

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

**YAĞDAN ZENGİN DİYETLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT TEDAVİSİNDE
MELATONİNİN ROLÜ**

Dr. Nalan KUZU

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU

ELAZIĞ-2008

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ömer Lütfi ERHAN.....

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU
Tez Danışmanı

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

Bu tez Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim Birimi Başkanlığı tarafından 1272 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında yetiŐmemde katkıları olan baŐta tez danıŐmanım ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. İ. Halil BAHçECİOğLU olmak üzere bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca uzmanlık eğitimim sırasında yardımlarını gördüğüm Doktor ArkadaŐlarıma, İç Hastalıkları Anabilim Dalında görev yapan HemŐire ve diğer Yardımcı Personele teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	iv
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ.....	3
3.1 .GENEL BİLGİLER.....	5
3.1.1. Karaciğerin Anatomisi	5
3.1.2. Karaciğerin Histolojisi	7
3.1.3. Non Alkolik Steatohepatit (NASH)	10
3.1.3.2.Obezite, İnsulin direnci ve adipositokinler	13
3.1.3.3.Genetik Faktörler.....	16
3.1.3.4. Çevresel Faktörler	17
3.1.3.5. İntestinal Bakteriyeminin Rolü	17
3.1.3.6. NASH'te Semptom, Bulgular ve Laboratuar	18
3.1.3.7. NAYKH / NASH'in Tanısı	19
3.1.3.8. NASH tedavisi.....	19
3.1.4.1. Steatohepatit deneysel modelleri.....	20
3.1.4.2. Genetik olarak obez <i>ob/ob</i> fare	20
3.1.4.3. Genetik olarak lipoatrofik fare	21
3.1.4.4. Metionin-Kolinden yoksun diyetle beslenen normal fare ya da rat	22
3.1.4.5. Yağdan zengin diyetle beslenen rat.....	22
3.1.5.1. Melatonin Sentezi, Salınması ve Metabolizması	23
3.1.5.2. Melatoninin Etkileri	24

3.1.5.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi	24
4.GEREÇ VE YÖNTEM	26
4.1. Kan ve doku örneklerinin alınması	28
4.2.1.Biyokimyasal Parametreler	28
4.3.2. Plazma ve doku MDA ölçümleri.....	28
4.3.3. Glutasyon düzeyleri	28
4.3.4. Sitokin düzeyleri	29
4.3.5.İnsulin direnci.....	29
4.4.1.Histopatolojik inceleme.....	29
4.4.2.İmmunohistokimyasal inceleme.....	30
4.5. İstatistik değerlendirme	30
5.BULGULAR	31
5.1.Biyokimyasal parametreler	33
5.2.Oksidatif stres ölçümü.....	34
5.3.İnsulin direnci.....	35
5.4.Serum TNF α düzeyi	35
5.5.Histopatolojik incelemeler	36
6. TARTIŞMA	42
7.KAYNAKLAR.....	47
8.ÖZGEÇMİŞ.....	60

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Non Alkolik Steatohepatit Etyolojisi	12
Tablo 2: Yağ dokusundan salgılanan ve NASH patogenezinde rolü olan faktörler	15
Tablo 3: Non alkolik steatohepatitin global aktivitesi.....	18
Tablo 4 : Non alkolik steatohepatit için fibrozis evrelemesi.....	18
Tablo 5: Yağdan zengin diyet ve standart diyet içerikleri.....	26
Tablo 6: Melatonin ve yağdan zengin diyet ve kontrol gruplarında ortalama vücut ve karaciğer ağırlıkları	31
Tablo 7: Melatonin ve yağdan zengin diyet ve kontrol gruplarında biyokimyasal parametreler, insulin direnci ve TNF- α düzeyleri	33
Tablo 8: Melatonin ve yağdan zengin diyet ve kontrol gruplarında plasma, karaciğer doku malondialdehide ve glutasyon düzeyleri.....	34
Tablo 9: Gruplarda histopatolojik bulgular	37

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: NASH patogenezinde iki darbe hipotezi	14
Şekil 2: NASH Patogenezinde Genetik Faktörler.....	16
Şekil 3: Ratlara verilen yağdan zengin diyet içeriği	27
Şekil 4: Yağdan zengin diyetle beslenen ratlar	27
Şekil 5a: Normal rat karaciğerinin makroskopik görünüşü	32
Şekil 5b: Yağlı karaciğerin makroskopik görünüşü	32
Şekil 6: Melatonin uygulanan gruplarda insulin direncinde anlamlı azalma.....	35
Şekil 7: Melatonin uygulanan gruplarda TNF α anlamlı azalma.....	36
Şekil 8 a: Normal karaciğer dokusu	37
Şekil 8b: Yağdan zengin diyetle beslenen ratların karaciğer dokusu; H Ex200)	3
Şekil 8 c: Grup 3 (YDZ+melatonin 10 mg/kg,i.p)'de steatoz, nekroz, inflamasyon grup 2' ye göre azalmıştı.....	38
Şekil 8 d: Grup 3 (YDZ+melatonin 50 mg/kg,i.p)'de steatoz, nekroz, inflamasyon grup 2' ye göre azalmıştı.....	39
Şekil 9a: Karaciğer dokusunda CYP 2E1 ekspresyonu (grup 2'den midzonal boyanma) ..	40
Şekil 9b: Karaciğer dokusunda CYP 2E1 ekspresyonu (grup 4'den midzonal boyanma) .	40
Şekil 10a: Grup 2'den karaciğer dokusunda α - sMA ekspresyonu	41
Şekil 10b: Grup 4'den karaciğer dokusunda α - sMA ekspresyonu.....	41

KISALTMALAR LİSTESİ

NFκB	: Nükleer faktör kapa beta
TNF α	:Tümör nekrozis faktör alfa
TNF α mRNA	: Tümör nekrozis faktör alfa mesenjer ribonükleik asid
Sitokrom P450 mRNA	: Sitokrom P450 mesenjer ribonükleik asid
İL-1β	: İnterlökin 1-beta
ATP	: Adenozin trifosfat
İL-6	: İnterlökin 6
NE	: Norepinefrin
İKK-β	: İnhibitör kinaz kapa beta
HDL-kolesterol	: High density lipoprotein
VLDL	: Very low density lipoprotein
ELISA	: Enzim linked immuno assay

1.ÖZET

Bu çalışmada güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan melatoninin deneysel modelde nonalkolik steatohepatit tedavisinde rolünü araştırmayı amaçladık. Çalışmada eşit sayıda 4 gruptan oluşan 40 adet erkek Sprague-Dawley ratlar kullanıldı. Birinci grup standart rat yemi ile beslendi. İkinci grup yağdan zengin diyet (YZD), Üçüncü grup YZD +Melatonin (6. haftadan itibaren, her gün 10 mg/kg, i.p), Dördüncü grup YDZ+ Melatonin (6. haftadan itibaren, her gün 50 mg/kg, i.p) ile beslendi. Çalışma 8. hafta sonunda sonlandırıldı ve ratlar dekapitasyonla öldürüldü. Ratlardan biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için karaciğer örnekleri alındı. Serum biyokimya analizleri, plazma malondialdehyde (MDA), karaciğer doku MDA ve glutatyon düzeyleri çalışıldı. CYP2E1 ve α -sMA ekspresyonunu göstermek için immunohistokimyasal boyama yapıldı. YZD ile beslenen ratların hepsinde NASH oluştu. Oksidatif stres, CYP 2E1 ve α -sMA ekspresyonu, insulin direnci ve serum tumor necrosis factor α (TNF- α) düzeyleri steatohepatit gelişen ratlarda artmıştı. Melatonin serum alanin aminotransferaz düzeyleri ile birlikte karaciğerde steatozis ve inflamasyonu azalttı. CYP 2E1 ekspresyonu, karaciğer MDA düzeyi, insulin direnci ve serum TNF- α düzeyi melatonin alan gruplarda azaldı. Glutatyon düzeyleri melatoninle arttı. α -sMA ekspresyonu yalnızca melatoninin 50 mg/kg dozunda azaldı. Melatonin deneysel steatohepatitte iyileştirici etkili görünmektedir. Melatoninin günde 50 mg/kg uygulanması, daha yararlı görünmektedir.

Anahtar kelimeler: Yağdan zengin diyet, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, melatonin, tedavi

2. ABSTRACT

The role of melatonin in the treatment of the experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high fat diet

The aim of this study was to investigate to the therapeutic effect of administration of melatonin in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high fat diet (HFD). Forty male Sprague-Dawley rats were divided into four equal groups randomly. First group received only standard rat diet (control group). Groups 2, 3 and 4 were given HFD ad libitum. After the six weeks, 10 mg/kg/day ve 50 mg/kg/day melatonin was administered intraperitoneally to the group 3 and 4 (respectively). After eight weeks all rats were killed. Serum biochemistry, tumor necrosis factor α (TNF- α), plasma and liver tissue malondialdehyde (MDA), glutathione levels were analyzed. Histopathologically; steatosis, ballooning degeneration, inflammation and fibrosis were scored. Immunohistochemical staining was done for CYP2E1 and α -sMA expression. All rat developed NASH feed by HFD. Oxidative stress, CYP 2E1 and α - sMA expression, insulin resistance and serum TNF- α levels were increased in rats with steatohepatitis. Melatonin was effective in reducing hepatic steatosis and inflammation with lowering serum alanine aminotransferase. CYP 2E1 expression, liver MDA level, insulin resistance and serum TNF- α level were decreased by administration of melatonin. Glutathione levels were increased by administration of melatonin. α -sMA expression were decreased only by administration of 50 mg/kg dose of melatonin. This study shows that melatonin was effective in the treatment of steatohepatitis. The administration of 50 mg/kg dose of melatonin seems to more beneficial.

Key Words: High Fat Diet, Non alcoholic Fatty Liver Disease, Melatonin, Treatment

3. GİRİŞ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), anlamlı alkol alımı olmadan basit steatozisten, nonalkolik steatohepatite (NASH) kadar değişen spektruma sahiptir (1-5). NASH, NAYKH'nın daha ciddi ve progressiv formu ve/veya subtipi olarak kabul edilmektedir (5). Nonalkolik yağlı karaciğer daha çok benign kabul edilirken, NASH'in % 15 oranında siroza progresyon gösterdiği bildirilmektedir. Nonalkolik steatohepatitin (NASH) makroveziküler steatozis, lobuler inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve nekroz, Mallory cisimciği ve presinuzoidal fibrozise kadar değişen geniş histopatolojik spektrumu vardır (5-8).

NASH patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Sitokinler, serbest yağ asitleri, mitokondriyel disfonksiyon, bakteriyel endotoksinler, vasküler bozukluklar NASH'te hepatic inflamasyon ve fibrozis gelişiminde önemli role sahiptir (3,9,10). NASH'te insulin direnci sonucu, serum yağ asitleri artar ve direk hepatotoksikler serbest oksijen radikallerinin hasar oluşturmaya neden olurlar (11). Serbest oksijen radikalleri muhtemelen NFκB translokasyonu üzerinden sitokinlerin üretimini artırır (12). TNF α'da insulin direnci ve hepatic inflamasyonu artırır (13). Oksidatif stres artışı mitokondriumlardaki yapısal bozukluklara neden olur ve respiratuvar zincirin bozulmasına neden olur (14).

Son zamanlarda geliştirilen yağdan zengin diyetle 3 hafta sürede insanlardaki nonalkolik steatohepatite benzer bulgular saptanmıştır. Standart diyet enerjinin % 35'i yağdan , %18'i proteinden ve % 47'si karbonhidrattan sağlanırken, yağdan zengin diyetle ise %71'i yağdan, %11'i karbonhidrattan ve %18'i ise proteinden sağlanmaktadır. Bu modelde 3 hafta sonunda steatohepatitin histolojik bulguları ile

birlikte hepatik TNF α , TNF α mRNA, oksidatif stres artışı, sitokrom P450 mRNA düzeylerinde artış saptanmıştır (15).

Pineal gland tarafından sentezlenen bir hormon olan melatoninin çok farklı biyolojik etkileri vardır. Bunlardan ikisi antioksidan ve antiinflamatuvar etkileridir. Melatonin karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarında oksidatif stresi azaltıcı etkileriyle birlikte NF-kappa β ekspresyonunu TNF- α ve İL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği saptanmıştır (16). Thioacetamide ile oluşturulan karaciğer hasarında NF-kappa β aktivasyonunu inhibe etmiştir (17). Kolesterolde zengin diyetle beslenen ratlarda yapılan çalışmada ise melatonin karaciğer hasarını azaltıcı yönde etkili bulunmuştur (18).

Nonalkolik steatohepatitin günümüzde ideal bir tedavisi yoktur. Bu çalışmada güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan melatoninin deneysel modelde nonalkolik steatohepatit tedavisinde rolünü araştırmayı amaçladık.

3.1 .GENEL BİLGİLER

3.1.1 Karaciğerin anatomisi

Karaciğer 1200-1500 gram ağırlığında, vücudun en geniş organıdır. Toplam erişkin vücut ağırlığının 1/5'ini teşkil eder (19). Karaciğeri her taraftan saran ve karaciğerin damarları içerisine uzantılar gönderen bağ dokusundan yapılmış kuvvetli bir fibröz kapsül (Glisson kapsülü, tunica fibrosa) vardır. Bu şekilde karaciğerin şekli korunur. Sagittal kesitlerinde kama şeklinde görünen karaciğer kabaca üçgen prizma şeklindedir (20).

Karaciğer karnın sağ üst kadranda bulunur. Diafragmanın altında, sağ kosta yanının önden sınırladığı alanda bulunur ve bir miktar sol kadrana doğru uzantı gösterir (21). Karaciğerin diyafragma ile komşu olan konveks üst yüzüne diyafragmatik yüz, iç organlar ile komşu olan konkav alt yüzüne visseral yüz adı verilir (20). Karaciğerde sağ ve sol lob olmak üzere iki lob vardır. Sağ lob, sol lobdan yaklaşık olarak 6 kat daha büyüktür. Sağ lobun daha küçük segmentleri olan kaudat lob posteriyor, quadrat lob inferiyor yüzey üzerindedir. Sağ ve sol lob birbirinden anteriyorda ligamentum falciforme tarafından, posteriyor'da fissura ligamentum venosum tarafından, inferiorda fissura ligamentum teres tarafından ayrılır (19). Fissura ligament teres ve fissura ligamenti venosi'nin birlikte oluşturdukları yarığa fissura sagittalis sinister adı verilir (20).

