

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL OLARAK NONALKOLİK STEATOHEPATİT  
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA GENİSTEİN'İN İNSÜLİN REZİSTANSI VE  
VİSFATİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Kerem METİN**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ**

2008 – ELAZIĞ

**DEKANLIK ONAYI**

Prof. Dr. Ömer Lütfi ERHAN

**D E K A N**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_

.....

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

\_\_\_\_\_

**Danışman**

**Uzmanlık Sınavı Juri Üyeleri**

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	III
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VI
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	VII
<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	3
<b>3. GİRİŞ</b> .....	5
3.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı .....	5
3.1.1. Tanım ve Önemi .....	5
3.1.2. Epidemiyoloji .....	6
3.1.3. Etiyoloji .....	7
3.1.4. Histopatoloji .....	8
3.1.5. Patogenez .....	14
3.1.6. Klinik Özellikler ve Tanı .....	25
3.1.7. Tedavi .....	30
3.1.8. Prognoz .....	34
3.2. Genistein .....	35
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>42</b>
4.1. Hayvanlar Ve Deneysel Çalışmanın Düzenlenmesi .....	42
4.2. Tedavi Protokolleri .....	44
4.3. Genistein Dozu, Hazırlanışı ve Uygulanma Şekli .....	44
4.4. Laboratuvar ve Histopatolojik Analizler .....	44
4.4.1. Biyokimyasal İncelemeler .....	44
<b>4.4.2. HOMA İndeksi</b> .....	<b>46</b>
<b>4.4.2. Histopatolojik İnceleme</b> .....	<b>47</b>
4.5. İstatistiksel Değerlendirme .....	47

<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>48</b>
5.1. Bazal ve haftalık ağırlık ölçümleri .....	48
5.2. Biyokimyasal Ölçümler .....	49
5.2.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri, Lipid Profili, Açlık Kan Glukozu ve İnsülin Düzeyleri .....	49
5.2.2. Serum İnsülin Düzeyleri .....	52
5.2.3. Serum IL-6 Düzeyleri .....	53
5.2.4. Serum TGF- $\beta$ 1 Düzeyleri .....	54
5.2.5. Serum Visfatin Düzeyleri .....	55
5.2.6. Serum TNF- $\alpha$ Düzeyleri .....	56
5.3. Histopatolojik İnceleme Bulguları .....	59
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>60</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>71</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>88</b>

## TABLO LİSTESİ

	SAYFA
<b>Tablo 1.</b> NAYKH'nın demografik özellikleri .....	8
<b>Tablo 2.</b> Primer ve sekonder NASH ile ilişkili durumlar .....	9
<b>Tablo 3.</b> NASH'de görülen histopatolojik lezyonlar özeti .....	13
<b>Tablo 4.</b> NASH lezyonlarının derece ve evrelendirilmesi .....	15
<b>Tablo 5.</b> Matriks metabolizmasının belirteçleri .....	30
<b>Tablo 6.</b> Klinik çalışmalarda NASH tedavisi için kullanılan ilaçlar .....	31
<b>Tablo 7.</b> Standart pellet yemin bileşimi .....	43
<b>Tablo 8.</b> Yağdan zengin diyetin içeriği .....	43
<b>Tablo 9.</b> Gruplara ait rat ağırlıkları .....	48
<b>Tablo10.</b> Gruplara ait glukoz, AST, ALT, ALP, GGT, kolesterol, trigliserid, HDL, VLDL, LDL kolesterol, insülin ve HOMA indeksi düzeyleri. .....	51

## ŞEKİL LİSTESİ

### SAYFA

Şekil 1. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması .....	35
Şekil 2. Genistein'in (4',5,7,-trihidroksiizoflavon) yapısı .....	36
Şekil 3. Gruplara ait serum insülin düzeyleri .....	52
Şekil-4. Gruplara ait serum IL-6 düzeyleri .....	53
Şekil-5. Gruplara ait serum TGF- $\beta$ 1 düzeyleri .....	54
Şekil-6. Gruplara ait serum Visfatin düzeyleri .....	55
Şekil-7. Gruplara ait serum TNF- $\alpha$ düzeyleri .....	56
Şekil-8. Kontrol + DMSO grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histolojik görünümü .....	57
Şekil-9. Kontrol + genistein grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histolojik görünümü .....	58
Şekil-10. YZD + DMSO kontrol grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histolojik görünümü .....	58
Şekil-11. YZD + genistein grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histolojik Görünümü .....	59
Şekil-12. NASH + genistein grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histolojik Görünümü .....	59

## KISALTMALAR LİSTESİ

NASH	: Nonalkolik steatohepatit
NAYKH	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
AKH	: Alkolik yağlı karaciğer hastalığı
VKİ	: Vücut kitle indeksi
DM	: Diabetes Mellitus
SYA	: Serbest yağ asitleri
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
UCP-2	: Uncoupling protein 2
NADH	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
FADH <sub>2</sub>	: İndirgenmiş Flavin Adenin Dinükleotid
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
JNK	: Jun N-terminal Kinaz
I $\kappa$ K- $\beta$	: İnhibitör Kappa Kinaz-Beta
NF $\kappa$ - $\beta$	: Nükleer Faktör Kappa-Beta
PPAR- $\alpha$	: Peroksizomal Proliferators-activated Reseptör-alfa
IRS	: İnsülin Reseptör Substratları
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Faktör-beta
IL	: İnterlökin
AMPK	: AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz
FIZZ	: Found in İnflamatuvar Zone
PBEF	: pre-B-cell Colony-enhancing Factor
AST	: Aspartat Transaminaz
ALT	: Alanin Transaminaz
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
UDCA	: Ursodeoksikolik asit
GGT	: Gama-Glutamil Transferaz
SAM	: S-adenozilmetiyonin
ÖR	: Östrojen Reseptörleri

MAPK : Mitojen Aktive Eden Kinaz  
LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler  
SGLUT-1 : İntestinal Sodyum Bağımlı Glukoz Taşıyıcı-1  
GLUT-1 : Glukoz Taşıyıcı-1  
YZD : Yağdan Zengin Diyet  
ELISA : Enzyme-linked İmmunosorbent Assay  
CV : Coefficient of variation  
ALP : Alkalen Fosfataz



## 1. ÖZET

Nonalkolik steatohepatit, nonalkolik yağlı karaciğer hastalık spektrumunun bir parçası olup; obezite, diyabet ve insülin rezistans sendromunun prevalansında artışa bağlı olarak dünya genelinde sıklığı giderek artan bir durum olarak kabul edilmektedir. Anlamli alkol kullanım öyküsü olmayan ancak karaciğer biyopsilerinde alkolik hepatitle uyumlu değişimler gösteren hastalar tanımlamak için kullanılmıştır. Bununla beraber, siroz ve fibroza ilerleyişi durdurmada henüz etkin bir tedavi tanımlanmamıştır. Genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone); anti-kanser, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler gösteren ve soya fasülyesinde bulunan bir fitoöstrojendir. Bu çalışmanın amacı; yağdan zengin diyet ile NASH'in deneysel bir modelini oluşturarak, genisteinin koruyucu ve tedavi edici özelliklerini araştırmaktır.

Çalışmada 200-250 gr ağırlığında erkek Sprague Dawley cinsi ratlar kullanıldı ve ratlar 5 çalışma grubuna ayrıldı. Grup 1 (n=10, kontrol grup; 100 µ/gün day %1.25 subkutan. 6 hafta); Grup 2 (n=10, kontrol grup; 0.2 mg/kg/gün genistein subkutan. 6 hafta), Grup 3 (n=10, Yağdan zengin diyet (YZD)grup; 100 µ/gün %1.25 subkutan 6 hafta); Grup 4 (n=10, YZD + genistein grup; 0.2 mg/kg/gün genistein subkutan 6 hafta); Grup 5 (n=10, NASH + genistein grup; 0.2 mg/kg/gün genistein subkutan 6 hafta). Çalışma tamamlandıktan sonra ratlar dekapite edildi, kan örnekleri alınarak rutin ve spesifik biyokimya parametreleri çalışıldı. Ayrıca histopatolojik inceleme için karaciğer doku örnekleri alındı.

Çalışmada serumda spesifik parametreler olarak serum TNF-alfa, IL-6, TGF-beta 1 ve insulinomimetik bir madde olan visfatin düzeyleri ölçüldü ve genisteinin bu parametreler üzerine etkileri incelendi.

Çalışmada; genisteinin, karaciğer fonksiyon testlerini düzelttiği insülin rezistansını, serum TNF-alfa ve IL-6 düzeylerini azalttığı, ayrıca yağdan zengin diyet ile oluşturulan karaciğer hasarının histopatolojik olarak gerilediği gözlemlendi. Sonuç olarak; genistein başta olmak üzere farklı izoflavonları içeren yiyeceklerin tüketilmesi NASH hastalarının tedavisinde önemli ve umut verici bir seçenek gibi görünmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Nonalkolik steatohepatit, genistein, yağdan zengin diyet, Visfatin.

## ABSTRACT

### **The investigation of effects on the level of visfatin and insulin resistance in experimentally-induced nonalcoholic steatohepatitis**

Nonalcoholic steatohepatitis is part of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease, a condition becoming increasingly recognized worldwide due to its prevalence in obesity, diabetes, and insulin resistance syndrome. The pathological picture bears a striking resemblance to that of alcohol-induced liver injury, but it occurs in individuals who deny a significant history of alcohol ingestion. Nevertheless, there is yet no definitive therapy that prevents it evolving through fibrosis and cirrhosis. Genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone), a phytoestrogen found in soybeans, has a variety of pharmacological features including anticancer, antioxidant and anti-inflammatory actions. The objective of the present study was to investigate the preventive and therapeutic role of genistein in an experimental model of NASH induced by a high fat diet (HFD).

A total of male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 gr. were used in the study and rats were divided into 5 groups. Group 1 (n=10, control group; 100  $\mu$ /day 1.25% subcutan for 6 weeks); Group 2 (n=10, control group; 0.2 mg/kg/day genistein subcutan for 6 weeks); Group 3 (n=10, HFD group; 100  $\mu$ /day 1.25% subcutan for 6 weeks); Group 4 (n=10, HFD + genistein group; 0.2 mg/kg/day genistein subcutan for 6 weeks); Group 5 (n=10, NASH + genistein group; 0.2 mg/kg/day genistein subcutan for 6 weeks). After 6 weeks, rats were decapitated; blood samples obtained for biochemical parameters and liver samples for histopathological investigation.

In this study, specific parameters serum TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  1 and insulinomimetic agent Visfatin levels were measured and the effects of genistein were evaluated on these parameters.

In this study; genistein was found to improve liver function tests, decrease insulin resistance, TNF- $\alpha$ , IL-6 levels, and prevent the high fat diet induced induced liver injury. In conclusion; especially genistein and consuming more food products containing isoflavones appears to be promising in the treatment of NASH patients.

**Key words:** Nonalcoholic steatohepatitis, genistein, high fat diet, visfatin.

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

##### 3.1.1. Tanım ve Önemi

Nonalkolik steatohepatit (NASH), 1980 yılında Ludwig ve arkadaşları tarafından alkol kullanmayan ancak karaciğer biyopsilerinde alkolik hepatite benzer histolojik bulguları mevcut olan hastalarda karaciğer hasarını tanımlayan morfolojik bir model olarak ileri sürülmüştür (1). Bu antiteyi tanımlamak için; psödoalkolik karaciğer hastalığı, alkol-benzeri hepatit, diyabetik hepatit, nonalkolik Laennec's hastalığı ve steatonekroz gibi farklı terimler kullanılmıştır (2). 1986 yılında, hastalığın geniş bir patolojik spektruma sahip olduğunun görülmesi ve NASH tanısının bazı özel histopatolojik kriterleri gerektirmesi nedeniyle, karaciğer yağlanması ile seyreden birçok tablo bu tanımın kapsamı dışında kalmış ve isimlendirmeden doğan önemli karışıklıkların yaşanmasına neden olmuştur. Bu karışıkları azaltmak için kullanılan nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) en çok tercih edilen tanımlama olmuştur (3). NAYKH'nin tanımladığı patolojik spektrum, basit benign yağlı karaciğerden, yağlı değişimle beraber lobüler inflamasyon, hepatoselüler hasar, Mallory hiyalenleri, ilerleyici fibrozis ile karakterize NASH'e ve siroza kadar uzanmaktadır (4).

Karaciğer yağlanması; hangi nedene bağlı olursa olsun lipidlerin karaciğer ağırlığının %5'inden fazlasını oluşturması veya histopatolojik incelemede hepatositlerin %5'ten fazla yağ vakuölü içermesi olarak tanımlanmaktadır (5). Günümüzde yağlı karaciğer hastalığı alkole bağlı ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olarak ikiye ayrılmakta ve aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

Alkolik yağlı karaciğer hastalığı (AKH):

✓ Alkolik yağlı karaciğer

✓ Alkolik steatohepatit

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı: Belirgin alkol alımı olmaksızın, karaciğerde makroveziküler steatozla karakterize hastalık grubudur.

✓ Yağ ihtiva eden karaciğer

✓ Yağlı karaciğer

✓ NASH (hepatoselüler hasar, lobüler inflamasyon ve yağlı değişiklikler)

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 ilerleyebilmesinin yanı sıra obezite, diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve hiperlipidemiye kapsayan metabolik ve insülin rezistans sendromu ile kardiyovasküler hastalıklarla çok sıkı bir birliktelik göstermesi hastalığın önemi giderek artırmaktadır (6).

### **3.1.2. Epidemiyoloji**

NAYKH bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve prevalansında coğrafik değişiklikler olmakla beraber, çeşitli popülasyonlarda %10 ila 24 arasında olduğu düşünülmektedir. Batı dünyasında en sık görülen karaciğer hastalığı olduğu ve prevalansının da giderek arttığı gözlenmektedir (7).

Tüm ırk ve etnik grupları etkilemekte aynı zamanda yaş ve cinsiyet ayrımı gözetmemektedir. Çocukların %2.6'sı etkilenmekte (8) ve obez çocuk popülasyonunda bu oran %22.5 (8) ve %52.8'lere (9) kadar yükselmektedir.

NAYKH, diğer karaciğer hastalıkları dışlandığında, aminotransferazların asemptomatik arttığı vakaların %42-90'ının nedenidir.

NAYKH prevalansı obez vakalarda %57.5'e (10) ve %74'e (11) kadar artış göstermektedir. Tip 2 diyabetli hastalarda %28-55 ve hiperlipidemilerde %20-92 (4,12) oranlarında artmış NAYKH prevalansı mevcuttur. Diyabet ile obezitenin birlikteliği, ek bir risk daha oluşturmakta ve diyabeti olan şiddetli obez hastaların %100'ünde en azından hafif steatoz, %50'sinde steatohepatit, %19'unda siroz tespit edilmektedir (13).

Bunun yanı sıra, NAYKH'li hastaların birçoğu normal karaciğer testleri ve lipid profiline sahip olup non-obez ve non-diyabetiktir (14,15). Normal vücut kitle indeksli (VKİ) hastalarda trunkal obezite önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. NAYKH prevalansı zayıf vakalarda yaklaşık %2-3 tahmin edilmekte ancak obez popülasyonda %19'lara kadar yükselmektedir (16,17). Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer batılı ülkelerde son 10-15 yılda NAYKH prevalansındaki artış, tüm yaş gruplarında gözlenen obezite ve diyabetteki artış ile paralellik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 30 milyondan fazla erişkinde NAYKH mevcut olduğu tahmin edilmekte ve bunların 8.6 milyonunun NASH'li olduğu düşünülmektedir (18).

Her ne kadar tüm yaş gruplarında ve her iki cinsiyet grubunda da hastalık görülme sıklığı artsa da yapılan birçok çalışmada NAYKH'nın özellikle beşinci ve altıncı dekada ve kadınlarda daha sık gözlemlendiği tespit edilmiştir. Obezite, tip 2 diyabet ve hiperlipidemi sıklıkla NAYKH ilişkili durumlardır (4,10,12). Farklı çalışmalardan alınan NAYKH'nın demografik özellikleri Tablo-1'de verilmiştir.

### **3.1.3. Etiyoloji**

NASH'in etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen multifaktöryel olduğu düşünülmektedir. Primer ve sekonder NASH

olarak bir ayırım yapılmış ise de NASH'in her iki tipi de benzer özellikler sergilemektedir.

**Tablo-1.** NAYKH'nın demografik özellikleri

Yazar	Sayı	Yaş (yıl)	Kadın (%)	Diyabet (%)	Obezite (%)	Hiperlipidemi (%)
Ludwig (1)	20	54	65	50	90	67
Diehl (12)	39	52	81	55	71	20
Lee (19)	49	53	78	51	69	Belirtilmemiş
Powell (20)	42	49	83	36	95	81
Bacon (14)	33	47	42	21	39	21
Matteoni (21)	132	53	53	33	70	92
Angulo (15)	144	51	67	28	60	57

Primer NASH; diabetes mellitus (DM) ve hiperlipidemi gibi metabolik sendrom ile ilişkili durumlarda ortaya çıkarken ikinci tip yani sekonder NASH; zayıflamaya yönelik bağırsak cerrahilerinde, obezlerde hızlı kilo kayıplarında, total parenteral nutrisyonda, lipodistrofi ve Wilson hastalığı ile amiodaron, tamoksifen, östrojenler ve glukokortikoidler gibi ilaçların kullanıldığı durumlarda görülmektedir (22). Tablo 2'de karaciğerde yağlanma ve primer veya sekoder NASH ile ilişkili olabilecek veya etiyolojilerinde yer alan hastalıklar verilmiştir.

#### 3.1.4. Histopatoloji

Yağlı karaciğer hastalığı, patolojik olarak karaciğer hücrelerinde trigliserid birikimi (steatozis) ve ilerleyici nekroinflamatuvar karaciğer hastalığı (steatohepatitis) ile sonuçlanan geniş spektrumlu klinik durumları tanımlamada kullanılan bir terimdir. Yağlı karaciğer hastalığı genellikle AKH ve NAYKH olarak iki ana etiyopatolojik klinik kategoriye ayrılmaktadır. NAYKH karaciğer hücrelerinde oluşturduğu histolojik hasar, alkol suiistimaline bağlı oluşan karaciğer hasarından ayırt edilemeyen bulgulara



sahiptir. Hepatik steatoz ve steatohepatit oluşturabilecek alkol alım eşiği tam olarak tespit edilememişse de genel olarak kadınlarda 20 g/gün ve erkeklerde 40 g/gün alkol alımı limit olarak kabul edilmektedir (24). Yine ayırıcı tanıda NASH ile kolaylıkla karıştırılabilecek hepatit C, otoimmün hepatitler, Wilson hastalığının erken evreleri göz önünde bulundurulmalıdır.

**Tablo-2.** Primer ve sekonder NASH ile ilişkili durumlar \*

<b>Primer NASH</b>	<b>Sekonder NASH</b>
<u>İnsülin rezistans sendromu olanlar:</u>	<u>İlaçlar:</u>
DM	Glukokortikoidler
Obezite	Sentetik östrojenlenler
Hiperlipidemi	Fosfor
Metabolik sendrom	Aspirin
Leptin eksikliği veya direnci	Amiodaron
	Perheksilin
	Kalsiyum kanal blokerleri
	Tetrasiklin
	Tamoksifen
	Methotreksat
	Antiviral ilaçlar
	Valproik asit
	Kokain alışkanlığı
	Nükleozid analogları
	Organik çözücüler
	<u>Cerrahi nedenler:</u>
	Gastropleksi
	Jejunioileal bypass
	İnce bağırsak rezeksiyonu
	Biliopankreatik diversiyon
	Bakterilerin aşırı çoğaldığı jejunal divertiküller
	<u>Genetik nedenler:</u>
	Abetalipoproteinemi
	Ailesel hipobetalipoproteinemi
	Tip I glikojen depo hast
	<u>Besinsel:</u>
	Total parenteral nutrisyon
	Protein kalori malnütrisyonu
	Schwachman sendromu
	Hızlı kilo kayıpları
	<u>Metabolik hastalıklar:</u>
	Galaktozemi
	Tirozinemi
	Fruktoz intoleransı
	Sistinüri
	Sandhoff hastalığı
	Sistemik karnitin eksikliği
	Wilson hastalığı
	<u>Sistemik hastalıklar:</u>
	Kaşeksi
	Isı çarpması
	İnflamatuvar bağırsak hast.
	Weber-Christian hastalığı
	Kistik fibrozis
	HBV, HCV

\* 23 nolu kaynaktan modifiye edilerek düzenlenmiştir.

Steatohepatitin morfolojik tanımlamasında kullanılan kriterler, karaciğer parankiminin kapsamlı olarak incelenmesini gerektirmektedir. Mikroskopik değerlendirmede, steatohepatite ait özellikler tipik olarak zon 3'te belirgindir. Karakteristik bulgular, değişen miktarlarda hepatosteatoz,

nekroinflamasyon, karaciğer hücre hasarı, ve/veya kendine özgü periselüler, perisünizoidal fibrozis kombinasyonundan oluşmaktadır. Bir çok araştırmacı için hali hazırda tanı için gerekli olan minimum morfolojik kriter portal inflamasyonun varlığını ve/veya fibrozisi kapsamaktadır (25). Birçok yazar, NASH'in histolojik tanısı için bu lezyonların, steatoz ve inflamasyona eklenmiş olması gerektiği hususunda birleşmişlerdir. Bir grup araştırmacı NAYKH'yı yağlanma (tip 1), yağlanma + inflamasyon (tip 2), yağlanma + balonlaşma (tip 3) ve yağlanma + balonlaşma ile birlikte Malorrry's hiyalenleri veya fibrozis (tip 4) olmak üzere dört histolojik alt gruba ayırmıştır (21). Tip 3 ve tip 4 histolojik ve klinik olarak NASH'e uymaktadır (26,27).

