

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



ÇOCUKLARDA PROBİYOTİK KULLANIMININ ALKOLE
BAĞLI OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI ÜZERİNE
ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayşe AKSEL İŞBİLEN

TRABZON 2016

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ÇOCUKLARDA PROBİYOTİK KULLANIMININ ALKOLE
BAĞLI OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI ÜZERİNE
ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı Prof. Dr. Murat ÇAKIR

Dr. Ayşe AKSEL İŞBİLEN

TRABZON 2016

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan, tez danışmanlığımı üstlenerek bana yol gösteren, tezimin hazırlanmasında her türlü bilimsel katkı ve manevi desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam, Prof. Dr. Murat ÇAKIR'a, Pediatri Anabilim Dalının tüm değerli hocalarına, tez çalışmasında emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Asım ÖREM'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Radyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Y. Doç. Dr. İlker EYÜBOĞLU'na ve asistan arkadaşlarım Tuğba MAZLUM ŞEN ile Fuat TÜFEKÇİ'ye, ihtisasım süresince manevi desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm çalışma arkadaşlarıma, tezime maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine, teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her anında varlıklarına şükrettiğim, sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan ve beni yüreklendiren çok değerli aileme ve canım kardeşime, yaşamın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de destek ve sevgisiyle beni güçlendiren, hayat arkadaşım olduğu için her zaman şükrettiğim sevgili eşim, can yoldaşım Kıvanç İŞBİLEN'e sonsuz teşekkür ederim...

Dr. Ayşe AKSEL İŞBİLEN

ÖZET

Çocuklarda probiyotik kullanmının alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı üzerine etkisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi

Giriş ve Amaç: Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD); alkol alımının olmadığı; diğer karaciğer hastalıklarının yokluğunda, hepatositlerde yağ infiltrasyonu artışı olarak tanımlanır. Patogenezinde son zamanlarda en fazla bağırsak mikrobiyota değişiklikleri vurgulanmaktadır. Bu çalışmada NAFLD'si olan çocuklarda probiyotik kullanmının etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Gastroenteroloji Polikliniğine, Ocak 2015-Kasım 2015 tarihleri arasında başvuran; 7-17 yaş arası, vücut kitle indeksi 95. persentil üzerinde olan ve ultrasonografi (USG) ile NAFLD tanısı alan 28 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak ise, sağlıklı çocuklar arasından yaş ve cinsiyet eşleştirmesi yapılarak 30 çocuk seçildi. Hastalara dört ay boyunca yaşam tarzı değişiklikleri, diyet ve probiyotik tedavisi verilerek takibe alındı. Tedavi öncesi ve sonrası antropometri, ultrasonografi, laboratuvar parametreleri, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR), serum etanol, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), sitokeratin-18, total oksidan durum, total antioksidan durum, zonulin ve dışkı kalprotektin sonuçları değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan hastalar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında antropometrik ölçümleri, karaciğer enzimleri, lipid değerleri, HOMA-IR, etanol, TNF- α , ve kalprotektin seviyeleri yükseldi ($p<0.05$). Tedavi sonrası karaciğer enzimlerinde, lipid parametrelerinde, C reaktif protein, etanol ve TNF- α değerlerinde azalma ve toplam antioksidan durum değerlerinde artış tespit edildi (tüm parametreler için ($p<0.05$)). Hastaların 19'unda (%67.8) USG ile karaciğer yağlanmasında azalma saptandı ($p<0.05$). Karaciğerde yağlanma azalan olgularla azalma saptanmayan olguların tedavi öncesi parametrelerinde fark yoktu. Azalma saptanan olgularda tedavi sonrasındaki total kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein, TNF- α , dışkı kalprotektin düşüşü yağlanması azalmayan gruptan farklı olarak istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

Sonuç: Probiyotik tedavi özellikle inflamasyonu azaltarak karaciğer yağlanmasını azaltmaktadır.

Anahtar kelimeler: NAFLD, probiyotik, etanol, TNF- α .

SUMMARY

Effect of Probiotics in Children with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Background and aim: Non-alcoholic liver disease (NAFLD) is defined as presence of fatty deposits after the exclusion of other liver diseases which cause fatty infiltration of liver and in the absence of excessive alcohol intake. Recently; gastrointestinal microbiota changes was emphasized in pathogenesis of the disease. In this study we aimed to investigate the effects of probiotic treatment in childrens with NAFLD.

Method: Twenty-eight patients diagnosed NAFLD with ultrasonography (USG) whose body mass index was above 95th percentile between January 2015 and November 2015, in Pediatric Gastroenterology Department of Karadeniz Technical University Faculty of Medicine were included in this study. Age and sex matched, 30 healthy children were selected as control group. Patients receive probiotic treatment beside the diet and life style modifications and prospectively evaluated for four months. Antropometric measures, laboratory and ultrasound findings, Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance (HOMA-IR), serum ethanole, tumor necrosis factor alfa (TNF- α), zonulin, cytokeratin 18, total oxidant status (TOS), total anti-oxidant status (TAS) and gaita calprotectin levels were measured before and after probiotic treatment.

Results: Antropometric measures, liver enzymes, lipid profile levels, insulin resistance, ethanole, TNF- α and calprotectine levels were higher in patients compared to healthy controls ($p < 0.05$). Levels of liver enzymes, lipid profile, C reactive protein, ethanole and TNF- α were decreased and levels of TAS were increased with treatment ($p < 0.05$). Decrease in fatty infiltration of liver was observed in 19 (67.8%) patients by USG. Laboratory parameters before the treatment was not differ between patients with and without decreased fatty infiltration. Patients with decreased fatty infiltration had significantly decreased levels of high density lipoprotein, total cholesterol, TNF- α and gaita calprotectin levels than patients whose fatty infiltration did not decreased after probiotic treatment ($p < 0.05$).

Conclusion: Probiotics were effective in treatment of NAFLD by decreasing inflammation.

Key words: NAFLD, probiotics, ethanol, TNF- α

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
TÜRKÇE ÖZET.....	iii
İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Çocuklarda Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	3
2.1.3. Patogenez.....	6
2.1.4. Klinik Bulgular.....	10
2.1.5. Tanı.....	10
2.1.6. Prognoz.....	13
2.1.7. Tedavi.....	14
2.2. Mikrobiyota ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ilişkisi...15	
2.2.1. Bağırsak mikrobiyotası ve disbiyozis.....	15
2.2.2. Bağırsak karaciğer eksenini.....	18
2.3. Probiyotikler.....	20
2.3.1. Probiyotiklerin Özellikleri.....	21
2.3.2. Probiyotiklerin Etkileri ve Kullanım Alanları.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	24
3.1.1. Hasta Grubu.....	24
3.1.2. Kontrol Grubu.....	24
3.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	24
3.3. İstatistiksel Yöntemler.....	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR.....	44
7. KAYNAKLAR.....	45

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

AKŞ	Açlık Kan Şekeri
ALT	Alanin Transaminaz
AN	Akantozis Nigrikans
AST	Aspartat Transaminaz
BM	Bağırsak Mikrobiotası
CK-18	Sitokeratin-18
CRP	C Reaktif Protein
DM	Diyabetes Mellitus
GGT	Gamma Glutamil Transaminaz
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein " <i>High Density Lipoprotein</i> "
HOMA-IR	İnsülin direnç indeksi " <i>Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance</i> "
IL	İnterlökin
İD	İnsülin Direnci
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein " <i>Low Density Lipoprotein</i> "
LPS	Lipopolisakkarit
MS	Metabolik Sendrom
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NAFLD	Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı " <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> "
NASH	Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatit " <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> "
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SCFAs	Kısa Zincirli Yağlı Asitleri " <i>Small chain fatty acids</i> "
SIBO	İnce Bağırsakta Bakteriyel Aşırı Çoğalma " <i>Small intestinal bacterial overgrowth</i> "
SYA	Serbest Yağ Asidi
TAS	Toplam Antioksidan Durum " <i>Total antioxidant status</i> "
TG	Trigliserid
TJs	Sıkı Bağlantılar " <i>Tight Junctions</i> "

TLR	Toll Benzeri Reseptör " <i>Toll like reseptör</i> "
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TOS	Toplam Oksidan Durum " <i>Total oxidant status</i> "
UDCA	Ursodeoksikolik Asit
USG	Ultrasonografi
VA	Vücut Ağırlığı
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein " <i>Very Low Density Lipoprotein</i> "



ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili faktörler.....	5
Şekil 2. Bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakteriler ve oranları.....	15
Şekil 3. Bağırsak mikrobiyotasının yaş ve bazı hastalıklar ile ilişkisi.....	16
Şekil 4. Barsak mikrobiyotası ve disbiyozisin NAFLD gelişimindeki rolü.....	20
Şekil 5. Hastaların tanı anında ultrasonografiye göre yağlanma dereceleri.....	29
Şekil 6. Dışkı kalprotektin ve serum zonulin düzeyi arasındaki korelasyon eğrisi grafiği.....	32
Şekil 7. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası antropometrik ölçümlerinin karşılaştırılması.....	33
Şekil 8. Tedavi öncesi ve sonrası ultrasonografiye göre yağlanma derecelerinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 9. Tedavi öncesi ve sonrası serum alanin transaminaz değerlerinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 10. Tedavi öncesi ve sonrası serum etanol değerlerinin karşılaştırılması.....	35
Tablo 1. Karaciğer yağlanmasında insülin direncinin rolü.....	7
Tablo 2. Vücut kitle indeksi persentillerinin değerlendirilmesi.....	10
Tablo 3. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığından şüphelenildiğinde yapılması gereken laboratuvar tetkikleri.....	12
Tablo 4. Ultrasonografide karaciğer yağlanma dereceleri.....	13
Tablo 5. Probiyotiklerin kullanım alanları.....	23
Tablo 6. Çalışmada kullanılan klinik bulgular ile laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ve amaçları.....	26
Tablo 7. Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve klinik bulguları.....	30
Tablo 8. Hasta ve kontrol gruplarının laboratuvar bulgularının karşılaştırılması.....	30
Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarının diğer laboratuvar bulgularının karşılaştırılması.....	31

Tablo 10. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası laboratuvar bulgularının karşılaştırılması.....	34
Tablo 11. Yağlanma derecesi azalan ve azalmayan hastaların tedavi öncesi ve sonrası klinik ve laboratuvar bulgularının karşılaştırılması.....	37



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, besinlerle alınan enerji miktarının, büyüme, bazal metabolizma ve fiziksel hareket ile tüketilen enerji miktarından daha çok olmasına bağlı, vücutta fazla miktarda yağ birikimi ile ortaya çıkan bir hastalıktır (1). Obezitenin çocuklarda yaygınlığı arttıkça; endokrin anormallikler, kardiyovasküler, gastrointestinal, pulmoner, ortopedik, nörolojik, dermatolojik problemler ve psikososyal komorbiditeler daha sık izlenmektedir. Metabolik sendrom (MS), tip II diyabetes mellitus (DM), hipertansiyon, dislipidemi ve kardiyovasküler hastalıklar bunların başında gelmektedir (2). Son yıllarda, obezitenin yaygınlaşması nedeni ile daha fazla görülmeye başlanan bir diğer komplikasyon ise, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı "*Non-alcoholic fatty liver disease*" (NAFLD)'dir (3). Alkol alımının olmadığı; viral, otoimmün veya ilaca bağlı karaciğer hastalığının yokluğunda, hepatositlerdeki yağ infiltrasyonunun %5'in üzerinde olması şeklinde tanımlanır (4). NAFLD'nin klinik spektrumunda; basit karaciğer yağlanması ve alkole bağlı olmayan steatohepatitten "*Non-alcoholic steatohepatitis*" (NASH), siroza kadar uzanan geniş bir histopatolojik yelpaze izlenir (5). Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm çocuklarda görülme sıklığı %12.5 iken, obez çocuklarda sıklığı % 30-50'ye kadar yükselmektedir (6).

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının patogenezi tam olarak netlik kazanmamıştır. Çeşitli hipotezler olmasına rağmen, araştırmacılar tarafından en fazla kabul göreni "çift darbe" teorisi (7). Ancak son zamanlarda "çoklu darbe" hipotezi de gündeme gelmektedir. Bu hipotezin birinci darbe kısmını insülin direnci (İD) oluşturmaktadır. Karaciğerde lipogenez ve adipoz dokuda lipolizin artması nedeniyle adipoz dokudan karaciğere serbest yağ asidi (SYA) taşınması artmıştır. Karaciğerde SYA artışı ile beraber, oksidatif stres, düzensiz adipokin salınımı, hepatosit apoptozu ve stellat hücre aktivasyonuna neden olarak; basit yağlı karaciğer hastalığının, NASH hatta siroza ilerlemesine sebep olmaktadır (8).

Kilo kaybı, NAFLD tedavisinde ilk basamaktır. Diyet kısıtlaması ve fiziksel aktivite artışına dayalı yaşam tarzı değişiklikleri, vücut ağırlığı (VA) ve vücut kitle indeksinde (VKİ) anlamlı bir azalma ile çocuklarda karaciğer fonksiyon testleri, karaciğer yağlanması ve karaciğer hasarının iyileşmesine neden olmaktadır (9).

Probiyotikler, sindirim sisteminde belirli sayıda bulunan ve tüketildiğinde

bireyin bağırsaklarındaki bakterilerin sayıca dengesini düzenleyerek sindirim sistemi ve bağırsak sağlığını koruyan canlı mikroorganizmalar ve/veya bileşenler olarak tanımlanmaktadır (10). Probiyotiklerin çeşitli mekanizmalar aracılığı ile karaciğerde inflamasyonu azalttığı ve NAFLD'si olan hastalarda olumlu etkileri olabileceği düşünölmektedir (11).

