

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

DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT MODELİNDE
GENİSTEİNİN KORUYUCU ROLÜ

Dr. MEHMET YALNIZ
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. İBRAHİM HALİL BAHÇECİOĞLU

ELAZIĞ-2005

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tez standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

.....

..... **Bilim Dalı Başkanı**

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

.....

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Bu tez Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim birimi başkanlığı tarafından 1131 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimin hazırlanması esnasında benden yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İ. Halil Bahçecioğlu'na, Gastroenteroloji BD'nda beraber çalıőtığım değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEŞEKKÜR.....	iv
TABLOLAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR.....	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. YAĞLI KARACİĞER.....	8
4.1.1. YAĞLI KARACİĞERİN OLUŞUMU.....	9
4.1.2. YAĞLI KARACİĞER EPİDEMİYOLOJİSİ.....	9
4.1.3. YAĞLI KARACİĞER ETYOLOJİSİ.....	10
4.2. NONALKOLİK STEATOHEPATİT.....	12
4.2.1. NASH EPİDEMİYOLOJİSİ.....	14
4.2.3. KLİNİK BELİRTİLER ve LABORATUVAR BULGULARI	15
4.2.4. TANI.....	16
4.2.5. GRADE ve STAGELEME.....	18
4.2.6. DOĞAL SEYİR ve PROGNOZ.....	20
4.2.7. NASH PATOGENEZİ.....	20
4.2.7.1. İNSÜLİN DİRENCİ.....	21
4.2.7.2. SERBEST YAĞ ASİTLERİ.....	21
4.2.7.3. OKSİDATİF STRES.....	22
4.2.7.4. LİPİD PEROKSİDASYONU ve NASH.....	23
4.4.7.5. NASH PATOGENEZİNDEN SORUMLU DİĞER	26
FAKTÖRLER.....	
4.4.7.5.1. SİTOKİNLER.....	26

	Sayfa no
4.4.7.5.2. GENETİK.....	26
4.4.7.6. İKİ DARBE HİPOTEZİ.....	26
4.4.7.7. NASH PATOGENEZİNDE SON GÖRÜŞLER.....	27
4.5. DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT MODELLERİ.....	29
4.5.1. GENETİK OLARAK OBEZ, DİYABETİK ob/ob SIÇANLAR.....	29
4.5.2. DİYABETLE BERABER OLAN LİPOATROFİK SIÇANLAR.....	30
4.5.3. KOLİNDEN FAKİR METİYONİNDEN KISITLI DİYETLE BESLENEN NORMAL RAT/SIÇANLAR.....	30
4.6. TEDAVİ.....	32
4.6.1. VÜCUT KİLOSUNDA AZALMA.....	33
4.6.2. NASH İÇİN İLAÇ TEDAVİSİ.....	34
4.6.2.1. NASH TEDAVİSİNDE ANTİOKSİDANLAR.....	35
4.6.2.1.1 GÜÇLÜ ANTİOKSİDAN ETKİYE SAHİP OLAN FİTOÖSTROJENLER ve İZOFLAVONLAR.....	36
4.6.2.1.2. GENİSTEİN.....	37
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
5.1. DENEY HAYVANLARI.....	39
5.2. DENEYDE KULLANILAN DİYETLER ve HAYVANLARIN BESLENMESİ.....	39
5.3. GRUPLARIN DAĞILIMI ve DENEYSEL ÇALIŞMANIN DİZAYNI.....	39
5.4. GENİSTEİN HAZIRLANMASI ve DOZU.....	40
5.5. ÇALIŞMANIN SONLANDIRILMASI ve ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	40
5.6. BİYOKİMYASAL ANALİZLERİN YAPILMASI.....	41
5.7. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	41

	Sayfa no
5.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	42
6. BULGULAR.....	43
6.1. BAZAL ve DENEY SÜRESİNDEKİ AĞIRLIK BULGULARI.....	43
6.1.1. KARACİĞER AĞIRLIKLARI.....	44
6.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	44
6.3. SERUM TNF ALFA ve TGF-BETA DÜZEYLERİ.....	46
6.4. LİPİD PEROKSİDASYONU BULGULARI.....	49
6.5. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	51
7. TARTIŞMA.....	56
8. KAYNAKLAR.....	63
9. ÖZGEÇMİŞ.....	74

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa no
Tablo 1: Yağlı karaciğere neden olan faktörler.....	11
Tablo 2: Yağdan zengin diyetin içeriği.....	32
Tablo 3. NASH hastaları veya deneysel çalışmalarda yararlı etkileri gösterilen terapötik yaklaşımlar.....	33
Tablo 4. Kontrol ve plasebo grubu ve GK ve GT gruplarındaki ratların kilo takibi, karaciğer ağırlıkları ve bu ağırlıkların vücut ağırlığına oranları.....	43
Tablo 5. Kontrol, plasebo, GK ve GT gruplarında serum biyokimya verileri.....	45
Tablo 6. Serum TNF-alfa ve TGF-beta düzeyleri.....	48
Tablo 7. Lipid peroksidasyon bulguları. Plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri.....	50
Tablo 8: Plasebo, GK ve GT grubu ratlarda saptanan histopatolojik özellikler.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1: NASH patogenezi: İki darbe hipotezi.....	28
Şekil 2: Kontrol grubu ratlarda anlamlı kilo artışına karşın plasebo ve genistein koruyucu ve tedavi edici gruptaki ratlarda anlamlı bir kilo kaybı gözlemlendi.....	44
Şekil 3. Gruplar arasında AST düzeyleri.....	46
Şekil 4. Gruplar arasında ALT düzeyleri.....	47
Şekil 5. Gruplar arasında serum TNF-alfa düzeylerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 6. Gruplar arasında serum TGF-beta düzeylerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 7. Gruplar arasında plazma MDA değerlerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 8. Gruplar arasında karaciğer doku MDA değerlerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 9: Kontrol grubu ile plasebo grubu histolojik bulgularının karşılaştırılması.....	54
Şekil 10: Plasebo grubu ile GK ve GT gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması.....	55

KISALTMALAR

NAYKH	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Nonalkolik steatohepatit
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
MDA	: Malondialdehid
HNE	: Hidroksinonenal
YK	: Yağlı karaciğer
YZD	: Yağdan zengin diyet
GK	: Genistein koruyucu
GT	: Genistein tedavi edici
TGF-beta	: Transforming growth faktör beta
VKİ	: Vücut kitle indeksi
AST	: Aspartat aminotransferaz
ALT	: Alanin amino transferaz
GGT	: Gama glutamil transpeptidaz
ALP	: Alkalin fosfataz
SYA	: Serbest yağ asiti
CYP	: Sitokrom P
MCD	: Metiyonin ve kolinden fakir

1. ÖZET

Oksidatif stres nonalkolik steatohepatit (NASH) patogenezinde rol alan en önemli faktörlerden biridir. Birçok farmakolojik özelliklere sahip bir fitoöstrojen olan genisteinin (4',5, 7-trihydroxyisoflavone) antioksidan ve anti-inflammatuvar etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan NASH modelinde genisteinin koruyucu rolünü araştırdık.

48 adet erkek Sprague-Dawley rat randomize olarak dört eşit gruba ayrıldı. Birinci grup sadece standart rat yemi aldı (kontrol grubu: grup K). Grup 2 (plasebo (serum fizyolojik) grubu), grup 3 ve 4' e ise yağdan zengin diyet (YZD) ad libitum olarak verildi. Grup 3'e YZD' e başlamadan bir gün önce ve tüm deney süresince 0.2 mg/kg/gün dozunda genistein subkutan olarak uygulandı (genistein koruyucu (GK) grup). Grup 4'e dördüncü haftadan sonra iki hafta 0.2 mg/kg/gün dozunda genistein subkutan olarak uygulandı (genistein tedavi (GT) grubu). 6 hafta bittikten sonra tüm ratlar öldürüldü. Kan örnekleri ve karaciğer dokuları alındı. Aminotransferazlar, plazma ve karaciğer malondialdehid (MDA) düzeyleri ölçüldü. Histopatolojik olarak, karaciğerde steatoz, balonlaşma dejenerasyonu, inflammasyon, Mallory cisimciği ve fibrozis değerlendirildi.

AST ve ALT değerleri ($p < 0.001$), plazma ve karaciğer MDA ve plazma TNF-alfa düzeyleri (p sırası ile < 0.001 , < 0.001 , < 0.01) plasebo grubunda kontrol grubundan yüksekti. TGF-beta düzeylerinde anlamlı fark yoktu. Histopatolojik olarak steatoz, mm^2 deki ortalama inflammatuvar hücre sayısı ve balonlaşma dejenerasyonu plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (p hepsinde < 0.001). Fibrozis ve Mallory cismi saptanmadı. Hem GK hem de GT grubunda AST ve ALT düzeyleri (p hepsinde < 0.05), plazma ve karaciğer MDA düzeyleri ve TNF-alfa düzeyleri plasebo grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (p

hepsinde <0.05). Histopatolojik incelemede GK ve GT gruplarında steatoz (sırası ile $p<0.05$ ve <0.01), mm^2 deki ortalama inflamatuvar hücre sayısı (her iki grupta $p<0.01$) ve balonlaşma dejenerasyonu (her iki grupta <0.01) plasebo grubuna göre anlamlı olarak düşüktü.

Sonuç: Güçlü bir antioksidan olan genistein deneysel olarak NASH gelişimini belirgin olarak önlemekte, histopatolojik ve biyokimyasal düzelme ile steatohepatiti azaltmaktadır.

Anahtar kelimeler: Nonalkolik steatohepatit, yağdan zengin diyet, oksidatif stres, genistein.

2. ABSTRACT

PREVENTIVE ROLE OF GENISTEIN IN EXPERIMENTAL NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS MODEL

Oxidative stress is one of the important factors that are playing role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Genistein (4',5, 7-trihydroxyisoflavone), a phytoestrogen with several pharmacological features, has also antioxidant and anti-inflammatory properties. In the present study, we evaluated preventive role of genistein in NASH model induced experimentally.

48 Sprague-Dawley rats were divided into four equal groups randomly. First group received only standard rat chow diet (control group: group C). Group 2 (group placebo), 3 and 4 were given high fat diet (HFD) ad libitum. 0.5 ml serum physiologic injected daily to placebo group subcutaneously. 0.2 mg/kg/day genistein injected subcutaneously to group 3 (genistein prevention (GP) group) starting one day before HFD administration and during the whole experiment. After the fourth week, genistein at 0.2 mg/kg/day injected subcutaneously to the fourth group (genistein treatment (GT) group). All rats killed after six weeks. Blood samples collected and tissue samples prepared. Aminotransferases, plasma and liver malondialdehyde (MDA) levels were measured. Steatosis, ballooning degeneration, inflammation, Mallory body and fibrosis in the liver examined histopathologically.

AST and ALT levels (p for each <0.001), plasma and liver tissue MDA and plasma TNF-alpha levels ($p <0.001$, <0.001 , <0.01 , respectively) were higher in placebo group than in the control group. TGF-beta levels were comparable in the placebo and control groups. In histopathological examination, steatosis, inflammatory cells per mm^2 and ballooning degeneration were significantly higher in the placebo

group than in the control group (p for each <0.001). There was no fibrosis and Mallory body. AST and ALT levels (p for each <0.05), plasma and liver tissue MDA and plasma TNF-alpha levels were significantly lower (p <0.05 for each) either in GP or in GT groups compared to the placebo group. Histopathologically, steatosis (p<0.05 and <0.01 respectively), mean number of inflammatory cells per mm² (p<0.01 for each) and ballooning degeneration (p <0.01 for each) in GP and GT groups were significantly lower than in the placebo group.

In conclusion; genistein, a strong antioxidant agent, not only remarkably prevents the emergence of NASH, but also attenuates the existing steatohepatitis by improving the biochemical and histopathological abnormalities.

Key words: Nonalcoholic steatohepatitis, high fat diet, oxidative stress, genistein.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) ve bu hastalığın en ciddi formu olan nonalkolik steatohepatitis (NASH) bir zamanlar sık rastlanan fakat zararsız bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen, günümüzde kronik karaciğer hastalığı, siroz ve karaciğer yetmezliğine ilerleme potansiyeli taşıdığı artık çok iyi bilinmektedir (1). Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalar hastalığın patofizyolojisini anlamaya ve tedavisine odaklanmıştır.

NASH, patogenezi oldukça karışık olan bir hastalıktır. Day ve James (2) tarafından ortaya atılan ve yaygın olarak kabul gören modele göre NASH iki darbeden (two-hit model) oluşan bir hastalıktır: **Darbe 1:** Birçok faktöre bağlı olarak trigliseridlerin karaciğerde birimi ile yağlı karaciğer (steatoz) gelişimi ve bununla birlikte karaciğerin ikinci darbelere karşı hassasiyetinin artışı, **Darbe 2:** İkinci darbe ile birlikte hepatosit hasarı, inflamasyon ve sonuç olarak fibrozis gelişimi.

Karaciğerde aşırı yağ birikimi ve buna neden olan etkenlere kronik olarak maruziyet oksidatif stres oluşumuna neden olur. Oksidatif stres, yağlı karaciğer (stetatoz) evresinden NASH'e ilerleyişten sorumlu tutulan en önemli faktörlerden biri olarak düşünülmektedir. Çeşitli NAYKH hayvan modelleri (3, 4) ve NASH' li hastalarda (5, 6) yapılan çalışmalarda okside proteinlerin (tirozin nitasyonu) ve lipidlerin mevcudiyetinin gösterilmesi, oksidatif stresin NASH gelişiminde rolüne dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır.

Reaktif oksijen ürünler (ROS) aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonu, NASH patogenezinde merkezi bir role sahiptir. Lipid peroksidasyonu; membranların yıkımına ve malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE) gibi reaktif metabolitlerin artışına neden olur ve böylece hücrel disfonksiyona yol açar (7, 8).

Lipid peroksidasyonunun derecesi serbest yağ asitlerinin mevcudiyeti ile koreledir (9) ve steatotik karaciğerde ciddi zarar vereceğini göstermektedir. MDA ve HNE, NASH'li hastaların %90'ında steatozlu hastalarla karşılaştırıldığında oksidatif stresin arttığını gösterir bir şekilde artmış olarak bulunmuştur (10).

NASH tedavisi de patogenez çalışmalarına paralel olarak araştırma safhasındadır ve henüz ideal bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır. Başlangıç tedavisi olarak hastalara kilo verme önerilse de hedefe ulaşılması zordur. İlaç tedavilerinden insülin duyarlılığını artıran ajanların potansiyel yan etkilerinin doğurduğu endişeler, hipolipidemik ilaçların belirgin bir faydalarının saptanamaması araştırmacıları alternatif tedavilere yöneltmiştir. Alternatif tedavi içinde patogeneze sorumlu tutulan özellikle ikinci darbeye rol alan ve fibrojeniz gelişiminden de sorumlu olduğu düşünülen oksidatif stres ve endotoksin-aracılı sitokin salınımı gibi faktörlere yönelik tedavilerle hastalığın şiddetinin azaltılması veya koruyucu tedaviler hedef alınmıştır. NASH patogenezinde oksidatif stresin rolünü gösteren delillerin artışı ile birlikte birçok antioksidan ajanın tedavideki rolü de araştırılmaktadır. Betain ve N-asetilsistein gibi glutatyon öncüleri ile yapılan bazı çalışmalarda olumlu sonuçlar bildirilmiştir (11).

Birçok farmakolojik özelliklere sahip bir fitoöstrojen olan genisteinin (4',5,7-trihydroxyisoflavone) kanser önleyici etkilerinin yanında anti-tümör, antioksidan ve anti-inflammatuvar etkileri olduğu bildirilmektedir (12, 13). Birçok hücresel sistemde büyümeyi önleyici etkisi olduğu gösterilen genisteinin, hücre büyümesini TGF-beta-1'in uyarı yollarını modüle ederek inhibe edebileceği öne sürülmüştür (14). Yakın zamanda yapılan iki ayrı *in vitro* çalışmada genisteinin hepatik fibrojenizden sorumlu olan stellat hücrelerin proliferasyonunu etkilediği (15, 16)

ve TGF- β -1 aracılı kollajen sentezini azaltarak anti-fibrotik etki gösterdiği (16) bildirilmiştir.

Bu çalışmada, hem anti-inflammatuvar ve antioksidan özellikleri hem de karaciğer stellat hücreleri üzerinden etki göstererek anti-fibrotik etkileri olduğu ileri sürülen genisteinin deneysel olarak oluşturulan NASH modelinde koruyucu rolünü araştırmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Yağlı Karaciğer

İlk kez 1962 yılında Heribert Taylor tarafından anlamlı miktarda alkol kullanmayan fakat alkolik steatohepatit ile uyumlu histolojik özelliklere sahip bir vaka bildirilmiştir (17). Benzer başka yayınlardan sonra alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması terimi ilk kez 1980’de Mayo klinikten Ludwig ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (18). 1998 yılında Amerika Birleşik Devletlerinin ulusal sağlık enstitüsün yaptığı konsensus toplantısı ile NASH dâhil yağlı karaciğer (YK) hastalıklarının kronik viral hepatit ve alkolik hepatit ile beraber endüstriyel ülkelerde en sık rastlanılan karaciğer hastalıkları olduğu bildirilmiştir. Geçmişte selim seyirli bir hastalık olarak görülen YK’in, artık günümüzde düşünöldüğü kadar masum olmadığı bilinmektedir. YK, kronik karaciğer hastalıklarına ve hatta hepatoselöler karsinomaya ilerleyebilmektedir. Hastalığın masum olarak bilinmesi yanlışının yanında yakın zamana kadar YK’in daha çok refah düzeyinin yüksekliğı ve beraberinde alkol tüketimi ile ilişkili olduğu kabul edilmekteydi.

Kimyasal olarak sağlıklı bir karaciğer kuru ağırlığının yaklaşık %4–5 kadarı yağdır ve mikroskopta görülemez. Bu miktar %5–6’yı geçtiğı takdirde mikroskopik olarak karaciğerde yağ birikimi fark edilebilir. Bununla beraber, terminolojik olarak karaciğer yağlanması ve YK aynı değildir. Bu iki terimin ayrımı şöyle yapılmaktadır. Histolojik olarak karaciğerdeki hepatositlerin %50’den azı görülebilir yağ damlacıkları içeriyorsa buna *karaciğer yağlanması*, eğer hepatositlerdeki görülebilir yağ damlacığı içeriğı %50’den fazla ise buna YK denir. Diğer bir deyişle karaciğerin ıslak ağırlığına göre yağ oranı %10-25 olduğunda bu durum YK olarak adlandırılır (19).

