülin Direnci	Yüksek glukoz ve insülin seviyesi TGF-β ve bağ dokusu büyüme faktörünün dengesini ve yıldızlı hücre biyolojisini benzer yıldızlı hücreleri uyarılır.	NASH ‘in devam eden fibrozisinde tiazolidinedionların etkisi faydalıdır.
Leptin	Leptin etkili bir profibrogenik faktördür, yıldızlı hücreleri direkt etkiler.	
Nükleer reseptörler	PPAR α, durgun yıldızlı hücrelerinde belirgindir, aktivasyon süreci ile azalır. PPAR α, ligandı aktif yıldızlı hücrelerinin çoğu özelliğini geri döndürüp fibrozisi durdurur.	CB1 reseptör antagonistleri, NASH’te gelecek çalışmalar için hedef konulardan biridir.
RAS	Anjiyotensin II yıldızlı hücrelerde profibrogenik etki yapar.	ARB lerle yapılan tedavilerde fibrozisin gerilediği görülmüştür.

Tablo 2: NAYKH’ da Fibrozis Mekanizmaları ve Tedavi Hedefleri

Kronik karaciğer hastalığının komplikasyonları açısından kimlerin en riskli olduğunun saptanması NAYKH ve NASH için önemlidir. Karaciğer biyopsisi

NASH tanı için altın standarttır, fakat daha az girişimsel, ve uygulanabilir tarama araçları gerekmektedir. NASH için henüz etkinliği kanıtlanmış bir tedavi mevcut değildir, mevcut tedavilerde NASH patogenezinde esas başlatıcı olduğuna inanılan çeşitli yollar üzerine odaklanılmıştır. Şekil 6’ da NASH tedavisinde araştırma aşamasındaki tedavilerin potansiyel patofizyolojik etkileri özetlenmiştir.



Şekil 6 :NASH Tedavisinde Araştırma Aşamasındaki Tedavilerin Potansiyel Patofizyolojik Etkileri

2.1.5.1.5. NAYKH ve Karsinogenez

İnflamasyon ve kanser arasındaki bağlantı uzun zamandan beri bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda birçok kanserin kronik enfeksiyon hastalıkları zemininde meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca bilinmektedir ki

enfeksiyon olmadan sebat eden inflamasyon kanser gelişimi riskini arttırmaktadır. İnflamasyon ilişkili kanserlerden en iyi bilinenlerinden birisi hepatoselüler kanserdir [241,242]. HCC başlıca hepatotropik virüslerden oluşan yangı ya da ethanol gibi toksik etkenlerin zemininde gelişen kronik inflamasyon sonucu yavaşça gelişen bir tümördür. NFκB bir transkripsiyonel düzenleyici protein olup karaciğerde inflamasyon, hasar, apoptoz ve kanser gibi durumlarda rol oynar [124,176,177,184,185]. Normalde NFκB' nin aktivasyonu sıkı kontrol altındadır. Bununla birlikte oksidatif stres, inflamatuvar sitokinler NFκB aktivasyonuna neden olmaktadır. NFκB' nin en güçlü uyarısı TNF-α' dır. Karaciğerde de TNF-α ilişkili olayların hemen hepsinde NFκB rol almaktadır. NFκB aktivasyonunun oksidatif stresle olan ilişkisinden dolayı redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olarak da isimlendirilmektedir. Sitoplazmik NFκB' nin aktivasyonu ve hücre nükleusuna translokasyonu için IKKβ' nin aktive olması gerekmektedir. NFκB aktivitesinde artış,pek çok kanser türünün gelişiminde rol oynar. Son yıllarda NFκB' nin insülin direnci, obezite ilişkili inflamasyon ve NASH patogenezinde de rol oynadığı düşünülmektedir [183,226]. NFκB inhibisyonu yapan ilaçlardan biri de selektif olmayan bir COX inhibitörü olan Aspirin' dir. Aspirin' in bu yolaktaki hedefi IKKβ' dir. Aspirinin IKKβ inhibisyonu yaparak NFκB aktivitesini bloke etmesi ve bu yolla IR' ni önlemesi son yıllarda yoğun olarak araştırılan bir konudur. Hundal ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek doz Aspirinin Tip 2 DM olgularında hem açlık hem tokluk hiperglisemisini düzelttiği ve insülin direncini azalttığı, insülin direnci için en özgül test olan öglisemik klemp testi ile doğrulanmıştır[178-180,182].Selektif COX-2 inhibitörleriyle de

bu etki gösterilmiştir [223]. COX-2'nin bunu IKK- β bağımsız olarak yapabileceği hayvan deneyleriyle kanıtlanmıştır [181,222,225]. İnflamasyon ve kanseri birbirine bağlayan mekanizma tam anlamıyla bilinmemekle beraber son yıllarda ortaya çıkan kanıtlar IKK β --NF κ B yolağının ve bu yolaktaki diğer inflamatuvar mediatörlerin (COX-2 gibi), karsinogenezde önemli rol oynadığını ortaya koymuştur [188-193,239]. Miyeloid hücrelerde (makrofaj, dendritik hücre, nötrofil) IKK β kodlayan genin seçici olarak yok edilmesi Ülseratif Kolit ilişkili kanser modelinde tümör sayısında belirgin azalma sağlamıştır [194]. Yine benzer olarak Kupffer hücrelerinde IKK β geninin delesyonu kimyasal-ilişkili HCC' de belirgin olarak tümör yükünü azaltmıştır [195]. Diğer karaciğer hastalıkları gibi, NAYKH da siroz ve HCC ye ilerleyebilir [5,229,230]. NASH' ten HCC gelişimi hayvan deneyleri ile bir çok kere gösterilmiştir [208,240]. Lipotoksisite, oksidatif stres ve inflamasyon, hepatosit ölümü ile sonuçlanır [111]. Sonuçta ortaya çıkan kronik hasar siroza yol açabilecek bir fibrojenetik yanıtı neden olur. Son yayınlar sirotik olmayan NAYKH/NASH' ten HCC oluşum riskinin arttığını işaret etmektedir [231,232,240,243]. Şimdiye kadar altta yatan moleküler bağlantılar tamamen çözülmemiş olmasına rağmen, obezite, diyabet ve potansiyel olarak da visseral yağ birikimi HCC gelişimi için bağımsız risk faktörü olarak görülmektedir [233,234,235]. IR ve HCC arasındaki ilişki süregelen bir araştırma konusudur. Metabolik sendrom ve obezite sirotik olmayan NASH' li hastalarda siroz ve HCC gelişimi için bağımsız birer risk faktörüdür [231].

NASH gelişiminde Kupffer hücrelerinden açığa çıkan TNF- α 'nın sadece apoptotik sinyalleri uyarmakla kalmadığı, NF κ B yolağının aktivasyonuna da neden olduğu düşünülmektedir. Çalışmalara göre Kupffer hücresi kaynaklı TNF- α , hepatositler üzerinde TNFR1 (TNF reseptör 1)'e bağlanarak kendisi ile ilgili süreçleri başlatmakta, NF κ B'yi aktive ederek apoptozun inhibisyonuna neden olmaktadır. TNF hem apoptotik, hem de antiapoptotik yolların aktivasyonuna neden olur. Genel olarak TNF- α 'nın hepatositler üzerinde proapoptotik ya da antiapoptotik olmasını belirleyen unsurun ortamın glutasyon(GSH) ve ROS(reaktif oksijen radikalleri) içeriği olduğu düşünülmektedir. NASH'teki kronik inflamatuvar durum ve esas olarak NF- κ B aktivasyonu inflamasyon ilişkili karaciğer karsinogenezinin anahtar basamağı olarak kabul edilir [236-242]. Kupffer hücreleri vücuttaki sabit makrofajların en büyük grubunu temsil etmekte ve karaciğerdeki parankim dışı hücrelerin % 20'sini oluşturmaktadır. NF- κ B'nin kronik aktivasyonu, epitel hücrelerinde antiapoptotik genlerin etkinleştirilmesi yoluyla tümörjenik hücrelerinin çoğalmasını, tümör büyümesi ve ilerlemesini artırır. IKK2-NF κ B yolunun inflamatuvar hücrelerde aktivasyonu, malign hücrelerin ve tümör stromasının büyüme ve yaşamasından sorumlu sikokinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu artırarak tümör gelişimine katkıda bulunur [237]. Deneysel modellerde, NF κ B inhibisyonu inflamasyon ilişkili HCC gelişimini önlemiştir [240,266]. NF κ B'nin İnsülin Direnci'nden başlayarak HCC'ye kadar devam eden süreçte NASH patogenezinin etkiye bulunduğu hipotezi 2007'de Luedde ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile çürütülmüştür. Hepatositlerde IKK2-NF κ B yolunun yok edilmesi farelerde kimyasal yolla oluşan

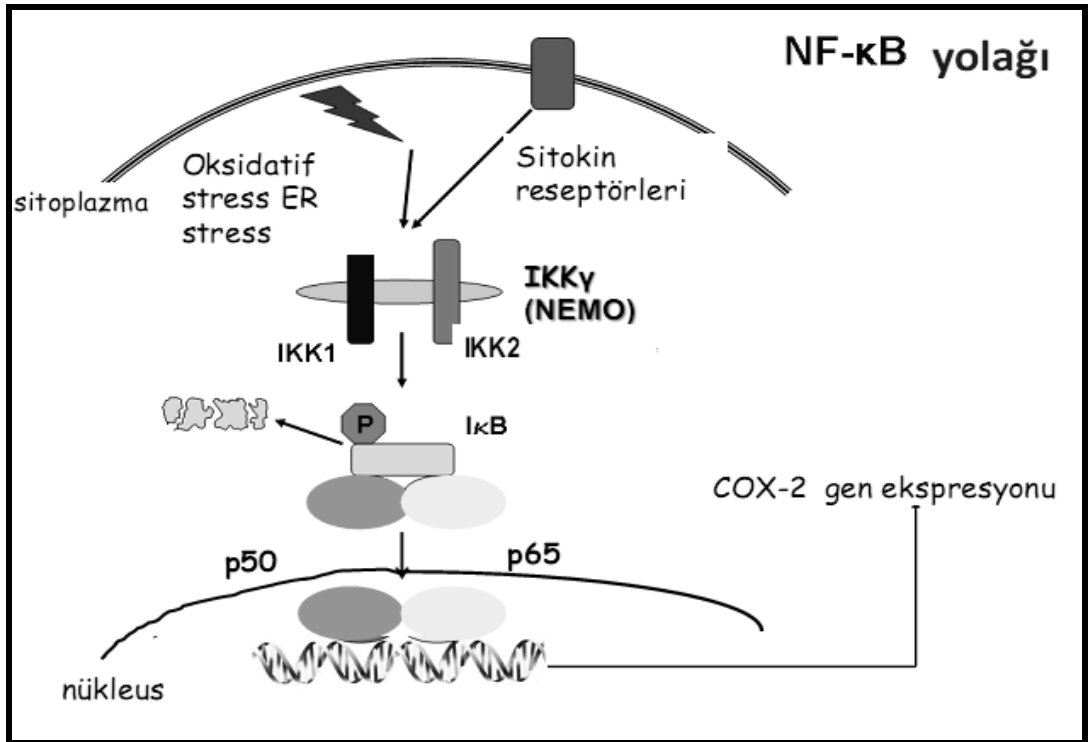
HCC modelinde tümör gelişimini arttırmıştır [128]. Ayrıca hepatositlerde NEMO (IKK düzenleyici kompleksinin bir alt ünitesidir) ablasyonu yoluyla NF- κ B' nin tamamen durdurulmuş olması spontan NASH ve HCC gelişimiyle sonuçlanmıştır [128]. Bu konu üzerinde yapılmış birbiriyle çelişen değişik araştırmaların veriler topluca değerlendirildiğinde gerçekçi yorumu Maeda ve arkadaşları şu şekilde yapmaktadır;

" Karaciğerde Kupffer hücreleri ve hepatositlerde NF κ B' nin hücre ölümü veya hücre farklılaşması gibi farklı işlevleri olabilir. Bu nedenle NF κ B sinyal yolağını hedefleyen ilaçların sistemik alınması halinde bir hücre tipinde yararlı sonuçlar elde edilirken, diğer hücre tipinde öngörülemez zararlar oluşabilir." [195,267,268].

Bu çelişkili bulgular ayrıca düzenleyicilerin inhibisyon potansiyelleri arasındaki farkla, yanı sıra bloke edilen NF- κ B yolunun hücre özgüllüğü ve seçilen deneysel HCC modelleri arasında farkla açıklanabilir [244]. Diyetle uyarılan NASH modelinde IKK2-NF κ B yolu NASH gelişmesini engellemiştir [127], ama bunun aynı zamanda NASH ilgili HCC' yi önlediğine ait veriler tartışmaya açıktır[128].

Karaciğer hastalıklarında potansiyel tedavi hedefinin sitoplazmik NF κ B düzenleyici proteinleri üzerinden değil, transkripsiyon faktörü olarak gen regülasyonu sonucu ekspresyonunu arttırdığı proinflamatuvar sitokinler üzerinden olması gerektiği Maeda ve arkadaşları tarafından ortaya atılan bir diğer görüşdür [195]. Bu aşamada, HCC' de ve Kronik Karaciğer Hastalıkları' nda arttığı gösterilen COX-2 ve spesifik inhibisyonu NASH patogenezinde

önem kazanmaktadır. COX-2 geni birkaç transkripsiyonel düzenleyici alana sahiptir. NF κ B COX-2 geninin promoter bölgesinde bir alan içermektedir [189-192]. NAYKH basit yağlanmadan NASH ve siroza kadar değişen bir hastalık spektrumudur. Steatozisten steatohepatit oluşumunu sağlayan inflamatuvar süreçteki mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Olası mekanizmalardan oksidatif stres, yağlı karaciğerde lipid peroksidasyonu tarafından tetiklenir. Lipid peroksidasyon ürünleri, direkt veya indirekt olarak IKK β -NF κ B'yi aktive ederek, birçok inflamatuvar mediatörün transkripsiyonel olarak ekspresyonunun artmasına neden olur. Bunlardan belki de en önemlisi COX-2'dir.



Şekil 7: NFkappaB yolağı ve COX-2 ilişkisi

2.1.5.2. NAYKH Histopatoloji ve Sınıflaması

2.1.5.2.1.NAYKH Histopatolojisi

Yağlanma bütün NAYKH olan hastaların biyopsilerinde rastlanan ve çeşitli seviyelerde tespit edilen bir bulgudur. NAYKH için tipik olan yağlanma, makrovezikülerdir. Makroveziküler yağlanma, hepatosit sitoplazması içinde geniş bir vakuol olarak görülür ve hücre çekirdeğini perifere itmiştir. Yağlı hepatositler, normal hepatositlere göre daha büyük görünümündedir. Makroveziküler yağlanma, H-E(Hematoksilen-Eozin) ile rahatlıkla tanınır. Karaciğerde yağlanma akademik amaçla gösterilmek istenirse, frozen kesitte Sudan Black gibi yağ boyaları yapılabilir.

Bazı olgularda mikroveziküler yağlanma da bulunmaktadır. Bu hepatositler görece olarak daha küçüktür ve nükleusları santral yerleşimlidir. Sitoplazmaları küçük lipid vakuelleri ile doludur. Hepatositler bu iki steatozu aynı anda içerebilir. Alkolik karaciğer hastalığında bu mikst pattern fibrozis gelişiminde artma riskiyle ilişkilidir. Biz olgularımızda genel olarak makroveziküler yağlanma izledik.

NAYKH' da hasar ve yağlanma pattern zon 3' ten başlar ve bütün asinüsü tutabilir. NASH' te yağlanmanın zon 3' ten başlaması tipiktir. Fakat amiadaron kullanımı ile ilişkili steatohepatit ve çocuk steatohepatit olguların biyopsilerinde zon 1 (periportal) başlangıçlı yağlanma, balonlaşma ve Mallory cisimleri gözlenebilir [272]. Bizim olgularımızın çoğunluğu ise, başlangıç olarak perisentral (zon 3) yağlanma içermektedir; ancak belli bir oranın üs-

tünde yağlanma izlenince karaciğer tama yakın yağlandığından, zon ayrımı yapılamamıştır. NASH' in diğer temel özellikleri, yangısal infiltrasyon, hepatosit hasarı ve parankim fibrozisidir. NASH olgularında yangı tipik olarak lobül-lerdir [245]. Portal yangı çocukluk çağı NASH' te izlenebilir. Yetişkin hastalarda NASH' te portal yangı nadir görülür. Çalışmamızda NASH olgularımızda % 7 oranında portal yangı izlenmiştir. Lobüler yangı, polimorfonükleer lökositlerle karakterizedir. Alkolik Steatohepatit' te ve NASH' te sentrilobüler balonlaşmış hepatositler, Mallory cisimleri, perisellüler-perivenüler fibrozis karakteristiktir [246]. NASH' te lipogranülomlar da bulunabilir [251]. Lipogranülomlar, yağlanmış hepatosit etrafını çeviren mononükleer hücreler ve Kupffer hücrelerini kapsar. Lipogranülomlarda eozinofillere de rastlanabilir. Lipogranülomlar NASH tanısı koyduracak kadar özel olmasa da, not edilmesi gereken bir bulgudur.

Hepatoselüler hasar, balonlaşma ve asidofilik dejenerasyon olmak üzere 2 farklı morfolojik görünümde-dir. Balonlaşma dejenerasyonu hücre içi sıvı birikiminin sonucu olup, şişkin hepatositlerle karakterizedir. Balonlaşmış hepatosiler tipik olarak zon 3' tedir. Mallory cisimleri alkolik karaciğer hastalığının karakteristik bulgusudur [248,249,250]. Fakat NASH' te de bulunabilir. Pediatrik NASH' te Mallory cisimlerine pek rastlanmaz [252,253]. Yetişkin NASH vakalarında Mallory hyalin cisimciği sıklığı % 9,5 ile % 90 arasında değişkenlik göstermektedir [254,255]. Steatoz, balonlaşma ve lobüler yangı zemininde Mallory cismi NASH tanısını destekler, ancak histopatolojik tanı için mutlaka gerekli bir bulgu değildir. Bulunduğu zaman Mallory cismi zon 3

balonlaşmış hepatositlerin içinde yer alır. Steatohepatitte glikojen dolu vakuolize nükleus varlığı yaygın olmakla birlikte, tanı koydurucu bulgu değildir. Megamitokondri de denilen genişlemiş mitokondriler NASH'te görülebilir [256]. Caldwell ve arkadaşları NASH'te ASH' e göre daha fazla megamitokondri bulmuştur [257]. Megamitokondrilerin karaciğer hasarının göstergesi veya hasara uyum sürecinde bir değişiklik olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki NASH olguları, Brunt kriterlerine göre grade ve stage'leri tekrar değerlendirilmiştir [245]. Brunt kriterlerine göre, olguların gradeleri steatoz, balonlaşma ve inflamasyon oranlarına göre, stage'leri ise fibrozisin oranı ve lokalizasyonu incelenerek değerlendirilmiştir. Brunt kriterleri, ayrıntılı olarak tablo 4 ve tablo 5' de açıklanmaktadır. NASH fibrozisi perivenüler (zon 3) bölgede yoğunlaşmıştır. Bazı bölgelerde kollajen, tek hücrelerin etrafını sarmış olarak gözlenebilir ki perisellüler veya **chicken wire** fibrozis olarak tanımlanır. Bu fibrozis patterni, ASH ve NASH' i diğer nekroinflamatuvar, kolestatik ve diğer kronik metabolik karaciğer hastalıklarındaki fibrozisten ayırır [249]. Diğer hastalıklarda fibrozis genelde periportal yerleşimlidir. Çalışmamızda da, NASH olgularında, sıklıkla perisellüler, perivenüler fibrozis patterni izlenmiştir. Bir çalışmada 545 NAYKH olgusunun karaciğer biyopsileri incelenmiştir [258]. Yağlanmanın şiddeti, yangı ve NASH' in diğer histolojik bulguları karşılaştırılmıştır. Şiddetli yağlanma, lobüler yangı, zon 3 fibrozis, steatohepatit ile birliktelik göstermekte olup, Zon 3 yağlanma, balonlaşma, Mallory cisimleri, ileri fibrozis ile sıklıkla birliktelik göstermiştir [258].

NASH' te tanı için gerekli olanlar	NASH' te sıklıkla bulunan fakat tanı için gerekli olmayanlar	NASH' te bulunabilen fakat tanı için gerekli olmayanlar	NASH için atipik diğer karaciğer hastalıklarını düşündüren
Steatoz, Makrosteatoz Mikrosteatoz	Zon 3 perisinüzoidal fibrozis: santral-portal köprüleşme	Zon 3 hepatositlerde Mallory cisimciği	Tek veya baskın olarak mikroveziküler steatoz
Karışık hafif lobüler inflamasyon: dağınık PNL ve mononükleer hücreler	Zon 1 hepatositlerde glikojenize nükleus	Prusya mavisi ile boyanan granüler, periportal hepatosellüler demir	Slerozan hyalin nekroz; perivenüler fibroz, fleboskleroz
Hepatositlerde balonlaşma, tipik olarak zon 3' te	Lobüllerde lipogranülomlar, değişken, küçük boyutta	Hepatositlerde megamitokondri	Portal inflamasyon Portal-periportal fibrozis, perisinüzoidal fibrozis olmadan portal alanda köprüleşme fibrozisi
	Bazı alanlarda asidofilik cisimcikler, PAS-d Kupffer Hücreleri		Lobüler düzensizlik ve inflamasyon, köprüleşme nekrozu
	Yağ kistleri		Kronik kolestaz, safra kanal lezyonları veya kanal kaybı
			Epiteloid granülomlar

Tablo 2: NASH' te Görülen Histopatolojik Lezyonlar

2.1.5.2.2. Brunt' a Göre Sınıflama ve NAYKH Aktivite Skoru (NAS)

NASH, çeşitli histopatolojik bulgulara göre sınıflanır, biz de olgularımızı Brunt skora göre değerlendirirdik. Brunt sistemindeki grade, stage ve NAS skorası ayrıntılı olarak Tablo 5 ve 6' da gösterilmiştir. (Tablo 5-6)

2.1.5.2.3. NAYKH' nin CRN Skorlama Sistemine Göre Sınıflaması

NAYKH evrelemesinde bir sınıflama CRN Skorlama sistemidir. Tablo 4' te ayrıntılı olarak anlatılmıştır [259]. Uygulaması daha pratik görünse de, yeni bir sınıflama olması nedeniyle, çalışmamızda bu sınıflamayı kullanmadık.