Bu çalışmada; NAFLD'si olan obez adölesanlarda probiyotik kullanımının, hastalığın seyrine etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çocuklarda Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı; alkol alımının olmadığı, viral, otoimmün veya ilaca bağlı karaciğer hastalığının yokluğunda, karaciğer biyopsisinde hepatositlerdeki yağ infiltrasyonunun %5'in üzerinde olması şeklinde tanımlanır (4). İlk kez, Ludwig (12) tarafından 1980 yılında erişkinlerde, alkole bağlı hepatite benzeyen ancak alkol tüketiminin olmadığı hepatik etkilenme olan NASH tanımlanmıştır. Üç yıl sonra da Moran ve Colab (13) tarafından, obez çocuklarda NAFLD tanımlanmıştır. Çoğunlukla obezite ile ilişkilidir ve gelişmiş ülkelerde çocuk ve adölesanlarda kronik karaciğer hastalığının en sık nedenidir (14). NAFLD'nin klinik spektrumunda; basit karaciğer yağlanması, siroza kadar uzanan geniş bir klinik yelpaze bulunmaktadır (15).

2.1.1 Epidemiyoloji

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının yaygınlığı hızla artmakta ve dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (16). Her yaşta, her iki cinsiyette ve çeşitli etnik gruplarda görülebilir (17). Amerikan Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması (NHANES) sonuçlarına göre, çocuklarda NAFLD sıklığının son 20 yılda iki kat arttığı bildirilmiştir (18). Nüfus tabanlı yapılan çalışmalarda NAFLD sıklığı; ABD, İtalya ve İsrail gibi batı ülkelerinde %20-30, Çin gibi doğu ülkelerinde %13-17 olarak belirtilmiştir (19). Otopsi verilerinden yapılan değerlendirmelere göre de, 2-19 yaş arası çocukların %10'unda, obez çocukların ise %38'inde NAFLD tespit edilmiştir (15). İlk çalışmalarda NAFLD'nin kadınlarda daha yaygın olduğu söylenece de, son çalışmalarda her iki cinsiyette neredeyse eşit olduğu, hatta erkeklerde daha fazla görüldüğü belirtilmektedir (20, 21). Ülkemizde 450 obez çocukla yapılan bir çalışmada, NAFLD prevalansının %48 olduğu bildirilmiştir (22).

2.1.2. Etiyoloji – Risk Faktörleri

Pediyatrik NAFLD için risk faktörleri; obezite, erkek cinsiyet, adölesan yaş grubu, İD, hipertrigliseridemi, beyaz veya Hispanik etnik ve genetik faktörler olarak belirlenmiştir (15, 23).

Obezite, NAFLD için en önemli risk faktörüdür (4). Yapılan geniş toplum çalışmasında çocuklarda NAFLD varlığı ile VKİ fazlalığı arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Diğer faktörler dışlandıktan sonra, VKİ'de sadece bir persentil artış NAFLD insidansını 5.58 kat artırmaktadır (24). Aşırı kilolu ve obez hasta grubu normal kilolulara göre kıyaslandığında da ise, NAFLD insidansının 13.36 kat artmış olduğu gösterilmiştir (24).

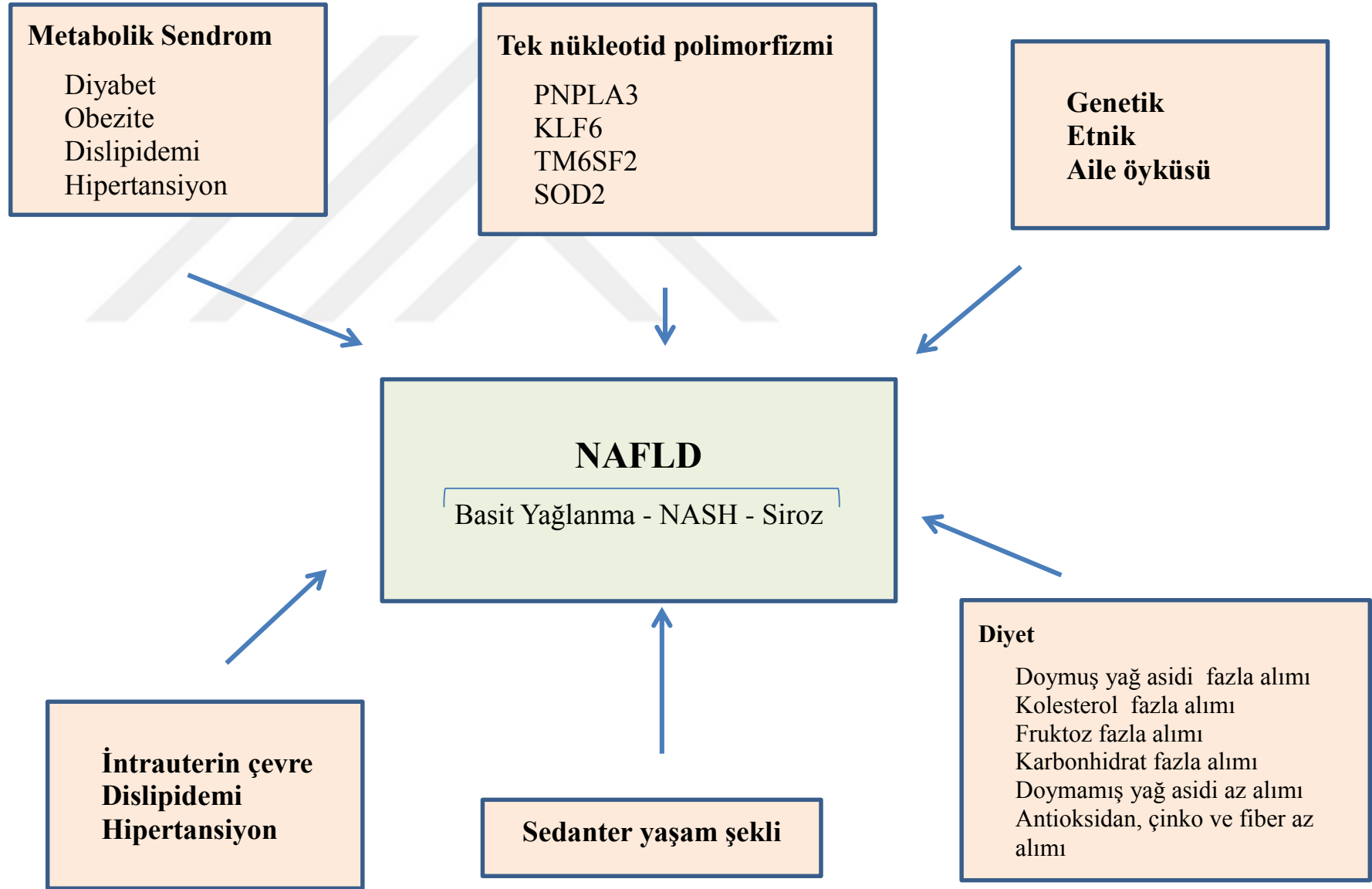
Östrojenin karaciğer koruyucu etkisi, androjenlerin NASH gelişimini şiddetlendirmesi varsayımlarına dayanarak, NAFLD sıklığının kızlara oranla erkek çocuklarda daha fazla olduğu düşünülmektedir (25).

Bir diğer risk faktörü ise yaştır. NAFLD, küçük çocuklarda da görülmesine rağmen, adölesanlarda görülme sıklığı daha fazladır. Bu dönemde, seks hormonları ve büyüme hormonu gibi insülin karşıtı hormonların artışı, pubertal İD'ye neden olur. Yine adölesan yaş grubunun sağlıksız yiyecek ve sedanter yaşam tarzı seçimleri de obeziteye, dolayısıyla NAFLD gelişime zemin hazırlamaktadır (4). Ülkemizde 169 obez çocukla yapılan bir çalışmada; hastalar pubertal ve prepubertal olarak iki gruba ayrılmış, ultrasonografi (USG) verileri değerlendirilmiş, NAFLD sıklığı pubertal grupta %61.9 iken, prepubertal grupta ise %40.8 tespit edilmiştir (26).

Erişkinlerde olduğu gibi çocuklarda da NAFLD; MS ve İD ile kuvvetli ilişkilidir. Yine hipertrigliseridemi ve/veya hiperkolesterolemi de NAFLD olgularında sık görülebilmektedir (4, 23).

Etnik ve genetik yatkınlığın da NAFLD ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Amerikan Hispanik etnik grupta daha sık, Afrika kökenli Amerikanlarda ise daha nadir görülmektedir. İD'nin Amerikan Afrikalılarda yüksek olmasına rağmen, NAFLD'nin daha az görülmesi ilginç bir bulgudur. NAFLD ilişkili PNPLA3 genindeki tek nükleotid değişkenliği, Hispaniklerde yüksek iken, Amerikan Afrikalılarda düşük bulunmuştur (25).

Bunların yanında, enerji dengesinde yer alan bazı genlerdeki polimorfizm ya da nokta mutasyonlarının (PNPLA3, KLF6, TM6SF2, SOD2 gibi), karaciğer yağlanması ve karaciğer hasarı şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (23). NAFLD gelişimi ve ilerlemesindeki risk faktörleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili risk faktörler (23).

2.1.3 Patogenez

Alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalığının patogenezini tam olarak netlik kazanmamıştır. Çeşitli hipotezler olmasına rağmen, araştırmacılar tarafından en fazla kabul göreni "çift darbe" teorisidir (7). Ancak son zamanlarda "çoklu darbe" hipotezi de gündeme gelmektedir. Bu hipotezin birinci darbe kısmını İD oluşturmaktadır. Karaciğerde lipogenez ve adipoz dokuda lipolizin artması nedeniyle adipoz dokudan karaciğere serbest yağ asidi (SYA) taşınması artmıştır. Bu durum karaciğeri savunmasız hale getirmektedir. Oksidatif stres, düzensiz adipokin salınımı, hepatosit apoptozisi ve stellat hücre aktivasyonu; basit yağlı karaciğer hastalığının, NASH hatta siroza ilerlemesinde suçlanan patojenik faktörlerdir (8).

Birinci darbe, karaciğerde lipid birikimi ile oluşmaktadır. Lipidler, bağırsak mukozasından emildikten sonra, şilomikron olarak lenfatik dolaşıma katılır. Bu moleküller, lipidleri adipoz dokuya taşır ve ihtiyaç halinde kullanılmak üzere trigliserid (TG) olarak adipoz dokuda depolanır. İhtiyaç duyulduğunda TG'ler, hormon duyarlı lipaz ile parçalanarak, SYA şeklinde dolaşıma verilir ve karaciğere taşınır. Karaciğere gelen yağ asitleri, mitokondride enerji oluşturacak şekilde yıkılır veya çok düşük yoğunluklu lipoprotein "*Very Low Density Lipoprotein*" (VLDL)'in sentezinde kullanılarak kana verilir. Lipidlerin karaciğer ve periferik depolar arasındaki dolaşımı ve yağ asitlerinin karaciğerde sentezi değerlendirildiğinde, birinci darbe gelişimine;

1. Yağ dokusundan karaciğere gelen SYA miktarında artış (obezite, ani kilo kaybı),
2. Karaciğerde yağ asidi sentezinde artış, protein ve karbonhidratların TG dönüşmesinde fazlalık (aşırı beslenme, total parenteral beslenme),
3. Yağ asidinin beta-oksidasyonunda azalma (vitamin eksiklikleri, karnitin eksikliği, mitokondriyal disfonksiyon, azalmış peroksizom proliferator aktif reseptör alfa aktivasyonu, düşük adiponektin seviyeleri),
4. VLDL sentez veya salınımında bozulma (apoprotein sentezinde azalma, protein malnutrisyonu ya da kolin eksikliği) neden olabilir (3, 27, 28).

Bunun yanında İD'nin, NAFLD oluşumundaki 'birinci darbe' gelişiminde bağımsız bir faktör olduğu düşünülmektedir. İnsülin, hücre düzeyinde kendi reseptörüne bağlandığında; hücre içinde bir dizi sinyal iletileri ile yağ ve kas

hücrelerine glukoz girişi, protein ve glikojen sentezi, glukoneogenez gibi olayları başlatmaktadır (29).