4.1.1. Yağlı Karaciğerin Oluşumu

Yağlı karaciğer biręok mekanizmayla oluşmaktadır. Belli başlı olarak dđrt mekanizma ile oluşabilir.

a) Trigliseridler ve yağ asitlerinin besin yolu ile alınması: Besinlerdeki yağ portal ven kanında şilomikronlar ile karaciğere taşınır. Nđtral yağların bir kısmı ise trigliseridler ve serbest yağ asitleri olarak depolandıkları yağ dokusuna ulaşırlar. Daha sonra esterlenmemiş yağ asitleri olarak karaciğere ulaşabilirler.

b) Hepatositlerde serbest yağ asidi sentezinde artma veya hücreye alınan yağ asitlerinin oksidasyonunda azalma. Her ikisi de hücrede trigliserid birikmesine yol açar.

c) Trigliseridlerin hepatositlerden dışarı taşınmasında bozulma. Trigliseridler kolesterol, fosfolipidler ve apo-proteinlerle birlikte dışarı taşınır. Taşıyıcı proteinlerin sentezi bozulduğunda trigliseridler hücre içerisinde kalır.

d) Karbonhidrat fazlalığı: Hücrede trigliseridlere dđnüřtürülebilir ve burada depolanabilir (20).

4.1.2. Yağlı Karaciğer Epidemiyolojisi

Yağlı karaciğer sık rastlanılan bir durum olmasına karşın genel populusyondaki prevalansı belli değildir. Histopatoloji ile elde edilen sonuçlar seğilmiş hasta populusyonu olduğu için genellenememektedir. Karaciğer histolojisi olmadan laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ile yapılan ęalıřmalarda ise YK'e neden olan biręok hastalık ayırt edilemez ve hatalı sonuç elde edilir. Histoloji en kesin sonucu vermekle beraber hiçbir inceleme tek başına YK prevalansını belirlemede güvenilir değildir. İncelenen populusyonun sosyal yapısı da epidemiyolojik sonuçları önemli oranda etkilemektedir. Yağlı karaciğer sıklığı Japonya ve İtalya' da yapılan ęalıřmalara göre %3 ile 58 arasında değişmektedir ve

ortalama olarak %23'tür (21, 22). Bu geniş aralığın sebebi dünyadaki farklı populasyonlardır ve populasyonların farklı sosyoekonomik durumlarıdır.

Cinsiyet konusunda da sonuçlar farklılık arz etmektedir. Önceleri YK'in kadın ve erkek cinsiyette eşit sıklıkta olduğu bildirilmekteydi. Ultrasonografi ile yapılan yeni çalışmalarda ise Japonlar farklı sonuçlar bildirmektedir. Aşırı kilosu veya hipertrigliseridemi olmayan kişilerde YK erkeklerde kadınlara göre anlamlı olarak daha sıktır (23).

Ultrasonografi ile yapılan çalışmalarda çocuklarda da YK'e düşük sıklıkta da olsa (%1.8-3.4) rastlanmaktadır. Fakat en sık görülme yaşı 40-59 yaşları arasındadır (24).

Görüldüğü gibi YK prevalansı yaş, cinsiyet, beslenme tarzı, vücut kitle indeksi (VKİ), ilaç kullanımı ve toksinlerle temasa göre değişkenlik göstermektedir.

YK için en önemli risk faktörleri obezite, alkol tüketimi ve insülin direncidir. Kontrollerde YK prevalansı %16 ile 20 arasında iken bu oran alkoliklerde %46'ya, aşırı kilolularda %76'ya, obez alkoliklerde ise %95'e yükselmektedir (25). Bu sonuçlarda göstermektedir ki obezite, alkol kullanımına göre YK gelişimi için daha güçlü bir ilişki göstermektedir.

4.1.3. Yağlı Karaciğer Etyolojisi

Yağ metabolizmasında karaciğer, barsaklar, kan ve periferik yağ dokusu gibi değişik organlar arasındaki ilişkiler zinciri, besin alımı, karaciğer ve barsak mukozasının veya hormon metabolizmasının sentez yeteneği gibi çeşitli fonksiyonlar arasında karmaşık bir ilişki vardır. Bunlarda meydana gelebilecek bozukluklar karaciğer yağ miktarında değişikliklere neden olabilir ve YK gelişimine zemin hazırlayabilir.

Yağlı karaciğerin birçok nedeni vardır. Bunlar **Tablo 1'de** gösterilmiştir.

Tablo 1: Yağlı karaciğere neden olan faktörler

Beslenmeye bağlı nedenler:	Aşırı beslenme, adipozitas, yetersiz beslenme: (Malnütrisyon, hızlı kilo kaybı vb), alkol, total parenteral beslenme Jejuno-ileal by-pass, mide by-passı, gastrik bandaj
Metabolizma bozuklukları:	Tip 2 diyabetes mellitus, hiperlipidemi, abetalipoproteinemi, Galaktozemi, glikogenez, fruktoz intoleransı vb. Reye sendromu Gut
Kronik hastalıklar:	İnflamatuvar barsak hastalıkları Wilson hastalığı Kronik sağ kalp yetmezliği Kistik fibrozis
Enfeksiyonlar:	Kronik hepatit C, fulminan virüs hepatiti, HIV enfeksiyonu, tüberküloz, kronik osteomyelit Karaciğer rezeksiyonu veya transplanatasyonu sonrasında karaciğer yetersizliği
Endokrinopatiler:	Cushing hastalığı, miksödem, akromegali
İlaçlar, toksinler:	Amiodaron, tamoksifen, glukokortikoidler, sentetik östrojenler, metotreksat, tetrasiklin, salisilat, valproik asit, virostatikler Arsenik, kurşun, tetraklor karbon, mantar zehirlenmesi vb.
Hamilelik:	Hiperemezis gravidarum, gebeliğin akut yağlı karaciğeri

Muhtemel nedenlerin çeşitliliği, YK'de tümüyle non-spesifik bir tablonun sözü konusu olduğunu ve YK'in kendi başına belirli bir nedene bağlanamayacağını ve ayrıca kendi başına bir hastalık değeri taşımadığını göstermektedir. Altta yatan hastalık veya nedenin giderilmesiyle karaciğerde depolanan yağ komplikasyonsuz bir şekilde kaybolur. Fakat YK tek başına herhangi bir risk taşımasa da ciddi formu olan NASH gelişimi için olmazsa olmaz koşuldur. Bu nedenle YK tamamıyla zararsız olarak kabul edilmemelidir ve YK'den şüphelenilen olgular detaylı olarak incelenmeli ve gerekli tetkikler yapıp uygun önlemler alınmalıdır.

4.2. Nonalkolik steatohepatit

Karaciğerde anlamlı miktarda alkol tüketimi olmadığında karaciğerde yağlı değişiklikler olmasına NAYKH denmektedir. NAYKH'nın histolojik spektrumu oldukça geniştir. Genellikle selim seyirli hafif karaciğer yağlanmasından, progresif fibrozis ve siroza ilerleyebilen formu olan steatohepatite (yağlanma ve hepatoselüler inflamasyon ve hasarın birlikteliği) kadar değişik formları mevcuttur. NAYKH'ı nedene yönelik olarak primer veya sekonder olabilir (26). Metabolik sendromun özelliklerinin eşlik ettiği ve diğer nedenlerin bulunmadığı tipe primer NAYKH'ı denmektedir. Sekonder nedenler **Tablo 1'de** gösterilmiştir. Primer ve sekonder NAYKH'nın birbirinden ayırt edilmesi önemlidir. Çünkü patogenezi ve prognozları birbirlerinden farklıdır ve sekonder tipe prognoz daha kötüdür.

NASH, NAYKH'nın klinik formlarından biridir ve en ciddi seyirli olanıdır. Psödoalkolik hepatit, diyabetik hepatit, metabolik steatohepatit, steatonekroz, alkol benzeri hepatit gibi birçok farklı terim NASH ile eş anlamlı olarak tanımlanmış ve kullanılmıştır. NASH tanımı için uluslararası bir uzlaşma toplantısı olmasa da yakın zamanda yapılan çalışmalarda NASH tanısını yaparken şu kriterler kullanılmaktadır (18, 27, 28).

a) Histoloji: Karaciğer biyopsisinde orta ile şiddetli derecede makroveziküler yağlı dejenerasyon ile birlikte lobuler veya portal inflamasyon olması. Birlikte Mallory cisimi, fibrozis ve siroz olabilir veya olmayabilir.

NASH'in histolojik tanımlanmasında da farklılıklar olmasına karşın steatohepatite ek olarak hepatositlerde balonlaşma/dejenerasyon, fibrozis ve Mallory cisimi NASH tanısında genellikle aranmaktadır.

Yakın zamanda Matteoni ve arkadaşları NAYKH'ı kategorize eden bir çalışma yapmışlardır (28). Buna göre NAYKH'ı dört alt tipe ayırmıştır.

Tip 1: Sadece yağlanmanın olması,

Tip 2: Yağlanmanın yanında inflamasyonun bulunması,

Tip 3: Yağlanma ve balonlaşma dejenerasyonu olması,

Tip 4: Yağlanma ve fibrozis ve/veya Mallory cisimciklerinin bulunması.

Bunlardan sadece tip 3 ve 4'ün ileri karaciğer hastalığına ilerlediği gösterilmiştir.

b) Alkol kullanımı: Birinci basamak sağlık kuruluşu hekimleri, laboratuvar testleri veya aile yakınlarının doğrulaması ile ihmal edilebilir derecede etanol kullanımı.

Günümüzde ihmal edilebilir alkol dozu henüz tam anlamıyla tanımlanmamıştır. Alkol kullanımının dışlanması için histolojik inceleme ve çeşitli laboratuvar testleri kullanılmaktadır. Histolojik olarak NASH'te nükleer vakuolaziyon ve steatozis alkolik steatohepatite göre daha şiddetliyen periportal fibrozis, Mallory cisimcikleri ve safra kanal proliferasyonu alkolik steatohepatitte daha sıktır. Alkolik steatohepatitte histolojik şiddetin derecesinin daha fazla olduğu bildirilmekle beraber bu iki klinik durumu sadece histolojiye dayanarak ayırt etmek mümkün değildir (29).

Ayaktan hastalarda rutin biyokimyasal testler ve klinik ile de NASH ile alkolik steatohepatit ayırımı yapmak zordur. Aşırı alkol kullanımını göstermek için birçok belirteç (mitokondriyel aspartat aminotransferaz (AST), ortalama eritrosit partikül hacmi, gama glutamil transpeptidaz (GGT) karbonhidrat eksik transferin ve AST/ALT oranı gibi) kullanılmasına rağmen *desile transferinin total transferine oranı* aşırı alkol alımı için en iyi göstergedir (30, 31). Henüz ne tek ne de kombine olarak hiçbir laboratuvar göstergesi alkol aldığını inkâr eden hastalarda 30 gramın altında alkol alımını belirlemede yardımcı değildir.

c) Eşlik eden hastalıklar: Diğer aktif karaciğer hastalıklarının olmaması.

NAYKH'ı tanısı konulmadan önce YK'e neden olabilecek sekonder nedenler dışlanmalıdır. Bunların içerisinde en önemlileri; Wilson hastalığı, kortikosteroid ile tedavi edilen otoimmün karaciğer hastalığı, galaktozemi, metotreksat toksisitesi ve hepatit C enfeksiyonudur (29)

4.2.1 NASH epidemiyolojisi

NAYKH' ının gerçek insidansı ve prevalansı bilinmemekle beraber, yaklaşık olarak NAYKH'ın genel toplumun %20'sinde, NASH' in ise %3' ünde görüldüğü bildirilmektedir (32, 33). Tüm yaş gruplarında görülen YK'in prevalansı vücut kilosunun artmasıyla artış göstermektedir. Normal kilolu kişilerde görülme sıklığı %10-15 iken obezlerde bu oran %70-80'e çıkmaktadır (24). Yakın zamanda yayınlanan bir derlemede de NAYKH' ın en sık olarak diyabetiklerde (%50) ve obezlerde (%75) görüldüğü ve morbid olarak obez olan diyabetiklerin hemen hepsinde mevcut olduğu bildirilmektedir (26). NASH görülme sıklığı ise obezlerde %18,5, şiddetli obez diyabetlilerde ise %50 dir. Bunun yanında normal kilolu kişilerde de daha düşük sıklıkta olmakla beraber (%2.5) NASH'e rastlanmaktadır (32, 34).

Her ne kadar 1990 yılından önceki yayınlarda NASH'in genellikle kadınlarda (%53-85) görüldüğü bildirilse de (18), daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalar (27, 35) NASH' in her iki cinsten de eşit sıklıkta görüldüğünü bildirmişlerdir.

4.2.3. Klinik belirtiler ve laboratuvar bulguları

Klinik belirtiler: Birçok diğer kronik karaciğer hastalığında olduğu gibi NAYKH'ı asemptomatiktir. Karaciğer hastalığı ya başka nedenlerden dolayı yapılan incelemelerde ya da rutin laboratuvar tetkiklerinde rastlantısal olarak ortaya çıkar. Birçok asemptomatik hastada alanin aminotransferaz (ALT) yüksekliği antihiperlipidemik ilaç kullananlarda hepatik panelin monitorizasyonu esnasında saptanır. Bazen şüpheli safra kesesi taşı araştırılırken ALT yükseliği saptanır. NAYKH'ı viral hepatit B ve C gibi kronik hastalığının bilinen diğer nedenler dışlandıktan sonra açıklanamayan persistan ALT yüksekliğinin en sık nedenidir (36).

Semptomlar oluştuğunda genellikle nonspesifiktir. Halsizlik muhtemelen en sık bildirilen semptomdur, fakat histolojik lezyonun şiddeti ile korele değildir (27). Diğer sık bir şikayet ise karaciğerin bulunduğu sağ üst kadranda künt bir ağrı, rahatsızlık hissi olmasıdır. Küçük bir hasta grubunda daha ciddi karaciğer hastalığının bulguları olan kaşıntı, bulantı ve kusma görülebilir. Hatta ileri dönemlerde sarılık, asit gibi kronik karaciğer hastalığına özgü belirti ve bulgularda ortaya çıkabilir(37).

Fizik muayene: NASH için herhangi bir patognomonik bir belirti yoktur. Obezite fizik muayenede en sık rastlanan bulgudur ve çalışmaların %30-100'ünde mevcuttur (18, 27, 32). Karaciğer hastalığına dair en sık bulgu ise hepatomegalidir ve çalışmalarda %50'ye kadar olan bir sıklıkta bildirilmektedir (18, 27).

Hastaların az kısmında kronik karaciğer hastalığına ait bulgular olabilir, bunlardan da en sık olanları spider nevi ve palmar eritemdir (38). İlerlemiş hastalıkta sarılık, ödem ve portal hipertansiyon bulguları olabilir. Karaciğer hastalığı ilerledikçe kas erimesi gelişebilir fakat ödem ve önceden mevcut olan obezite bunu maskeleyebilir.

Laboratuvar bozuklukları

Hastane popülasyonlarındaki NASH hastalarında yapılan çalışmalarda (18, 27, 35) çoğu olguda (%50-90) anormal aminotrasferaz aktiviteleri mevcuttur. Enzim yükselmesinin derecesi belirgin değildir ve genellikle normalin üst sınırının bir ila dört katı arasındadır. ALT değerleri bir çok durumda AST değerlerinden yüksek olsa da (18, 39) AST bazen, özellikle de siroz varlığında, ALT seviyesinden yüksek olabilir (27). Ama AST/ALT oranı hemen hiçbir zaman 2'den büyük değildir. ALT seviyesinin yükseldiği hastalarda bu yükseklik genellikle persistan olmakla beraber değerlerde dalgalanmalar görülebilir. Daha az sıklıkta ise ALT seviyeleri daimi olarak normal düzeyde kalabilir. ALT değerleri steatozun veya fibrozisin derecesi ile korele değildir (40). GGT düzeyleri de artabilir. Alkalin fosfataz seviyeleri genellikle normal düzeylerde seyretmekle beraber normalin üst sınırının iki katına kadar artış gösterebilir (18, 27, 35).

Siroz veya karaciğer yetmezliği gelişene kadar hepatik fonksiyonel kapasite normal sınırlarda seyreder. Diyabetiklerde diyabetik nefropati nedeniyle proteinüri ve hipoalbuminemi gelişebilir. Birçok seride hastaların %10-15'nde antinükleer antikor pozitifdir (18, 41) ve ilerlemiş fibrozis ile ilişkili olduğu bulunmuştur (42). Hastaların yaklaşık %30-50'sinde diyabet veya glukoz tolerans bozukluğu, %20-80'ninde ise açlık lipid profilinde hipertrigliseridemi mevcuttur (18, 43, 44)

4.2.4. TANI

Görüntüleme: Ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi (BT) ve magnetik rezonans gib görüntüleme yöntemleri karaciğerdeki orta ve şiddetli yağlı değişiklikleri belirlemede güvenilirdir. Ultrasonda hepatik yağ, dalak ve böbrek korteksinin daha az olan ekojenitesine göre artmış ekojeniteye neden olur.

Kontrastsız BT incelemesinde yağlı karaciğer hipodens ve dalaktan daha koyu olarak belirir.

Basit steatozis ve NASH'i hiçbir görüntüleme yöntemi ayırt edemez (45). Ultrasonografinin yağlı karaciğeri belirlemede duyarlılığı ve özgüllüğü VKİ arttıkça azalmaktadır, bu nedenle duyarlılığı %49 ile %100 arasında özgüllüğü ise %75 ile %95 arasında değişmektedir (45, 46). Görüntüleme yöntemlerinin duyarlılığı yağlı infiltrasyonun derecesi ile artmaktadır ve en az %33 steatozis olması görüntüleme yöntemleri ile tespit için optimaldir (45).

Karaciğer biyopsisi: Karaciğer biyopsisi ve histolojisi NASH tanısına götüren en önemli tanı yöntemleridir. Çok sayıda kimyasal fibrozis göstergesi kullanılmasına rağmen fibrozis ve siroz tanısı için şimdiye kadar yardımcı olmamıştır. Evreleme için sadece karaciğerin histolojik incelemesi anlamlıdır.

NAYKH için tanıda altın standart steatozisin karaciğer biyopsisi ile teyidi ve alkol gibi diğer nedenlerin klinik olarak dışlanması sonrasında klinikopatolojik korelasyonun sağlanmasıdır. Fakat alkolik karaciğer hastalığı ve NAYKH'ı benzer histolojik bulgulara sahip olduğu için karaciğer biyopsisi yardımıyla ayırım yapılamaz. Alkolik ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığını ayırmak için gerekli olan alkol alımı sınırı için cut-off değeri belli değildir. Fakat genellikle kadınlarda 20 gram/gün, erkeklerde 30 gram/gün alkol alımı sınır olarak kullanılmaktadır (33).

Karaciğer Histolojisi: NASH tanısı, klinik açıdan kesinliğe sahip olmadığından histolojik bulgu gereklidir. NAYKH'ı tanısı için minimum olarak ağırlığın %5-10'u kadar steatozis gereklidir. Steatozis genellikle makroveziküler olmakla beraber mikroveziküler damlacıklar ile karışık olabilir.