Steatoz	Lobüler	Hepatosellüler
Grade	İnflamasyon	Balonlaşma
0:<%5	0 : Yok	0 : Yok
1:5-33%	1 : < 2 odak (20 büyütme)	1. Hafif, az
2:34-66%	2 : 2 – 4 odak (20 büyütme)	2 : Orta, belirgin
3:>66%	3 : > 4 odak (20 büyütme)	2 : Orta, belirgin
Fibrozis(CRN Sınıflaması) :		
Stage 0: Yok		
Stage 1a: Zon 3te hafif perisinüzoidal fibrozis (Mason trikrom boyası ile gösterilebilir).		
Stage1b: Zon 3te orta derecede perisinüzoidal fibrozis (H-E boyası ile görülebilir).		
Stage 1c: Portal fibrozis		
Stage 2: Zon 3te perisinüzoidal fibrozis ve periportal fibrozis		
Stage 3: Bridleşen fibrozis		
Stage 4: Siroz		

Tablo 4: NAYKH CRN Sınıflama Sistemi

Steatoz	Lobüler İnflamasyon	Balon Dejenerasyonu
0 : < % 5	0 : yok,	1 : az, ılımlı
1 : % 5-33	1: 2 odak (20 büyütme),	2 : belirgin, çok
2 : % 34-66	2: 2-4 odak (20 büyütme),	
3 : > % 66	3 : > 4 odak (20 büyütme)	
Fibrozis Skoru		
1	: Fokal veya yaygın Zon 3 , Perisinüzoidal Fibrozis, Portal Fibrozis yok	
2	: Fokalden daha fazla veya yaygın Zon 3 ,Perisinüzoidal Fibrozis, Fokal veya yaygın Portal Fibrozis	
3	: Zon 3, Perisinüzoidal Köprüleşen Septalı Fibrozis, Portal Alanda Köprüleşen Septalı Fibrozis	
4	: Yaygın Köprüleşme Fibrozisi, Siroz	

Tablo 5: NAYKH Brunt Sınıflama Sistemi

NAS ^a	Steatoz ^b	Balonlaşma	Lobüler İnflamasyon ^c
0	0-5% (0)	Yok (0)	Yok (0)
3	5-33% (1)	Çok az , bir kaç (1)	1-2 odak / 20 saha (1)
6	34-66% (2)	Çok (2)	2-4 odak /20 saha (2)
8	>66% (3)	Çok (2)	>4 odak / 20 saha (3)

Tablo 6: NAYKH Aktivite Skoru (NAS Skoru)

^a Parantez içindeki sayılar her histolojik özellik için NAS skorunu ifade etmektedir. Herhangi bir olguda, lezyonların kombinasyonları farklı olabilir ama NAS skorları aynı olabilir.

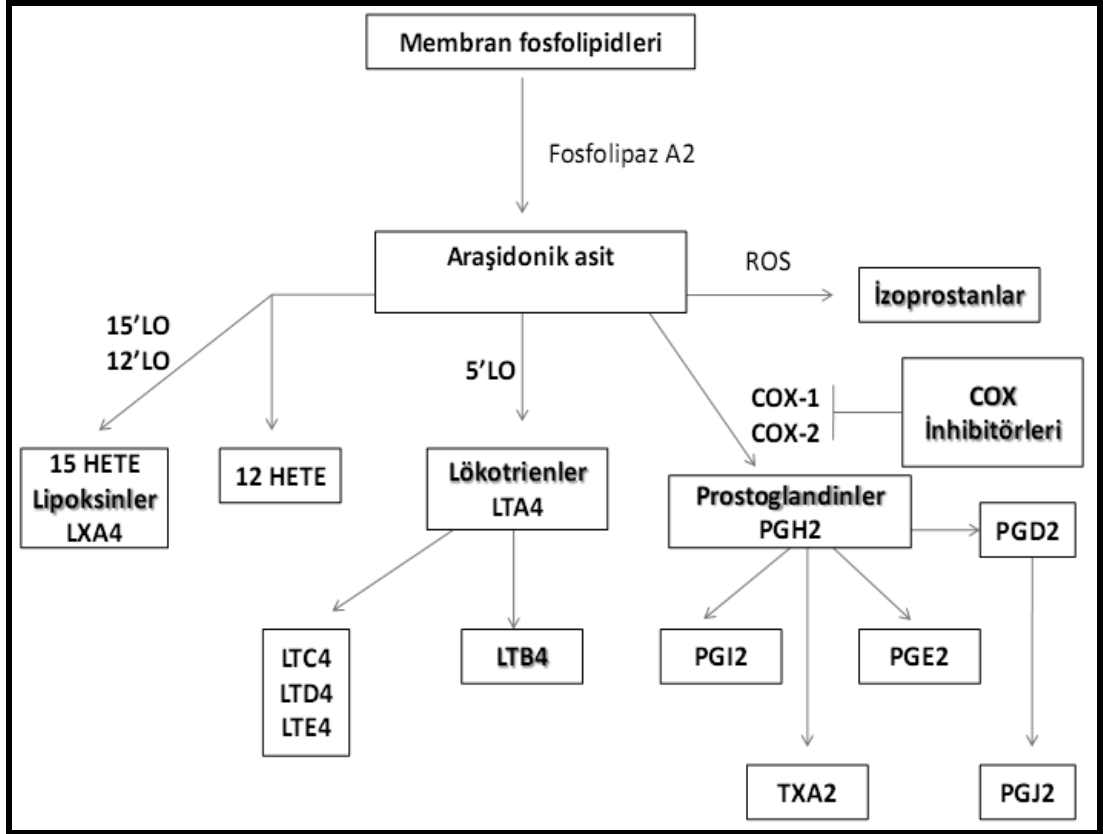
^b Hepatositler 4' lük ve 10' luk büyütmede incelenerek tahmin edilen yağlanma oranı yüzde olarak belirtilmektedir.

^c Lobül içindeki her türlü iltihabi hücre kümelerini içerir.(nötrofiller, eozinofiller, mononükleer hücreler

2.2.Siklooksijenaz-2 (COX-2)

COX, prostaglandin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimlerdir [312]. Araşidonik asid (AA) hücre membranı fosfolipidlerinin içinde ester olarak bulunan 20 karbonlu bir çoklu doymamış yağ asididir [305]. Prostaglandinlerin prekürsörüdür. Prostaglandin sentezinde ilk basamak fosfolipaz A2 ile fosfolipidlerinin hidrolizi ve araşidonik asidin salınımıdır. İkinci reaksiyon ise COX tarafından katalizlenir [273]. Bu anahtar reaksiyonda, moleküler oksijen araşidonik asidin içine katılır ve prostaglandin G2 (PGG2) adlı kararsız ara ürün oluşur. PGG2, COX' ın peroksidaz aktivitesi sayesinde hızlıca prostaglandin H2 (PGH2) ye dönüşür. Bundan sonra spesifik izomerazlar PGH2 'yi farklı prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüştürür (PGE2, PGF2a, PGI2 ve TXA2). Hücreler farklı stimuluslarla uyarıldıklarında yada hasar gördüklerinde hücre membran lipitleri hızla biyolojik olarak aktif mediatörlere dönüşürler. Membran lipiti olan AA' ten türeyen biyolojik mediatörler inflamasyon ve hemostaz gibi değişik fonksiyonlarda görev alarlar. Bu mediatörlere otokoidler denir. Bunlar hızla yapılırlar, lokal etki ederler daha sonra ya spontan ya da enzimsel yolla ortadan kaldırılırlar. AA' ten türeyen mediatörler başlıca lökotirenler, prostaglandinler, lipoksinler ve tromboksanlardır. Bunlara eikazanoitler denir. Eikazanoitler değişik doku ve organlarda çok sayıda inflamatuvar, mitojenik ve anjiyojenik aktiviteye sahiptirler. Aynı zamanda ağrı ve ateşe neden olurlar [305]. COX' un COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu vardır [304]. COX-1 Myomato tarafından 1976' da COX-2 ise Simmons tarafından 1989' da tanımlanmıştır. AA' ten COX enzimleri

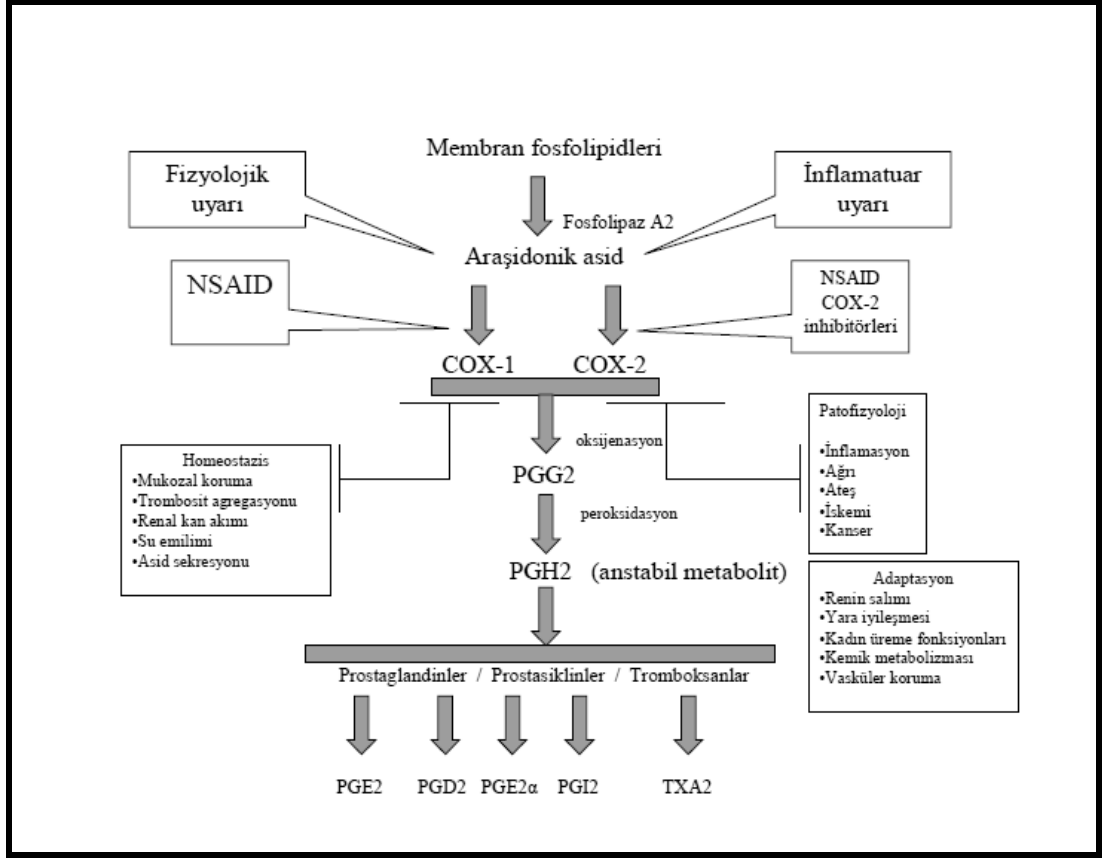
aracılığıyla oluşturulan başlıca eikazanoitler, PGE₂, PGD₂, PGF₂alfa, PGI₂ (prostosiklin) ve TxA₂' dir [305]. (Şekil 8) AA salınımını stimüle eden sitokin ve büyüme faktörleri aynı zamanda COX-2' nin transkripsiyonunu stimüle eder. Böylece PG' lerin sentezi artar [305].



Şekil 8: Eikazanoitlerin Sentezi

COX-1 ER' da iç membran proteinindedir [305]. COX-2 ise hücrede perinükleer yerleşimli bir enzimdir. COX-1 'in etkisiyle üretilen prostanoitler otokrin ve parakrin etkiye sahiptir. COX-2 tarafından üretilen prostanoitler ise intrakrin etkiye sahiptir. Hemen tüm memeli dokularında çoğu hücre türlerinde COX-1 enzimi devamlı olarak sentezlenir. Hücreler arası iletişim, doku hemostazı, hücre koruma ve hücre içi düzenleme görevlerine sahiptir. Bunun tersine COX-2 yangısal mediatörler, sitokinler, tümör promoterleri,

büyüme faktörleri ve gonadotropinler tarafından indüklenebilir. Uygun uyarı olmadan COX-2 enzimi çoğu dokuda önemsiz derecede az bulunur. COX-1 ve COX-2 genleri ayrı genlerdir [306]. Birbirine aminoasit seviyesinde % 60 benzerdir. COX-1 geni 22 Kilodalton(Kd)' luk uzunluğa sahiptir ve 11 ekson içerir. COX- 2 geni 8 Kd uzunluktadır ve 10 ekson içerir. COX-2 ekspresyonu PKC, LPS, tümör promotörleri, onkogenler, mitojenler, hormonlar, bakteriyel endotoksinler ve sitokinler gibi değişik uyaranlara yanıt olarak insan endotel, düz kas hücreleri, monosit ve fibroblastlar gibi farklı hücrelerde hızla artar[307,308]. (Şekil 9) PGH2 nükleer eikazanoitler sinyal sisteminde rol alan pek çok inflamatuvar bileşiğin öncülüdür. COX-2 ve beraberinde PGE2 artışı CMV, HSV ve HBV' nin replikasyonuna eşlik ettiği görülmüştür. PGE2 yangısal reaksiyonlar esnasında en bol bulunan lipit mediatörlerden birisidir. Tümör hücre apoptozunu inhibe eder, tümör hücrelerine direkt etkiyle metastazı artıran matriks metalloproteinaz yapımını artırır ve anjiogenezi stimüle eder [337,338].



Şekil 9: COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Patofizyolojik Etkileri

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Amaç

Bu çalışmanın amacı NAYKH' da karaciğer COX-2 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi ve histopatolojik bulgularla ilişkisini araştırmaktır.

3.2.Hasta Seçimi

E.Ü.T.F Gastroenteroloji Bilim Dalı Karaciğer Polikliniğinde izlenen öykü özellikleri, klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguları ve karaciğer ince iğne aspirasyon biyopsileri ile tanıları doğrulanmış, E.Ü.T.F Patoloji Anabilim Dalı'nda karaciğer biyopsileri olan 1997-2007 arasında karaciğer biyopsisi yapılmış 20-72 yaşları arasında 60 hasta alınmıştır. Kasım 1997 – Haziran 2007 yılları arasında, biyopsileri ile tanı alan 60 adet NAYKH olgusu arşiv kayıtları incelenerek belirlendi. Çalışmaya başlamadan önce hastanemiz etik kurulundan onay alındı. NAYKH olgularını seçerken, HBV, HCV, otoimmün hepatit, primer biliyer siroz ve alkol hikayesi olmayan, karaciğer biyopsilerinde %5' in üzerinde yağlanması olan, laboratuvar incelemelerinde karaciğer enzim yüksekliği bulunan ve karaciğer biyopsileri yapılmış olanlar arasından rastgele seçilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen hastaların bilgileri hasta dosyalarından elde edilmiştir. Çalışmamızdaki 60 hastanın karaciğer biyopsi bloklarına immünohistokimyasal yöntemle COX-2 boyası uygulanmıştır. Paraffin blokları ve H&E boyalı preparatları Immünohistokimyasal

incelemeye uygun olmayan 6 olgu çıkarılmıştır. 54 olgu Brunt NAYKH Evreleme Sistemine göre evrenmiş ve NAS skorları belirlenmiştir. Bu skorlamada 0' dan 8'e kadar sayısal skorlama mevcut olup 0 puan nekroinflamatuar aktivitenin ve yağlanmanın olmadığını, 8 puan ise yüksek nekroinflamatuar aktiviteyi ve karaciğer inflamasyonu olduğunu göstermektedir. Brunt Evrelemesine göre fibrozis 0, 1, 3 ve 4 olarak skorlandı. 0'dan 3'e kadar olan skordaki olgular NASH, fibrozis 4 olanlar siroz olarak değerlendirildi. NAS skoru 8 olan vaka yoktu.

3.3. Değerlendirilen Veriler

3.3.1. Histopatolojik Değerlendirme

Orijinal patoloji raporlarından elde edilen klinik ve histopatolojik bilgiler, Hematoksilen-Eozin(HE), Masson-Trikrom(MT) ile boyanmış lamalarının tekrar değerlendirilmesiyle immünohistokimyasal boyama için uygun örnekler seçildi. Biyopsi örnekleri E.Ü.T.F Patoloji Anabilim Dalında NAS histolojik aktivite skoruna göre değerlendirildi. Tüm karaciğer biyopsileri hastaların biyokimyasal laboratuvar değerlerini ve daha önceki histopatolojik bulgularını bilmeyen NAYKH konusunda deneyimli bir patolog tarafından (F.Y) değerlendirilmiştir.

3.3.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimya boyama önesinde NAYKH olgularına ait uygun olan 1 adet paraffin blok seçildi. Seçilen paraffin bloklardan elde edilen 5µm' lik kesitler poli-L-Lisin' li lamlara alındı. Lamlara İmmünohistokimyasal boyaa

Ventana Benchmark XT cihazı kullanılarak uygulandı. Bu işlemde aşağıdaki boyama prosedürü izlendi:

- **Paraffin kesitler** 60 derecedeki etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Ksilende iki kez 15 dakika bekletildi.
- Saf alkolden iki kez 10 dakika geçirilerek deparafinize edildi.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitler PT modülle cihazında pH=6'da 98°'de 20 dakika ısıtıldı.
- Tekrar distile suda yıkandı.
- %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika muamele edildi.
- Distile su ile 5 dakika yıkandı.
- Fosfatla tamponlanmış salin (PBS) solüsyonunda iki kez 5 dakika yıkandı.
- Ultra V blok solüsyonu 5 dakika uygulandı.
- Primer COX-2 antikoru ile 1/100 30 dakika inkübasyon yapıldı.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5 dakika yıkandı.
- Biotinize edilmiş keçi anti-polivalent ile 20 dakika inkübe edildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Streptavidin peroksidaz ile 20 dakika inkübe edildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5 dakika yıkandı.
- DAB kromojeni 5 dakika uygulandı.
- Kesitler distile su ile yıkandı.

- Mayer Hematoksileni ile 30 s süreyle zıt boya yapıldı.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Artan konsantrasyondaki alkolden (70°,80°, 90°) geçirildi.
- Ksilenle yıkandı.
- Mounting medium kullanılarak lamel kapatıldı.

Çalışmamızda(COX-2 Rabbit SP21Cell Marque ,Bios Kat. No: 240R-16) antikor kullanıldı.Kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. COX-2 'nin değerlendirilmesinde sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma immünaktif olarak değerlendirildi.İmmünaktivitenin en yoğun olduğu alanlar x40 ve x100 objektifler kullanılarak belirlendi. Daha sonra x100 objektif kullanılarak bir büyük büyütme alanındaki tüm hücreler ve immünreaktivite gösteren tüm hücreler sayılarak,100 hücrede pozitif boyanmış hücre sayısı olarak hesaplandı. Pozitif boyanan hücrelerin % oranı dikkate alınarak aşağıdaki şekilde skorlandı. COX-2 için % 5 değerinin üzerindeki olgular pozitif olarak kabul edildi. COX-2 \leq % 5 ise negatif kabul edildi

Boyanmanın şiddeti:

0: (negatif) boyanma olmayan ve <% 5 hücrede boyanma;

1+: (zayıf), düşük ekspresyon % 5-29 hücrede boyanma

2+: (orta derecede); % 30-59 hücrede boyanma

3+: (kuvvetli boyanma), % 60-100 hücrede boyanma

0: (0-4%), 1:(5-29 %), 2: (30-59 %), 3: (60-100 %).

Boyanmanın yoğunluğu: **0:** (negatif); **1+:** (orta), **2+:** (kuvvetli boyanma).

İmmunreaktivite skoru: boyanma Şiddeti ve boyanma yoğunluğundan elde edilen skorların birbiriyle çarpımından oluşmaktadır.

4. BULGULAR

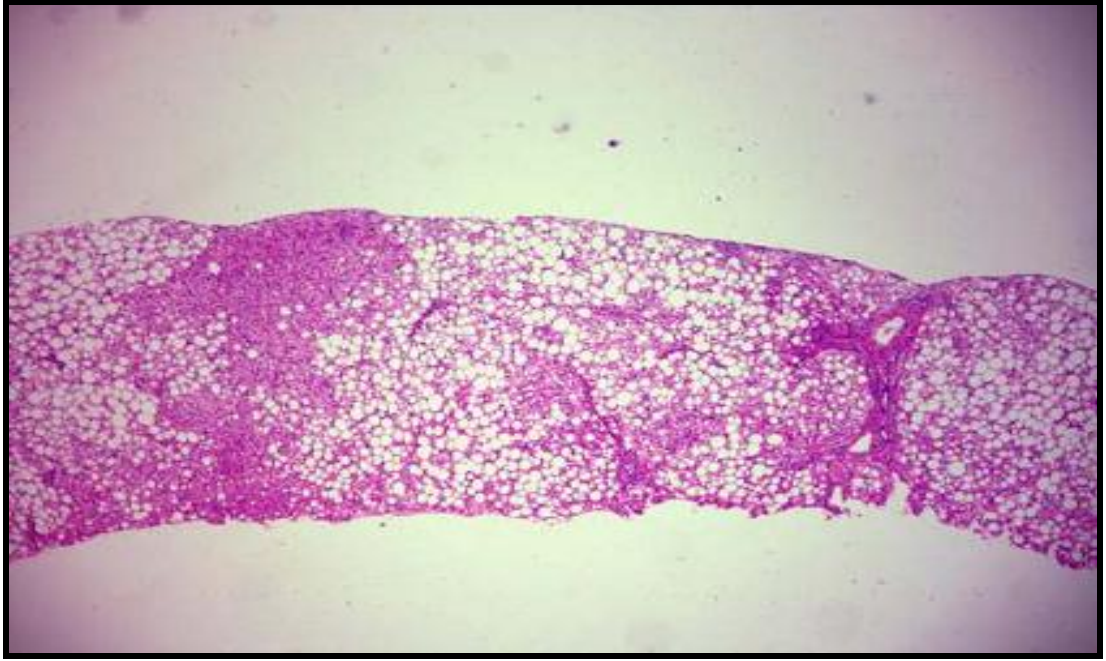
4.1.Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızdaki 50 NASH olgusunun karaciğer biyopsi bloklarına immünohistokimyasal yöntemle COX-2 boyası uygulanmıştır. 4 hasta da karaciğer tamamen normal saptanmıştır. Tüm olguların yaşları 20-72 arasında olup, yaş ortalaması 45.6' dir. Tüm olguların kadın/erkek oranı 21/33 olup, % 44.4' ü kadındır. NASH grubu fibrozisin varlığına göre **Steatohepatit** (NASH, fibrozis yok) ve **Steatofibrozis**(NASH, fibrozis var) olarak 2 gruba ayrılmıştır. Steatohepatit grubunda olgu sayısı 29 (tüm olgu sayısının % 53.7' i), Steatofibrozis grubunda olgu sayısı 21 (tüm olgu sayısının %38.8'i) olarak izlenmiştir. Normal olgular 4 adet olup tüm olguların % 7.4' ünü oluşturmaktadır. Steatohepatit olgularında cinsiyet dağılımı (K/E :10/19) olup bu grubun % 34.4' ü kadındır. Steatofibrozis olgularında cinsiyet dağılımı (K/E:9/12) olup bu grubun % 42.8' i kadındır. Steatohepatit grubunda hastalar 21-72 yaş aralığı arasındadır (ortanca yaş:47), Steatofibrozis grubunda hastalar 20-65 yaş aralığı arasındadır (ortanca yaş:46)

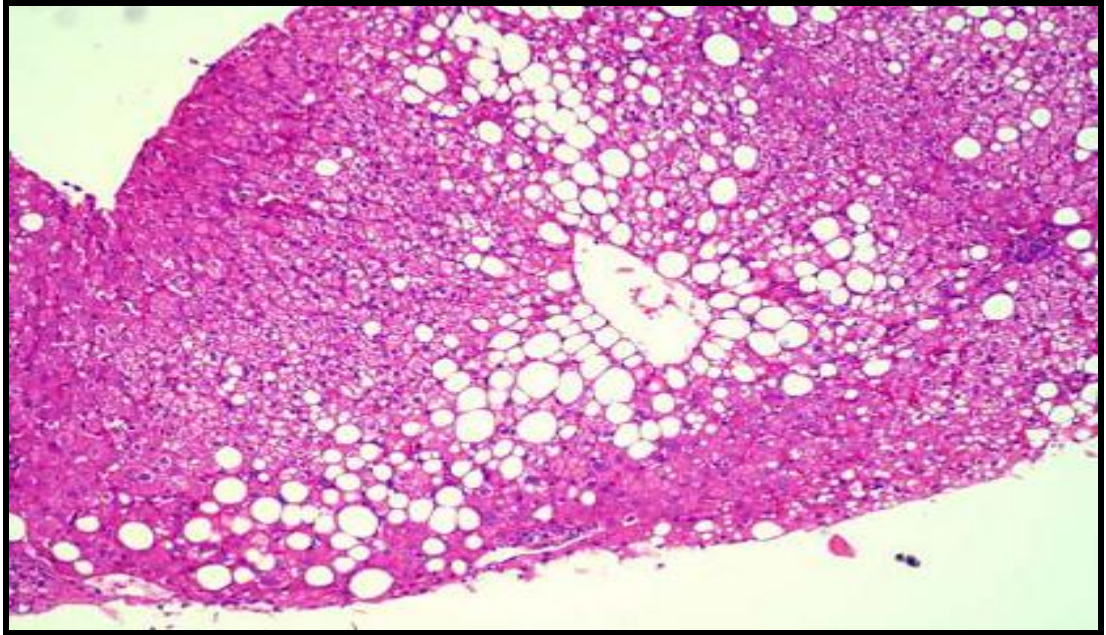
Steatohepatit grubunda hastalar immünohistokimyasal olarak % 62 oranında COX-2 ekspresyonu gösterirken, Steatofibrozis grubunda % 100 oranında COX-2 ekspresyonu izlenmiştir.