İnsülin direnci; pankreas tarafından üretilen normal miktarda insüline yağ, kas ve karaciğer hücrelerinde gerekli tepkinin oluşturulamaması durumudur. Normal metabolik cevabın oluşması için, normalden fazla insülin konsantrasyonu gerekmesi veya normal insülin konsantrasyonunun metabolik cevap oluşturmada yetersiz kalması şeklinde tanımlanabilir (30). İD varlığında, hücrelere glukoz girişi ve kullanımı azalır ancak karaciğerde glukoneogenez ile glukoz yapımı devam eder. Kan glukoz düzeyi yükselir ve kompensatuvar hiperinsülinemi gelişir. Genetik, inflamatuvar, beslenme ve yaşam tarzı gibi pek çok sebepten dolayı insülin sinyalizasyonunun bozulması sonucu İD gelişir. İD nedeni ile artan insülin, hormon duyarlı lipaz seviyesini artırır. Bu da, yağ dokusunda lipolizi uyararak, SYA seviyelerinde artış sağlar. Yine İD nedeni ile, karaciğerde glukoneogenez artışı ve glikojen sentezinin azalması ile SYA üretimi artar ve yağ asitlerinin beta oksidasyonu engellenir. Bu da karaciğere gelen yağ asidi miktarının artmasına neden olur. Karaciğer kendisi de, de novo lipogenez olarak adlandırılan süreç ile karbonhidratlardan lipid üretimi yaparak yağlanmaya katkıda bulunur. Normal karaciğerde, de novo lipogenez karaciğerdeki yağın ana kaynağı değildir. Ancak obezite ve hiperinsülinemi durumunda, lipid depolarına %25 katkıda bulunur (23, 29, 31, 32). Karaciğer yağlanmasında İD'nin rolü Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Karaciğer yağlanmasında insülin direncinin rolü

	İnsülin Etkisi	İnsülin Direnci
Kas Dokusu	Glukoz geri alımı artar	Glukoz geri alımı azalır
Yağ Dokusu	Trigliserid sentezi artar Lipoliz azalır	Lipoliz artar
Karaciğer	Glukoneogenez artar Lipid sentezi artar Lipoliz azalır	Lipid sentezi artar

Sonuç olarak, hem birinci darbe sonucu hem de İD ile karaciğerde SYA artışı nedeni ile karaciğerde yağlanma gelişmektedir. İkinci darbe ise oksidatif stres ve anormal sitokin üretiminin, inflamasyonu arttırarak karaciğer hasarına yol açması ile

oluşur ve steatohepatit gelişimine zemin hazırlar. İkinci darbe için etiyolojik faktörler;

1. Oksidatif stres,
2. Mitokondriyel disfonksiyon,
3. Yağ dokusu hücrelerinden sentezlenen çözünebilir araçlar (adipokinler),
4. Bağırsak disbiyozisi ve endotoksinler olarak belirtilmiştir (33).

Serbest radikaller, moleküler yörüngelerinde, bir ya da birden fazla serbest elektron bulunan moleküllerdir (tekli oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil). Reaktif oksijen türevleri (ROT) ise moleküler oksijenden türetilmiş çeşitli molekül ve serbest radikalleri tanımlayan genel bir terimdir ve organizma için bazen yararlı bazen de zararlı etkileri olabilmektedir. Serbest radikallerin zararlı etkisi sonucu oluşan potansiyel biyolojik zedelenme, oksidatif stres olarak adlandırılır (34).

Canlı organizmalarda oksidatif stres, oksijen kullanılan metabolik reaksiyonlar sonucu, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır (34, 35). Mitokondride elektron transport akışındaki verimsizlik ROT'un ana kaynağıdır. Fizyolojik koşullarda antioksidan enzimler ile su içine detoksifiye edilir Ancak yüksek yağlı beslenme veya aşırı glukoz alımı durumlarında, ROT artar ve mitokondriyel solunum zincir enzimlerini inhibe eder. Bunun sonucunda, plazma ve hücre içi membranlarında peroksidasyon, mitokondride aşırı büyüme, hücre nekrozu ve apoptozisi gelişir (36). Birikmiş SYA, strese bağlı olarak, apoptozisi başlatır ve hepatik stellat hücre ile kuppfer hücrelerini uyarır (37).

Mitokondriyel disfonksiyon; oksidatif stresi oluşturan ROT'un temel sonuçlarından birisidir. Ancak NAFLD'deki rolü bununla sınırlı değildir. Mitokondriyel disfonksiyon sonucu, SYA metabolizmasındaki bozukluklar (beta oksidasyon), SYA sentezindeki artış ve hepatositlerde SYA esterleşmesindeki artış da mitokondriyel disfonksiyonla ilişkili olarak NAFLD patogenezinde rol oynamaktadır (38).

Adipokinler ve sitokinler; temel olarak adipoz dokudan salgılanan çok fonksiyonlu faktörlerdir. Üzerinde en fazla çalışılanları, insülin duyarlılığını artıran leptin, insülin antagonistik özelliği olan adiponektin ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)'dır. Leptin; enerji alımı ve harcanması arasındaki denge, bağışıklık sistemin düzenlenmesi, inflamasyon ve fibrogenezin sağlanmasından sorumludur.

Obezite geninin (ob) bir ürünüdür. Leptin seviyeleri, doğrudan vücut yağ kitlesi ve adiposit boyutu ile bağlantılıdır. Obez hastalarda düzeyleri yüksektir. NAFLD'nin leptin direnci ile ilişkili olduğu ve patogeneizde önemli yerinin olduğu düşünülmektedir (39, 40).

Adiponektin, anti-inflamatuar özellikte bir sitokindir ve insülin duyarlılığını artırır. TNF- α üretimini baskılar, karşılıklı olarak TNF- α da adiponektini baskılar. Leptinin aksine adiponektinin, dolaşımdaki seviyeleri vücut yağ kitlesi ile ters orantılıdır ve NAFLD hastalarında azalmıştır. Adipoz dokudan salgılanan bir diğer adipokin TNF- α 'dır. Obezite ve İD patogenezinde rolü vardır. Yağ dokusu kitlesi ve İD ile pozitif korelasyon gösterir. NAFLD hastalarında artmıştır. Aynı zamanda karaciğerden de salınır ve inflamatuvar yanıtı uyararak hücrelerin kemotaksisini sağlar, hepatositlerin zarar görmesini ve fibrozisin ortaya çıkmasını kolaylaştırır (39, 40).

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı gelişiminde ve ilerlemesinde, bağırsak karaciğer ekseninin de önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir. Bağırsak disbiyozisi (mikrobiyal flora bozukluğu); ince bağırsakta bakteriyel aşırı çoğalma "*small intestinal bacterial overgrowth*" (SIBO), artmış bağırsak geçirgenliği "*leaky gut*" ve inflamasyon ile NAFLD patogenezine etki etmektedir (32). Sonuç olarak; ikinci darbe sonucunda karaciğerdeki basit yağlanmaya ek olarak inflamasyon ve fibrozis gelişmektedir.

Hastalığın siroz ve hepatoselüler kansere ilerlemesi ise çevresel ve genetik faktörlere bağlıdır. Fibrozis ve daha ileri şekli siroz, NAFLD dahil, tüm kronik karaciğer hastalıklarının ortak son yoludur. Karaciğer fibrozisinde en önemli basamak, hepatik stellat hücre aktivasyonudur. Hasarlanmış karaciğer hücrelerinde, inflamatuvar hücreler gibi, DAMPs "*damage associated molecular patterns*" da, stellat hücreleri uyarabilir. Serbest kolesterol, stellat hücre üzerindeki toll benzeri reseptörleri "*toll like reseptör*" (TLR) uyararak, karaciğer fibrozis gelişimine katkıda bulunabilir. Oksidatif stres de ROT artışı ile stellat hücrelerini uyarabilir (23).

Stellat hücreleri hasara, myofibroblastlara dönüşerek cevap verir. Aktive olduklarında, dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1 ve bağlayıcı doku büyüme faktörü aracılığıyla ekstrasellüler matriks proteini ve kollajen sentezler. Aynı zamanda metalloproteinaz-1-2'nin doku inhibitörlerini de üretirler. Bu faktörler;

metalloproteinazları doğrudan inhibe ederek ekstraselüler matriks birikimine ve skar oluşumuna yol açar (41). Yağlanmanın ilerlemesi ile portal fibrozis, santral-portal, portal-portal septumlar (köprüleşme) oluşur ve sonuçta siroz gelişir (42).

2.1.4 Klinik Bulgular

Hastalığın başlangıcı sinsidir ve çocuklarda genellikle asemptomatiktir. En sık görülen belirtiler; sağ hipokondriyak bölgede ağrı ve yorgunluktur. Çocuklarda tanımlanan diğer klinik belirtiler; sinirlilik, üzüntü, konsantrasyon eksikliği, bulantı, ishal, karın şişliği ve kas kramplarıdır (43). Hepatomegali sıkça görülebilir. NAFLD'si olan çocukların %30-50'sinde İD ile ilişkili olan; servikal, aksiller ve inguinal bölgelerde izlenen, fleksiyon alanlarının pigmentasyonu ile karakterize akantozis nigrikans (AN) gözlenebilir (44). Nadir olarak, kronik karaciğer hastalığı veya siroz gelişmişse asit, özofagus varisleri, sarılık, gastrointestinal kanama ve ensefalopati görülebilir. NAFLD aile öyküsü olan çocuklarda bazen İD veya tip II DM izlenebilir (45).

2.1.5 Tanı

Hastaların antropometrik ölçümleri alınmalıdır. Boy ve kiloları ölçülerek VKİ hesaplanmalıdır. VKİ, iki yaş ve üzeri fazla kilolu ve obez çocuklar için kabul edilen standart ölçümdür ve kg/m^2 formülü ile hesaplanır. Çocuklarda yaş ve cinsiyete göre VKİ persentilleri kullanılmaktadır (46). Çocuk ve adölesanlar için VKİ persentil çizelgesinin %85–94 aralığı aşırı kilolu, %95 ve üzeri ise obez olarak tanımlanmaktadır (47). VKİ persentil eğrisinin değerlendirilmesi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Vücut kitle indeksi persentillerinin değerlendirilmesi

Vücut Kitle İndeksi Persentil (%)

< 5	Zayıf
5-84	Normal
85-94	Aşırı kilolu
≥ 95	Obez
≥ 99	Şiddetli obez

Klinik uygulamada NAFLD tanısı, aşırı kilolu ve/veya obez çocuklarda, USG'de karaciğer parlaklığının gösterilmesi ve/veya serum hepatobilyer enzimleri artışı ile konulmaktadır. Serum alanin transaminaz (ALT) aktivitesi tarama ve NAFLD'nin ilk değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılabilen ucuz bir testtir. Ancak hastaların bir kısmında normal aralıklarda bulunabilir (14). Aspartat transaminaz (AST) ve/veya ALT değerleri normalin bir-dört katı kadar yükselebilir. NASH'den farklı olarak, AST/ALT oranının birden küçük olması NAFLD için tipik kabul edilmektedir. Amerikan ulusal beslenme ve sağlık araştırmasında (1999-2004), 12-19 yaş arası çocukların %8'inde, karaciğer hastalıkları için diğer nedenlerin yokluğunda, ALT seviyelerindeki yükselme NAFLD için belirleyici olarak gösterilmiştir. Alkalen fosfataz, yüksek değerlere sahip olabilir. Karaciğer fonksiyonları ile ilgili diğer laboratuvar parametreleri genellikle normal sınırlardadır. Dislipidemi, anormal TG seviyeleri ve/veya düşük yüksek yoğunluklu lipoprotein "*High Density Lipoprotein*" (HDL) değerleri NAFLD'si olan çocukların çoğunda mevcuttur (48).

Yağlı karaciğerde inflamasyon ve hasarı gösteren diğer belirteçler; TNF- α , resistin, interlökin 6 (IL-6) (proinflamatuvar sitokin), adiponektin (antiinflamatuvar sitokin), leptin (profibrotik), retinol bağlayıcı protein (insülin direnci), serum endotoksin, plazminojen aktivatör inhibitör-1, CRP (C-reaktif protein), fetuin A (İD'de önemli mediatör) ve sitokeratin-18 (CK-18) (fibrozis belirteci)'dir (14).

Sitokeratin-18, başlıca hepatositler olmak üzere epitelyal hücreler tarafından nekroz ve apoptozis sırasında üretilen hücre içi bir proteindir ve hücre ölümünü yansıtan bir serum belirteçidir. Obezitesi veya İD'si olan hastalarla yapılan çalışmalarda, artmış CK-18 seviyeleri; hepatosit hasarı, inflamasyon ve fibrozis ile ilişkili bulunmuştur. Çin'de yapılan bir çalışmada, CK-18 seviyelerinin NASH'lı hastalarda, NASH olmayan gruba göre daha yüksek seviyelerde olduğu, yağlanma şiddeti, lobuler inflamasyon ve fibrosis derecesi ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlar, CK-18 düzeyinin, NASH şiddetini tahmin etmek için önemli bir belirteç olabileceğini göstermektedir (49).

Tanısal çalışma sırasında, kronik karaciğer hastalığının diğer nedenlerinin ekarte edilmesi gerekir. Viral karaciğer hastalığı, kistik fibrozis, Wilson hastalığı, hemokromatoz, α -1-antitripsin eksikliği, otoimmün karaciğer hastalığı ve ilaç

kullanımı yağlanmaya neden olan diğer durumlar arasındadır (14) (Tablo 3).

Tablo 3. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığından şüphelenildiğinde yapılması gereken laboratuvar tetkikleri (14).

Metabolik fonksiyon ve karaciğer testleri:

Temel profil; kan sayımı, standart karaciğer fonksiyon testleri, açlık kan şekeri ve insülin, üre ve elektrolitler, koagulasyon, INR (international normalized ratio) ALT ve AST seviyeleri

Lipid profili (kolesterol, TG, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol), lipoproteinler

Oral glukoz tolerans testi (OGTT), glikolize hemoglobin

İD belirteçleri

Tiroid fonksiyon tesleri

Hepatik steatozun diğer nedenlerinin dışlanması için yapılması gereken diğer testler:

Serum laktat, ürik asit, demir, ferritin, pirüvat

Serum bakır, seruloplazmin, 24 saat idrarda bakır

Ter testi

Anti doku transglutaminaz immunglobulin A (IgA), Total IgA

Alfa 1 antitripsin

Aminoasitler ve organik asitler

Plazma serbest yağ asitleri ve açıl karnitin profili

İdrarda steroid metabolitleri

Diğer özel testler (viral hepatit paneli, serum immunoglobulin, karaciğer otoantikorları)

Hastalığın tanısı için en sık kullanılan görüntüleme yöntemi USG'dir (4). USG, invaziv olmaması, ucuz olması ve eş zamanlı portal sistemin de değerlendirilebilmesi nedeni ile NAFLD teşhisi için iyi bir tarama yöntemi olarak kabul edilir. Duyarlılığı % 80 olup, orta ve şiddetli steatozu saptamada özgülüğü % 100'e ulaşır. USG'de steatoz, karaciğere komşu olan sağ böbrek ve dalak ile kıyaslandığında; karaciğerin daha parlak, parankim ekojenitesi artmış ve vasküler yapılarında düzensizlikler görünmesidir. Derecelendirme 0-3 arasında yapılır (Tablo 4). Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), karaciğer yağlanmasını gösteren diğer görüntüleme yöntemleridir (50).