NASH'i basit steatozisten ayırmak için gerekli olan histolojik özellikler çelişkilidir ve literatürde farklılıklar mevcuttur.

Yakın zamanda yapılan bir konferansta (33) NASH; zone 3'de baskın olan makroveziküler yağlanma ile kombine olarak hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve mikst tipte inflamatuvar infiltrat olarak tanımlanmıştır ve genellikle karakteristik perisinüzoidal ve periselüler fibrozis ile beraberdir.

Histolojik olarak NASH üç formda görülebilir (47).

- a) İnaktif NASH: (İlerlemeyen form). Histolojik olarak hafif inflamasyon, yağlanma veya inflamasyonsuz yağlanma izlenir.
- b) Subfulminan NASH: Çok seyrek görülür. Potansiyel olarak fataldir. Alkolik steatohepatitten ayırımı zordur.
- c) Kronik NASH: Klinisyenlerin NASH olarak adlandırdıkları kronik olan formdur. Yavaş ilerler. Hastalık uzun süre duraklayabilir sonra yine yavaş ilerleme gösterebilir. Ataklar şeklinde gidiş gösterebilir, fokal infiltratlar oluşturabilir ve bağ dokusu lifleri birikebilir. Yıllar sonra siroza dönüşür.

NASH' te saptanan tipik histolojik bulgular: makroveziküler, mikroveziküler veya mikst tipte yağlanma, hepatositlerde balonlaşma, mikst hücreli inflamasyon, lobüler hepatit, tek hücre veya fokal nekrozlar, periselüler ve perisinüzoidal fibrozis (*chicken wire fibrozis*), santral ven çevresinde tel örgüsü fibrozisi (*chicken wire fibrozis*), santral alanlar arasında periportal alandan diğerine uzanan fibröz septalar, karaciğer yapısının tümüyle değişmesi (siroz) ve daha seyrek olarak ta siderozis (47).

Sentrilobuler inflamasyon ve fibrozisin bulunmaması, karaciğerde yağlanmanın olmaması halinde başka tanı düşünülmelidir.

4.2.5. Grade ve Stageleme

Anlamli parankim parametrelerinin yarı kantitatif olarak değerlendirilmesine gradeleme (derecelendirme) denir. Evrelendirme (staging) ise karaciğer parenkim hasarı sonucunda gelişen yapısal değişimlerin değerlendirilmesidir. Histolojik grade

steatohepatit lezyonunun aktivitesini gösterirken, evre fibrozisin derecesini yansıtmaktadır.

NASH'in klinik gidiş değişkenlik göstermektedir. Klinik olarak önemli bir bulgu olmadan ağır ilerleyici bir gidiş gösterebilir. Bu nedenle hastalık tablosu morfolojik kriterlerle tanımlanmalıdır. Farklı araştırmacıların bulgularını karşılaştırılabilir kılmak amacıyla histolojik veriler standardize edilmelidir. Bu nedenle bir derecelendirme ve evrelendirme sistemi oluşturulmalıdır.

NASH için Brunt ve arkadaşları (48) bir grade ve evreleme sistemi önermişlerdir. Bu sisteme göre grade için 10 bulgu kullanmışlardır: hepatik makroveziküler steatozis, hepatoselüler balonlaşma, intra-asinar inflamasyon, portal trakt inflamasyonu, Mallory hyaleni, asidofil cisimcikler, glikojen nükleusu, lipogranülomlar ve hepatoselüler demirin değerlendirilmesi. Bunların hepsi ayrı ayrı skorlanmaktadır. NASH'te grade 0 (sıfır) yoktur. Çünkü NASH morfolojik değerlendirme olmadan onu tanımlayacak bir serolojik testi bulunmayan klinikopatolojik bir antitedir.

Fibrozis için üç parametre skorlanmaktadır: perisinüzoidal fibrozis, portal fibrozis ve köprüleşme fibrozisi. Bunlara dayanarak nekroinflamatuvar aktivite hafif, orta ve şiddetli olarak evrenmektedir. Hastalık evrenmesi de fibrozisin derecesine göre 1'den 4' e kadar sınıflandırılmıştır.

Brunt ve arkadaşları (48) tarafından 1999'da NASH için önerilen bu yarı kantitatif değerlendirme sistemi NAYKH'nın içerisine aldığı klinik spektrumun tamamını değerlendirmede kullanılamamaktadır. Çok yakın zamanda NASH Klinik Araştırma networku tarafından yeni bir histolojik değerlendirme yöntemi geliştirildi (49). Bu sistemde klinik çalışmalarda kullanılmak üzere NAYKH'ı aktivite skoru (NAS) geliştirilmiştir. Bu sistemde 14 histolojik bulgu kullanılmıştır.

4'ü yarı kantitatif olarak steatozis (0-3), lobular inflamasyon (0-2), hepatoselüler balonlaşma (0-2) ve fibrozisi (0-4) değerlendirmektedir. Diğer dokuz özellik ise var veya yok olarak kaydedilmektedir. Bu skora göre NAS ≥ 5 NASH tanısı ile korele olduğu bulunurken, < 3 skorunda ise tanı olarak NASH yoktur şeklinde değerlendirilmiştir.

4.2.6. Doğal seyir ve prognoz

NASH sık görülmesine ve potansiyel olarak ciddi olmasına karşın doğal seyri çok iyi belirlenmemiştir. Yakın zamanda 420 NAYKH'ı tanı hastada yapılan bir çalışmada (50) hastalar ortalama 7.6 yıl takip edilmişler. Bu sürede 420 hastanın 53'ü (%12.6) ölmüş. Yaşam beklentisi, normal popülasyona göre beklenenden düşükmüş. Yüksek mortalite yaş, bozulmuş açlık glukozu ve sirozla birlikteymiş. 21 (%5) hastada siroz gelişirken iki hastada hepatoselüler karsinoma saptanmış.

4.2.7. NASH patogenezi

NASH patogenezi henüz açık değildir. Mevcut bilgilere göre insülin direnci, hipertrigliseridemi ve hızlı kilo kaybı bir şekilde NASH patogeneziye katkıda bulunmaktadır. Diğer yandan risk taşıyan herkeste NASH gelişmemesi, muhtemelen çevresel faktörler ve genetik özelliklerin etkisi olduğunu düşündürmektedir.

NASH patogenezi oldukça karışıktır. Artmış tümör nekrozis alfa (TNF- α) ekspresyonu, insülin direnci ve karaciğere artmış serbest yağ asidi (SYA), TNF- α ve kortizol sunumuna neden olan adipoz dokuda lipoliz arasındaki yakın ilişkiler başlangıç olarak steatozis gelişimine neden olur. Artmış yağ birikimi nihai olarak lipotoksisitenin bir yandaşı olarak hepatik insülin direncine yol açar ve NAYKH'ında evrensel olarak bulunan insülin direncine katkıda bulunur. İnsülin direnci SYA'nin oksidasyonunda artışa neden olur. Artmış yağ oksidasyonu TNF- α ile birlikte oksidatif stres ve mitokondriyel uncoupling protein salınımına neden olur.

Hassas kişilerde bu oksidatif stres ve sonucundaki lipid peroksidasyonu, TNF- α ekspresyonu ve mitokondriyel disfonksiyonun büyüklüğü hepatositlerde ölüme, inflamasyona ve en son olarak da fibrozise yol açar. NASH'e duyarlılığı artıran faktörler oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu artıran çevresel ve genetik faktörler tarafından belirleniyor gibi görünmektedir (51).

Bugün için NAYKH gelişiminde temel patofizyolojik faktör olarak insülin direnci kabul edilmektedir (33). Esas olarak hepatik steatozun insülin direnci sendromunun bir parçası olduğu da ileri sürülmektedir.

4.2.7.1. İnsülin direnci

İnsülin direncinin patogenezi karışıktır ve insülin sekresyonu ve etkisini etkileyen birçok genetik polimorfizm ve obezite ve hareketsizliğe neden olan çevresel faktörler katkıda bulunmaktadır. İnsülinin antilipolitik etkisine karşı direnç mevcuttur. Yağ asitleri visceral yağ dokusundan mobilize olur, serum SYA'nın düzeyleri artar ve hepatositlere sunumu artar. İnsülin direncine bağlı olarak hepatositlerde yağ birikimi olur. Normalde karaciğerdeki lipidlerin %15'ini oluşturan trigliseridler yağlanma ile %50'ye çıkar (52). Ek olarak, kronik hiperinsülinemi *de novo* hepatik lipogenez gelişimine yardımcı olur ve yağ dokusu büyüme faktörü gibi birçok profibrotik sitokini aktive edebilir (53).

Karaciğerdeki yağlanma sonrası doğal seyirdeki farklılık, steatoz gelişiminden sonraki patofizyolojinin daha kompleks olduğunu ve birçok faktörün rol aldığını göstermektedir.

4.2.7.2. Serbest yağ asitleri

Serbest yağ asitleri NASH patogenezinde anahtar rol oynamaktadır. NASH'in SYA'nın serum konsantrasyonlarının ve karaciğere SYA'nın alımının arttığı durumlarla birlikte olduğu bulunmuştur. Bunlar arasında fazla kilo, hızlı kilo verme,

tip 2 diyabetes mellitus ve alkol vardır. Ayrıca SYA'nın serum konsantrasyonları ile NASH'te saptanan karaciğer fibrozu arasında bir korelasyon olduğu ileri sürülmüştür (54). SYA'ı yağlı karaciğer gelişiminde sadece ilk darbeye değil aynı zamanda NASH gelişiminde yani ikinci darbeye de rol oynayan zararlı bir faktördür. Her ne kadar ROS üretimi ve oksidatif stres NASH gelişiminde zemin hazırlasalar da, inflamasyon NAYKH'ından NASH'e geçişte majör ek faktördür. SYA'ı burada anahtar rol oynayabilir. Çünkü, SYA'ı inflamasyon kaskadında yer alan İkB/NFkB'ı direk olarak aktive eder (55, 56)

4.2.7.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; ROS ve bunların metabolitlerinin üretiminin bunlara karşı olan savunma ve detoksifiye etme mekanizmalarının kapasitesini aşarak dengenin bozulması ile meydana gelir. Serbest radikaller genellikle serbest metallerle (Fe, Cu) ilgili enzimatik veya enzimatik olmayan oksido-redüksiyon esnasında oluşabilir. En önemli radikaller süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve aktif hidroksil radikalidir. Yağ metabolizmasında kısa-, orta-, ve uzun zincirli SYA'ının artan akımı sonucunda beta-oksidasyon artmaktadır. Bu da NASH yolunda en önemli adım olan serbest radikal üretimi ile sonuçlanmaktadır. Sonuçta hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine maruziyet lipidler, DNA ve proteinler gibi hücrel makromoleküllerde hasara neden olabilir. Giderek artan bir şekilde ortaya çıkmaktadır ki, farklı oksidatif stres seviyeleri ile hücreler üzerinde farklı etkiler meydana gelir: belirgin bir etki olmayabilir veya hücre büyümesi, büyümenin durması, apoptozis ve nekrozun uyarılması gibi etkiler olabilir. Mitokondri bu ROS'lar için en önemli kaynağı oluşturmaktadır (57). Reaktif oksijen türlerinin artışı aynı zamanda antioksidan ajan olan alfa tokoferol (vitamin E) ve glutatyonun (GSH) azalması ile eş zamanlıdır.

Serbest radikal üretimi için önemli bir enzim sistemi endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) sistemidir. Bu sistem açlık, alkol, tip 2 diyabet, santral obezite ve insülin direnci gibi NASH patogenezinde önem taşıyan faktörlere bağlı olarak artar. CYP 2E1 enziminin uyarılması yan ürünlerin salınımı ile ROS oluşumuna neden olur. CYP2E1, alkolik karaciğer hastalığında önemli role sahip olan ROS oluşumu ve patogeneizde merkezi role sahiptir. İlginç bir şekilde NASH indüksiyonunda da potansiyel bir faktör olarak suçlanmaktadır. Deneysel NASH'te, CYP2E1 ekspresyonunun yaygınlığı ve lobular dağılımı steatozis ve inflamasyonun dağılımı ile yakından ilişkili bulunmuştur (58). CYP2E1 ekspresyonu NASH hastalarının biyopsilerinde de artmış olarak bulunmuştur (59). Fakat CYP2E1 endojen lipidlerin peroksidasyonunda tek katalizör değildir ve CYP4E10 ve CYP4E14 de bu hastalarda up-regüle olarak bulunmaktadır ve oksidatif stresin başlamasında alternatif olarak rol alabilirler (3).

CYP2E1 sistemi NASH indüksiyonunda önemli bir role sahiptir. Fakat başka kaynaklardan özellikle de mitokondrilerden gelen serbest radikallerin ve TNF- α sitokininin rolü muhtemelen daha anlamlıdır. Eğer karaciğere mitokondrinin beta-oksidasyon kapasitesini aşacak kadar SYA'i gelirse peroksizomlar ve sitozol diğer potansiyel ROS üreticileri olarak rol alırlar (57).

Hepatik antioksidan savunmaların azalması da ROS'un etkilerini arttırabilir. Hem rat hem de sıçanlar da MCD diyeti ile yapılan çalışmalarda hepatic glutatyon seviyeleri azalmış olarak, hepatic ve sistemik tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler (4-HNE ve MDA) ise artmış olarak bulunmuştur (57).

4.2.7.4. Lipid peroksidasyonu ve NASH

Serbest radikallerin oluşumu hücrenin gereksinimi olan oksijenin %90'ının harcanmasına, çeşitli metabolik bozukluklara ve lipid peroksidasyonu olarak bilinen

doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açar. Oksidatif stres kısmında belirtildiği gibi, mitokondriyal, mikrozomal, peroksizomal ve sitoplazmik lipid metabolizmasından masif serbest radikal çıkışı lipid peroksidasyonuna neden olur.

Doymamış lipidlerin serbest radikallerin etkisine maruziyeti bir serbest radikal aracılı mekanizma olan lipid peroksidasyonunda zincirleme bir reaksiyon başlatır. Çoklu doymamış yağların diyetle eklenmesi bu lipid peroksidasyonunu artırır (57). Lipid peroksidasyonu, hücrel membranların yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına neden olur. Lipid peroksidasyonunun sitotoksik ürünleri, nükleotidler ve protein sentezi gibi hücrel fonksiyonları bozabilir (60) ve hepatik stellat hücrelerdeki kollajen gen ekspresyonunu module ederek karaciğer fibrogenezinde rol oynayabilir.

Okside proteinler veya lipidlerin varlığının deneysel çalışmalarda (5, 6) gösterilmesi ile oksidatif stresin NAYKH'ı ve NASH'li hastalarda bulunduğu dair kanıt olmuştur. ROS aracılı lipid peroksidasyonunun NASH patogenezinde merkezi role sahip olması için birçok neden mevcuttur. Öncelikle, Pessayre ve arkadaşlarının (61) derlemesinde belirtildiği gibi ROS ve lipid peroksidasyonu potansiyel olarak NASH'teki tüm tipik histolojik özellikleri açıklamaktadır. Plazma ve intraselüler membranların peroksidasyonu direk olarak hücre nekrozu/apoptozise ve megamitokondriye neden olabilir.

Lipid peroksidasyonunun önemli yıkım ürünleri MDA ve 4-HNE NASH'te yüksek konsantrasyonda izlenmiştir (62). 4-HNE ve MDA hepatik proteinleri kovalen olarak bağlayarak potansiyel olarak zararlı immün cevabı başlatan bileşenler oluşturabilirler. Ayrıca hepatoselüler stellat hücrelerinde ekstraselüler matriks proteinlerin sentezini, Mallory cisimciklerinin oluşmasını uyarabilirler ve HNE nötrofil kemotaksisini uyarabilir.

NAYKH'ı bulunan hastalarda yapılan bir çalışmada (63) lipid peroksidasyonunun majör aldehydik metaboliti 4-HNE bileşenleri imünohistokimyasal boyama ile karaciğerde yaygın olarak bulunmuştur.

4-HNE ve MDA; mitokondri DNA'sına, proteinlerine zarar vererek solunum zincirlerinde aksamaya neden olur. Böylece yeniden açığa çıkan serbest radikaller kupfer hücrelerinde, hepatositlerde ve yağ dokusunda TNF- α ekspresyonunu aktive ederler. TNF- α mitokondrielerde yapısal ve fonksiyonel olarak hasar verir (64). Bu, serbest radikallerin, lipid peroksidasyon ürünlerinin ve sitokinlerin elektron transport zincirinin ve böylece tüm hücrelerin metabolizmasının aktivitelerinde azalmaya neden olmaları anlamına gelir.

Hepatositlerdeki oksidatif stres nükleer faktör K beta (NF κ B)'yi aktive ederek steatotik karaciğerin belirgin şekilde duyarlı olduğu sitokinlerinde dahil olduğu proinflamatuvar genlerin ekspresyonuna neden olur (65).

İnsanlardaki NASH'te oksidatif stresin varlığına yönelik indirek kanıtlar NASH'in tedavisi için antioksidanın kullanıldığı pilot çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar olmuştur (66, 67, 68). Yakın zamanda bir diyet anketi ile yapılan çalışmada (69) NASH'li obez hastaların NASH'li normal kilolu hastalara göre antioksidanlardan fakir diyetle beslendikleri bildirilmiştir. NASH hastalarının karaciğer biyopsisinin mikroarray ile incelemesinde birçok antioksidan enzimi kodlayan mRNA'ların ekspresyonunun normal karaciğere göre veya diğer karaciğer hastalığı olanlara göre daha düşük olarak rapor edilmiştir (70). Tüm YK'lerde inflamasyon ve fibrozis gelişmediği için ikincil fibrojenik darbe olan oksidatif stres diyet, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenebilir.

Lipid peroksidasyonunun derecesi serbest yağ asitlerinin mevcudiyeti ile koreledir (9) ve steatotik karaciğerde ciddi zarar vereceğini göstermektedir.

MDA ve HNE, NASH'li hastaların %90'unda steatozlu hastalara göre oksidatif stresin arttığını gösterir bir şekilde artmış olarak bulunmuştur (10).

4.4.7.5. NASH Patogenezinden sorumlu diğer faktörler

4.4.7.5.1. Sitokinler: TNF- α , transforming growth faktör (TGF) beta, interlökin (IL) 8 ve 10 gibi çok sayıda sitokinlerin ekspresyonu oksidatif stresin bir hücrel reaksiyonudur. Serbest radikaller ve sitokinler, karaciğerin TNF- α 'ya duyarlılığını arttırlar. TNF- α ekspresyonu enteral endotoksinler gibi diğer faktörlerle de uyarılır. TNF- α leptin eksikliğinde de up-regüle olur ve artmış TNF- α konsantrasyonları insülin direncini agra ve eder. Sitokinler fibrogenezisi uyarırlar ve idame etmesini sağlarlar (71).