Steatohepatit ve Steatofibrozis grubu beraber değerlendirildiğinde olgularının % 38' inde hafif yağlanma izlendi. (Histopatolojik değerlendirmede ol-

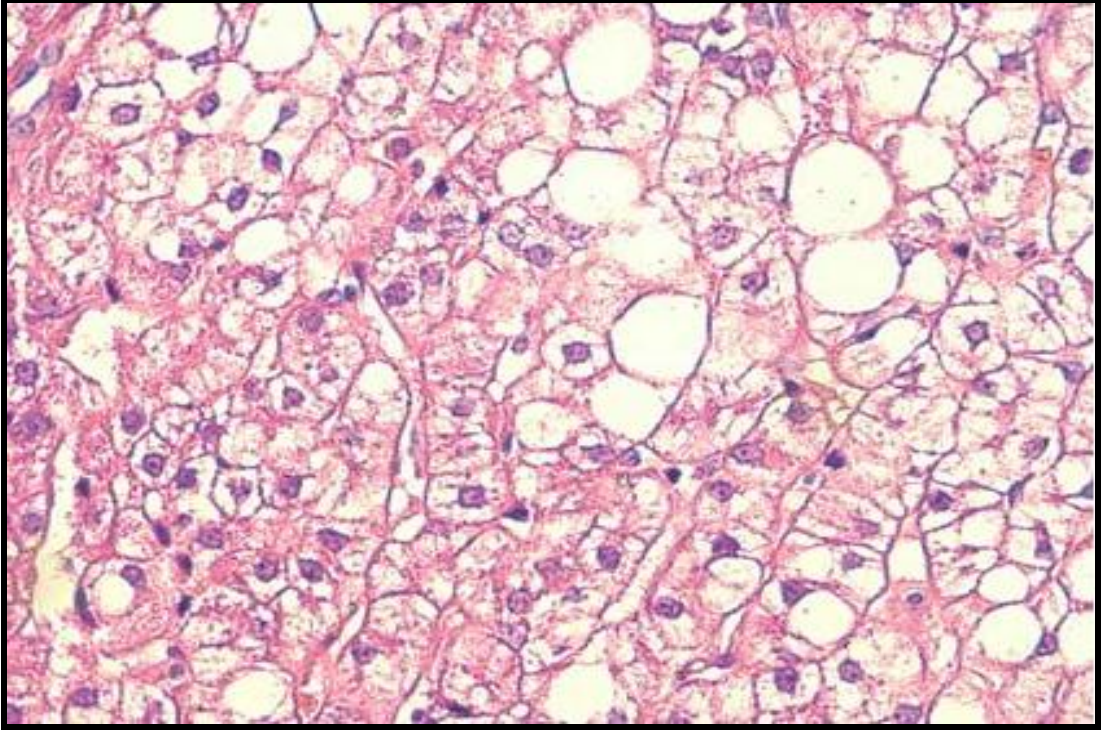
gular yağlanma oranlarına göre: **1(hafif):**%5-33; **2(orta):**%34-66; **3(şiddetli):**%>67 olarak değerlendirilmiştir. Tüm NASH olgularının % 34'ünde orta yağlanma, % 28'inde şiddetli yağlanma izlenmiştir. NASH olgularının % 6'ında portal inflamasyon izlenmiştir.Bu literatürle uyumludur. Steato-fibrozisli hastaların % 9.5'inde perisellüler fibrozise perisellüler fibrozis patternine eşlik eden periportal fibrozis izlenmiştir.



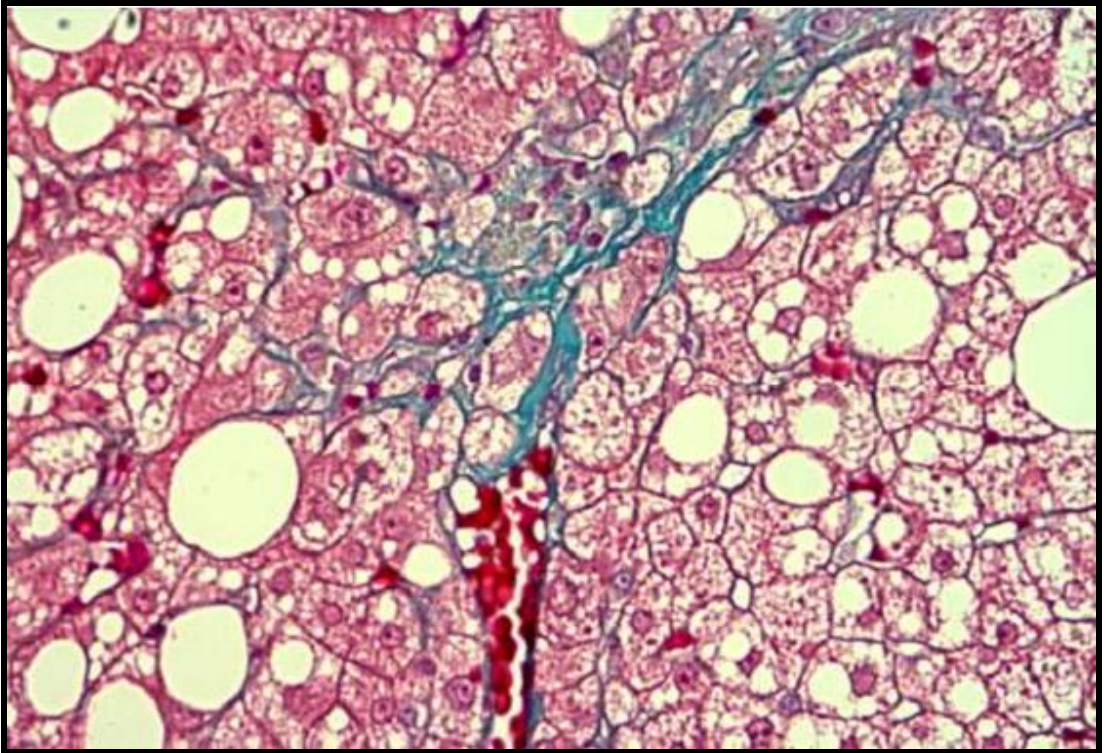
Resim 1: H-E ; Zon 3 Yağlanma X 40



Resim 2: H-E ; Zon 3 Yağlanma X 100



Resim 3: H-E , Balonlaşma X 400



Resim 4: M-T ; Periselüler Fibrozis X 400

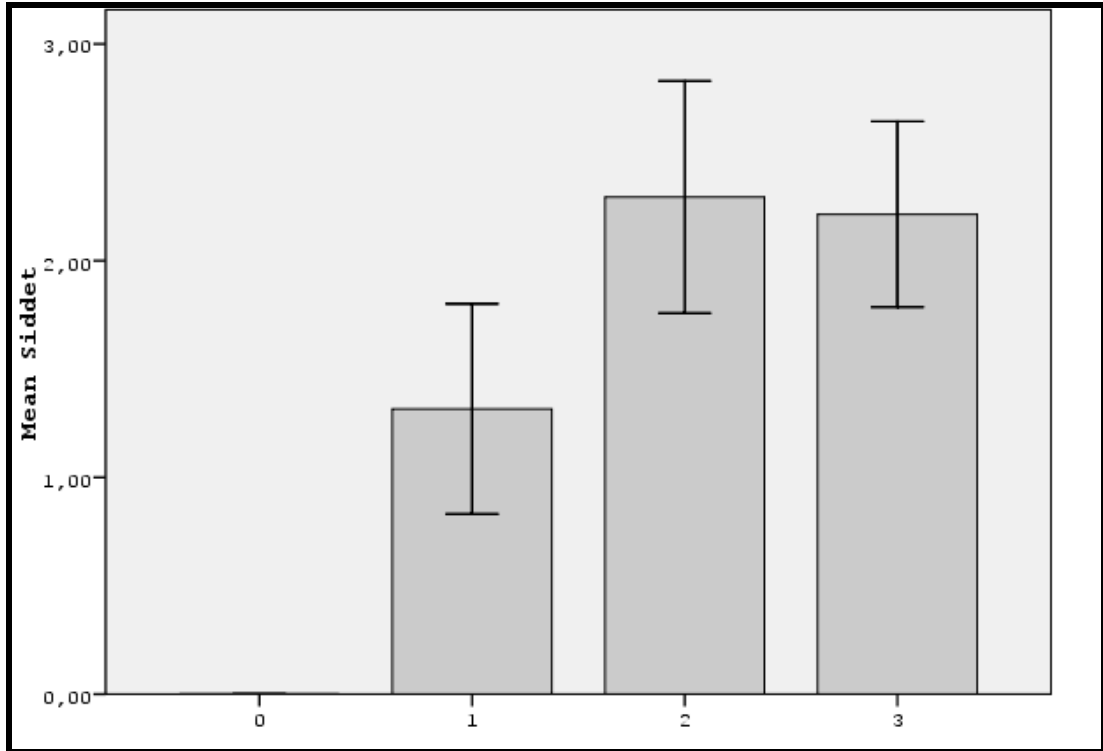
4.2.İmmünohistokimyasal bulgular

Olguların Brunt evresine göre, hepatositlerde COX-2 ekspresyonu olan hücreler sayıldığında, evre 0 olguların % 62' sinde (ortalama İHC skor:2.10), evre 1 olguların % 100' ünde (ortalama ihc skor 4.57), evre 2 olguların % 100' ünde (sadece 1 olgu, İHC skoru 2), evre 3 olguların % 100' sinde (4 olgu ortalama İHC skor:2.75), evr 4 olguların %100' ünde (2 olgu,ortalama İHC skor:4) COX-2 ekspresyonu ilelenmiştir. Yağlanması olmayan 4 olguda COX-2 ekspresyonu gözlenmemiştir. (İHC skor:0)

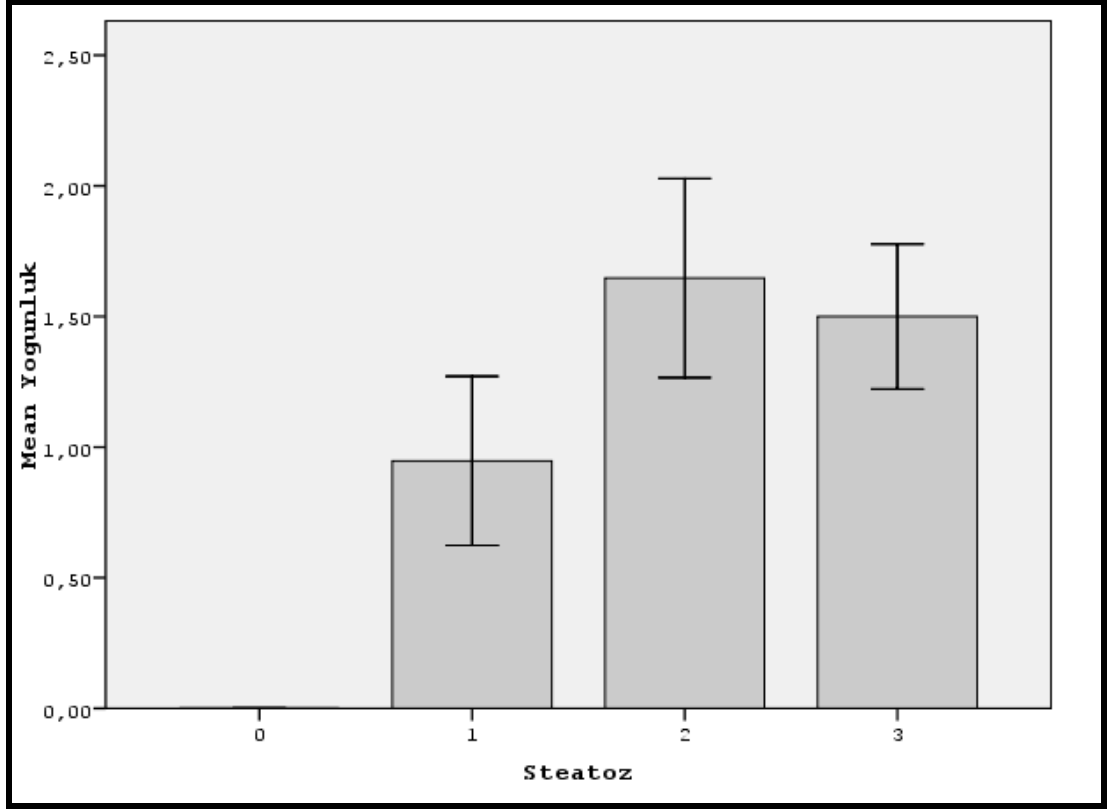
COX-2 ekspresyonu ve histopatolojik değişkenler parametrik olmayan bir test olan **Spearman Korelasyon Analizi** ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak COX-2 boyanma şiddeti ve yoğunluğu ile 4 histopatolojik parametre (fibrozis,steatoz, yangı ve balonlaşma) ve NAS skoru arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. (Tablo 8)

		COX-2 Boyanma Şiddeti	COX-2 Boyanma Yoğunluğu
Fibrozis	Korelasyon Katsayısı	0.353489538	0.384344442
	p	0.008739628	0.004112959
Steatoz	Korelasyon Katsayısı	0.480771515	0.466487834
	p	0.000233509	0.000377305
Yangı	Korelasyon katsayısı	0.353872944	0.425256619
	p	0.008661898	0.001348194
Balonlaşma	Korelasyon Katsayısı	0.344864219	0.483626473
	p	0.01065547	0.000211616
NAS Skoru	Korelasyon Katsayısı	0.431769614	0.503290803
	p	0.001114118	0.000104861

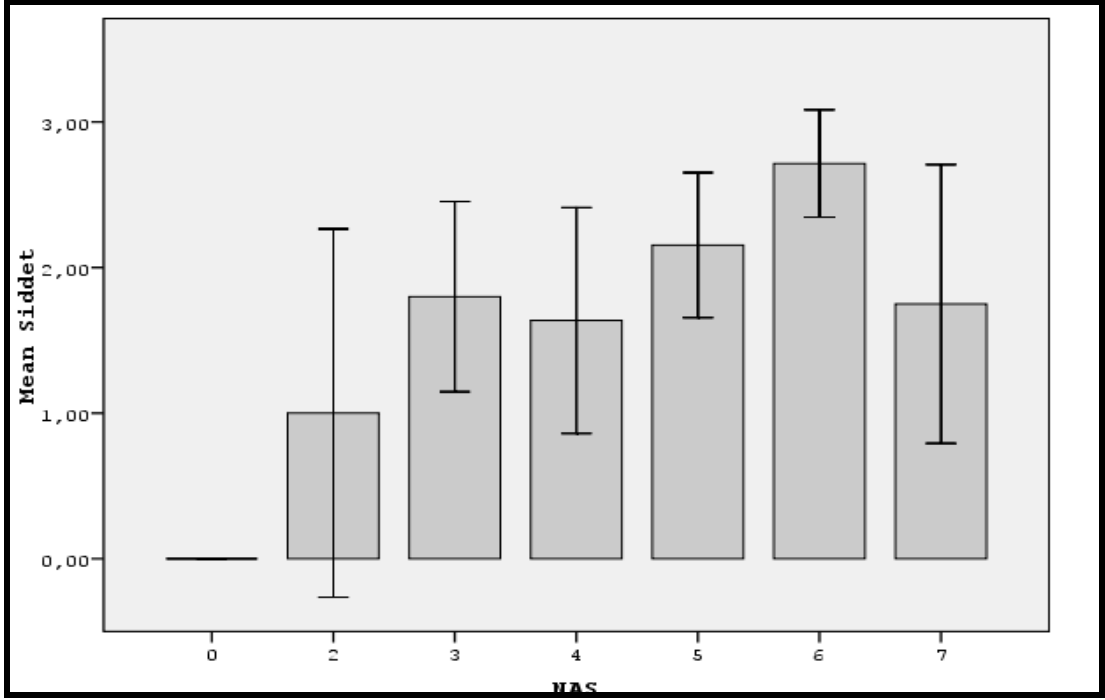
Tablo 7: Tüm Verilerin Korelasyon Analizi



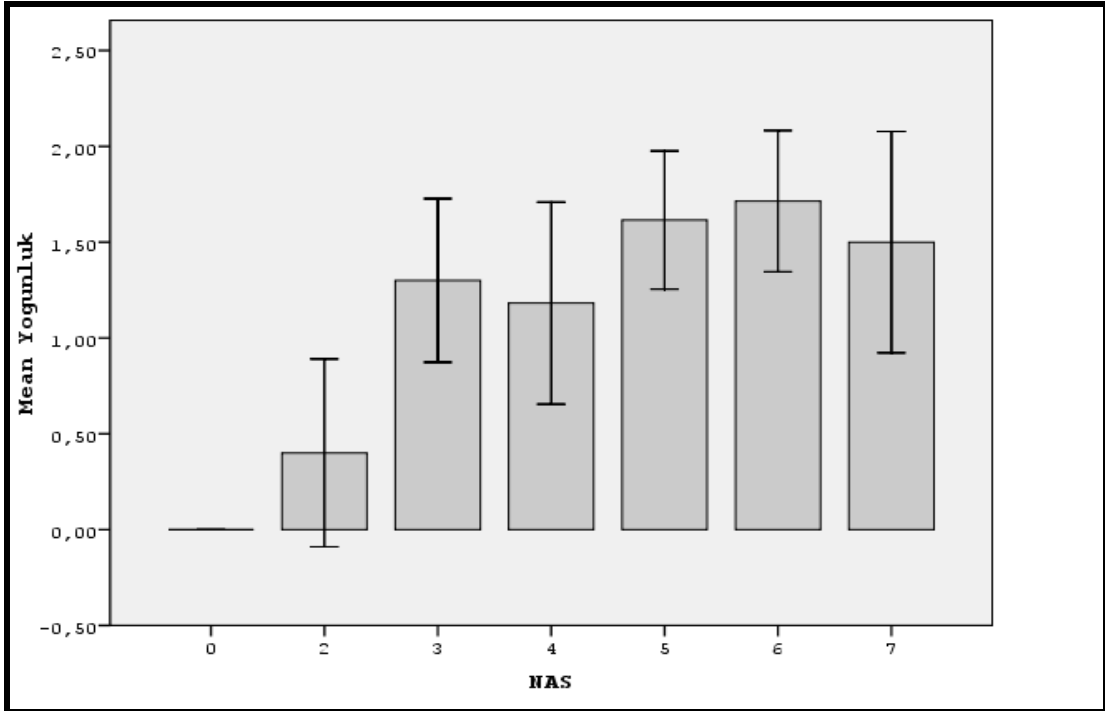
Tablo 8: COX-2 Boyanma Şiddeti ve Yağlanma Şiddeti İlişkisi ($p = 0.0002$)



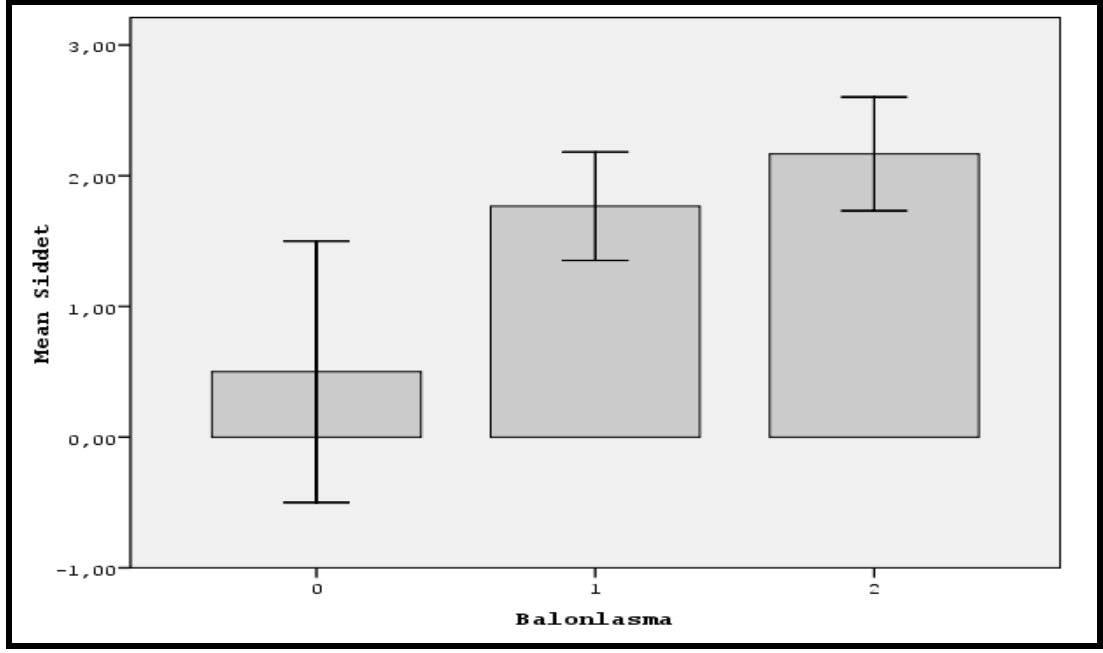
Tablo 9: COX-2 Boyanma Yoğunluğu Ve Yağlanma Şiddeti İlişkisi ($p = 0.0003$)