Karaciğer 8 segmentten oluşur. Kaudat lob segment I, sol lobun lateral bölümünün posterior kısmı segment II, anterior kısmı segment III ve medial bölümü segment IV'ü oluşturur. Sağ lobun anteromedial bölümün alt kısmını segment V, üst kısmını segment VIII, posterolateral bölümün ön kısmını segment VI ve arka kısmını segment VII meydana getirir. Sol hepatic ven segment II ve III'ü, orta hepatic ven segment IV ve V ile VII'i, sağ hepatic ven ise segment VI ve VII'yi

drene eder (22). Karaciğer kanlanması portal ven ve hepatic arter olmak üzere iki sistemden desteklenir. Portal kan akımı tüm ince barsaklar boyunca emilime uğrayan sindirilmiş besin maddelerinden zengin olan maddeleri karaciğere taşır (19). Karaciğere gelen kanın %20'sini A. hepatica propria, %80'ini ise V. porta hepatis taşır. Pankreasın arkasında V. mesenterica inferior, V. lienalis ile V. mesenterica superior'un birleştiği noktaya dökülür. Her üçü birleşerek vena portayı oluşturur. V. porta ductus koledokus ile a. hepatica propria'nın arkasında seyrederek. Çok sayıda küçük venler vena portaya katılır (23). Truncus coeliacus'tan çıkan A. hepatica communis, A. gastroduodenalis ve A. gastrica dekstra dallarını verdikten sonra a. hepatica propria adını alır. Porta hepatis'te A. hepatica propria ve V. porta hepatis dekstra ve sinistra olmak üzere ikişer dala ayrılır. Karaciğer dokusu içerisinde de tekrar intersegmental ve interlobüler dallara ayrılır. A. hepatica propria, V. porta hepatis ve safra kanallarının interlobüler dalları portal üçgeni oluşturur. Portal üçgen karaciğer lobüllerinin köşelerinin birleştiği yerde bulunan ve Kiernan aralığı adı verilen bölgelerde yer alır. V. porta hepatis sinüzoidlere açılan daha ince dallara ayrılır. Bu dallar karaciğer sinüzoidlerinin periferal kısmına açılır (20). Hepatic arterlerde dallanarak interlobüler arterleri oluşturur. İnterlobüler dallar sinüzoidlere periferal veya v.centralis'e yakın kısımlarda açılır. Bu şekilde sinüzoidlere portal venöz ve arteriyel kan gelir (20). Kan klasik karaciğer lobülünün periferinden santrale doğru akmaktadır. Arteriyel sistemden gelen kanın başlıca fonksiyonu karaciğer hücrelerine gerekli olan oksijeni sağlamaktır (19). Karaciğer vücudun en büyük lenf kaynaklarından. Total lenf volümünün %15-20'sini oluşturur. Karaciğer lenfası oldukça yüksek protein ve hücre içerir (23). Karaciğerin lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere 2 grup şeklindedir. Yüzeysel grup lenf damarları peritonun altındaki areolar bağ dokusu içindedir. Derin

gruptaki lenf damarları birleşerek yukarı ve aşağı giden iki trunkus oluşturur. V. hepatica'yı izleyerek yukarı doğru giden lenf damarları sonunda V. cava inferior'un terminal kısmında bulunan lenf nodüllerine, aşağı doğru uzanan lenf damarları ise porta hepatis'te nodi hepatici'ye drene olur (20). Karaciğeri innerve eden sempatik sinir lifleri medulla spinalisin torakal 7-10 segmentleri arasında yer alan columna intermediolateralis'ten çıkar ve plexus coeliacus'ta sinaps yaptıktan sonra N. splanchnicus majorlar ile karaciğere gelir ve damarların etrafında seyrederek karaciğere dağılır. Parasempatik sinir lifleri ise truncus vagalis anterior ve truncus vagalis posterior'un rr. hepatici'lerinden gelir.

3.1.2. Karaciğerin histolojisi

Karaciğer içe bakan yüzeyinde hepatik arter, hepatik ven, hepatik kanallar ve sinirlerin girip çıktığı genişçe bir portal alana sahiptir. Hepatik kanallar sağ ve sol büyük loblardan gelen kanallardır. Bu kanallar birleşerek esas hepatik kanalı oluştururlar. Bu da sistik kanal ile birleşir. Ana safra kanalı safrayı duodenuma boşaltır (24).

Karaciğerin histolojisi içinde lobüller tipiktir. Bunlar hegzagonal şekilli ve çoğunlukla kesitlerde septalara ayrılmış görünümündedirler. Her bir lobül karaciğerin tüm fonksiyonlarının üstlenildiği bir birim niteliğindedir. Her lobülün merkezinde ise merkezi ven bulunur. Merkezi venden dışa doğru ışınları kordonlar halinde parankimatik karaciğer hücreleri (hepatosit) yerleşim gösterirler (24). Hepatositler karaciğerin % 60'ını kapsar. Poligonal şekilli ve yaklaşık olarak 30 µm çapındadırlar. Nükleusları tektir veya daha az sıklıkla mitoz ile bölünmüş ve multipldir. Yaşam süreleri deneysel hayvanlarda yaklaşık olarak 150 gündür. Hepatositler üç yüzeye sahiptirler. Bir yüzeyi sinüzoid ve disse aralığı ile, ikinci yüzey kanalikülle, üçüncü yüzey komşu hepatositlerdir. Hepatositler bazal membrana

sahip değildirler (19). Bol miktarda glikojen ve yağ damlası içeren hepatositlerin dizilimleri arasında sinüzoidal alanlar kalır (24). Hepatositlerin sinüzoide bakan yüzeyinde bol miktarda mikrovillus bulunur. Bu hücrelerin özellikle mitokondriler olmak üzere organelleri de iyi gelişmiştir. Lizozomlar hücre içi elemanların fagosite edilmesini, peroksizomlar ise detoksifikasyonu ve yağ asitlerinin yıkımını gerçekleştirirler (24). Disse aralığı hepatositler ile sinüzoidal endotelial hücreler arasında kalan doku aralığıdır. Hepatik lenfatikler endotelium boyunca dizilir ve peri portal bağ dokusunda bulunurlar. Doku sıvısı endotelium içinden lenf damarlarına sızar (19).

Sinüzoidal alanların içini oldukça yassılaştırmış nukleuslara sahip olan endotelial hücreler ile retikulo-endotel-sisteme (RES) ait olan yıldız şeklinde Kupffer hücreleri döşer (24). Kupffer hücresi çok değişik şekillerde, membranı girintili çıkıntılı özelliktedir. Bir membranla çevrili mikropinositik veziküller, makropinositik vakuoller, solucanımsı invaginasyonlar gösterir. Hücre içi çok zengin lizozomal yapılara sahiptir. Çok iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi hücrede aktif bir protein sentezi olduğunu göstermektedir (25).

Kupffer hücresinin salgıladığı monokin ve sitokinler önce bu hücreyi aktifleştirir sonra hepatositlerle etkileştirip fonksiyonlarını yönlendirirler. Hepatositlerle olan en geniş etkileşim reseptörlerle düzenlenen haberleşmedir. Kupffer hücreleri ve sinüzoidal endotelial hücreler Fc reseptörlerine sahiptir ve erimiş immun komplekslerin temizlenmesinde rol alırlar (26). Önemli hücreler arası ilişkilerde bulunmasına rağmen esas işlevi fagositik özelliği üzerinedir. Kupffer hücreleri geniş spektrumdaki unsurları fagosite eder. Yapılan fagositoz neticesi Kupffer hücreleri prostaglandinler, interlökin (IL), tümör nekrozis faktör (TNF) ve değişik sitokinler gibi faktörler salgırlar. Yoğun bir fagositoz gerektiği zaman

Kupffer hücre salgısının hepatosit sitokrom P-450 mekanizmasını baskıladığı ortaya konulmuştur (27).

Kupffer hücresinin tümör hücrelerini de fagosite ettiği gösterilmiştir (28). Ayrıca kısmi karaciğer eksizyonunda hepatositlerin DNA sentezini rejenerasyon için stimüle ettiği, karaciğer lipositleri ile sitokinler aracılığı ile iletişim halinde oldukları ve bu etkileşim ile lipositlerin fibroblastik hücrelere transformasyonuna yönlendirdiği bildirilmiştir (29). Kupffer hücrelerinin bir enfeksiyon bariyeri olduğu da çeşitli çalışmalara ortaya konulmuştur (30). Sinüzoidal hücreler olarak kupffer hücrelerinden başka endotelial hücreler, hepatik stellat hücreler (HSH) ve pit hücreleri vardır. Fonksiyonel ve histolojik olarak birlikte sinüzoidal form oluştururlar (31).

Endotelial hücreler disse aralığı ve sinüzoid arasında fenestraya sahip olup dereceli bariyer sağlarlar. Spesifik ve nonspesifik endositotoksik aktiviteye ve değişik reseptörlere sahiptirler. Endositoz için yüksek kapasiteye sahip olup makro moleküllerin ve küçük partiküllerin sirkülasyondan temizlenmesi esnasında aktifleşirler (32). HSH (yağ depolayan hücreler, lipositler, Ito hücreleri) disse mesafesinin subendotelial tarafındadır. Uzun sitoplazmik uzantılara sahiptirler. Parenkimal hücreler, kan akımını regüle eden sinüzoidlerle yakın temas halinde olduklarından portal hipertansiyondan etkilenirler (33). Normal karaciğerde retinoidleri başlıca depo ederler ve onlara sitoplazmik yağ damlacıkları olan morfolojik karakteristik özelliğini verirler. Bu hücreler aktin ve miyozin içerirler ve endotelin-1 ve substans -P için cevapta kontrakte olurlar (34). Hepatosit hasarında hepatik stellat hücreler kendi yağ damlacıklarını, proliferasyonu, asinusun Zone 3 migrasyonunu, miyofibroblast benzeri fenotip değişikliğini, tip I, III, IV ve laminin üretimini kaybederler (35).

Pit hücreler endoteliumun sinüzoidal yüzeyinde oldukça yüksek mobilite gösteren karaciğere spesifik natural killer lenfositlerle bağlantılı hücrelerdir (36). Yaşam süreleri kısadır ve sinüzoid içindeki farklı büyük granüler lenfositlerin sirkülasyonundan yenilenirler. Karakteristik granülleri vardır. Pit hücreler tümörlere ve virüs enfekte hepatositlere karşı spontan olarak sitotoksite gösterirler (19).

Hepatositler bol oksijenli kandan yararlanma derecelerine göre üç alanda gruplanır. En iyi kanlanan periportal kısım “alan 1”, en az kanlanan perivenüler kısım “alan 3” olarak adlandırılır. Alan 1 ile alan 3 arasındaki kısım “alan 2” olarak adlandırılır. İskemik olaylardan en çok 3 üncü alandaki hepatositler etkilenir. Safra akımı kabaca kan akımını tersi yolu izleyerek (alan 3’ten alan 1’e doğru) karaciğer parankimini portal alanlardan terk eder (37).

3.1.3. Nonalkolik steatohepatit (NASH)

3.1.3.1. Tanım

Steatozis, inflamasyon ve sirozun obezite ve diyabet ile ilişkisi 1958’ den beri bilinmektedir (38). Peters ve arkadaşları tarafından 1975’ de nonalkolik hastalarda steatohepatit tanımlanmıştır (39). Adler ve Schaffner tarafından 1979’ da bu hastalık 29 fazla kilolu hastada karakterize edilmiştir (40). 1980’ de Ludwig ve arkadaşları ilk defa nonalkolik steatohepatit (NASH) terimini Mayo Klinik’ten nonalkoliklerde benzer histolojik bulgular gösteren hastalar için kullanmışlardır (9).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), basit steatozisten, steatohepatit, ileri derecede fibrozis ve siroza kadar, karaciğer hasarının geniş spektrumunu içeren klinikopatolojik bir tablo olarak tanımlanmaktadır (1-5). Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) klinikopatolojik kriterlere göre tanımlanmaktadır (41). Klinik olarak anlamlı miktarda alkol alımı olmaması (genel olarak ikiden fazla kadeh alınmaması) olarak tanımlanmaktadır. Patolojik olarak ise hastalığın birkaç paterni

vardır: Olmazsa olmaz özelliği makroveziküler yağlanma ve steatozisin bulunmasıdır. Eğer bu izole ise hastanın basit steatozis ve yağlı karaciğeri olduğu söylenir. Hastaların çoğu bu durumu kolay tolere ederler ve siroza ilerleme potansiyeli çok nadirdir. Steatozisli bazı hastalarda nonspesifik inflamatuvar infiltrasyonla nekroinflamatuvar aktivite, Mallory hyalen ile hepatositte balonlaşma dejenerasyonu bazen de fibrozis süperpoze olur. Bu tablo nonalkolik steatohepatit olarak adlandırılır. Bu hastaların bazılarında siroz gelişecektir. Hasta hepatosellüler karsinom ve karaciğer ile ilişkili bir nedenle komplike olarak ölebilir (41-43).

NAYKH Dünyada sık bir karaciğer hastalığıdır. NAYKH' in gerçek prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Basit steatozisin prevalansı %20-30 ve NASH prevalansı ise % 2-3 olarak hesaplanmaktadır (44).

NASH'in iki tipi vardır: Primer NASH obezite, hiperlipidemi, tip 2 diabet ile metabolik sendromla ilişkilidir. NASH'in dominant formudur. Sekonder NASH ise obezite ile ilişkili cerrahi sonrası, obezlerde hızlı kilo kaybı, total parenteral beslenme, amiodoran, perheksilin maleate, lipodistrofi, Wilson hastalığı gibi durumlardır (10,45). Tablo 1'de Non alkolik steatohepatitin etyolojik dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 1: Nonalkolik steatohepatit etyolojisi

Metabolik sendrom	<i>İlaçlar</i>
Sentral obezite	Amiodaron
Tip 2 diabetes mellitus	Nifedipin
Hiperlipidemi	Diltiazem
Hızlı kilo kaybı	Tamoksifen
Total parenteral beslenme	Östrojenler
	Glukokortikoidler
	Metotreksat
Cerrahi prosedürler	Diğer nedenler
Geniş ince barsak rezeksiyonu	A beta ve/ hipolipoproteinemi
Jejunioileal bypass	Aşırı bakteri çoğalması
	Parsiyel lipodistrofiler
	Weber-Christian hastalığı

NAYKH'nın prognozu değişkendir. Tanı esnasında yapılan biyopside ki şiddete bağlıdır. Basit steatozis genellikle progresyon göstermez, NASH histolojik ve klinik olarak progresyon gösterir. Prospektif tekrarlayıcı biyopsi ile NASH'li hastaların ortalama 4.3 yılda %31.8'inde fibrozise progresyon gösterdiği saptanmıştır. NASH'li hastaların %10-15'inde histolojik olarak doğrulanmış siroz saptanmıştır (44, 46-48).