4.4.7.5.2. Genetik: Tüm risk gruplarında NASH gelişmemesi bu antiteden genetik faktörlerinde kısmen de olsa sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Fakat NASH için genetik etki açık değildir. Genetik faktörler nihai olarak NASH gelişimine neden olan bazı mekanizmaları tetikleyebilir; birçok sitokinin ekspresyonunu ve ikinci darbenin yaygınlığını etkileyebilirler. Aday bazı genetik faktörler henüz araştırma safhasındadır.

4.4.7.6. İki darbe hipotezi:

Günümüzde NASH patogenezini açıklamak için en çok kabul gören görüş, 1998 yılında klinik ve deneysel çalışmalara dayanılarak önerilen "*iki darbe hipotezi*" dir (2). Birinci darbe karaciğerin yağlı dejenerasyonu veya steatozis hepatis için substrat olan hepatositlerde yağ birikimidir. Bu yağlı birikim karaciğerin ikinci darbelere olan duyarlılığını da arttırmaktadır. İkinci darbe oluşana kadar karaciğer yağlanması steatozisten başka bir şey değildir. İkinci darbe barsaklara cerrahi müdahale yapılması, belirli ilaçların alınması veya tip 2 diyabetes mellitusun gelişmesi olabilir. Bu senaryoda SYA'nin ani artışı önemli rol oynayabilir.

Bu nedenle, NASH tipik olarak tip 2 diyabetliler, santral obeziteliler, hızlı kilo kaybı ve alkol kullanımı gibi SYA'lerin mobilizasyonuna ve karaciğere alımına yol açarlarda meydana gelmektedir. İkinci darbe ile hepatositlerde hasar, inflamasyon ve nihai olarak fibrozis meydana gelir.

Steatozis: Birinci darbe: Giderek artan oranda kanıtlar steatozisin masum bir durumdan ziyade NAYKH'nın NASH'e ve fibroze ilerlemesinde rolünün olduğunu göstermektedir (2). Steatozisin şiddeti hem eşlik eden steatohepatitin ve/veya fibrozisin riskini hem de siroza ilerleme riskini önceden haber verebilir (32, 72). Bunun yanında, yağlanmanın şiddeti hepatik stellat hücrelerin aktivasyonunun derecesi ile koreledir (73).

SYA'i hepatositlerde mitokondri veya diğer hücre organellerinde okside olurlar veya trigliserid, fosfolipid ve kolesterol esterlerinin sentezinde kullanılırlar. Eğer SYA'i sunumu aşırı olursa yağ metabolizması fazlaca aktive olur ve yıkım azalır ve trigliserid depolanması meydana gelir.

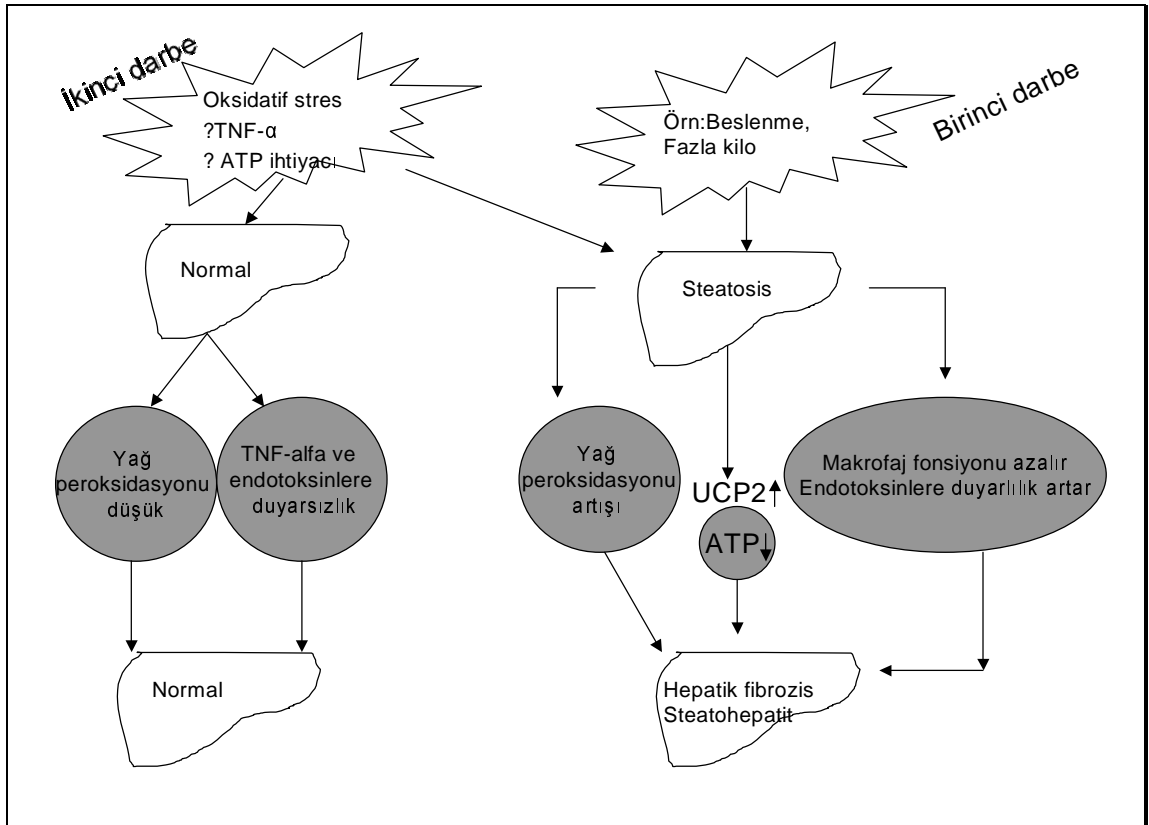
Aşırı aktive olmuş yağ metabolizması serbest radikallerde artış ile birliktedir. Bu durumda oksidatif stres meydana gelmektedir. Yağlı dejenerasyona uğramayan karaciğer ikinci darbeye karşı önemsiz olarak reaksiyon gösterir. Duyarlı karaciğerde ise artmış yağ içeriği lipidlerin beta oksidasyon ile yoğunlaştırılmaları ile koreledir ve sonuçta serbest radikaller artar, ATP azalır. Makrofajların fonksiyonunda azalma ile bireysel hasarlar tetiklenir.

4.4.7.7. NASH patogenezinde son görüşler: Görüldüğü gibi NAYKH'ı ve NASH'in patogenezi oldukça karışıktır ve bilgiler arttıkça daha da karmaşık hale gelmektedir.

Yakın zamanda tek bir darbenin yani ünsülin direncinin NAYKH'nın tüm spektrumunu açıklamaya yeterli olabileceği ileri sürülmüştür (74). Son zamanlarda

hangi faktörlerin rol oynadığı net olarak ifade edilmemişse de "üçüncü/dördüncü darbe" ile de siroz ve hepatoselüler kanserin geliştiği ileri sürülmektedir (75). Wanless ve Shiota (76) ise daha kapsamlı, dört basamaklı, bir model önermişlerdir: Birinci basamakta insülin ile kolaylaştırılan steatozis, ikinci basamakta intraselüler lipid toksisitesi veya lipid peroksidasyonu ile indüklenen nekroz, üçüncü basamak hepatositlerden intersiyuma yığın halinde lipidlerin salınması ve bunların hepatik venlere direk ve inflamatuvar hasar yapması ve son olarak dördüncü basamakta sekonder kollapsla venöz obstruksiyon gelişmesi ve nihai olarak fibröz septalaşma ve siroz oluşumu.

NASH patogenezi **Şekil 1'de** kısaca özetlenmiştir.



Şekil 1: NASH patogenezi: İki darbe hipotezi.

4.5. DENEYSEL NONALKOLİK STEATOHEPATİT MODELLERİ

Hepatositlerde yağ birikiminden ve sonuçta steatohepatit gelişiminden sorumlu patogenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması risk ilerlemesini azaltıcı koruyucu yolların ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Hepatik steatozis ve steatohepatitin hayvan modelleri NAYKH'nın daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu modeller ile devam ettirilen çalışmalar ile patogenez aydınlamaya devam edecek ve NAYKH'nın tanı ve tedavisi daha iyi noktalara gelecektir. Birçok deneysel model mevcuttur. Steatozis ve steatohepatitin patogenezinden sorumlu mekanizmaları açıklamak için en çok kullanılan üç ana model özellikle bilgi verici olmuşlardır: genetik olarak obez ob/ob sıçanlar, lipoatrofik sıçanlar ve kolinden eksik metiyoninden kısıtlı diyetle (MCD) normal ratların beslenmesi. Bu üç ana model de NAYKH'ı için çoklu darbe hipotezini desteklemektedir (77). Bu modellerin tümünde steatozis spontan olarak gelişirken, steatohepatit ve siroza ilerleme değişkendir.

4.5.1. Genetik olarak obez, diyabetik ob/ob sıçanlar: NAYKH'ı için doğal olarak oluşan bir modeli temsil etmektedir. Bunlarda ob genindeki mutasyon dolayısıyla beyaz yağ dokusunda sentezlenen doygunluk hormonu leptin eksiktir. Leptin eksikliğinde aşırı yeme nedeniyle ob/ob sıçanlarda obezite gelişir. Bu sıçanlarda ayrıca insülin direnci, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve hiperlipidemi vardır. En önemlisi bunlarda spontan olarak yağlı karaciğer gelişir. Hiperleptinemi olup da, leptinin etkilerine karşı direnç bulunan db/db sıçanlar ve fa/fa ratlarda fenotip olarak ob/ob sıçanlara benzerler (78). Bu modellerde leptin eksikliği veya etkisine karşı direnç sonucunda obezite, insülin direnci, dislipidemi ve NAYKH'ı meydana gelmektedir. Fakat bu modelde eksiklik olarak, aşikâr veya biyokimyasal olarak hepatik inflamasyon bulguları (yani steatohepatit) meydana gelmez.

Bu modeller hepatik steatozun diğer hepatotoksik maddelere duyarlılığı arttırıp arttırmadığını ve ayrıca bu maddeler ile karşılaşılınca steatohepatit gelişip gelişmeyeceği hipotezlerini araştırmada kullanılmaktadır.

4.5.2. Diyabetle beraber olan lipoatrofik sıçanlar: Değişik Őekillerde oluşmaktadır. Adipoz doku leptinin temel kaynağı olduğu için, adipoz dokunun harap edildiği veya genetik olarak eksik olduğu tüm lipoatrofik sıçanlar leptinden fakirdir. Bu nedenle ob/ob sıçanlarda olduğu gibi bu modelde de insülin direnci, artmış TNF- α ekspresyonu ve yağlı karaciğer gelişmektedir (79). Lipoatrofik sıçanlarla yapılan çalışmalarda obezitenin kendiliğinden (veya tek başına) NAYKH'ı veya insülin direncine yol amadığı gösterilmiştir (77).

Bu iki modelin handikapı sadece hepatik steatozis gelişmesidir ve NASH ile ilgili çalışmalar yapılması için ek hepatotoksik maddeler ile NASH indüklenmesi gerekmektedir.

4.5.3. Kolinden fakir metiyoninden kısıtlı diyetle beslenen normal rat/sıçanlar: Normal rat ve sıçanların MCD ile beslenmesi hepatik antioksidanları şiddetli oranda azaltır ve GSH ve S-adenozilmetiyonin (S-AMe) düzeyleri azalır (80). Kolin ve metiyoninden fakir diyet oksidatif savunma mekanizmalarını azaltarak oksidatif stresi arttırır (81). Bu model hepatik steatozis ve steatohepatitte oksidatif stresin patogenetik önemini göstermenin yanında oksidatif stresin obeziteden bağımsızlığını da göstermektedir.

Kolin ve metiyoninden fakir diyetin eksik yönü ise insülin ve leptin direnci, obezite gibi insan NASH'inin temel patogenetik faktörlerinin gelişmemesi ve insanlarda meydana gelen NASH'in bir özelliği olmayan nütrisyonel yönden eksiliklere neden olmasındır.

Bu üç ana modelin yanında daha az kullanılan başka modellerde vardır. Ratlarda CYP2E1 indüksiyonu ile de yağlı karaciğer oluşturulabilmektedir (82). Fakat bu modelin handikapı ratların çok uzun süre, yaklaşık bir yıl, tedavi edilmelerinin gerekmesidir (83). Diğer bir modelde ise genetik olarak sitokrom P450 enzim sisteminde defekt olan rodentler kullanılmaktadır (84).

Yağlı karaciğer ve NASH için birçok model kullanılmasına rağmen bunlarda patogenetik faktörlerden bir kısmı eksiktir. Eksik yönler nedeniyle uygun modelin olmayışı NASH'in patogenetik faktörlerini ve bunlara yönelik tedavileri araştırmaya yönelik çalışmaların yapılmasını engellemektedir.

Yakın zamanda Lieber ve arkadaşları (85) tarafından erkek Sprague-dawley cinsi ratlarda yağdan zengin diyetle (YZD) yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar bu eksikliğin giderilmesi yönünden umut verici olmuştur. Bu modelde tüm esansiyel besinler yeterli miktarda mevcuttur. Standart rat diyetinin içeriğinde enerjinin %18'i proteinden, %47'si karbonhidratlardan, %35'i yağlardan elde edilirken, YZD diyetinde protein oranı sabit iken karbonhidrattan sağlanan enerji miktarı %11'e düşerken yağdan elde edilen enerji miktarı ise %71 oranına çıkmaktadır. Bu diyetin içeriği **Tablo 2'de** gösterilmiştir. Bu diyetle üç hafta gibi kısa bir sürede NASH'in tipik hepatik lezyonları olan steatozis, inflamasyon ve erken fibrozis meydana gelmiştir. Patogeneizde suçlanan insülin direnci, hiperinsülinemi, hepatik TNF- α ve CYP2E1 ekspresyonunda artış ve oksidatif stres belirteçlerinde artış da saptanmıştır. Elde edilen bulgular açıkça göstermiştir ki insan NASH'inde mevcut olan anahtar özellikler bu modelle ortaya konulmuştur.

Tablo 2: Yağdan zengin diyetin içeriği*

İçerik	Yağdan zengin diyet (gr/litre)
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 bitartrat	0.53
Fiber	10.0
Xantan gum	3.0

*: (85) no'lu kaynaktan alınmıştır. Diyete ayrıca 50 gram vitamin-mix eklenmiştir.

4.6. TEDAVİ

En az viral hepatitler kadar sık olarak rastlanılan NASH'in siroza ilerleme riski de bu hastalıklar ile benzerdir. Fakat NASH için etkili bir tedavi henüz yoktur.

NASH'in prognozu açık değildir. Bu nedenle terapötik yaklaşımların hedefi hastalığın ilerlemesinin durdurulması ve eğer mümkünse siroz gelişiminin önlenmesi olmalıdır. NASH patogenezi de henüz tam olarak aydınlatılmadığı için tedavi ampiriktir ve NASH'e eşlik eden durumlara yöneliktir.

Mevcut NASH tedavi yaklaşımları konservatiftir ve **tablo 3'te** gösterilmiştir.

Önemli bir sağlık sorunu olan NASH hakkında toplum ve hastalar bilgilendirilmeli, beslenme tarzı ve yaşam stilinde düzenlemeye dair eğitim verilmesi ilk yapılması gereken basamaktır. Alkol ve diğer hepatotoksinlerden kaçınmalıdırlar. İlaçlarla yapılan NASH tedavisine başlanmadan önce bedensel aktivite ve diyet denenmelidir. Bunun yanında ilaç ve diyet/egzersiz tedavileri kombine de edilebilir.

Tablo 3: NASH hastaları veya deneysel çalışmalarda yararlı etkileri gösterilen terapötik yaklaşımlar (86).

Strateji	Tedavi
Tedrici olarak kilo verme	Kalori kısıtlaması Egzersiz Kilo verdirici cerrahi işlemler
İnsülin duyarlılığını arttırma	Metformin PPAR ligandları (Rosiglitazon, Pioglitazon)
Lipid azaltıcı ilaçlar	Fibratlar (Klofibrat) Balık yağı
Antioksidanlar	Vitamin E N-asetil-sistein Betain
Sitokin modülasyonu	Vitamin E
Apoptoz	Ursodeoksikolik asit
Karaciğer demiri	Flebotomi

4.6.1. Vücut kilosunda azalma: Hızlı, fakat aynı zamanda yavaş olarak 10 ile 30 kilo verme şiddetli olarak aşırı kilolu kişilerde karaciğer yağ içeriğini azaltabilir hatta normale döndürebilir (87). %30 oranında aşırı kiloya sahip aşırı kilolu kişilerde vücut ağırlığında yaklaşık %10 oranında azalma laboratuvar parametrelerinde yararlı düzelmelere neden olur. Diğer yandan, çok hızlı ve aşırı kilo verme SYA deşarjına yol açarak portal fibrozis ve inflamasyona neden olabilir (88).

En etkin tedavi uzun zaman periyodunda sürdürülen düşük kalorili diyetdir. Diyetle ise düşük kalorinin yanında özellikle de çoklu doymamış yağ asitleri etkilidir. Diyabetli ve kardiyovasküler hastalığı ve lipid bozukluğu bulunan hastalarda ise özel bakım gerekir ve metabolik bozuklukların optimal kontrolü önemlidir. İştah kesicilerin yararı belirlenmemiştir, ayrıca bu ilaçların pulmoner sistem üzerine zararlı etkileri bulunabilir.

Progresif kilo verme ve metabolik kontrolün yanında tedrici egzersiz de karaciğer bozukluğundaki düzelemeye katkıda bulunabilir.

4.6.2. NASH için ilaç tedavisi

Maalesef, obez kişilerde diyet ve egzersiz programlarına uyum oldukça düşüktür. Epizodik kilo verme sonrasında tekrar fazla yeme ve kilo almalar görülmektedir. Bu nedenle bazen uyumsuz diyetler, özellikle de hızlı kilo verme ve sonrasında tekrar kilo alma şeklinde yoyo etkisi yaptıkları zaman işler kötüye de gidebilir.

Bu nedenle patofizyolojik zemindeki mevcut faktörlere yönelik tedaviler araştırılmaktadır. Fakat NASH'e yönelik verilen tedavilerin büyük çoğunluğu küçük ve kontrollü olmayan çalışmalardır. Bundan dolayı bugün en yararlı ilacın hangisi olduğuna dair karar vermek oldukça zordur. Fazla kilolu olmayanlarda, fazla kilolu olup da kilo veremeyen veya verdiği kiloda kalamayanlarda ilaç tedavisi uygulanmalıdır.

İnsülin direncinin NASH patogenezindeki temel rolünden dolayı insülin direncini azaltan ve hepatik insülin duyarlılığını arttıran ilaçlara ilgi fazladır. Metforminin NASH'te nekroinflammatuvar aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir (89). Etkilerini insülin direncini peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (PPAR gama) nükleer reseptörlerini aktive ederek düzelterek gösteren roziglitazon ve

piagli tazonda NASH'te yararlı etkiler göstermektedirler (90, 91). Fakat bu ilaçların uzun dönem etkileri bilinmemektedir. Ayrıca tiazolidinlerin potansiyel hepatotoksik yan etkileri olması bu ilaçların uzun dönemde NASH'te güvenle kullanımları için ayrı bir handikaptır.