Tablo 4. Ultrasonografide karaciğer yağlanma dereceleri (51).

Derece 0 (normal ekojenite): Yağlanma yok. Böbrek ve karaciğer izoekoik.

Derece 1 (hafif yağlanma): Diyafram ve intrahepatik damarlar normal, karaciğer parankimi hafif diffüz hiperekojenik, karaciğer ekosu böbreğe göre hafif artmış.

Derece 2 (orta derece yağlanma): Diyafram ve intrahepatik damarlar biraz bozulmuş. Karaciğer parankim ekojenitesi diffüz orta derecede artmış.

Derece 3 (ağır yağlanma): Diyafram, portal ven sınırları ve karaciğer sağlob posterior kısım görüntülemesi bozulmuş. Karaciğer parankim ekojenitesi ağır derecede artmış.

Görüntüleme yöntemlerinden bilgisayarlı tomografi, erişkin çalışmalarında biyopsi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %82, özgüllüğü %100 olarak değerlendirilmiştir (14). Ancak iyonize radyasyona gereksiz maruziyet nedeni ile çocuklarda kullanımı sınırlıdır. MRG'de ise sadece su içeren ve su ile birlikte yağ içeren hücrelerin ayrımı ile yağ infiltrasyon ölçümü yapılabilmektedir. Ucuz bir yöntem değildir. Erişkin çalışmalarda duyarlılığı %100, özgüllüğü %90.4 değerlendirilmiştir, ancak pediatrik grupta yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır (14). Fibroscan görüntüleme NAFLD'si olan çocuklarda, geçici elastografi kullanılarak, karaciğer fibrozisini değerlendiren, invaziv olmayan, ucuz, ağrısız ve tekrarlanabilir yeni bir yöntemdir. Ancak bugünkü haliyle, yaygın kullanım için henüz uygun değildir. Manyetik rezonans spektroskopisi ve elastografi diğer görüntüleme yöntemleri arasındadır. Karaciğer biyopsisi, diğer potansiyel tedavi edilebilir durumların ayrımını en iyi yapan; basit steatoz, NASH ve NAFLD ayrımının yapılabildiği tek testtir. Ancak rutin tanısal amaçlı yapılmaz. Karaciğer hasarının derecesi, karaciğer yapısındaki değişiklikler, inflamatuvar aktivite ve fibrozis şiddeti hakkında önemli bilgiler sağlar (14, 52).

2.1.6. Prognoz

Hastalığın seyri benign ve yavaştır. Ancak prognozunda hala belirsizlikler vardır. Karaciğer nakil ihtiyacı gelişebilen siroz ve hepatosellüler karsinom

görülebilmektedir (4). Erişkin dönemde kardiyovasküler hastalık gelişme riski de artmıştır. Çocuk hastalarda, karotis intima medial kalınlık artışının gelecekteki aterosklerozun göstergesi olduğu kabul edilmiştir (53).

2.1.7. Tedavi

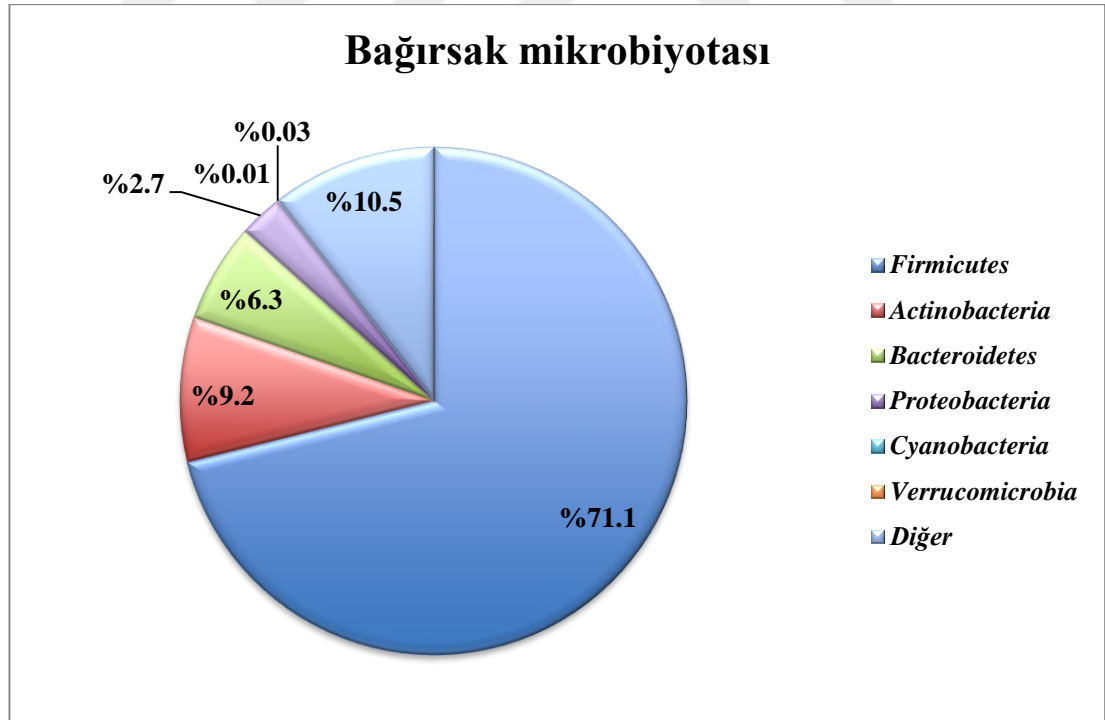
Altta yatan karaciğer histolojisi ne olursa olsun, kilo kaybı ve fiziksel aktivitede artış hedefleyen yaşam tarzı değişikliği, NAFLD'nin yönetiminde hayati önem oluşturmaktadır. Hastalara, günlük aktivitelerini artırıp düzenli egzersiz yapmaları, sağlıklı beslenmeleri ve sedanter yaşamdan uzaklaşmaları, haftanın beş günü 30 dakika ılımlı egzersiz yapmaları ve günde ortalama 10000 adım atmaları önerilmelidir. Yapılan bir çalışmada, 48 hafta boyunca diyet tavsiyeleri alan ve haftada 200 dakika ılımlı egzersiz yapan hastaların %9,3'ünde kilo kaybı olmuş, karaciğer biyopsisinde yağlanma ve inflamasyonda iyileşme sağlanmıştır (54).

Kilo kaybı ve yaşam tarzı değişikliği ile başarılı olunamadığı durumlarda ya da bazı olgularda kombine tedavi (kilo kaybı, yaşam tarzı değişikliği, farmakolojik tedavi) gerekebilir. NAFLD ve NASH için, erişkin ve çocuk hastalarda kesin olarak kabul edilmiş farmakolojik ajan yoktur. Oksidatif stresi azaltan, serbest yağ asitlerinin inflamatuvar ve lipotoksik etkilerini düzenleyen ilaçlar ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (55). Antioksidanlar, oksidatif stresi azaltarak hücre zarlarını lipid peroksidasyonundan korur (56). Vitamin E; karaciğer yağlanması olan, diyabetik olmayan hastalarda, son zamanlarda histoloji üzerinde yararlı etkileri olduğu gösterilen bir antioksidandır (57). Yapılan en büyük pediatrik çalışma olan TONIC çalışmasında; 96 hafta boyunca hastalara vitamin E ve metformin tedavileri verilmiş, vitamin E ve metforminin, ALT düzeyinin düşürülmesinde plaseboya karşı üstünlüğü saptanmamış; ancak vitamin E tedavisi alan grupta diğer iki gruba göre histolojik düzelmenin olduğu tespit edilmiştir (58). NAFLD'si olan çocuklarda, vitamin E kullanılsa da, ilave doğrulayıcı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmüştür. Son zamanlarda yapılan meta-analiz çalışmalarında; vitamin E'nin, plasebo ile karşılaştırıldığında, çocuklarda NAFLD üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır (59). Bir diğer farmakolojik ajan ursodeoksikolik asittir (UDCA). Erişkin ve çocuk NAFLD'si olan hastaların alındığı çalışmalarda, UDCA tedavisinin de karaciğer hasarını azaltmada etkili olmadığı görülmüştür (55).

2.2. Mikrobiyota ve alkole bağı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ilişkisi

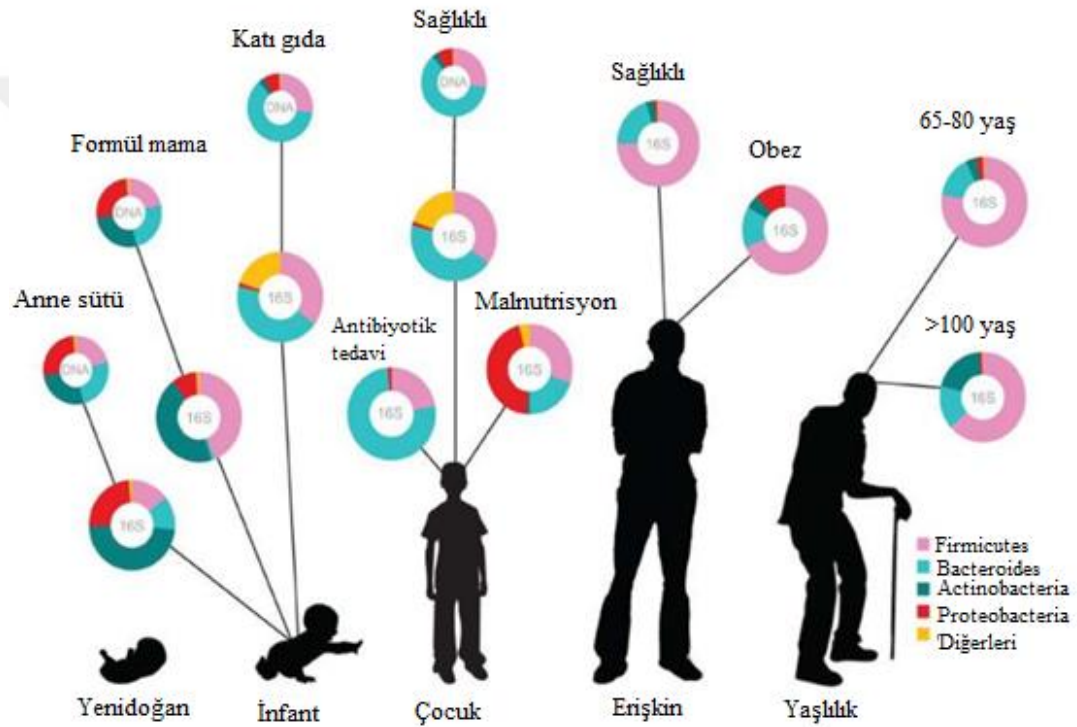
2.2.1. Bağırsak mikrobiyotası ve disbiyozis

Bağırsaklar, besin emilimi ve mukozal bariyer fonksiyon bütünlüğü için gerekli olan, bağırsak mikrobiyotası (BM) olarak bilinen çok sayıda mikroorganizmadan oluşur (1). Mikrobiyota, vücudun bir organ veya bir kısmında yaşayan mikroskopik organizma nüfusunu ifade eder. Mikrobiyom ise tüm genetik elementleri kişiye ait olan benzersiz mikroorganizma nüfusu anlamına gelir (60). BM, bir-iki kilogram ağırlığında, binden fazla türde, trilyonlarca mikroorganizmadan oluşmaktadır (61). Esas olarak %71.1'ini *Firmicutes*, %9.2'sini *Actinobacteria*, %6.3'ünü *Bacteroidetes*, %2.7'sini *Proteobacteria*, %0.03'ünü *Cyanobacteria*, %0.01'ini *Verrucumicrobia* ve %10.5'ini diğer gruplar oluşturmaktadır (24) (Şekil 2). BM'nin, vücuttaki tüm fonksiyonlar ile etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Metabolik olaylar ve büyüme üzerine etkisi, mukozal ve sistemik bağışıklığın düzenlenmesinde rolü mevcuttur (62).



Şekil 2. Bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakteriler ve oranları (24).

Disbiyozis; mikrobiyal topluluğun sayı, fonksiyonunda değişiklik veya dağılımındaki dengesizlik anlamına gelir (63). BM; yaşa, beslenme alışkanlıklarına (vejeteryan diyet, yüksek karbonhidratlı yada yağlı beslenme), ilaç kullanımına, coğrafi bölgeye ve etnik kökene göre farklılıklar göstermektedir (64) (Şekil 3). BM'deki bu değişikliklerin (disbiyozis); obezite, DM, NAFLD, ateroskleroz, allerjik hastalıklar, mide-bağırsak hastalıkları, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çeşitli klinik durumlar ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (1).