NASH'e götüren nedenler çok çeşitlidir. Etyopatogenezi komplekstir. Day CP'e göre ilk kez 1998 yılında geliştirilen hipoteze göre, NASH patogenezi başlangıçta steatozis gelişimi birinci darbe diğer zedeleyici etkenlere maruz kalma ikinci darbe olarak adlandırılmaktadır. Birinci darbede karaciğerin yağlı dejenerasyonu ya da steatoz için substrat olan yağın hepatositlerde birikimidir. İnsulin direnci burada primer olarak rol oynar. Primer insulin direnci hiperinsulinemi oluşumuna yol açar ve metabolik sendromla ilişkilidir. Yağ dokusundan karaciğere yağ asidlerinin transportu artmıştır. Bu yağlı dejenerasyon

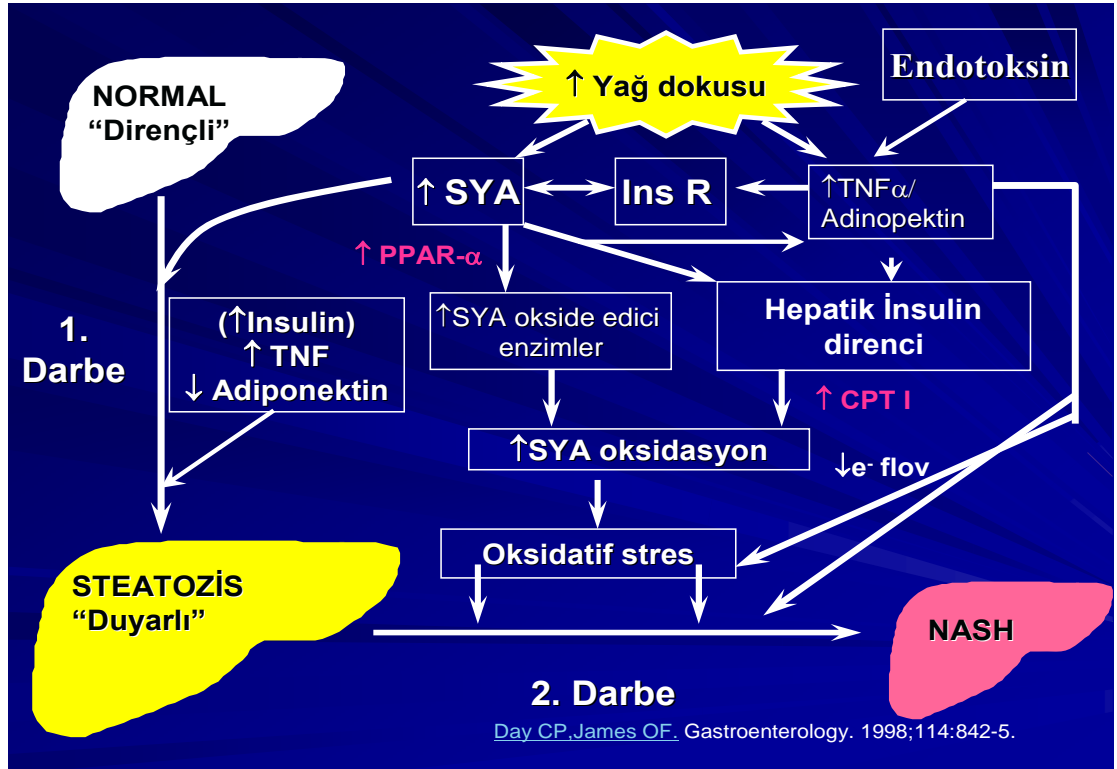
organın ikinci darbeye duyarlılığını arttırır. Karaciğer ikinci darbeye kadar yalnızca basit steatozis olarak kalır. İkinci darbe barsağa ilişkin prosedürlerden, belli ilaçların kullanılmasından ya da tip 2 diabetes mellitus gelişiminden biri olabilir. Serbest yağ asidlerinin ani yükselmesi bu senaryoda önemli rol oynamaktadır. NASH tip 2 diabetes mellitus, sentral obezite, ani kilo kaybı gibi serbest yağ asidlerinin mobilizasyonuna ve karaciğere alınmalarına yol açan durumların var olduğu hastalarda ortaya çıkmaktadır. Serbest yağ asidleri hepatositlerde, mitokondride ve diğer hücre organellerinde oksitlenmekte ya da trigliseridlerin, fosfolipid ve kolesterol esterlerinin sentezi amacıyla kullanılmaktadır. Eğer serbest yağ asidleri miktarı aşırı artarsa yağ metabolizması çok aktifleşir, yıkım yetersiz kalır ve trigliseridler birikir. Yüksek düzeyde aktifleşmiş yağ metabolizması serbest radikallerde artışla ilişkilidir. Yağlı karaciğerde artmış yağ içeriği lipidlerde β -oksidasyonda artma, serbest radikallerin daha fazla artmasına ve ATP' de azalma ile korelasyon gösterir.

İkinci darbede oksidatif stres ve sitokinler (başlıca TNF α) NASH'de önemli role sahiptir. Bu insülin direncini daha fazla arttırır. Karaciğer hücrelerinde organel disfonksiyonu oksidatif stresi arttırır. İnflamatuvar süreçle sonlanır. Hepatosellüler dejenerasyon ve fibrozis gelişimi ile sonuçlanır (49). Şekil 1'de iki darbe hipotezi gösterilmiştir.

3.1.3.2. Obezite, insülin direnci ve adipositokinler

İntraabdominal yağ dokusundan serbest yağ asidlerinin portal ven aracılığı ile karaciğerde birikimi artmıştır. Karaciğer hücresinde trigliserid şeklinde depolanır ve kana salgılanır. Yağ dokusunun nöroendokrin rolü olduğu saptanmış ve kabul

görmüştür. Yağ dokusundan çeşitli hormonlar salgılanır. Bunlar Leptin, resistin ve adiponektindir.



Şekil 1: NASH patogenezinde iki darbe hipotezi (Kaynak 12'den)

Yağ dokusundan aynı zamanda NE ve angiotensin II ve PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1) gibi nörotransmitterlerde salgılanır. Yağ dokundan ayrıca TNF α ve İL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerde salgılanır (50,51). Serbest yağ asidlerinin (SYA) aşırı sekresyonu, TNF α 'nın yüksek düzeyleri düşük düzeyde adiponektin karaciğerde ve kasta insulin sinyalizasyonunu bozar. İnsulin direncinde artışa neden olur. İnsulin reseptör substrat (IRS-1ve IRS-2) mikrozomal trigliserid transfer protein karaciğerde yağ akümülyasyonuna neden olur. Oksidatif stres reaktif oksijen radikalleri tarafından oluşturulur. Yağlı karaciğerde nekroinflamasyon

oluşmasına yol açar. Bu süreci insulin direnci hızlandırır. Adipositokinlerde 2. darbeyi hızlandırırlar.

Fibrozis NAYKH' ında inflamasyon ve zedelenmeye karşı normal iyileşme mekanizmasıdır. Obeziteyi etkileyen faktörler ve insulin direnci direk olarak fibrojeniktir (52,53). Angiotensinojen, norepinefrin ve leptin'de insulin ve glukoz gibi fibrojenik etkilir (51).

Leptin yağ akümülyasyonunu ve fibrozisi hızlandırır. Leptin yoksun ob/ob mice'larda leptin verilmesi siroz gelişimine yol açtığı bulunmuştur (54). Leptinin potent bir NE stimulanı olduğu saptanmıştır. NE ise profibrojenik bir faktördür. Ob/ob mice'lara NE verildiğinde karaciğerde fibrozis geliştiği gösterilmiştir. Bu ratlarda hepatik stellate hücre aktivasyonunu arttırdığı bulunmuştur. Çeşitli profibrojenik sitokinlerin karaciğerde düzeyleri artmıştır (55). Yağ dokusundan salgılanan ve hepatik inflamatuvar cevapta rolü olan faktörler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Yağ dokusundan salgılanan ve NASH patogeneğinde rolü olan faktörler

Hormonlar

Leptin
Resistin
Adiponektin

Sitokinler

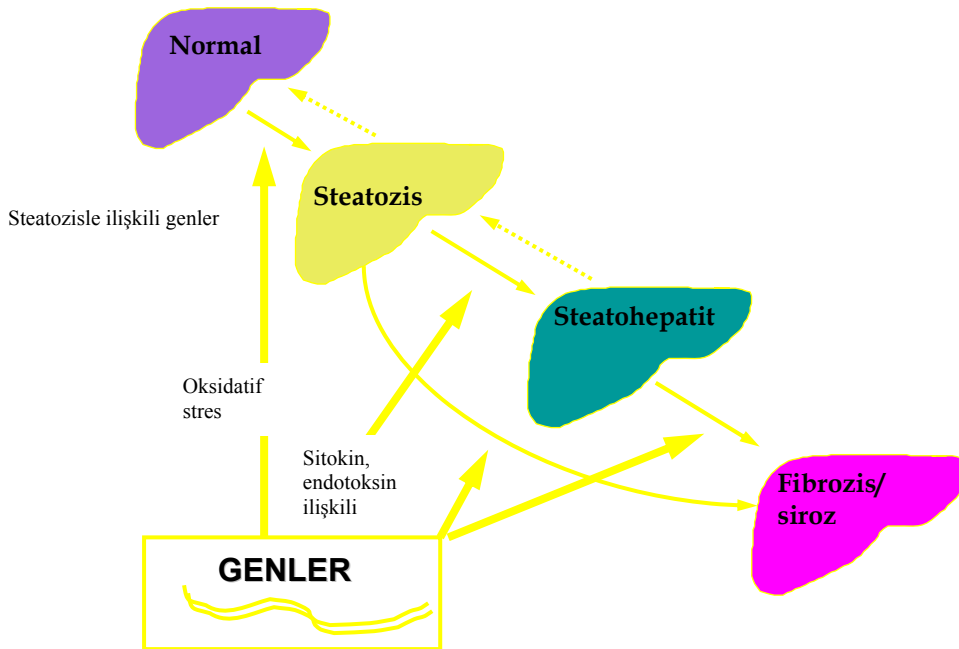
TNF α
PAI

Nörotransmitterler

Norepinefrin
Angiotensin

3.1.3.3. Genetik faktörler

Willner ve ark. NASH'li 90 hastanın %18'inin 1. dereceden akrabalarının etkilendiğini göstermiştir (56). Karaciğer lipid metabolizmasının sentez, depolanma ve trigliseridlerin karaciğerden çıkışını düzenleyen enzimleri kodlayan genlerde poliformizm kişilerde steatozun derecesini belirler (57). Bunlardan mikrozomal trigliserid transfer protein (MTP) geninde poliformizm saptanmıştır. MTP VLDL'in karaciğer ve barsaktan sentez ve sekresyonunda kritik role sahiptir (58). Uygun yağ asidi oksidasyonu karaciğerde yağ akümülyasyonunu önlemek için gereklidir. Aşırı yağ asidi oksidasyonu oksidatif stres artışına yol açar. Mitokondriyel serbest yağ asidi oksidasyonu inflamasyon ve fibrozis progresyonu için gereklidir. Peroksizomal ve mikrozomal yağ asidi oksidasyonu serbest oksijen radikallerinin artışına yol açar. Bu proteinleri kodlayan enzimlerde genetik poliformizm NASH'e predispozisyonu hazırlar (57). NASH patogenezinde genetik faktörlerin rolü şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: NASH patogenezinde genetik faktörler

3.1.3.4. Çevresel faktörler

NASH'li hastalarda sağlıklı bireylere göre doymuş yağlarla ve kolesterolden zengin beslenme, doymamış yağ asidlerinden fakir yağ, fiber, vitamin E ve C daha düşük diyetle beslenme, obez karaciğer hastalığı olmayan bireylere göre daha yüksektir (59). Diyete doymamış yağ asidleri ilavesi steatozisi azaltıp, insülin duyarlılığın arttırmaktadır. Diyetteki doymamış yağ düzeyleri ile düşük insülin düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (60).

3.1.3.5. İntestinal bakteriyeminin rolü

Endotoksine bağlı sitokin üretiminin NASH patogenezinde rolünü destekleyen bulgular vardır. NASH'li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre ince barsaklarda artmış bakteriyel aşırı çoğalma olduğu bulunmuştur (61). NASH'de sitokinler, özellikle TNF α barsaklardaki floradan salgılanan endotoksine cevap olarak Kupffer hücrelerinden ve aynı zamanda artan serbest yağ asidlerine bağlı olarak hepatositlerden ve yağ dokusu makrofajlarından salgılanır (62). Kupffer hücre aktivasyonu, TNF α 'nın hepatosit mitokondriyumunda, peroksizom, ve mikrozomunda serbest yağ asidi oksidasyonu artmasına bağlı olarak oksidatif stres artar (52-53). NAYKH'nin mikroskopik özellikleri alkolik yağlı karaciğer hastalığından ayrılamaz. En önemli olmazsa olmaz özelliği makroveziküler yağlanmadır. Diğer bulgular hepatosellüler balonlaşma, Mallory cisimciği, perisentral perisinuzoidal fibrozis, lobuler ve portal inflamasyondur. Glikojen nükleusu NAYKH'nda sıklıkla görülür. Fakat özgül değildir. Grade steatohepatitik lezyonların aktivitesini, evre ise fibrozis derecesini yansıtır. Brunt tarafından geliştirilen skora sistemi Tablo 3 ve 4'de gösterilmiştir (63).

NASH siroza progresyon gösterebilir. Siroz gelişince, karaciğerde steatozis azalır veya tamamen kaybolabilir. Sitolojik balonlaşma da azalabilir (64).

Tablo 3: Nonalkolik steatohepatitin global aktivitesi

Grade*	Steatozis	Balonlaşma dejenerasyonu	İnflamasyon**
Grade 1 (Hafif)	1-2	Minimal	L=1-2;P:yok, hafif
Grade 3 (Orta)	2-3	Var-zon 3	L=2;P:hafif-orta
Grade 3 (Şiddetli)	3	Belirgin-zon 3	L=3; P:Hafif-orta

*Steatozis grade 1≤%33; 2,>%33≤%66, 3,>%66

**Lobuler (fokus/20x), P=portal.

Tablo 4 : Nonalkolik steatohepatit için fibrozis evrelemesi

Evre	Zon 3 presinüzoidal fibrozis	Portal fibrozis	Köprüleşme Fibrozis	Siroz
1	Perisellüler,perisinüzoidal fibrozis, fokal veya yaygın	0	0	0
2	Perisellüler, perisinüzoidal fibrozis, fokal veya yaygın	Portal veya periportal fibrozis, fokal ve yaygın	0	0
3	Köprüleşme fibrozisi	Köprüleşme fibrozisi	+	0
4	+/-;zone 3 septalara uzanım gösterebilir.	Portal üçgene uzanım gösteren septalar	Yaygın	+

3.1.3.6. NASH'te semptom, bulgular ve laboratuvar

NASH'li vakaların çoğu asemptomatiktir (% 48-100). Ancak düşük oranda karında şişkinlik, sağ üst kadranda ağrı, halsizlik, yorgunluk gibi semptomlar

görülebilmektedir. En sık rastlanan fizik muayene bulgusu hepatomegalidir (1-3,65,66). Nadiren kronik karaciğer hastalığı veya portal hipertansiyonun bulgularına rastlanır. NASH'de hafif-orta derecede artmış aminotransferaz düzeyleri en sık rastlanan laboratuvar bulgusudur (Genellikle 2-3 kat) (1-3, 7, 65,66). NASH' te ALT/AST oranı 1'in üzerindedir. NASH'li kişilerde alkalen fosfataz (ALP) % 50'den daha az yüksek ve gama glutamil transpeptidazda yüksek saptanabilir. Bilirubin, protrombin zamanı (PTZ) ve serum albumini genellikle normal seviyededir. NASH'li vakalarda anormal serum lipid profili (hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi veya miks) veya artmış kan şekeri düzeyi yüksekliği % 25 -75 oranında yüksek saptanmıştır. Serum ferritin düzeyleri yüksek bulunabilir.

3.1.3.7. NAYKH / NASH'in tanısı

Karaciğerdeki yağın varlığı farklı görüntüleme yöntemleri kullanılarak belirlenebilirken, inflamasyon veya fibrozis tanısı için kullanılacak, doğruluğu tam, noninvaziv bir metod mevcut değildir. Ultrasonografi, komputere tomografi ve magnetik rezonans görüntüleme yöntemi karaciğerde yağ birikimini göstermek için kullanılabilir (65,66). NASH'in tanısı klinikopatolojik korelasyona bağlıdır. Steatozis ve inflamasyon steatohepatitin (NASH) en önemli özelliğidir. Bu nedenle NASH'in ayırıcı tanısı için karaciğer biyopsisi gerekmektedir. Karaciğer biyopsisi steatohepatit tanısının konulması, hastalığın şiddetinin derecelendirilmesi ve/veya evrelendirilmesi ve hastalığın yayılımının belirlenmesinde tek yöntem olmayı sürdürmektedir (63,64,67,68).