4.6.2.1. NASH tedavisinde antioksidanlar

Obez ve aşırı kilolu NASH hastaları için kilo verme oldukça zordur ve genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Ayrıca hızlı kilo verme de hepatik bozukluğu hızlandırabilir ve daha kötüleştirebilir. İnsülin duyarlılığını arttıran tedaviler, ursodeoksikolik asit gibi denenmiş diğer tedavi yöntemleri ile elde edilen sonuçlar da farklılıklar arz etmektedir ve henüz kabul görmüş etkili bir tedavi yoktur.

NASH patogenezinin daha iyi anlaşılması yeni terapötik açılımların bulunması için gereklidir. Oksidatif stres, NASH patogenezinde merkezi role sahiptir ve en önemli faktörlerden birisidir.

NASH'li hastaların karaciğeri oksidatif stresin tetiklenmesi ve sürmesi için gerekli içeriği sahiptir. Hepatoselüler steatozisin kendisi de lipid peroksidasyonun ilerlemesini tetikleyebilir. Pessayre ve grubu, karaciğerde okside edilebilir yağın varlığının tek başına lipid peroksidasyonunu tetikleyebileceğini göstermişlerdir (92).

Hücreleri serbest oksijen radikallerinde korumak için süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi birçok savunma mekanizması mevcuttur. Bunların yanında karoten, likopen, askorbit asit ve tokoferol gibi birçok besinin antioksidan etkileri mevcuttur.

Tüm yağlı karaciğerler fibrotik hale gelmiyor. Fibrojenik ikinci darbe oksidatif stresin nedeni diyet, çevresel faktörler ve genetik polimorfizm olabilir. Fakat koruyucu mekanizmaların eksikliğine de bağlı olabilir. Antioksidanlarda rölatif

bir eksiklik oksidatif stres ve lipid peroksidasyonun devamında önemli etkiye sahip olabilir.

Bu nedenlerle terapötik açıdan NASH patogenezinde rol oynayan oksidatif stresi işaret etmek mantıklıdır. Güçlü serbest radikal temizleyici özellikleri olan antioksidan maddeler NASH tedavisinde yer alabilirler. Bir hidroksil anyonu yüzlerce yağ asidi yan zincirinin oksidasyonuna yol açarak lipid hidroperoksidlere dönüşümüne neden olabilir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu antioksidan tedavi ile durdurulup önlenir.

Doğada serbest radikallerin oluşumunu önleyen çeşitli sistemler vardır. Antioksidanlar olmadan canlı kalmazdı. 1969' da hemen her memeli tarafından eksprese edilen süperoksit dismutaz (SOD) keşfedilmiştir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürerek detoksifiye etmektedir. Demir ve bakır gibi metallerin de antioksidatif etkileri mevcuttur. Karoten, likopen, askorbik asit ve tokoferoller gibi birçok antioksidan ise önemli besinlerdir (93)

4.6.2.1.1 Güçlü antioksidan etkiye sahip olan Fitoöstrojenler ve İzoflavonlar

Antioksidanların besin kaynaklı olanları oksidatif hasara karşı korunmada oldukça önemlidir. Fitoöstrojenler, östrojen reseptörlerine bağlanabilen, bitkilerde antioksidan görevleri bulunan, insan ve hayvanlarda östrojenik ve anti-östrojenik etkilere sahip bitkisel kaynaklı difenolik bileşiklerdir (94). Yapı ve fonksiyon olarak 17 β -östradiyole benzerler. Kimyasal yapılarında ise tüm steoid hormonlarda olduğu gibi steran halkası mevcuttur. Zayıf östrojenler olarak davranabilir veya östrojen aktivitesini etkileyen maddeler için prekürsör sağlarlar. Vücutta östrojen reseptörlerine bağlanabilir ve östrojen reseptörü ve dolaşımdaki östrojen

konsantrasyonlarına bağılı bağılı olarak hedef dokularda hem östrojenik hem de anti-östrojenik etkilere sahiptirler (95).

"Fitoöstrojen" yüzlerce farklı bileşiği kapsayan oldukça kapsamlı bir terimdir. Başlıca beş sınıfı; izoflavonlar, flavanollar, flavonlar, flavanonlar ve lignanlardır. Bunlardan en önemlileri ise soya fasulyesinde bulunan izoflavonlar ve hemen hemen bütün bitki özlü gıdalarda bulunan lignanlardır (96).

İzoflavon grubunda genistein, daidzein, formononetin, biochanin A yer almaktadır (97). İzoflavonlar vücutta çok çeşitli etkilere sahiptir. Over, endometriyum, akciğer, kolon ve mide kanseri gibi çeşitli kanserlere, kardiyovasküler hastalıklara, osteoporoz ve çeşitli kronik hastalıklara karşı koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (98). Soya izoflavonların etki mekanizmalarından bir tanesi de antioksidan özellikleridir. Soy izoflavonların antioksidan etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir. İzoflavonların, özellikle de genistein ve daidzeinin serbest radikaller üzerine baskılayıcı etkileri mevcuttur (99). Genistein ve daidzeinin oksidanlara maruz kalan hücrelerde ve DNA' da bir oksidatif marker olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunu önledikleri gösterilmiştir (100). İzoflavonlar hücrelerdeki oksidatif hasardaki azalmayı antioksidan savunma mekanizmaları uyarma gibi indirek yollarla da yapabilir (101).

4.6.2.1.2. Genistein: Genistein (4',5,7-trihidroksiizoflavon), izoflavonoid bileşiklerinin biyosentetik olarak en basitidir. Soya fasulyesinde bulunan genisteinin birçok biyolojik aktivitesi mevcuttur. Yapı olarak 17 β -östradiyola benzer ve hem östrojenik hem de antiöstrojenik etkileri mevcuttur. Diğer izoflavonlarda olduğu gibi majör kaynak soya ürünleridir. Gensitein meme ve protat kanseri ve kardiyovasküler hastalıklardan koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir (14). Genistein DNA topoizomeraz ve tripsin protein kinazı inhibe etmektedir (102). Bunun yanında

antioksidan ve hücre siklusunu inhibe edici aktivileri de mevcuttur. Kanser önleyici etkilerinin yanında, genisteinin antitümör, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileride mevcuttur (12, 13). Yakın zamanda yapılan iki *in vitro* çalışmada genisteinin rat hepatik stellat hücrelerinin proliferasyon ve aktivasyonunu inhibe ettiği ve karaciğer fibrozisini önleyici potansiyel etkileri olabileceği bildirilmiştir (103, 104).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma için Fırat Üniversitesi etik kurulundan onay alındı ve çalışma uluslararası standart deney hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

5.1. Deney hayvanları: Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde (FÜTDAM) yapıldı. Çalışmada, FÜTDAM'dan temin edilen, ağırlıkları 233-345 (275.4±26.6) gram arasında değişen, 48 adet sekiz haftalık erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar dörderli olarak, paslanmaz çelik kafeslere konuldu. Ratlar çalışma süresince, 12 saat ışık/karanlık siklusunun sağlandığı, ısı (23-25°C) ve nemin kontrol edildiği ortamda muhafaza edildi. Deneye ratlar çalışmanın ortama bir hafta uyum sağladıktan sonra başlandı.

5.2. Deneyde kullanılan diyetler ve hayvanların beslenmesi: Su ve standart rat yemi ve YZD ratlara *ad libitum* olarak verildi. Standart rat yemi Özel Elazığ Yem Fabrikasından alındı. Bu yemin yağ içeriği tüm diyetin %20.5 idi. YZD ise Fırat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Beslenme Anabilim dalındaki Uzman tarafından hazırlandı. İçeriği tabloda gösterilmiştir. Bu diyetin yağ içeriği ise %71 dir. Ratlara günlük 10gram/100 gram dozunda yem verildi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise çelik paslanmaz bilyeli biberonlarda verildi. YZD her hafta taze olarak hazırlandı ve kullanıldığı süre içerisinde buzdolabında (8°C'de) saklandı. Ratlar günde üç kez genel olarak kontrol edildiler. Günlük yem ve su tüketimleri takip edildi. Ayrıca haftalık olarak kiloları tartılıp kaydedildi.

5.3. Grupların dağılımı ve deneysel çalışmanın dizaynı: Ratlar dört eşit gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu): Tüm deney süresince sadece standart rat yemi aldılar. Herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Grup 2 (Plasebo grubu): Çalışma süresince ratlara özel olarak hazırlanan YZD diyet verildi. Deney süresince 0.5 ml serum fizyolojik subkutan yolla enjekte edildi.

Dördüncü haftanın sonunda YZD ile beslenen ratlardan iki tanesi sakrifiye edilerek, histopatolojik olarak minimum NASH kriterlerinin gelişip gelişmediği teyit edildi. %10'dan fazla yağlanma, inflamasyon, balonlaşma dejenerasyonu ve nekroinflamasyonun varlığının görülmesinden sonra çalışmaya devam edildi.

Grup 3 (Genistein koruyucu (GK) grup): Deney süresince YZD diyetle beslenen bu gruptaki ratlara çalışmanın başlamasından bir gün önceden başlayarak deney sonuna kadar 0.2 mg/kg/gün dozunda genistein subkutan olarak enjekte edildi.

Grup 4 (Genistein tedavi edici (GT) grup): YZD verilen bu gruptaki ratlara ise dördüncü haftadan sonra, iki hafta süreyle, 0.2 mg/kg/gün dozunda genistein subkutan olarak enjekte edildi.

5.4. Genistein hazırlanması ve dozu: Genistein (Sigma/Türkiye), 100 mikrolitre DMSO (%1.25) ve PEG-400 (%98.75) karışımında çözülerek hazırlandı ve +8°C' de muhafaza edildi. Grup 3 ve 4'deki ratlara 0.2 mg/kg/gün dozunda subkutan yolla (105) enjekte edildi.

5.5. Çalışmanın sonlandırılması ve örneklerin toplanması: Çalışma toplam altı hafta sürdü. Altı hafta bittikten sonra ratlar bir gecelik açlığı takiben dekapite edildi ve kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri 5000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra elde edilen serum örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı. Abdomenleri açılıp karaciğerleri alındıktan sonra tartıldı ve kaydedildi. Karaciğerin farklı bölgelerinden doku örnekleri alındıktan sonra daha önceden hazırlanmış %10'luk formalin solusyonu ile tespit edildi. Aynı gün Fırat Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında parafin blokları hazırlandı.

5.6. Biyokimyasal analizlerin yapılması

Serum AST, ALT, GGT, ALP, total ve direk bilirubin, glukoz, kolesterol ve trigliserid düzeyleri Olympus AU 600 otoanalizörle Olympus kitler kullanılarak çalışıldı.

TNF- α (TNF- α ELİSA kit (rat), Biosource Int., California, USA) ve TGF-beta (TGF-beta ELİSA kit (Multispecies), Biosource Int., California, USA) kitleri ile ELİSA yöntemiyle çalışıldı.

Plazma MDA düzeyleri Satoh ve arkadaşları (106) ve Yagi (107) tarafından modifiye edilmiş tiyobarbitürik asit metodu ile ölçüldü. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi. Karaciğer doku MDA düzeyleri ise Ohkawa (108) metodu ile ölçüldü, sonuçlar nmol/gram doku olarak verildi.

5.7. Histopatolojik değerlendirme: Parafin ile fikse edilmiş bloklardan beş mikrometre kalınlığında karaciğer kesitleri alınarak konvansiyonel histopatolojik inceleme için hematoksilin eozin (HE) ile boyandı. Fibrozis değerlendirilmesi için ise Masson Trichrom boyaması kullanıldı. Boyanan preparatlar Olympus BX-50 ışık mikroskobu ile x40, x100, x200 ve x400 büyütmelerde bu konuda uzman patolog tarafından kör olarak incelendi.

HE ile boyanan preparatların tüm alanları x400 büyütme ile ışık mikroskobunda incelendi. Histopatolojik değerlendirmede steatoz, balonlaşma dejenerasyonu, inflamasyon, Mallory cisimi ve fibrozis değerlendirildi.

Steatozis varlığının değerlendirilmesi: steatotik hücrelerin yüzdesi belirlendi.

Grade 0: yok

Grade 1: parenkimin %25'inden azında bulunması,

Grade 2: %26 ile %50 arasında bulunması,

Grade 3: %51 ile %75 arasında olması,

Grade 4: %75'den daha fazlasında bulunması şeklinde değerlendirildi.

Balonlaşma dejenerasyonun varlığı: benzer şekilde değerlendirildi.

Grade 0: yok

Grade 1: parenkimin %25'inden azında bulunması,

Grade 2: %26 ile %50 arasında bulunması,

Grade 3: %51 ile %75 arasında olması,

Grade 4: %75'den daha fazlasında bulunması şeklinde değerlendirildi.

İnflamasyon: x400 büyütmede 10 rasgele alanda milimetrekarede inflamatuvar hücreler sayılarak ortalaması alındı ve mm²'deki inflamatuvar hücre sayısı belirlendi (109).

Mallory cisimciği: Var veya yok şeklinde değerlendirildi.

Fibrozis: Var veya yok şeklinde değerlendirildi.

5.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler başka şekilde belirtilmedikçe ortalama±standart sapma olarak gösterildi. İstatistiklerin hazırlanmasında SPSS 11.0 bilgisayar paket programı (SPSS Inc. , Software Chicago, IL, USA) kullanıldı. Bağımsız gruplarda gruplar arası fark Kruskal Wallis testi ile gruplar arasındaki farkın anlamlılığı ise Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. P değerinin 0.05' den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Deney süresince takip edilen ratlarda herhangi bir olağan dışı durum meydana gelmedi ve ölen rat olmadı.

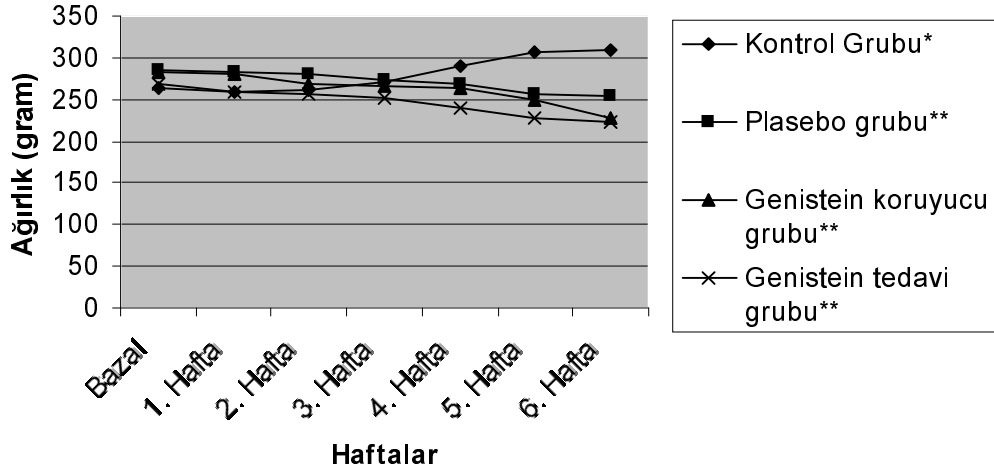
6.1. Bazal ve deney süresindeki ağırlık bulguları: Gruplar arasında arasında ratların bazal ağırlıklarının ortalaması yönünden istatistikî olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Çalışma süresince yapılan ağırlık takiplerinde, ratlarda deney süresince gözlenen ağırlık değişiklikleri tablo 4 ve şekil 2’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Kontrol ve plasebo grubu ve GK ve GT gruplarındaki ratların kilo takibi, karaciğer ağırlıkları ve bu ağırlıkların vücut ağırlığına oranları.

Ağırlık	Kontrol grubu	Plasebo grubu	GK grubu	GT grubu
Bazal	264.3±25.2	285.9±25.7	282.9±30.4	268.4±20.8
Çalışma sonu	308.7±37.5	251.8±35.5	227.5±35.2	222.5±28.9
Karaciğer ağırlığı (gr)	7.1±0.5	7.5±0.7	7±0.7	6.3±0.9*
Karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı	0.023	0.3±0.003*	0.027±0.004	0.028±0.002

*: Plasebo grubu ile kontrol grubu veya GT grubu arasında $p<0.01$.

Gruplara göre ratların ağırlıklarının haftalara göre değişimi



Şekil 2: Kontrol grubu ratlarda anlamlı kilo artışına karşın plasebo ve GK ve GT gruplarındaki ratlarda anlamlı bir kilo kaybı gözlemlendi. (*: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$).

6.1.1. Karaciğer ağırlıkları: Karaciğer ağırlığı plasebo grubunda kontrol grubundan yüksek, GK ve GT grubundan düşüktü, fakat bu farklılıklarda sadece GT grubu ile olan istatistik olarak anlamlı idi ($p < 0.01$). Karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı ise plasebo grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.01$). Bu oran plasebo grubunda GK ve GT gruplarına göre de yüksekti fakat anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Ratların deney sonu karaciğer ağırlıkları ve karaciğer ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı **tablo 4**'te gösterilmiştir.

6.2. Biyokimyasal bulgular:

Plasebo grubunda kontrol grubuna göre serum AST, ALT ($p < 0.001$), total bilirubin ve trigliserid ($p < 0.05$) istatistik olarak anlamlı bir şekilde artmıştı. Serum glukoz, ALP, GGT, total ve direk bilirubin değerlerinde ise anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p > 0.05$).

GK ve GT grubunda ise plasebo grubuna göre AST (her iki grupta da<0.05), ALT (p sırası ile <0.001 ve 0.05) ve trigliserid (her iki grupta da<0.05) düzeyleri anlamlı olarak düşüktü.