Karaciğer biyopsilerinde, steatozis sık rastlanan bir bulgudur. NASH çalışmalarının %100'ünde steatozis bildirilmiştir ayrıca alkolik karaciğer hastalığında en erken ortaya çıkan patolojik bulgu olduğu görülmektedir. Hem yetişkin hem de çocuklarda NAYKH'da tek, geniş ve nükleusun yerini değiştiren yağ damlacığının bulunduğu makroveziküler tip steatozis daha baskındır. Bunun yanı sıra mikroveziküler veya karışık tip steatozis de görülebilir. Mikroveziküler ve karışık tip steatoz AKH ve NASH'de ortak olarak gözlenirken tek başına mikroveziküler steatoz AKH'de görülür. Makroveziküler steatoz, hücre içi trigliserid birikimi ile sonuçlanan; lipidlerin taşınması, metabolizması, sentezi ve atılımı ile ilgili kompleks anormalliklerden kaynaklanır. Mikroveziküler steatoz ise yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonundaki defektlerle karakterize mitokondriyal sitopatiler, üre sentez bozuklukları ya da Reye sendromu, gebeliğin akut yağlı karaciğeri ve çeşitli ilaçların toksik etkileriyle ortaya çıkan daha ciddi karaciğer hastalıklarının göstergesi olarak düşünülmektedir (28). Steatozis, hastalığın ilerleme sürecinde

kalıcı olmamakta bu nedenle AKH ve NASH'e bağılı sirozun ayırımının yapılmasında yararlı olmamaktadır (29).

Steatohepatitteki lobüler inflamasyonun göstergesi sinüzidlerde ve balonlaşmış hepatositlerin yakınında az sayıda polimorfonükleer lökosit içeren karma inflamasyonun bulunmasıdır (30). Steatohepatitin aktif olduğu veya düzelme dönemlerinde lobüllerde ve portal yollarda hafif mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlenebilir. Ancak aşırı mononükleer infiltrasyonu kronik hepatit C gibi süperempoze kronik karaciğer hastalık şüphesini artırmaktadır. İlginç bir şekilde, NASH'li çocukların karaciğer biyopsilerinde steatozis ve lobüler mononükleer hücre infiltrasyonu çok sık karşılaşılan bir bulgudur (31). Lipogranülomlar, hem NASH hem de AKH'da tanımlanmakla birlikte teşhis için gerekli olduğu düşünülmemektedir. Lipogranülomlar, kronik inflamatuvar hücrelerden, Kupffer hücrelerinden ve bazen de steatotik hücreleri çevreleyen eozinofillerden meydana gelmektedir. Geniş lipogranülomların fibrozis ile ilişkili olabileceği düşünülmemektedir ancak bu steatohepatitin parenkimal fibrozisi ile karıştırılmamalıdır (32).

Sıklıkla balonlaşma dejenerasyonu şeklinde aynı zamanda litik nekroz ve apoptotik cisimcikler içeren karaciğer hasarı steatohepatit teşhisi için diğer ön koşullardan biridir. Balonlaşmış karaciğer hücreleri sitoplazmanın şişmesi ve yoğunluğunun azalması ile karakterizedir ki bu değişim özellikle karaciğerin zon 3 bölgesinde gözlenir. Köprüleşme nekrozları NASH'de sık olmasa da AKH'da daha sık olarak gözlenmektedir (33).

Mallory hiyalinleri; karaciğer hücrelerinde, periventriküler yerleşimli olduğunda steatohepatit için karakteristik ancak tanı için mutlaka gerekli olmayan, ip benzeri, yoğun intrasitoplazmik inklüzyonlardır. Sıklıkla

perisünizoidal fibroz alanlarında ve polimorflarla çevrenmiş karaciğer hücrelerinde tespit edilmektedir. AKH'da, NASH'e oranla daha sık olarak gözlenmektedir. Kronik kolestaz, Wilson hastalığı, ilaca bağlı hepatitler, fokal nodüler hiperplazi ve hepatoselüler karsinom gibi diğer karaciğer hastalıklarında daha çok zon 1'de tespit edilmektedir (28,34).

Megamitokondriler, intraselüler yuvarlak veya sigara şeklinde eozinofilik yapılar olarak tanımlanabilir. İntra-mitokondriyal parakristalin inklüzyonu, kristallerin kaybı ve multilameller membranlar şeklinde ultrastrüktürel anormallikler gösterirler. Daha çok AKH ile ilişkilidirler. Yapılan son çalışmalar NASH'de megamitokondrilerin daha ziyade zon 1'de yer aldığını göstermekte ve mitokondri hasarı NASH ile ilgili çalışmalarda yeni bir saha oluşturmaktadır (35).

Steatohepatitte, fibrozisin karakteristik görünümü, chicken-wire fibrozis olarak adlandırılan Disse aralığında kollajen birikimine bağlı periselüler fibrozistir. Bu tip fibroz hem AKH hem de NASH'de zon 3'te tespit edilmektedir. Karaciğerde en önemli kollajen üreten hücreler olan hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu sünizoidal kollajen formasyonundan sorumludur. Siroz aşamasında karakteristik perisünizoidal fibrozis görünümü kaybolabilmektedir (36). Tablo-3'de NASH'de görülen histopatolojik lezyonlar özetlenmiştir.

Steatohepatit tanısının histolojik olarak koymada çeşitli kriterler kullanılmaktadır. Ancak nekroinflamatuvar odaklar, özellikle balonlaşmış karaciğer hücreleri ve parankimal inflamatuvar hücre infiltrasyonu histopatolojik değerlendirmede önemli anahtar noktaları oluşturmaktadır. Steatozun şiddeti, etkilenen parankimin yaygınlığına bakarak

derecelendirilebilir. Son zamanlarda steatoz ve nekroenflamasyon lezyonlarını ‘derece’ler, fibroz tiplerini de ‘evreler’ halinde birleştiren bir sistem önerilmiştir (Tablo-4).

**Tablo-3.** NASH’de görülen histopatolojik lezyonlar \*

<b>NASH’de tanı için gerekli olanlar</b>	<b>Tanı için sıklıkla olan fakat gerekli olmayan</b>	<b>Tanı için gerekli olmayan fakat bulunabilen</b>	<b>NASH için atipik,diğer karaciğer hastahklarını düşündüren</b>
Steatoz, Makrosteatoz Mikrosteatoz	3 bölgede perisinüzoidal fibrozis; Santral-portal Köprüleşme	3 bölgede hepatositlerde Mallory cisimciği;	Tek veya baskın olarak mikrovesiküler steatoz
Karışık, hafif lobüler inflamasyon; Dağınık PNL ve mononükleer hücreler	Zon 1 hepatosellüler glikojenize nukleus	Prussian mavisi ile 1+granüler periportal hepatosellüler demir	Sklerozan hyalin nekroz; perivenüler fibroz, fleboskleroz
Hepatosellüler balonlaşma; tipik olarak 3. bölgede steatotik hücre yanında	Lobüllerde lipogranülomlar; Değişken,küçük,boyutta	Hepatositlerde megamitokondri	Portal inflamasyon
	Bazı alanlarda asidofilik Cisimcikler, PAS-d Kupffer hücreleri		Portal-periportal fibrozis; perisinüzoidal fibrozis olmadan veya perisinüzoidal fibrozisde artış; portal alanda köprüleşme fibrozisi
	Yağ kistleri		Lobüler düzensizlik ve inflamasyon; köprüleşme nekrozu
			Kr.Kolestaz; safra kanal lezyonları veya kanal kaybı
			Kr.kolestaz; safra kanal lezyonları veya kanal kaybı
			epitelyumoid granülomlar

\* 27 nolu kaynaktan alınmıştır.

### 3.1.5. Patogenez

NASH'in patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da Day ve arkadaşlarının öne sürdüğü iki darbe teorisi günümüzde en çok kabul gören hipotezdir. Bu teoriye göre ilk darbeye çeşitli faktörlere bağlı olarak karaciğerde yağ depolanması artmakta ve sağlıklı karaciğer steatotik hale gelmektedir. Bu yağlı değişim organın ikinci darbeye karşı duyarlılığını artırmaktadır. Ardından oksidatif stres ve sitokinler aracılığı ile hepatosit hasarı, inflamasyon ve sonuçta fibrozis gelişimi ile karakterize ikinci darbe gerçekleşmektedir (37).

Yağlı karaciğer dejenerasyonu; obezite, malnütrisyon, bağırsak malabsorbsiyonları, diyabet gibi metabolik ve endokrin hastalıklarda hepatositlerin bir yanıtı olarak gözlenmektedir (38,39). Yağlı karaciğer aynı zamanda hepatotoksik ilaçlar, alkol, geçiş metallerinin birikimi ve hepatit C enfeksiyonlarında da ortaya çıkmaktadır (40,41). Karaciğer yağlanması, insülin rezistansının anahtar rol oynadığı metabolik sendromun da bir özelliğidir (39). NAYKH, AKH ve hepatit C ile yapılan çalışmalar NAYKH'nın NASH'e ve fibroze ilerlemesinde steatozisin önemli bir rol üstlendiğini göstermiştir (42). Ayrıca yağlanmanın şiddeti ile hepatik stellat hücre aktivasyonu korelasyon göstermektedir ki bu hücreler ekstraselüler matriks protein sentezinde en önemli hücrelerdir (43). Yağ birikimi parenkimal karaciğer hücrelerindeki anormal yağ asidi metabolizmasının sonucu oluşmaktadır (44). Bu hücrelere; karaciğerin metabolize edebileceğinden fazla serbest yağ asidi gelmekte, mitokondriyal serbest yağ asidi sentezi artmakta veya apolipoproteinlerin ve/veya trigliseridlerin sentez veya sekresyonunda bozukluklar ortaya çıkmaktadır (45).

**Tablo-4.** NASH lezyonlarının derece ve evrelendirilmesi \*

---

---

### **A-STEATOZ İÇİN DERECE**

**Derece 0:** Yağlanma yok

**Derece 1:** Hepatositlerin %33'den daha azı etkilenmiş

**Derece 2:** Hepatositlerin %33-66'sı etkilenmiş

**Derece 3:** Hepatositlerin %66'dan fazlası ekilenmiş

### **B-NEKROİNFLAMATUAR AKTİVİTE İÇİN SINIFLAMA**

**Derece 1, hafif:**

· **Steatoz:** Lobülün %66'sı etkilenmiş, makroveziküler

· **Balonlaşma:** Zon 3 hepatositte, sıklıkla görülür

· **Lobüler inflamasyon:** Yer yer veya hafif akut inflamasyon (PNL) ve nadiren kronik

inflamasyon (mononükleer)

· **Portal inflamasyon:** Yok veya hafif

**Derece 2, orta:**

· **Steatoz:** Değişik derecelerde mikst makroveziküler ve mikroveziküler

· **Balonlaşma:** Aşık, zon 3 hepatositte

· **Lobüler inflamasyon:** hepatositlerle PNL infiltrasyonu olur. Perisellüler fibrozis ve

hafif kronik inflamasyon görülebilir.

· **Portal inflamasyon:** Hafif veya orta

**Derece 3, şiddetli:**

· **Steatoz:** Tipik olarak lobüllerin %66'dan (panaciner) fazlası etkilenmiş ve mikst steatoz

· **Balonlaşma:** Belirgin, zon 3 hepatositte

· **Lobüler inflamasyon:** Yer yer akut ve kronik inflamasyon; perisinüzoidal fibrozis ve

balonlaşmanın olduğu zon 3 de PNL infiltrasyonu yoğunlaşmıştır.

· **Portal inflamasyon:** Hafif veya orta

### **C-FİBROZİS EVRESİ:**

**Evre 0:** Fibrozis yok.

**Evre 1:** Fokal veya yaygın, zon 3 perivenüler, perisinüzoidal veya perisellüler fibrozis

**Evre 2:** Yukarıdaki gibi, ek olarak fokal veya yaygın periportal fibrozis

**Evre 3:** Fokal veya yaygın köprüleşme fibrozu

**Evre 4:** Siroz

---

---

\* 27 nolu kaynaktan alınmıştır.

Artmış serbest yağ asitlerinin (SYA), insülin rezistansına neden olmalarının yanı sıra hepatositlere doğrudan toksik etkileri de vardır. SYA'ların hücrel toksisiteyi şu anki görüşlere göre oldukça karmaşıktır. Ancak, NASH patogeneğinde SYA toksisitesinin iki önemli mekanizması kabul görmektedir. SYA'ların doğrudan sitotoksik etkileri, hücre içi aşırı birikimlerinin sonucudur. Dolaylı sitotoksik etkileri ise SYA'ların lipid peroksidasyonlarının toksik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Her iki toksik etkiyi deneysel olarak birbirinden ayırmak oldukça zordur. Doğrudan olan toksik etkiler, yüksek konsantrasyonlarda (deterjan etkilerinden dolayı) membranda bozulma oluşturmaları, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz inhibisyonu ve hücre içi Ca<sup>+2</sup> homeostazının bozulmasıdır (46,47). SYA'lar aynı zamanda mitokondriyal toksisiteye neden olup hücre apoptozuna ve nekrozuna götüren olayları başlatır (48).

NASH ve AKH'nin histolojilerindeki benzerlik, her iki hastalığın patogeneğinde de ortak hasar mekanizmalarının söz konusu olabileceğini düşündürmüştür. AKH'da; oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ve sitokin aracılı hasar, hastalığın patogeneğinde önemli olduğu düşünülen iki mekanizmadır ve her iki mekanizmanın NASH'te gözlemlenen karaciğer hasarında da aynı olduğuna yönelik görüşler giderek güçlenmektedir (49).

Serbest oksijen radikalleri (SOR); mitokondride elektron transport zincirinden, sitoplazmada ksantin ve aldehit oksidaz enzimlerinin aktivitesinden ve endoplazmik retikulumdaki sitokrom P2E1 (uzun zincirli yağ asitlerinin ω-hidroksilasyonu) ve sitokrom P4A (ω1-hidroksilasyon) enzimlerinin aktivitesinden kaynaklanır (50).



Hepatik steatoz ve SOR oluşumu arasında ilişki henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hepatik steatozun, karaciğerde insülin rezistansını artırdığı gösterilmiştir (51) ve fizyolojik inhibitörü olan malonil koenzim A'ya olan ilgisinin azalmasına bağlı karnitin palmitoil transferaz enzim aktivitesinin artmasına bağlı olarak mitokondrilere SYA alımı kolaylaşmaktadır. Hepatik SYA havuzunun taşması ile lipid peroksidasyonunu tetikleyen yeterli miktarda SOR oluşumu artmış  $\beta$ -oksidasyon ile açıklanabilir (52,53). Nitekim Sanyal ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada NASH'de, SYA'ların artmış mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyonun önemli bir SOR kaynağı olabileceğini ileri sürmüştür (54).

Karaciğere aşırı SYA taşınması peroksizomal oksidasyonu arttırmakta ve sitokrom p-450 sistemini stimüle etmektedir. Mikrozomal P-450 sistemi de yağlı karaciğer hastalığında SOR'ların üretimini artırarak oluşan oksidatif değişikliklerden pay almaktadır. Bu, hepatik mikrozomal lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir. Etanol yokluğunda, sitokrom P2E1 endojen olarak üretilen keton, aldehytlerden ve diyetle alınan N-nitrozaminlerden SOR oluşturabilmektedir. NASH'li hastaların biyopsilerinde sitokrom P2E1'in artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Sitokrom P2E1 yokluğunda ise sitokrom P4A enzimi hepatik mikrozomal lipid peroksidasyonunda en önemli katalizör durumuna gelmektedir (50).

NAYKH'lı hayvan modellerinde (50,55) ve NASH'li hastalar ile yapılan çalışmalarda (54,56) okside proteinler ve lipidlerin varlığı, oksidatif stresin gösterilmesinde ikna edici deliller sağlamıştır. Serbest oksijen radikallerine (SOR) bağlı lipid peroksidasyonu, birçok nedenden dolayı NASH patenezinde merkezi bir rol üstlenmeye adaydır. Öncelikle, SOR ve lipid

peroksidasyonu NASH'in tipik histopatolojik özelliklerini açıklayabilecek potansiyele sahiptir (57). Plazma ve intraselüler membranların peroksidasyonu direkt olarak hücre nekrozuna/apoptozisine ve megamitokondrilerin oluşuma neden olabilir. Lipid peroksidasyonunun aldehit yapılı son ürünleri olan 4-hidroksinonenal ve malondialdehit hepatik proteinlere kovalent olarak bağlanarak potansiyel olarak immün yanıtı bağılı hasar başlatacak bileşenlerin oluşmasına neden olabilir. Ayrıca hepatik stellat hücreleri aktive ederek başta kollajen olmak üzere ekstraselüler matriks proteinlerinin, sitokeratinler arasında çapraz bağlar oluşturarak Mallory cisimlerinin sentezini ve eozinofil kemotaksisini stimüle edebilirler. NASH'li hastalarda lipid peroksidasyonunun derecesi ile steatozisin ciddiyeti arasında korelasyon gösterilmiştir. SOR aynı zamanda karaciğer hücrelerinde, Fas-ligand ekspresyonunu artırarak apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır (55,58).

Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu, mitokondrial deoksiribo nükleik asitlerinde (DNA) hasar oluşturarak ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu bozarak, mitokondriyal yapıda anormallik oluşturmaktadır (59) ve ATP azalmasına neden olmaktadır. ATP hücre bütünlüğünü sağlamada önemli olduğundan, tükenmesi hepatoselüler hasar oluşumuna zemin hazırlayabilmektedir (60). Ob/Ob farelerde yapılan çalışmalarda karaciğer hücrelerinde uncoupling protein 2'nin (UCP-2) ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (61). Bu mitokondriyal protein proton gradiyentini etkileyerek, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve indirgenmiş flavin adenin dinükleotidin (FADH<sub>2</sub>)'nin tekrar oksidasyonu sırasında ATP sentezinden ziyade ısı oluşturmaktadır. Bu etki mitokondriyal SOR oluşumunu azaltmaktadır (62,63). UCP-2'deki bu artış oksidatif strese karşı bir adaptasyon

olarak düşünülebilir. Ancak bu durumda karaciğerin ATP sentezinin artışına ihtiyaç duyulan durumlarda yeterli cevabı oluşturamamasına neden olmaktadır ve hücrenin enerji miktarını azaltmaktadır. Artmış UCP-2'ye bağlı azalan mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondriyal membran geçirgenliğini etkilemekte ve hepatositleri nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne sürüklemektedir (57).

Primer NAYKH gelişiminde en çok desteklenen teori insülin rezistansının anahtar mekanizma olduğudur. İkinci darbeye geçişte ise oksidatif stres ve bu bağlı lipid peroksidasyonunun, proinflamatuvar sitokinlerin (özellikle tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ )) ve yağ dokusu kaynaklı hormonların (adipokinler) etkili olduğu kabul edilmektedir. Obezite, tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve insülin rezistansı ile ilişkili durumlar NAYKH'li hastaların büyük bir kısmında mevcuttur. İnsülin rezistansı aynı zamanda obez olmayan ve normal glukoz toleransı olan NAYKH'li hastalarda da gözlemlenmiştir (64,65). İnsülin rezistansı veya insülin rezistans sendromu (veya her ikisi) NAYKH'li hastalarda fibrozis varlığı ve ciddiyeti ile korelasyon göstermektedir (66).

İnsülin rezistansına öncülük eden moleküler mekanizmalar komplekstir ve henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Çeşitli moleküller (TNF- $\alpha$ , leptin ve SYA) insülin sinyal yolağını etkiliyormuş gibi görünmektedir (18). İnsülin rezistansı ile ilişkili olarak lipid metabolizmasında ortaya çıkan değişimler arasında; artmış periferik lipoliz, SYA'ların karaciğer hücreleri tarafından artmış alımı ve hepatositlerde artmış trigliserid sentezi sayılabilir. Bunların net etkileri karaciğerde yağın birikmesidir ve bu da hepatik steatoz gelişimindeki insülin rezistansını anahtar rolünü açıklayabilmektedir (67,68). Yine obez

hastalarda yapılan çalışmalarda hızlı kilo kayıpları gibi lipolizi artıran durumlarda NASH riskinin arttığı gösterilmiştir (16).

SYA'ların hepatositler içerisinde birikmesi ile insülin sinyalizasyonu bozulmakta ve Protein kinaz C-3, Jun N-terminal Kinaz (JNK), inhibitör kapp kinaz-beta ( $I\kappa K-\beta$ ) ve nükleer faktör kapp-beta ( $NF\kappa-\beta$ ) aktivasyonu ile hepatik insülin rezistansı oluşmaktadır (69,70). Ardından hepatik insülin rezistansı mitokondriyal yağ asidi sentezini artırmaktadır. SYA'lar ve metabolitleri; mitokondriyal, peroksizomal ve mikrozomal yağ asidi oksidasyonunda enzimleri kodlayan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan peroksizomal proliferatör-aktivasyon reseptör- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) için ligandırlar (71).

TNF- $\alpha$  karaciğer tarafından üretilir ancak artmış TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonu obez ve diyabetik hayvan modellerinin yağ dokusundan da elde edilmiştir ve insülin rezistansında etkili olduğu gösterilmiştir (72). Hepatosit ve adipositlerde, TNF- $\alpha$ 'nın  $I\kappa K-\beta$ 'yi aktive etmesi; normalde insülinin reseptörüne bağlandığında başlatılan insülin reseptör substratları (IRS) 1 ve 2'nin tirozin fosforilasyonunu azaltmaktadır (73). Bu etkinin IRS'lerin serin treonin fosforilasyonu yoluyla fosfatidil-3-hidroksi kinaz aktivasyonunun ve diğer insülin sinyalizasyon olaylarının engellenmesi ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir (74). TNF- $\alpha$ 'nın transkripsiyonunun,  $I\kappa K-\beta$  ve daha sonra  $NF\kappa-\beta$ 'ye dayandığı düşünüldüğünde, TNF- $\alpha$ 'nın  $I\kappa K-\beta$ 'yi aktive etmesi, TNF- $\alpha$ 'nın sürekli olarak arttığı bir kısır döngü oluşturmaktadır. Bu durum, SYA'ların ve TNF- $\alpha$ 'nın artarak dolaşıma salındığı, artmış insülin rezistansı ve lipoliz ile sonuçlanmaktadır (73).