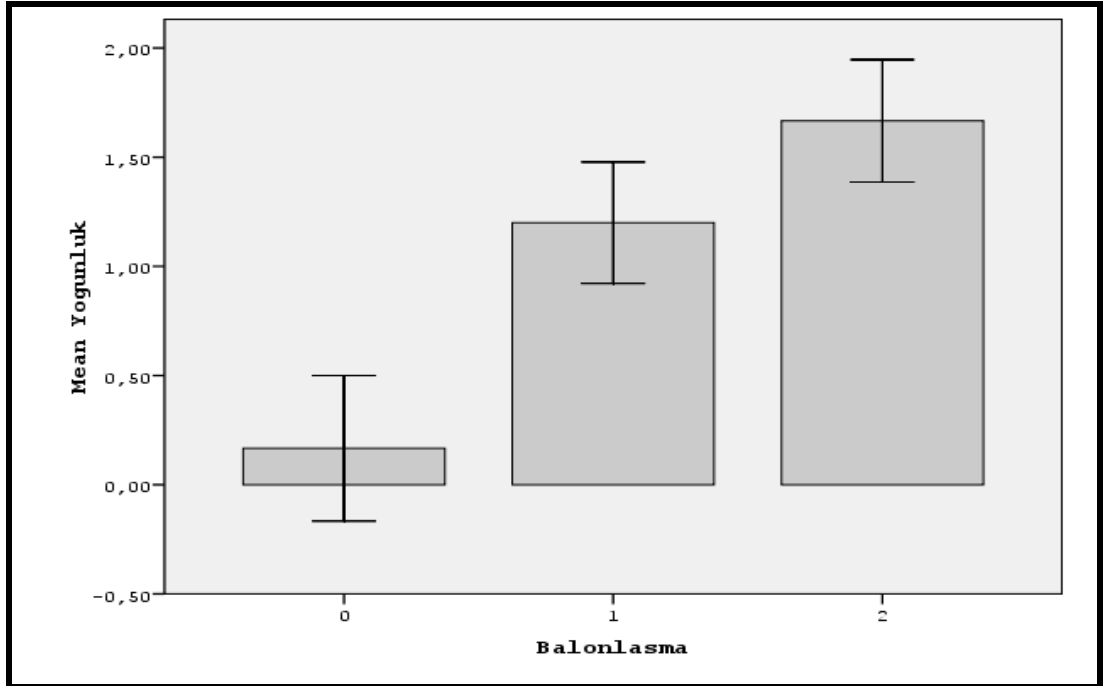
Tablo 10: COX-2 Boyanma Şiddeti NAS Skoru İlişkisi ($p = 0.001$)



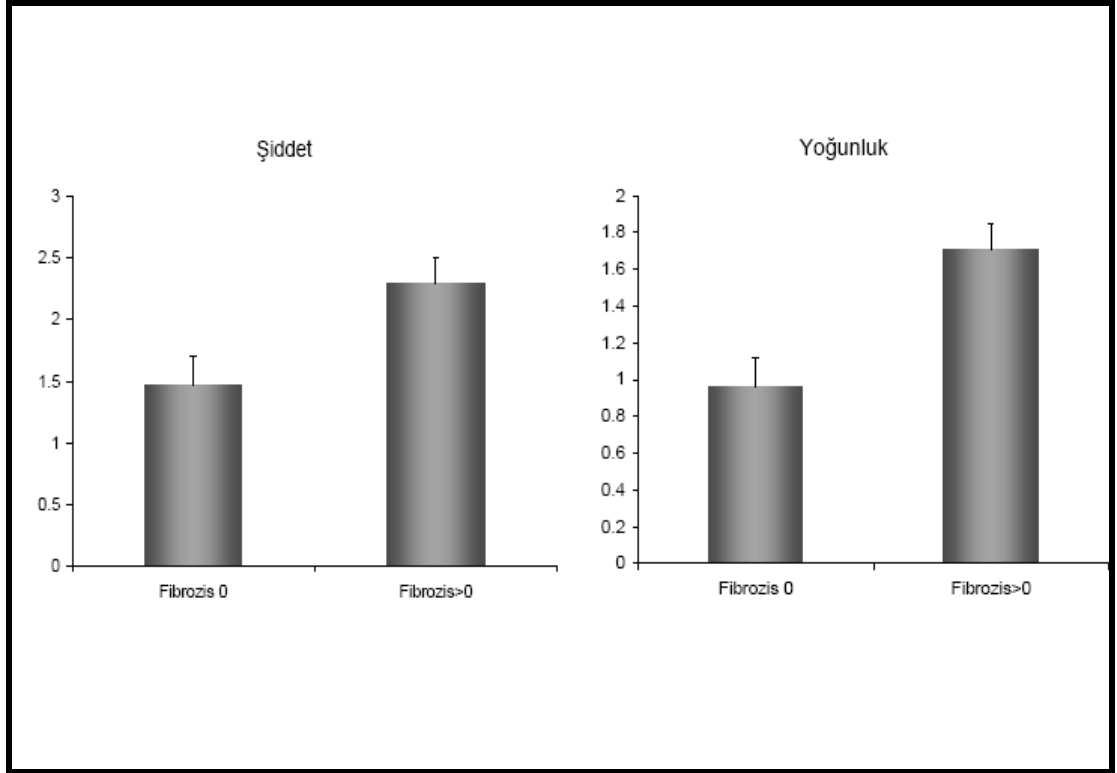
Tablo 11: COX-2 Boyanma Yoğunluğu NAS Skoru İlişkisi ($p = 0.0001$)



Tablo 12: COX-2 Boyanma Şiddeti Ve Balonlaşma İlişkisi ($p = 0.01$)



Tablo 13: COX-2 Boyanma Yoğunluğu Ve Balonlaşma İlişkisi ($p = 0.0002$)



Tablo 14:COX-2 Boyanma Şiddeti, Yoğunluğu ve Fibrosis İlişkisi ($p=0.008$)

4.2.1.COX-2 Ekspresyonu

Hepatositlerde COX-2 ekspresyonunun dağılım Şiddeti semikantitatif olarak 0,1,2,3 derecelerine ayrıldı. Boyanmanın Şiddeti:

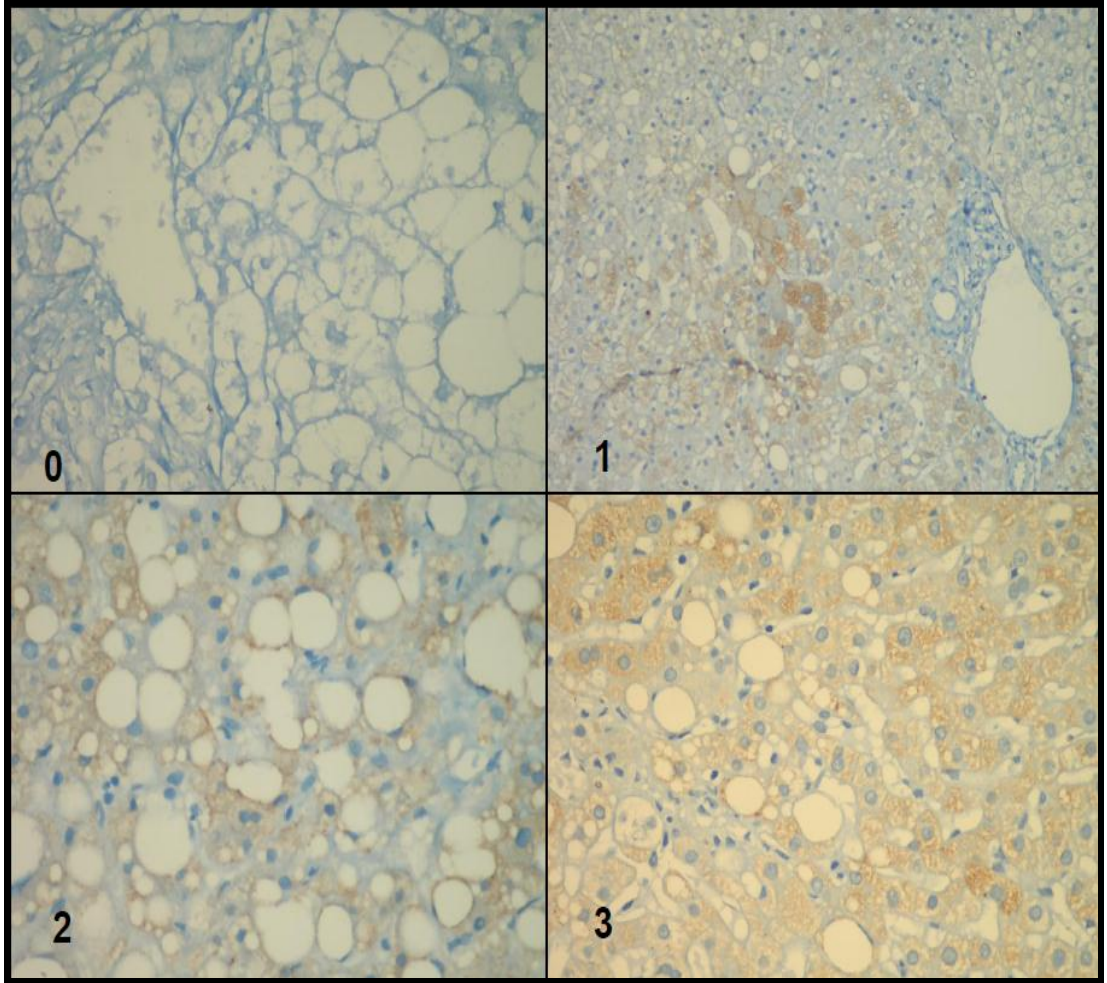
0: (negatif) boyanma olmayan ve <% 5 hücrede boyanma;

1+: (zayıf), düşük ekspresyon % 5-29 hücrede boyanma

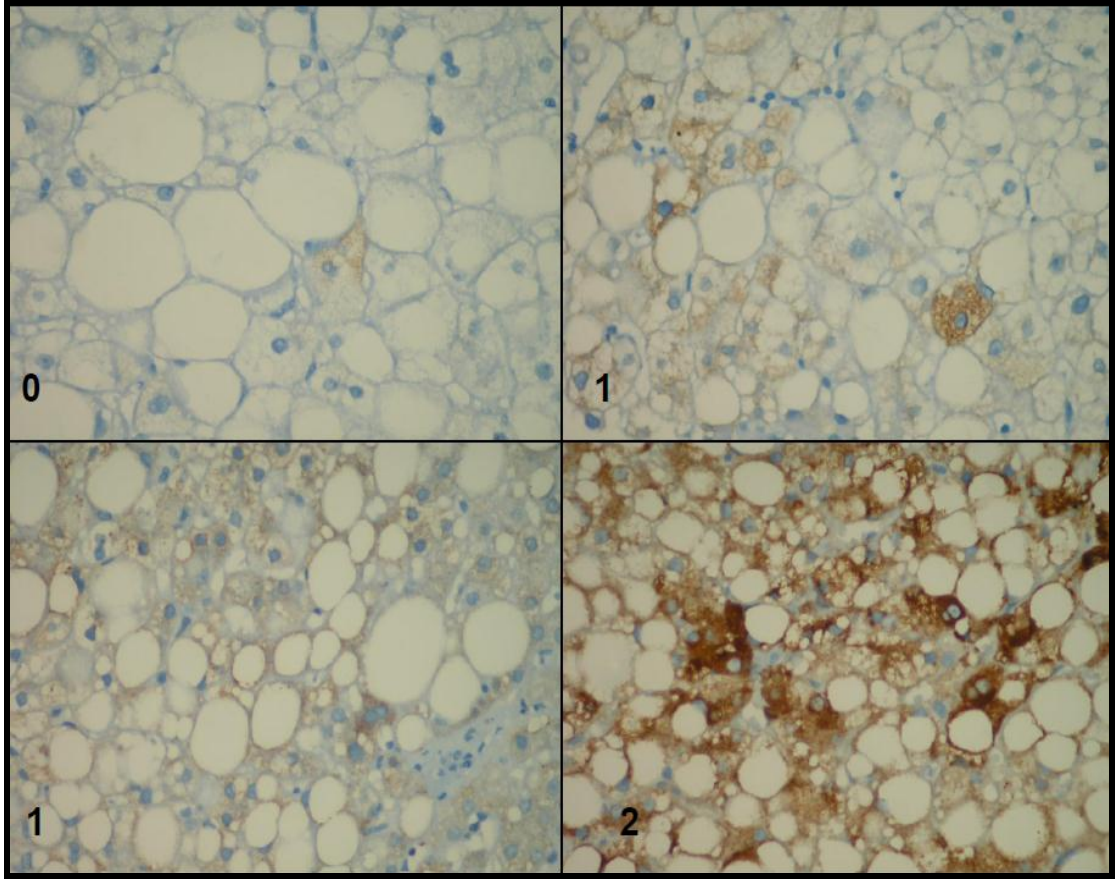
2+: (orta derecede); % 30-59 hücrede boyanma

3+: (kuvvetli boyanma), % 60-100 hücrede boyanma

[0: (0-4%), 1:(5-29 %), 2: (30-59 %), 3: (60-100 %)]. (Resim 5)

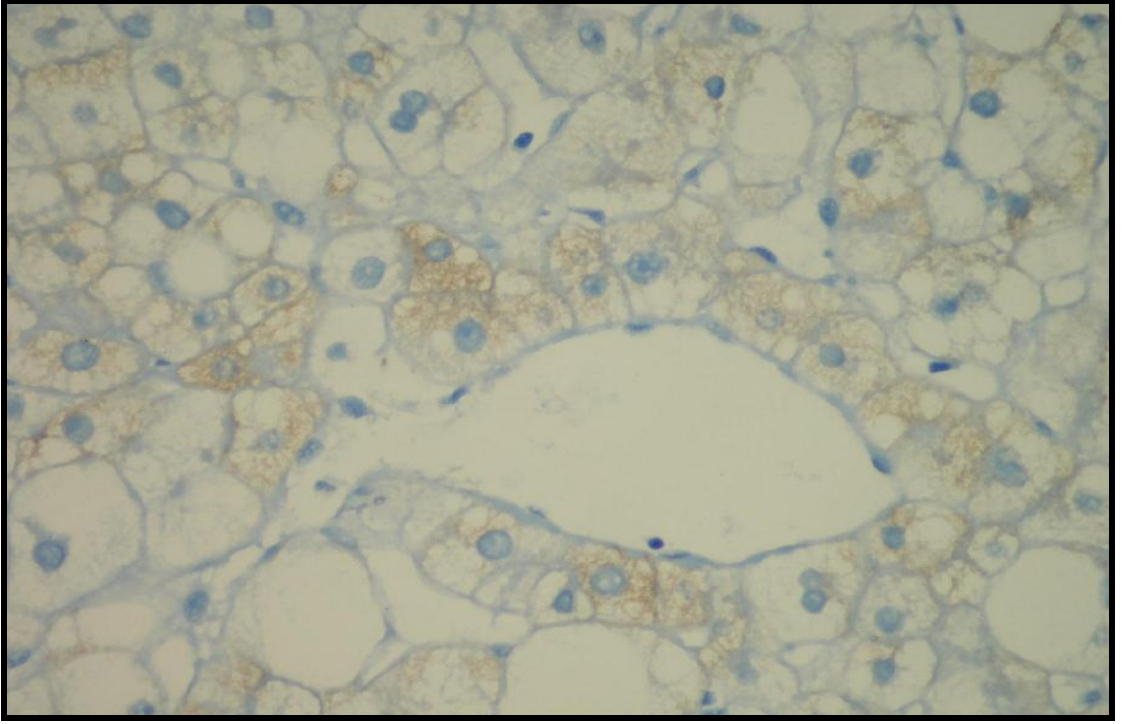


Resim 5:COX-2 Ekspresyon Şiddetinin Semikantitatif Skorlanması

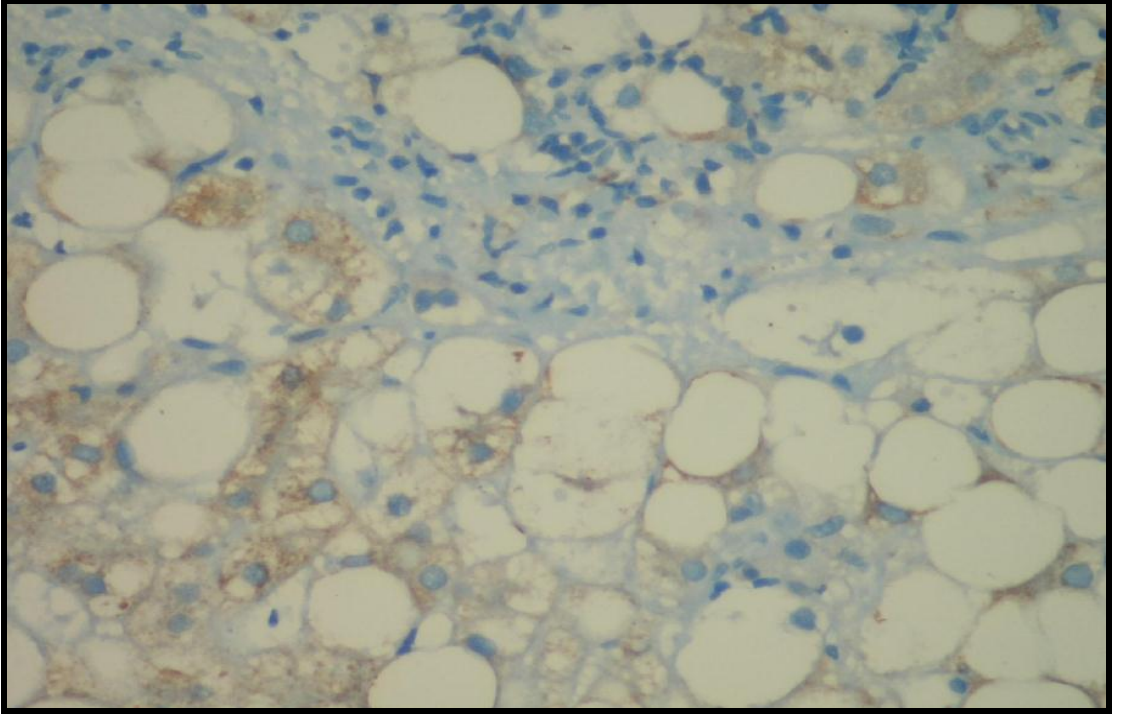


Resim 6:COX-2 Ekspresyonunun Yoğunlunun Semikantitatif Skorlanması

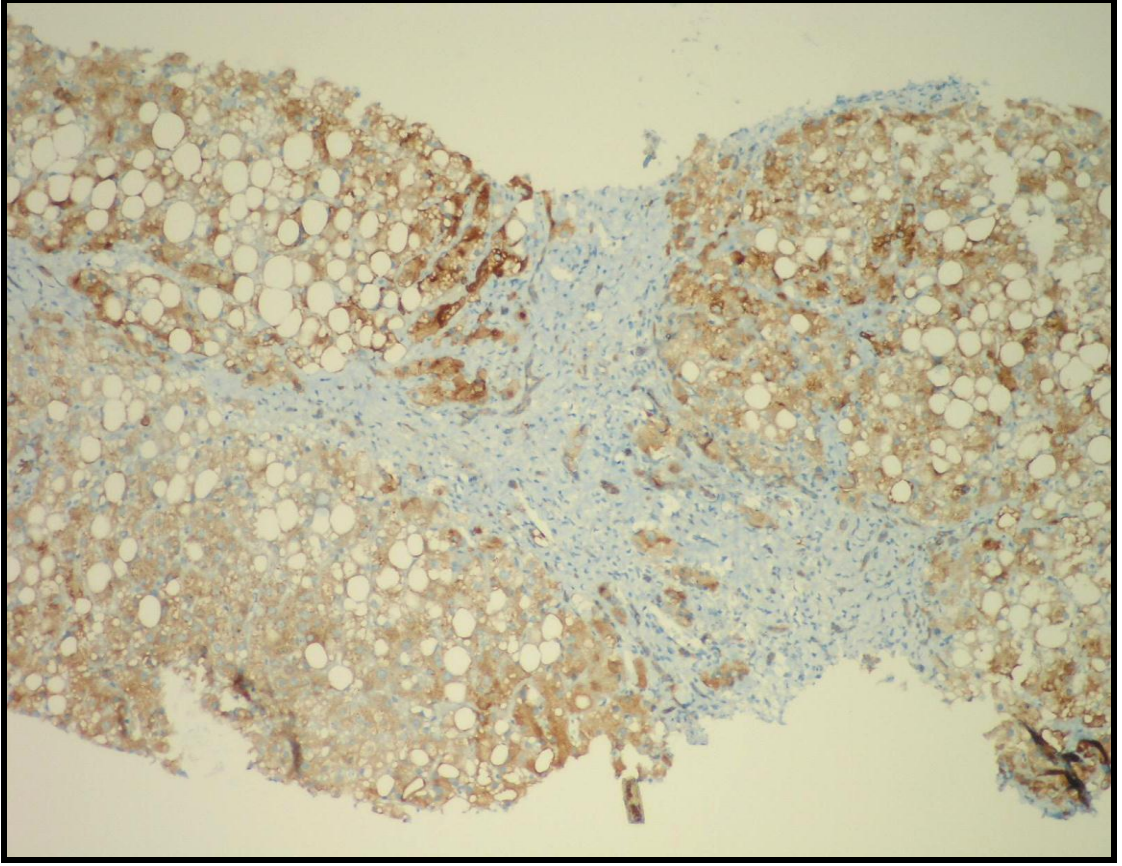
COX-2 ekspresyonu ile ilgili değişik örnekler resim 7,8 ve 9 da gösterilmiştir.