Şekil 3. Bağırsak mikrobiyotasının yaş ve bazı hastalıklar ile ilişkisi: BM doğumla birlikte başlayan, *Bifidobacteria*'ların baskın olduğu ve ilk iki üç yıl içinde dengeye ulaşan dinamik bir ekosistemdir. Hayat boyu artış göstermekte, erişkin yaşta *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* ailelerinin baskın olduğu en zengin forma ulaşmaktadır. Hayatın geç dönemlerinde çeşitliliği azalmaktadır. Yaşlılıkta, *Bacteroidetes*/*Firmicutes* oranı artmış, *Proteobacteria* miktarı artmış, *Bifidobacteria* miktarı azalmıştır. BM gelişiminde diyet önemli bir faktördür. Anne sütü ile beslenen bebeklerin mikrobiyotası, formül mama ile beslenenlere göre daha çeşitli ve zengindir. Kronik bağırsak hastalıkları ve antibiyotik kullanımı ile mikrobiyota farklılıkları oluşmaktadır. Malnutrisyon, *Bacteroidetes* miktarının azalmasına neden olmaktadır. Obezite ise *Firmicutes*/*Bacteroidetes* oranının artışı ile karakterizedir (64).

Obezite ve BM arasındaki ilişki ile ilgili yapılan ilk çalışmalar, bağırsak florası olmayan (*germ free*) hayvan deneyleridir. *Germ free* farelerin, normal farelerle kıyaslandığında, aynı diyet ile beslenmesine rağmen, aynı ağırlığı korumak için daha fazla kaloriye ihtiyaçlarının olduğu ve vücut yağ miktarının daha düşük olduğu saptanmıştır. *Germ free* fareler, normal bağırsak florası ile kolonize olduğunda VA ve yağ miktarında anlamlı oranda artış olduğu görülmüştür. Bu da bakteri kolonizasyonunun konağa, sindirilemeyen liflerden ek kalori sağladığını göstermektedir (65).

Bu çalışmalara ek olarak daha sonra; Cani ve ark.'nın (66) yaptığı çalışmada, kolonda bulunan gram-negatif bakterilerden köken alan lipopolisakkaritlerin (LPS), kronik sistemik inflamasyona neden olduğu, böylece İD ve obezite gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle yüksek yağlı diyetle beslenen kişilerde, dolaşımda LPS düzeyinin arttığı, BM bileşiminin (gr. negatif/gr. pozitif oranının), özellikle *Bifidobacteria* azalması yönünde değiştiği tespit edilmiştir. Endotoksin seviyelerindeki artış sonucu, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-6, plazminojen aktivatör inhibitörü) üretimi artmış ve bozulmuş glukoz toleransı sonucunda İD gelişmiştir (67).

Yapılan çalışmalarda, obez farelerde, *Firmicutes* oranının fazla, *Bacteroides* oranının daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu değişiklik geri dönüşümlü olup düşük kalorili diyet ile obez farelerin kilo verdiği ve *Bacteroides/Firmicutes* oranının azaldığı görülmüştür (67).

Obezlerde disbiyozis ilişkisi;

1. Obez hastalarda kullanılmayan enerji substratlarının (sindirilemeyen fiber ve polisakkaritler) fermente edilmesiyle ek bir enerji kaynağı olarak kısa zincirli yağlı asitleri (SCFAs), bütirat, asetat ve propiyonat üretimi olur. Böylece, besinlerden elde edilen enerji artmış olur,
2. SCFAs; ince bağırsak, kolon, yağ dokusu ve bağışıklık hücrelerinde ifade edilen iki G protein bağlı reseptörü (Gpr40 ve Gpr43) aktive ederek önemli bir adipojenik rol oynar. Artmış seviyeleri, bağırsak bariyer bütünlüğünü arttırırken, bağırsak hareketleri ve bağırsak geçiş süresini azaltarak SIBO'yu arttırabilir. SIBO hem obez çocuklarda hem de obez erişkinlerde yüksektir,
3. Normalde bağırsak epiteli, gram-negatif bakterilerden salınan endotoksin olan

LPS'nin translokasyonunu engelleyen bir bariyer görevi görür. Ancak bazı endojen ve eksojen faktörler bu fonksiyonu bozabilir. Geçirgenliğin artması sonucunda, plazma LPS'de artış olur, bu da inflamatuvar sitokinlerin artışına yol açar,

4. Lipoprotein lipaz inhibitörü olan *fasting induced adipose faktör*'ün (Fiaf) bağırsaktan ekspresyonunun azalması ile lipoprotein lipaz aktivitesinin artması sonucunda şilomikron ve VLDL içerisindeki TG açığa çıkar ve yağ dokusunda birikir (32, 62, 68).

Sonuç olarak; diyetle BM'nin değişmesi sonucu besinlerden elde edilen enerji miktarı, vücuda geçişi ve depolanması artar. Bunun yanında, bağırsak geçirgenliğinin artması sonucu; obeziteden sorumlu diğer bir faktör olan kronik düşük seviyeli bir inflamasyon gelişir. Tüm bu olaylar sonucu obeziteye ve diğer komplikasyonlara zemin hazırlanmış olur.

2.2.2. Bağırsak karaciğer eksenini

Bağırsak mikrobiyatındaki değişiklikler, yağlı karaciğer hastalığına sadece obezite riskini artırarak değil, direk olarak yakın komşuluk yoluyla karaciğeri etkileyerek de katkıda bulunmaktadır. Yapılan BM incelemelerinde obez ve NAFLD'si olan hastaların mikrobiyotalarında bazı farklılıklar bulunması da bunu desteklemektedir (69).

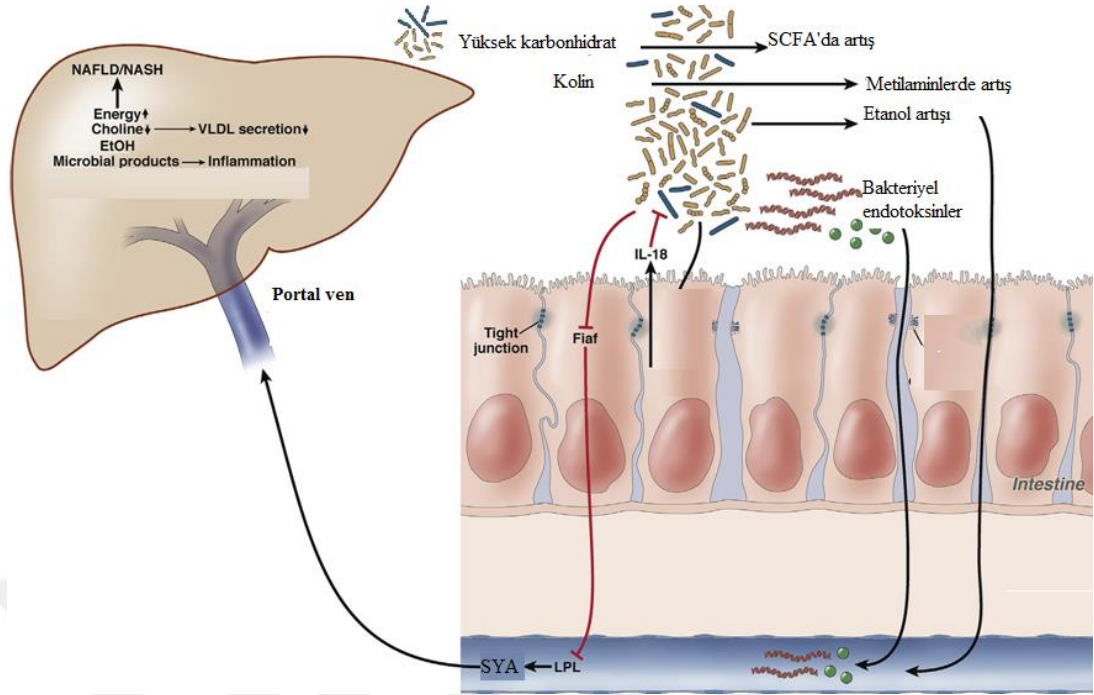
Bağırsak karaciğer eksenini, gastrointestinal sistem ve karaciğer arasındaki yakın anatomik ve fonksiyonel ilişkiyi ifade eder. İki organ arasındaki ilişki, sağlıklı ya da hasta karaciğere, BM ilişkili moleküllerin transferini içerir (70). Portal venin direk bağırsak çıkışlı olması nedeni ile, karaciğer kanının büyük kısmını bağırsaktan alır. Dolayısıyla karaciğer, bağırsak kaynaklı toksinler, bakteri ve bakteriyel ürünlere en fazla maruz kalan organdır (11).

Bağırsak bariyeri; luminal ve mukozal unsurlardan (örn: epitel hücreleri, mukozal bariyer, doğuştan ve kazanılmış immün bileşenler) oluşan karmaşık işlevsel bir birimdir. Bu bariyer, zararlı toksinler ve bakteriyel ürünler gibi enterik organizmalara karşı korunmada önemli bir rol oynar. En önemli luminal bariyer mukus tabakasıdır. Disbiyozis sonucu hem mukus tabakasının yoğunluğu hemde bariyer etkinliği değişmektedir. Mukozal bariyerleri de, enterositler arasındaki sıkı bağlantılar "*tight junctions*" (TJs) ve zonula adherens oluşturmaktadır. TJs, dörtlü ve

tek açıklı trasmembran proteinleri ile hücrelerin birbirine yapışmasına aracılık eder ve epitel hücreleri arasındaki boşluğu kapatır. Zararlı moleküllere engel olmak için; su, iyon ve çözünen moleküllerin geçişinde gözenek görevi görür (71).

Disbiyozis sonucu mukus yapısındaki değişiklikler ile beraber; TJs yapısındaki değişiklikler de, bağırsak geçirgenliğinde artışa yol açar. Böylece patojen bakteri ve bakteriyel ürünlerin portal sisteme translokasyonu gerçekleşir (32). Bakteriler, bakteriyel ürünler ve bağırsak florasından üretilen endotoksinler ve metabolitlerin (LPS, etanol, amonyak ve asetaldehit) karaciğere girişi ve metabolizması artar. Karaciğerde kupffer hücre aktivitesi ve sitokin üretimi uyarılır. Kupffer hücreleri üzerinden, hepatik inflamasyon uyarılır ve stellat hücreler aktive olur ve karaciğer hasarına yol açar (11, 32).

Bağırsak mikrobiyotasının NAFLD patogeneğinde önemli olan bir diğer bölümü ise değişmiş kolin metabolizmasıdır. Kolin suda çözünür temel bir besindir. Hücre zarı için önemli bir fosfolipid bileşen ve asetilkolin nörotransmitter için prekürsör moleküldür. Karaciğerdeki yağ asitlerinin VLDL'ye dönüşümünde ve karaciğerden lipid taşınmasında önemli rol oynar. Fosfatidilkolinin endojen kaynakları, epitel hücreleri ve bağırsak bakterileridir. Eksojen kaynakları ise süt ürünleri, balık, soya fasulyesi, fındık, et ve kepekli tahıllardır. Çalışmalarda; diyetle az miktarda kolin olmasının, karaciğerdeki yağlanmayı artırdığı belirtilmektedir. Yağlı diyet, değişen BM diyetle alınan kolinin trimetilaminlere dönüşümünü artırarak portal vendeki kolin miktarını azaltmaktadır. Böylece; VLDL oluşumu ve sekresyonu için gerekli olan fosfatidilkolin azalmakta ve hepatositlerde yağ birikimi gerçekleşmektedir (1). Ayrıca, disbiyozis ve artan bağırsak geçirgenliği, düşük dereceli inflamasyon ve etanol üreten bakterilerin artışı ile karaciğerde inflamasyon, yağ birikimine neden olmaktadır (69). BM ve disbiyozisin NAFLD gelişimindeki rolü Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Barsak mikrobiyotası ve disbiyozisin NAFLD gelişimindeki rolü: Yüksek yağlı diyet ile beslenme, disbiyozis ve SIBO ile sonuçlanarak SCFA artışına neden olmaktadır. Diyet ile alınan kolin, BM tarafından trimetilamine metabolize edilmekte ve kolin eksikliği ortaya çıkmaktadır. Karaciğere gelen kolin miktarının azalması sonucu, VLDL oluşumu azalmakta ve hepatositlerde yağ birikimi olmaktadır. Disbiyozis nedeni ile etanol üretimi olmakta ve karaciğer tarafından metabolize edilerek inflamasyonu artırmaktadır. Disbiyozis nedeni ile Fiaf baskılanarak, lipoprotein lipaz aktivitesi artmakta, SYA sentezine neden olarak karaciğerde yağ birikiminine neden olmaktadır. Tüm bu mekanizmalar ile karaciğerde gelişen inflamasyon, NAFLD gelişimine neden olmaktadır (72).

2.3. Probiyotikler

İlk olarak 1965 yılında Lily ve Stillwell tarafından tanımlanan probiyotik kelimesi, Latince “pro” ve “bios” kelimelerinden türetilmiştir ve “yaşam için” anlamına gelmektedir (73). Probiyotikler; yeterli miktarda alındığında, konağın mikroflorasını değiştirerek olumlu etki yapan, sindirilemeyen, kolona ulaşarak yaşama kapasitesi olan, patojen olmayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin, seçici olarak büyüme ve gelişmesini sağlayan, aktivitelerini artıran, sindirilemeyen gıda maddelerine ise “prebiyotik” adı verilir. İyi bilinen prebiyotik moleküller arasında; fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, inulin, soya fasülyesi oligosakkaritleri ve diyet liflerini oluşturan kompleks polisakkaritler sayılabilir. Sindirilemez olmasına rağmen, kolona ulaşarak, belirli probiyotik bakterilerin, özellikle *Bifidobacteria* türlerinin çoğalmasını artırır. Probiyotik ve prebiyotikleri, birlikte ve belli bir sinerji gerektirmeden içeren ürünler “simbiyotik”

lerdir (60).