SOR'lar aynı zamanda, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , transforming growth faktör-beta (TGF- $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6), IL-8) üretimini artıran transkripsiyon faktörü NF $\kappa$ - $\beta$ 'nin aktivasyonunu başlatırlar (75). İnflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) NAYKH'nın patogenezinde önemli bir role sahip olduklarına dair kanıtlarda mevcuttur (76). Sistemik ve hepatik insülin rezistansına neden olabilirler (77). Aynı zamanda karaciğer hücre hasarına ve apoptozise, nötrofil kemotaksisine ve hepatik stellat hücre aktivasyonuna da neden olabilirler (78,57). Crespo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, NASH'li obez hastaların karaciğerlerinde artmış TNF- $\alpha$  ve onun reseptörü olan p-55'in ekspresyonunu ve yağ dokusunda artmış TNF- $\alpha$  ekspresyonunu göstermişlerdir (79). TNF- $\alpha$  ekspresyonundaki bu artışın, karaciğer fibrozunun derecesi ile korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Hepatositlerde yağ birikimi NF $\kappa$ - $\beta$  bağımlı inflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) salınmasını uyarmaktadır (80,81). Karaciğere spesifik makrofajlar olan Kupffer hücreleri aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin potent bir kaynağıdır. Bu hücreleri aktive eden uyarılar; hepatosit kaynaklı sitokinler, okside lipid artıkları (76) veya bağırsak kaynaklı endotoksinler olabilmektedir (82).

Böylelikle SOR'lar; birinci darbeden ikinci darbeye geçişte ve dolayısıyla yağlı karaciğer evresinden steatohepatit oluşum evresine geçişte en önemli faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. SYA'lar ise her iki darbeyi de etkilemektedir; başlangıç aşamasında trigliserid sentezine katılarak karaciğerde birikmekte ardından mitokondri ve peroksizomlarda oksidasyona uğrayarak SOR oluşuna neden olmaktadır.

Obezite ve NASH arasındaki ilişki insülin rezistansı ve SYA'lardaki artış ile açıklanabilse de yağ dokusunun, artık endokrin organ sınıfına girmesini sağlayan gelişmeler de göz ardı edilmemelidir. Yaklaşık son 10 yılda yapılan çalışmalar ile adipositlerden salgılanan çeşitli metabolik ve endokrin fonksiyonlara sahip oldukları için adipokin olarak adlandırılan biyolojik aktif maddeler bulunmuştur. Adipokinlerin aktivitelerinin; obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkları ve bunların sekellerini kapsamlı şekilde etkiledikleri kabul edilmektedir. Bu sebeple adipoz doku obeziteye bağlı hastalıkların patogenezinine doğrudan katılmaktadır.

Adipokinler arasında ilk keşfedilen ob geni ile kodlanan, 167 amino asit ihtiva eden, esasen adipositler tarafından üretilen, hipotalamusu etkilemek sureti ile gıda alınımını baskılayan ve enerji harcanmasını artıran leptindir. İnsan ve kemirgenlerde iştah ve ağırlığı düzenleyen, tokluk sinyalini ileten bir rol üstlenir. Leptin geninde (ob/ob), veya leptin reseptör geninde (db/db) mutasyon olan fareler aşırı obezdirler. Leptin kan düzeyleri doğrudan yağ dokusunun miktarıyla orantılıdır ve obezlerde yüksektir. Leptinin immun ve inflamatuvar olaylar üzerine de etkilerinin olduğu gösterilmiştir. İmmun sistemde T lenfositleri apoptozisten korumakta ve T-hücre aktivasyon ve proliferasyonunu düzenlemektedir. Aynı zamanda T lenfositlerin sitokin üretimini de etkilemektedir. Leptin eksikliği nedeniyle T lenfositlerinde sitokin üretimi baskılanmış çocuklara leptin verilmesi ile düzelme sağlanmıştır (83). T lenfositlerin yanı sıra monositlerin de aktivasyon, fagositoz ve sitokin üretimlerini etkilemektedir. Leptin endotelial hücrelerde oksidatif strese ve adezyon moleküllerinin artışına neden olmaktadır.

Bir diğerk önemli adipokin, adiponektindir. 30 kDa ağırlığında 247 amino asit içeren monomerik bir proteindir. Monomerik subüniteler oligomerize olarak trimerleri, bunlarda birbirleri ile birleşerek önce düşük molekül ağırlıklı ve sonra yüksek molekül ağırlıklı polimerleri oluştururlar. Adipositler, adiponektinin en önemli kaynağı olmasına rağmen obezitede leptinden farklı olarak adiponektin düzeyi artmaz. Bu durumun mekanizması tam olarak aydınlatılamamışsa da obezitede yağ dokusunda artmış olan TNF- $\alpha$  düzeylerinin adiponektin düzeyini azalttığı düşünülmektedir. Diğerk yandan adiponektin, TNF- $\alpha$ 'nın üretimini ve aktivitesini azaltmaktadır. Adiponektinin anti-inflamatuvar etkileri arasında IL-6 üretiminin inhibisyonu ve anti-inflamatuvar sitokinlerin -IL-10 ve IL-1 reseptör antagonistleri- indüksiyonu yer almaktadır (85).

Ayrıca adiponektin NF $\kappa$ B'nin inhibisyonunu ve vasküler adezyon moleküllerinin indüksiyonunun azaltılmasını da sağlamaktadır (84). Karaciğerk ve kas dokusu adiponektin reseptörleri içermektedir. Karaciğerkde adiponektin reseptörlerinin aktivasyonu PPAR- $\alpha$  ve AMP ile aktive olan protein kinazı (AMPK) aktive etmektedir. Sonuç olarak adiponektin yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunu artırır ve böylelikle hepatik trigliserid içeriğini ve hepatik insülin rezistansını azaltır. Yapılan çalışmalarda adiponektin; karaciğerkde nekroz ve inflamasyonu azaltarak koruyucu etkiler göstermiştir. NASH, obezite ve tip 2 DM'de adiponektin düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu protektif faktörün eksikliğinde karaciğerk sitokinlerin ve oksidatif stresin olumsuz etkilerine karşı savunmasız kalmaktadır (85-88).

Adipositlerden sekrete edilen yeni bir faktör olarak resistinin keşfi ve insülin duyarlılığı üzerine etkisi, adiposit-obezite-insülin rezistansının

patojenik dizisini açıklamada yeni bir mekanizma olarak önerilmiştir. Ancak resistinin biyolojik etkileri ve düzenlenmesi tartışmalı kalmıştır ve en azından insanlardaki bir insülin rezistans mediatörü olarak sahip olduğu rol kesin değildir (89). Bununla birlikte çalışmalar, insanlarda ateroskleroza da kapsayan inflamatuvar süreçlerde bir role sahip olduğunu gösteren kanıtlar sağlamıştır (90). Resistin 12,5 kDa ağırlığında sisteinden zengin, peptid yapıda resistin benzeri moleküller ailesinin bir üyesidir. Bu aile “found in inflamatuvar zone “ (FIZZ) olarak da bilinir. Resistin (FIZZ-3), başlangıçta farelerde bulunmuştur ve baskın olarak adipositlerde eksprese edildiği görülmüştür (91). Buna karşılık resistinin insanlardaki en önemli kaynağının adipositlerden çok makrofajlar olduğu görülmüştür (92). Obezite ve tip 2 DM’de resistinin arttığına, azaldığına veya değişmediğine dair yayınlar mevcuttur (93-95). Ancak son yayınlarda endotoksin veya proinflamatuvar sitokinlerle makrofajların uyarılması, bu hücreler tarafından resistin üretimini anlamlı olarak arttırmaktadır. Bu nedenle resistinin; insanlarda sepsis ve diğer inflamasyon durumları ile ilişkili insülin rezistansında kritik bir mediatör olarak görev aldığı düşünülmektedir. NASH’li hastalarda kronik ancak sessiz seyreden bir inflamasyon olduğu düşünüldüğünde resistinin bu hastalıkta ne gibi roller üstlendiği tartışmaya açıktır (96).

Visfatin, yakın zamanda Fukuhara ve arkadaşları tarafından izole edilmiş, primer olarak visseral beyaz yağ dokusu tarafından üretilen ve salgılanan bir adipokindir. Visfatinin, önceden lenfositler tarafından eksprese edilen “pre-B-cell colony-enhancing faktor” (PBEF) olarak bilinen sitokin ile özdeş olduğu bulunmuştur. Molekül ağırlığı 52 kDa’dur. Visfatin farelere verildiğinde insülin etkilerine benzer şekilde kan glukozunu düşürür. *In vitro*,



IR'nün ve insülin reseptör substratlarının (IRS-1 ve IRS-2) fosforilasyonunu sağlayarak ve IRS-1 ve IRS-2'ye fosfotidil-inositol-3-kinazın bağlanması ile insülinin etkisini taklit eder. Visfatinin insan embriyonik böbrek-293 hücreleri insülin reseptörlerine bağlanma denge dissosiasyon sabiti insülininki ile benzerdir (97). Görünüşe bakılırsa visfatin insülin reseptörleri ile doğrudan ilişkiye girebilmektedir ancak bu ilişkinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle beraber, etkisini insülinin reseptörüne bağlanma noktasından farklı bir bölgeye bağlanarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. PBEF ekspresyonunun; lipopolisakkarit, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi insülin rezistansını arttıran sitokinlerle düzenlenmesi oldukça ilginçtir (98,99). Visfatin düzeylerindeki artış, akut akciğer inflamasyonu ve sepsis gibi insülin rezistans durumlarıyla birliktelik göstermektedir. Visfatin, endotoksinler tarafından uyarılmış nötrofiller tarafından da salınmakta ve nötrofil apoptozisini inhibe etmektedir (100). Her ne kadar visfatinin, insülinomimetik ve antiapoptotik etkileri arasındaki bağlantılar tam olarak aydınlatılamamışsa da, visfatin, adipoz doku, insülin rezistansı ve inflamasyon arasında kuvvetli bir ilişki olduğu görülmektedir.

### **3.1.6. Klinik Özellikler ve Tanı**

Kronik karaciğer hastalıklarının diğer tiplerinde olduğu gibi NAYKH'lı çoğu hastada asemptomatiktir (14). Hastalık genellikle rutin laboratuvar tahlilleri sırasında hepatik panelde artmış ALT düzeyleri ile teşhis edilir(1). Hepatit C ve diğer kronik karaciğer hastalıkları hariç tutulduğunda NAYKH açıklanamayan persistan ALT düzey artışının en sık nedenidir (101). Hastalarda semptomlar görülse bile bunlar spesifik değildir. Belirsiz sağ üst kadran ağrısı, kırıklık ve yorgunluk en sık karşılaşılan semptomlardır.

Hastalarda nadiren kaşıntı, iştahsızlık ve bulantı şikayetleri bulunabilir. Sarılık, abdominal distansiyon, gastrointestinal kanama ve konfüzyon ilerlemiş karaciğer hastalığını göstergesi olup geç ortaya çıkmaktadır (102,103).

NAYKH'nın belirgin patognomik bir göstergesi de yoktur. Fizik muayenede, obezite hastaların %30-100'ünde gözlenen en sık anormalliktir. Hastaların %75'inde hepatomegali saptanabilir. Ultrasonografi ile hepatomegali prevalansı %95'e kadar yükselebilir. Portal hipertansiyon bulgularına daha az sıklıkta rastlanır. Hastalığın ileri dönemlerinde kas kütlelerinde azalma tespit edilebilirse de genellikle ödem ve aşırı kiloya bağlı olarak değerlendirilemez (1,14,20).

Hafif veya orta düzeyde artmış serum transaminaz düzeyleri en sık, çoğunluklarda tek anormal laboratuvar bulgusudur (18). Hepatik inflamasyon veya fibrozisin histolojik ciddiyeti ile serum transaminaz artışının düzeyi arasında anlamlı bir ilişki yoktur (15, 20). Aspartat transaminaz/ alanin transaminaz (AST/ALT) oranı genellikle <1'dir (1,20). AST/ALT oranında siroz gelişimi ile birlikte artma eğilimi gözlenir ve bu nedenle tanıdaki güvenilirliği azalır (15). Hastaların 1/3'ünde önemsenecek düzeyde serum alkalın fosfataz düzeylerinde artış görülebilir (14). Hiperbilirubinemi, hypoalbuminemi ve uzamış protrombin zamanı genellikle karaciğer yetmezliği tablosu oturduğunda gözlenir bunun dışında genellikle normaldir. Yükselmiş serum lipid profili ve glukoz konsantrasyonu NAYKH'lı hastalarda sık karşılan bir durum olup hastaların %25-75'inde bildirilmiştir (2).

NAYKH'lı hastaların küçük bir yüzdesinde, düşük titrede antinükleer antikor pozitifliği tespit edilebilir (1). NAYKH hastalığının patogenezinde demirin rolü tartışmalıdır. Hastaların yaklaşık %50'sinde transferrin

satürasyonunda ve serum ferritin düzeylerinde yükselme tespit edilmiş çalışmalar mevcuttur (14,15). Ancak artmış demirin NASH'deki fibrozis ile ilişkili olduğu da yine tartışmaya açık bir durumdur.

Primer NAYKH tanısını tam olarak koyabilmek için karaciğer yağlanmasına neden olabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi önemlidir. Hepatit C ve alkolik karaciğer hastalığı yüksek prevalansları nedeniyle önemlidir. Hepatit C, NAYKH'ya benzer histolojik değişikliklere neden olduğundan, NAYKH tanısı konulmadan önce mutlaka serolojik testlerle viral hepatitler tanıdan dışlanmalıdır (20,41). Hastalığın tanısında alkol hikayesi oldukça önemlidir ve mutlaka sorgulanmalıdır. Alkol kullanımında genel kanı, kesin olmamakla beraber 20 g/gün altında alkol kullanımı ile alkolik karaciğer hastalığı gelişmeyeceği yönündedir.

Ultrasonografi, tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi çeşitli noninvazif görüntüleme teknikleri hepatic steatozis tespit edilebilir. Bunlar arasında en ucuz olanı ultrasonografidir. Yaygın yağlı değişimin ultrasonografik bulgusu yaygın hiperekojenitedir (parlak karaciğer). Ucuz, kolay uygulanabilir olmasının yanı sıra nodülleri ve portal hipertansiyonu göstererek siroz tanısını destekleyebilir. Ancak artmış ekojenite hepatic steatozu, fibrozisten ayırt etmede yeterli değildir. Ayrıca ultrasonografik incelemeyi yapan kişinin tecrübesi de önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (104). Tomografide ise düşük dansiteli parenkim görünümü mevcuttur (105). Tomografi ile ultrasonografi karşılaştırıldığında yağlı değişimleri göstermede ultrasonografi daha sensitif bulunmuştur (106). Ancak yağlı değişim yama tarzında yada fokal olduğunda MRG ve tomografi daha üstündür (107). Bu görüntüleme yöntemleri karaciğerin yaygın yağlı

değişimini tanımda yardımcı olsalar da hiçbirisi hepatik inflamasyonu, fibrozisi ya da sirozu tespit etmede yeterince sensitif değildir (108).

Karaciğer biyopsisi NAYKH tanısında, sadece yağlı karaciğer ile steatohepatit ayırımının yapılmasında ve hepatik fibrozun evrenmesinde altın standarttır. Ne yazık ki, ciddi mortalite ve mortalite riski taşıması, invazif bir girişim olması, pahalılığı, henüz NASH'in spesifik farmakolojik tedavisinin olmaması faydalarını sınırlandırmaktadır. Hafif inflamasyon ve orta düzeyde serum transaminaz yükselmesi tanısız olarak anlamlı olmadığı gibi düşük prognostik ve klinik öneme sahiptir. Bu durumda sorulması gereken soru; diagnostik biyopsinin ne zaman açıklayıcı ve patolojist tarafından NASH'i diğer durumlardan rutin olarak ayırt etmede veya hastalığın ciddiyeti hakkında hüküm vermede faydalı olabileceğidir. Toplam 369 hastayı kapsayan çalışmalarda karaciğer hastalığının progresyonunu belgelemede önemli bir belirteç olan fibroze bakılmış ve 45 yaş altındaki NASH'li hastaların sadece %4'ünde bulunmuştur ancak yaşlı hastalarda anlamlı olarak daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Normal ağırlıklı (VKİ<25) 45 yaş altı hastalarda hemen hemen hiç gözlenmemiştir. Bu bulgular ışığında, 40 yaş altı hastaların biyopsilerinin NASH tanısıyla ilgili bilgi vermesinin olası olmadığı sonucuna varılmıştır. Karaciğer biyopsileri, bu nedenle esas olarak 40-45 yaş üstü hastalarda evrelemede ve tedavinin düzenlenmesinde faydalıdır (15,21).

Histolojik olarak NASH üç evreye ayrılır. İnaktif non-progresif formda sadece ufak inflamasyon belirtileri vardır. Subakut veya subfulminan form çok seyrek görülür ve ASH'dan ayırt edilemez. Genelde kilo verme amacıyla yapılan operasyonlardan sonra veya şiddetli perhiz sonrası görülür. Potansiyel olarak öldürücüdür. Kronik yavaş yavaş gelişen form en yaygın görülen form

olup tipik NASH kliniğini bu form verir. Bu üç aşama içerisinde hastalığın ciddiyeti 1 ile 4 arası puan verilerek hesaplanabilir. Bu puanlama NASH'ta görülen histolojik özelliklerin nicelik ve nitelik olarak varlığına dayanır (109).

Karaciğerin histopatolojik incelenmesi etyolojiyi açıklayamamanın yanı sıra invazif bir girişim olması ile de önemli sorunlara neden olmaktadır. Hastaların %1-5'inde; 1/1000 ve 1/10000 arasında mortalite oranı olan önemli komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Hastaların tahminen %30'unda ağrı oluşmaktadır. Hastalığın progresyonunun ve uygulanan tedavinin etkinliğini değerlendirmek için tekrarlayan biyopsiler gerekmekte bu da hastalar tarafından çoğu kez istenmemekte veya reddedilmektedir. Buna ek olarak biyopsi uygulamalarının pahalı olması, tecrübeli patolog ve diğer yardımcı elemanlara gereksinim göstermesi, her zaman ve her ortamda uygulamasında sorunlara neden olmaktadır. Çoğu zaman alınan biyopsiler ile karaciğerin sadece 1/50000'ini değerlendirebilmekte ve özellikle küçük biyopsilerin analizi sırasında örnekleme hatalarına bağlı yanlış değerlendirmeler yapılabilmektedir. Radyolojik görüntüleme yöntemlerinin tanı koyma ve takipteki etkinliği de sınırlı kalmaktadır. Bu nedenlerle karaciğer fibrozunu göstermek için güvenilebilir, basit, non-invazif, tekrarlanabilir, spesifik ve biyopsiye göre nispeten daha ucuz metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Rutin laboratuvar uygulamaları NASH tanısı koymada yetersiz ve non-spesifikler. Ekstraselüler matriks metabolizmasına eşlik eden çeşitli serum ve idrar metabolitleri veya enzimlerin, karaciğer fibrozisini gösterebilecek belirteçler (Tablo-5) olarak kullanılabileceğini ileri süren çalışmalar vardır (110,111).

Sayıları giderek artan bu markerler, biyopsi sonuçları ile kıyaslanmakta, tanı ve tedavinin izlenmesindeki etkinlikleri araştırılmaktadır. Biyopsi ile

karşılaştırıldığında ucuz, kolay ve tekrarlanabilir özellikte olmakla beraber sadece karaciğere spesifik ve histopaloji ile uyumlu bir markerin bulunmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir.

**Tablo-5.** Matriks metabolizmasının belirteçleri \*

<b>Matriks birikim belirteçleri</b>
Prokollajen I C terminal
Prokollajen III N terminal
Tenascin
Doku metalloproteinaz inhibitörü
TGF- $\beta$
<b>Matriks değişim belirteçleri</b>
Prokollajen IV C peptid
Prokollajen IV C peptid
Kollajen IV
Undulin
Metalloproteinaz
Üriner desmozin ve hidrosilizilpiridinolin
<b>Kesin olmayan belirteçler</b>
Hyaluronan
Laminin
YKL-40

\* 112 nolu kaynaktan alınmıştır.

### **3.1.7. Tedavi**

NASH'in seyri hala açık değildir ve patogenezinde henüz aydınlatılamamış noktalar bulunmaktadır. NAYKH, bazı hastalarda selim bir seyir gösterip steatoz yıllarca stabil kalırken bazılarında son dönem karaciğer yetmezliğine ilerleyerek portal hipertansiyon ve karaciğer sirozu ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle tüm tedavi ölçeklerinin amacı hastalığın ilerleyişini durdurmak ve eğer mümkün ise siroz gelişimini önlemektir. Henüz kabul edilmiş ve etkin bir tedavi protokolü olmamakla beraber uygulanan ampirik tedavi yöntemleri hastalığın patogenezinin sorumlu tutulan oksidatif stres, DM, obezite, hiperlipidemi gibi NASH ile ilişkili durumları hedef

almakta veya hepatotoksik farmakolojik ajanlardan kaçınma yolu ile sınırlı kalmaktadır. Bu amaçla NASH tedavisi için klinik çalışmalarda kullanılan çeşitli ilaçlar ve patogeneizde etkin olabilecekleri düşünülen noktalar tablo-6’da verilmiştir.

Uzmanların kontrolünde, yavaş yavaş 10-30 kg kadar kilo verilmesi aşırı kilolu hastalarda karaciğerin yağ içeriğini azaltabilir yada normale döndürebilir. Vücut ağırlığında yaklaşık % 10’luk bir düşüş normalin %30’undan daha fazla kilolu hastalarda laboratuvar parametrelerini düzenlemede kısmen faydalıdır (114).

**Tablo-6.** Klinik çalışmalarda NASH tedavisi için kullanılan ilaçlar\*

- 
- I. İnsülin duyarlılığını arttıran ajanlar
    1. Metformin
    2. Glitazonlar
      - a. Troglitazon
      - b. Rosiglitazon
      - c. Pioglitazon
  - II. Vitaminler
    1. Vitamin E
    2. Vitamin C
  - III. Hepatoprotektif ajanlar
    1. Ursodeoksikolik asid
    2. Betain
    3. Pentoksifilin
  - IV. Anjiotensin II reseptör blokerleri
    1. Losartan
  - V. Antiobezite ilaçları
    1. Orlistat
    2. Sibutramin
  - VI. Lipid düşürücü ilaçlar
    1. Statinler
      - a. Pravastatin
      - b. Atorvastatin
    2. Fibraller
      - a. Klofibrat
      - b. Gemfibrozil
    3. Probukol
    4. Omega-3 yağ asitleri
- 

\* 113 no’lu kaynaktan alınmıştır.