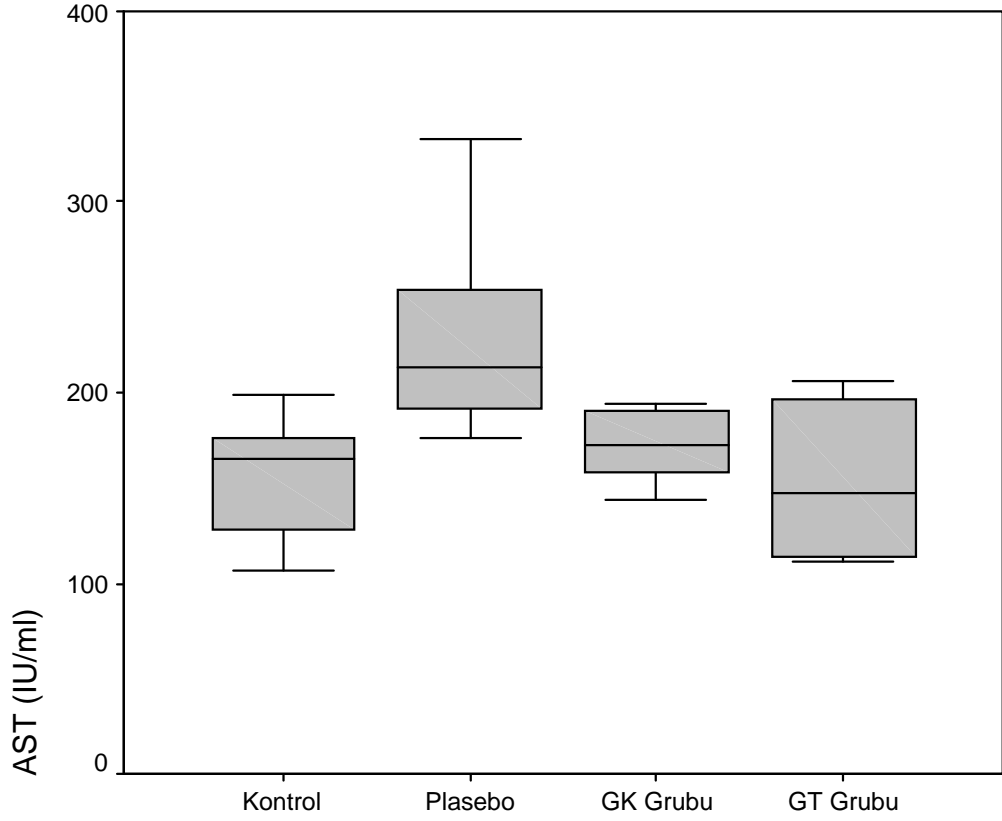
Gruplardaki ortalama biyokimyasal veriler tablo 5'te gösterilmiştir. Gruplar arasında AST ve ALT düzeylerindeki farklılıklar şekil 3 ve 4'te gösterilmiştir.

Tablo 5: Kontrol, plasebo, GK ve GT gruplarında serum biyokimya verileri.

Parametre	Kontrol grubu	Plasebo grubu	GK grubu	GT grubu
Glukoz (gr/dl)	154.6±33.1	162.2±35.6	162.7±30.2	168.8±39.8
Kolesterol (mg/dl)	83.7±30.2	96.1±33.7	85.5±20.2	96.3±21.9
Trigliserid (mg/dl)	125.1±43.5	194.8±76.7*	101.8±24.6†	131.3±39.6†
AST (IU/ml)	155.8±30.1	230.6±55.9**	171.8±19.1†	154.6±39.7†
ALT (IU/ml)	85.6±28.5	161.3±48.3**	86.7±10.9††	99.4±38.3†
ALP (IU/ml)	810±617.2	1279.5±413.9	955±539.2	968.2±360.7
GGT (IU/ml)	2.4±0.5	4±4	1.5±0.6†	2.4±0.9
Total bilirubin (mg/dl)	0.42±0.2	0.63±0.2*	0.85±0.54	0.62±0.36
Direk bilirubin (mg/dl)	0.03±0.008	0.04±0.009	0.038±0.01	0.036±0.001

Kontrol grubu ile plasebo grubu arasında: *: p<0.05, **: p<0.001

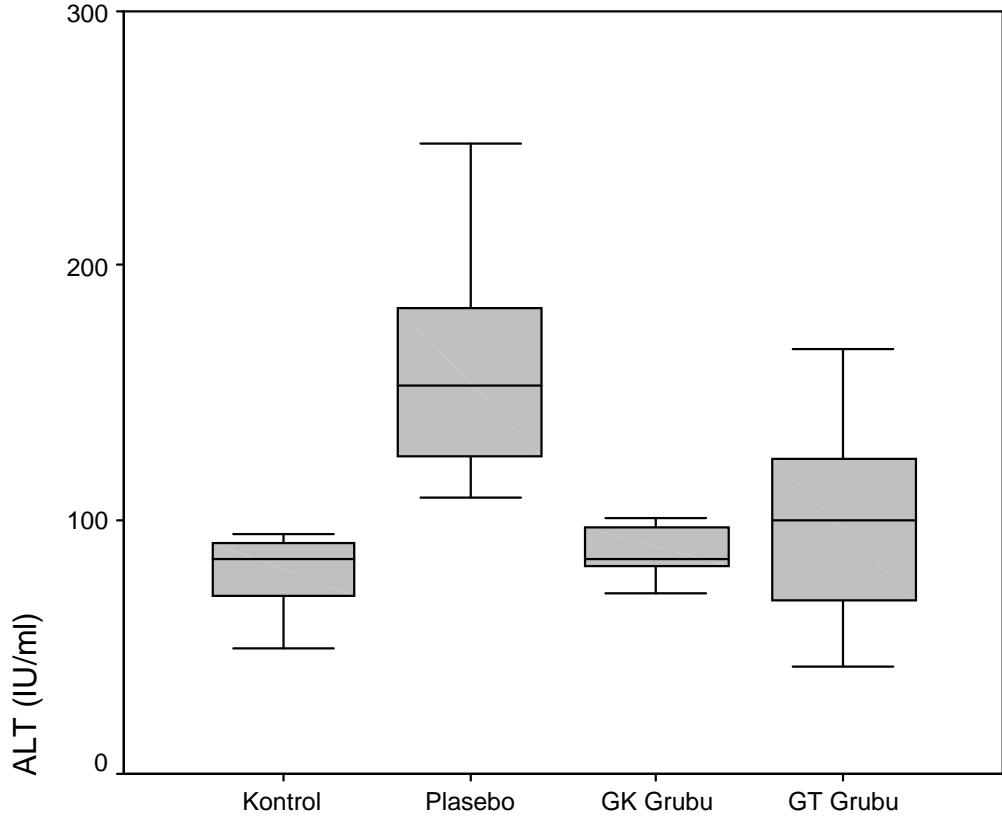
Plasebo ile GK veya GT grubu arasında: †: p<0.05, ††: p<0.001



Şekil 3. Gruplar arasında AST düzeyleri*.

*: AST değerleri, plasebo grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekken, GK ve GT grubunda plaseboya göre anlamlı azalma mevcuttu.

6.3. Serum TNF- α ve TGF- β düzeyleri: TNF- α plasebo grubunda (7066.7 \pm 1502.2) kontrol grubuna göre (3485.9 \pm 1828.9) anlamlı derecede yüksektir (p<0.01). GK (2464.5 \pm 564.9) ve GT (4724.5 \pm 1002.0) grubunda ise TNF- α düzeyleri plasebo grubuna göre anlamlı şekilde düşük olarak saptandı (p<0.001).



Şekil 4: Gruplar arasında ALT düzeyleri*.

*: ALT değerleri, plasebo grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekken, GK ve GT grubunda plaseboya göre anlamlı azalma mevcuttu.

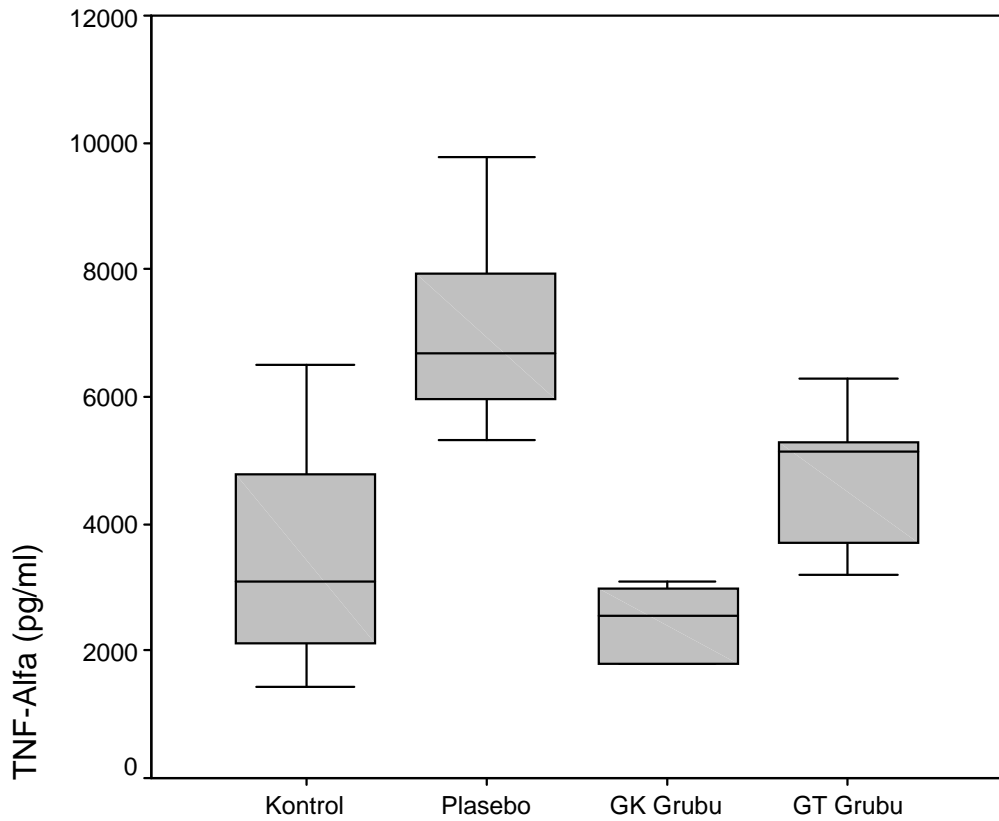
GK grubunda plazma TNF- α düzeylerindeki azalma GT grubunda izlenen azalmadan anlamlı bir şekilde daha fazlaydı ($p < 0.001$). TGF- β seviyeleri ise kontrol ve plasebo grubu, GK ve GT gruplarında benzerdi ve gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık yoktu (p hepsinde > 0.05). Plazma TNF- α ve TGF- β düzeyleri tablo 6'da, gruplar arasındaki ilişki şekil 5 ve 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Gruplarda serum TNF- α ve TGF- β düzeyleri.

Parametre	Kontrol grubu	Plasebo grubu	GK grubu	GT grubu
TNF-α (pg/ml)	3485.9 \pm 1828.9	7066.7 \pm 1502.2*	2464.5 \pm 564.9†	4724.5 \pm 1002.0†
TGF-β (pg/ml)	369.9 \pm 87.9	387.9 \pm 76.4	427.8 \pm 32.5	384.3 \pm 70.7

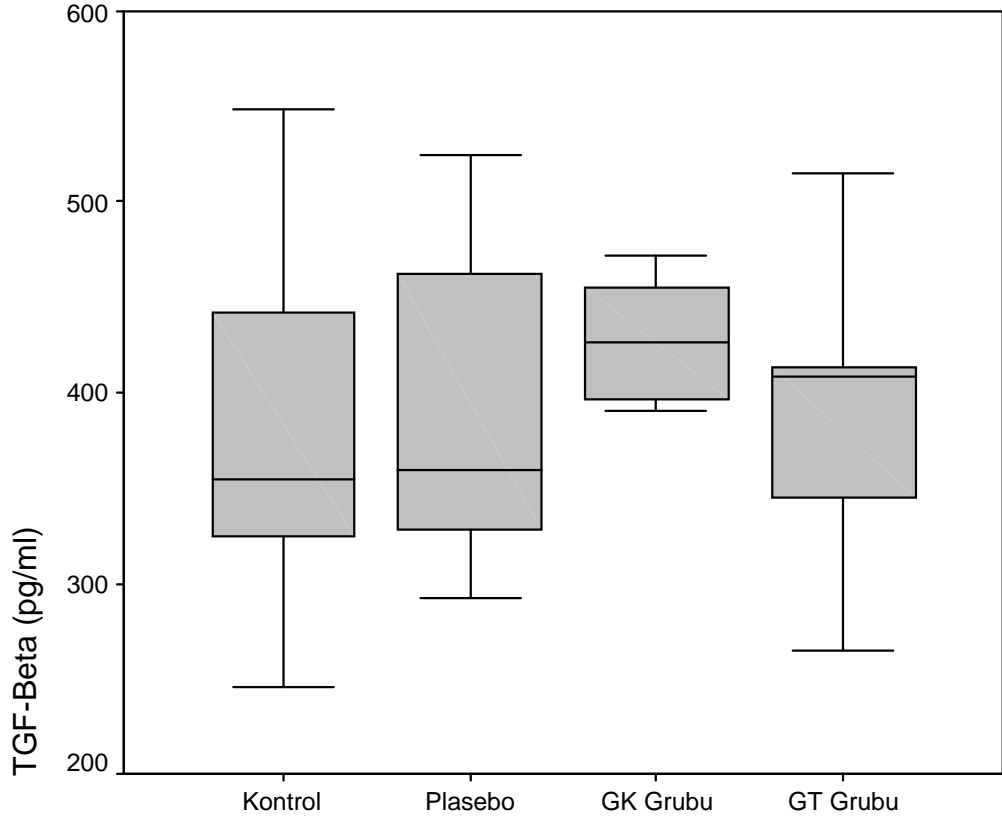
Plasebo ile kontrol grubu arasında: *: p<0.01.

Plasebo ile GK veya GT grubu arasında: †: p<0.001.



Şekil 5. Gruplar arasında serum TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması*

*: Serum TNF-alfa düzeyleri plasebo grubunda anlamlı artmışken, GK ve GT gruplarında anlamlı gerileme mevcuttu.



Şekil 6. Gruplar arasında serum TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması*.

*: Gruplar arasında plazma TGF- β düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu.

6.4. Lipid peroksidasyonu bulguları: Hem plazma hem de karaciğer doku MDA düzeyleri plasebo grubunda kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı (p her ikisi içinde <0.001). Bunun yanında hem GK grubunda (p <0.05) hem de GT grubunda p her ikisi içinde <0.05) plazma ve karaciğer MDA düzeyleri plasebo grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmış olarak bulundu.

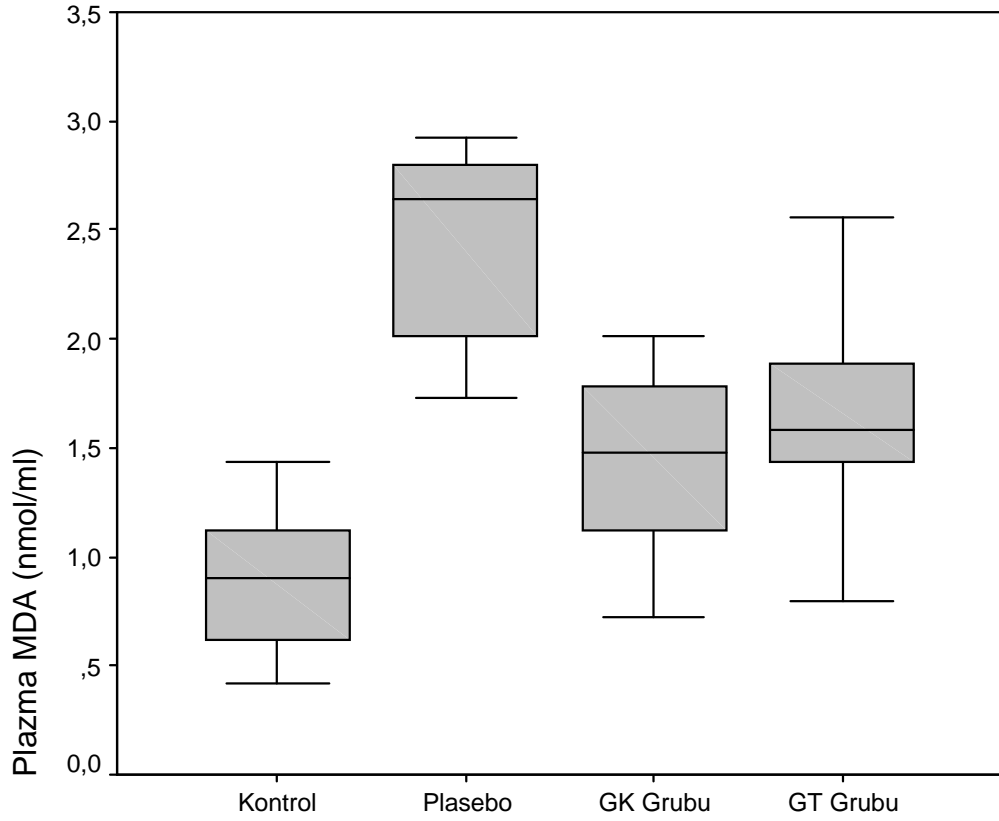
Plazma ve karaciğer MDA düzeyleri **tablo 7'de** gösterilmiştir. Bu parametrelerin gruplar arasındaki farklılıkları **şekil 7 ve 8'de** gösterilmiştir.

Tablo7: Lipid peroksidasyon bulguları.

Plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri*.

Parametre	Kontrol grubu	Plasebo grubu	GK grubu	GT grubu
Plazma MDA (nmol/ml)	0.96±0.4	2.45±0.43	1.43±0.48	1.7±0.54
Karaciğer MDA nmol/ gr doku	9.5±2.5	16.1±3.1	11.6±3.6	11.3±5.3

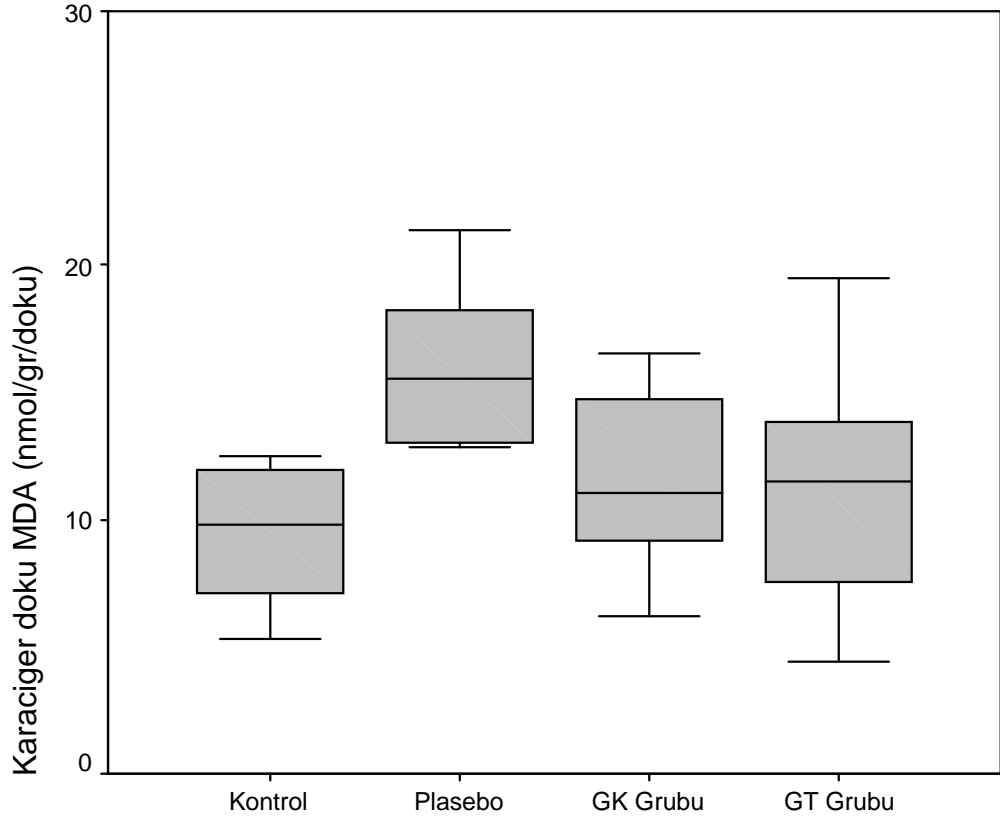
*: p hepsinde <0.05).