2.3.1. Probiyotiklerin Özellikleri

Probiyotik mikroorganizmalar tipik olarak; *Lactobacillus* (*Firmicutes* ailesinden), *Bifidobacterium* (*Actinobacteria* ailesinden) ve *Streptococcus* üyeleridir. Bu bakteriler; farklı şekillerde olan, hareketli olmayan, laktik asit üreten, fermentatif, zorunlu veya fakültatif anaerob organizmalardır. Bu özellikleriyle, insan sindirim sisteminde, potansiyel patojen mikroorganizmalar üzerinde hakimiyet sağlamaktadırlar. Butirat gibi; konağın biyolojik fonksiyonlarında olumlu düzenlemeler sağlayan, SCFA içeren, metabolik yan ürünler ürettikleri var sayılmaktadır. Bu metabolik yan ürünler, bazen "postbiyotik" olarak adlandırılır ve bağışıklık düzenleyici olarak biyolojik işlev görebilirler. Bugüne kadar, en çok çalışılan probiyotik bakteriler arasında *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* ve *Streptococcus thermophilus* bulunmaktadır. *Saccharomyces boulardii* gibi, bazı maya ve maya yan ürünleri de probiyotik madde olarak kullanılmaktadır. Bu bakterilerin özellikleri; *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Proteus* türleri gibi, zararlı bakterilerin biyolojik özelliklerinden farklıdır. *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Proteus* türleri, gram-negatif, hareketli olmayan, laktik asit üretmeyen bakterilerdir. İntestinal epitel boyunca translokasyon ile insanlarda hastalığa neden olabilir. Probiyotik bakteriler, tedavi edici veya gıda takviyesi olarak, tek ya da fonksiyonel gıdalarla karışmış şekilde alınabilir (60).

2.3.2. Probiyotiklerin Etkileri

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilmesi için; insan kaynaklı olması, patojenik olmaması, bağırsak bariyerini geçmemesi, diğer patojen mikroorganizmaların yapışmasını önlerken, mukusa iyi yapışma yeteneğine sahip olması ve genel olarak bağışıklık sistemi ve insan sağlığı için yararlı olması gerekmektedir (74). Probiyotikler;

1. Patojen mikroorganizmaların mukozal adezyonlarını, beslenmelerini önler ve bağırsak bariyer sistemini güçlendirir,
2. Antitoksin üretir, salgısal IgA salınımını, fagositozu ve B lenfosit yapımını arttırarak bağışıklık sisteminin fonksiyonlarını güçlendirir,

3. Peptidlere karşı duyarlılığı azaltarak, allerjik hastalıkları önler,
4. Lipid emilimini engeller, lipid sentezini azaltır ve kolesterolü metabolize ederek kandaki lipid düzeyini düşürür,
5. Bağırsak epiteline tutunarak bağırsak ile ilişkili lenfoid doku ile etkileşime geçer ve konağın bağışıklık sistemini uyarır,
6. Laktazı aktive ederek laktoz sindirimini artırır (60, 75).

Probiyotiklerin ürettikleri en güçlü antimikrobiyal maddeler bakteriosinlerdir. Ürettikleri diğer maddelerle birlikte, sistemik, lenf ve kan dolaşımına karışarak bağışıklık sisteminin düzenlenmesine yardımcı olurlar. Bunun sonucunda vücutta proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 beta, IL-6, TNF- α , interferon gama, IL-12 azalırken, antiinflamatuvar özellikteki IL-10, doku büyüme faktörü-beta artar (60, 75, 76). Tüm bu etkileri nedeni ile birçok alanda kullanılmaktadır. Probiyotiklerin kullanım alanları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Sonuç olarak; anatomik ilişkisi nedeni ile, bağırsak kaynaklı toksinlere ve bakteriyel ürünlere en fazla maruz kalan organ karaciğerdir. Probiyotikler, daha ilk aşamada patojen bağırsak bakterilerinin mukozal epitele yapışmaları ve beslenmelerinin önleyerek karaciğere yararlı etkiler sağlayabilir. İnflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını sağlayarak antiinflamatuvar özellik gösterirler. Aynı zamanda, lipid emilimini engelleyip, lipid sentezini azaltarak ve kolesterolü metabolize ederek, kandaki lipid düzeyini de düşürürler (77). Probiyotiklerin tüm bu yararlı etkilerinden dolayı NAFLD tedavisinde etkili olacağına, probiyotik desteği ile karaciğerdeki yağlanmanın azalacağına inanmaktayız. Bu amaçla, NAFLD'si olan obez çocuklarda prospektif uzun süreli probiyotik kullanımının etkisini gözlemek amacı ile bu çalışmayı planlamış bulunmaktayız.

Tablo 5. Probiyotik kullanımının kanıt düzeyi ‘A’ seviyede olduğu klinik durumlar (78).

Klinik Durum	Kullanılan Mikroorganizma
Enfeksiyöz ishal tedavisi	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>
Antibiyotik ilişkili ishalin önlenmesi	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
İnflamatuvar bağırsak hastalığı-poşit önlenmesi ve remisyonun sürdürülmesi	VSL#3®
Ülseratif kolit idame tedavisi	VSL#3®, <i>Escherichia coli</i>
İnek sütü ilişkili atopik egzema tedavisi	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>
İnek sütü ilişkili atopik egzemanın önlenmesi	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>
İmmun yanıt düzenlenmesi	<i>L. rhamnosus GG</i> , <i>L. acidophilus</i> LAFT1, <i>L. plantarum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>L. johnsonii</i>
Hepatik ensefalopati	VSL#3®

VSL#3®: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* birleşimi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

3.1.1 Hasta Grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Gastroenteroloji Polikliniğine, Ocak 2015 ile Kasım 2015 tarihleri arasında başvuran; 7-17 yaş arası, NAFLD tanısı alan, VKİ 95. persentil üzerinde olan 30 hasta dahil edildi. Kontrole gelmeyen iki hasta çalışma dışı bırakılarak çalışma 28 hasta ile tamamlandı. NAFLD tanısı hepatobilier USG'de karaciğer yağlanması gösterilmesi ile konuldu.

Hastalar belirlenirken karaciğerde yağlanmaya neden olabilecek;

1. Viral hepatit, Wilson hastalığı gibi hastalıkları olan,
2. Diyabet, hipotiroidi, çölyak gibi sistemik hastalıkları olan,
3. Karaciğerde yağlanmaya yol açabilecek ilaç kullanımı olan (kortikosteroid, anabolizanlar, seks steroidler vb),
4. Hormonal bozuklukları olan (cushing hastalığı vb),
5. Metabolik hastalığı olan,
6. Alkol kullanım öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmadı.

3.1.2 Kontrol Grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı sağlam çocuk polikliniğine Ocak 2015 ile Kasım 2015 tarihleri arasında başvuran; bilinen sistemik hastalık, obezite ve ilaç kullanım öyküsü olmayan sağlıklı çocuklar arasından yaş ve cinsiyet eşleştirmesi yapılarak 30 çocuk seçildi.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, antropometrik ölçümlerden boy, kilo, VKİ ve bunların persentil değerleri, VKİ z-skoru; AN varlığı ve vücut yağ oranları kaydedildi.

Boy ve VA persentilleri belirlenmesinde Türk çocukları için hazırlanmış yaşa ve cinse uygun büyüme eğrileri ile kullanıldı (79). VKİ, VA/boy^2 (kg/m^2) formülü ile hesaplandı. Elde edilen değerler yaşa ve cinse uygun VKİ eğrileri ile kıyaslandı.

VKİ, 95. persentil üzerinde olan hastalar obez olarak kabul edildi. VKİ z-skorları hesaplandı (80).

Karaciğer yağlanması USG ile belirlenen hastaların, vücut yağ ölçümü, çocuk gastroenteroloji polikliniğinde TANITA TBF-300 model Body Composition Analyzer (Illinois-ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü. Hepatobilier USG'leri, radyoloji kliniğinde, tek hekim tarafından yapıldı. Ultrasonda Toshiba Aplio TUS-A500 modeli cihaz ve 6C1 konveks prob (Zoetermeer, Hollanda) kullanıldı. Yağlanma derecesi 0-1-2-3 olarak belirlendi.

Hastalardan başvuru anında açlık kan şekeri (AKŞ), eş zamanlı insülin düzeyi, total kolesterol, TG, LDL, HDL, ALT, AST, GGT, CRP, etanol, TNF- α , zonulin, CK-18, toplam oksidan durum "*total oxidant status*" (TOS) ve toplam antioksidan durum "*total antioxidant status*" (TAS) düzeyleri tayin edildi. Dışarıdan gelen kitlerin çalışılması için yaklaşık 8 ml kan alındı. Alınan numuneler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldıktan sonra, çalışılincaya kadar Biyokimya Araştırma Laboratuvarında -80 °C de dondurularak uygun koşullarda saklandı. Dışkıda kalprotektin düzeyi çalışılması için hastalardan dışkı örneği alındı ve Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında -20 °C de saklandı.

Alanin transaminaz için 45 U/L ve üzerindeki değerler yüksek kabul edildi. İD'nin değerlendirilmesi amacıyla, açlık serum glukoz ve eş zamanlı insülin değerleri ile HOMA-IR hesaplandı. HOMA-IR: glukoz (mg/dl) x insülin (μ U/ml)/ 405 formülü kullanıldı. Bu değer 2.5 ve üzerinde olması İD açısından anlamlı kabul edildi (81).

Hastalara diyet ve fizik aktivitenin arttırılmasının yanı sıra günde bir adet probiyotik (Maflor plus kapsül®) verildi. İçeriğinde; *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* türlerinde toplam 7×10^9 CFU (7 Milyar CFU) aktif probiyotik ve Hindiba inülini 100 mg mevcuttu.

Hastaların diyetleri, aldığı kaloriden %10 oranında azaltılarak; enerjinin %30'u yağlardan, %15'i proteinlerden, %55'i karbonhidratlardan sağlanacak şekilde yaşına uygun olarak düzenlendi. Fiziksel aktivitenin arttırılması adına günlük normal aktivitelerine ek olarak, günlük 45 dakika orta seviyeli egzersiz (üç gün) yapılması veya orta tempolu yürüyüşte 10000 adım atılması önerildi (54).

Hastalar toplam dört ay, tek hekim tarafından yakın olarak izlendi. Dördüncü

ayın sonunda tekrar değerlendirildi. Antropometrik ölçümleri, biyokimyasal parametrelerinden, AKŞ, eş zamanlı insülin düzeyi, total kolesterol, TG, LDL, HDL, ALT, AST, GGT, CRP ve etanol düzeyleri tekrar ölçüldü. Aynı zamanda hastalardan serum TNF- α , CK-18, zonulin, TAS ve TOS düzeyi ile dışkıda kalprotektin düzeyi de tekrarlandı. Vücut yağ ölçümü ve hepatobilier USG değerlendirmesi yeniden yapıldı. Takiplerde yağlanmanın azalması; "USG'ye göre yağlanma derecesinin önceki USG bulgusuna göre ≥ 1 derece azalması" olarak kabul edildi.

Çalışmada kullanılan klinik bulgular ile laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ve amaçları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan klinik bulgular ile laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ve amaçları

Amaç	Tetkik
Antropometri	VA, VKİ, Vücut yağ oranı
Karaciğer yağlanma, inflamasyon ve fibrozis göstergeleri	USG, Serum ALT, AST, GGT, CK-18
Sistemik inflamasyon	Serum CRP, TNF- α
Metabolik durum	Etanol, Serum Kolesterol, TG, LDL, HDL, AKŞ, İnsülin, HOMA-IR, AN
Oksidatif stres	Serum TAS, TOS, OSİ
Bağırsak geçirgenliği	Serum Zonulin
Bağırsak inflamasyonu	Dışkıda Kalprotektin

Çalışma için etik kurul onayı Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'nın 09.12.2014 tarih 2014/97 nolu etik kurul raporu sonucu alındı. Gerekli kitlerin harcama giderleri TTU-2015-5231 numaralı proje kapsamında Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından sağlandı. Hasta ve kontrol grubundaki çocuklara ve ailelerine çalışma protokolü anlatılarak, aydınlatılmış onam formu imzalatıldı.