Diğer yandan, kısa sürede hızlı ağırlık kayıpları portal fibrozise ve inflamasyona sebep olduğundan ani kilo kayıplarında kaçınmak gerekmektedir. En etkili tedavi uzun süre uygulanan düşük kalorili diyettir. DM'li, kardiyovasküler hastalıklı veya lipid metabolizma bozukluğu olan hastalara özel dikkat gerekmektedir (115).

Kilo verdirmek için kullanılan ajanlar sibutramin ve orlistattır. Sibutramin noradrenalin ve serotonin geri alınımını inhibe ederek iştahı azaltmaktadır. En önemli yan etkileri ağız kuruluğu, uykusuzluk, asteni ve kalp hızı ve kan basıncında hafif artıştır (116). Orlistat pankreatik lipazı inhibe eder, yağ sindirim ve emilimini azaltırken trigliseridlerin %30 dışıyla atılmasına neden olur. Abdominal şişkinlik ve yumuşak dışkılama en önemli yan etkileridir (117).

Diyabetik NASH hastaları, diyet programına başlamalı ve yeterli antidiyabetik tedavi almalıdır. Metformin glukozun hepatik atılımını glukoneogenezi inhibe ederek ve TNF- $\alpha$  sentezini %40 azaltarak etki göstermektedir. Hayvan deneylerinde, antidiyabetik bir ajan olan metforminin obez ob/ob farelerdeki NASH üzerine pozitif etkilerinin olduğu belirlenmiştir (118). NASH hastalarında sonuçlar henüz yeterli değildir ve laktik asidoz oluşturabilme potansiyeli olduğundan dikkat edilmelidir. Pioglitazon, troglitazon ve rosiglitazon insülin duyarlılığını artırır. PPAR- $\gamma$  aktivasyonu yaparak adipoz dokudan TNF- $\alpha$  ve SYA'ların salınımını azaltırlar. 48 hafta süreyle günde iki kere rosiglitazon uygulanan hastalarda çalışmanın sonunda ALT'de düzelme, insülin sensitivitesinde artış ve tomografik incelemelerde karaciğer yağ muhteviyatında azalma tespit edilmiştir (119,120).



Hipertrigliseridemi NAYKH ile yakın ilişki olduğundan lipid düşürücü ajanlarında tedavi edici etkisi olabileceği düşünülmüştür. Klofibratin ratlarda AKH'da, hepatik trigliserid içeriğini azalttığı bulunmuştur. Ancak NASH hastalarında 2 gr/gün bir yıl süreyle yapılan tedavi sonrası etkisiz olduğu kanıtlanmıştır (121). Gemfibrozilin, klofibrattan farklı olarak serumda sadece trigliseridi değil çok düşük yoğunluklu lipoproteinleri (VLDL) de düşüren, aynı zamanda periferik yağ dokusundan SYA'ların mobilizasyonunu da azaltan, 4 haftanın üzerinde 600 mg/gün dozunda kullanıldığında serum transaminazlarını düzelteren bir ajan olduğu öne sürülmüştür (122).

Ursodeoksikolik asit (UDCA) ve betain glukuronat sitoprotektif ajanlar olarak NASH tedavisinde etkili olabileceği düşünülen ilaçlardır. UDCA'nın; safra asit havuzundan daha fazla hidrofobik ve hepatotoksik safra asidini uzaklaştırdığı ve ek olarak sitoprotektif, immunoprotektif, antiapoptotik özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Toplam 79 NASH'li hastanın bulunduğu dört çalışmada günlük 10-15 mg/kg UDCA düşük yağlı diyet ile kombine edildiğinde hastaların %40'unda AST ve %30'unda gama-glutamil transferaz (GGT) azalmış veya normalleşmiş olduğu gösterilmiştir. Buna ilaveten UDCA karaciğer yağ içeriğini azaltmıştır. UDCA'nın avantajı 11 yıldan uzun süre kullanan primer bilier sirozlu hastalarda hiçbir yan etkiye sebep olmamasıdır (123,124). Betain glukuronat, karaciğerde S-adenozilmetiyonin (SAM) konsantrasyonunu artırarak etkisini göstermektedir. Sekiz NASH hastasında günlük 20 gr dozunda betain kullanıldığında serum transaminazlarında, hepatik yağ içeriğinde, karaciğer inflamatuvar aktivitesinde ve fibrozisinde düzelmeye sağladığı görülmüştür (125).

$\alpha$ -tokoferol (vitamin E) oksidatif stresin patogenezdaki rolü göz önünde bulundurularak tedavideki etkinlikleri araştırılmış bir ajandır. Vitamin E serbest radikalleri yakalar, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8'in ekspresyonunu ve hepatik kollajen kodlayan genin ekspresyonunu baskılar. NASH'li 11 çocuk hastada yapılan çalışmada vitamin E serum transaminaz düzeylerinde düzelme sağlamıştır (126).

Son dönem karaciğer hastalığı gelişen NAYKH'lı hastalarda karaciğer transplantasyonu yapılmalıdır. Ancak bu hastalarda steatozisten steatohepatite hızlı bir progresyon izlenmektedir.

### **3.1.8. Prognoz**

NASH tedavisiz olarak bırakıldığında hastaların %10'unda 5-10 yıl içerisinde fibrozise ve siroza ilerler. Bazı çalışmalar bu durumu %40'a kadar çıkarmışlardır. Bu hastaların yaklaşık %12'si, özellikle diyabetikler 10 yıl içerisinde karaciğer hastalığı komplikasyonlarına bağlı ölürlür. Buna rağmen hastaların büyük bir kısmında NASH bening seyreder ve son döneme kadar ilerlemez.

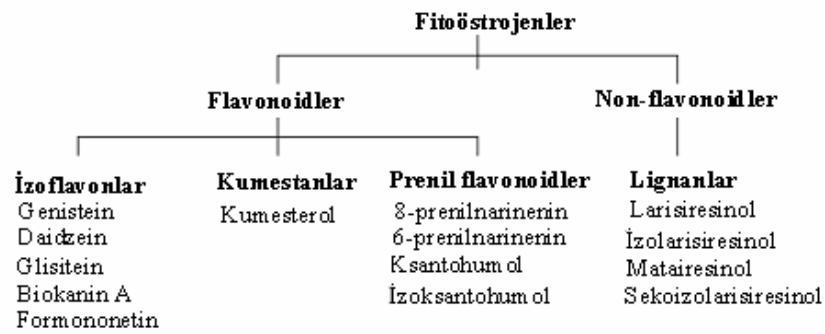
Şunu akılda tutmak gerekir ki NASH kronik hepatit C ile aynı sıklıkta ortaya çıkar ve muhtemelen siroza ilerlemede karşılaştırılabilir riske sahiptir ve hepatit C'den farklı olarak NASH'in etkili bir tedavisi yoktur. NASH hastaları ASH'lılara göre 5 ila 10 yıl daha uzun yaşam süresine sahip olmalarına rağmen normal popülasyonla kıyaslandığında yaşam süreleri kısalmıştır.

NAYKH üzerine çalışan araştırma gruplarının sayısı yakın zamana kadar pek fazla olmadığından istatistiklerin tam ve eksiksiz olduğu düşünülmemelidir. Değişik merkezlerden bildirilen prevalans bilgileri uyumlu olmasa da NASH'in sık görülen bir hastalık olduğu açıktır. Bu nedenle uzun

süre serum transaminaz düzeyleri yüksek seyreden ve yukarıda bahsedilen risk faktörlerini taşıyan hastalarda NASH tanısı mutlaka düşünülmelidir.

### 3.2. GENİSTEİN:

Fitoöstrojenler, insan östradiolüne olan yapısal benzerliklerine bağlı olarak östrojenik ve/veya anti-östrojenik etkilere neden olabilen bitkisel orijinli doğal olarak bulunan kimyasallardır (127). Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması şekil-1’de gösterilmiştir.



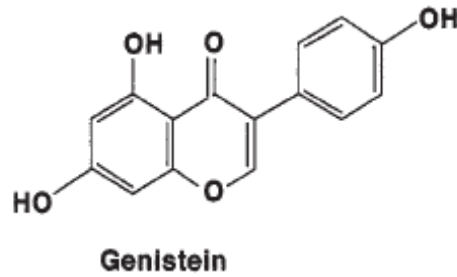
**Şekil-1.** Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması

Fitoöstrojenlerin, meme, bağırsak, prostat ve diğer kanserlerde, alkol suiistimalinde, osteoporozda ve menopozal semptomların düzenlenmesi gibi insanları ilgilendiren önemli sağlık durumlarında koruyucu etkilerinin olabileceğinin gösterildiği çalışmalar giderek artmaktadır (128). Fitoöstrojenlerin etki mekanizmaları tam olarak ortaya konmamakla beraber östrojenik/antiöstrojenik etkiler, antioksidan ve antikarsinojenik aktiviteleri ön plana çıkmaktadır (129).

Fitoöstrojenlerin büyük bir kısmı flavonoidler olarak bilinen fenolik grup içeren bileşiklerden oluşmaktadır. Östrojenik özellikler ihtiva eden çeşitli flavonoid grupları mevcuttur. Bunlardan kumestanlar ve izoflavonlar en fazla östrojenik aktivite gösterenlerdir (130).

İzoflavonlar arasında en önemli olanlar; genistein, daidzein ve glisitein gibi polifenolik fitoöstrojenlerdir. Bitki dünyasında kısıtlı bir dağılım gösteren izoflavonlar özellikle baklagillerde bulunurlar. İzoflavonların diyetteki başlıca kaynakları soya fasulyesi ve soya ürünleridir (131).

Genistein (4',5,7,-trihidroksiizoflavon), anti-oksidan, anti-tümör ve anti-inflamatuvar özellikleri bulunan, izoflavon yapısında bir fitoöstrojendir (132). Şekil-2'de genisteinin yapısı verilmiştir.



**Şekil-2.** Genistein'in (4',5,7,-trihidroksiizoflavon) yapısı.

Genistein, bifenolik yapısından dolayı östrojen reseptörlerine (ÖR) bağlanarak endojen östrojenin etkilerine benzeyen veya etkilerini düzenleyen ÖR agonisti veya antagonisti olarak işlev görebilmektedir. Genistein, ÖR'nin iki alt tipi olan ÖR $\alpha$  ve ÖR $\beta$ 'ya bağlanabilmekle beraber ÖR $\beta$ 'ya 20-30 kat daha güçlü bağlanabilmektedir. Genistein aynı zamanda progesteron, androjen ve oksitosin reseptör ekspresyonunu etkilemektedir (128,131,133).

Göreceli olarak oldukça fazla miktarda soya ihtiva eden yiyecek tüketen Asyalı kadınlar, Amerika'ya yerleşmiş ve batılı beslenme alışkanlıklarını benimsemiş ikinci kuşak Asyalı göçmen kadınlar ile karşılaştırıldığında meme kanseri insidansı oldukça düşük bulunmuştur (134). Diyet ile soya alımı ile azalmış endometriyum kanser insidansı da bildirilmiştir (135). İzoflavonlardan zengin diyetle beslenen ülkelerde, batı ülkelerine göre meme ve endometrial kanserlerinin yanı sıra prostat kanser oranının da düşük olması

izoflavonların östrojenik etkilerinin yanı sıra androjen reseptörleri ile ilişkili hastalıklarda faydalı etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Kompetatif radyoligand bağlanma analizlerinde, fitoöstrojenler androjen reseptörlerine bağlanma göstermişlerdir. Ancak fitoöstrojenlerin anti-androjenik etkilerinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (136).

Her ne kadar genisteinin biyolojik aktivitesi çoğunlukla östrojen reseptörlerine olan kompetatif affinitesi ile ilişkilendirilse de, genistein aynı zamanda apoptozis, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve diğer sinyal yollarıyla etkileşmek gibi biyokimyasal mekanizmalarla, belki de östrojenik aktivitesinden bağımsız olarak kanser riskini azaltmaktadır. Genisteinin, kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı miktarda bulunan bir enzim olan tirozin protein kinazın spesifik bir inhibitörü olduğunun gösterilmesi farklı koruyucu mekanizmaların araştırılmasının yolunu açmıştır (137). Yapılan çeşitli çalışmalarda genisteinin, Mitojen aktive eden kinaz (MAPK) (138), ribozomal S6 kinaz (139), DNA topoizomeraz I ve II (140) gibi sinyal iletiminde görevli, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda etkili çeşitli enzimlerin inhibitörü olduğu gösterilmiştir.

Genistein serbest radikallerin temizlenmesinde görev almakta ve böylelikle DNA hasarına karşı hücreyi korumaktadır (141). Katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri stimüle etmektedir (142). Sierens ve arkadaşları Comet metodu ile genisteinin fizyolojik konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde hidrojen perokside bağlı DNA hasarına karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Dahası bu koruyucu özelliğinin 17 $\beta$ -östradiol, tamoksifen ve antioksidan vitaminler olarak bilinen askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferolden daha yüksek bulunmuştur (143). *In vitro*

çalışmalarda genistein ve daidzeinin damar subendotelinde vitamin E'ye benzer şekilde düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) oksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (144).

Flavonoidlerin anti-inflamatuvar, anti-aterosklerotik ve anti-allerjik aktiviter gösterdiği bilinmektedir. Bir transkripsiyon faktörü olan NFκ-B; sitokinler, hücre yüzey reseptörleri, adhezyon molekülleri ve akut faz proteinleri gibi genellikle inflamasyonla ilişkili çeşitli düzenlenebilir genlerin ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli inflamatuvar ya da çevresel nedenlere bağlı aktif NFκ-B oluşununun stimülasyonu ile bu aktif form nükleusa hareket eder ve hedef genleri aktive eder. Genistein gibi bazı izoflavonlarında, NFκ-B'nin bu hareketini inhibe eden etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte inhibisyonun hangi mekanizma ile gerçekleştirildiği tam olarak anlaşılamamıştır. Overektomize edilmiş fareler aterojenik diyet ile beslendiğinde NFκ-B ve aterosklerotik gelişiminin önemli komponentleri olan çeşitli inflamatuvar genlerin düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu farelere subkutanöz veya gavaj ile 17-etinilstradiol verilmesi inflamatuvar gen ekspresyonunda ve R bağımlı genlerin ekspresyonunda azalma ile sonuçlanmıştır. Yine genistein uygulandığında da inflamatuvar genlerin indüksiyonu inhibe olmuş ancak R bağımlı genlerin ekspresyonu etkilenmemiştir (145,146).

Farklı alışmalar kronik inflamasyon ile kanser oluşumu arasında bağlantı kurmuş ve çeşitli kanser türlerinin gelişim ve ilerleyişine TNF-α'nın katıldığını ileri sürmüşlerdir. İnflamatuvar hücreler tarafından üretilmesinin yanı sıra, TNF-α malign hücreler tarafından da üretilmekte ve ekspresyonu tümör progresyonu ile korelasyon göstermektedir (147,148). TNF-α'nın

ovaryan kanserlerde otokrin ve parakrin büyüme faktörü olarak fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (149). Meme kanserinde de yüksek TNF- $\alpha$  düzeyleri tümör büyümesi ile pozitif olarak korele ve tümör derecesi ve nodül kapsamı ile ilişkilidir (150). TNF- $\alpha$ , kollagenaz gibi tümör yayılımında etkili enzimleri artırmaktadır (151). Monosit kültürü kullanılan *in vitro* çalışmalarda ve tam kan kültürleri kullanılan çalışmalarda 17-östradiol, daidzein ve genistein, lipopolisakkarit nedenli TNF- $\alpha$  salınımını benzer konsantrasyon-cevap kinetikleri ile etkilemektedir. 17-östradiol ve genistein tarafından oluşturulan benzer konsantrasyon ve TNF- $\alpha$  cevabı arasındaki ilişki, TNF- $\alpha$  üretiminin inhibisyonunda genisteinin östrojenik etkisini ileri sürmektedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda IL-1 ve IL-6 üretiminde de izoflavonların benzer inhibitör etkileri gösterilmiştir (152,153).

Soy izoflavonlar, yapısal olarak östrojenlere benzemektedir, ÖR ile etkileşirler ve serum kolesterol konsantrasyonlarını benzer mekanizmalarla düşürebilirler. Anthony ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada izoflavondan zengin soy protein diyeti ile beslenen maymunların izoflavondan fakir diyetle beslenen maymunlara göre anlamlı olarak daha iyi serum lipid değerlerine (düşük total kolesterol ve yüksek HDL kolesterol konsantrasyonu) sahip olduğunu göstermiştir (154). Soya alımının kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak, diğer kardiyak yararları da tanımlanmıştır. Damar hücre kültürleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda genisteinin, hücre adhezyonunu inhibe ederek, büyüme faktör aktivitesini değiştirerek ve hücre proliferasyonunu inhibe ederek aterosklerotik lezyon gelişimini engellediği gösterilmiştir (155).

Genisteinin, karaciğer ve yağ dokusunda lipid metabolizmasına direk etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Genistein, hepatositlerde glukozun lipidlere dönüşümünü azaltmakta ve ortama serbest yağ asitlerinin salınımını arttırmaktadır. Bu değişim hepatik triaçilgliserol içeriğinin azalması ile birliktelik göstermektedir. Ayrıca genisteinin overektomi yapılmış ratların karaciğerindeki yüksek afiniteli insülin reseptör sayısında azalma yaptığı da kaydedilmiştir (156,157). Adipositlerde, insülin varlığında veya yokluğunda glukozun total lipidlere dönüşümünü inhibe etmektedir. Bazal ve epinefrine bağlı lipolizi uyarmakta ve insülinin stimüle ettiği glukoz oksidasyonunu doza bağlı olarak inhibe etmektedir. Bu yüzden genisteinin karaciğer ve yağ dokusunda hem lipogenez hem de lipolizi etkileyerek lipid metabolizması üzerinde direk etkilerinin olduğu görülmektedir (158).

Genistein tavşanlarda intestinal glukoz alınımını doza bağlı olarak inhibe etmekte aynı zamanda LDL'yi insülinin neden olduğu oksidasyona karşı korumaktadır. İntestinal sodyum bağımlı glukoz taşıyıcı-1 (SGLUT-1) ve glukoz taşıyıcı-2 deneysel diyabetlilerde artmıştır. Bunun postprandial hiperglisemide etkili olabileceği düşünülmektedir. Genisteinin glukoz taşıyıcı-1'in (GLUT-1) potent bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (159).

Genistein verilmesi db/db farelerin karaciğerinde, glukokinaz aktivitesini stimüle ve glukoz 6 fosfataz aktivitesini inhibe ederek kan glukoz konsantrasyonunu düzenlemektedir. Karaciğer fosfoenolpiruvat karboksikinaz enzimini de normalleştirmiştir. Bu nedenle izoflavonların hepatik glukoneogenezi değiştirerek glukoz homeostazisini etkileyebileceği düşünülmektedir. Genistein tip 2 DM'li farelerde plazma SYA'larını düşürmede oldukça etkili olduğu, genistein verilen tip 2 DM'li farelerde  $\beta$ -



oksidasyonun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (160). Deneysel çalışmalar pankreatik  $\beta$  hücrelerden insülin salınımının düzenlenmesinde protein tirozin kinazların rol oynadığını ileri sürmektedir. Genisteini protein tirozin kinaz inhibitörü olarak kullanan çeşitli *in vitro* çalışmalar, pankreatik ada hücrelerinden insülin salınmasında birçok etkiye sahip olduğunu göstermektedir (161,162). Genisteinin Langerhans adacık hücrelerinde bazal insülin sekresyonunu arttırmakta ancak bu dozda uygulanan genistein aynı zamanda adacık hücre proliferasyonunu azaltmaktadır. Ayrıca, genisteinin adacık tirozin kinaz aktivitesi ile glukoz ve sülfonilürelerin stimüle ettiği insülin salınımını, glukoz metabolizmasını etkilemeden inhibe ettiği gösterilmiştir (163).

Bütün bu veriler ışığında kompleks mekanizmalar ve farklı etiyolojik nedenlere bağlı olarak gelişen NASH patogenezinde insülin rezistansı ve adipokin düzeyleri ile sitokinlerinde etkili olduğu ve inflamasyon sürecinin önemli rol oynadığı görülmektedir.

Biz bu çalışmada; antioksidan, anti-tümör ve anti-inflamatuvar özellikleri bulunan, bir isoflavon olan genisteinin, NASH patogenezindeki mekanizmalara yönelik etkilerini ve abdominal yağ dokusunda bol miktarda bulunan, insülinomimetik etkisi ile son zamanlarda ön plana çıkan yeni bir adipokin olan Visfatin düzeyleri üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 4.1. Hayvanlar ve Deneysel Çalışmanın Düzenlenmesi

F.Ü. Deneysel Hayvanlar Çalışmaları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra (Tarih: 08.06.2006, Toplantı: 8, Karar No: 1) çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Bu çalışmada ağırlıkları ortalama 200 gram olan sekiz haftalık 50 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi ve bakımları aynı merkezde yapıldı. Deneysel öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 22-24 °C sabit ısıdaki odalarda barındırıldı. Hayvanların beslenmesinde, Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen 8 mm'lik standart pellet yemi (Tablo-7) ve çeşme suyu kullanıldı. NASH ve fibrogenezisin oluşumu için ise Lieber ve arkadaşlarının çalışmalarında tarif ettikleri şekilde yağdan zengin diyet (YZD) kullanıldı (Tablo-8) (164).

Ratlar herbir grupta 10 rat olmak üzere beş gruba randomize olarak bölündü. Ratlara çalışma süresince standart rat diyeti (Grup 1: kontrol grubu ve Grup 2: kontrol + genistein uygulanacak grup) ve YZD (Grup 3: NASH oluşturulacak grup, Grup 4: NASH oluşumu sırasında genistein uygulanacak grup ve Grup 5 NASH oluştuktan sonra genistein uygulanacak grup) ad libitum olarak verildi.