3.1.3.8. NASH tedavisi

NASH, çoğu zaman kendisine eşlik eden bazı metabolik bozukluklarla birlikte görülür. Örneğin hastaların % 50-80'inde obezitenin varlığı bilinmektedir (1-3). Bu nedenle hastalarda ilk düzeltici önlem kilo azaltılması gibi altta yatan metabolik sorunların giderilmesi şeklinde olmalıdır. Dikkat edilmesi gereken husus, hastalık

progresyonunu olumsuz etkileyeceğinden kilo kaybının çok hızlı olmamasıdır. Genellikle hastalardan üç ay içinde ağırlıklarının % 10'u kadar kilo kaybetmeleri istenir. Kilo kaybı ile beraber karaciğere olan yağ infiltrasyonunun derecesi azalır. Tedavide egzersiz de önemlidir. Egzersiz ile hastalarda obezitenin kontrolü, yağ oksidasyonunun artması, kas ve adipoz dokularda lipolizin artması hedeflenmektedir. (69). Tüm hastaların düzenli bir diyet tedavisi ve egzersiz programına alınması, kilo hedeflerinin bireyselleştirilmesi, klinik ve biyokimyasal parametreleri açısından düzenli takibinin yapılması gerekliliğidir (1,69).

Tedavisinde ideal ilaç yoktur. Hepatoprotektif ve antioksidan ilaçlar tedavide kullanılmıştır. Bu ilaçların çoğu klinik kullanıma girmemiştir. Ursodeoksikolik asid, vitamin E, C ve metforminin plasebo ile karşılaştırıldığı çalışmalarda histopatolojik iyileşme saptanmamıştır. Pentoksifilin ve antihiperlipidemiklerden atorvastatin aminotransferaz düzeylerinde iyileşme sağlamıştır. Sınırlı sayıda hastanın yer aldığı çalışmalarda probukol, betadine ile biyokimyasal ve histolojik iyileşme sağlanmıştır. Yeterli bilgi olmadığından ilaç tedavisi klinik çalışmalar dışında önerilmemektedir (3,70).

3.1.4.1. Steatohepatit deneysel modelleri

Başlıca deneysel modeller genetik olarak obez ob/ob mice, lipoatrofik mice kolinden fakir metioninden kısıtlı diyet ve yüksek yağlı diyetle oluşturulmuştur.

3.1.4.2. Genetik olarak obez *ob/ob* fare

Ob geni leptini kodlamaktadır, buradaki mutasyon leptin eksikliğine yol açmaktadır (71). Leptin beyaz yağ doku tarafından sentezlenen doygunluk hormonudur; yeme isteğini baskılar ve hipotalamus ventral median bölgesinde yer alan anoreksik nöronları etkileyerek enerji harcamasını artırır (72,73). *Ob/ob* farelerde olduğu gibi leptin yokluğunda hiperfaji ve inaktivite gelişir sonucunda

obezite başlar. Bu farelerde hiperinsülinemi, insülin direnci, hiperglisemi, hiperlipidemi ve daha önemlisi spontan olarak yağlı karaciğer gelişmektedir (73).

Genç *ob/ob* fareler histolojik olarak inflamasyon bulgularının bulunmadığı yağlı karaciğere sahiptirler. İki darbe hipotezine göre karaciğerde yağlanma birinci darbedir (74). Yağlı karaciğerde oksidatif stres ya da ilave toksik ajanlarla karaciğerde hasar oluşur. Böylelikle ikinci darbe oluşmuş olur. Tüm NASH deneysel modellerinde karaciğerde serbest oksijen radikallerinin, TNF α ve benzeri sitokinlerin arttığı ortaya konmuştur (75). *Ob/ob* yağlı karaciğer modeli karaciğerde oksidatif stresin artması ile steatohepatite yatkındırlar. Bu model iki darbe hipotezini değerlendirmek için uygun yöntemdir. Normal ratlarda hasar oluşturamayan Yang ve arkadaşları (75), lipopolisakkarid (endotoksin) ile yaptıkları çalışmada, *ob/ob* farelerde steatohepatit geliştiğini saptamışlardır. Chavin ve arkadaşları (76) yapmış oldukları çalışmada *ob/ob* farelerin iskemi-reperfüzyon ve alkol ile indüklenen karaciğer hasarına duyarlı olduklarını ortaya koymuşlardır .

3.1.4.3. Genetik olarak lipoatrofik fare

Farelere genetik olarak adiposit spesifik bölgesine difteri toksini ile müdahale edilmekte, sonucunda ise adipositlerde harabiyet oluşmaktadır (77). Adiposit farklılaşmasındaki problem sonucu adipoz dokuda generalize azalma oluşmaktadır (73,78). *Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1* ve *fosfoenol piruvat karboksikinaz* aşırı üretimi sonucunda genaralize lipoatrofi gelişmektedir (73,79). *Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1*; yağ asidi ve kolesterol sentezinde görevli birçok genin anahtar transkripsiyonel regülatörüdür. Yöntemine bakılmaksızın yağ doku kitlesini azaltan ve lipoatrofi yapan nedenler; insülin direnci, hiperinsülinemi ve karaciğerde yağlanma oluşturur. Yağ doku leptinin birincil kaynağıdır. Lipoatrofik fareler aynı zamanda leptinden yoksundurlar (73).

3.1.4.4. Metionin-kolinden yoksun diyetle beslenen normal fare ya da rat

Normal fare ya da ratlar metionin ve kolinden yoksun (MCD) diyetle beslendiklerinde ciddi şekilde hepatik antioksidanlar (glutasyon sülfat, S-adenosil methiyonin gibi) tüketilmektedir (73,80). MCD diyetle beslenen deney hayvanlarında oksidatif savunma sisteminin baskılanması sonucunda oksidatif stres artar (14,81). Bunun da TNF α ve diğer proinflamatuvar sitokinleri indüklediği bilinmektedir (49). Artmış oksidanların ve TNF α 'nın İKK- β yolunu aktive ettiği beklenir. MCD diyet öğreticidir çünkü steatoz ve steatohepatit patogenezinde obesiteden bağımsız olarak oksidan sistemin altını çizmektedir (73).

Homosistein metionin siklüsünün bir üyesi olan S-adenozil metionin (SAM); fosfotidil kolin sentezi için gerekli olduğu kadar (şekil-VII), glutasyon sentezi ve çeşitli moleküllerin metilasyonu için gereklidir (83). Fosfotidil etonolaminin metilasyonu sonucunda fosfotidil kolin oluşur. Oluşan fosfotidil kolin; VLDL sentezi için esansiyeldir, eksikliğinde karaciğer trigliserid miktarı artar ve steatoz ile sonuçlanır (84). MCD diyetle olduğu gibi herhangi bir şekilde kolin ve/veya metionin eksikliğinde; fosfotidil kolin ve antioksidan glutasyon sentezi azalır (83,84).

3.1.4.5. Yağdan zengin diyetle beslenen rat

YZD ile insanlardaki nonalkolik steatohepatite benzer bulgular saptanmıştır. Standart diyet enerjinin % 35'i yağdan, %18'i proteinden ve % 47'si karbonhidrattan sağlanırken, yağdan zengin diyetle ise %71'i yağdan, %11'i karbonhidrattan ve %18'i ise proteinden sağlanmaktadır (84). Periferal insülin rezistansı, artmış yağ asidi beta oksidasyonu ve karaciğer oksidatif stres artışı ve karaciğerde yağlı dejenerasyon NASH'in bilinen özellikleridir (3-6). Yağdan zengin diyetle yapılan çalışmada, 3 hafta sonunda steatohepatitin histolojik bulguları ile birlikte hepatik TNF α , TNF α mRNA, oksidatif stres artışı, sitokrom P450 mRNA düzeylerinde artış saptanmıştır (84).

3.1.5. Melatonin

3.1.5.1. Melatonin sentezi, salınması ve metabolizması

Melatonin bir indolamindir ve pinealositlerde sentez edilir. Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksi-triptofana, bu ise aromatik amino asit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) aracılığıyla 5-hidroksitriptamine (5-HT, serotonin) dönüştürülür. Pineal bezde melatonin yapılması ve salınması karanlık ile uyarılır, ışık ile baskılanır. Gün ışığının bulunduğu saatlerde retina fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir ve retinahipotalamik-pineal sistem sessizdir, bu dönemde çok az melatonin salgılanır. İnsanlarda melatonin düzeyindeki artış karanlık çökmesinden hemen sonra başlar (20:00-23:00), gecenin ortasında (01:00 ile 05:00 arasında) doruk düzeyine ulaşır, daha sonra gecenin ikinci yarısında melatonin düzeyi giderek azalır. Serum melatonin düzeyi yaşa göre değişir (85). Normal genç erişkinlerde ortalama gündüz ve gece doruk değerleri 10 ve 60 pg/ml'dir. Melatoninin sirkadiyen salınım profili her bireyde sabittir. Ancak bireyler arasında melatonin düzeyleri çok farklılık gösterir. Bu nedenle maksimal gece doruk melatonin düzeyi 30 ile 200 pg/ml arasında değişir. Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisi yoktur (86). Melatonin yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliğe sahiptir, vücutta depolanmadan kan ve vücut sıvılarına hızla karışır.

Melatonin büyük ölçüde karaciğerde hidroksilasyonla (6-hidroksimelatonin) hızla metabolize olur ve sülfürik ya da glukuronik asit ile konjuge olduktan sonra idrarla atılır. Melatonin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimelatoninidir ve idrardaki düzeyi serum melatonin düzeyi ile yakın ilişkilidir. Gece idrarındaki 6-sülfatoksimelatoninin gece melatonin sentez miktarını yansıtır. Ayrıca melatonin böbreklerde de metabolize olur. Oral verilen melatoninin biyoyararlanımı çok değişkendir. Düşük dozlarda (1-5 mg) melatonin alınmasından bir saat sonra

melatonin düzeyi gece doruk değerinden 10-100 kat daha yüksek bulunmuştur ve bu değerler 4-8 saat sonra normal başlangıç değerine düşmektedir. Gündüz verilen çok daha düşük oral dozlar (0.1-0.3 mg) normal gece doruk değerlerine yakın serum düzeyini sağlamaktadır. Melatonin çok hızlı metabolize olur. Pineal bez melatonin yapımından sorumlu tek organ değildir. Diffüz nöroendokrin sistem içinde kabul edilen amine precursör (APUD) hücrelerinde de melatonin sentez edildiği gösterilmiştir. Bu hücreler retina, lakrimal bezler, beynin diğer bölgeleri ile bronş, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, gastrointestinal sistem, timus, plasenta, over, testis ve endometriyumda yer alır. Ayrıca mast hücresi, lökosit ve doğal öldürücü hücrelerinde melatonin sentezlenmektedir (85).

3.1.5.2. Melatoninin etkileri

Melatoninin ritmik özelliğe sahip birçok biyolojik fonksiyon (vücut ısısı, solunum, dolaşım sistemi, üreme vb) üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir. Genel olarak birçok canlı türü için melatoninin çeşitli fizyolojik olaylara adaptasyonda zamana uyumu düzenlediği düşünülmektedir (85).

3.1.5.3. Melatoninin antioksidan etkisi

Vücutta normalde aerobik metabolizma sırasında süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Bu serbest oksijen radikallerinin doymamış yağ asitlerinde lipid peroksidasyonuna yol açarak hücrel hasar meydana getirmeleri karşı antioksidan sistemler ile engellenir. En iyi bilinen antioksidanlar C ve E vitaminleri ve glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi enzimlerdir. İskemi/reperfüzyon sırasında iskemik dokunun hızla tekrar oksijenlenmesi sonucunda fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşur. Melatonin iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etki gösterir (86). Melatonin, elektrondan zengin bir moleküldür ve direkt antioksidan özelliği vardır (87-89). Melatonin hem

yağda hem de suda çözüner özelliğe sahip olması nedeniyle, vücudun her hücresine, sitozole ve hücre içindeki diğler yapılarla kolaylıkla girer ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (87). Böylece dejeneratif ve proliferatif değışikliklere neden olan hastalıklara karşı nükleer DNA'yı, membran lipidlerini ve sitozolik proteinleri korur (85,87,88). Melatoninin E vitaminine göre en az iki kat, glutatyona göre beş kat daha etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (88,89). Hiperkolesterolemik sıçanlarda yapılan bir çalışmada kronik melatonin alımının lipid peroksidazı belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (90). Bu sonuçlar hiperlipidemik hastalarda lipid düşürücü ilaçlarla birlikte melatonin kullanımının ateroskleroz gelişimini azaltabileceğini düşündürmektedir.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada toplam 40 adet erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Ratlar 12 saat günışığı alan bir özel odada hazırlanmış kafeslerde muhafaza edildi. Çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kaidelerine uygun olarak yapıldı. Yağdan zengin diyet tablo 5’de ki içeriğe uygun olarak sağlandı (Dyets, Inc.Bethlehem, PA). Ratlara verilen yağdan zengin diyet şekil 3’de gösterilmiştir. Ratlar eşit sayıda 5 gruba bölündü: Grup 1 (n=10; 8 hafta normal diyet), grup 2 (n=10; 8 hafta yağdan zengin diyet (YZD), Grup 3 (n=10) (8 hafta YZD+ 6.hafta sonundan itibaren günde 10 mg/kg i.p, melatonin), Grup 4 (n=10; 8 hafta YZD+ 6.hafta sonundan itibaren günde 50 mg/kg i.p, melatonin). Sekiz hafta sonunda ratlar dekapitasyon ile öldürüldü. Yağdan zengin diyetle beslenen ratlar şekil 4’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Yağdan zengin diyet ve standart diyet içerikleri

İçerik	Standart	YDZ
	g/l	g/l
Kazein	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5
dl-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	8.5	48.5
Zeytin Yağı	28.4	28.4
Dextrin Maltoz	115.2	25.2
Kolin bitartarat	0.53	0.53
Fiber	10	10
Xanthan gum	3	3



Şekil 3: Ratlara verilen yağdan zengin diyet içeriği



Şekil 4: Yağdan zengin diyetle beslenen ratlar

4.1. Kan ve doku örneklerinin alınması

Ratlardan alınan kan örnekleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında 5000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj cihazında (Hettich, Tutlingen-Almanya) santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri analiz yapılmaya kadar -20 derecede bekletildi. Kan örneklerinin alınmasını takiben hızlı bir şekilde abdomen açıldı. Karaciğerden farklı bölgelerden doku örnekleri alınarak daha önce hazırlanmış % 10'luk formalin solüsyonu ile tespit edildi. Aynı gün içerisinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında karaciğerden alınan örneklerden rutin takip işlemlerine tabii tutuldu. Parafin blokları hazırlandı.

4.2.1. Biyokimyasal Parametreler

Ratlardan alınan kan santrifüj edilerek alınan plazma örnekleri -20 derecede analiz yapılmaya kadar bekletildi. İnsulin ELISA yöntemiyle, açlık kan glukozu, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), gama glutamil peptidaz (γ -GT), trigliserid, kolesterol düzeyleri olympus AU 600 otoanalizörde yapıldı.

4.3.2. Plazma ve doku MDA ölçümleri

Plazma MDA düzeyleri ölçümü Satoh ve Yagi tarafından modifiye edilmiş olan thiobarbitürik asit metodu ile ölçüldü (91). Sonuçlar nmol/ml olarak verildi. Karaciğer doku MDA düzeyleri ölçümü ise Ohkawa metodu ile ölçüldü. Sonuçlar nmol/g doku olarak verildi (92).

4.3.3. Glutatyon düzeyleri

Glutatyon düzeyleri Ellmann (93) yöntemiyle çalışıldı. Sonuçlar μ mol/mg doku olarak gösterildi.

4.3.4. Sitokin düzeyleri

TNF α (Biosource, immunoassay kit, Biosource international, Inc Ca, USA) ölçümü ELISA yöntemi [TNF α ELISA kit (Rat), Biosource International, California-USA] ile çalışıldı.