Serum örneklerindeki CK-18 (M30) seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA 'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay'kit ("Human Cytokeratin 18-M30 (CK 18-M30) ELISA Kit", Sun Red®, Cat

No: 201-12-1611, Şanghay, Çin) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbanları mikroyu okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar ng/mL cinsinden verildi. Serum örneklerindeki TNF- α seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA kit (DIA Source®, Cat No: KAP 1751, Louvain-La-Neuve, Belçika) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbanları mikroyu okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, Kaliforniya, ABD) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar pg/mL cinsinden verildi. Serum örneklerindeki zonulin seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA kit (Cusabio®, Cat No: CSB-EQ027649HU, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbanları mikroyu okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, Kaliforniya, ABD) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar ng/mL cinsinden verildi. Serum örneklerindeki TOS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics®, Cat No: RL0024, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Total oksidan durum tayini; farklı oksidan türlerinin Fe⁺²'nin Fe⁺³'e yükseltgemesine, oluşan Fe⁺³'ün kromojen ile renkli bir kompleks oluşturmasına ve oluşan bu kompleksin spektrofotometrik olarak 530 nm'de ölçümüne dayanmaktadır. Elde edilen veriler standart ile oranlanarak numunedeki total oksidan kapasite $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L biriminden bulunur. Serum örneklerindeki TAS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics®, Cat No: RL0017, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Total antioksidan durum tayini; serumda bulunan antioksidanların koyu yeşil-mavi renkli ABTS reaktifini renksiz hale indirgemesi esasına dayanır. Absorbanstaki değişim 660 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir ve elde edilen veriler standart ile oranlanarak, numunedeki total antioksidan kapasite mmol Trolox Equiv/L biriminden bulunur. Serum örneklerindeki OSI seviyeleri; $\text{OSI} = \frac{(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L})}{(\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox equivalent/L})} \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı (82). Dışkıda kalprotektin ölçümü için toplanan örnekler, çalışılana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Çalışma zamanı örnekler -20°C den çıkartılıp oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı. Çözünme işlemi sonrası dışkı örneklerindeki kalprotektin seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELISA kiti

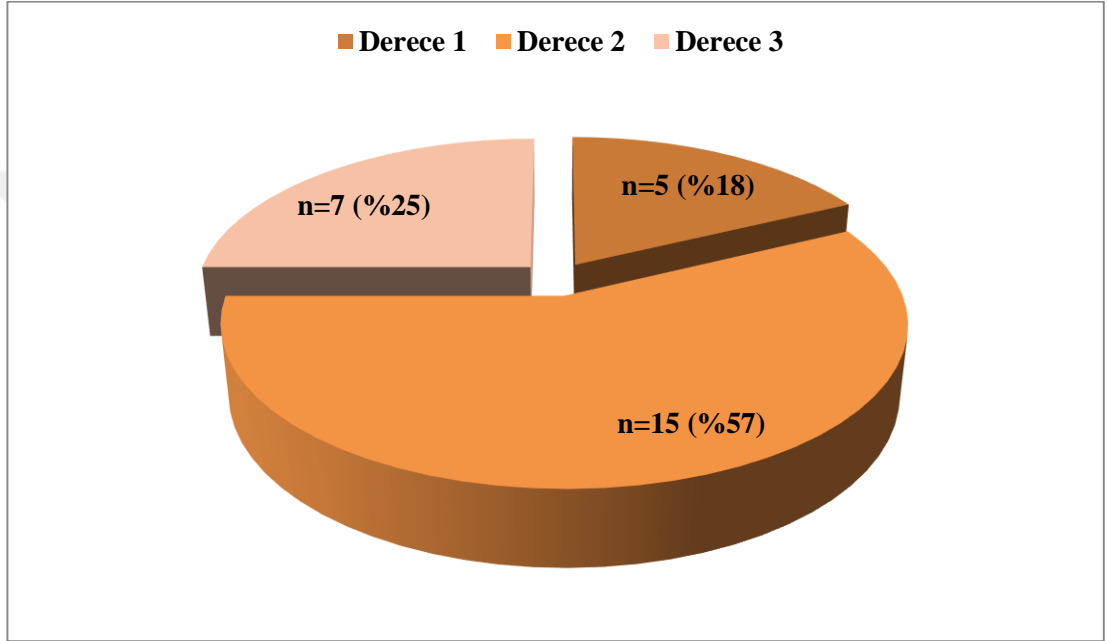
(IDK® Calprotectin ELISA, Cat No:K 6927, Bensheim, Almanya) kullanılarak belirlendi. Süre sonunda 100'er µL stop solüsyonu ilave edildikten sonra kuyucukların optik dansiteleri (OD) RT-6000 plak okuyucu ile (Rayto Ltd., Shenzhen, Çin) 450/620 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar ng/mL cinsinden ifade edildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS, IBM, 23. sürüm, (Chicago, ABD) kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler, ortalama \pm standart sapma (ort. \pm SD) olarak ifade edildi. Veri setindeki sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğunu ölçmek için küçük örneklemelerde daha iyi sonuçlar veren '*Shapiro-Wilk*' testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren bağımlı sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında 'bağımlı gruplar için *t* testi', bağımsız sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında 'bağımsız gruplar için *t* testi' kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen bağımlı sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında '*Wilcoxon*' işaretli sıra testi, bağımsız sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında '*Mann Whitney U*' testi kullanıldı. Ayrıca sürekli değişkenler arasındaki ilişki '*Spearman*' sıra korelasyon testi ile incelendi. Elde edilen *p* değerinin 0.05'in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya, ortalama yaşları 12.2 ± 2.2 yıl olan, 18'i (%64.3) erkek, 10'u (%35.7) kız olmak üzere toplam 28 yağlı karaciğer hastası dahil edildi. Hastaların tedavi öncesinde, USG'ye göre beşinde (%17.9) birinci derece, 16'sında (%57.1) ikinci derece ve yedisinde (%25.0) üçüncü derece yağlanma mevcuttu (Şekil 5).



Şekil 5. Hastaların tanı anında ultrasonografiye göre yağlanma dereceleri: Beş (%17.9) hastada birinci derece, 16 (%57.1) hastada ikinci derece ve yedi (%25.0) hastada üçüncü derece yağlanma vardı.

Hasta ve kontrol gruplarının demografik ve antropometrik özellikleri karşılaştırıldığında, beklendiği gibi, hasta grubunun vücut ağırlığı, VKİ, VKİ z-skoru ve vücut yağ oranlarının fazlalığı istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$). Yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). NAFLD'si olan 19 (%67.9) hastada AN izlendi (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve klinik bulguları

	Hasta Grubu (n=28)	Kontrol Grubu (n=30)	p değeri
Demografik özellikler			
Yaş (ort.±SD), yıl	12.2±2.2	12.2±2.2	0.95
Cinsiyet			
Kız, n (%)	10 (35.7)	10 (33.3)	0.95
Erkek, n (%)	18 (64.2)	20 (66.6)	0.92
Antropometrik özellikler			
VA (ort.±SD), kg	74.09±20.96	43.46±11.27	0.001
VKİ (ort.±SD), kg/m ²	30.27±5.97	19.17±2.16	0.001
VKİ z-skoru (ort.±SD)	2.09±0.37	0.41±0.40	0.001
Vücut Yağ Oranı (ort.±SD), %	34.17±6.33	16.77±2.95	0.001
Klinik bulgular			
AN varlığı, n (%)	19 (67.9)	—	

Hasta ve kontrol grubu laboratuvar bulguları karşılaştırıldığında; ALT, AST, kolesterol, LDL, VLDL, TG ve HOMA-IR değerleri hasta grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (tüm parametreler için p<0.05). Hastaların HOMA-IR sonucunda, 19'unda (%67.9) İD izlendi (Tablo 8).

Tablo 8. Hasta ve kontrol gruplarının laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

Laboratuvar bulguları	Hasta Grubu (n=28)	Kontrol Grubu (n=30)	p değeri
ALT (ort.±SD), U/L	56.31±39.82	23.13±5.45	0.001
AST (ort.±SD), U/L	45.04±22.98	18.30±4.66	0.001
AKŞ (ort.±SD), mg/dl	84.93±10.36	85.63±6.67	0.54
Kolesterol (ort.±SD), mg/dl	173.75±26.80	139.03±15.50	0.001
LDL (ort.±SD), mg/dl	101.46±24.55	82.20±12.79	0.005
HDL (ort.±SD), mg/dl	43.75±7.04	44.33±5.67	0.45
VLDL (ort.±SD), mg/dl	28.60±13.86	12.50±3.40	0.001
TG (ort.±SD), mg/dl	143.18±67.59	89.40±11.52	0.001
HOMA-IR	5.06±4.52	1.06±0.24	0.001
İD varlığı, n (%)	19 (67.9)	—	

Hastaların tedavi öncesi, kan etanol düzeyi, TNF- α ve dışkıda kalprotektin düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti (sırasıyla 4.93±3.95 mg/dl'ye 0.60±0.81 mg/dl, p=0.001, 9.92±7.48 pg/ml'ye 6.18±4.68 pg/ml, p=0.03 ve

14.65±18.44 ng/ml'ye 7.21±0.88 ng/ml, p=0.01). Fibrozis belirteci olan CK-18 seviyesi ile oksidatif stres belirteçleri olan TAS, TOS, OSİ ve bağırsak geçirgenliği belirteci olan zonulin düzeyleri arasında hasta ve kontrol grubunda fark bulunmadı (Tablo 9).

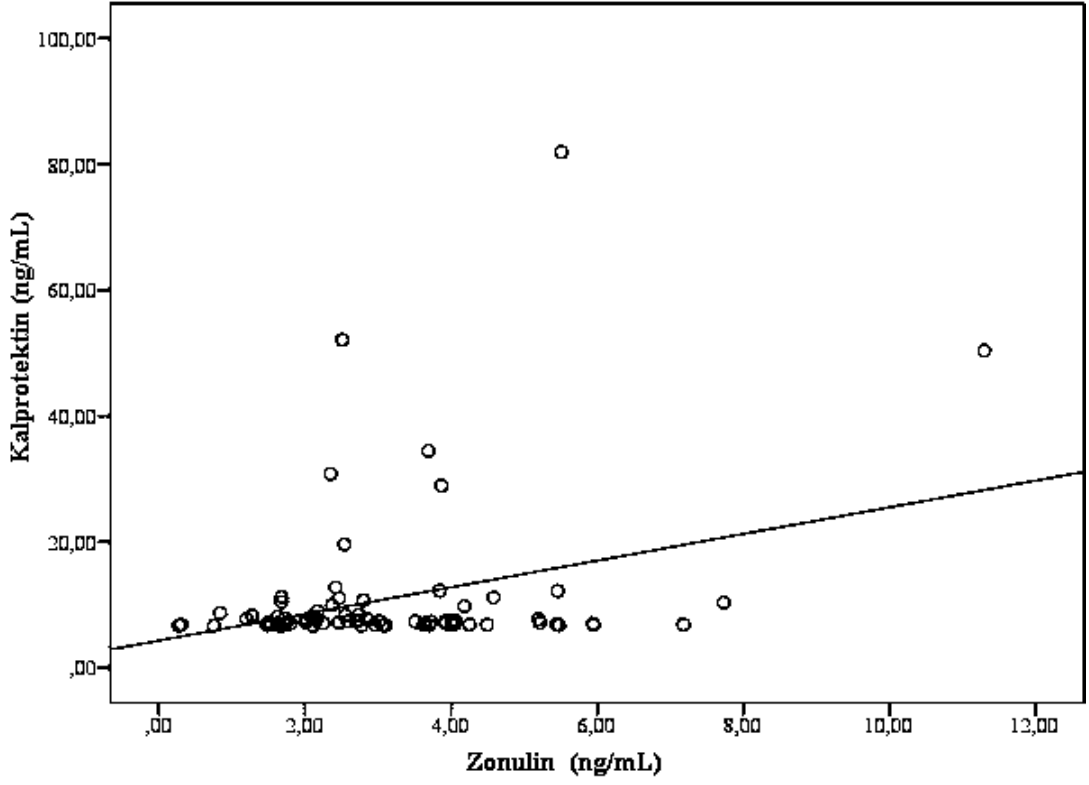
Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarının diğer laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

Laboratuvar bulguları	Hasta grubu (ort.±SD, n=28)	Kontrol Grubu (ort.±SD, n=30)	p değeri
Etanol (mg/dl)	4.93±3.95	0.60±0.81	0.001
TNF-α (pg/ml)	9.92±7.48	6.18±4.63	0.03
CK-18 (ng/ml)	34.64±22.14	33.02±22.29	0.77
TAS (mmol trolox Eq/L)	1.43±0.35	1.49±0.42	0.52
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	15.14±27.81	9.59±12.01	0.61
OSİ	1118±2229	964±1551	0.26
Zonulin (ng/ml)	3.32±2.22	2.51±1.09	0.21
Kalprotektin (ng/ml)	14.65±18.44	7.21±0.88	0.01

Yapılan korelasyon çalışmalarında, hasta ve kontrol grubunda (n=58), VKİ ile vücut yağ oranı (p=0.001, r=0.812), USG yağlanma derecesi (p=0.003, r=0.383), kolesterol düzeyi (p=0.004, r=0.304), VLDL düzeyi (p=0.005, r=0.295), HOMA-IR değeri (p=0.001, r=0.383), etanol düzeyi (p=0.008, r=0.279) ve OSİ değerleri (p=0.047, r=0.214) arasında pozitif korelasyon saptandı.

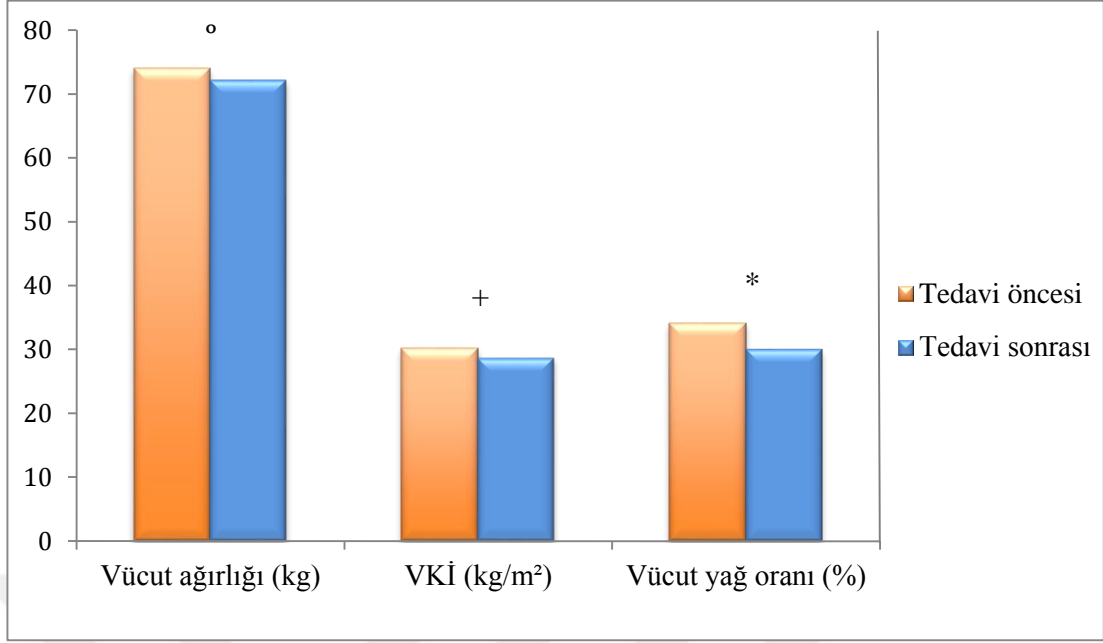
USG yağlanma derecesi ile ALT (p=0.032, r=0.282), etanol (p=0.007, r=0.348) ve TNF-α (p=0.026, r=0.298) düzeyleri arasında pozitif korelasyon mevcuttu.