Tüm deney süresince ratların gıda alımı ve kiloları haftalık olarak ölçülüp kaydedildi. Deneysel sonunda (Grup 1,2,3,4 deney başlangıcından altı hafta, Grup 5 deney başlangıcından 12 hafta sonra) tüm ratlar hafif pentobarbital anestezisi altında dekapite edildi ve çalışmanın sonuçlarının inceleneceği parametreler için uygun kan ve doku örnekleri hazırlandı

**Tablo-7.** Standart pellet yemin bileşimi.

<b>Yem Bileşimi</b>	
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl’de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	%1.25

\* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

\*\* Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D<sub>3</sub> (1000 IU/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vit. B<sub>2</sub> (4 mg/kg).

**Tablo 8:** Yağdan zengin diyetin içeriği\*

<b>İçerik</b>	<b>Yağdan zengin diyet (gram/litre)</b>
Kazein	41.4
L-sistein	0.5
DL-metiyonin	0.3
Mısır yağı	48.5
Zeytin yağı	28.4
Ay çiçek yağı	2.7
Dekstrin-maltoz	25.6
Kolin bitartarat	0.53
Fiber	10.0
Xantan gum	3.0

\* 164 no’lu kaynaktan alınmıştır. Diyete ayrıca vitamin karması eklenmiştir.

## **4.2. Tedavi Protokolleri**

Kontrol gruplarından birine (Grup1) ve YZD ile NASH oluşturulmuş gruplardan birine (Grup 3) tedavi uygulanmadı ancak diğer gruplara uygulanan tedavi protokülüne benzer şekilde uygun doz ve yolla DMSO (%1.25) ve PEG-400 (%98.75) uygulaması yapıldı. Grup 4'teki ratlara, YZD diyeti ile eşzamanlı olarak genistein uygulamasına başlanarak koruyucu rolü araştırıldı, Grup 5'teki ratlara ise NASH gelişim süresini takiben altı hafta süreyle genistein tedavisi verilerek tedavi edici etkileri araştırıldı. Kontrol gruplarından diğerine (Grup 2) ise Grup 4 ile aynı zamanda genistein uygulaması yapıldı.

## **4.3. Genistein Dozu, Hazırlanışı ve Uygulanma Şekli**

Genistein (Bonistein, DSM, Switzerland) 100 mikrolitre DMSO (%1.25) ve PEG-400 (%98.75) karışımında çözülerek hazırlandı (165) ve günde bir kez (haftanın yedi günü), 0.2 mg/kg/gün dozunda, subkutanöz yoldan altı hafta süreyle verildi.

## **4.4. Laboratuvar ve Histopatolojik Analizler**

### **4.4.1. Biyokimyasal İncelemeler**

Biyokimyasal incelemeler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı. Biyokimyasal analizler için kan örnekleri düz biyokimya tüplerine alındı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) edilerek serumları elde edildi. Elde edilen serumlar küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu ve bekletilmeden -20 °C'de donduruldu ve çalışma gününe kadar uygun süre saklandı.

Örnekler çözdürüldükten sonra serum glukoz, AST, ALT, ALP, GGT, total kolesterol, HDL, LDL ve trigliserit düzeyleri düzeyleri Olympus AU 600

(Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo-Japan) otoanalizöründe Olympus marka ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. VLDL-Kolesterol düzeyleri ise yine aynı otoanalizörde hesaplama ile elde edildi.

Serum TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1, insülin ve visfatin düzeyleri enzyime-linked immunosorbent assay (ELISA) rat kitleri kullanılarak ölçüldü. Yıkama işlemlerinde otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 yıkama cihazı kullanıldı. Absorbanslar, kit kullanım kılavuzunda belirtilen uygun dalga boyları kullanılarak ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak elde edildi.

Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri, rat TNF- $\alpha$  ELISA kiti (Biosource, katalog no: KRC3011, California, USA) kullanılarak ve kit kullanım klavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı, 1:2 dilüsyon nedeniyle sonuçlar iki ile çarpıldı ve pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: <4 pg/ml, ölçüm aralığı: 15.6-1000 pg/ml, intra-assay Coefficient of variation (CV): < %3 ve inter- assay CV değeri: < %5'di.

Serum IL-6 düzeyleri, rat IL-6 ELISA kiti (Biosource, katalog no: KRC0061, California, USA) kullanılarak ve kit kullanım klavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı, 1:2 dilüsyon nedeniyle sonuçlar iki ile çarpıldı ve pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: <8 pg/ml, ölçüm aralığı: 31.2-2000 pg/ml, intra-assay CV: < %5 ve inter- assay CV değeri: < %10'du.

Serum TGF- $\beta$ 1 düzeyleri, rat TGF- $\beta$ 1 ELISA kiti (Biosource, katalog no: KAC1688, California, USA) kullanılarak ve kit kullanım klavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı, 1:40 dilüsyon nedeniyle sonuçlar 40 ile çarpıldı ve pg/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: <15.6 pg/ml,

ölçüm aralığı: 31.2-2000 pg/ml, intra-assay CV: <%5.5 ve inter- assay CV değeri: <%7.5'di.

Serum insülin düzeyleri, rat insülin ELISA kiti (Linco research, katalog no: EZRMI-13K, Missouri, USA) kullanılarak ve kit kullanım klavuzuna uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm'de alındı ve sonuçlar ng/ml olarak elde edildi. Kit sensitivitesi: <0,2 ng/ml, ölçüm aralığı: 0.2-100 ng/ml, intra-assay CV: < %5 ve inter- assay CV değeri: < %7.5'di.

Serum visfatin düzeyleri, human visfatin ELISA kiti (AdipoGen, katalog no: V05323EK, Seoul, Korea) kullanılarak ve kit kullanım klavuzuna uygun olarak çalışıldı. Human visfatin ELISA kiti rat visfatini ile %100 cross reaktiviteye sahipti. Absorbanslar 450 nm'de alındı, 1:2 dilüsyon nedeniyle sonuçlar 2 ile çarpıldı ve ng/ml olarak verildi. Kit sensitivitesi: <30 pg/ml, ölçüm aralığı: 0.06-32 ng/ml, intra-assay CV: <%5.5 ve inter- assay CV değeri: < %10'du.

#### **4.4.2. HOMA İndeksi**

İnsülin rezistansının belirlenmesinde altın standart insülinin intravenöz olarak sabit bir hızda infüze edildiği ve kan glukozunun sık aralıklarla ölçüldüğü öglisemik klemp tekniğidir. Ancak bu yöntem invaziv bir girişim olup uygulanması zordur. Bu nedenden dolayı Matthews ve arkadaşları tarafından IR belirlenmesinde daha kolay bir yöntem olan ve taramalarda sıklıkla kullanılabilen HOMA-IR formülü geliştirilmiştir (166). Buna göre:

HOMA-IR = Açlık serum insülin düzeyi ( $\mu$ U/ml) x Açlık serum glukoz düzeyi (mmol/l) / 22.5

İnsülin rezistansının tespitinde kullanılan HOMA-IR için açlık serum insülin düzeyleri 24.15 sabiti ile çarpılarak ng/ml'den  $\mu$ U/ml'ye ve açlık serum glukoz düzeyleri 0.055 sabiti ile çarpılarak mg/dl'den mmol/ml'ye çevrilmiştir.

#### **4.4.3. Histopatolojik İnceleme**

Histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri derhal %0,9'luk NaCl ile yıkanarak kandan temizlenmeleri sağlandı ardından bekletilmeden %10'luk formaldehit içerisinde muhafaza edildi. Karaciğer kesitleri konvansiyonel histopatolojik inceleme öncesi parafin içerisinde fikse edildi, beş mikrometre kalınlığında kesitler alındı ve hemotoksilen eozin boyası ile boyandıktan sonra uzman bir patoloğ tarafından Olympus BX-50 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Her bir karaciğer doku örneğinden 10 farklı alan, x10, x40, x100 ve x200 büyütme ile incelendi ve her bir alanda 500 hücre sayıldı. Steatoz karaciğer hücrelerinin yağ içeriğinin normal karaciğer hücrelerinininkine oranlanmasına dayanan aşağıdaki şekilde %33'in altında 1, %33-66 aralığında 2, %66 üzerinde 3 olarak değerlendirilmiştir. Nekroz  $\text{mm}^2$ 'deki odak sayısı ve inflamasyon  $\text{mm}^2$ 'deki inflamatuvar hücre sayısı ile tayin edilmiştir. Fibrozis, karaciğer dokusuna fibroz alanların oranlanmasıyla değerlendirilmiştir (167).

#### **4.5. İstatistiksel Değerlendirme**

Grumlardan elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Parametreler değerlendirilirken grumlardan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Mann Whitney-U testi, Korelasyon–regresyon analizleri ve Ki-kare testleri kullanıldı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Bazal ve haftalık ağırlık ölçümleri

Gruplar arasında rat ağırlıkları arasındaki ilişki tablo 9’da verilmiştir.

**Tablo-9:** Gruplara ait rat ağırlıkları

Gruplar	Ağırlıklar Bazal Değerler	Ağırlıklar Son Değerler	Ağırlıklar Arası Fark	P
Grup 1 (Kontrol)	213.80±24.37	213.80±24.37	94.31±15.49	<0.001
Grup 2 (Kontrol+G)	194.01±21.69	194.01±21.69	99.51±12.89	<0.05
Grup 3 (YZD)	225.4±15.30	225.4±15.30	59.35±31.72	<0.05
Grup 4 (YZD+	209.87±18.36	209.87±18.36	67.11±27.78	<0.01
Grup 5 (NASH+G)	211.37±29.07	211.37±29.07	119.81±31.07	<0.001
P	P>0.05	P<0.05 grup 1-3 P<0.01 grup 3-5 P<0.05 grup 4-5	P<0.05 grup 2-3 P<0.01 grup 4-5 P<0.001 grup 3-5	

Çalışma gruplarında rat ağırlıkları değerlendirildiğinde; bazal değerler açısından bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenirken, çalışma sonrasında gruplar arasında ağırlık açısından anlamlı farklılıklar olduğu gözlemlendi (Tablo 9).



## 5.2. Biyokimyasal Ölçümler

### 5.2.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri, Lipid profili, Açlık Kan Glukozu ve İnsülin Düzeyleri

Serum açlık glukoz düzeyleri grup 3'te ( $196.01 \pm 17.54$  mg/dl) Grup 1 ( $119.8 \pm 9.89$  mg/dl) ve Grup2 'ye ( $127.6 \pm 11.73$  mg/dl) göre ( $p < 0.001$ ) ve Grup 4 ( $149.2 \pm 6.45$  mg/dl) ve Grup 5'e ( $153.12 \pm 10.53$  mg/dl) göre ( $p < 0.01$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo-7).

Serum AST düzeyleri grup 3'te ( $80.21 \pm 10.32$  U/L) Grup 1 ( $46.4 \pm 6.32$  U/L) ve Grup2 'ye ( $52.6 \pm 6.07$  U/L) göre ve Grup 4 ( $60.51 \pm 4.75$  U/L) ve Grup 5'e ( $57.25 \pm 9.89$  U/L) göre anlamlı olarak ( $p < 0.01$ ) yüksek bulundu. Grup 1'de Grup 4'e göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) düşük tespit edildi (Tablo-7).

Serum ALT düzeyleri grup 3'te ( $266.21 \pm 37.45$  U/L) Grup 1 ( $184.8 \pm 21.9$  U/L) ve Grup2 'ye ( $212.3 \pm 15.59$  U/L) göre ( $p < 0.001$ ) ve Grup 4'e ( $202.62 \pm 34.1$  U/L) göre anlamlı olarak ( $p < 0.01$ ) yüksek bulundu. Grup 5'te ( $224.2 \pm 26.8$  U/L), Grup 3'e ve Grup 1'de Grup 4'e göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) düşük tespit edildi (Tablo-7).

Serum alkalin fosfataz (ALP) düzeyleri grup 3'te ( $285.2 \pm 55.9$  U/L) Grup 1 ( $177.4 \pm 13.62$  U/L) ve Grup 4'e ( $173.1 \pm 12.98$  U/L) göre ( $p < 0.001$ ) ve Grup2 'ye ( $207.8 \pm 37.08$  U/L) göre ( $p < 0.01$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup 5'de ( $247.1 \pm 37.5$  U/L), Grup 1 ve Grup 2'ye göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) yüksek tespit edildi (Tablo-7).

Serum GGT düzeyleri grup 5'te ( $2.5 \pm 1.41$  U/L) Grup 3 ( $4.1 \pm 1.2$  U/L) ve Grup 4'e ( $3.75 \pm 1.16$  U/L) göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) düşük tespit edildi (Tablo-7).

Serum kolesterol düzeyleri Grup 3'te ( $70.4 \pm 2.88$ ) Grup 1 ( $55.52 \pm 3.95$ ) Grup 2 ( $54.8 \pm 3.48$ ) ve Grup 4'e ( $61.2 \pm 5.15$ ) göre ( $p < 0.001$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup 5'de ( $62.3 \pm 4.65$ ), Grup 1 ve Grup 2'ye göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) yüksek ve Grup 3'e göre ( $p < 0.05$ ) anlamlı olarak düşük tespit edildi (Tablo-7).

Serum trigliserid düzeyleri Grup 3'te ( $126.2 \pm 5.96$  mg/dl) Grup 1 ( $67.9 \pm 13.74$  mg/dl) ve Grup 2'ye ( $80.5 \pm 22.7$  mg/dl) göre ( $p < 0.001$ ) ve Grup 4'e ( $80.5 \pm 22.7$  mg/dl) göre ( $p < 0.01$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup 5'de ( $95.1 \pm 11.2$  mg/dl), Grup 1 ve Grup 2'ye göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) yüksek tespit edildi (Tablo-7).

Serum yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol düzeyleri grup 3'te ( $28.2 \pm 4.81$  mg/dl) Grup 1'e ( $36.1 \pm 7.4$  mg/dl) göre anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) düşük tespit edildi (Tablo-7).

Serum VLDL kolesterol düzeyleri Grup 3 ( $23.4 \pm 2.31$  mg/dl) ve Grup 5'te ( $22.75 \pm 4.33$  mg/dl) ve Grup 1 ( $14.6 \pm 4.01$  mg/dl) Grup 2 ( $15.3 \pm 3.12$  mg/dl) Grup 4'e ( $16.2 \pm 3.28$  mg/dl) göre ( $p < 0.05$ ) anlamlı olarak yüksek tespit edildi (Tablo-7).

Serum LDL kolesterol düzeyleri grup 3'te ( $19.6 \pm 1.34$  mg/dl) Grup 1 ( $15.77 \pm 4.02$  mg/dl) ve Grup 5'e ( $15.6 \pm 2.82$  mg/dl) göre ( $p < 0.05$ ) anlamlı olarak yüksek tespit edildi (Tablo-7).

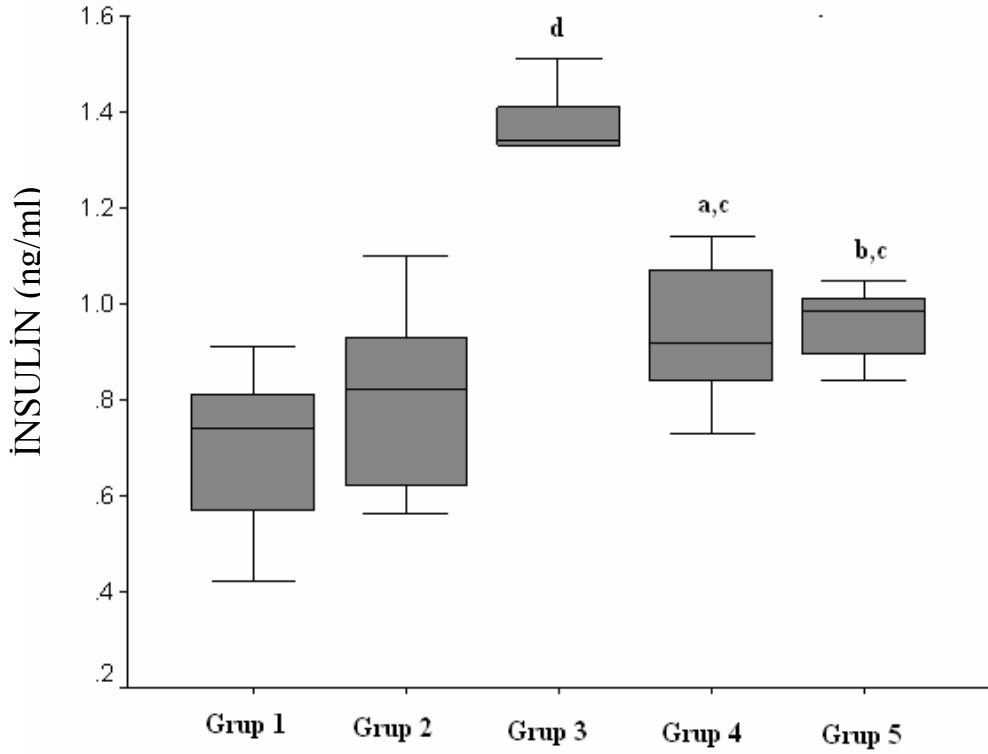
HOMA-IR indeksi Grup 3'te ( $15.38 \pm 2.96$ ), Grup 1 ( $4.99 \pm 1.41$ ) Grup 2 ( $6.05 \pm 1.72$ ) Grup 4 ( $8.28 \pm 1.36$ ) ve Grup 5'e ( $8.38 \pm 1.41$ ) göre ( $p < 0.001$ ) ve Grup 1'de, Grup 4 ve Grup 5'e göre ( $p < 0.01$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo-7).

**Tablo-10.** Gruplara ait glukoz, AST, ALT, ALP, GGT, kolesterol, trigliserid, HDL, VLDL, LDL kolesterol, insülin ve HOMA indeksi düzeyleri

	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Kontrol+G)	Grup 3 (YZD)	Grup 4 (YZD+G)	Grup 5 (NASH+G)	P
Glukoz (mg/dL)	119.8±9.89	127.6±11.73	196.01±17.54 <sup>a</sup>	149.2±6.45 <sup>b</sup>	153.12±10.53 <sup>b</sup>	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,2 <sup>b</sup> p<0.01 grup 1-4,5, <sup>b</sup> p<0.01 grup 3-4,5
AST (U/L)	46.4±6.32 <sup>c</sup>	52.6±6.07	80.21±10.32 <sup>a</sup>	60.51±4.75 <sup>b</sup>	57.25±9.89 <sup>b</sup>	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,2 <sup>b</sup> p<0.01 grup 3-4,5 <sup>c</sup> p<0.05 grup 1-4
ALT (U/L)	184.8±21.9 <sup>c</sup>	212.3±15.59	266.21±37.45 <sup>a</sup>	202.62±34.1 <sup>b</sup>	224.2±26.8 <sup>c</sup>	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,2 <sup>b</sup> p<0.01 grup 3-4 <sup>c</sup> p<0.05 grup 1-4 <sup>c</sup> p<0.05 grup 3-5
ALP (U/L)	177.4±13.62	207.8±37.08 <sup>b</sup>	285.2±55.9 <sup>a</sup>	173.1±12.98	247.1±37.5 <sup>c</sup>	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,4 <sup>b</sup> p<0.01 grup 3-2 <sup>c</sup> p<0.05 grup 5-1,2
GGT (U/L)	3.1±1.19	2.9±1.19	4.1±1.2	3.75±1.16	2.5±1.41 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> p<0.05 grup 5-3,4
T.Kolesterol (mg/dL)	55.52±3.95	54.8±3.48	70.4±2.88 <sup>a</sup>	61.2±5.15	62.3±4.65 <sup>b</sup>	<sup>a</sup> P<0.01 grup 3-1,2,4 <sup>b</sup> p<0.05 grup 5-1,2,3
Trigliserit (mg/dL)	67.9±13.74	76.2±14.81	126.2±5.96	80.5±22.7	95.1±11.2	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,4 <sup>b</sup> p<0.01 grup 3-2 <sup>c</sup> p<0.05 grup 5-1,2
HDL.Kolesterol (mg/dL)	36.1±7.4	33.4±4.99	28.2±4.81 <sup>a</sup>	31.5±7.61	32.87±4.38	<sup>a</sup> p<0.05 grup 3-1
VLDL Kolesterol (mg/dL)	14.6±4.01	15.3±3.12	23.4±2.31 <sup>a</sup>	17.87±7.14	22.75±4.33 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> p<0.05 grup 3-1,2,4 <sup>a</sup> p<0.05 grup 5-1,2,4
LDL Kolesterol (mg/dL)	15.77±4.02	17.4±2.67	19.6±1.34 <sup>a</sup>	16.2±3.28	15.6±2.82	<sup>a</sup> p<0.05 grup 3-1,5
İnsulin (ng/mL)	0.71±0.21	0.82±0.23	1.33±0.15 <sup>a</sup>	0.95±0.14 <sup>b</sup>	0.93±0.13 <sup>b</sup>	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,2 <sup>b</sup> p<0.01 grup 3-4,5
HOMA indeks	4.99±1.41 <sup>b</sup>	6.05±1.72	15.38±2.96 <sup>a</sup>	8.28±1.36	8.38±1.41	<sup>a</sup> p<0.001 grup 3-1,2,4,5 <sup>b</sup> p<0.01 grup 1-4,5

### 5.2.2. Serum İnsülin Düzeyleri

Serum insülin düzeyleri Grup 3'te ( $1.33 \pm 0.15$  ng/ml) Grup 1 ( $0.71 \pm 0.21$  ng/ml) ve Grup 2'ye ( $0.82 \pm 0.23$  ng/ml) göre ( $p < 0.001$ ) ve Grup 3'te, Grup 4'e ( $0.95 \pm 0.14$  ng/ml) ve Grup 5'e ( $0.93 \pm 0.13$  ng/ml) göre ( $p < 0.01$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu. Serum insülin düzeyleri Grup 1'de, Grup 4 ( $p < 0.05$ ) ve Grup 5'e ( $p < 0.01$ ) göre anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil-3).



Şekil-3. Gruplara ait serum insülin düzeyleri.