Resim 7: Santral ven çevresinde steatoz ve COX-2 pozitifliği



Resim 8: Belirgin inflamasyon, Steatozis, Fibrozis, Artmış COX-2 Ekspresyonu



Resim 9: Belirgin Steatohepatit Ve İleri Fibrozis, Şiddetli COX-2 Ekspresyonu

5. TARTIŞMA

Obezite, insülin direnci ve metabolik sendromun artan prevalansı, kronik karaciğer hastalığının geleceği için önemli belirteçlerdir. TURDEP çalışması 20 yaş üzeri 24.788 birey üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmaya göre, obezite prevalansı (BKİ ≥ 30 kg/ m²) kadınlarda %29.9, erkeklerde %12.9'dur. Santral obezite (Bel çevresi: kadında ≥ 88 cm, erkekte ≥ 102 cm) açısından değerlendirme yapıldığında obezite prevalansı %34.3 (kadınlarda %48.4 ve erkeklerde %16.9) olarak saptanmıştır [18]. Türk kadınlarında santral obezite sıklığının bu denli yüksek olması, başta kalp damar hastalıkları ve tip 2 diyabet ve NAYKH olmak üzere kadın nüfusun yakın gelecekte karşılaşacağı önemli sorunlara işaret etmektedir.

İnflamasyonun başlamasında ve sürdürülmesinde en önemli enzim COX enzimidir. COX-2' nin HCC, siroz , ve kronik hepatitte karaciğerde arttığı bilinmektedir [303]. Bu nedenle karaciğerde gelişen inflamasyondan ve fibrozisten sorumlu olduğu düşünülmektedir. COX enziminin iki alt tipi COX-1 ve COX-2' dir. COX-1 fizyolojik olaylarda, COX-2 ise patolojik olaylarda rol alır [304]. COX-2' nin artan karaciğer fibrozisiyle birlikte dokuda arttığı gösterilmiştir [260,314]. COX-2 inhibitörleriyle karaciğerde fibrozisin geriletildiği çalışmalar da mevcuttur [293,294,319,339-341]. Fakat tam tersi yönde yayınlar da mevcuttur [342]. COX-2' nin karaciğer fibrozisindeki rolü çelişkilidir ve daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır [247].

COX-2' nin birçok kanser prekürsörü lezyonda ve kanserde ve HCC' de arttığı gösterilmiştir [261-263,328]. Morinaga ve arkadaşları tümör dışındaki karaciğer dokusunda HCC ile karşılaştırıldığında COX-2 ekspresyonunun arttığına göstermiş, Histolojik Aktivite İndeksi, transaminaz değerleri ve proliferatif aktivite ile ilişkili bulmuşlardır [287]. Bu nedenle COX-2'nin nekroinflamatuvar ve rejeneratif aktivitede rolü olduğu yorumunu yapmışlardır. COX-2' nin hepatokarsinogenez mekanizmasındaki rolüne ait veriler gün geçtikçe artsa da, rolü tam olarak bilinmemektedir [196-200,227,228,289,329]. COX-2' nin ürettiği bir eikanoit olan PGE₂' nin hepatokarsinogenezin ilk basamaklarına daha spesifik olmak üzere tümör hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz ve anjiogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir [200,309,332,333]. COX-2 inhibitörlerinin HCC hücre kültüründe anjiyogenezi azalttığı ve apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir [196,198,295,334]. Koga ve arkadaşları HCC de immünohistokimyasal COX-2 ekspresyonunun tümör farklılaşmasına bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır [228]. Kondo ve arkadaşları HCC' de tümör dışı karaciğer dokusunda COX-2 ekspresyonunun kötü sağkalım göstergesi olduğunu ortaya koymuşlardır. COX-2 ekspresyonunun iyi diferansiye tümörlerde kötü diferansiye tümörlere göre daha çok eksprese olduğu görülmüştür. COX-2'nin iyi diferansiye HCC' de daha çok eksprese olması, inflamasyonla ilişkili karsinogenez ve COX-2 ilişkisini desteklemektedir [336].

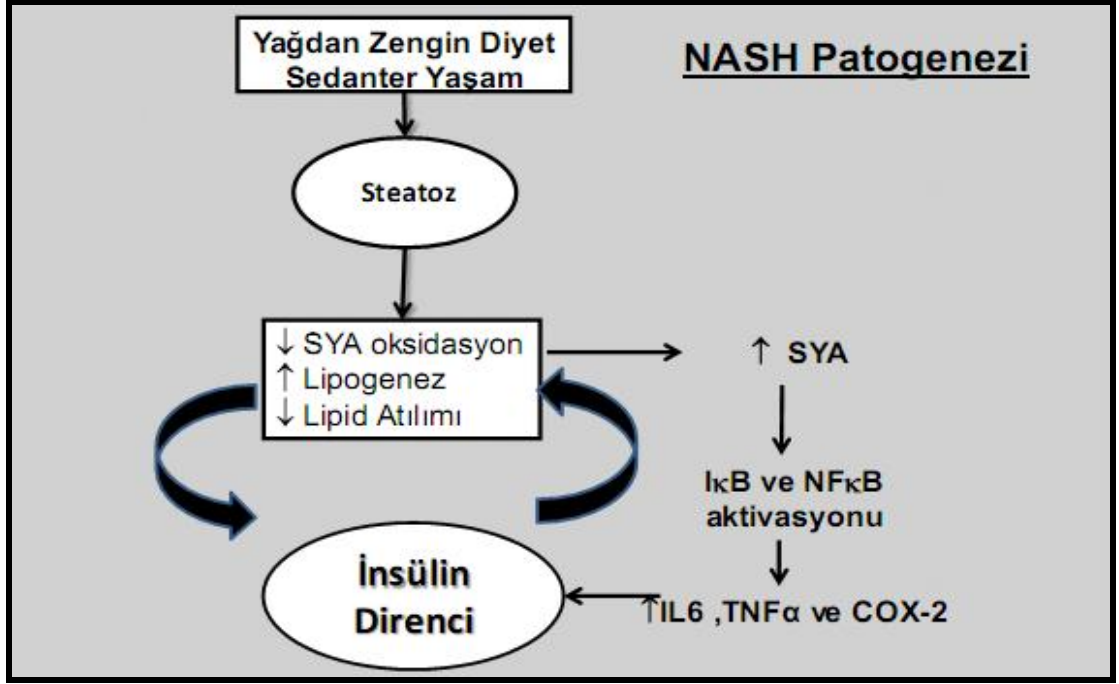
COX-2 ekspresyonunun kronik viral hepatit, sirozda arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir [228,287,296,301,303,330,331]. (Şekil 11). HCC' nin

büyük çoğunlukla sirotik zeminde gelişmesi ileri evre fibrozisin bir kanser prekürsörü olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla fibrozise katkıda bulunan faktörlerin HCC' ye de katkısı olabilir. HCC' de rol oynayan COX-2' nin NASH fibrozisinin ilerlemesinde rol alabileceğini düşünmekteyiz. HCC' nin COX-2 bağımlı bir mekanizma ile olabileceği hipotezinden yola çıkarak Giannitrapani ve arkadaşları immünohistokimya ile NASH, Kronik Hepatit, Siroz ve HCC gruplarında COX-2 ekspresyonunu araştırmış, bu 4 grupta COX-2 ekspresyonunu normal karaciğere göre artmış olarak tespit etmişlerdir [301]. ve NAYKH ve karaciğerdeki COX-2 ekspresyonu ile ilgili bildiğimiz kadarı ile literatürde sadece iki hayvan çalışması bulunmaktadır [27,301]. İnsan NAYKH ve karaciğerde COX-2 ekspresyonuna odaklanmış bir yayın bulunamamıştır. Migbo ve arkadaşları 40 adet 8-10 haftalık erkek SD (Sprague-Dowley) sıçanı randomize ederek 2 gruba ayırmış, ve bir gruba yüksek yağlı diyetle besleyerek deneysel NAYKH oluşturmuş, diğer grubu normal diyetle besleyip sonuçta karaciğer COX-2 ekspresyonunu Western-blot yöntemiyle ölçmüştür. Kontrol grubunda COX-2 ekspresyonu izlenmezken, NAYKH oluşturulan ratlarda COX-2 ekspresyonu belirgin olarak saptanmıştır [27]. Karaciğer araşidonik asit ürünlerinin parçalanması ve eliminasyonunda en büyük rol oynayan organdır. PGE2 portal kan basıncı, glukoz homeostazisi, KC parankim hücrelerine besinlerin dağıtımı, karaciğer fibro-genezi gibi önemli fonksiyonları ve patolojileri düzenler [331,343]. İnvitro çalışmalarda Kupffer hücrelerinin yalnızca COX-1 eksprese ettikleri bunun yanı sıra endotoksine maruz bırakılan Kupffer hücrelerinin hem COX-1 hem de COX-2 ürettikleri görülmüştür [284,315]. COX-1' in hem sirotik hem de

normal KC dokusunda eksprese edildiği görülmüştür. COX-2 normal karaciğerde eksprese olmazken sirozda eksprese olmaktadır. Sirozda artmış COX-2 ekspresyonu fibrozis ve inflamasyonun derecesiyle ilişkili bulunmuştur [301]. Sirozda COX-2' nin artışı IKK β -NF κ β yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. NF κ β yolağının düzenlenmesi ve NASH arasında çelişkili sonuçlar olduğu için posttranskripsiyonel COX-2 düzenlenmesinin NASH patogenezinde önemli olabileceği savı güçlenmiştir. Karaciğer endotoksine maruz kalan bir organdır ve endotoksinler COX-2' nin major indükleyicileridir [344]. Endotoksinler Kupffer hücreleri tarafından alınırlar, bu yolla aktive olan Kupffer hücreleri PG sentezini artırır [284]. Bu durum NASH' te COX-2' nin artmasını açıklayabilir. NASH' in artmış endotoksin düzeyleri ile seyrettiği gösterilmiştir [274]. Hepatositler COX-1'i yapısal olarak eksprese ederler, bunun yanında normal şartlarda erişkin hepatositlerde COX-2 çok düşük miktarlarda eksprese olur. COX-2 LPS (endotoksin), oksidatif stress, TNF- α , IL-6 gibi sitokinlerin uyarısı ile çok hızlı bir şekilde artar. NAYKH patogenezinde fibrozis, ince barsak bakteriyel aşırı çoğalma, artmış barsak permeabilitesi ve barsakta endotoksin reseptörü olan TLR-4 ile ilişkilidir [374]. Lipotoksisite doymuş yağ asitlerinin doymamış yağ asitlerinden daha çok oksidatif stres ve karaciğer hasarına neden olmasıdır. Lee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada doymuş yağ asitlerinin TLR-4 aracılığıyla COX-2 ekspresyonunu arttırdığını ortaya koymuştur [361]. Doymamış yağ asitleri COX-2 ekspresyonuna neden olmamıştır. Yu ve arkadaşları MCD diyet ile farede oluşturulan deneysel NASH modelinde, kontrol grubunda değişiklik yokken COX-2 mRNA' nın MCD diyeti ile NASH oluşturulmuş farelerde 5.

günden itibaren arttığını, 10.günde COX-2 mRNA' nın 5. günde ki değerinin 2 katına ulaştığını, 3. ve 5. haftalarda 11 ve 12 katına ulaştığını saptanmışlardır [302]. Artmış COX-2 mRNA düzeyi hem hepatositlerde hem de hepatosit-dışı hücrelerde (Kupffer hücreleri, HSC) saptanmıştır. Bir başka çalışmada MCD diyet ile beslenen ve steatohepatit gelişen olgularda günlük periton içi NS398 (selektif COX-2 inhibitörü) ile steatohepatitin geriletilmiştir [302]. IKK β -NF κ B sinyal yolağı NASH patogenezinde önemlidir [183]. Ayrıca bu yolak obezite ilişkili inflamasyon ve insülin direncinden de sorumludur [219]. Selektif COX-2 inhibitörleri ve NSAID' ler IKK β ' yı spesifik olarak inhibe etmektedirler, ve insülin duyarlılığını arttırmaktadır [178-182]. Bir çalışmada karaciğere özgü IKK β inhibisyonu sadece karaciğerde insülin direncini iyileştirip, kas dokusunda insülin direncine etki etmezken, IKK β 'nın tüm miyeloid hücrelerde inhibisyonu yüksek yağlı diyetle rağmen sistemik olarak insülin direnci korunmuştur [126]. Bu da karaciğerde miyeloid hücre görevi gören Kupffer hücrelerinin NASH patogenezindeki rolünü vurgulamaktadır [345]. Ayrıca İnsülin Direnci ve PG yolağı içiçe geçmiştir. Şöyleki; karaciğerde üretilen TNF- α ve IL-6, yağ dokuda PG üretimini artırır [276]. Ve karaciğerde Kupffer hücreleri tarafından üretilen prostanoitler karaciğer insülin direnci patogenezinde rol oynayan TNF- α ve IL-6 üretimini arttırmaktadır [315]. Yapılan çalışmalarda insanda insülin direncinin artmış PG seviyeleri ile ilişkili olduğu ve yeni tanı yaşlı Tip 2 DM' li erkeklerden oluşan bir kohortta COX-2 ' nin subakut ve kronik inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili olduğu saptanmıştır [221]. Ayrıca COX-2 gen polimorfizmi Tip 2 DM ve metabolik sendrom gelişimi ile ilişkili bulunmuştur [290]. Hepatositler de pros-

taglandin reseptörlerine sahiptir. Kupffer hücrelerinden salınan PGE2' nin bu reseptörlere bağlanarak hepatositteki glukoz metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir [222]. Yakınlarda yapılan bir çalışmada hepatositlerde PGE2' nin karaciğer insülin direncine EP3 reseptör bağımlı ERK1/2 aktivasyonu yoluyla katıldığını göstermektedir. ERK 1/2 aktivasyonu IRS' nin (İnsülin Reseptör Substrat) serin fosforilasyonuna neden olur. Serin fosforile olan IRS , Akt' ı fosforile eder. Şu ana kadar hep ASA ve diğer NSAID'lerin IKKβ inhibisyonu ile insülin duyarlılığını arttırdığı düşünülüyordu fakat Rohl ve arkadaşları bu mekanizmadan sadece COX- bağımsız mekanizmaların rol almadığını, COX bağımlı mekanizmaların da IR patogeneze katkıda bulunduğunu göstermiştir [226]. NSAID'lerin insülin duyarlılığını arttırmadaki etkilerinin kısmen de olsa PGE2' nin inhibisyonu sonucu olduğu düşünülmektedir [222,356]. PGE2 karaciğerde insülin direncine ERK1/2 aracılıklı İnsülin Reseptör Substrat Serin Fosforilasyonu ile katılır, bunun aksine IL-6 insülin direncine JAK-STAT-Ras-Raf-MEK-MAPK yolağında SOCS3' ün gen ekspresyonunu arttırarak katılır. Bu iki ayrı yolak yoluyla İnsülin Direnci mekanizmasına katılmaları, neden IL-6 ve PGE2' nin insülin direncini sinerjik olarak arttırdığını açıklamaktadır. (Şekil 10)

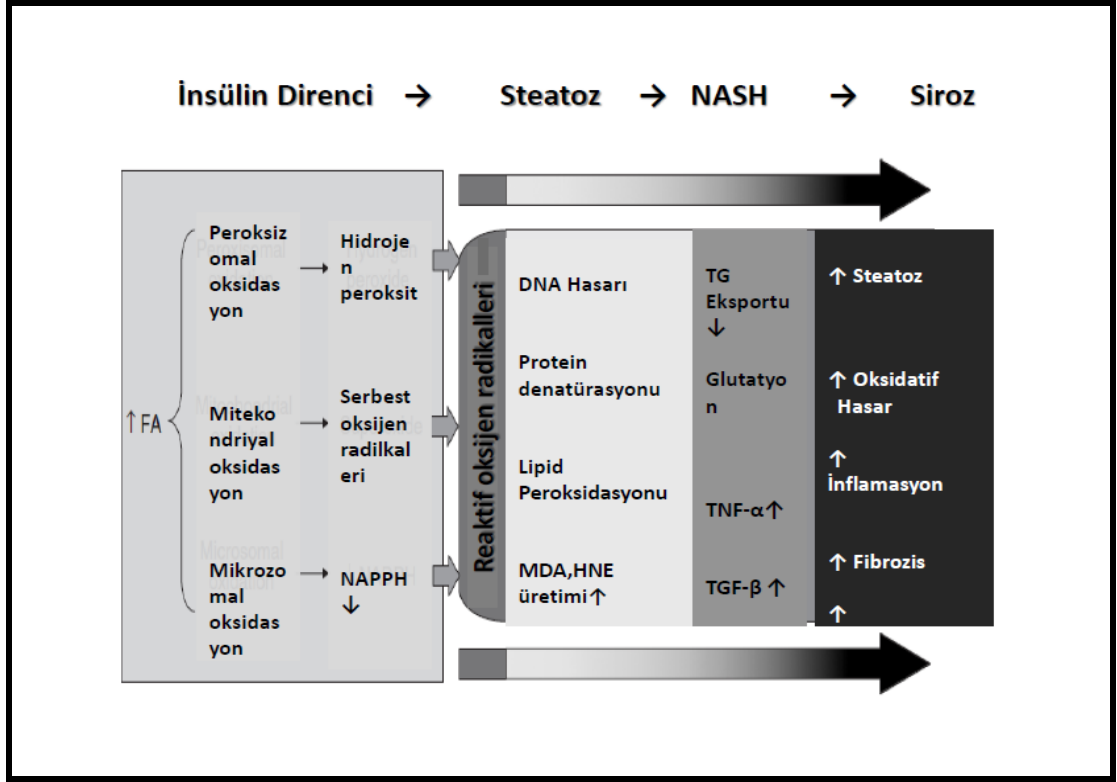


Şekil 10: COX-2, İnsülin Direnci ve NASH Patogenezi

Enomoto ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Kupffer hücrelerinden salınan PGE2'nin karaciğerde alkol ilişkili yağlanma patogenezinde rol oynadığı öne sürülmüştür [317]. Kupffer hücreleri 24 saat etanole maruz kaldıktan sonra izole edilmiş, PGE2 ELİSA yöntemi, COX-2 mRNA RT-PCR yöntemi ile ölçülmüştür. Etanolün etkisi ile karaciğerde TG miktarı 3 kat artmıştır. Ayrıca etanol Kupffer hücreleri tarafından üretilen PGE2'yi 3 kat artırmıştır [317]. Burada NASH ile birçok patogenetik benzerliği olan ASH' te COX-2'nin rol oynayabileceği vurgulanmaktadır [250].

COX-2 inflamatuvar mediatörler tarafından hızla indüklenir [324]. COX-2'nin hücrelerde malign transformasyona nasıl katkıda bulunduğu tam olarak bilinmemektedir. COX siklooksijenaz ve peroksidaz aktivitesi olan bifonksiyonel bir enzimdir. Siklooksijenaz aktivitesiyle araşidonik asidi PGG2'ye oksitler. Peroksidaz aktivitesiyle de PGG2'yi PGH2'ye çevirir. COX-2 aynı za-

manda peroksidaz aktivitesiyle, bazı prokarsinojenleri (örn.:Benzo[a]piren) karsinojenlere çevirebilir. Karaciğerde bu tip oksidatif olaylar sitokrom P450s tarafından katalizlenir. Karaciğer dışında örneğin kolonda P450s ve diğer monooksijenaz enzimlerin konsantrasyonları düşüktür. Bu durumda bazı ksenobiyotikler COX' un peroksidaz aktivitesi sayesinde mutajenlere okside olabilir. Bu etki özellikle tütün karsinojenlerine maruz kalan akciğer, oral kavite, mesane gibi organ bölgeleri için geçerlidir. Bunlara ek olarak COX' un araşidonik asidi metabolize etmesiyle bazı mutajenler oluşur. Araşidonik asidin oksidasyon ürünleri, örneğin malondialdehit bir prokarsinojendir. Bu maddenin NASH patogenezinde de rol aldığı bilinmektedir [346,347].Lipid peroksidasyonunun önemli yıkım ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksienanol(4-HNE) NASH' te yüksek konsantrasyonda izlenmiştir [346]. Bu iki lipid peroksidasyon ürünü proteinleri kovalen olarak bağlayarak, yağlanmanın NASH' e ilerleyişinden sorumlu DNA hasarında rol oynayabilir. Ayrıca HSC ekstrasellüler matriks protein sentezini, Mallory cisimciklerinin oluşumunu uyarabilir (Şekil 22).