4.3.5. İnsulin direnci

Formüle göre hesaplandı (94). **HOMA-IR:** [(serum glucose level (mg/dl)/18.1xinsulin level (μ IU/ml)]/22.5. Yüksek HOMA-IR skoru yüksek insulin direncini göstermektedir.

4.4.1. Histopatolojik inceleme

Karaciğer doku örnekleri %10 formalin solusyonunda saklandı. Parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan alınan kesitler hemotoksilen-eosin ve masson trichom ile boyanarak incelendi. Histopatolojik inceleme bu konuda Uzman Patolog tarafından yapılarak değerlendirildi. Brunt histopatolojik kriterlerine göre steatohepatit tanısı konuldu (4). Histopatolojik bulgular Brunt' kriterlerinden de yararlanılarak steatoz, inflamasyon ve fibrozis semikantitatif olarak skorlandırıldı (95,96). Steatotik hücrelerin yüzdesi belirlendi. % 25'e kadar +, %26-50: ++, % 51-75: +++, %76> ++++ olarak derecelendirildi. X400 büyütmede rastgele 10 alanda inflamatuvar hücreler sayıldı, ona bölünerek mm²'deki ortalama inflamatuvar hücreler belirlendi. X400 büyütmede rastgele 10 alanda nekroz odakları sayıldı, ona bölünerek mm²'deki ortalama nekrotik odak belirlendi. Balonlaşma dejenerasyonu, Mallory cisimciği var/yok şeklinde değerlendirildi. Parafin bloklardan alınan kesitler Masson Trichrom ile boyanarak X40, X100, X200 ve X 400 büyütmeyle incelendi. Fibrozis 0'dan 4'e kadar evrelendirildi. Zone 3'de perisellüler fibrozis evre 1; portal ve/veya periportal fibrozis olsun olmasın zone 2 ve 3'de perivenuler ve perisellüler fibrozis evre 2; köprüleşme fibrozisi evre 3; siroz evre 4.

4.4.2. İmmunohistokimyasal inceleme

HSH aktivasyonu göstermek için immunohistokimyasal olarak karaciğer dokusunda α -SMA boyama yapıldı (Actin smooth muscle neomarkers, catalog nu: RB-910-R7). Karaciğerde HSC reaktive α -SMA varlığı semikantitatif olarak skorlandırıldı (97) Grade 0: Boyanma yok yada çok nadir, Grade 1: sinuzoidal karaciğer hücrelerinin $\leq 30\%$unda stellate hücrelerde boyanma, Grade 2: %31-%60 boyanma, Grade 3: %61-90 boyanma, Grade 4: sinusoidal karaciğer hücrelerinin %90'dan fazlasında diffüz boyanma

CYP2E1 ekspresyonu için karaciğer dokusunda immunohistokimyasal metotla boyama yapıldı (CYP 2E1 Chemicon, catalog nu: AB1252). Zonal boyanma skoru; perivenüler boyanma:1, midzonal:2, panlobüler: 3 Boyanma şiddeti; boyanma yok:0, hafif:1, orta:2, şiddetli:3 şeklinde değerlendirildi (98).

4.5. İstatiksel değerlendirme

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Parametrelerin gruplar arasından değerlendirilmesinde Kruskal Valis tek yönlü varyans analiz testi, ikili değerlendirmelerde ise Mann Whitney U testi ile değerlendirme yapıldı. Bazı parametreler için Pearson Spearman korelasyon testleri kullanıldı. İstatiksel değerlendirmeler SPSS 11.0 paket program kullanılarak yapıldı.

5.BULGULAR

YZD ile beslenen ratların hepsinde NASH oluştu. Grup 1’de iki, grup 2 ve grup 3’de birer rat ex oldu.

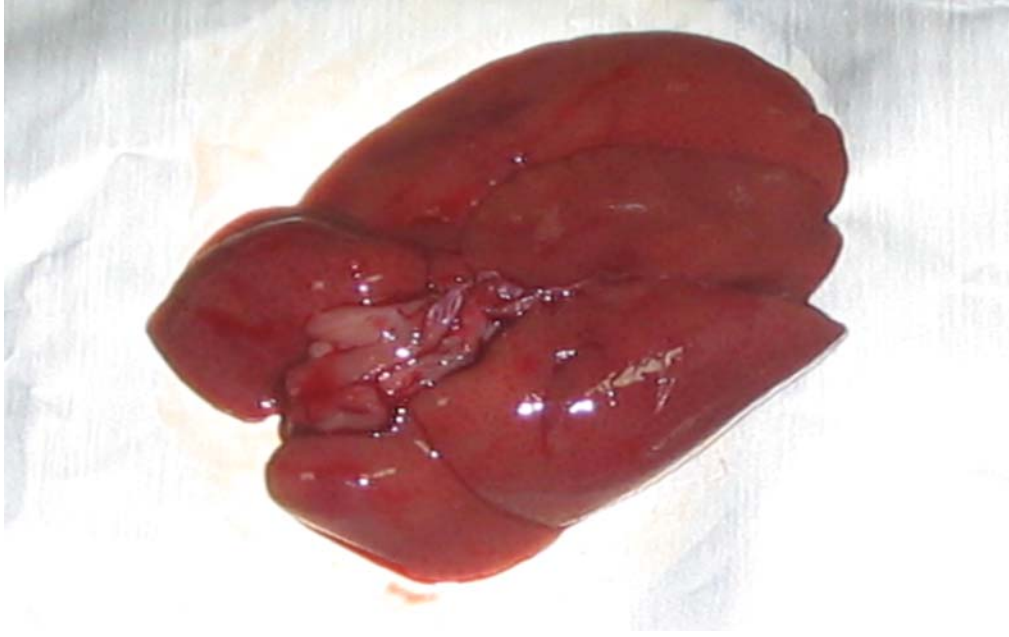
Ratların başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Bütün gruptaki ratlarda ağırlık başlangıca göre çalışma sonunda anlamlı olarak artmıştı ($p<0.001$). Çalışma sonunda grup 2, grup 3 ve grup 4 ‘de ortalama ağırlık artışı kontrol grubuna göre anlamlı idi (her biri için $p<0.05$). Grup 2’de ortalama karaciğer ağırlığı kontrol grubuna göre artmıştı ($p<0.05$). Grup 2, grup 3 ve grup 4 arasında ortalama karaciğer ağırlıkları açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Grupların başlangıçta ve çalışma sonunda ortalama vücut ağırlıkları ve çalışma sonunda ortalama karaciğer ağırlıkları Tablo 6’da gösterilmiştir. Kontrol ve YZD gruplarında karaciğerin makroskopik görünümü sırasıyla şekil 5a ve 5b’de gösterilmiştir.

Tablo 6: Melatonin ve yağdan zengin diyet ve kontrol gruplarında ortalama vücut ve karaciğer ağırlıkları

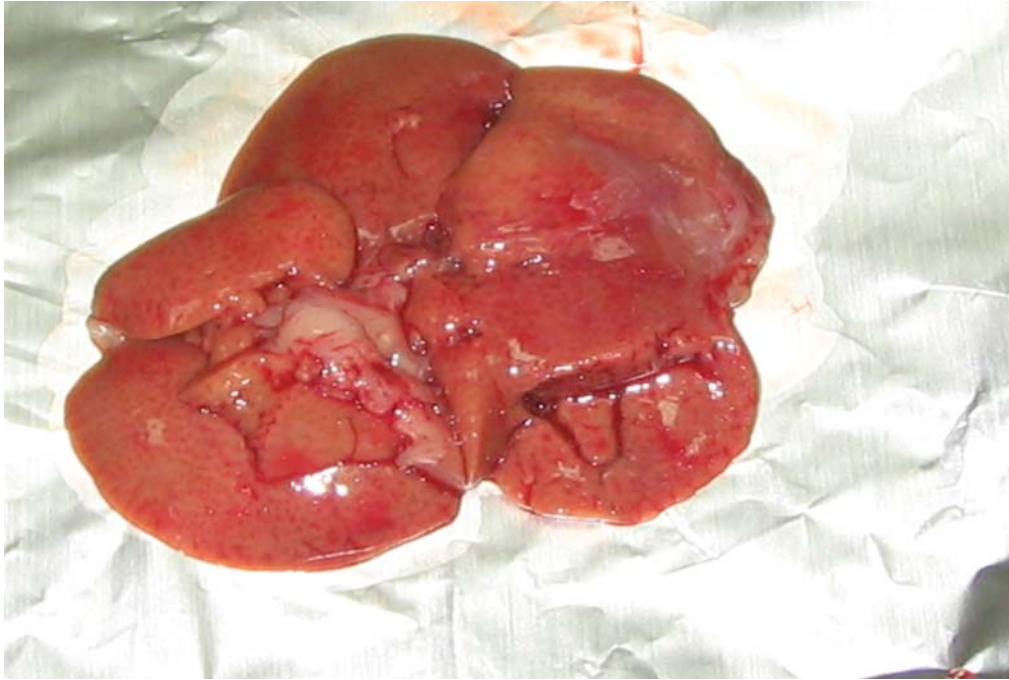
Ağırlık	Grup 1 Kontrol grup (n =8)	Grup 2 YZD (n =9)	Grup 3 YZD+10 mg/kg melatonin (n=9)	Grup 4 YZD+50 mg/kg melatonin (n=10)
Başlangıçta vücut ağırlığı (ort. ; g)	265,00±29,87	265,00±36,51	225,00±45,60	259,20±38,30
Deney sonu vücut ağırlığı ort. ; g)	288,30±27.89	340,70±50,46*	306,30±40,40*	335,10±37,70*
Karaciğer ağırlığı (ort.; g)	9,11±1,10	10,45±1,28*	9,95±1,40	9,80±1,36

*: $p<0.05$: Vücut ağırlıkları grup 2 , grup 3 ve grup 4’de grup 1’e göre anlamlı artmıştı.

* $p<0.05$: Ortalama karaciğer ağırlıkları grup 2’de kontrol grubuna göre anlamlı artmıştı.



Şekil 5a: Normal rat karaciğerinin makroskopik görünüşü (grup 1'den)



Şekil 5b: Yağlı karaciğerin makroskopik görünüşü (grup 2'den)

5.1. Biyokimyasal parametreler

Grup 2’de (YZD) açlık kan glukozu, ALT, AST, trigliserid, kolesterol düzeyleri grup 1 (kontrol)’e göre anlamlı artmıştı. Grup 3’de (10 mg/kg melatonin) grup 2’e göre açlık kan glukozu, ALT düzeyinde anlamlı azalma vardı ($p<0.01$, $p<0.05$). AST, kolesterol, trigliserid düzeyleri ise anlamlı olarak değişmemişti. Grup 4’de (50 mg/kg 3 melatonin) grup 2’ye göre açlık kan glukozu, ALT ve trigliserid düzeyi anlamlı olarak azalmıştı (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.05$). AST, kolesterol ve trigliserid düzeylerinde anlamlı değişme yoktu ($p>0.05$). Grup 3 ile grup 4 arasında açlık kan glukozu, ALT, AST, kolesterol, trigliserid düzeyleri açısından anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Biyokimyasal parametreler tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: Melatonin ve yağdan zengin diyet ve kontrol gruplarında biyokimyasal parametreler, insulin direnci ve TNF- α düzeyleri

Parametreler	Grup 1 Kontrol grup (n =8)	Grup 2 YZD (n =9)	Grup 3 YZD+10 mg/kg melatonin (n=9)	Grup 4 YZD+50 mg melatonin (n=10)
Insulin (μ IU/ml)	0,101 \pm 0,04	0,138 \pm 0,05	0,136 \pm 0,07	0,110 \pm 0,01
Glukoz (mg/dl)	139,0 \pm 15,8	165,1 \pm 9,3	144, \pm 9,92**	138,60 \pm 18,95**
HOMA-R	0,034 \pm 0,02	0,055 \pm 0,02	0,032 \pm 0,01*	0,036 \pm 0,07*
kolesterol (mg/dl)	52,57 \pm 5,31	75,66 \pm 8,7	76,34 \pm 13,2	79,50 \pm 7,84
Trigliserid (mg/dl)	81,00 \pm 19,32	184,44 \pm 60,34	214,62 \pm 45,85	209,10 \pm 37,39
ALT (IU/L)	83,8 \pm 9,6	85,55 \pm 8,1	74,8 \pm 11,0*	78,4 \pm 10,5*
AST (IU/L)	190,28 \pm 33,4	244,5 \pm 44,1	234,6 \pm 60,43	251,8 \pm 36,85
GGT (IU/L)	1 \pm 0,0	0,7 \pm 0,4	0,87 \pm 0,64	0,7 \pm 6,7
TNF- α (pg/ml)	0,241 \pm 0,99	0,569 \pm 0,22	0,237 \pm 0,09*	0,198 \pm 0,07*

* $P<0.05$, ** $p<0.01$ grup 2’ye göre anlamlı azalmıştı

5.2.Oksidatif stres ölçümü

Grup 2’de plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri grup 1’e göre anlamlı olarak artmıştı (her biri için; $p<0.001$), Glutasyon düzeyleri grup 2’de grup 1’e göre anlamlı azalmıştı, fakat istatistiksel anlamlılık yoktu ($p>0.05$). Grup 3’de plazma ve karaciğer MDA düzeyleri grup 2’e göre daha düşüktü. Fark anlamlıydı (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.001$). Grup 3’de glutasyon düzeyi grup 2’ye göre anlamlı olarak yüksekti. Grup 4’de plazma ve karaciğer MDA düzeyleri grup 2’ye göre daha düşüktü. Fark anlamlıydı (her biri için; $p<0.001$). Grup 4’de karaciğer glutasyon düzeyi grup 2’ye göre daha yüksekti. Grup 4 ile grup 3 karşılaştırıldığında plazma MDA düzeyi grup 4’de daha düşüktü ($p<0.05$). Karaciğer MDA ve glutasyon düzeyleri açısından anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Glutasyon düzeyleri grup 4’de grup 3’ e göre anlamlı olarak daha yüksekti. ($p<0.05$). Oksidatif stres ölçümleri tablo 8’de gösterilmiştir.