<sup>a</sup> $p < 0.05$ , Grup 1 ile karşılaştırıldığında

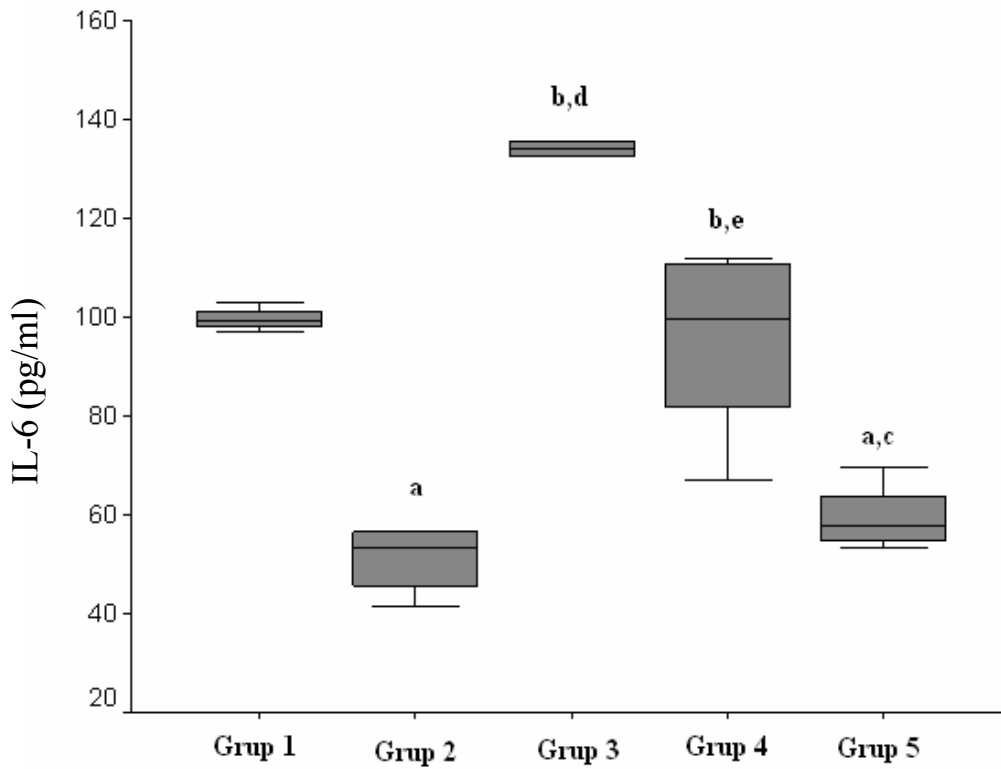
<sup>b</sup> $p < 0.01$ , Grup 1 ile karşılaştırıldığında

<sup>c</sup> $p < 0.01$ , Grup 3 ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup> $p < 0.001$ , Grup 1 ve 2 ile karşılaştırıldığında

### 5.2.3. Serum IL-6 Düzeyleri

Serum IL-6 düzeyleri Grup 1'de ( $100.86 \pm 4.81$  pg/ml) Grup 2 ( $55.92 \pm 12.82$  pg/ml) ve Grup 5'e ( $59.45 \pm 5.13$  pg/ml) göre ve Grup 4'te ( $95.33 \pm 18.72$  pg/ml) Grup 5'e göre anlamlı olarak yüksek Grup 2'de ise Grup 3 ( $129.02 \pm 16.08$  pg/ml) ve Grup 4'e göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0.001$ ). Grup 3, Grup 1, Grup 5 ( $p < 0.01$ ) ve Grup 4 ( $p < 0.05$ ) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil-4).



Şekil-4. Gruplara ait serum IL-6 düzeyleri.

<sup>a</sup> $p < 0.001$ , Grup 1 ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> $p < 0.001$ , Grup 2 ile karşılaştırıldığında

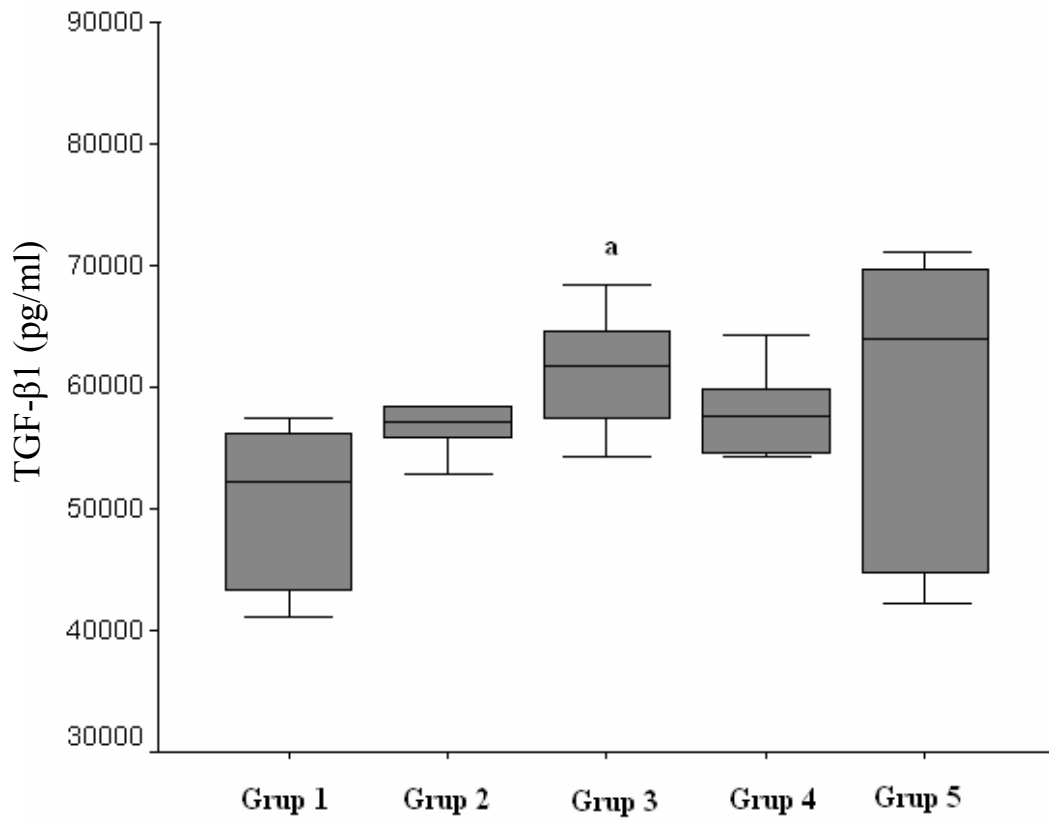
<sup>c</sup> $p < 0.001$ , Grup 4 ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup> $p < 0.01$ , Grup 1 ve 5 ile karşılaştırıldığında

<sup>e</sup> $p < 0.05$ , Grup 3 ile karşılaştırıldığında

#### 5.2.4. Serum TGF-β1 Düzeyleri

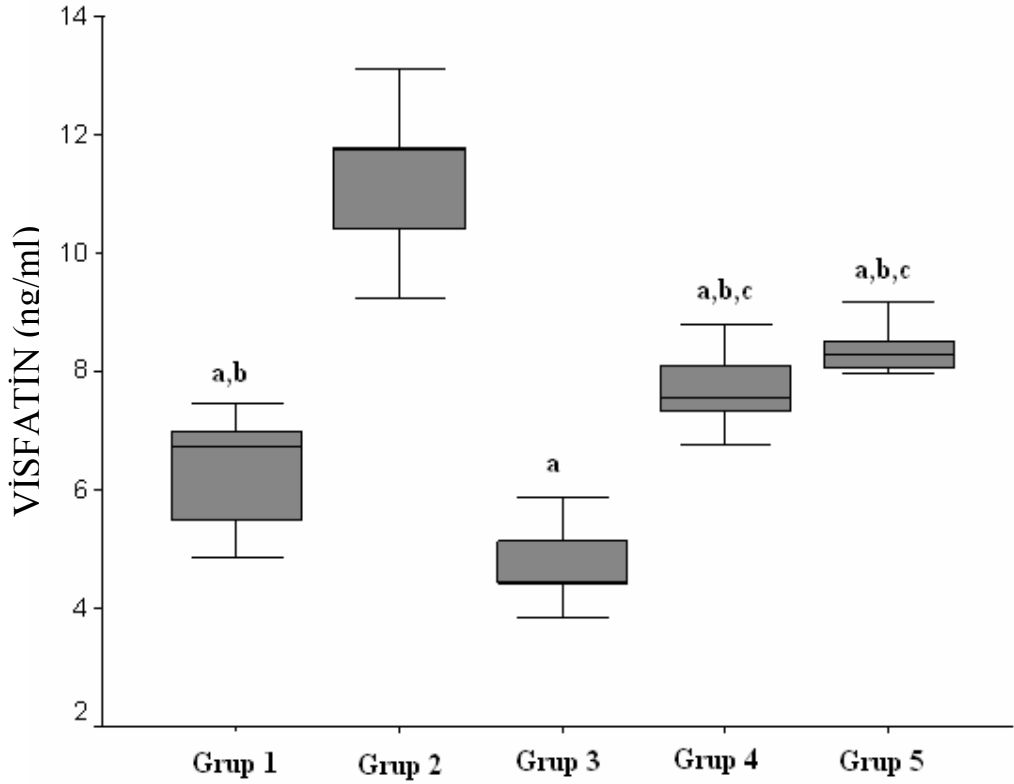
Serum TGF-β1 düzeyleri Grup 1 (52577±10579 pg/ml) ile Grup 3 (61337±5608 pg/ml) karşılaştırıldığında Grup 1’de anlamlı olarak yüksek tespit edildi ( $p<0.05$ ). Serum TGF-β1 düzeyleri bakımından diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ) (Şekil-5).



**Şekil-5.** Gruplara ait serum TGF-β1 düzeyleri.  
<sup>a</sup>  $p<0.05$ , Grup1 ile karşılaştırıldığında.

### 5.2.5.Serum Visfatin Düzeyleri

Serum Visfatin düzeyleri Grup 2'de ( $11.36 \pm 1.28$  ng/ml) Grup 1 ( $6.82 \pm 1.75$  ng/ml), Grup 3 ( $4.73 \pm 0.77$  ng/ml), Grup 4 ( $7.09 \pm 0.63$  ng/ml) ve Grup 5'e ( $8.18 \pm 0.72$  ng/ml) göre anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Grup 3'te ise Grup1, Grup 4 ve Grup 5'e göre anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.01$ ). Grup 1'de de, Grup 4 ve Grup 5'e göre anlamlı olarak düşük olarak tespit edildi ( $p < 0.05$ ) (Şekil-6).



Şekil-6. Gruplara ait serum Visfatin düzeyleri.

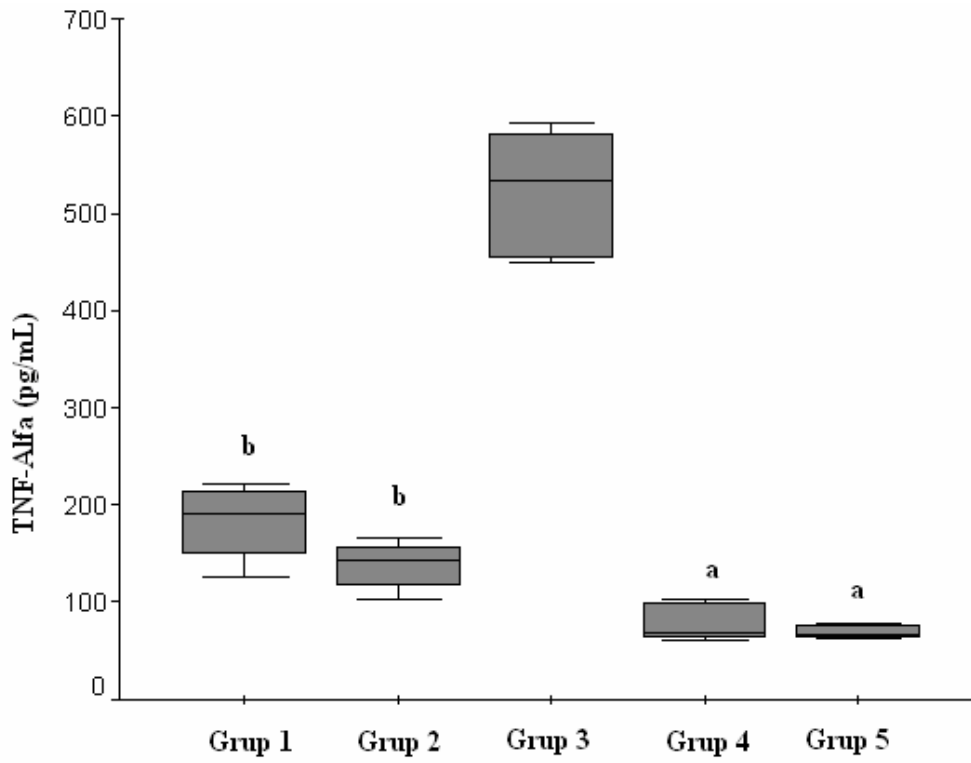
<sup>a</sup> $p < 0.001$  Grup2 ile karşılaştırıldığında.

<sup>b</sup> $p < 0.01$  Grup 3 ile karşılaştırıldığında.

<sup>c</sup> $p < 0.05$  Grup 1 ile karşılaştırıldığında.

### 5.2.6. Serum TNF- $\alpha$ Düzeyleri

Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri Grup 3'de ( $522.8 \pm 67.99$  pg/ml), Grup 1 ( $183.27 \pm 35.23$  pg/ml) ve grup 2'ye ( $137.26 \pm 23.52$  pg/ml) göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenirken ( $p < 0.001$ ) bu yüksekliğin genistein uygulanan grup 4 ( $77.59 \pm 18.2$  pg/ml) ve grup 5'de ( $69.41 \pm 15.95$  pg/ml) de grup 3'e göre anlamlı olarak ( $p < 0.01$ ) azaldığı gözlemlendi. Tedavi uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmezken kontrol grubu ile sadece genistein uygulanan gruplara göre bir yükseklik olmakla beraber YZD uygulanmış gruba göre serum TNF alfa düzeyleri daha düşük düzeylerde olduğu gözlemlendi (Şekil-6).



Şekil-7. Gruplara ait serum TNF- $\alpha$  düzeyleri.

<sup>a</sup>  $p < 0.01$  Grup 3 ile karşılaştırıldığında.

<sup>b</sup>  $p < 0.001$  Grup 3 ile karşılaştırıldığında

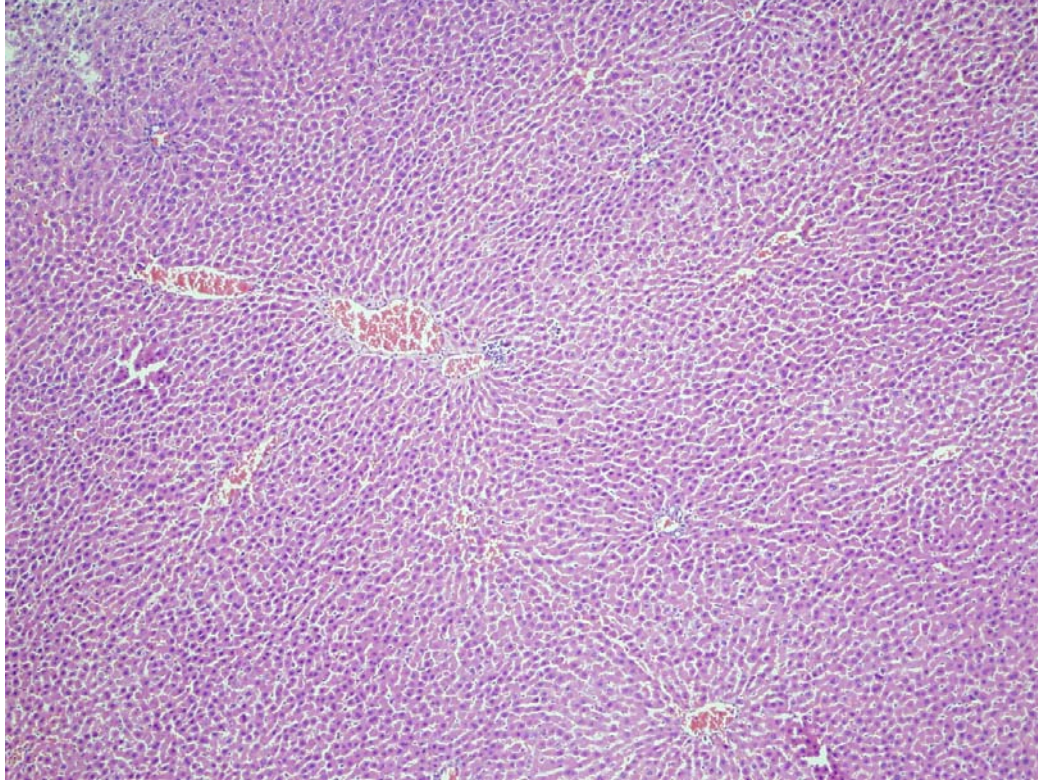


### 5.3. Histopatolojik İnceleme Bulguları

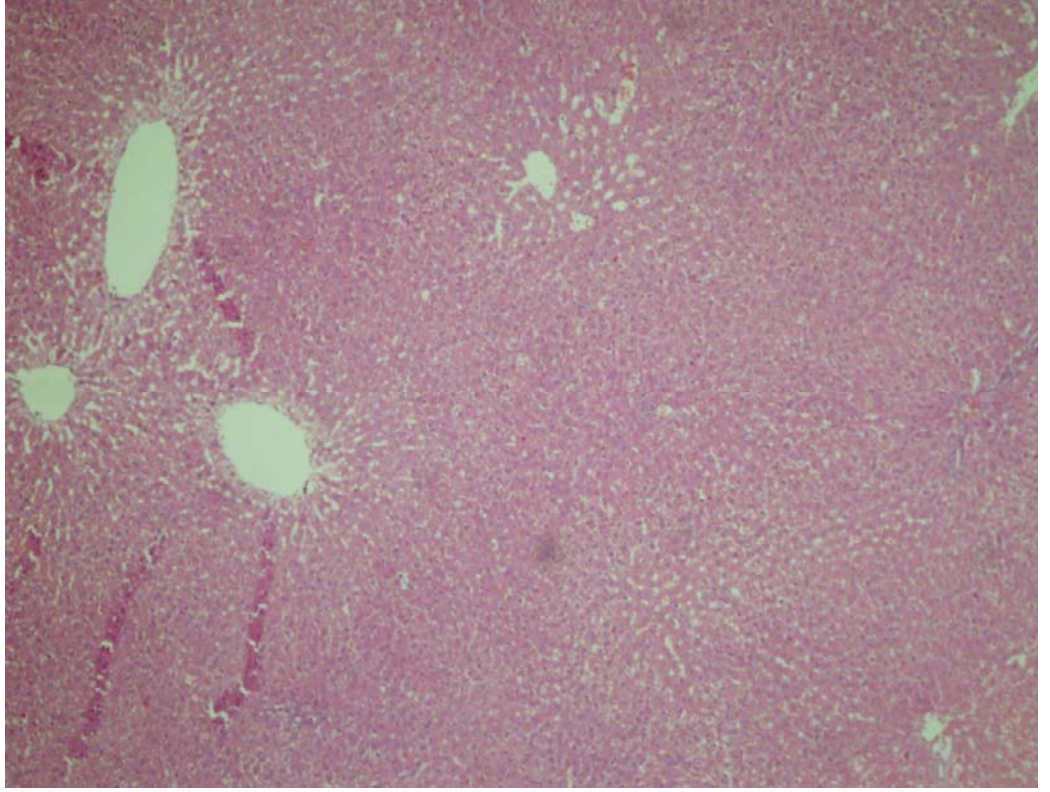
Ratların karaciğer dokularından hazırlanan ve hemotoksilen eozin boyası ile boyanan histolojik preparatların incelenmesi sonucu kontrol gruplarında normal karaciğer doku histolojisi bulguları olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8, 9).

YZD uygulanan tüm gruplarda steatozis ve nekroinflamatuvar aktivitede artış tespit edilmiştir (Şekil 10-12). Genistein uygulaması ile steatoz ve nekroinflamatuvar aktivitede azalma gözlenmiştir.

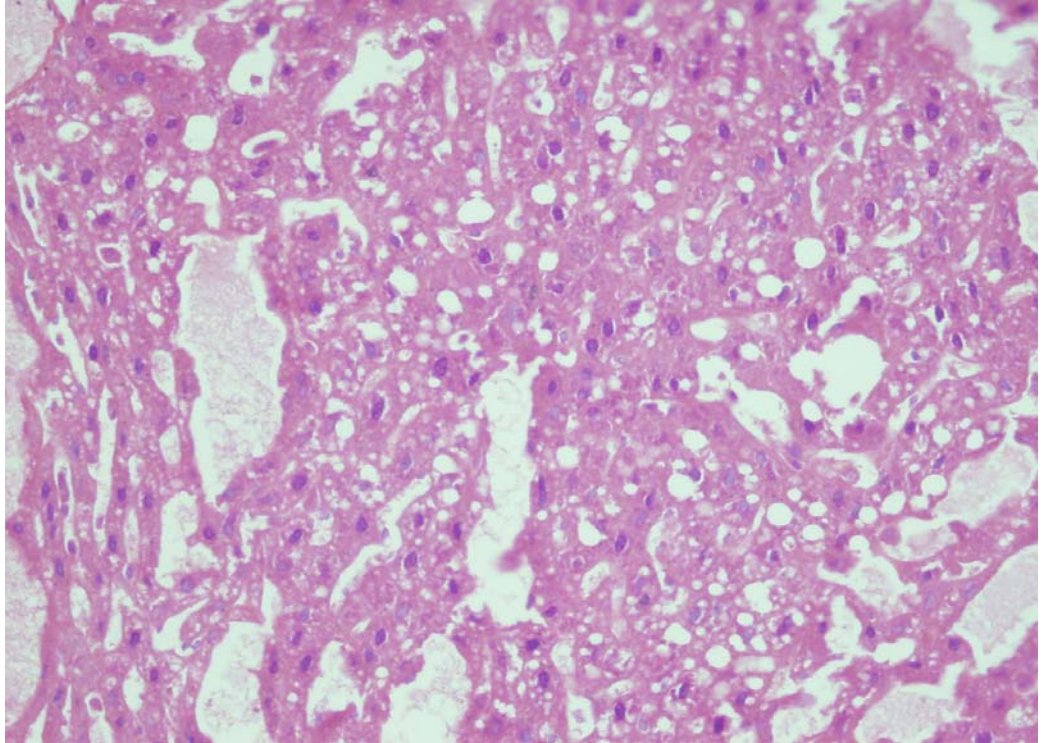
Gruplarda fibrozis tespit edilememiştir.