Şekil 7. Gruplar arasında plazma MDA değerlerinin karşılaştırılması*.

*: Plazma MDA plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmışken

GK ve GT gruplarında plaseboya göre anlamlı olarak düşüktü.



Şekil 8. Gruplar arasında karaciğer doku MDA değerlerinin karşılaştırılması*.

*: Karaciğer doku MDA düzeyleri plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmışken GK ve GT gruplarında plaseboya göre anlamlı olarak düşüktü.

6.5. Histopatolojik bulgular:

a) *Steatozis*: Plasebo grubundaki ratların hepsinde steatozis meydana geldi. Bunların %90'ında grade 1 steatozis oluşurken, sadece %10'nunda grade 2 steatozis oluştu. GK grubunda ise ratların %66.7'sinde anlamlı bir steatozis saptanamazken sadece %33.3'ünde grade 1 düzeyinde steatozis saptandı. GT grubunda ise ratların %58.3'ünde anlamlı bir steatozis bulunmazken, kalan

%41.7'sinde ise grade 1 düzeyinde steatozis saptandı. Hem GK hem de GT grubunda plasebo grubuna göre steatozis anlamlı derecede düşük olarak saptandı (p her ikisi için de <0.05).

b) *Balonlaşma dejenerasyonu*: Balonlaşma dejenerasyonu; plasebo grubunun %80'ninde grade 3, %20'sinde ise grade 4 düzeyinde idi. GK grubunda ise ratların %50'sinde anlamlı bir balonlaşma dejenerasyonu izlenmedi. %25'inde grade 1, %25'inde ise grade 2 düzeyinde balonlaşma dejenerasyonu gelişti. GT grubunda ise %16.6'sında anlamlı bir balonlaşma dejenerasyonu saptanamazken, %50 oranında grade 1, %25 oranında grade 2, %8.3 oranında ise grade 3 düzeyinde balonlaşma dejenerasyonu gelişti. Balonlaşma dejenerasyonu plasebo grubuna göre GK ve GT gruplarında (p her ikisi içinde <0.001) azalmıştı. GK grubundaki balonlaşma dejenerasyonunda azalma GT grubunda izlenenden anlamlı olarak daha fazla idi (p<0.05).

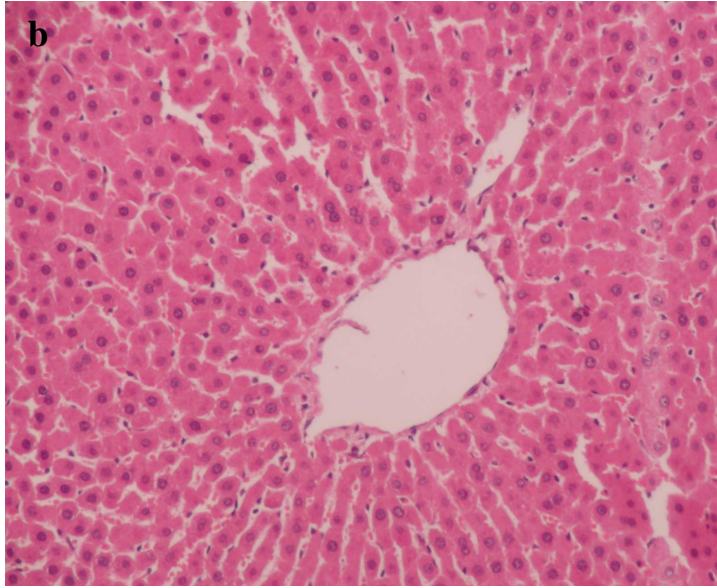
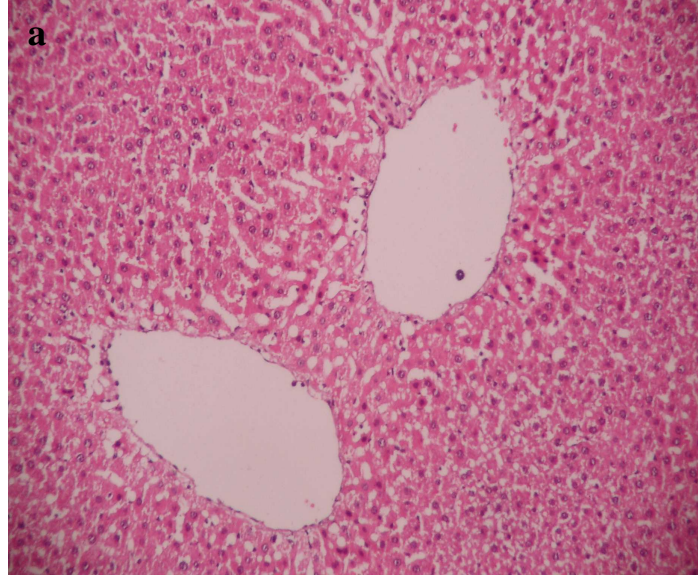
c) *İnflamasyon*: mm²'deki inflamatuvar hücre sayısının ortalaması plasebo grubunda 16.1±3.7 iken, GK grubunda 8.8±2.9, GK grubunda ise 7.3±4.2 idi ve GK ve GT gruplarında plasebo grubuna göre saptanan bu düşüklük istatistiki olarak anlamlı idi (p her iki grup içinde <0.01). GK ve GT grupları arasında ise anlamlı bir farklılık yoktu (p>0.05).

d) *Fibrozis*: Hiçbir grupta *Masson Trichrom* boyaması ile fibrozis saptanmadı.

Histopatolojik bulgular **tablo 8'de** özetlenmiş **şekil 9 ve 10'da** gösterilmiştir.

Tablo 8: Plasebo, GK ve GT grubu ratlarda saptanan histopatolojik özellikler

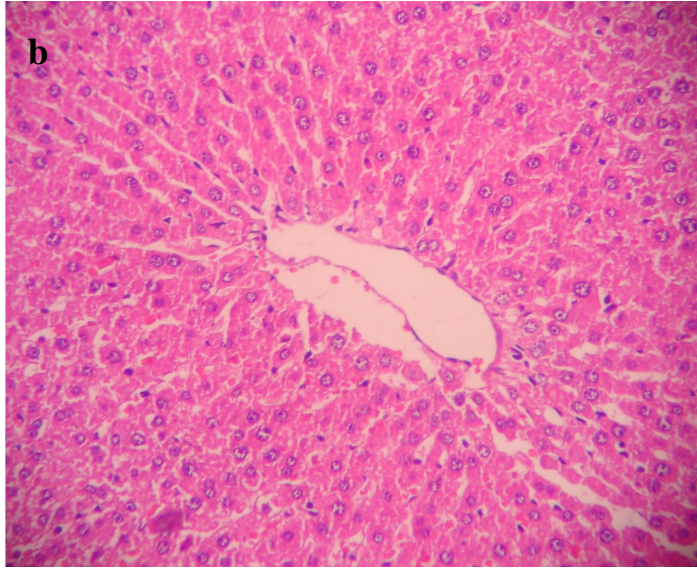
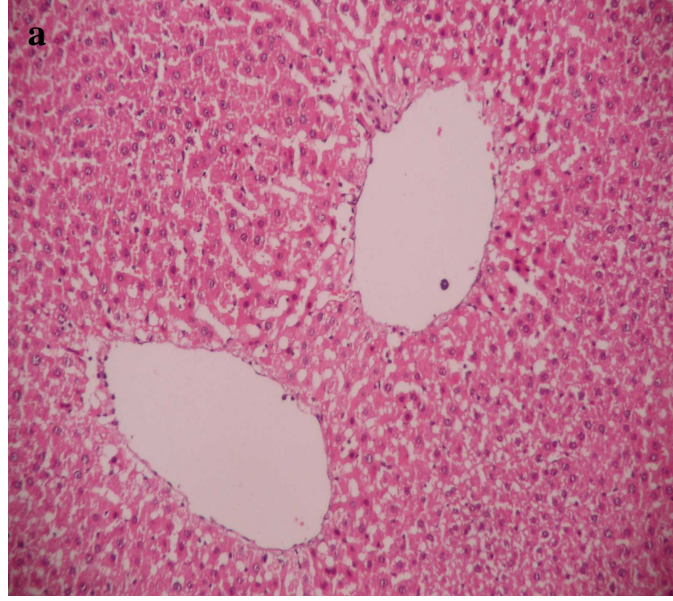
Histolojik bulgu	Plasebo grubu (n=10)	Grup (n=12)	GK Grup (n=12)	GT
Steatozis	n (%)	n (%)	n (%)	
Grade 0	-	8 (66.7)	7 (58.3)	
Grade 1	9 (90)	4 (33.3)	5 (41.7)	
Grade 2	1 (10)	-	-	
Balonlaşma dejenerasyonu				
Grade 0	-	6 (50)	2 (16.6)	
Grade 1	-	3 (25)	6 (50)	
Grade 2	2 (20)	3 (25)	3 (25)	
Grade 3	8 (80)	-	1 (8.3)	
İnflamasyon (mm² de inflamatuvar hücre sayısı)	16.1±3.7	8.8±2.9	7.3±4.2	
Fibrozis	-	-	-	



Şekil-9: Plasebo grubu ile genistein koruyucu grubunun histolojik bulgularının karşılaştırılması

a: Plasebo grubu- Karaciğerde santral ven etrafında mikro ve makroveziküler yağlanma ile balonlaşma dejenerasyonun görünümü (Hematoksilen –Eosinx 100)

b: Genistein koruyucu grup: KC de yağlanmada azalma ile az sayıda hücrede hidropik dejenerasyon izlendi.(H&Ex100)



Şekil 10. Plasebo grubu ile genistein tedavi edici grubunun histolojik bulgularının karşılaştırılması

a: Plasebo grubu- Karaciğerde santral ven etrafında mikro ve makroveziküler yağlanma ile balonlaşma degenerasyonunun görünümü (Hematoksilen –Eosin x 100)

b: Genistein tedavi grubu: KC’ de yağlanmada azalma görülmekle beraber belirgin hidropik degenerasyon izlendi. (H-Ex100)

7. TARTIŞMA

NASH toplumda sık olarak görülen NAYKH'ının en ciddi formudur ve hepatoselüler karsinoma da dâhil olmak üzere fibrozis ve siroza ilerleme potansiyeline sahiptir. Bu kadar önemli olmasına ve çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen henüz patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Kabul görmüş ideal bir tedavisi yoktur. Uygun deneysel modellerin eksikliği bu yönde yapılacak çalışmaları engellemektedir. Deneysel NASH çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta olan genetik olarak obez/diyabetik ob/ob sıçanlar ve MCD ile geliştirilen modellerde, insanlarda görülen NASH'in patogenezinde suçlanan faktörlerin bir kısmı eksiktir.

Yakın zamanda Lieber ve arkadaşları (85), YZD ile insanlarda görülen NASH'in patogenezinde rolü olduğu ileri sürülen tüm faktörlerin de rol aldığı yeni bir model oluşturmuşlardır. Bu modelde hem insülin direnci hem de oksidatif stres ile birlikte histolojik olarak NASH tanısı için gerekli olan steatozis, balonlaşma dejenerasyonu, inflamasyon ve erken fibrozis saptanmıştır. Bu modelin en belirgin özelliği enerjinin %71'inin yağdan sağlanmasıdır. Daha yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada Carmiel-Haggai ve arkadaşları (110) ob/ob obez ratlara ikinci darbe olarak YZD vererek karaciğer hasarındaki ilerlemeyi incelemişler. Kalorinin %60'ının yağ olarak verildiği, sekiz hafta süren bu çalışmada ratlarda hiperglisemi ve steatohepatit meydana gelmiş. Karaciğer hasarı ile beraber ALT düzeyleride yüksek olarak bulunmuş. YZD ile beslenme, ob/ob ratlarda lipid peroksidasyon ve protein karbonillerinde artışa neden olurken, glutatyon ve diğer antioksidan enzimlerde ise belirgin şekilde düşme meydana gelmiş. Sonuç olarak bu çalışmada da YZD karaciğerde hasara neden olarak periportal fibrozise yol açmıştır. Sorumlu mekanizma olarak, lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, antioksidan savunmada azalma gösterilmiştir.

Bu çalışmada, deneysel olarak NASH oluşturulması için normal Sprague – Dawley ratlarda YZD modeli kullanıldı. Histopatolojik olarak steatozis, balonlaşma dejenerasyonu ve inflamasyon gelişen ratlarda fibrozis gelişmedi. Steatozis genellikle grade 1 ile 2 düzeyinde idi ve Lieber ve arkadaşlarının (85) yaptıkları çalışmada belirttikleri şekilde şiddetli bir steatozis gelişmedi. Bununla beraber, bu çalışmada karaciğerde yağ birikiminin bir göstergesi olarak karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı, YZD ile beslenen plasebo grubu ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksekti. YZD her ne kadar referans alınan çalışmaya (85) göre minör modifikasyonlar ile hazırlandıysa da, muhtemelen diyetin temel özelliklerinden olan yağ oranının %71'den daha düşük olduğunu ve çalışmalar arasındaki farklılıkların temel nedeninin, yağ oranındaki bu muhtemel değişiklikten meydana geldiğini düşünmekteyiz. Nitekim Lieber ve arkadaşları (85) yaptıkları çalışmada, YZD, 2/3 oranında kısıtlanarak verildiği zaman histopatolojik olarak karaciğerde gelişen yağlanmanın orta derecede olduğu izlenmiştir.

YZD'le yapılan önceki çalışmalar ve bu çalışmadan elde edilen bilgiler açık bir şekilde göstermektedir ki YZD ile oluşturulan deneysel NASH modelinde oluşması beklenen histopatolojik lezyonların şiddeti diyetin içeriğindeki yağ miktarı ve deneyin süresi ile yakın bir şekilde ilişkilidir. Bu durum NAYKH'nın farklı histopatolojik evrelerinin incelenmesine olanak sağlayabilmesinin yanında diyetteki yağ miktarının azalması ile histopatolojik ve klinik bozukluklarda meydana gelecek düzelmelerin gösterilmesinin de tedavi açısından yol gösterici yararları olacaktır.

YZD ile NASH geliştirilen ratlarda çalışmamızın sonunda lipid peroksidasyonunun önemli yıkım ürünlerinden MDA'nın hem plazmadaki hem de karaciğer dokusundaki düzeyleri plasebo grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artmıştı. Bilindiği gibi doymamış lipidlerin serbest radikallerin etkisine

maruziyeti ile lipid peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonlar başlar. Çoklu doymamış yağların diyeteye eklenmesi ise bu lipid peroksidasyonunu arttırır (54). YZD ile oluşturulan NASH modelinde yağın diyetin en büyük kısmını oluşturmasının yanında, diyetteki yağ içeriği doymamış yağlardan oldukça zengindir ve gelişen lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresin ana nedeni olarak belirmektedir. Oluşan oldukça toksik olan bu lipid oksidasyon ürünleri NASH'te meydana gelen birçok patolojiden sorumlu tutulmuştur. 4-HNE ve MDA; mitokondri DNA'sına, proteinlerine zarar vererek solunum zincirlerinde aksamaya neden olur. Böylece yeniden açığa çıkan serbest radikaller kupffer hücrelerinde, hepatositlerde ve yağ dokusunda TNF- α ekspresyonu aktive ederler (64). Bu çalışmada NASH gelişiminin hemen tüm basamaklarında yer alan TNF- α 'nın da plazma seviyeleri plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur.

NAYKH' ında ve genellikle eşlik ettiği metabolik sendromda hipertrigliseridemi mevcuttur ve steatozis artmış olan trigliseridlerin hepatositlerde birikimi ile meydana gelmektedir. Patogeneizde rolü bulunan trigliserid düzeyleri bu çalışmada YZD ile beslenen ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulundu.

YZD için referans alınan çalışmada (85) NASH gelişimi ile serum AST ve ALT düzeylerinde artış olmayıp, normal değerlerde kalmıştır. Bu durum, bazı NASH hastalarının da normal enzim seviyeleri ile birlikte olmasına benzediği şekilde açıklanmıştır. Fakat Carmiel-Haggai ve arkadaşlarının (110) ob/ob obez ratlara ikinci darbe olarak YZD verdikleri çalışmada, karaciğer hasarı ile birlikte ALT düzeylerinde de artış meydana gelmiş. Bu çalışmada da hem AST hem de ALT değerleri plasebo grubunda kontrol grubundan anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulundu. Çalışmamızın, üç hafta süreli olan Lieber ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmaya (85) göre daha uzun süreli olması da(altı hafta) AST ve ALT yükeklığının bir nedeni olabilir.

Bu çalışmanın asıl amacı, deneysel NASH modelinde güçlü bir antioksidan olan ve çeşitli farmakolojik etkilere sahip genisteinin steatohepatiti önleyici rolünü araştırmaktır. Toplumda yüksek prevalansa sahip olan ve son dönem karaciğer yetmezliği ve karaciğer sirozuna ilerleme potansiyeline sahip olan NASH'in hem ilerlemesinin durdurulması hem de tedavi edilebilmesi önemlidir. NASH patogenezinde çoklu darbe hipotezi göz önüne alınacak olursa çeşitli faktörler sorumludur ve tedavide bu faktörlere yönelik tedbirler alınmalıdır. Bu nedenle NASH patogenezinde en çok suçlanan faktörlerden birisi olan oksidatif strese yönelik tedavi, NASH tedavisi için kilo verme ve insülin duyarlılığını artırıcı gibi tedavilere alternatif olarak denenmektedir.

Oksidatif stres ile oluşan serbest radikaller hücrenin gereksinimi olan oksijenin %90'ının harcanmasına, çeşitli metabolik bozukluklara ve lipid peroksidasyonu olarak bilinen doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açar (62). NASH patogenezinde oksidatif stresin rolünü gösteren delillerin artışı ile birlikte birçok antioksidan ajanın tedavideki rolü de araştırılmaktadır. Fakat oksidatif stresin NASH patogenezindeki merkezi rolüne karşılık antioksidanların etkinliği sürpriz bir şekilde yeterince araştırılmamıştır. Çalışmalar az sayıdadır ve çoğunluğu az vakalı, pilot çalışmalar şeklindedir (66, 67, 68).