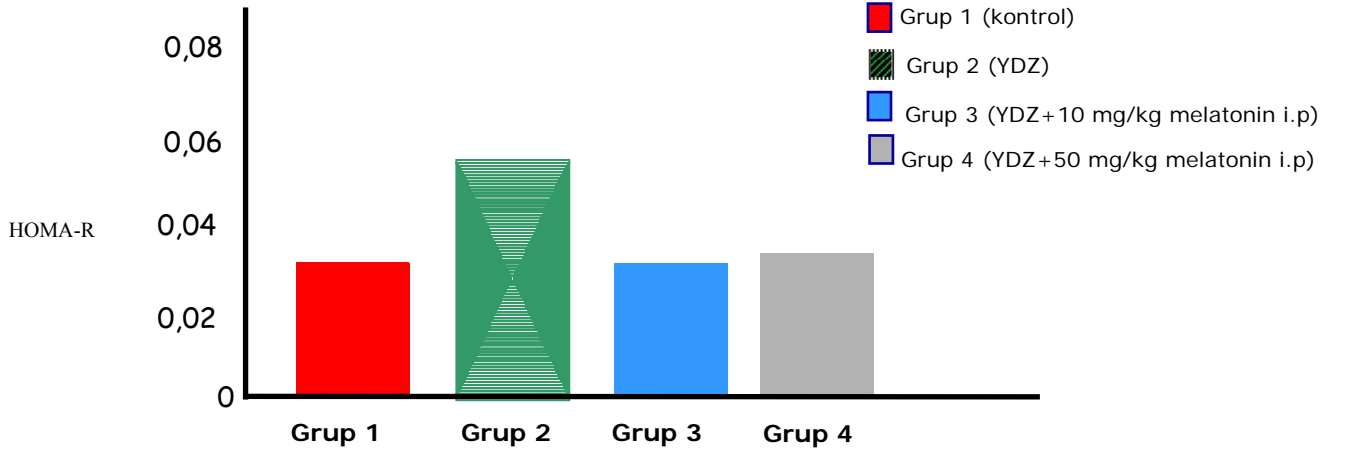
Tablo 8: Melatonin ve yağdan zengin diyet ve kontrol gruplarında plazma, karaciğer doku malondialdehide ve glutasyon düzeyleri

Bulgular	Grup 1 Kontrol grup (n =8)	Grup 2 YDZ (n =9)	Grup 3 YDZ+10 mg/kg Melatonin (n=9)	Grup 4 YDZ+50 mg/kg Melatonin (n=10)
Plazma MDA (nmol/ml)	2,43 ±0,66	5,88± 0,98	4,92 ±0,54**	4,39±1,09**
Karaciğer MDA nmol/ gr doku	20,66±3,55	29,69±2,97	21,73±3,48*	24,21 ±5,97**
Karaciğer Glutasyon (μ mol/mg)	13,67 ±2,28	11,49±3,09	23,46±3,13*	37,07±12,80*

* $P<0.001$; ** $p<0.05$ grup 2’ye göre anlamlı azalmıştı.

5.3. İnsulin direnci

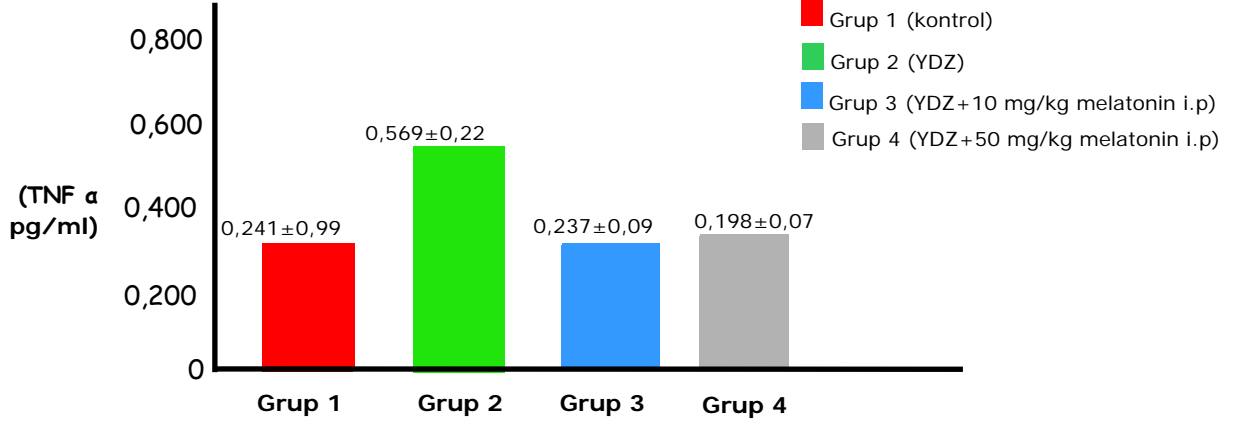
İnsulin direnci grup 2’de kontrol grubuna göre artmıştı ($p<0.05$). Melatonin verilen gruplarda grup 2’ye göre azalmıştı. Fark istatikselsel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). İnsulin direnci tablo 7’de ve şekil 6’de gösterilmiştir.



Şekil 6: Melatonin uygulanan gruplarda insulin direncinde anlamlı azalma

5.4.Serum TNF α düzeyi:

Serum TNF α düzeyi grup 2’de kontrol grubuna göre artmıştı ($p<0.05$). Melatonin verilen gruplarda TNF α düzeyi anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.05$). Serum TNF α düzeyleri tablo 7 ve şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7: Melatonin uygulanan gruplarda TNF α düzeyinde anlamlı azalma

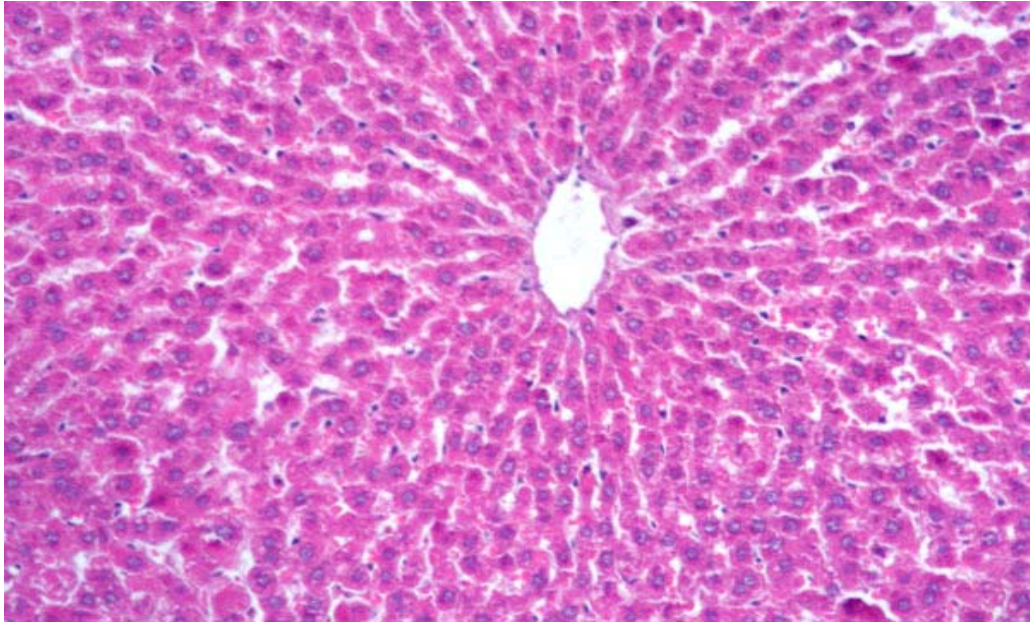
5.5. Histopatolojik incelemeler

Grup 2 (HFD) 'de grup 1 (kontrol)' e göre steatoz, inflamasyon, balonlaşma degenerasyonu, nekroz anlamlı olarak artmıştı ($p>0.001$). Grup 3 ve grup 4'de grup 2'ye göre steatoz azalmıştı (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$). Grup 3 ve grup 4'de grup 2'ye göre inflamasyon azalmıştı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$). Balonlaşma degenerasyonu, fibrozis ve nekroz açısından fark anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup 3 ve grup 4 arasında ise anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Histopatolojik bulgular Tablo 9 ve şekil 8'de gösterilmiştir.

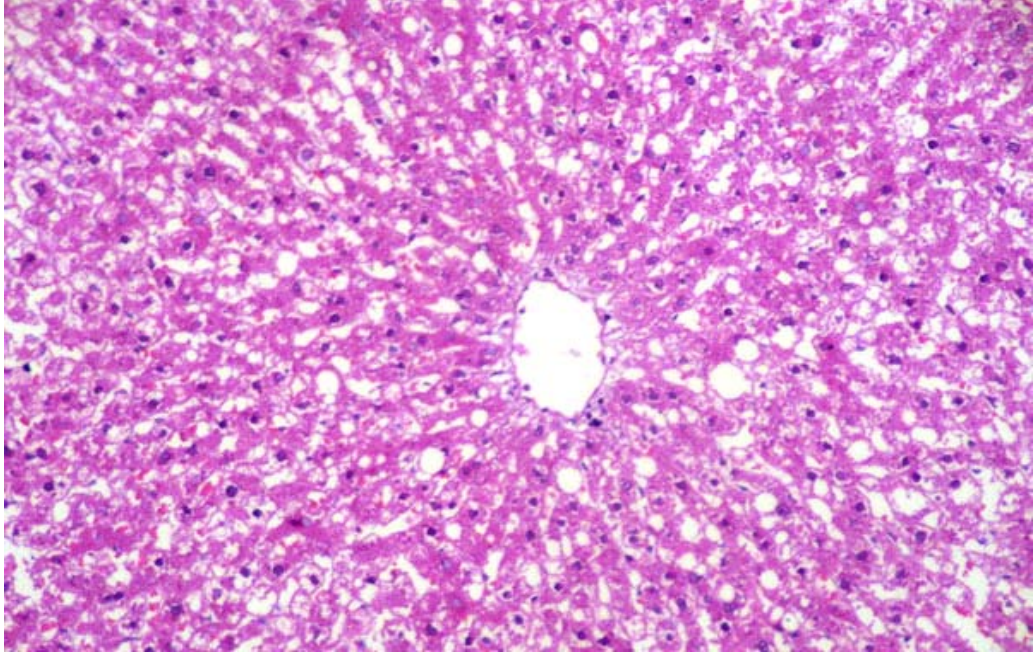
Tablo 9: Gruplarda histopatolojik bulgular

Bulgular	Grup 1 Kontrol grup (n =8)	Grup 2 YDZ (n =9)	Grup 3 YDZ+10 mg/kg Melatonin (n=9)	Grup 4 YDZ+50 mg/kg Melatonin (n=10)
Steatozis (0-4)	-	2,22 ± 0,44	1,50 ±0,53*	1,20±0,422**
inflamasyon (hücre/mm ²)	1,36±0,74	17,56±3,28	12,13±3,39**	7,10±3,47***
Nekroz (fokus/mm ²)	-	1,28±0,41	1,32±0,38	1,01±0,55
Fibrozis (0-4)	-	0,56±0,52	0,63±0,52	0,50±0,52
CYP 2E1 ekspresyonu	1,0±0,0	2,22±0,44	1,38±0,58*	1,20±0,41***
α -SMA ekspresyonu	-	2,44±0,52	2,00±0,00	1,10±0,31**

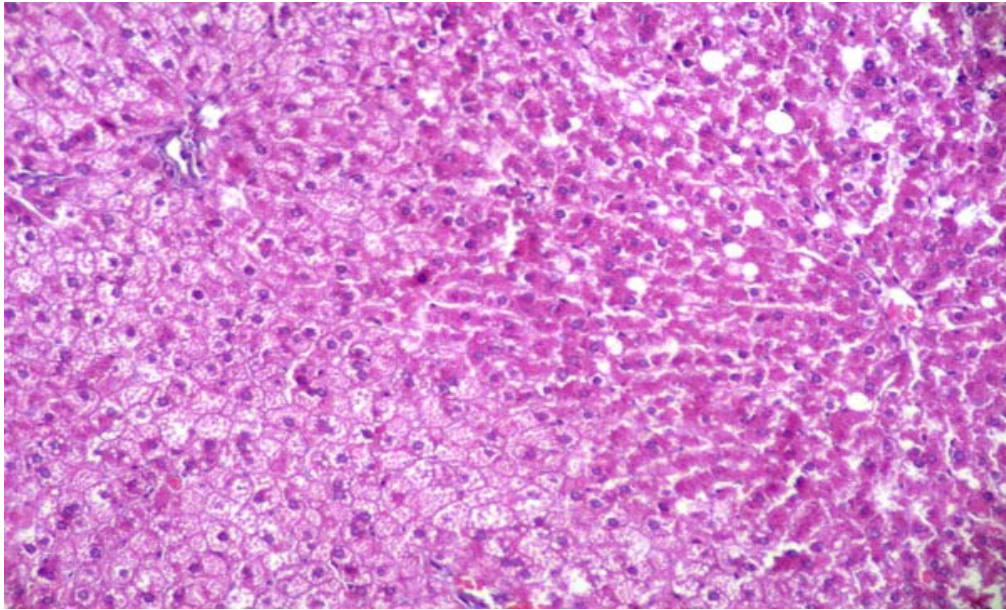
•*P<0.05 ; **p<0.01; ***p<0.001 grup 2'ye göre anlamlı azalma



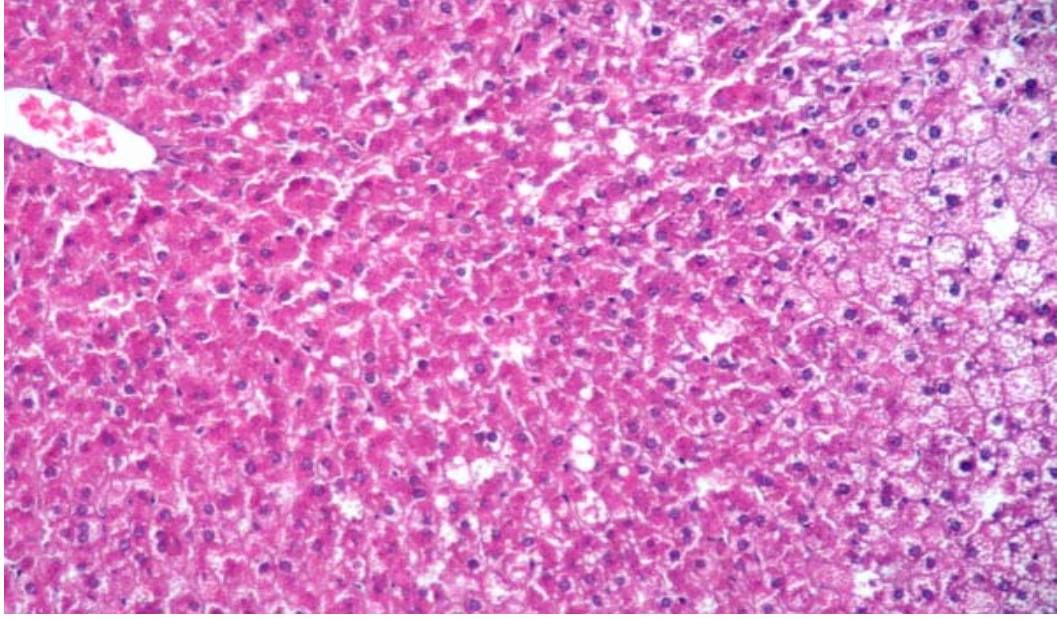
Şekil 8 a: Normal karaciğer dokusu (H Ex200)



**Şekil 8b: Yağdan zengin diyetle beslenen ratların karaciğer dokusu; H Ex200)
(grup 2'den)**



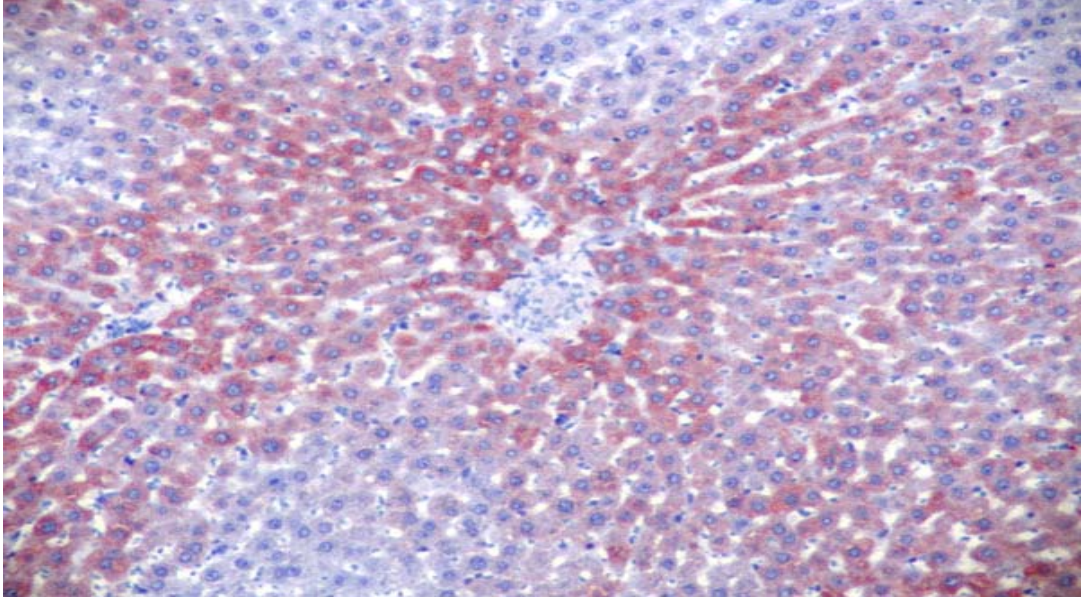
Şekil 8 c: Grup 3 (YDZ+melatonin 10 mg/kg.i.p)'de steatozis, nekroz, inflamasyon grup 2' ye göre azalmıştı (H Ex200).