**Şekil-8.** Kontrol + DMSO grubu ratlara ait karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü (H.E.  $\times 100$ ).

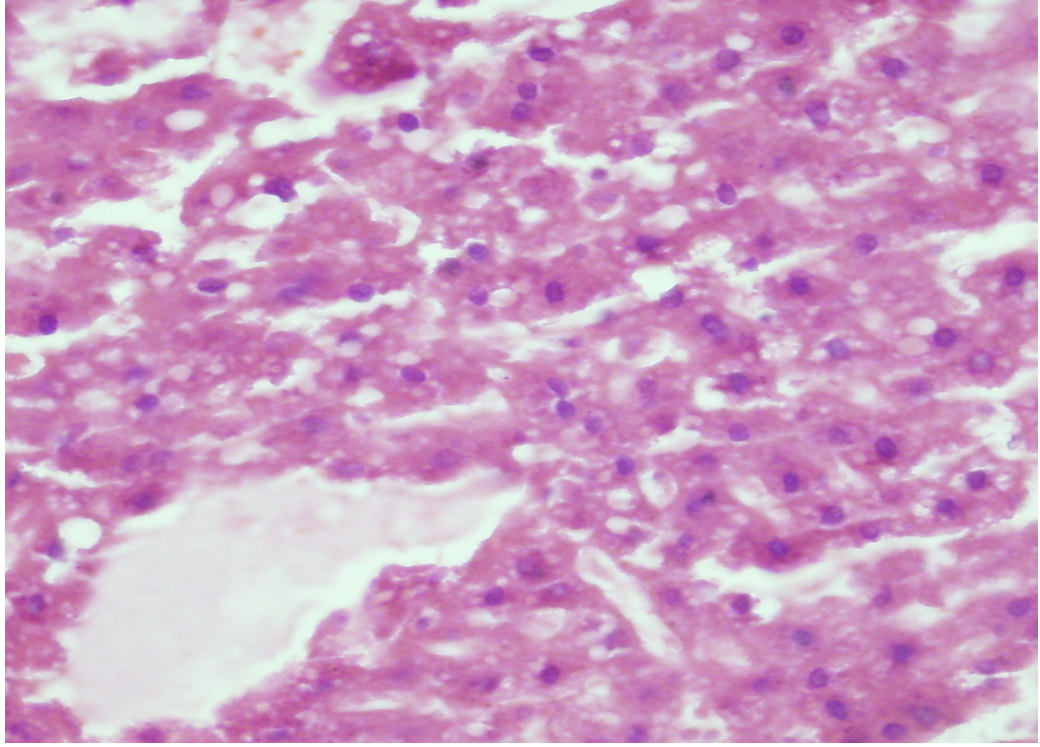


**Şekil-9.** Kontrol + genistein grubu ratlara ait karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü (H.E.  $\times 100$ ).

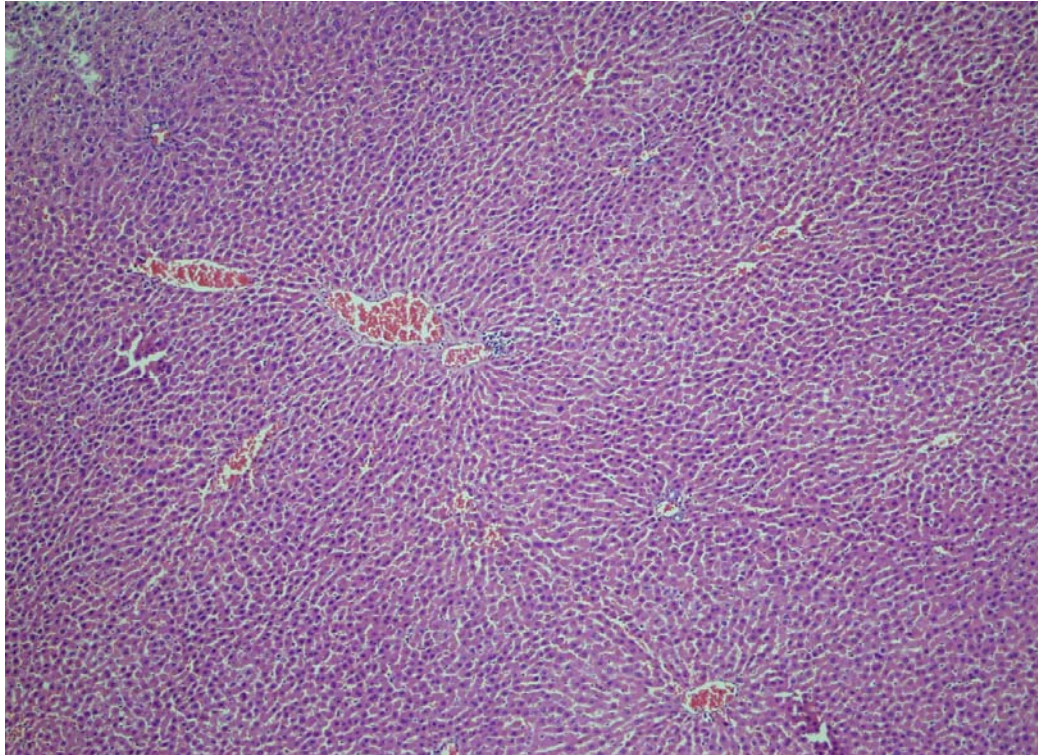


**Şekil-10.** YZD + DMSO grubu ratlara ait karaciğer dokusunda orta düzeyde artmış makrosteatoz ve nekroinlamatuvar aktivitenin histopatolojik görünümü (H.E.  $\times 100$ ).





**Şekil-11.** YZD + genistein grubu ratlara ait karaciğer dokusunda YZD + DMSO grubuna göre azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histopatolojik görünümü (H.E.  $\times 100$ ).



**Şekil-12.** NASH + genistein grubu ratlara ait karaciğer dokusunda YZD + DMSO grubuna göre azalmış makrosteatoz ve nekroinflamatuvar aktivitenin histopatolojik görünümü (H.E.  $\times 100$ ).

## 6. TARTIŞMA

Daha önceleri bening bir durum olarak kabul edilen karaciğer yağlanması, son yıllarda yapılan çalışmalar ile NASH olarak adlandırılan ve potansiyel olarak daha ciddi hastalıklara yol açabilen bir durum olarak düşünülmeye başlanmıştır. Bu terim ilk olarak 1980'li yıllarda alkol kullanmayan ancak karaciğer biyopsilerinde alkolik hepatitle uyumlu değişimler gösteren hastalar için kullanılmıştır. NASH'de karaciğerdeki histopatolojik değişimler makroveziküler steatoz ve hepatosit hasarı ile değişen düzeylerde fibrozisi içermektedir (14,29). Karaciğerin diğer kronik inflamasyonlarında olduğu gibi NASH de siroz ve karaciğer yetmezliğine kadar ilerleyebilmektedir. Günümüzde NASH'in kriptojenik sirozlu hastaların önemli bir kısmının nedeni olduğu kabul edilmekte ve NASH'in sirotik evresi hepatosellüler karsinoma dönüşebilmekte ve hepatosellüler karsinomalı hastaların yaklaşık % 13'ünü bu grup hastaların oluşturduğu düşünülmektedir. Basit yağlı karaciğer ve NASH, NAYKH başlığı altında gruplandırılmaktadır (168).

Gelişmiş toplumlarda obezitenin ve aşırı kiloluların prevalansındaki artışla beraber NASH'in daha sık karşılaşılan bir hastalık tablosu olarak karşımıza çıkacağı şüphe götürmez bir gerçektir. Günümüzde NASH oluşumunda ileri sürülen patojenik hipotezler insülin rezistansını, oksidatif stresi ve pro-inflamatuvar sitokinlerin anormal üretimini içermektedir. Bu durum toplumda önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında ilk sıralarda yer alan metabolik sendrom, tip 2 DM ve kardiyovasküler gibi hastalıkların patogenezi ile örtüşmektedir (37,169). Bu hastalıklar farklı isim ve klinik tablolarla karşımıza çıksa da patogeneziindeki birçok ortak nokta nedeniyle

birbirlerinden kesin sınırlarla ayırmak mümkün değildir. Hatta günümüzde NASH'in, metabolik sendromun karaciğerdeki tezahürü olduğu düşünülmektedir. Yapılan birçok araştırma aslında farklı isimlerle adlandırılan bu hastalıkların patogenezindeki ortak mekanizmaları ortaya çıkarıp, bunlara uygun tedavi yöntemleri geliştirmeyi amaçlamaktadır. Bununla birlikte, NASH oluşumunu veya NASH'in fibrozis ve siroza ilerleyişini önleyebilecek etkin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır.

NASH'li hastaların önemli bir kısmı; sağ üst kadranda rahatsızlık, yorgunluk bitkinlik gibi şikayetler dışında genellikle asemptomatiktir. Hepatomegali görülebilir ancak sıklıkla semptomlara eşlik etmez (170). Aminotransferaz düzeylerinde normale göre 2-3 kat artış sıklıkla görülürken, NAYKH'lı hastaların bir kısmında serum GGT düzeyleri de normal aralığın üstünde olabilmekte ancak genellikle alkole bağlı karaciğer hastalığı olan hastalarda görülen düzeylerin altında kalmaktadır. Hastaların % 50'sinden azında artmış ALP düzeyleri ve sadece % 10 ila 15'inde artmış serum konjuge bilirubin düzeylerine rastlanmaktadır. Hipoalbüminemi, trombositopeni, artmış bilirubin ve uzamış pıhtılaşma zamanı ilerlemiş karaciğer hastalığının göstergesidir (7,170).

Bizim çalışmamızda da Grup 3'de, kontrol gruplarına ( $p<0.001$ ) ve genistein uygulanan gruplara ( $p<0.01$ ) göre daha yüksek serum AST düzeyleri tespit edildi. Serum ALT düzeyleri Grup3'de; kontrol gruplarına ( $p<0.001$ ), Grup 4 ( $p<0.001$ ) ve Grup 5'e ( $p<0.05$ ) göre anlamlı olarak yüksekti. Serum ALP düzeyleri kontrol grubunda ve Grup 4'de, Grup 3'e göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.001$ ). Grup 5'de serum GGT düzeyleri Grup 3'e ve Grup 4'e göre anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.05$ ).

YZD verilerek NASH oluşturulmuş ratlara altı hafta genistein uygulaması ile yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde genistein uygulanan grupta plasebo grubuna göre anlamlı olarak artmış serum AST ( $p<0.01$ ), ALT ( $p<0.001$ ) ve GGT ( $p<0.05$ ) düzeyleri tespit edilmişken, serum ALP düzeyleri plasebo grubunda yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ).

İnsülin rezistansının genel popülasyonda yaklaşık olarak % 25 oranında görüldüğü düşünülmektedir. Hiperinsülinemi, anormal glukoz toleransı, tip 2 DM, hipertrigliseridemi, azalmış HDL düzeyleri, hipertansiyon, anormal fibrinoliz, artmış visseral yağ birikimi, hiperürisemi, polikistik over sendromu ve diğer lipid anormallikleri ile ilişkili bir durumdur. Bu bulgu ve semptomlar topluluğu özellikle hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve bozulmuş glukoz toleransı; metabolik sendrom veya sendrom X olarak adlandırılmaktadır (68,171).

İnsülin rezistansı önemli sayıda NASH hastasında da gözlenmektedir. 66 hastadan oluşan bir NASH popülasyonda (hem zayıf hem de obez) hastaların % 98'inde insülin rezistansı sadece % 39'unda ise DM tespit edilmiştir. İnsülin rezistansı açlık serum C-peptid (insülin üretiminin ölçüsü), insülin ve glukozun düzeyleri ile belirlenir. İnsülin rezistansı artmış VKİ ile değil ancak santral obezitenin varlığı ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular diğer NASH çalışmalarında da gözlenmiştir (68).

İnsülin rezistansı NASH patogenezi için yaygın olarak kullanılan faktörlerden biridir. İnsülin rezistansı; periferik adipositler ve monositlerce alınamayan glukozdan, karaciğerde SYA üretimi artışına ve hepatositlere yağ girişinin artmasına neden olur. İnsülin rezistansının, VKİ'den

ziyade hepatik yağ içeriği ile daha sıkı bir ilişki göstermesi insülin rezistansının gelişiminde hepatik yağ içeriğinin bağımsız bir faktör olabileceğinin göstergesi olabilir (172).

Banerji ve arkadaşları, yapmış oldukları bir çalışmada tip 2 DM'li Afrikalı Amerikan hastalarda karaciğer yağlanması insülin sensitivitesi ile ters ilişkili olduğunu göstermişlerdir (173). Farklı bir çalışmada ise eksojen insülin verilerek kan glukozları düzenlenmiş tip 2 DM'li hastalarda karaciğer yağ içeriğinin azaldığı gösterilmiştir (174).

Aynı şekilde glisemik kontrolü sağlamak için PPAR aktivasyonu yapan ve insülin sensitivitesini arttırıcı bir ajan olan troglitazonun (tizolidinedion) 3-6 ay uygulanması ile 10 NASH'li hastanın 7 sinde serum ALT seviyelerinde normalleşme ve her ne kadar tekrarlanan karaciğer biyopsilerinde yedi hastada nekroinflamasyon devam etse de dört hastanın inflamasyon düzeyinde azalma tespit edilmiştir (175). Troglitazon daha sonra karaciğerde kendine özgü hepatosellüler hasar oluşturduğu için kullanımdan kaldırılmıştır.

Diğer tiazolidinedionların da karaciğer hastalığı olan vakalarda uzun dönem kullanımı ile ilgili bir takım kaygılar mevcuttur. Ancak yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada biyopsi yapılarak NASH tanısı konulmuş 30 vakada, 48 hafta boyunca günde iki defa 4 mg rosiglitazon uygulanmış ve çalışma sonucunda insülin duyarlılığında düzelme ve NASH'in histopatolojik belirteçlerinde iyileşme tespit edilmiştir (176). Küçük bir pilot çalışmada diyabeti olmayan 18 NASH hastasına 1 yıl boyunca pioglitazon uygulanmış ve hastaların insülin duyarlılığında, serum ALT düzeyinde ve histolojik göstergelerinde anlamlı düzelme gözlemlenmiştir (177).

Metformin (biguanid) hepatik insülin sensitivitesini artıran diğer bir antidiyabetik ilaçtır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada dört haftalık bir uygulama ile serum aminotransferaz düzeylerinde iyileşme tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu hastaların karaciğer hacimlerinde ve vücut ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir (68).

Hipertrigliseridemi NASH ile sıklıkla ilişkili bir durumdur. NASH'li hastalarda hem açlık hem de yemek sırasında karaciğerde aşırı yağ yüklenmesi ile sonuçlanan hipertrigliseridemi gözlenir ve lipid metabolizmasındaki bu değişim sağlıklı karaciğerin steatotik hale dönüşümüne neden olur. Bu nedenle lipid düşürücü ajanların tedavide etkin olabilecekleri düşünülmüştür. NASH'li hastalara bir yıl süreyle günde 2 g klofibrat uygulanan bir çalışmada karaciğerde biyokimyasal parametrelerinde, steatoz, inflamasyon ve fibroz derecelerinde önemli bir değişim tespit edilememiştir (121). Bir randomize kontrol çalışmada, biopsi ile teşhis konulmuş 46 NASH hastasına günde 600 mg gemfibrozil uygulanmış ve gemfibrozil uygulanan hastalarda serum ALT, AST, GGT ve trigliserid düzeyleri bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada tedavi sonrası histolojik veriler sunulmamıştır (122).

Postmenopozal kadınlarda yapılan bir çalışmada genistein tüketimi ile düşük VKİ ve açlık insülin konsantrasyonu ile yüksek HDL konsantrasyonu ilişkili bulunmuştur. Genistein aynı zamanda oral glukoz yüklemesine insülin cevabını azaltmaktadır. Bu sonuçlar izoflavonların hiperinsülinemi, hiperlipidemi gibi risk faktörlerine karşı faydalı etkilerini göstermektedir (178).

Bizim çalışmamızda da Grup 3'de, kontrol gruplarına ( $p<0.001$ ) ve genistein uygulanan gruplara ( $p<0.01$ ) göre daha yüksek serum açlık glukoz düzeyleri tespit edildi. Kontrol grupları ile grup 4 ve Grup 5 arasında serum



açlık glukoz düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi. Serum insülin düzeyleri Grup 3’de, kontrol gruplarına ( $p<0.001$ ) ve genistein uygulanan gruplara ( $p<0.01$ ) göre daha yüksek tespit edildi. Grup 4 ve Grup 5’de, Grup 2’ye göre serum insülin düzeyleri daha yüksekti. İnsülin rezistansının gösterilmesinde sıklıkla kullanılan HOMA-IR indeksi gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup 3’de, kontrol ve genistein uygulanan gruplara göre ( $p<0.001$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup 4 ve Grup 5’de, Grup 1’e göre HOMA-IR indeksi daha yüksekti ( $p<0.01$ ).

Yine çalışmamızda Grup 3’de, kontrol gruplarına ( $p<0.001$ ) ve Grup 4’e ( $p<0.01$ ) göre ve Grup 5’de kontrol gruplarına göre ( $p<0.05$ ) daha yüksek serum trigliserid düzeyleri tespit edildi. Grup 4’de kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilemedi. Serum VLDL düzeyleri Grup 3’de ve Grup 5’de kontrol gruplarına ve Grup 4’e göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Serum HDL düzeyi sadece Grup 3’de, Grup 1’e göre anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.05$ ). Grup 3’de, serum LDL düzeyleri Grup 1’e ve Grup 5’e göre yüksek olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ).

İnsülin sensitivitesi aynı zamanda peptid yapılı mediatörler tarafından da düzenlenmektedir. Yağ dokusu özellikle mezenterik yağ, venöz kan dönüşü doğrudan karaciğere olduğundan metabolik aktiviteyi düzenleyen sitokinlerin ve peptid yapılı hormonların önemli bir kaynağıdır. TNF- $\alpha$ , anjiotensinojen, plazminojen aktivatör inhibitör-1, leptin ve komplement komponentleri bunlara örnek olarak verilebilir (179).

TNF- $\alpha$ ’nın IR gelişimindeki rolü, TNF- $\alpha$  eksikliği olan ratlarda obezite indüksiyonuna cevap olarak IR gelişiminin olmadığını gösteren çalışmalar ile ortaya konulmuştur (72). NASH hastalarında TNF- $\alpha$  ekspresyonu hem adipoz

dokuda hem de karaciğerde, insülin rezistansı ile korelasyon gösterecek şekilde artmıştır. TNF- $\alpha$ 'nın bu artmış ekspresyonu karaciğer fibrozunun düzeyi ile korelasyon göstermektedir. SYA'ların karaciğerde birikmesi NF $\kappa$ B bağımlı inflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) salınımını stimüle etmektedir. Bunun yanı sıra lipid peroksidasyonunun son ürünleri oldukça toksiktir ve NASH'deki düzensizliklerin önemli bir kısmından sorumludur. Serbest radikaller, NASH gelişiminin hemen tüm basamaklarında önemli role sahip, anahtar bir patolojik faktör olan TNF- $\alpha$ 'nın ekspresyonunu, Kupffer hücrelerinde, hepatositlerde ve adipoz dokuda aktive ederler (79,180).

IL-6'nın plazma düzeyleri vücut ağırlığındaki artış ile artmaktadır. IL-6, TNF- $\alpha$ 'ya benzer şekilde yağ hücrelerinde ve hepatositlerde insülin etkilerinde bozulmaya neden olmaktadır. Buna ek olarak IL-6 insülin duyarlılığını artıran bir adipokin olan adiponektinin yağ hücrelerindeki parakrin etkilerini azaltmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, izoflavonların uyarılmış hücre kültürlerinde IL-6'nın üretimi üzerine inhibitör etkilerinin olduğunu gösterilmiştir (181).

Bizim çalışmamızda serum TNF- $\alpha$  düzeyleri Grup 3'de, kontrol gruplarına ( $p < 0.001$ ) ve genistein uygulanan gruplara ( $p < 0.01$ ) göre daha yüksek tespit edildi. Grup 4'de ve Grup 5'de, Grup 1'e ve Grup 2'ye göre daha düşük serum TNF- $\alpha$  düzeyleri olmakla beraber gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi ( $p > 0.05$ ).

Çalışmamızda serum IL-6 düzeyleri Grup 1'de, Grup 2'ye ve Grup 5'e göre anlamlı olarak yüksek ( $p < 0.001$ ) ve Grup 3'e grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.01$ ). Serum IL-6 düzeyleri Grup 2'de, Grup 3'e ve Grup 4'e göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ( $p < 0.001$ ). Grup 4'de, Grup 5'e göre anlamlı

olarak yüksek tespit edildi ( $p<0.001$ ). Grup 3, Grup 4 ( $p<0.05$ ) ve Grup 5 ( $p<0.01$ ) ile karşılaştırıldığında serum IL-6 düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde genistein verilen gruplarda ki azalma oksidatif stresi de kapsayan çeşitli faktörler ile açıklanabilir. Nitekim bir antioksidan olan vitamin E ile NASH'li çocuklarda yapılan bir çalışmada vitamin E'nin günlük 400-1200 IU verilmesiyle serum aminotransferazlarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (121). Ancak antioksidan etkilerinin yanı sıra genisteinin NF $\kappa$ B inhibisyonu gibi farklı farmakolojik özelliklerinin de olduğu unutulmamalıdır. Çalışmamızda özellikle serum TNF- $\alpha$  düzeyleri genistein verilen gruplarda anlamlı olarak azalmıştır. Bununla beraber TNF- $\alpha$  düzeylerindeki bu azalma hepatik NF $\kappa$ B düzeylerinin de irdelendiği farklı çalışmalar ile açıklığa kavuşturulmalıdır.