Antioksidanların besin kaynaklı olanları oksidatif hasara karşı korunmada oldukça önemlidir. Fitoöstrojenler, bitkilerde antioksidan görevleri bulunan, insan ve hayvanlarda östrojenik ve anti-östrojenik etkilere sahip bitkisel kaynaklı difenolik bileşiklerdir (94). Epidemiyolojik çalışmalar, soya ve izoflavonlar gibi fitoöstrojenlerden zengin olan soya ürünlerinin tüketiminin çok yönlü etkileri

nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlı etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Birçok insan ve hayvan çalışmasında izoflavonların bu yararlı etkilerinin antioksidan aktivitelerine bağlı olduğu düşünülmüştür. İzoflavonlar hücrelerdeki oksidatif hasardaki azalmayı antioksidan savunma mekanizmalarını uyarma gibi indirek yollarla da yapabilir (101).

Birçok farmakolojik özelliklere sahip bir fitoöstrojen olan genisteinin anti-tümör, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri olduğu bildirilmektedir (12, 13). Genisteinin, oksidantlara maruz kalan hücrelerde ve DNA'da bir oksidatif belirteç olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunu önlediği gösterilmiştir (100). Birçok hücresel sistemde büyümeyi önleyici etkisi de olduğu gösterilen genisteinin, hücre büyümesini TGF- β 1'in uyarı yollarını modüle ederek inhibe edebileceği öne sürülmüştür (14).

Bu çalışmada genistein YZD ile oluşturulan deneysel NASH modelinde histopatolojik olarak steatozis, balonlaşma dejenerasyonu ve nekroinflamasyon gelişimini etkin bir şekilde önlemiştir. Bunun yanında hem biyokimyasal hem de histopatolojik düzelme ile steatohepatiti tedavi ederek gerilemesine de yol açmıştır. Koruyucu rolü daha üstün olan genistein, balonlaşma dejenerasyonunu tedavi edici gruptan anlamlı bir şekilde daha fazla azaltmıştır. Histopatolojik düzelmenin yanında AST ve ALT düzeylerinde anlamlı azalma ile birlikte biyokimyasal düzelmeye de neden olmuştur. Genistein tedavisi, plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olan trigliserid düzeylerini de her iki grupta da anlamlı bir şekilde azalttı.

Majör bir izoflavon olan genisteinin östrojenik aktivitesi, tirozin kinaz inhibisyonu ve antioksidan etki gibi birçok fonksiyonu vardır (14). Genistein antioksidan özelliklerinin Fe^{2+} -ADP kompleksi ile uyarılan mikrozomal lipid

peroksidasyonundan koruyarak (111), bakır ve peroksil radikallerinin in vitro olarak aracılık ettiği düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önleyerek (112) ve endotelial hücreleri aterojenik LDL hasarından koruyarak (113) göstermektedir. Genistein daha önceden yağlı karaciğer veya NASH tedavisinde kullanılmamıştır ve bu çalışmada ilk kez kullanılmıştır. Antioksidan tedavi olarak, deneysel NASH tedavisinde sadece bir çalışmada, MCD ile oluşturulan NASH modelinde, E ve C vitamini kullanılmış (114). C vitamini artmış olan oksidatif stresi azaltarak histopatolojik olarak steatozisi de azaltırken, E vitamini ne oksidatif stresi azaltmış ne de histopatolojik olarak etkili olmuş.

NASH'te kullanılmamasına rağmen, yakın zamanda yapılan iki ayrı *in vitro* çalışmada genisteinin hepatik fibrojenizden sorumlu olan stellat hücrelerin proliferasyonunu etkilediği (15, 16) ve TGF- β 1 aracılı kollajen sentezini azaltarak anti-fibrotik etki gösterdiği (15) bildirilmiştir. Bu çalışmada TGF- β ve fibrozis gelişimi incelenmesine rağmen YZD ile histopatolojik olarak fibrozis gelişmemesi ve TGF- β düzeylerinde anlamlı bir artış olmaması nedeniyle genisteinin olası antifibrotik etkileri değerlendirilememiştir. Ayrıca, fibrozis gelişimi için muhtemelen YZD diyetini daha uzun süreli vermek gerekmektedir.

Genisteinin sadece antioksidan etkisi yoktur. Bunun yanında birçok farmakolojik etkiye sahiptir. Bunlardan bir tanesi de TNF- α ile indüklenen nükleer faktör kapp β inhibisyonudur. Davis ve arkadaşlarının insan lenfosit kültürlerinde yaptıkları çalışmada (115) genistein TNF- α ile indüklenen nükleer faktör kapp β 'yi inhibe etmiştir. Böylelikle genistein hücreleri oksidatif stresten NF-kapp β 'yi inhibe ederek korumuşlar ve DNA türlerinin seviyelerini azaltmışlardır.

Serbest radikaller kupffer hücrelerinde, hepatositlerde ve yağ dokusunda TNF- α ekspresyonunu aktive ederler. TNF- α mitokondrilerde yapısal ve fonksiyonel

olarak hasar verir (64). Bu çalışmada, YZD ile oksidatif stres belirteçlerinin artış göstermesinin yanında, NASH patogenezinin her basamağında yer alan TNF- α konsantrasyonlarının da plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını belirtmiştik. TNF- α düzeyleri, oksidatif stres dahil birçok nedenden dolayı artmış olabilir. Genisteinin hem koruyucu hem de tedavi edici olarak verilmesi plazma TNF- α konsantrasyonlarının anlamlı bir şekilde düşmesine neden olmuştur.

Sonuç olarak, genistein hem antioksidan etki ile plazma ve karaciğer MDA düzeylerini azaltmıştır hem de oksidatif stres de dahil olmak üzere bir çok nedenden dolayı artmış olan serum TNF- α konsantrasyonlarını belirgin şekilde azaltmıştır. Genistein bu çok yönlü olumlu farmakolojik etkileri ile hem steatohepatit gelişimini önlemiştir hem de biyokimyasal ve histopatolojik düzelme ile steatohepatitte gerilemeye yol açmıştır ve umut verici sonuçlar göstermiştir.

8. KAYNAKLAR

- 1) Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2714-2724.
- 2) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845.
- 3) 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. *J Clin Invest* 2000;105:1067-1075.
- 4) Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 1996;24:200-208.
- 5) Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
- 6) Garcia-Monzon C, Martin-Perez E, Iacono OL, Fernandez-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, Larranaga E, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000;33:716-724.
- 7) Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001;121:710-723.
- 8) Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:663-678.
- 9) Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47:233-261.
- 10) Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, Budillon G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol* 2001;35:568-574.
- 11) 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.
12. Goldwyn S, Lazinsky A, Wei H. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact*

2000;17:261-289.

13. Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm* 2000;57:135-155.
14. Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry* 2002;60:205-211.
15. Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. 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.
- 16) Qi LH, Kang LP, Zhang JP, Shi N, Zhang M, Wu TM. [Antifibrotic effects of genistein and quercetin in vitro]. *Yao Xue Xue Bao* 2001;36:648-651.
- 17) Thaler H. The fatty liver and its pathogenetic relation to liver cirrhosis. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 1962. 335:180-210.
- 18) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 1980. 55(7): 434-8.
- 19) Cairns SR, Peters TJ. Biochemical analysis of hepatic lipid in alcoholic and diabetic and control subjects. *Clin Sci* 1983;65:645-652.
- 20) Scherlock S, Dooley S. Nutritional and metabolic liver diseases. In: Scherlock S, Dooley S (eds). *Diseases of the Liver and Biliary System*. Eleventh edition, Milan, Blackwell Publishing. 2002, p:423-431.
- 21) Kawai N, T Kawai, K Kawai. Ultrasonic and laboratory studies on fatty liver in white-collar workers]. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 1995. 92(7): 1058-65.
- 22) Brogna A, Buccer AM, Ferrara R, et al., Prevalence of diffuse fatty infiltration of the liver in a population having abdominal ultrasonography. *Ital J Gastroenterol*, 1997. 29 (Suppl 2): p. A169.
- 23) Oshibuchi M, Nishi F, Sato M, Ohtake H, Okuda K. Frequency of abnormalities detected by abdominal ultrasound among Japanese adults. *J Gastroenterol Hepatol*, 1991. 6(2):165-8.
- 24) Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, Kusano Y. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci*, 1995. 40(9):2002-2009.

- 25) Bellentani S, Tribelli C. Epidemiology and risk factors for fatty liver. In: Leuschner U, James OFW, Danczygier H (eds). Steatohepatitis (NASH and ASH), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2001, 3-10.
- 26) Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005;172(7):899-905.
- 27) Bacon, B.R, Farahvash, M. J. Janney, C. G. Neuschwander-Tetri, B. A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*, 1994. **107**(4): p. 1103-9.
- 28) Matteoni, C.A., Younossi, Z. M. Gramlich, T. Boparai, N. Liu, Y. C. McCullough, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999. 116(6): p. 1413-9.
- 29) McCullough AJ. Non-alcoholic liver disease: natural history In: Leuschner U, James OFW, Danczygier H (eds). Steatohepatitis (NASH and ASH), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2001, 11-20.
- 30) Fletcher LM, Knoh-Gain I, Powell EE, Powell LW, Halliday JW. Markers of chronic alcohol ingestion. I. Patients with non-alcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. *Hepatology* 1991;13: 445-459.
- 31) Storey EI, Anderson GJ, Mack U, Powell LW, Halliday JW. Desialylated transferrin as a serologic marker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet* 1987;2:1292-1294.
- 32) Wanless IR, Lentz JS, Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with risk factors. *Hepatology* 1990;12:1106-1110.
- 33) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-1219.
- 34) Silverman JF, Pories WJ, Caro JF. Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity. Clinical, pathological and biochemical considerations. *Pathol Annu.* 1989;24Pt 1:275-302.
- 35) 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.
- 36) Sonsuz A, Basaranoglu M, Ozbay G. Relationship between aminotransferase levels and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis (letter). *Am J Gastroenterol* 2000;95:1370-

1371.

- 37) AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:1705-1725.
- 38) Powell EE, Cooksley, WG, Hanson R, Searle J, Hall, Day JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
- 39) Itoh S, Yougel T, Kawagoe K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1987;82:650-654.
- 40) Noguchi H, Tazawa Y, Nishinomiya F, Takada G. The relationship between serum aminotransferase activities and fatty liver in children with simple obesity. *Acta Paediatr Jpn* 1995;37:621-625.
- 41) Tajiri K, Takenawa H, Yamaoka K, Yamane M, Marumo F, Sato C. Nonalcoholic steatohepatitis masquerading as autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 1997;25: 538-540.
- 42) Adams LA, Lindor KD, Angulo P. The prevalence of autoantibodies and autohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1316-1320.
- 43) Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594-598).
- 44) da Silva PM, Eliseu T, Costa MM, Bastos H, Nobre FL. Nonalcoholic steatohepatitis. *Acta Med Port* 1995;8:323-327).
- 45) 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.
- 46) Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:539-543.
- 47) Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:398-403.
- 48) Brunt EM, Janney CG, Di Biscaglia AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2464.
- 49) Kliener DE, Brunt EM, Nata MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu Y, Torbenson MS, Unalp-Arida Aynur, Yeh M, McCullough

- AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
- 50) Adams LA, Lymp FJ, Sauver JS, Sanderson OS, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129:113-121.
- 51) Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. In: *EASL 2003 38 th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Istanbul/Turkey. Nonalcoholic fatty liver disease: From innocent bystander to progressive fibrosis and cirrhosis. President's premeeting syllabus.* (eds) Tözün N, Avşar E. 2003: 12-28.
- 52) Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A,. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:201-229).
- 53) Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001;34:738-744.
- 54) Day CP, Yeaman SJ. The biochemistry of alcoholic fatty liver. *Biochem Biophys Acta* 1994;1215-1233.
- 55) Garg R, Tripathy D, Dandona P. Insulin resistance as a proinflammatory state: mechanisms, mediators, and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets* 2003;4:487-492.
- 56) Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *diabetes* 2003;52:2882-2887.
- 57) Cortez-Pinto H. Oxidative stress in alcoholic and nonalcoholic liver disease. In: *Steatohepatitis(NASH and ASH).* Eds: Leuschner U, James OFW, Dancygier H. Dodrecht, Kluwert Academic Publishers, , 2001: 54-61.
- 58) Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996;111:1645-1653.
- 59) Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P4502E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998;27:128-133.

- 60) Poli G, Albano E, Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987;45:117-143.
- 61) Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2001;21:57-69.
- 62) Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner LI. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81.
- 63) Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 2002;37:56-62.
- 64) Lancaster JR, Laster JM, Gooding LR. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEES Lett* 1989;248:169.
- 65) Garcia-Ruiz C, Colell M, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa J. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1995;48:825-834.
- 66) Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour AA, Naserimoghadam S. Probuocol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol* 2003;38:414-418.
- 67) Lavine JE. Vitamin E treatment of non-alcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *J Pediatr* 2000;136:734-738.
- 68) Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2485-2490.
- 69) Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Faga E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:909-916.
- 70) Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:244-251.

- 71) Leuschner U. Pathogenesis of NASH. In: Leuschner U. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) revised edition 2004. Dr. Freiburg, Falk Pharma GmbH,. 2004:14-19.
- 72) Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995;246:987-990.
- 73) 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 the severity of steatosis. *Journal of Hepatology* 1996;25:677-683.
- 74) Loria P, Lonardo A, Carulli N. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver [Letter] *Hepatology* 2004;39:1748.
- 75) Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, Giral P, Grimald, A, Opolon P, Poynard T. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1485-1493.
- 76) Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2004;24:99-106.
- 77) Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2002; 16:679-690.
- 78) Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. Obesity. *New England Journal of Medicine* 1997;337:396-407.
- 79) Reitman ML, Mason MM, Moitra J, Gavrilova O, ;Marcus-Samuels B, Eckhaus M, Vinson C. Transgenic mice lacking white fat: models for understanding human lipotrophic diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; : 289-296.
- 80) Ghoshal AK, Ahluwalia M, Farber E. The rapid induction of liver cell death in rats fed a choline-deficient methionine low diet. *American Journal of Pathology* 1983;113:309-314.
- 81) Hensley K, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM, Tabatabaie, Stewart CE, et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction

- and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2000;21:983-989.
- 82) Enriquez A, Leclercq I, Farrell GC, Robertson G. Altered expression of CYP2E1 ver CYP4A in obese, diabetic ob/ob mice and fa/fa Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:300-306.
 - 83) Raucy JL, Lasker JM, Kramer JC, Salazar DE, Lieber CS, Corcoran GB. Induction of P450OIE1 in the obese rat. *Mol Pharmacol* 1991;39:275-280.
 - 84) Irizar A, Barnett CR, Flatt PR, Ionnides C. Defective expression of cytochrome P450 proteins in the liver of the genetically obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol* 1995;293:385-393.
 - 85) Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-509.
 - 86) Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. Nonalcoholic steatohepatitis: recent advancews from experimental models to clinical management. *Clinical Biochemistry* 2005;38:203-217.
 - 87) Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight paitents. *Gastrenterology* 1999;99:1408-1413.
 - 88) Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991;12:224-229.
 - 89) Uygun A, Kadayıfçı A, Isik A, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537-544.
 - 90) Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved non-alcoholic stetatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- γ ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003;38:1008-1017.
 - 91) Pomrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic teatihepatitis. *Hepatology* 2004;39:188-196.
 - 92) Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronis hepatic steatosis lead to *in vivo* lipid peroxidation in mice. *J Hepatol*. 1996;24:200-208.
 - 93) Dufour JF. α -Tocopherol and antioxidants in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. In: *Steatohepatitis (NASH and ASH)*. (eds) Leuschner U,

- James OFW, Dancygier H. Dodrecht, Kluwert Academic Publishers, 2004:197-202.
- 94) Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys*. 1998;360:142-148.
- 95) Tanos V, Brzezinski A, Drize O, Struss N, Peretz T. Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial breast cells *in vitro*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;102:188-194.
- 96) Mitchell JH, Collins AR. Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men: a pilot study. *Eur J Nutr* 1999;38:143-148.
- 97) Fritsche S, Steinhart H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. *Eur Food Res Technol* 1999;209:153-179.
- 98) Stark A, Madar Z. Phytoestrogens: a review of recent findings. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15:561-572.
- 99) Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:133-141.
- 100) Giles D, Wei H. Effect of structurally related flavones/isoflavones on hydrogen peroxide production and oxidative DNA damage in phorbol ester-stimulated HL-60 cells. *Nutr Cancer* 1997;29:77-82).
- 101) Cai K, Wei F. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer* 1996;25:1-7.
- 102) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shbuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987;262:5592-5595.
- 103) Kang LP, Qi LH, Zhang JP, Shi N, Zhang M, Wu TM, Chen Ji.. Effects of genistein and quercetin on proliferation, collagen synthesis, and type I procollagen mRNA levels of rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22:793-796.
- 104) Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation,

- activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J of Gastroenterology* 2002;8:739-745.
- 105) Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi AP. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovascular Research* 2000;45:454-462.
- 106) Satoh K, Takamatsu S, Sakuta S, Mizuno S, Metoki H, Otakamatsu M. Augmented malondialdehyde production by platelets from patients with cerebrovascular disorders. *Jpn Circ J.* 1981;45(12):1335-1341.
- 107) Yagi K. Assay for blood plasma or serums. *Methods Enzymol.* 1984;105:328-381.
- 108) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assays for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-358.
- 109) Bahçecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, Bülbüller N, Keçeci M, Demirdağ K, Özercan İ, Üstündağ B. TNF-alpha and leptin in experimental liver fibrosis models induced by carbon tetrachloride and by common bile duct ligation. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(6):359-63.
- 110) Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J.* 2005;19: 136-138.
- 111) Jha HC, von Recklinghausen G, Ziliken F. Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1367-1369.
- 112) Kerry N, Abbey M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1998;140:341-347.
- 113) Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BMK. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2868-2874.
- 114) Oliveira CP, Gayotto LC, Tatai C, Della Nina BI, Lima ES, Abdalla DSP, Lopasso FP, Laurindo FR, Carrilho FJ. Vitamin C and Vitamin E in Prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Choline Deficient Diet Fed Rats. *Nutrition J* 2005: 2-9.

- 115) Davis JN, Kucuk O, Djuric Z, Sarkar FH. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-Kb activation by TNF- α in blood lymphocytes. *Free Radical Biology&Medicine* 2001;30:1293-1302.

9. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ' da tamamladıktan sonra 1989 yılında Hacettepe Tıp Fakültesine girdim. 1995 yılında tıp fakültesinden mezun olduktan sonra 1996 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ihtisasına başlayıp Ekim 2000' de ihtisasımı tamamladım. 2002 yılında Gastroenteroloji yan dal ihtisasına başladım. Halen Fırat Üniversitesi İç Hastalıkları ABD' nda görev yapmaktayım. Evli ve bir kız çocuğu babasıyım.