Şekil 11: Oksidatif Stres Ve NASH

NAYKH olgularında, lipid peroksidasyonunun bir metaboliti olan 4-HNE bileşenleri immünohistokimyasal boyama ile karaciğerde yaygın olarak bulunmuştur [347]. MDA ve HNE NASH olgularında basit yağlanma olgularına göre artmış olarak bulunur. Bu durum oksidatif stresin bir göstergesidir. HNE'nin lipid türevidir ve COX-2'nin endojen bir uyarıcı olduğunu ortaya koyan bir çalışma COX-2'nin NAYKH'da inflamasyon ve oksidatif stresten sorumlu olduğunu düşündürmektedir [351]. COX-2 ekspresyonu HNE dışında bazı prokarsinojenlerle de indüklenebilir [348]. Örneğin benzo[a]piren adlı tütün dumanında ve ızgara yapılmış gıdalarda bulunan bir polisiklik aromatik hidrokarbon COX-2 transkripsiyonunu stimule edebilir. COX-2 benzo[a]piren-7,8-diolü DNA'ya direkt bağlanan benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epokside çevirir [350]. Bu bulgular benzo[a]piren kaynaklı COX-2 indüksiyonunun, tütün du-

manı gibi benzo[a]piren içeren maddelerin yol açtığı kanser gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kolon adenokarsinom hücrelerinde, COX-2 aşırı ekspresyonunun vasküler endotel hücrelerinin kollajen matrikse göç etmelerini sağladığı, bunun da invitro ortamda kapiller yapıları arttırdığı gözlenmiştir [349]. Bu etki NS-398 adlı selektif COX-2 inhibitörüyle bloke edilmiştir. Tümör büyümesi COX-2 (-/-) farelerde, wild tip ya da COX-1 (-/-) farelerden daha az olarak izlenmektedir. Buna ek olarak COX-2' nin genetik kaybı veya farmakolojik inhibisyonu VEGF üretiminde azalmaya yol açmaktadır. Bu COX-2 (-/-) farelerde tümör büyümesindeki azalmayı muhtemelen açıklayabilir [352]. Bir hücre popülasyonunun büyüklüğü, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Azalmış apoptozis premalign ve malign süreçlerde izlenmektedir. Apoptozisi pek çok faktör düzenler. İnsanda apoptozu düzenleyen faktörlerden birisi BCL-2'dir. COX-2'yi aşırı eksprese etmek için genetik olarak değiştirilmiş farelerin intestinal epitel hücrelerinde COX-2 ile beraber antiapoptotik bir madde olan BCL-2 düzeyi de kararlı bir şekilde artar. Bu hücreler bütiratla stimule edilmiş apoptozise dirençli hale gelirler [353]. COX-2 aşırı ekspresyonu transgenik farelerde meme karsinogenezi için yeterli olmaktadır. Bu esnada tümörlü meme dokusunda Bcl-2 artarken, proapoptotik proteinler BAX ve BCLxL'i azalmaktadır [354]. Kronik inflamasyon epitelyal karsinogenez için önemli bir risk faktörüdür. Kronik inflamasyon olan bölgelerde sitokin kaynaklı COX-2 indüksiyonu sayesinde prostaglandinler artar. Bu durumun kronik inflamasyonda kanser riskinin arttırmasının nedenlerinden birisi olduğunu düşünülmektedir. Tümör hücrelerinden salgılanan koloni stimule edici faktör-

ler, monosit ve makrofajlardan PGE2 sentezini uyarır. PPAR COX-2 kaynaklı bazı endojen prostaglandinler tarafından da aktive edilebilen nükleer hormon süperailisine ait transkripsiyon faktörleridir. 3 PPAR izotipi tanımlanmıştır (α , δ , ve γ). PPAR' ların lipid metabolizması, bağışıklık, hücre farklılaşması gibi fizyolojik rolleri vardır. PPAR' lar ve kanser arası ilişki son zamanlarda giderek artan bir merak konusudur. Yapılan bir çalışmada selektif bir COX-2 inhibitörü olan SC-236' nın karaciğer fibrozisini PPAR δ aktivasyonu ve parankim dışı hücre apoptozunu gerçekleştirerek azalttığı ortaya konmuştur [341]. PPAR ve COX-2 arasındaki ilişki aydınlatıldığında, NAYKH mekanizması daha iyi anlaşılacaktır. İnflamasyona neden olan her uyaran AP-1, NF kappa B , T hücrelerini aktive eden nükleer faktör, IL-6 gibi pek çok transkripsiyon faktörü aracılığıyla COX-2 indüksiyonuna neden olur [288,289,292]. Son dönemlerde HCV' ye ikincil olarak gelişen HCC' de artmış COX-2 düzeyi bildirilmiştir [295,296]. Yağlanma da HCV ilişkili sirozdan HCC gelişiminde bağımsız bir risk faktörüdür [297-299]. Yapılan bir çalışma hepatositlerdeki COX-2 ekspresyon düzeyinin Kronik HCV' de Interferon/ Ribavirin kombinasyon tedavisine düşük tedavi yanıtı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [330]. COX-2 ve COX-2 ilişkili eikazanoitler farklı koşullarda ve farklı hücrelerde farklı fonksiyonlar gösterebilmektedir [28]. Örneğin, Lökotrienler ve PGE2 akut inflamatuvar yanıtın erken döneminde inflamasyonu şiddetlendirmek amacıyla fazlaca eksprese olurken, lipoksinler, PGJ2 ve PGD2 geç inflamatuvar yanıtta parakrin proinflamatuvar sinyalleri antagonize etmek amacıyla eksprese edilir [322]. COX-2, doku hasarının erken fazında proinflamatuvar olabilir, ama daha sonra prostaglandin sentezini antiinflamatuvar

eikazanoitler yönüne çevirerek inflamasyonun çözülmesine yardım edebilir [316]. COX-2 ekspresyonunun hasarın türüne göre hem pro-inflamatuvar hem anti-inflamatuvar olabilir [321,323]. Karaciğer hastalıkları hayvan modellerinde selektif COX-2 inhibitörlerinin bir çok farklı etkisi bildirilmiştir. Selektif COX-2 inhibitörü olan JTE-522, metiyonin-kolin fakir diyetle oluşturulan karaciğer fibrozisini durdurmuştur [291]. Yine bir selektif COX-2 inhibitörü olan SC-236, farede karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer fibrozisini, nekroinflamasyonu etkilemeden azaltmıştır [293]. Tersine, yine bir selektif COX-2 inhibitörü olan Selekoksib, sıçanda karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer fibrozisini ve hasarını kötüleştirmiştir [294]. Bu paradoks etkiler, COX-2'nin farklı inflamatuvar stimuluslarla ile oluşan farklı işlevleri ile açıklanabilir [292]. Yu ve arkadaşları tarafından tranretin promoter geni kontrolüyle seçici olarak hepatositlerde oluşturulan COX-2 ekspresyonunun NFkB aktivasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır [260]. Şu anda kronik hepatit tedavisinde ya da karaciğer fibrozisini önlemede COX-2 inhibitörlerinin kullanımı için yeterli veri bulunmamaktadır. Bir çalışmada COX-2 transgenik farelerde karaciğerde artan COX-2 ve PGE2 düzeylerinin, serum alanin aminotransferaz düzeyi ve histolojik hepatite yol açtığı ortaya konmuştur. Bulgular visseral yağ dokusu inflamasyonunda COX-2 aktivasyonunun yüksek yağlı diyetle beslenen obez ratlarda insülin direnci ve karaciğer yağlanması gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir [223,225,276,327]. COX-2 yağ dokusunda en çok eksprese edilen genlerden biridir [275]. COX-2 ekspresyonunun obez insan adipositlerinde arttığı gösterilmiştir [276]. Ayrıca COX-2 heterozigot (+/-) farelerin COX-2 homozigot(-/-) farelere göre vücut ağırlıklarında % 33 artış

saptanmıştır [277]. COX-2 gen ekspresyonunun Tip 2 DM gelişimine katkıda bulunduğu yapılan bir insan genom çalışmasında gösterilmiştir [290].

6. ÇALIŞMANIN KISITLILIKLARI

1.Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı incelenen biyopsi sayısının az olmasıdır. Bu çalışmadan çıkan verilerin desteklenmesi için hasta sayısının fazla olduğu prospektif daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.İmmünohistokimya patoloji laboratuvarlarında çeşitli hastalıkların tanısında kullanılan önemli bir araçtır. İmmünohistokimyasal Boyanmanın duyarlılık kalitesi ve duyarlılığı formalin fiksasyonu tarafından etkilenir, formalin fiksasyonu antijenitenin değişken derecelerde kaybına yol açar, bu maske etkisi olarak bilinmektedir [311]. Antijen retrieval standart immünohistokimyasal yöntemlerle maskelenmiş antijenleri tespit ederek epitoplari yeniden ortaya çıkaran bir teknik yöntemdir [311]. İmmünohistokimyanın duyarlılığı belirli antijenleri için mükemmel iken, COX-1 ve COX-2 gibi diğer antijenleri özellikle formalinle sabitlenmiş paraffin kesitlerde saptamak zordur. Antijen retrieval uygulanmış olmasına rağmen maske etkisi COX-2' nin boyanma sonucunu etkilemiş olabilir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmadan elde ettiğimiz önemli çıkarımlar şunlardır:

1.COX-2 enzimi inflamasyonda anahtar bir enzim olup kronik inflamatuvar hastalıklarda hastalık ilerleme sürecinde belirleyici olabilir.

2.Bu alışma COX-2 ekspresyonunu karaciğer inflamasyon ve fibrozisi ile ilişkisini gösteren literatürdeki az çalışmadan biridir.

3.Karaciğer COX-2 ekspresyonu ve NASH' teki inflamasyon ve fibrozis ilişkisini gösteren bildiğimiz tek insan çalışmasıdır.

4.Bu çalışmada karaciğerde immünhistokimyasal COX-2 ekspresyonu histopatolojik verilerle (steatoz, inflamasyon, fibrozis, balonlaşma ve NAS skoru) istatistiksel olarak anlamlı ilişki göstermiştir. Bunun sebep sonuç ilişkisindeki yerini bilmemekteyiz. Bu ilişkiyi aydınlatacak deneysel hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

5.Benzer alışma daha geniş vaka serilerinde yapılmalıdır. Karaciğer COX-2 düzeyleri immünhistokimya dışında daha duyarlı yöntemlerle de araştırılmalıdır.

8. ÖZET

Giriş ve Amaç: NAYKH basit yağlanmadan siroza kadar ilerleyebilen geniş bir spektrumu içerir. En sık rastlanan kronik karaciğer hastalığı olan NAYKH' nın etyopatogenezi tam olarak aydınlatılmamıştır. İnsülin direnci, obezite, hiperlipidemi, Tip 2 DM karaciğerde yağlanmanın en önemli sebepleridir. Yapılan çalışmalar karaciğerdeki oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinlerin rolü olabileceğini göstermektedir. Benzer bir mekanizma ile COX-2 NAYKH progresyonundan sorumlu mediatör olabilir. Mingbo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçan deneysel NAYKH modelinde COX-2 ekspresyonunun karaciğerde inflamasyon ve hasarın derecesine paralel olarak arttığı bulunmuştur [27]. Bu çalışmanın amacı, karaciğerde, NASH fibrogenezinde önemli rol oynama ihtimali olan COX-2 ekspresyonunun İmmünohistokimyasal olarak yoğunluğunu ve dağılım paternlerini araştırmak, normal karaciğer dokusu ve steatohepatitteki farklılıkları belirlemektir.

Metod: Çalışmamızdaki olgular, E.Ü.T.F Gastroenteroloji Bilim Dalı Karaciğer polikliniğinde izlenen öyküleri, klinik ve laboratuvar ve radyolojik bulguları ve 1997-2007 arasında biyopsi yapılan karaciğer ince iğne aspirasyon biyopsileri ile NAYKH tanıları doğrulanmış, E.Ü.T.F Patoloji ABD' nda karaciğer biyopsilerine ait paraffin blokları olan 54 olgudur. Olguların karaciğer biyopsi bloklarına İHC yöntemle COX-2 boyası uygulanmıştır. Olgular Brunt NAYKH Evreleme sistemine göre evrenmiş, NAS skorları belirlenmiştir.

Sonuç: COX-2 ekspresyonu ve NAS skor, fibrozis,steato, balonlaşma ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon göstermiştir.

Anahtar Kelimeler siklooksijenaz-2(COX-2), immünohistokimya, nonalkolik steatohepatit(NASH), NAS skoru (NAYKH Aktivite skoru).

9. SUMMARY

Background and Aims: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of disorders ranging from steatosis to steatohepatitis (NASH), which in turn can progress to cirrhosis, but the molecular mechanisms influencing the disease progression are still unknown. Cyclooxygenase (COX-2), the inducible isoform of the enzymes that catalyze the prostaglandin synthesis from arachidonic acid, has been described to be overexpressed in the livers of mice with methionine- and choline deficient (MCD) diet-induced steatohepatitis and in patients with chronic hepatitis C associated steatosis. The aim of this study was to evaluate the expression of COX-2 in a population of subjects with NASH to confirm its possible role as pro-inflammatory mediator in nonalcoholic steatohepatitis.

Methods: Biopsies from fifty-four NAFLD patients who were followed at the Ege University Medical Faculty Gastroenterology Department "Hepatology Clinic" between the years of 1999-2007 were included in this study. We used 54 formalin-fixed, paraffin embedded liver tissue samples obtained by needle biopsies from patients NAFLD/NASH (21F/33M), scored for hepatic steatosis, grading and staging according to Brunt. Four histological normal livers obtained from the living liver donors were used as controls. The expression for COX-2 was investigated by immunohistochemistry. The positive signals for COX-2 staining were observed under the light microscope, COX-2 staining in all liver cells scored on the basis of: 1) extensiveness (by percentage population of positive stained cells) (0-3), 2) intensity (by level observed in the positive staining cells) (0-2). The score of each specimen was the multiplication of the two parameters (the immunohistochemistry score).

Results: No hepatic expression of COX-2 was shown in healthy liver. Significant correlation was observed between the NAS Scores, fibrosis,

steatosis, ballooning and IHC scores. Significant correlation was observed between the IHC scores and grading and staging.

Conclusion: The positive correlation between the expression of COX-2 and NAS scores, paralleled by a similar relationship with histological grading and staging, let us hypothesize a possible role of COX-2 as pro-inflammatory mediator in NAFLD/NASH which may deserve further studies for its use as a marker of disease progression.

Keywords: cyclooxygenase-2(COX-2), nonalcoholic steatohepatitis(NASH), immunohistochemistry, nonalcoholic steatohepatitis activity score(NAS score)

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Burcu

Soyadı : Ülküden

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 07/04/1980

Eğitim:

2005-2010 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi; İç Hastalıkları ABD,

1998-2004 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Yabancı Dil: İngilizce

Üye olduğum bilimsel kuruluşlar: Ege Karaciğer Derneği

Bilimsel Etkinlikler:

1.Renin-Angiotensin Sistem inhibisyonu Sklerozan Enkapsüle Peritoniti Geriletebilir 24.Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi Poster Sunumu

2.N-Asetilsistein, Sklerozan Enkapsüle Peritonitte Periton Fonksiyonlarını ve Morfolojisini Koruyabilir mi? 24.Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi Poster Sunumu

11. KAYNAKLAR

[1].Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH, Nonalcoholic Steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference, *Hepatology*, (2003); 37:1202-1219.

[2].Yeh MM, Brunt EM, Pathology of fatty liver: differential diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease; *Diagnostic Histopathology*, (2008); 14(12):586-597.

[3].Brunt EM, Nonalcoholic Steatohepatitis, *Seminars in Liver Disease*, (2004); 24: 3-20.

[4].Dixon TB, Garion DE, Bhatol PS, A view on diagnostic criteria of Non-alcoholic steatohepatitis, *Gastroenterology*, (2002); 97(11): 2714-2724.

[5].Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: A Weighty Connection, *Hepatology*, (2010); 51:1820-1832.

[6].Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN, The Incidence and Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis, *Hepatology*, (2010); 51:1972-1978.

[7].Targher G, Marra Fi marchesini G, Increased risk of cardiovascular disease in NAFLD: causal effect or epiphenomenon ?, *Diabetologia*, (2000); 51:1947-1973.

[8]. Mc Cullough AJ, Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis, *J. Clin Gastroenterol*, (2006).

[9].O'Rourke RW, Inflammation in obesity-related diseases, *Surgery*, (2009), 145:255-259

[10].O'Rourke RW, Molecular Mechanisms of Obesity and Diabetes: At the Intersection of Weight Regulation, Inflammation, and Glucose Homeostasis, *World J Surg.*, (2009), 33:2007-2013.

[11].Garcia- Manson C, Martin-Perez E, Locano O, Characterization of pathogenic and prognostic factors of NASH associated with obesity, *J Hepatol* , (2000); 315:716-720.

[12].Bellentani S, Marino M, Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Annals of Hepatology*, (2009); 8(1):4-8

[13].Das K, Mukherjee PS, Ghosh A, Ghosh S, Mridha AR, Dhibar T, Nonobese Population in a Developing Country Has a High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver and Significant Liver Disease, *Hepatology*, (2010); 51:1593-1602.

[14].Merat S, Yarahmadi S, Tahaghoghi S, Alizadeh Z, Sedighi N, Mansournia N, Prevalence of Fatty Liver Disease among Type 2 Diabetes Mellitus Patients and its Relation to Insulin Resistance, *Middle East Journal of Digestive Diseases*, (2009), 1(2):74-79.

[15].Radu C, Grigorescu M, Crisan D, Lupsor M, Constantin D, Dina L, Prevalence and Associated Risk Factors of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Hospitalized Patients, *J Gastrointestinal Liver Dis.*, (2008); 17(3):255-260.

[16].Li H, Wang Y-J, Tan K, Zeng L, Liu L, Liu F-J, Prevalence and risk factors of fatty liver disease in Chengdu, Southwest China, *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int.*, (2009); 8(4):377-382.

[17].Charatcharoenwitthaya P, Lindor KD, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and NASH: Clinical and Histological Aspects, Metabolic Aspects of Chronic Liver Disease, (2007); 71-109.

[18].TURDEP , Türkiye Diyabet ve Obezite Epidemiyolojisi Çalışması.

[19].METSAR, Türkiye Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması.

[20].Choudhury J, Sanyal AJ, Insulin Resistance and the pathogenesis of NAFLD, *Clin Liver Dis*,(2004); 575-594.

[21].Ponticana P, Giattoglini I, Palmieri VO, Poloscino G,, NASH: recent advances from experimental models to clinical management.

[22].Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC,H-Wolber J,Hui JM, Fung C, NASH and Insulin Resistance: Insulin Hypersecretion and Specific Association with the Insulin resistance syndrome, *Hepatology*, (2002); 35:373-375.

[23].Day CP, Pathogenesis of steatohepatitis, *Best Prac. Res. Clin.,Gastroenterol* ,(2002); 16: 663-678.

[24].Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J,Yu XX, PandeySK, Diacylglycerol acyltransferase-1 anti-sense oligonucleotides reduce hepatic fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* (2008) 47:625–635.

[25].Ginsberg HN, Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol?, *Cell Metabolism*, (2006); 4(3):179-181.

[26].Browning JD, Horton JD, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury, *The Journal of Clinical Investigation*, (2004); 114:147-152.

[27].Mingbo C, Dong L, Lu X, Luo J, Expression of cyclooxygenase-2 and its pathogenic effects in nonalcoholic fatty liver disease, *Journal of Nanjing Medical University*, (2008); 22(2):111-116.

[28].Holt AP, Adams DH, Complex roles of Cyclooxygenase 2 in hepatitis,. *Gut* , (2007); 56:903–904.

[29].Bondini S, Kleiner DE, Goodman ZD, Gramlich T, Younossi ZM, Pathologic Assessment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease, (2007);11:17-23.

[30].Thaler H, The fatty liver and its pathogenetic relation to liver cirrhosis, *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.*, (1962);335:180-210.

[31].Demir K, Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı: Etyoloji ve patogenezi, Çapa Gastroenteroloji Günleri 2004, Editor:Beşışık F, İstanbul Medikal Yayıncılık 2004;90-94.

[32].Angulo P, Lindor K, and Treatment of nonalcoholic fatty liver: present and emerging therapies, *Semin Liver Dis.*, (2001); 21: 81-88.

[33].Day CP, James OF, Steatohepatitis: a tale of two 'hits' ?, *Gastroenterology*, (1998), 114:842-845.

[34].Agarwal N, Sharma BC, Insulin resistance and clinical aspects of nonalcoholic steatohepatitis (NASH), *Hepatology Research* (2005) ; 33:92–96

[35].Brunt EM, Janney C, D-Bisceglie A, Nonalcoholic fatty liver disease: A proposal for grading and staging histological lesions, *Am J Gastroenterol.*, (1999), 94:2467-2474.

[36].Brunt EM, Neuschwander-T. BA, Oliver D, Wehmeier KR, Bacon BR, Nonalcoholic Steatohepatitis: Histology Features and Clinical Correlations With 30 Blinded Biopsy Specimens, *Human Pathol.*, (2004),35:1070-1082.

[37].Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Morini R, NAFLD, NASH and the Metabolic Syndrome, *Hepatology*, (2003); 37:917-923.

[38].Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values, *Hepatology*, (2003);37(6):1286–1292.

[39].Ong JP, Elariny H, Collantes R, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg.*, (2005);15(3):310–315.

[40].Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population, *Hepatology* (2005);41(1):64–71.

[41].Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol*, (2002);17(10):1098–105.

[42].Clark JM, Brancati FL, Diehl AM, The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States, *Am J Gastroenterol*. (2003);98(5):960–967.

[43].Ruhl CE, Everhart JE, Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States, *Gastroenterology*, (2003);124(1):71–79.

[44].Clark JM, Brancati FL, Diehl AM, Nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, (2002);122(6):1649–1657.

[45].Ground KE, Liver pathology in aircrew. *Aviat Space Environ Med* 1982;53(1):14–8.

[46].Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Liver histology in a 'normal' population: examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterol.*, (1977);12(5):593–597.

[47].Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan, *Jpn J Med.*, (1988);27(2):142–149.

[48].Shen L, Fan JG, Shao Y, Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey, *World J Gastroenterol.*, (2003);9(5):1106–1110.

[49].Lai SW, Tan CK, Ng KC, Epidemiology of fatty liver in a hospital-based study in Taiwan, *South Med J.*, (2002);95(11):1288–1292.

[50].Nonomura A, Mizukami Y, Unoura M, Clinicopathologic study of alcohol-like liver disease in non-alcoholics; non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Gastroenterol Jpn.*, (1992);27(4):521–528.

[51].Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*, (2005);42(1):44–52.

[52].Farrell GC, Larter CZ, Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis, *Hepatology*, (2006);43(1):99–112.

[53].Kojima S, Watanabe N, Numata M, Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol.*, (2003);38(10): 954–961.

[54].Kemmer NM, McKinney KH, Xiao SY, High prevalence of NASH among Mexican-American females with Type II diabetes mellitus. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p.A117.

[55].Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE, Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese, *Gastroenterology*, (2001);121(1):91–100.

[56].Crespo J, Fernandez-G. P,Hernandez-G. M, .Are there predictive factors of severe liver fibrosis in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis?, *Obes Surg.*, (2001); 11(3):254–257.

[57].Falck-Ytter Y,Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ, Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes, *Semin Liver Dis.* , (2001);21(1):17-26.

[58].Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*,(2008);134: 568–576.

[59].Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity, *Gastroenterology*, (1999);116(6):1413–1419.

[60].Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH,The natural history of nonalcoholic fatty liver disease:a clinical histopathological study, *Am J Gastroenterol.*, (2003);98(9):2042–2047.

[61].Adams LA, Lymp JF, Sauver J, The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, (2005);129(1):113–121.

[62].Ong JP, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) two decades later: are we smarter about its natural history? *Am J Gastroenterol.*, (2003);98(9):1915–1917.

[63].Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial, *Hepatology*, (2004);39(3):770–778.

[64].Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies, *Hepatology*, (2004)4;0(4):820–826.

[65].McCullough AJ, The epidemiology and risk factors of NASH. In: Farrell GC, George J, de la M Hall P, et al, editors. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Malden (MA): Blackwell Publishing; 2005, sayfa 23–37.

[66].Utzschneider KM, Kahn SE, Review: the role of insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab* ,(2006),91:4753-4761.

[67].Malaquamera M, Rosa MD, Nicoletti F, Malaquamera L, Molecular mechanisms involved in NAFLD progression, *J. Mol. Med.*,(2009);87:679-695.

[68].Capecau J, Insulin resistance and steatosis in humans, *Diabetes and Metabolism*, (2008);34:649-657.

[69].Malik MS, deVera ME, Fontes P, Shaikh O, Sasatomi E, Ahmad J, Recurrent Disease Following Liver transplantation for NASH Cirrhosis, *Liver Transplantation*, (2009); 15:1843-1851.

[70].Postic C, Girard J, Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice, *J. Clin. Invest.*, (2008) ;118: 829–838.

[71].Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ, Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *J Clin Invest.*, (2005);115:1343-1351.

[72].Postic C, Girard J, The role of lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis, *Diabetes & Metabolism*, (2008); 34:643-648.

[73].Marra F, Gastaldelli A, Svegliati G, Baroni TG, Tiribelli C, Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis, *Trends Mol. Med.*,(2008);14: 72–81.

[74].Baranova A, Younossi ZM, G. , Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007, 291–305.

[75].C-Kent C, Zein NN, Feldstein AE, Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment, *Am. J. Gastroenterol.*, (2008);103:1036–1042.

[76].Bertolani C, Marra F,The role of adipokines in liver fibrosis, *Pathophysiology*, (2008); 15: 91–101.

[77].Le KA, Bortolotti M, Role of dietary carbohydrates and macronutrients in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, (2008);11: 477–482.

[78].Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects, *J Clin Endocrinol Meta.*, (2005);90: 2804–2806.

[79].Leclercq IA, Pathogenesis of steatohepatitis: insights from the study of animal models, *Acta Gastroenterol. Belg.*, (2007);70: 25–31.