Çalışmamızda histopatolojik incelemelerde makro veziküler steatoz, nekroinflamatuvar aktivite, histopatolojik evreleme ve fibrozis düzeyleri değerlendirilmiştir. Tüm gruplarda fibrozis tespit edilememiştir. Steatozis YZD uygulanan tüm gruplarda tespit edilmiştir ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Grup 3'de, Grup 4'e ve Grup 5'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Grup 4 ve Grup 5 karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Gruplar nekroinflamatuvar aktivite açısından değerlendirildiğinde YZD uygulanan tüm gruplarda tespit edilmiştir ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Grup 3'de, Grup 4'e ve Grup 5'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Grup 4 ve Grup 5 karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Histopatolojik derecelendirme YZD uygulanan tüm gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı

olarak yüksek bulunmuştur. Ancak YZD uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Genistein aynı zamanda antifibrotik özelliklere sahip bir ajandır. *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada bir kollajen sentezini TGF- $\beta$ 1 aracılığıyla azalttığı ve akabinde stellat hücre proliferasyonunu ve hepatik fibrozu önlediği gösterilmiştir (182). Bizim çalışmamızda serum TGF- $\beta$ 1 düzeyleri sadece Grup 3'de, Grup 1'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Tüm gruplarda fibrozisin tespit edilememiş olması serum TGF- $\beta$ 1 düzeylerinde gruplar arasında önemli farklılıkların olmamasının nedeni olabilir. Bu nedenle genisteinin muhtemel antifibrotik etkileri çalışmamızda tam olarak saptanamamıştır. Bu da bize fibrozis gelişiminin gösterilebilmesi için daha uzun süreli YZD uygulaması yapılması gerektiğini göstermektedir.

Visfatin yakın zamanda tanımlanmış insülin benzeri etkileri olan özellikle visseral yağ dokusundan salınan bir adipositokindir. İntravenöz yolla rekombinant visfatin verilen farelerde doza bağlı olarak plazma glukoz düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Visfatin ve insülinin; insülin reseptörlerine bağlanmada kompetitif bir etkileşim göstermemişlerdir. Bu nedenle reseptöre insülininden farklı bir bölgeden bağlanarak aktive ettiği düşünülmektedir (97). Ancak visfatinin biyolojik aktivitesi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fukuhara ve arkadaşları obezlerde visfatinin visseral yağ dokusundan ekspresyonunun arttığını ve plazma visfatin konsantrasyonunun visseral yağ miktarı ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (97). Bunun yanı sıra plazma visfatin düzeyleri tip 2 DM'li hastalarda (183) ve gestasyonel diyabetli kadınlarda yüksektir (184).

Visfatin ile oksidatif stres, düşük dereceli inflamasyon, ve ateroskleroz arasındaki ilişki insülin rezistansına bağlıymış gibi görünse de henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Nitekim, visfatinin aynı zamanda inflamatuvar hücrelerde de belirlenmesi ve çeşitli inflamatuvar hastalıklarda plazma seviyelerinin yükselmesi farklı sitokinlerin visfatin sentez ve salınımında etkili olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda serum visfatin düzeyleri Grup 1’de, Grup 2’ye ( $p<0.001$ ) ve Grup 4’e ile Grup 5’e ( $p<0.05$ ) göre anlamlı olarak düşük, Grup 3’e göre ise anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0.01$ ). Grup 2’de, Grup 3’e, Grup 4’e ve Grup 5’e göre serum visfatin düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). Visfatin düzeyleri Grup 3’de, Grup 4’e ve Grup 5’e göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ( $p<0.01$ ). Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda, TNF- $\alpha$  ve IL-6’nın kemirgen 3T3-L1 hücrelerinde visfatin ekspresyonunu negatif olarak etkilediği bildirilmiştir (185). Hem TNF- $\alpha$  hem de IL-6 obezlerde adipoz dokuda sentezlenmekte ve her ikisinin de otokrin ve parakrin aktiviteleri bulunmaktadır. Dolayısıyla yağ dokuda visfatin ekspresyonunun azalması bu sitokinlerin inhibitör etkilerinden kaynaklanabilir. Çalışmamızda genistein uygulanan gruplarda hem TNF- $\alpha$  hem de IL-6’nın serum düzeylerindeki azalma, bu sitokinlerin inhibitör etkilerinin ortadan kalkmasıyla visfatin ekspresyonunun arttığını düşündürse de her iki sitokin ile visfatin düzeyleri arasında korelasyon saptanamamıştır.

Özellikle etiopatogenezine bakıldığında çeşitli faktörlere bağlı olarak karaciğerde meydana gelen yağlanma ve oksidatif stres ile birlikte proinflamatuvar sitokinlerin de rol oynadığı mekanizmalar sonucunda karaciğer hücrelerinde harabiyet ve değişik düzeylerde fibrozis ile karakterize,

siroza hatta hepatoselüler karsinoma kadar ilerleyebilen ve NASH olarak adlandırılan bu klinik tablonun etkin olarak önlenmesi, koruyucu tedbirlerin alınması ve tedavisi çok önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde etkin bir tedavisi olmayan bu hastalığın patogenezi de göz önüne alarak özellikle soya bitkisinde bulunan antioksidan, anti-tümör, anti-inflamatuvar özellikleri ihtiva eden bir izoflavon olan genistein hastalığın gelişim ve tedavisindeki etkinliğini araştırdığımız çalışmamızda;

Sonuç olarak; YZD uygulayarak NASH oluşturduğumuz ratlarda genistein uygulanması ile; karaciğer fonksiyon testlerinde, karaciğer histopatolojisinde, insülin rezistansında, lipid profilinde ve çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin serum düzeylerinde dikkat çekici bir düzelme gözledik. Özellikle, başta genistein olmak üzere farklı izoflavonları da ihtiva eden yiyeceklerin tüketilmesi NASH ve benzeri hastalıkların gelişimini önlemede ve tedavisinde önemli ve umut verici bir seçenek gibi görünmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. 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.
2. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145.
3. Schaffner F, Thaler H: Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* 1986; 8:283-298.
4. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; 22:1714-1719.
5. Sonsuz A, Uraz HS. Karaciğer yağlanması ve nonalkolik steatohepatit *Aktüel Gastroenteroloji ve Hepatoloji* 2001; 107-119.
6. Anne B, Michael RL. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *American Journal of Transplantation* 2004; 4: 686-693.
7. Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 186-190.
8. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2002-2009.
9. Franzese A, Vajro P, Argenziano A, Puzziello A, Iannucci MP, Saviano MC, et al. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1428-1432.
10. Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Tani S, Goto M. Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Jpn J Med* 1988; 27: 142-149.
11. Luyckx FH, Desai C, Thiry A, Dewé W, Scheen AJ, Gielen JE, et al. Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 222-226.

12. Diehl AM, Goodman Z, Ishak G. Alcohol like liver disease in nonalcoholics. A clinical and histological comparison with alcohol induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062.
13. Silverman JF, Pories WJ, Caro JF. Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity: clinical, pathological and biochemical considerations. *Pathol Annu* 1989; 24: 275-302.
14. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
15. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-1362.
16. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-1110.
17. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1349-1355.
18. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231.
19. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20:594-598.
20. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 1174-1180.
21. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419.
22. Jesus M, Luis IF, Luisa GB, Ricardo MO. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2004; 27: 2057-2065.
23. Angulo P, Lindor K. Treatment of nonalcoholic fatty liver: present and emerging therapies. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 81-88.



24. Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 1999; 19: 221-229.
25. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphologic screws on a hepatic ramber. *Hepatology* 1995; 21: 1742-1743.
26. Falk-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Seminers in Liver Disease* 2001; 21: 17-26.
27. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Seminers in Liver Disease* 2001; 21: 3-16.
28. Burt AD, Mutton A, Day C. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1998; 15: 246-258.
29. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-669.
30. Takahashi T, Kamaimura T, Ichida H. Ultrastructural findings on polymorphonuclear leucocyte infiltration and acute hepatocellular damage in alcoholic hepatitis. *Liver* 1987; 7: 347-358.
31. Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *Journal of pediatrics* 1995; 127: 700-704.
32. Brunt EM, Tiniakos DG. Pathology of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16: 691-707.
33. Ziol M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C et al. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *Journal of Hepatology* 2001;34: 254-260.
34. MacSween RNM, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Seminers in Liver Disease* 1986; 6: 221-232.
35. Le TH, Redick JA, Sheppard BL. The distribution of mitochondria containing crystalline inclusions within the hepatic lobule in NASH. *Hepatology* 2001; 34: 455-461.
36. Lefkowitz JH. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. *Arch Med Res.* 2007; 38: 634-43.
37. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.

38. James OF, Day CP. Nonalcoholic steatohepatitis: a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998; 29: 495-501.
39. Vigano M, Vergani A, Trombini P, Paleari F, Piperno A. Insulin resistance influences iron metabolism and hepatic steatosis in type 2 diabetes. *Gastroenterology* 2000; 118: 986-987.
40. Sokol RJ, Twedt D, McKim JMJr. Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington Terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1788-1798.
41. Rubbia-Brandt L, Leandro G, Spahr L, Giostra E, Quadri R, Malé PJ, et al. Liver steatosis in chronic hepatitis C: a morphological sign suggesting infection with HCV genotype 3. *Histopathology* 2001; 39: 119-125.
42. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998; 27: 1463-1465.
43. Reeves HL, Burt AD, Wood S, Day CP. Hepatic stellate cell activation occurs in the absence of hepatitis in alcoholic liver disease and correlates with severity of steatosis. *Journal of Hepatology* 1996; 25: 677-683.
44. Bianchi G, Marchesini G, Zoli M, Bugianesi E, Fabbri A, Pisi E. Prognostic significance diabetes in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994; 20: 119-125.
45. Alpers DH, Sabesin SM, White HM. Fatty liver; biochemical and clinical aspects. In: *Diseases of the liver*, Lippincott, Philadelphia 1993; 825-855.
46. Bass NM, Raghupathy E, Rhoads DE, Manning JA, Ockner RK. Partial purification of molecular weight 12 000 fatty acid binding proteins from rat brain and their effect on synaptosomal Na<sup>+</sup>-dependent amino acid uptake. *Biochemistry* 1984; 23: 6539-6544.
47. Nguyen N, Glanz D, Glaesser D. Fatty acid cytotoxicity to bovine lens epithelial cells: investigations on cell viability, ecto-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and intracellular sodium concentrations. *Exp Eye Res* 2000; 71: 405-413.
48. Ockner RK. Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 248-260.
49. Stewart SF, Jones DEJ, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends in Molecular Medicine* 2001; 7: 408-413.

50. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105: 1067-1075.
51. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7522-7527.
52. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004;30:121-138.
53. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005; 42: 928-940.
54. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al. Nonalcoholic fatty liver disease: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120: 1183-1192.
55. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *Journal of Hepatology* 1996; 24: 200-208.
56. Garcia-Monzon C, Martin-Perez E, Lo Lacono O, Fernandez-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *Journal of Hepatology* 2000; 33:716-724.
57. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2001; 21:57-69.
58. Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira A G, De Moura MC. Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome? *Clin Nutr* 1999; 18, 353–358.
59. Hruzskewycz AM. Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1988; 153: 191-197.
60. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Domenicali M, Caraccio G, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism

- alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001; 33: 808–815.
61. Chavin KD, Yang SQ, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 5692-5700.
  62. Yang SQ, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 378: 259-268.
  63. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002; 415: 96-99.
  64. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379.
  65. Kim HJ, Lee KE, Kim DJ, Kim SK, Ahn CW, Lim SK, et al. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2169-2175.
  66. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung S N, et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-1517.
  67. Moller DE, Flier JS. Insulin resistance; mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med* 1991; 325: 938-948.
  68. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-455.
  69. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353.
  70. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-190.

71. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: 1333-1339.
72. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-614.
73. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK $\beta$ . *Science* 2001; 293: 1673-1677.
74. Birnbaum MJ. Turning down insulin signaling. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 655-659.
75. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, et al. 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.
76. Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006; 44: 197-208.
77. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198.
78. Nagai H, Matsumaru K, Feng G, Kaplowitz N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 55-64.
79. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163.
80. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Ryzdzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185-194.

81. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003; 52: 2882-2887.
82. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211.
83. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110: 1093-1103.
84. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 415-419.
85. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 26: 2442-2450.
86. Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, Grazotto M, Catucci A, Federspil G, et al. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1748-1752.
87. Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumor necrosis factor alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Hormone Metab Res* 2000; 32: 548-554.
88. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in obese mice. *Hepatology* 2004; 40: 177-184.
89. Rea R, Donnelly R. Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity? *Diabetes Obes Metab* 2004; 6: 163-170.
90. Verma S, Li SH, Wang CH, PW Fedak, RK Li, RD Weisel, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of, adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; 108: 736-740.

91. Stepan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, et al. Family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 502-506.
92. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR-gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 472.
93. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312.
94. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, et al. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2001; 276: 25651-25653.
95. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53: 1671-1679.
96. Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. Inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *Public Library of Science Medicine* 2004;1: 45.
97. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426-430.
98. Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY, Garibay-Tupas J, Samal B, Bryant-Greenwood GD. Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J. Mol. Endocrinol.* 2001; 26: 107-117.
99. Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M. Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: 586-590.
100. Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Invest* 2004; 113: 1318-1327.

101. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 985: 960-967.
102. Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001; 121: 710-723.
103. Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123:1705-1725.
104. Yajima Y, Ohta K, Narui T, Abe R, Suzuki H, Ohtsuki M. Ultrasonographical diagnosis of fatty liver: significance of the liver-kidney contrast. *Tohoku J Exp Med* 1983; 139: 43-50.
105. Bydder GM, Chapman RW, Harry D, Bassan L, Sherlock S, Kreel L. Computed tomography attenuation values in fatty liver. *J Comput Tomogr* 1981; 5: 33-35.
106. Mendler MH, Bouillet P, Le Sidaner A, Lavoine E, Labrousse F, Sautereau D et al. Dual-energy CT in the diagnosis and quantification of fatty liver: limited clinical value in comparison to ultrasound scan and single-energy CT, with special reference to iron overload. *J Hepatol* 1998; 28: 785-794.
107. Gore R. Diffuse liver disease. In *Textbook of Gastrointestinal Radiology*. Gore RM, Levine MS, Laufer I (eds). Philadelphia: Saunders, 1994; 1968-2017.
108. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 745-750.
109. Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 398-403.
110. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001, 344: 495-500.
111. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:1449-1457.
112. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1160-1174.
113. Diakou MC, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Tsianos EV, Burroughs AK, Elisaf MS. Pharmacological treatment of non-alcoholic steatohepatitis: the current evidence. *Scand J Gastroenterol*. 2007 ;42:139-147.



114. Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 1990; 99: 1408-1413.
115. Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991; 12: 224-229.
116. James WP, Astrup A, Finer N, Hilsted J, Kopelman P, Rossner S, et al. "Effect of Sibutramine on Weight Maintenance After Weight Loss: A Randomised Trial", STORM Study Group, Sibutramine Trial of Obesity Reduction and Maintenance, *Lancet*, 2000; 356: 2119-2125.
117. Harrison SA, Ramrakhiani S, Brunt EM, Anbari MA, Cortes CH, Bacon B. "Orlistat in the Treatment of NASH: A Case Series". *Am J Gastro* 2003; 98: 926-930.
118. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000; 6: 998-1003.
119. Ruan H, Pownall H J and Lodish H F. "Troglitazone Antagonizes TNF-alpha-induced Reprogramming of Adipocyte Gene Expression by Inhibiting the Transcriptional Regulatory Functions of NK-kappaB". *Atherosclerosis* 2003; 166:119-127.
120. Neuschwander-Tetri B, Brunt EM, Wehmeier KR, Sponseller CA, Hampton K and Bacon BR. "Interim Results of a Pilot Study Demonstrating the Early Effects of the PPAR-gamma Ligand Rosiglitazone on Insulin Sensitivity, Aminotransferases, Hepatic Steatosis and Body Weight in Patients with Non-alcoholic Steatohepatitis". *J Hepatol* 2003 ;38: 434-440.
121. Laurin J, Lindor K Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, et al. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcoholic-induced steatohepatitis. *Hepatol* 1996; 23: 1464-1467.
122. Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 384.
123. Schalm S W, von Hoek B. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. Role of ursodeoxycholic acid. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001, 185-187.

124. Padda S, Ramirez F C, Shernoff NJ. The effects of ursodeoxycholic acid treatment on liver tests in patients with Non-alcoholic induced steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2660.
125. Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2711-2717.
126. Lavine J E. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr* 2000; 136: 734-738.
127. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The Journal of Nutrition* 1999; 129:758-767.
128. Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A. Phytoestrogens: where are we now? *The British Journal of Nutrition*. 1998; 79: 393-406.
129. Oomah BD. Phytoestrogens. Ed. W.J. Hurst. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. CRC Press. 2002 Florida. USA.
130. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*. 1997; 62: 365-372.
131. Cassidy A, Hanley B, Raventos R. Isoflavones, Lignans And Stilbens-Origins, Metabolism And Potential Importance To Human Health. *J Scien of Food* 2000; 80:1044-1062.
132. Polkowsky K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm* 2000; 8: 739-745.
133. Davis S., Dalais F., Simpson E., Murkies A. Phytoestrogens In Health And Disease. *Recent Progress In Hormone Research*. 1999; 54: 185-211.
134. Deapen D, Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK, Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women, *Int J Cancer* 99 2002; 747-750.
135. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 2001; 276:17808-17814.
136. Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over 40 years of age. *J Nutr* 2002; 132: 3168-3171.

137. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987; 262:5592-5595.
138. Thorburn J, Thorburn T. The tyrosine kinase inhibitor, genistein, prevents a-adrenergic-induced cardiac muscle cell hypertrophy by inhibiting activation of the Ras-MAP kinase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1586-1591.
139. Linassier C, Pierre M, Le Peco J-B, Pierre J. Mechanism of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. *Biochem Pharmacol* 1990; 39:187-193.
140. Constantinou A, Kiguchi K, Huberman E. Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 1990; 50: 2618–2624.
141. Wei H, Frenkel K, Bowen R, Barnes S. Inhibition of tumour-promoter induced hydrogen peroxide formation by genistein in vitro and in vivo. *Nutr Cancer* 1993; 20: 1-12.
142. Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 364-373.
143. Sierens J, Hartley JA, Campbell MJ, Leathem AJ, Woodside JV. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat Res* 2001; 485: 169-176.
144. Wiseman H, O'Reilly J, Adlercreutz H, Mallet A, Bowey E, Rowland I et al. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 395-400.
145. Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Tani T, Izumi R, Miwa K, et al. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of nf-[kappa]b, *Transplant. Proc.* 2002; 34: 1335–1340.
146. Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo, *Circ. Res.* 2001; 89: 823-830.
147. Normark S, Nilsson C, Normark BH, Hornef MW. Persistent infection with *Helicobacter pylori* and the development of gastric cancer. *Adv Cancer Res* 2004; 90: 63-89.

148. Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Sariban E, Kufe DW. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J Clin Invest* 1988; 81: 455-460.
149. Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, Berchuck A, Wiener JR, Weinberg JB, et al. Bast RCJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Cancer Res* 1993; 53:1939-1944.
150. Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. Expression of tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer* 1994; 56:777-782.
151. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162:2163-2168.
152. Suh KS, Koh G, Park CJ, Woo JT, Kim SW, Kim JW, et al. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry* 2003; 63:209-215.
153. Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC. Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *J Cell Biochem* 2003; 89:633-664.
154. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL. Soy isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996;126:43-50.
155. Raines EW, Ross R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr* 1995;125:624-630.
156. Nogowski L, Mackowiak P, Kandulska K, Szkudelski T, Nowak KW. Genistein-induced changes in lipid metabolism of ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab*.1998; 42: 360-366.

157. Mackowiak P, Nagowski L, Nowak KW. Effect of isoflavone genistein on insulin receptors in perfused liver of ovariectomized rats. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19: 283-292.
158. Persaud SJ, Harris TE, Burns CJ, Jones PM. Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult ratslets. *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 19-28.
159. Fedorak RN, Cheeseman CI., Thomson BR., Porter VM. Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol.* 1991; 261: 585-591.
160. Sun AP, Myung SC, Soo YC, Junk SS, Un JY, Myung JK, et al. *Life Science* 2006.
161. Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology* 1994;134:1975-1978.
162. Ohno T, Kato N, Ishii C, Shimizu M, Ito Y, Tomono S, et al. Genistein augments cyclic adenosine 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr Res* 1993;19:273-285.
163. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 75: 265-271.
164. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509.
165. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, et al. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 454-462.
166. Mathews DR, Hosker JP, Rudenkl AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cells function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.
167. Nanji AA, Yang EK, Fogt F, Sadrzadeh SMH, Dannenberg AJ. Medium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established

- experimental alcoholic liver disease. *J Pharma Exper Ther* 1996; 277: 1694–1699.
168. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of non-alcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42: 132–138.
169. Farrell GC. “Non-alcoholic Steatohepatitis: What is it, and Why is it Important in the Asia-Pacific Region?”, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18: 124–138.
170. Kumar KS, Malet PF. “Nonalcoholic Steatohepatitis”, *Mayo Clin. Proc.* 2000; 75: 733-739.
171. Reaven GM. Syndrome X: 6 years later. *J Intern Med* 1994; 236: 13-22.
172. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol* 2002; 282: 193-199.
173. Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL, Gordon D, Lebovitz HE, Kral JG. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19: 846–850.
174. Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, et al. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49: 749–758.
175. Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies L J, Pratipanawatr W, Glass L, et al. Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1364- 1370.
176. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR: Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 week of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38:1008–1017.
177. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH: A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:188-196.

178. Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 2001;131:1202–1206.
179. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38: 413-419.
180. Mezey E. Dietary fat and alcoholic liver disease. *Hepatology* 1998; 28:901-905.
181. Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC. Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *J Cell Biochem* 2003; 89:633-664.
182. Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, et al. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J. Gastroenterol.* 2002; 8: 739-745.
183. Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:295-299.
184. Krzyzanowska K, Krugluger W, Mittermayer F, Rahman R, Haider D, Shnawa N, et al. Increased visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Clin Sci.* 2006;18: 88-89.
185. Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, et al. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 2005; 185: 1-8.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başladım ve 2001 yılında bu fakülteden mezun oldum. Bir yıl süre ile Elazığ İli Sivrice İlçesi Gözeli köyünde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2002-2003 yıllarında Çanakkale 118. Jandarma Er Eğitim Alay Komutanlığı'nda Tabip Asteğmen olarak askerlik görevimi yerine getirdim. 2004 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım ve halen aynı anabilim dalında Araştırma Görevlisi Doktor olarak çalışmaktayım.