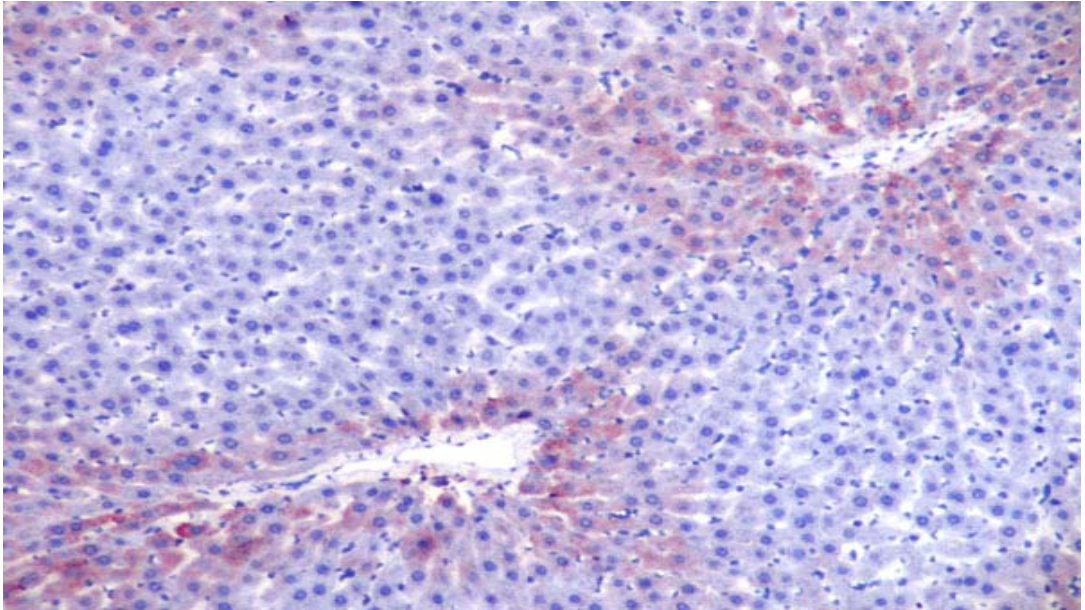
Şekil 8 d: Grup 4 (YDZ+melatonin 50 mg/kg,i.p)'de steatozis, nekroz, inflamasyon grup 2' ye göre azalmıştı (H Ex 200).

5.6. İmmunohistokimyasal inceleme:

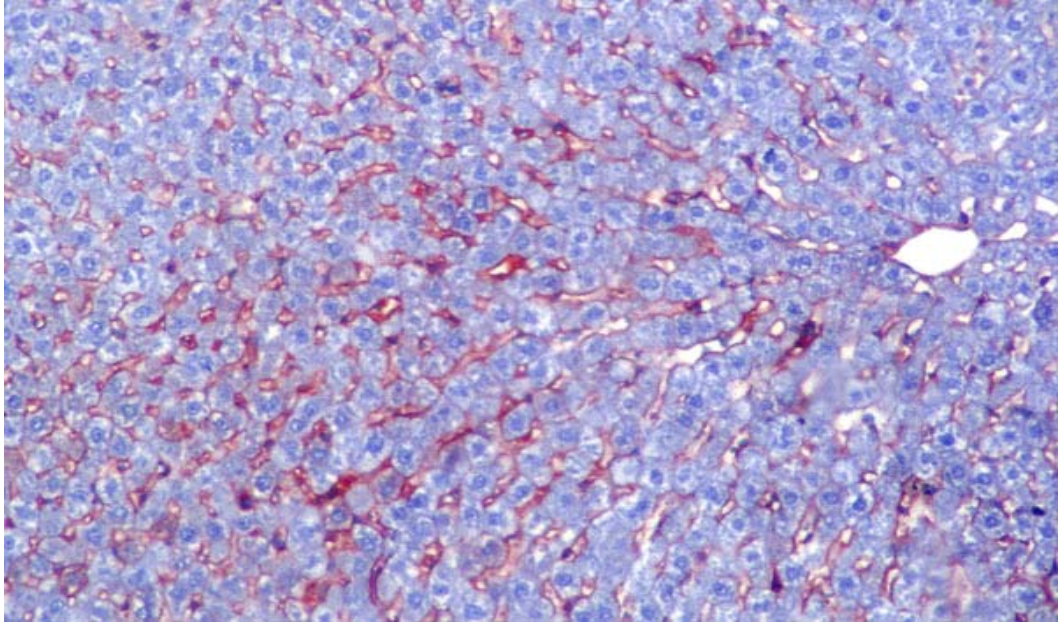
α -sMA ve CYP 2E1 ekspresyonu grup 2'de grup 1' e göre artmıştı ($p<0.001$). Grup 3'de CYP 2E1 ekspresyonu grup 2'ye göre azalmıştı ($p<0.01$), α -sMA ekspresyonu açısından grup 3 ve 2 arasında ise anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Grup 4'de hem α sMA hem de CYP 2E1 ekspresyonu grup 2'ye göre anlamlı azalmıştı (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.001$). Grup 3 ve grup 4 karşılaştırıldığında α -sMA ekspresyonu grup 4'de anlamlı azalmıştı ($p<0.05$). Karaciğer dokusunda CYP 2E1 ekspresyonu şekil 9a ve 9b'de gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda α - sMA ekspresyonu şekil 10a ve 10b'de gösterilmiştir.



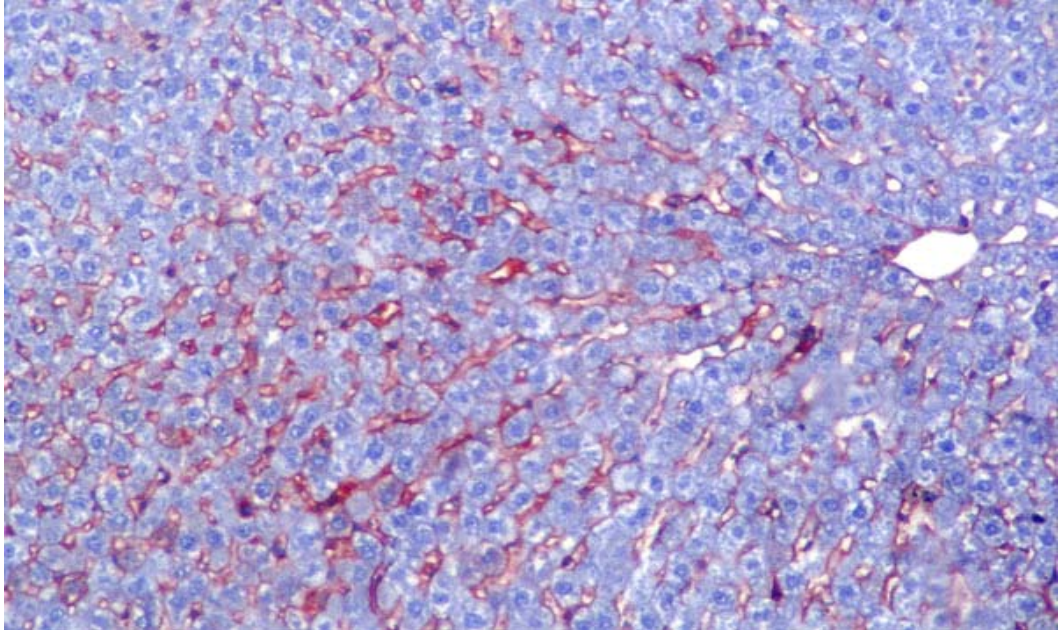
Şekil 9a: Karaciğer dokusunda CYP 2E1 ekspresyonu (grup 2'den midzonal boyanma; x 200)



Şekil 9b: Karaciğer dokusunda CYP 2E1 ekspresyonu (grup 4'den perivenuler boyanma; x200)



Şekil 10a: Grup 2'den karaciğer dokusunda α - sMA ekspresyonu (x 200)



Şekil 10b: Grup 4'den karaciğer dokusunda α - sMA ekspresyonu (x 200)

6. TARTIŞMA

Periferel insulın direnci, artmış yağ asidi beta oksidasyonu ve karaciğer oksidatif stres artışı, karaciğerde yağlı dejenerasyon NASH' in bilinen özellikleridir. NASH tedavisinde insulın direncini, yağ asidlerinin karaciğerde birikimini azaltan, hepatoprotektif ve antioksidan özellikli ilaçlar etkili bulunmuştur (1-3). Yağdan zengin diyet insanlardaki NASH' e identik olan bir model olarak bulunmuştur. NASH' de aktivitesi ve düzeyleri artan bir çok antioksidan enzim ve sitokinler bu modelde de artmış bulunmuştur (15).

Melatonin pineal bezden salgılanan bir hormon olarak fizyolojik, immunolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara sahiptir. Doğrudan serbest radikal tutucu etkileri ve antioksidan enzim sentezlerini stimule ederek antioksidan etkileri vardır (99). Melatonin hidroksil ve peroksil radikalleri tutucu olarak lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki göstermektedir (100). Melatonin verilen post menapozal kadınlarda insulın duyarlılığında ve glukoz toleransında azalma saptanmıştır (101).

Yayınlanmış bir çok çalışmada melatonin akut ve kronik karaciğer hasarında kullanılmıştır. Hepatoprotektif ve antioksidan özellikleri ile etkili bulunmuştur (16-18, 99). CCl4 ile karaciğer hasarı oluşturulmuş; melatonin verilmesi ile nekrozis, fibrozis, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, yağlı dejenerasyon, rejeneratif nodüller azalmıştır (102). Metanol ile oluşturulan akut karaciğer hasarında da melatonin 10 mg/kg dozunda oksidatif stres parametrelerini ve lipid peroksidasyonunu azaltarak etkili bulunmuştur (103).

NASH tedavisinde melatoninle yapılmış çok az sayıda çalışma vardır. Hussein MR ve arkadaşları (104) yaptıkları çalışmada on iki hafta süreyle YZD vererek oluşturdukları deneysel obezite modelinde son dört hafta da melatonin

eklenmesi ile karaciğerde yağlı infiltrasyonun yalnızca YZD verilen gruba göre daha az olduğunu saptamışlardır. Pan M ve arkadaşları (105) on iki hafta YZD vererek oluşturdukları NAYKH'ında melatoninin koruyucu rolünü incelemişlerdir. Melatoninin 2.5, 5 ve 10 mg/kg dozlarında uygulanan melatoninin steatozis ve inflamasyonu azalttığını tespit etmişlerdir. Biz bu çalışmada melatoninin 10 mg ve 50 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak YZD vererek oluşturduğumuz deneysel NASH modelinde kullandık. Steatozis ve inflamasyonu azaltıcı etkisi ile ALT düzeylerini de düşürdüğünü saptadık. Bizim çalışmamızda farklı olarak YZD ile NASH oluşturma süremiz her iki çalışmadan daha kısa ve melatoninin daha yüksek dozdadır. Pan M ve arkadaşları (105) melatoninin koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Biz çalışmamızda YZD oluştuktan sonra melatoninin iki hafta süreyle uyguladık ve tedavi edici etkilerini inceledik. Vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir etki saptamadık. Fakat Puchalski SS ve arkadaşları melatoninin YZD verilen ratlarda vücut ağırlığını azalttığını bildirmişlerdir (106).

Çalışmamızda YZD ile TNF α düzeylerinin yükseldiği ve insulin direncinin oluştuğu görüldü. Melatonin verilmesiyle TNF α azaldı. İnsulin direncinde de melatonin verilen gruplarda anlamlı bir azalma vardı. Yağlı karaciğerin NASH'e progresyonunda primer metabolik anormalliğin insulin direnci olduğu ileri sürülmüştür (49). İnsulinin karaciğer glukoz outputu üzerine baskılayıcı etkisi ve insulinin diğer metabolik etkilerinin bozulmasına neden olur. İnhibitör kappa kinaz beta (IKK- β) aktivasyonu sağlayarak periferal insulin direncine neden olur (107). Hayvan modellerinde oksidatif stres, insulin direnci ve TNF α arasında mekanik bir ilişki olduğu gösterilmiştir (107). NASH'de barsaklardaki floradan salgılanan endotoksine cevap olarak Kupffer hücrelerinden, hepatositlerden ve yağ dokusu makrofajlarından TNF α salgılanır. Kupffer hücre aktivasyonu, TNF α 'nın hepatosit

mitokondriyumunda, peroksizom, ve mikrozosomunda serbest yağ asidi oksidasyonu artmasına bağlı olarak oksidatif stres artar (52,53).

TNF α insülin direncinin gelişiminde anahtar role sahiptir. İnsülin reseptörlerindeki tirozin kinaz aktivitesini etkiler (108,109). Deneysel çalışmalarda melatonin oksidatif stresi azaltıcı etkileriyle birlikte NF- κ B ekspresyonunu üzerinden TNF α üretimini inhibe ettiği saptanmıştır (16). TNF α steatohepatit dahil karaciğer hasarının bir çok formunun gelişiminde önemli bir sitokindir (110). Sitokinlerle oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ilişkisinin steatohepatit gelişiminde anahtar rolü vardır (111).

Melatonin bir etkisi de mitokondriyal fonksiyonlar üzerinedir. Melatoninin mitokondriyal fonksiyonları da düzelttiği bildirilmiştir. İskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyal serbest radikal oluşumunu azalmıştır (112). NASH'de mitokondriyal bozukluk gösterilmiştir (49,52). Melatonin NASH'te mitokondriyal fonksiyonları iyileştirerek etkili olabilir.

NASH'in patogenezinde CYP 2E1 indüksiyonu anahtar role sahiptir. NASH'de bir çok etyolojik faktör söz konusu olmasına rağmen patogenetik mekanizma alkolik steatohepatite benzer. Alkolik steatohepatitte olduğu gibi NASH'te CYP2E1 overekspresyonu olmaktadır (113). Etanolle yapılan çalışmada etanol hidrojen peroxide artışına ve CYP 2E1 aşırı ekspresyonuna yol açmış, glutatyon düzeylerinde de azalma olmuştur. Bu azalma hidrojen peroksit radikallerindeki artışla paraleldir (114). Bizim çalışmamızda da NASH oluşturulan ratlarda CYP 2E1 ekspresyonu artışı oldu ve alkolik modelde olduğu gibi bu artış melatoninin her iki dozuyla da inhibe edildi. Yüksek doz verilen grupta hem glutatyon düzeylerinde ki artış hem de CYP 2E1 ekspresyonu daha çok baskılandı. MDA düzeyleri de melatonin iki dozuyla da azaldı. Pan M ve arkadaşları (105) on

iki hafta YZD vererek oluşturdukları NAYKH' ında MDA düzeyi yalnızca 10 mg/kg melatonin'le azalmışken SOD ve GPx aktivitesi bütün dozlarda artmış saptanmıştır. Melatonin 5 ve 13 gün süreyle ortak safra kanal ligasyonu yapılan ratlarda 10 ve 100 mg melatonin oral olarak verilmiş ve yüksek dozda melatonin daha etkili olduğu karaciğerde selenyum, GSH-Px aktivitesinin yüksek dozlarda artığı saptanmıştır (115).