[80].Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease, *J. Hepatol.*, (2008);48: 993–999.

[81]. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Consuming fructose-sweetened, not glucose sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans, *J. Clin. Invest.*, (2009);119: 1322–1334.

[82]. Petta S, Muratore C, Craxi A, Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future, *Dig. Liver Dis.*, (2009); 41:615–625.

[83]. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to NAFLD, *Nat. Genet.*, (2008); 40:1461–1465.

[84]. M-Sanchez N, Arrese M, Z-Valdes D, Uribe M, Current concepts in the pathogenesis of NAFLD, *Liver Int.*, (2007); 27:423–433.

[85]. Angulo P, Nonalcoholic fatty liver disease, *N Engl J Med.*, (2002) ;346: 1221–1231.

[86]. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, D.S. Ory, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2003) ; 100: 3077–3082.

[87]. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ, Free fatty acids induce JNK- dependent hepatocyte lipoapoptosis, *J. Biol. Chem.*, (2006); 281:12093–12101.

[88]. Unger RH, Lipotoxic diseases, *Annu. Rev. Med.*, (2002);53: 319–336.

[89]. Schaffer JE, Lipotoxicity: when tissues overeat, *Curr. Opin. Lipidol.* , (2003); 14: 281–287.

[90]. Malhi H, Gores GJ, Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease, *Semin. Liver Dis.*, (2008) ;28: 360–369.

[91]. Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE, Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal, *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, (2009) ;3:445–451.

[92].Jou J, Choi SS, Diehl AM, Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease, *Semin. Liver Dis.* (2008);28: 370–379.

[93].Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, S.K. Pandey, Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology*, (2007);45: 1366–1374.

[94].Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK, Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism, *J. Biol. Chem.*, (1998); 273: 15639–15645.

[95].Maher JM, Mechanisms of liver injury due to fat, *AASLD Postgrad. Course Syllabus* (2006) 89–96.

[96].P-Carreras M, Hoyo PD, Martin MA, Rubio JC, Castellano G, Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology*, (2003); 38:999–1007.

[97].Sanyal AJ, C-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities, *Gastroenterology*, (2001);120: 1183–1192.

[98].Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE, The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity, *Hepatology*, (2008); 47:1495–1503.

[99].Caldwell SH, Freitas LA, Park SH, Moreno ML, Redick JA, Davis CA, Intramitochondrial crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology*, (2009); 49:1888–1895.

[100].Wei Y, Wang D, Gentile CL, Pagliassotti MJ, Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells, *Mol. Cell. Biochem.*, (2009) ;331(1-2):31-40.

[101].Ota T, Gayet C, Ginsberg HN, Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents, *J. Clin. Invest.*,(2008) ;118: 316–332.

[102].Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators, *Dev. Cell*, (2008);15: 829–840.

[103].Wieckowska A, Feldstein AE, Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive, *Semin. Liver Dis.*,(2008); 28: 386–395.

[104].Yilmaz Y,Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M, Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis, *World J Gastroenterol*, (2007;13(6):837-844.

[105].Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, Hazen SL, Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients, *Clin Gastroenterol Hepatol.*, (2008); (11):1249-1254.

[106].Paik Y-H, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C,Brenner DA, Toll-like Receptor 4 Mediates Inflammatory Signaling by bacterial Lipopolysaccharide in Human Hepatic Stellate Cells, *Hepatology*, (2003); 37:1043-1055

[107].Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ, Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice, *J.Hepatol*,(2003); 39: 978–983.

[108].Malhi H, Barreyro FJ,Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ, Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity, *Gut* (2007);56:1124–1131.

[109].Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF,Rydzewski R, Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway, *Hepatology*,(2004);40: 185–194.

[110].Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ, Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization, *Am. J. Physiol.*, (2006) ;290:1339–1346.

[111].Barreyro FJ, Kobayashi S, Bronk SF, Werneburg NW, Malhi H, Gores GJ, Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipooptosis, *J. Biol. Chem.*, (2007) ;282: 27141–27154.

[112].Kammoun HL, Hainault I, Ferre P, Foufelle F, Nutritional related liver disease:targeting the endoplasmic reticulum stress, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*,(2009);12: 575–582.

[113].Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes* ,(2007);56: 1761–1772.

[114].Hotamisligil GS, Inflammation and metabolic disorders, *Nature* ,(2006);444:860–867.

[115].Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*, (2002);420 :333–336.

[116].Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice, *Hepatology*,(2006);43: 163–172.

[117].Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS, Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2006);103: 10741–10746.

[118].Singh R, Wang Y, Xiang Y, Tanaka KE, Gaarde WA, Czaja MJ, Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance, *Hepatology*,(2009)49: 87–96.

[119].Kodama Y, Brenner DA, c-Jun N-terminal kinase signaling in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: multiple roles in multiple steps, *Hepatology*,(2009);49: 6–8.

[120].Yang R, Wilcox DM, Haasch DL, Jung PM, Nguyen PT, Voorbach MJ, Liver-specific knockdown of JNK1 up-regulates proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta and increases plasma triglyceride despite reduced glucose and insulin levels in diet-induced obese mice, *J. Biol. Chem.*, (2007);282: 22765–22774.

[121].Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP, *Cell*,(2005);120: 261–273.

[122].Wolfrum C, Stoffel M, Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion, *Cell-Metab.*, (2006);3: 99–110.

[123].Ribeir PS, C-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients, *Am. J. Gastroenterol.*,(2004);99: 1708–1717.

[124].Wullaert A, Loo G, Heyninck K, Beyaert R, Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond, *Endocr. Rev.*, (2007);28: 365–386.

[125].Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB, *Nat. Med.*,(2005) ;11:183–190.

[126].Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance, *Nat. Med.*, (2005) ;11:191–198.

[127].Beraza N, Malato Y, VanderBorgh S, Liedtke C, Wasmuth HE, Dreano M, Pharmacological IKK2 inhibition blocks liver steatosis and initiation of non-alcoholic steatohepatitis, *Gut*,(2008);57: 655–663.

[128].Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, Loo G, A. Nenci, Vos RD, Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell*, (2007);11:119–132.

[129].Luedde T, Assmus U, Wustefeld T, Vilsendorf AM, Roskams T, S-Suppran M, Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury, *J. Clin. Invest.*, (2005);115:849–859.

[130].Beraza N, Luedde T, Assmus U, Roskams T, VanderBorgh S, Trautwein C, Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury, *Gastroenterology*, (2007) ;132:2504–2517.

[131].Ley LR, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI, Obesity alters gut microbial ecology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2005);102:11070–11075.

[132].Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2004),101:15718–15723.

[133].Rivera CA, Adegboyega P, Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M, Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis, *J. Hepatol.*, (2007);47: 571–579.

[134].Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS, TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, (2006);116:3015–3025.

[135].Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR, Role of PAT metabolism, *Biochimie*, (2005);87: 45–49.

[136].Brunt EM, Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology., *Seminars in Liver Disease*, (2001); 21: 3-16.

[137].Sakhuja P, Pathology of NASH and fibrosis, *Arab Journal of Gastroenterology*, (2010); 17-20.

[138].Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, (2004);306. 457–461.

[139].Kotronen A, Y-Jarvinen H, Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* ,(2008) ;28:27–38.

[140].Gonzalez-Baro MR, Lewin TM, Coleman RA, Regulation of triglyceride metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action, *Am. J. Physiol., Gastrointest. Liver Physiol.*, (2007);292: 1195–1199.

[141].Parekh S, Anania FA, Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, (2007);132: 2191–2207.

[142].Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease, *J. Biol. Chem.* ,(2004);279: 32345–32353.

[143].Sreejayan N, Dong F, Kandadi MR, Yang X, Ren J, Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice, *Obesity*,(2008);16: 1331–1337.

[144].Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice, *J. Clin. Invest.* ,(2009);119: 1201–1215.

[145].Friedman SL, Hepatic fibrosis—overview, *Toxicology* ,(2008);254: 120–129.

[146].Wallace K, Burt AD, Wright MC, Liver fibrosis, *Biochem. J.* ,(2008);411: 1–18.

[147].Wells RG, Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis, *Clin. Liver Dis.* ,(2008);12: 759–768

[148].Poorten DVD, George J, Disease-specific mechanisms of fibrosis: hepatitis C virus and nonalcoholic steatohepatitis, *Clin. Liver Dis.*, (2008) ; 12: 805–824

[149].Lanthier N, Horsmans Y, Leclercq IA, The metabolic syndrome: how it may influence hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, (2009); 12: 404–411.

[150].Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis, *Gastroenterology*, (2007);132:282–293.

[151].Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology*,(2001);34:738–744.

[152].Cusi K, Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, (2009);16: 141–149.

[153].Bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, Fingas CD, Marquitan G, Jochum C, Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells, *Hepatology Res.*, (2009);39: 756–764.

[154].Iwamoto K, Kanno K, Hyogo H, Yamagishi S, M. Takeuchi, S. Tazuma, Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells, *J. Gastroenterol.*, (2008);43: 298–304.

[155].Yilmaz Y, Ulukaya E, Gul OO, Arabul M, Gul CB, Atug O, Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Clin. Biochem.* (2009);42: 802–807.

[156].Hyogo H, Yamagishi S, Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease, *Curr. Pharm. Des.*, (2008) ;14: 969–972.

[157].George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun J, Farrell G, Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis, *J. Hepatology*, (2003) 39: 756–764.

[158].Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat, *Gastroenterology*, (2002);122: 1399–1410.

[159].Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin, *Gastroenterology*, (2003) ;125: 1796–1807.

[160].Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA, The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology, *Am. J. Pathol.*, (2005);166: 1655–1669.

[161].Arrese M, Riquelme A, The value of serum adipokine measurement in non-alcoholic fatty liver disease, *Liver Int.*, (2009) ;29: 1291–1293.

[162].Moreno M, Bataller R, Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis, *Clin. Liver Dis.*, (2008);12: 825–852 .

[163].Pereira RM, Santos RA, CostaDias FL,Teixeira MM, SimoeseSilva AC, Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis, *World J. Gastroenterol.*, (2009);15: 2579–2586.

[164].Lubel JS, Herath CB, Burrell LM, Angus PW, Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications,*J. Gastroenterol.Hepatol.*, (2008); 23: 1327–1338.

[165].Prasad A, Quyyumi AA, Renin–angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome, *Circulation*, (2004);110: 1507–1512.

[166].Kurita S, Takamura T, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Uno M, Olmesartan ameliorates a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis through its pleiotropic effects, *Eur. J. Pharmacol.*, (2008);588: 316–324.

[167].Kudo H, Yata Y, Takahara T, Kawai K, Nakayama Y, Kanayama M, Telmisartan attenuates progression of steatohepatitis in mice: role of hepatic macrophage infiltration and effects on adipose tissue. *Liver Int.*, (2009);29: 988–996.

[168].Ibanez P, Solis N, Pizarro M, Aguayo G, Duarte I, Miquel JF, Effect of losartan on early liver fibrosis development in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, (2007);22: 846–851.

[169].Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, Okamoto S, Okada M, Aso K, Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology*,(2004);40: 1222–1225.

[170].Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans, *J. Clin. Invest.*, (2008);118: 3331–3342.

[171].Syn WK, Jung Y, Omenetti A, Abdelmalek M, Guy CD, Yang L, Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, (2009);137:1478–1488 .

[172].Yki-Jarvinen H, Westerbacka J, The fatty liver and insulin resistance, *Curr. Mol.Med.*, (2005);5: 287–295.

[173].Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A et al., Cannabinoid CB2 Receptor Potentiates Obesity-Associated Inflammation, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis., *PLoS ONE*, (2009); 4(6): e5844.

[174].Mallat A, Lotersztajn S, Cannabinoid receptors as novel therapeutic targets for the management of non-alcoholic steatohepatitis, *Diabetes & Metabolism.*, (2008) ;34: 680-684.

[175].Fleig SV, Choi , Yang L, Jung Y, Omenetti A, VanDongen HM, Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitor increases with severity of fatty liver damage in mice, *Laboratory Investigation*, (2007); 87: 1227–1239.

[176].Heyninck K, Wullaert A, Beyaert R, Nuclear factor-kappa B a central role in tumour necrosis factor-mediated liver disease, *Biochemical Pharmacology*, (2003);66: 1409-1415.

[177].Elsharkawy AM, Mann DA, Nuclear Factor- κ B and the Hepatic Inflammation-Fibrosis-Cancer Axis, *Hepatology* , (2007); 46: 590-597.

[178].Hundal RS, Peterson KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, SE Shoelson, Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*,(2002);109:1321-1326.

[179].Möhlig M, Freudenberg M, Bobbert T, Ristow M, Rochlitz H, Weickert MO, Asetilsalicylic Acid Improves Lipid-Induced Insulin Resistance in Healthy Men, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, (2006); 91:964-967.

[180].Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Prevention of fat induced insulin resistance by salicylate, *The Journal of Clinical Investigation*,(2001); 108: 437-446.

[181].Carvalho-Filho MA, Ropelle ER, Pauli RJ, Cintra DE, Tsukumo DML, Silveria LR, Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibition inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IR β / IRS-1 and Akt, *Diabetologia*, (2009);52: 2425-2434.

[182].Yuan M, Komstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Shoelson SE, Reversal of obesity-and Diet-Induced insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of IKK-beta, *Science*, (2001);293:1673-1677.

[183].Marra F, Nuclear factor- κ B inhibition and Non-alcoholic steatohepatitis: inflammation as a target for therapy, *Gut* , (2008); 57: 570-572.

[184].Karin M, The I κ B kinase- a bridge between inflammation and cancer, *Cell Research* ,(2008);18: 334-342.

[185].Karin M, NF κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, (2009); 1-14

[186].Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans, *J. Clin. Invest*, (2008);118: 3331–3342.

[187].Syn WK, Jung Y, Omenetti A, Abdelmalek M, Guy CD, Yang L, Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*,(2009);137: 1478–1488 e8.

[188].Evans CDJ, Oien KA, Mac Sween RNM, Mills BR, NASH: a common cause of progressive chronic liver injury, *J Clin Pathol*, (2002); 55:689-692.

[189].Poligone B, Baldwin AS, Positive and Negative Regulation of NF-KB by COX-2, *The Journal of Biological Chemistry*, (2001);276(42):38658-38664.

[190].Jang B-C, Kim D-H, Park J-W, Kwon T-K, Kim S-P, Song D-K, Induction of cyclooxygenase-2 in macrophages bt catalase: role of NF-KB and PI3K signaling pathways, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2004); 316:398-406.

[191].Chiu F-L, Lin J-K, Tomadine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF-KB and JNK pathways in LPS-stimulated Mouse macrophages, *FEBS Letters*,(2008); 2407-2412.

[192].Choi S-H, Langenbach R, Bosetti F, Cyclooxygenase-1 and -2 enzymes differentially regulate the brain upstream NF-KB pathway and downstream enzymes involved in prostaglandin biosynthesis, *Journal of Neurochemistry*, (2006);98:801-811.

[193].Lim JW, Kim H, Kim KH, Nuclear Factor-KB Regulates Cyclooxygenase-2 Expression and Cell Proliferation in Human Cancer Cells, *Laboratory Investigation*,(2001);81(3):349-360.

[194].Greten FR et al, IKK β link inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis associated cancer, *Cell*, (2004);118: 285-296.

[195].Maeda S et al, IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis, *Cell*, (2005), 121: 977-990.

[196].Wu T, Cyclooxygenase-2 in HCC, *Cancer Treat Rev* ,(2006); 32:28-44.

[197].Leng J , COX-2 promotes HCC cell growth through AKT activation:Evidence for AKT inhibition in Celecoxib-induced apoptosis, *Hepatology*, (2003); 38:756-768.

[198].Kern MA e al.,Cyclooxygenase -2 imhibition induces apoptosis signalling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res*, (2006); 66:7059-7066.

[199].Charlton M, Kasparova P, Weston S, Lindor K, Maer-Kendler Y, Wieshwe RH, Frequency of NASH as A Cause of Advanced Liver Disease, *Liver Transpl*, (2001);7: 608-614.

[200].Dajani OF et al, Prostaglandin E2 upregulates EGF-stimulated signalling in mitogenic pathways involving Akt and ERK in hepatocytes, *J Cell Physiol*, (2008); 214:371-380.

[201].Z-Sagi S, N-Kaluski D, Halpern Z, Oren R, Prevalance of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures, *Liver International*, (2006); 26:856-863.

[202].Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver, *Cell Metabolism*, (2006); 6(1):69-78.

[203].Trauner M, Arrese M, Wagner M, Fatty liver and lipotoxicity, *Biochimica et Biophysica Acta*, (2010);1801: 299–310.

[204].Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease., *Mayo Clin Proc.*, (1980); 55: 434–438.

[205].Tamura S, Shimomura I, Contribution of adipose tissue and de-novo lipogenesis to NAFLD, *The Journal of Clinical Investigation*,115(5):1139-1141.

[206].Cheung O,sanyal AJ, Abnormalities of lipid metabolism in NAFLD, *Semin liver Dis*, (2008);28:351-359.

[207].Abdelmalek MF,Increased Fructose Consumption is Associated with Fibrosis Severity in Patients with NAFLD; *Hepatology*, (2010);51:1961-1971.

[208].Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang X-D, NASH induced by a high-fat diet promotes DEN-initiated early hepatocarcinogenesis in rats, *Int J Cancer*, (2009); 124:540-546.

[209].Bataller R, North KE, Brenner DA, Genetic Polimorphisms and the Progression of Liver Fibrosis. A Critical Appraisal, *Hepatology*, (2003);37:493-503.

[210].Dongiovanni P,Valenti L, Rametta R, Daly AK,Nobili V,Mozzi V, Genetic variants regulating insulin receptor signalling are associated with the severity of liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease, *Gut*, (2010);59:267-273.

[211].Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pogliassotti MJ, Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stres and apoptosis independently of ceramide in liver cells,*Am J Phisiol Endocrinol Metab*,(2006);291:275-281.

[212].Chaves JA, Summers SA, Lipid oversupply, selective IR, adipolipo-toxicity: molecular mechanisms, *Biochmica et Biophysica Acta*,(2010); 1801:252-265.

[213].Reddy JK, Sambastiva R, Lipid Metabolism and Liver Inflammation: II.Fatty liver disease and fatty acid oxidation, *Am J Phisiol Gastrointest Liver*,(2006); 290:852-858.

[214].Pan M,Cederbaum AL, Zhong YL,Ginsberg HN,Williams KJ,Fischer EA, Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production,The Journal of Clinical Investigation,(2004);13(9):1277-1287.

[215].Tesseri P, Coracino A,Cosmo A,Tiego A, Hepatic lipid metabolism and NAFLD,Nutrition, Metabolism& Cardiovascular Diseases, (2009);19:291-302.

[216].Nomoto K, Tsunayama K,Takahashi H,Mural Y, Tokiano Y, Cytoplasmic Fine Granular Expression of 8-OHdG Reflects Early Mitochondrial Oxidative DNA Damage In NAFLD, Appl Immunohistochem Mol Morphol,(2008);16(1):71-75.

[217].Dela PA, Leclercq I, Field J et al, NF-kappaB activation, rather than TNF mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis, Gastroenterology (2005); 129:1663-1674.

[218].Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S et al, Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors; and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic steatohepatitis patients; Am J Gastroenterol ,(2004); 99: 1708-1717.

[219].Shoelson SE., Herrero L, Naaz A, Obesity, inflammation, and insulin resistance, Gastroenterology, (2007); 132:16180

[220].Edmison J, McCullough AJ, Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data; Clin Liver Dis, (2007), 11:75-104.

[221].Helmersson A , Vessby B,Larsson A, Bosu S, Association of Type-2 Diabetes with cyclooxygenase-2-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population, Circulation, (2004);109:1729-1734.

[222].Henkel J, Neuschäfer-Rube F, Neuschäfer-Rube AB, Püschel G, Aggravation by Prostaglandin E2 of Interleukin-6-Dependent Insulin Resistance in Hepatocytes, Hepatology (2009);50: 781-790.

[223].Hsieh PS, Tsai HC, Kuo CH, Chan JGY, Shyu JF, Cheng WT, Selective COX-2 inhibition improves whole body and muscular insulin resistance in fructose-fed rats, *European Journal of Clinical Investigation*, (2008); 38: 812-819.

[224].Mendez-S N, Zamora-V D , Pichardo-B R , Barredo-P B, Ponciano-R G, Bermejo-M L, Endocannabinoid receptor CB2 in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver int.*, (2007);27: 215-219.

[225].Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, 12/15 Lipoxygenase Is Required for the Early Onset of High Fat Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Mice, *PLoS ONE*, (2009);4: 1-8.

[226].Röhl M, Pasparakis M, Baudler S, Baumgartl J, Gautam D, Huth M, Conditional disruption of IK β kinase fails to prevent obesity in induced insulin resistance, *J Clin Invest*, (2004), 113: 474-481.

[227].Cervello M, Fodera D, Florena AM et al, Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of inflammatory cells in human primary hepatocellular carcinoma: Possible role in tumor promotion and angiogenesis, *World J Gastroenterol*, (2005); 11:4638-4643.

[228].Koga H, Sakisaka S, Ohissi M et al, Expression of COX-2 in human HCC: Relevance to tumor dedifferentiation, *Hepatology*, (1999); 29:688-689.

[229].Bugianesi E, Nonalcoholic steatohepatitis and cancer, *Clin.LiverDis.*, (2007); 11:191- 207.

[230].Ratziu V, Bonyhay L, DiMartino V,Charlotte F,Cavallaro L,Sayegh-Tainturier MH, Survival,liver failure,and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis, *Hepatology*, (2002); 35:1485–1493.

[231].Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F,Vilgrain V, Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis, *Hepatology*, (2009); 49: 851–859.

[232].Regimbeau JM, Colombat M, Mognol P,Durand F,Abdalla E, Degott C, Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma, *LiverTranspl.*, (2004); 10:69–73.

[233].El-Serag HB,Tran T, Everhart JE, Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma,*Gastroenterology*, (2004); 126:460–468.

[234].Nair S,Mason A, Eason J,Loss G,Perrillo RP,Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis?,*Hepatology*, (2002); 36:150–155.

[235].Ohki T, Tateishi R,Shiina S,Goto E,Sato T,Nakagawa H, Visceral fat accumulation is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment in patients with suspected NASH, *Gut* (2009); 58:839–844.

[236].Elsharkawy AM, Mann DA, Nuclear factor-kappa B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis, *Hepatology*, (2007); 46:590–597.

[237].Karin M, Greten FR, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression, *Nat.Rev.,Immunol*, (2005); 5:749–759.

[238].Arsura M, Cavin LG,Nuclear factor-kappa B and liver carcinogenesis, *Cancer Lett.*,(2005);229:157–169.

[239].Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S,Kasem S, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, *Nature* ,(2004);431:461–466.

[240].De Lima VMR, Oliveira CPMS, Alves VAF,Chammas MC,Oliveira EP, A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma,*Journal of Hepatology*,(2008);49:1055-1061.

[241].Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Latasa MU, Prieto J, Avila MA, Inflammation and Liver Cancer New Molecular Links, *Steroid Enzymes and Cancer:Ann N.Y. Acad. Sci.*, (2009);1115: 206-221.

[242].Hoffmann A, Xia Y, Verma IM, Inflammatory Tales of Liver Cancer, *Cancer Cell*, (2007);11: 99-101.

[243].Guzman G, Brunt EM, Petrovic LM, Ghesfec G, Layden TJ, Cotler SJ, Does NAFLD Predispose Patients to HCC in The Absence of Cirrhosis, *Arch Pathol Lab Med*, (2008); 132:1761-1766.

[244].Uwe S, Anti-inflammatory interventions of NF- κ B signalling: Potential applications and risks, *Biochemical Pharmacology* ,(2008); 75:1567-1579.

[245].Matthew MY, Brunt EM, Pathology of fatty liver: differential diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease, *Diagnostic Histopathology MINI- Symposium, Diagnostic Histopathology*,(2008);14(12):586-597.

[246].Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N, Kupffer Cell Aggregation and Perivenular Distribution in Steatohepatitis. *Mod Pathol* 2002;15(7):699-704.

[247].Kim SM, Park KC, Kim HG, Han SJ, Cyclooxygenase-2: its paradoxical roles in liver inflammation and fibrosis, *Hepatology Research*,(2008);38:772-774.

[248].Hall P, The Pathological Spectrum of Alcoholic Liver Disease, *Journal Pathology*, (1985); 17(2): 209 – 218.

[249].Syn W-K, Teaberry V, Choi SS, Diehl AM, Similarities and Differences in the Pathogenesis of Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis, *Semin Liv Dis*, (2009);29:200-210.

[250].Valenti L, Fracanzani L, Fargion S, The immunopathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: two triggers for one disease?, *Semin Immunopathol*;(2009),31:359-369.

[251].Anthony PP, Scheuer PJ et al. ,*Pathology of the Liver*. London: Churchill Livingstone, 1994:317-334.

[252].Rashid M, Roberts EA., Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:48-53.

[253].Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F et al., Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *J Pediatr* 1995;127:700-704.

[254].Powell EE, Cookslew WGE, Hanson R et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty two patients for up to 21 years.*Hepatology*,1990;11:74-80.

[255].Diehl AM, Goodman Z, Islak KG, Alcohol-like disease in nonalcoholics, A clinical and histologic comparison with alcohol induced liver injury, *Gastroenterology*,1988;95:1056-1062.

[256].Brunt AD, Mutton A, Day C Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis., *Semin Diagn Pathol* 1998; 15;246-258.

[257].Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, et al. , Mitochondrial abnormalities in Nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:430-434.

[258].Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE, Cummings OW, Brunt EM, Ünalp A, for the NASH Clinical Reserch Network. Relationship of Steatosis Grade and Zonal Location to Histological Features of Steatohepatitis in Adult Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Journal of Hepatology*,2008;48:829-834.

[259].Malik R, Chang M, Bhaskar K, Nasser I, Curry M, Schuppan D, Biomarkers and the NASH CRN Liver Biopsy Scoring System in NAFLD Patients, *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, (2009);24(4), 564-568.

[260].Mohammed NA, El-Aleem SA, El-Hafiz HA, RFT McMahon RFT, Distribution of constitutive(COX-1) and inducible(COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis *J Clin Pathol* 2004;57:350–354.

[261].Ito Y, Yoshida H, Nakano K et al., Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology* 2003;42:492-497.

[262].Sano H, Kawahito Y, Wilder RL et al. ,Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-3789.

[263].Wolff H, Saukkonen K, Anttila S et al. ,Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:4997-5001.

[264].Ocknerr RK, Kaikasa, Bass N, Fatty-acid Metabolism and the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: Review and Hypothesis, *Hepatology*, (1993); 18(3):670-676.

[265].Dray A, Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* (1995);75:125-131.

[266].Wu W, Yao D-F, Qui L-W, Sai W-L, Shen J-J, Yu H-B, Characteristics of hepatic nuclear-transcription-factor-kappaB expression and quantitative analysis in rat hepatocarcinogenesis, *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, (2009); 8(5):504-509.

[267].Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, The NF- κ B- mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease, *Cell death and Differentiation*, (2006); 13:712-729.

[268].Valerio N, Manco M, Measurement of advanced glycation end products may change NASH management, *J. Gastroenterol. Hepatol*,(2007); 22:1112–1119.

[269].Kirsch R, Clarkson V, Verdonk RC, MA Arais, Shephard EG, Ryffel B, Rodent nutritional model of steatohepatitis: Effects of endotoxin (lipopolysaccharide) and tumor necrosis factor alpha deficiency, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2006); 21:174–182.

[270].Murayama H, Ikemoto M, Nagata A, Marked elevation of serum mitochondrion-derived markers in mild models of non-alcoholic steatohepatitis in rats, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*,(2009);24: 270–277.

[271].Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N, Oxidative Stress and Cytokine Response In Hepatic Fibrogenesis Role of Adipocytokines in Hepatic Fibrogenesis, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2007) ;22(1):87–92.

[272].Denk H, Stumptner C, Fuchsbichler A, Zatloukal K, Mallory bodies and liver diseases, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* ,(2004); 19:349–352.

[273].DeWitt DL, Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1991;1083:121–34.

[274].Harte AL,Silva NF,Creely SJ,McGee KC,Billyard T,Youssef-Elabd EM,Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease, *Journal of Inflammation*, (2010);,7:15: 1-10.

[275].Bolduc C, Larose M, Lafond N, Adipose tissue transcriptome by serial analysis of gene expression, *Obes Res*,(2004);12:750–757.

[276].Fain JN, Kanu A, Bahouth SW et al. Comparison of PGE2, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*,(2002);67: 467–473.

[277].Fain JN, Ballou LR, Bahouth SW, Obesity is induced in mice heterozygous for COX-2, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, (2001); 65:199-209.

[278].Anderson N, Borlak J, Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis, *Pharmacol. Rev.* ,(2008);60:311–357.

[279].Puschel GP, Kirchner C, Schroder A, Glycogenolytic and anti-glycogenolytic prostaglandin E2 actions in rat hepatocytes are mediated via different signalling pathways. *Eur J Biochem*, (1993);218:1083–1089.

[280].Qu W, Savier E, Thurman RG, Stimulation of monooxygenation and conjugation following liver transplantation in the rat: involvement of Kupffer cells., *Mol Pharmacol* (1992);41:1149–1154.

[281].Qu W, Zhong Z, Goto M,Kupffer cell prostaglandin E2 stimulates parenchymal Cell O2 consumption:alcohol and cell–cell communication. *Am J Physiol*(1996);270:574–580.

[282].Quiroga J, Prieto J. Liver cytoprotection by prostaglandins. *Pharmacol Ther.*, (1993);58:67–91.

[283].Wisse E, Knook DL, Fraser R. Cells of hepatic sinusoids, Vol. 7. Leiden, The Netherlands: The Kupffer Cell Foundation, (1999).

[284].Dieter P, Scheibe R, Jakobsson P, Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* (2000);276:488–492.

[285].Casado M, Molla B, Roy R, Protection against Fas- induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology*,(2007); 45:631–638.

[286].Leung WK, Cheung KF, Ching AKK, Chui YL, Chan KK, Sung JJY, Expression of a cyclo-oxygenase-2 transgene in murine liver causes hepatitis, *Gut* ,(2007); 56:991-999.

[287].Morinaga S, Yamamoto Y, Noguchi Y, Imada T, Rino Y, Akaike M, Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2002) ,17: 1110-1115.

[288].Iniguez, MA., Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem* (2000); 275:23627–23635.

[289].Lara-Pezzi E, Gomez MV, Galvez BG, Mira E, The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane- type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Investig*, (2002); 110:1831–1838.

[290].Konheim YL, Wolford JK, Association of a promoter variant in the inducible cyclooxygenase-2 gene (PTGS2) with type 2 diabetes mellitus in Pima Indians, *Hum Genet* (2003) 113 : 377–381.

[291].Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis, *Gastroenterology*, (2003), 125:556-571.

[292].Park GY, Christman JW, Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006);290: 797–805.

[293].Horrillo R, Planaguma A, G-Periz A, Ferre N, Titos E, Comparative Protection against Liver Inflammation and Fibrosis by a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor and a Nonredox-Type 5-Lipoxygenase Inhibitor, *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* (2007); 323:778-786.

[294].Hui AY, Leung WK, Chan HLY, Chan FKL, Go MYY, Chan KK, Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat, *Liver International* (2006); 26:125-136.

[295].Bae S, Jung YM, Kim S, Expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a Cox-2 inhibitor, NS-398. *Clin. Cancer Res*, 2001;7:1410–1418.

[296].Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Coexpression of inducible nitric oxide synthase and Cox-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of Cox-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin. Cancer Res.*, (2001);7:1325–1332.

[297].Pekow JR, Bhan AK, Zheng H, Chung RT, Hepatic Steatosis Is Associated With Frequency of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis C-Related Cirrhosis, *Cancer*, (2007);109:2490-2496.

[298].Negro F, Clement S, Impact of obesity, steatosis and insulin resistance on progression and response to therapy of hepatitis C, *Journal of Viral Hepatitis*, (2009); 681-688.

[299].Ramesh S, Sanyal AJ, Hepatitis C and NAFLD, *Seminars of liver Disease*, (2004); 4:399-413.

[300].NAFLD: The Pathogenetic Roles of Insulin Resistance, *Current Molecular Medicine*, (2009); 9:299-314.

[301].Giannitrapani L, Ingrao S, Soresi M, Florena AM, Spada EL,Sandonato L, Cyclooxygenase-2 Expression in Chronic Liver Diseases and Hepatocellular Carcinoma An Immunohistochemical Study, Steroid Enzymes and Cancer: Ann. N.Y. Acad. Sci. (2009).1155: 293–299.

[302].Yu J, Ip E, Pena A, Hou JY, Sessa J, Pera N, COX-2 Induction in Mice With Experimental Nutritional Steatohepatitis: Role as Pro-inflammatory Mediator, Hepatology, (2006); 43:826-836.

[303].Pazirandeh S , Khettry U, Gordon FD, Resnick RH, Murray JE, Sheth SG, Cyclooxygenase-2 Expression in Hepatocellular Carcinoma, Cirrhosis and Chronic Hepatitis in the United States, Dig Dis Sci (2007) 52:220–227.

[304].Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D, cyclooxygenase in normal human tissues-is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform?, Journal of Cellular and Molecular Medicine, (2008):1-19.

[305].Simmons DL, Botting RM, Hla T, Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition, Pharmacol Rev, (2004); 56:387–437.

[306].Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T, Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene, Biochem J,(1994); 302:723–727.

[307].Aronoff DM, Boutaud O, Marnett LJ, Oates JA, Inhibition of prostaglandin H2 synthases by salicylate is dependent on the oxidative state of the enzymes, J Pharmacol Exp Ther, (2003); 304:589–595.

[308].Bergstrom S, Danielsson H, and Samuelsson B,The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors, Biochim Biophys Acta ,(1963); 32:90:207–210.

[309].Breinig M ,Rieker R, Eiteneuer E, Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma, Int. J. Cancer, (2008),122:547–557.

[310].Wisse E, Knook DL, Fraser R, Cells of hepatic sinusoids, Vol. 7. Leiden, The Netherlands: The Kupffer Cell Foundation, (1999).

[311].Saed GM, Immunohistochemical Staining of Cyclooxygenase with Monoclonal Antibodies, From: Methods in Molecular Biology, vol. 477: Advanced Protocols in Oxidative Stress I, Edited by: D. Armstrong, Humana Press., NY, 219-227.

[312].Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte BA, Cyclooxygenase in biology and disease, FASEB J, (1998); 12:1063-1073.

[313].Hui AY, Dannenberg AJ, Sung JJ, Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells, J Hepatol., (2004); 41:251–258.

[314].Nieto N, Greenwel P, Friedman SL, Zhang F, Dannenberg AJ, Cederbaum A, Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H₂O₂ and cyclooxygenase-2. J Biol Chem., (2000); 275: 20136–20145.

[315].Fennekohl A, Schieferdecker HL, Jurgermann K. Püschel GP, Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver, (1999), 30:38-44.

[316].Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW, Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation, Nat Rev Immunol., (2002) ;2:787–795.

[317].Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, et al. Kupffer cell-derived prostaglandin E2 is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. Am J Physiol., (2000); 279:100–106.

[318].Yokoyama Y, Xu H, Kresge N, Role of thromboxane A2 in early BDL-induced portal hypertension, Am J Physio Gastrointest Liver Physiol, (2003); 284: 453–460.

[319].Kim SM, Park KC, Kim HG, Han SJ, Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam of liver fibrosis in rats with ligated common bile ducts, *Hepatology Research*, (2008); 38: 800–809.

[320].Sokol RJ, Devereaux M, Dahl R, Gumprich E. ‘Let there be bile’ – understanding hepatic injury in cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, (2006); 43 (Suppl 1): 4–9.

[321].Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties, *Nat Med.*, (1999) ;5:698–701.

[322].Levy BD, Clish CB, Schmidt B, et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution, *Nat Immunol.*, (2001);2:612–619.

[323].Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB J*, (2007); 21:325–332.

[324].M-Sanz P, Callejas NA, Casado M, D-Guerra MJM, Bosca L, Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines, *British Journal of Pharmacology*, (1998); 125:1313–1319.

[325].Yu J, Hui AY, Chu ESH, Cheng ASL, Go MYY, Chan HLY, Expression of a cyclo-oxygenase-2 transgene in murine liver causes hepatitis, *Gut*, (2007); 56:991-999.

[326].Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM, Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines, *J. Biol. Chem.*,(1993);268: 9049-9054.

[327].Hsieh P-S, Jin J-S, Chiang C-F, Chan P-C, Chen C-H, Shih K-C, COX-2-mediated Inflammation in Fat Is Crucial for Obesity-linked Insulin Resistance and Fatty Liver, *Obesity*, (2009);17:1150–1157.

[328].Sung YK, Hwang SY, Kim JO, The correlation between cyclooxygenase-2 expression and hepatocellular carcinogenesis. *Mol Cells*, (2004); 17:35–38.

[329].Han C, Michalopoulos GK, Wu T, Prostaglandin E2 receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinases and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Physiol.*, (2006); 207: 261–270.

[330].Yosry A, E-Sherif Y, Esmat G, E-Hendawi A, Zayed N, Zakaria MS, The Effect of COX-2 Expression in Hepatocytes on Response to Combined Interferon/Ribavirin in Chronic Hepatitis C Infection, *Arab J Gastroenterol* ,(2008); 9(4): 89-93.

[331].Hu K-Q, Cyclooxygenase 2 (COX2)-prostanoid pathway and liver diseases, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, (2003) ; 69: 329–337.

[332].Cusimano A, Daniela Foder , Lampia N, Azzolina A, Notarbartolo M, Giannitrapani L, Prostaglandin E2 Receptors and COX Enzymes in Human Hepatocellular Carcinoma Role in the Regulation of Cell Growth, *Steroid Enzymes and Cancer: Ann. N.Y. Acad. Sci.* ,(2009),1155: 300–308 .

[333].Han C, Michalopoulos GK, Wu T, Prostaglandin E2 receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinases and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Physiol.*, (2006), 207: 261–270.

[334].Hu KQ, Yu CH, Mineyama Y, Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor, *Int. J. Oncol.*,(2003); 22: 757–763.

[335].Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, (1999); 5:4005–4012.

[336].M-Sanz P, Mayoral R, Casado M, Boscá L, COX-2 in liver, from regeneration to hepatocarcinogenesis: What we have learned from animal models?, *World J Gastroenterol*, (2010); 16(12): 1430-1435.

[337].Wang D, DuBois RN, Prostaglandins and cancer, *Gut*, (2006), 55:115-122.

[338]. Müller Ri Crosstalk of oncogenic and prostanoid signalling pathways, *J Cancer Res Clin Oncol*, (2004) 130:429-444.

[338]. Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis, *Gastroenterology*, (2003); 125:556-571.

[339]. Hui AY, Leung WK, Chan HLY, Chan FKL, Go MYY, Chan KK, Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat, *Liver International* (2006); 26:125-136.

[340]. Planaguma A, Claria J, Miquel R, L-Parra M, Titos E, Masferrer JL, The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPAR γ activation, *The FASEB Journal*, (2005).

[341]. Yu J, Wu CW, Chu ESH, Hui AY, Cheng ASL, Go MYY, Elucidation of the role of COX-2 in liver fibrogenesis using transgenic mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2008); 372:571-577.

[342]. Skill NJ, Theodorakis NG, Wang YN, Wu JM, Redmond EM, Sitzmann JV, Role of cyclooxygenase isoforms in prostacyclin biosynthesis and murine prehepatic portal hypertension, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, (2008); 295: 953–964.

[343]. Han C, Li G, Lim K, DeFrances MC, Gandhi CR, Wu T, Transgenic Expression of Cyclooxygenase-2 in Hepatocytes Accelerates Endotoxin-Induced Acute Liver Failure, *The Journal of Immunology*, (2008); 181: 8027-8035.

[344]. Plastaras JP, Guengerich FP, Nebert DW, Marnett LJ. Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J Biol Chem*. (2000); 275(16): 11784-11790.

[345]. Baffy G, Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view, *Journal of Hepatology*, (2009); 51:212-223.

[346].Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner LD. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes, *Free Radic-Biol, Med*,(1991);11:81.

[347].Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K, Insitu detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver disease, *Journal of Hepatology*, (2002);37:56-62.

[348].Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF, Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2, *Carcinogenesis*, (2001); 22(1): 5-10.

[349].Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. (1998); 93(5): 705-716.

[350].Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. (1997); 18(4): 795-799.

[351].Uchida K, A Lipid Derived Endogenous Inducer of COX-2: a Bridge Between Inflammation and Oxidative Stress,(2008); *Mol Cells*,23:3:347-351.

[352].Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN, Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth., *J Clin Invest.*,(2000);105(11): 1589-1594.

[353].Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*,(1995); 83: 493-501.

[354].Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*. (2001); 276(21): 18563-18569.

[355].Bagga D, Wang L, F-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST, Differential effects of prostaglandin derived from ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America(PNAS)*,(2003); 100: 1751-1756.

[356].G-Ortiz M, M-Abundis E, B-Munoz B,R,R-Cervantes JA, Inhibition of Cyclooxygenase-1 or -2 on Insulin Sensitivity in Healthy Subjects, *Horm Metab Res*, (2001),;33:250-253.

[357].Hsieh P-S , Lu K-C, Chiang C-F, Chen C-H, Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats, *Eur J Clin Invest*, (2010); 40 (2): 164–171.

[358].Mayoral R, Molla B, Flores JM, Bosca L, Casado M, M-Sanz P, Constitutive expression of cyclooxygenase-2 transgene in hepatocytes protects against liver injury, *Biochem. J.*,(2008); 416:337-346.

[359].Li G, Han C, Xu L, Lim K, Isse K, Wu T, Cyclooxygenase-2 Prevents Fas-Induced Liver Injury Through Up-Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor, *Hepatology* , (2009); 50:834-843.

[360].Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A, Role of NF- κ B in the Antiproliferative Effect of Endothelin-1 and Tumor Necrosis Factor- α in Human Hepatic Stellate Cells, Involvement of cyclooxygenase-2, *The Journal of Biological Chemistry*, (1998), 273: 23183–23190.

[361].Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D, Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4, *The Journal of Biological Chemistry*,(2001), 276,16683–16689.

[362].Efsen E, Bonacchi A, Pastacaldi S, Valente AJ, Wenzel UO, T-Guerra C , Agonist-Specific Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Cyclooxygenase Metabolites in Hepatic Stellate Cells, *Hepatology*, (2001);33:713-721.

[363].F-Martinez A, Molla B , Mayoral R, Bosca L, Casado M, M-Sanz P, Cyclo-oxygenase 2 expression impairs serum-withdrawal-induced apoptosis in liver cells, *Biochem. J.* (2006) ;398:371–380.

[364].Liu W, Nakamura H, Tsujimura T, Cheng J, Yamamoto T, Iwamoto Y, Chemoprevention of spontaneous development of hepatocellular carcinomas in fatty liver Shionogi mice by a cyclooxygenase-2 inhibitor, *Cancer Sci*, (2006); 97: 768–773.

[365].Yin H, Cheng L, Langenbach R, Ju C, Prostaglandin I₂ and E₂ Mediate the Protective Effect of Cyclooxygenase-2 in A Mouse Model of Immune-Mediated Liver Injury, *Hepatology*,2007;45:159-169.

[366].Fierro IM, Kutok JL, Serhan CN, Novel Lipid Mediator Regulators of Endothelial Cell Proliferation and Migration: Aspirin-Triggered-15R-Lipoxin A₄ and Lipoxin A₄, *The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, (2002); 300:385-392.

[367].Casado M, Callejas NA, Rodrigo J, Zhao X, Dey SK, Boscá L, Contribution of cyclooxygenase-2 to liver regeneration after partial hepatectomy, *The FASEB Journal*, (2001).

[368].Vegiopoulos A, M-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, Cyclooxygenase-2 Controls Energy Homeostasis in Mice by de Novo Recruitment of Brown Adipocytes, (2010); 328:1158-1162.

[369].Planaguma A, Titos E, L-Parra M, Gaya J, Pueyo G, Arroyo V, Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A₄ (LXA₄) and ASA-triggered 15-epi-LXA₄, *The FASEB Journal* , (2002).

[370].Titos E, Claria J, Planaguma A , L-Parra M, G-Periz A, Gaya J, Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogat experimental liver injury: role of Kupffer cells, *J.Leukoc. Biol.*, (2005); 78: 871–878.

[371].Madsen L, Pedersen LM , Lillefosse HH , Fjære E, Bronstad I, Hao Q, UCP1 Induction during Recruitment of Brown Adipocytes in White Adipose Tissue Is Dependent on Cyclooxygenase Activity, *PLoS ONE*,(2010).

[372].Li H, Hatakeyama S, Tsutsumi K, Sato T, Akiba S, Group IVA phospholipase A₂ is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver, *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, (2008); 86:12–17.

[373].Li H, Yokoyama N, Yoshida S, Tsutsumi K, Hatakeyama S, Sato T, Alleviation of High-Fat Diet-Induced Fatty Liver Damage in Group IVA Phospholipase A₂-Knockout Mice, *PLoS ONE* , (2009).

[374].Musso G, Gambino R, Cassader M, Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition. Mechanisms and implications for metabolic disorders, *Curr Opin Lipidol*, (2010);21:76-83.

[375].Birsen Besnili, Histopatolojik ve immunhistokimyasal açıdan Non-alkolik Steatohepatit (NASH), hepatosteatoz ve normal karaciğer bi-yopsilerinde kupffer hücreleri ve stellat hücrelerin değerlendirilmesi, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Uzmanlık Tezi, 2009.

[376].Burhan Özdil, Kronik Hepatit ve Sirozlu Vakalarda COX-2 Gen Polimorfizminin Fibrozis Gelişimindeki Önemi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Yan Dal Uzmanlık Tezi, 2008.