Bu alışmada YZD 8 hafta süreyle verildiğinden bu sürede fibrozis gelişimi minimal oldu. Bu nedenle fibrozis açısından değerlendirme yeterli olmadı. Fibrozis gelişiminde anahtar role sahip olan HSH aktivasyonu, immunohistokimyasal metotla sMA ekspresyonu gösterilerek incelendi. Melatoninin yalnızca 50 mg/kg dozunda α -sMA ekspresyonunun inhibe edildiği görüldü. Oksidatif stres HSH aktivasyonu ve ekstrasellüler matriks oluşumuna yol açar. Altı hafta süreyle CCl₄ ile fibrozis oluşturulan ratlarda melatoninle hydroxyproline ve malondialdehyde düzeyleri azalmış, GSH-Px ve SOD düzeyleri ise artmıştır. Fibrotik ratlarda melatonin ayrıca bir çok proinflamatuvar sitokinin transkripsiyon faktörü olan **NF kappa β** 'ın karaciğer dokusunda ekspresyonunu inhibe etmiştir. Dokuda **TNF α** üretimini de azaltmıştır. Lipid peroksidasyonunun sitotoksik ürünleri hücrel fonksiyonları, nükleotid ve protein sentezini bozabilir, HSH'lerde kollagen genlerini module ederek karaciğer fibrojenesisinde rol oynayabilir (116). Melatonin serbest radikal tutucu özel yapısıyla lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini engelleyerek antiinflamatuvar etki göstermektedir. Sonuç olarak HSH aktivasyonunu da baskılamaktadır. Bütün bu değişimler melatonin primer olarak artmış oksidatif stresi baskıladığı, sitokin indüksiyonunu baskılamasının dolaylı bir etki olduğunu düşündürmektedir.

Melatonin lipid metabolizması bozukluklarını düzeltici etkileri saptanmıştır. Çalışmalarda melatonin plazma ve karaciğer doku trigliserid düzeylerini düşürdüğü de saptanmıştır (117). Diabetik ratlarda melatonin verilmesi ile lipid metabolizmasında düzelme olmuştur (118). Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen mice'larda melatonin plazma ve karaciğer kolesterol düzeylerini düşürmüştür (119-120). NASH'de insulin direnci ile ilişkili olarak lipid metabolizması bozuklukları vardır. NASH tedavisinde lipid düşürücü bir ilaç olarak gemfibrozil etkili bulunmuştur (121). Çalışmamızda melatoninin her iki dozunda serum trigliserid ve kolesterol düzeylerini düşürdüğünü saptadık. YZD ile yapılan diğer çalışmalarda da lipid metabolizmasını düzenleyici etkileri saptanmıştır. Hussein MR ve arkadaşları (104) lipid düzeylerini daha düşük bulmuşlardır. Melatonin verilen grupta HDL-kolesterol düzeyleri yükselmiştir. Pan M ve arkadaşları (105) YZD ile birlikte melatonin verilmesinin yalnızca YZD verilen gruba göre daha düşük bulmuşlardır. Bu etki kolesterolün safra asidlerinin metabolizmasına girmesini indüklemektedir (120).

Sonuç olarak YZD' le oluşturulan deneysel NASH tedavisinde melatonin steatohepatiti iyileştirmektedir. Karaciğerde steatoz ve inflamasyonu azaltmıştır. Oksidatif stres parametrelerini ve insulin direncini azaltmakta, lipid metabolizması bozukluklarını düzeltmektedir. Melatoninin 50 mg/kg dozu daha yararlı görünmektedir. Melatonin NASH tedavisinde ideal ilaç olabilir. Melatonin birçok özelliği ile etkili olabilir. Bu konuda farklı doz ve sürelerde yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Eng J Med* 2002; 346:1221-321.
2. Harrison SA, Di Bisceglie AM. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003; 63: 2379-94.
3. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005;173:5.
4. Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:1-9.
5. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Bopari N, Liu Y, McCullough AJ. Non-alcoholic fatty liver: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;107:1103-9.
6. Ludwig J, Viaggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Non-alcoholic steatohepatitis, Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:4334-8.
7. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler. *Hepatology* 1995; 21:1742-7.
8. Teri MR, James OFW, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of non-alcoholic steatohepatitis: a follow up study. *Hepatology* 1995;22:1714-19.
9. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial dysfunction in hepatic steatosis. Leuschner U, James OFW, Dancygier H. *Steatohepatitis (NASH and ASH)*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001; 185-7.
10. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343:1467-76.
11. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. *Hepatology* 2004 ;40:46-54

12. Albrecht H, Schook LB, Jongeneel CV. Nuclear migration of NF-kappa B correlates with TNF-alpha mRNA accumulation. *J Inflamm.* 1995;45:64-71.
13. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-94.
14. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-92.
15. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-9.
16. Wang H, Wei W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, et al. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005;77:1902-15.
17. Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, et al. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol* 2004; 40:86-93.
18. Balkan J, Sener G, Cevikbas U, Keyer-Uysal M, Uysal M. Melatonin improved the disturbances in hepatic prooxidant and antioxidant balance and hepatotoxicity induced by a high cholesterol diet in C57BL/6J mice. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74:349-54.
19. Scherlock S, Dooley S. Anatomy and function. In ; Scherlock S, Dooley s (eds). *Disease of the liver and Biliary System*. Eleventh edition, Milan, Blackwell Publishing 2002
20. Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel Anatomi. Metu Press 2002; 226-6.

21. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L, Sağlıker Y. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri 15. Edisyon Nobel Tıp Kitabevleri & McGraw-Hill Comp. Inc 2004:1707.
22. Ökten A. Karaciğerin fonksiyonel anatomisi . Ökten A, Mungan Z, akaloğlu Y. Gastroenteropatoloji . Nobel tıp Kitabevi, İstanbul 2001;311-4
23. Dere F. Karaciğer ve safra kesesi anatomisi . Anatomi ders kitabı Son baskı . Okullar Pazarı. Adana 1996; 642-1.
24. Öber A, İzzetoğlu G. Karaciğer Histolojisi. Histoloji 1. Baskı, Nobel yayın dağıtım Ankara 2006;198-3.
25. Bouwens L, Baekeland M, Wisse E. Cytokinetic analysisof the expanding Kupffer-Cell Population in rat liver.Cell Tissue Kinet 1986; 19: 217-226.
26. Ito L, Hiroyuki M, Kosugi L, Shirasawa H. Alteration inFc receptor activity in sinusoidal endotelial cells and Kupffer cells during D-Galactosamine (GalN)-induced liver injury in rats. Virchows Arch B Cell Pathology 1990; 58: 417.
27. Azri S, Renton KW. Depression of murine hepatic mixed functiooxidase during infection with listeria monocytogenes. J Pharmacol Exp Ther 1987; 243: 1089-91
28. Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey PA, McCuskey RS, Wallace S. In vivo microscopy of hepatic metastases: dynamic observation of tumor cell invasionand interaction with Kupffer cells. Hepatology 1995; 21: 487-94.
29. Ashhab HA, The role of Kupffer Cells in Alcohol Induced Liver Injury. Dissertations. UMI No: 1382006 1996; 23-24.
30. Stenback A, Meurling S, Cantar C, Lundholm M, Wallander J, Johnsson C. The effect of mesenteric lymphadenectomy and Kupffer cell depletion on bacterial translocation. J Surg Res 2002; 102: 207-214.

31. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 1994; 35: 1509.
32. Smedsrod B, Pertoft H, Gustafson S. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem. J.* 1990; 266: 313.
33. Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996; 24: 233.
34. Sakamoto M, Ueno T, Kin M et al. Ito cell contraction in response to endothelin-1 and substance P. *Hepatology* 1993; 18: 978.
35. Arthur MJP, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13: s33
36. Wisse E, Luo D, Vermijlen D. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 1997; 17:265.
37. Jungueira LC, Cameiro J, Kelley RO. *Basic Histology*, 7. Edition, Appleton, Lange, İstanbul 1993: 380-394.
38. Westwater JO, Fainer D. Liver impairment in the obese. *Gastroenterology* 1958; 34: 686-93.
39. Peter RL, Gay T, Reynolds TB. Post-jejunoileal bypass hepatic disease. Its similarity to alcoholic hepatic disease. *Am J Clin Pathol* 1975;63:318-331
40. Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients *Am J Med* 1979;67:811-816.
41. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
42. Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2006 ;49:450-65.

43. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2004;8:521-33.
44. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Sponseller CA, Hampton K, 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;38:434-40.
45. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007;18:184-95.
46. Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH. Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. *J Pediatr* 2000;136:727-33.
47. 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 21years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
48. Ratziu V, Giral P, Charlotte F. Liver fibrosis in over weight patients. *Gastroenterology.* 2000;118:1117-23
49. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
50. Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54:303-6.
51. Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des* 2003;9:1023-31.

52. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006;130:207-10.
53. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* .2004; 40:46-54.
54. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002 ;37:206-13.
55. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, et al. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004;53:438-45.
56. Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2957-61.
57. Day CP. Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2006;26:1021-8.
58. Bernard S, Touzet S, Personne I. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia*.2000;43:995-9.
59. Ito L, Hiroyuki M, Kosugi L, Shirasawa H. Alteration in Fc receptor activity in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells during D-Galactosamine (GalN)-induced liver injury in rats. *Virchows Arch B Cell Pathology* 1990; 58: 417.
60. Azri S, Renton KW. Depression of murine hepatic mixed function oxidase during infection with *listeria monocytogenes*. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 1089-91.
61. 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 non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-11.

62. Musso G, Gambino R, Biroli G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2438-46.
63. Brunt E.M. Non alcoholic steatohepatitis: grading and staging the histological lesions. *Steatohepatitis (NASH and ASH)*. Leuschner U, James OF, Dancygier H (Editors). Kluwer Academic Publishers and Falk Foundation e.V. Dordrecht 2001:26-33.
64. Mofrad PS, Sanyal A. Nonalcoholic fatty liver disease. *Med Gen Med* 2003;5:14.
65. Baldrige AD, Perez-Ateyde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *J Pediatr* 1995; 127: 700-4.
66. Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 172-9.
67. Gore RM. Diffuse liver disease. Gore GM, Levine MS, Laufer I. *Textbook of gastrointestinal radiology*. Saunders. Philadelphia, 1994: 1968-2017.
68. 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.
69. Thaler H. Relation of steatosis to cirrhosis. *Clin Gastroenterol* 1975; 4: 273-80.
70. Ramesh S, Sanyal AJ. Evaluation and management of nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2005;42:2-13.
71. Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. Obesity. *N Engl J Med* 1997; 337: 396-407.

72. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res* 1996; 26: 619–632.
73. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatohepatitis. *Best Pract & Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 679-90.
74. Morin CL, Eckel RH, Marcel T, Pagliassotti MJ. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity. *Endocrinology* 1997; 138: 4665–71.
75. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1997; 94: 2557–62.
76. Chavin K, Yang SQ, Lin HZ. Obesity induces expression of uncoupling protein in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 1999; 274: 5692–5700.
77. Reitman ML, Mason MM, Moitra J. Transgenic mice lacking white fat: models for understanding human lipotrophic diabetes. *Ann New York Ac Sci* 1999:289–96.
78. Moitra J, Mason MM, Olive M. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes and Development* 1998; 12: 3168–81.
79. Shimano H, Horton JD, Hammer JE. Over production of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996; 98: 1575–84.
80. Ghoshal AK, Ahluwalia M, Farber E. The rapid induction of liver cell death in rats fed a choline-deficient methionine-low diet. *Am J Pathol* 1983; 113: 309–14.
81. Hensley K, Kotake Y, Sang H. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2001;21:983–9.

82. Chawla RK, Watson WH, Eastin CE, Lee EY, Schmidt J, McClain CJ. S-adenosylmethionine deficiency and TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *Am J Physiol* 1998; 275:125-9.
83. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18: 1272-82.
84. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-9.
85. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Eng J Med* 1997; 336: 186-95.
86. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Am J Physiol -Endocrinology and Metabolism* 2001; 280: E11-E22.
87. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci* 2000;67:101-12.
88. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-71.
89. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: PL271-6.
90. Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Oliván F, Garcia-Perganeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res* 2000; 28: 150-5.
91. Yagi K. Assay for blood plasma and serum. *Methods Enzymology* 1984;105:328-31.
92. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95:351-8.

93. Sedlak J, Lindsay Rh. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25:192-205.
94. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
95. 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; 277:1694-9.
96. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1272-82.
97. Lau DT, Luxon BA, Xiao SY, Beard MR, Lemon SM. Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. *Hepatology* 2005;42 :273-81.
98. Cohen PA, Mak KM, Rosman AS. Immunohistochemical determination of hepatic cytochrome P-450 E1 in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1057-62.
99. Nishida S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine* 2005;27:131-6.
100. Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993;70:65-71.

- 101.** Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, Volpe A. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:339-46.
- 102.** Kus I, Ogeturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsilmaz M. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005;23:169-74.
- 103.** Kurcer Z, Oğuz E, Iraz M, Fadillioglu E, Baba F, Koksall M, Olmez E. Melatonin improves methanol intoxication-induced oxidative liver injury in rats. *J Pineal Res* 2007 ;43:42-9.
- 104.** Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *Int J Exp Pathol* 2007;88:19-29.
- 105.** Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res* 2006;41:79-84.
- 106.** Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine* 2003;21:163-7.
- 107.** Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293:1673-7.
- 108.** Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389:610-4.

109. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665-8.
110. Hill DB, Shedlofsky S, McClain CJ, Diehl AM, Tsukamoto H. Cytokines and liver disease. In: Remick D, Friendland J, eds. *Cytokines in health and disease*. 2.edition. New York: Mercel Dekker, 1997:401-25.
111. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liverdisease. *Gastroenterology* 2002;122:274-80.
112. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003;469:145-52.
113. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998;27:128-33.
114. Xu Y, Leo MA, Lieber CS. Lycopene attenuates alcoholic apoptosis in HepG2 cells expressing CYP2E1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:614-8.
115. Ohta Y, Imai Y, Matura T, Yamada K, Tokunaga K. Successively postadministered melatonin prevents disruption of hepatic antioxidant status in rats with bile duct ligation. *J Pineal Res* 2005;39:367-74.
116. Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis?. *Hepatology* 1994;19:1262-71.

- 117.** Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Oliván J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res* 2000;28:150-5.
- 118.** Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res* 2002;32:26-33.
- 119.** Mori N, Aoyama H, Murase T, Mori W. Anti-hypercholesterolemic effect of melatonin in rats. *Acta Pathol Jpn* 1989;39:613-8.
- 120.** Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Oliván J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res* 2000;28:150-5.
- 121.** Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:384.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Ankara'da doğdum. 1995 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinden Mezun oldum. 1995-1998 yılları arasında İzmit SSK Hastanesinde; 1998-1999 yılları arasında Soma SSK Hastanesinde Pratisyen Hekim olarak çalıştım. 1999-2002 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji, Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dallarında Araştırma Görevlisi olarak çalıştım. 2002 yılından beri Fırat Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. İngilizce bilmekteyim ve bir çocuk annesiyim.