Dışkı kalprotektin ve serum zonulin düzeyi arasında da pozitif korelasyon saptandı (p=0.003, r=0.324) (Şekil 6).



Şekil 6. Dışkı kalprotektin ve serum zonulin düzeyi arasındaki korelasyon eğrisi grafiği (p=0.003, r=0.324).

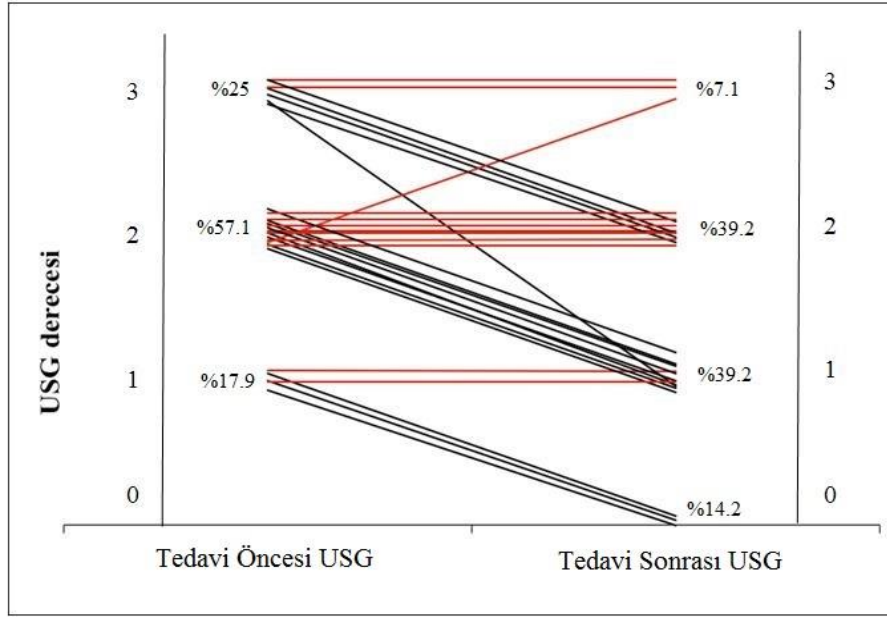
Hastalara, dört ay boyunca *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* türlerinde toplam 7×10^9 CFU (7 Milyar CFU) aktif probiyotik ve Hindiba inülini 100 mg içeren, probiyotik (Maflor plus kapsül®) günde bir defa, bir adet verildi. Tedavi öncesi hastaların ort. \pm SD vücut ağırlıkları 74.09 ± 20.96 kg iken tedavi sonrasında 72.19 ± 19.23 kg'a gerilediği (p=0.007), vücut yağ oranlarının da tedavi sonrası belirgin olarak azaldığı izlendi (%34.17 \pm 6.33'e %30.13 \pm 7.09, p=0.001). Yine hastaların tedavi sonrasında VKİ ve VKİ z-skorunun anlamlı derece azaldığı görüldü (30.27 ± 5.97 kg, 28.73 ± 5.47 kg, p=0.001, 2.09 ± 0.37 , 1.97 ± 0.42 , p=0.001). Hastaların tedavi öncesi ve sonrası antropometrik ölçümlerinin karşılaştırılması Şekil 7'de gösterildi.



Şekil 7. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası antropometrik ölçümlerinin karşılaştırılması ($p^o=0.007$, $p^+=0.001$, $p^*=0.001$).

Tedavi sonrasında, birinci derece yağlanması olan beş hastanın dördünde yağlanma kaybolurken, ikinci derece yağlanması olan 16 hastadan, dokuzunda yağlanma derecesinin birinci dereceye gerilediği görüldü. Üçüncü derece yağlanması olan yedi hastanın, beşinde ikinci dereceye, birinde de birinci dereceye gerileme gözlemlendi. Böylece tedavi sonrasında toplamda 11 hastada (%39.2) birinci derece, 11 hastada (%39.2) ikinci derece ve iki hastada (%7.1) üçüncü derece yağlanma izlendi. Toplam 19 (%67.8) hastanın yağlanma derecesinde azalma tespit edildi. Hastaların tedavi öncesi ort. \pm SD USG derecesi 2.07 ± 0.66 iken, tedavi sonrası 1.39 ± 0.83 idi ($p=0.001$). Tedavi öncesi ve sonrası USG'e göre yağlanma derecelerinin karşılaştırılması Şekil 8'de gösterildi.

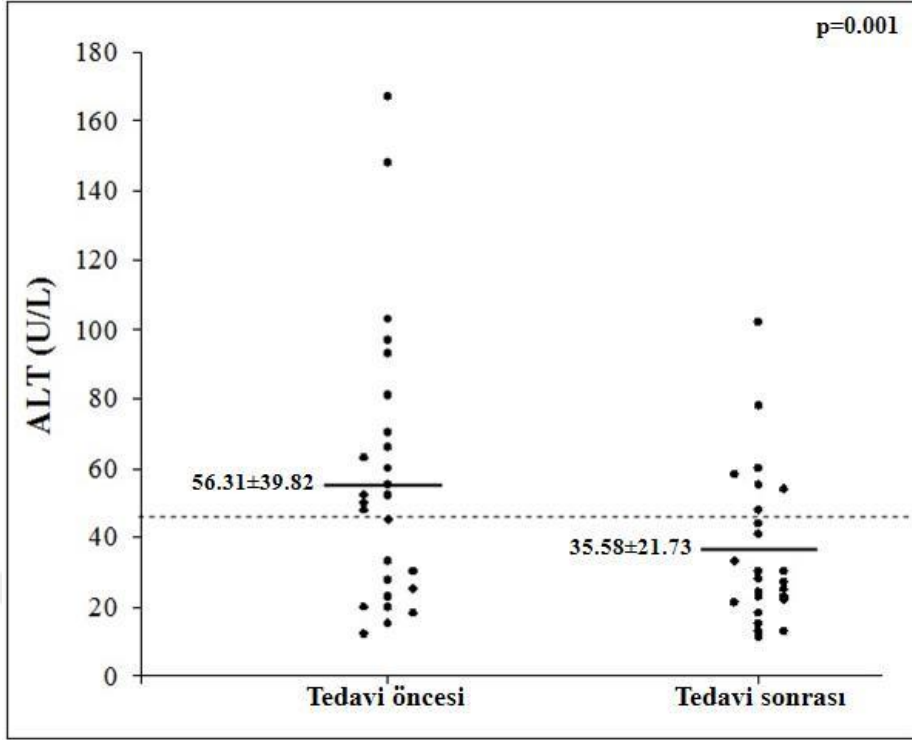
Hastaların tedavi sonrası tedavi öncesine göre ALT, AST, kolesterol, LDL, CRP, etanol ve TNF- α değerlerinde anlamlı düşüş ve TAS değerinde anlamlı artış izlendi (tüm parametreler için $p<0.05$). Diğer parametreler için anlamlı farklılık yoktu (Tablo 10). Tedavi öncesi ve sonrası ALT ve etanol değerlerinin karşılaştırılması Şekil 9 ve 10'da gösterildi.



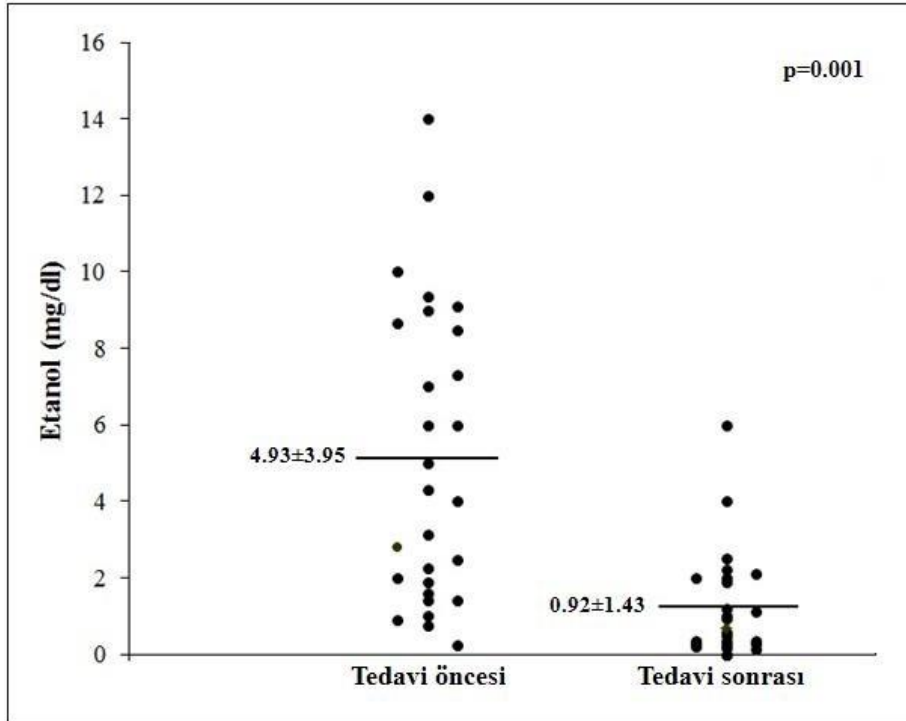
Şekil 8. Tedavi öncesi ve sonrası ultrasonografiye göre yağlanma derecelerinin karşılaştırılması (p=0.001) (siyah çizgiler yağlanması azalan hastaları, kırmızı çizgiler ise yağlanması değişmeyen hastaları göstermektedir).

Tablo 10. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

Laboratuvar bulguları	Tedavi öncesi (ort.±SD)	Tedavi sonrası (ort.±SD)	p değeri
ALT (U/L)	56.31±39.82	35.58±21.73	0.001
AST (U/L)	45.04±22.98	41.46±37.95	0.02
GGT (U/L)	30.11±14.18	29.96±27.63	0.16
TG (mg/dl)	143.18±67.59	129.50±69.59	0.24
Kolesterol (mg/dl)	173.75±26.79	161.64±26.93	0.005
LDL (mg/dl)	101.46±24.55	89.60±20.14	0.005
HDL (mg/dl)	43.75±7.04	45.53±9.19	0.09
VLDL (mg/dl)	28.60±13.86	26.50±14.45	0.33
AKŞ (mg/dl)	84.93±10.30	85.50±7.52	0.47
HOMA-IR	4.59±3.84	4.16±3.24	0.99
CRP (mg/dl)	0.51±0.44	0.39±0.38	0.003
ESH (mm/saat)	12.96±8.46	11.89±11.1	0.27
Etanol (mg/dl)	4.93±3.95	0.92±1.43	0.001
TNF-α (pg/mL)	9.03±6.46	8.46±7.44	0.01
CK-18 (ng/mL)	34.64±22.14	36.42±23.88	0.92
TAS (mmol trolox Eq/L)	1.43±0.35	1.84±0.43	0.02
TOS (µmol H ₂ O ₂ Eq/L)	15.14±27.81	15.27±28.18	0.90
OSİ	780.48±1261.37	586.08±854.55	0.55
Zonulin (ng/mL)	3.32±2.22	3.44±1.63	0.50
Kalprotektin (ng/mL)	14.83±18.81	7.95±1.5	0.104



Şekil 9. Tedavi öncesi ve sonrası serum alanin transaminaz değerlerinin karşılaştırılması: Tedavi öncesi ort.±SD 56.31±39.82 U/L olan ALT değerinin, tedavi sonrasında 35.58±21.73 U/L'e düştüğü gözlemlendi (p=0.001).



Şekil 10. Tedavi öncesi ve sonrası serum etanol değerlerinin karşılaştırılması: Tedavi öncesi ort.±SD etanol düzeyi 4.93±3.95 mg/dl iken tedavi sonrasında 0.92±1.43 mg/dl'e düştüğü gözlemlendi (p=0.001).

Ultrasona göre yağlanma derecesi azalan (n=19) ve azalmayan (n=9) hastalar karşılaştırıldığında, yağlanması azalan grupta, tedavi öncesine göre tedavi sonrasında, USG yağlanma derecesi, VA, VKİ, VKİ z-skorunun, vücut yağ oranının ve CRP, AST, ALT, kolesterol, LDL, TNF- α , kalprotektin değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı; yağlanması azalmayan grupta ise VA'nın arttığı ve diğer grupla benzer şekilde etanol değerinin azaldığı, TAS değerinin ise arttığı gözlemlendi (tüm parametreler için $p<0.05$). Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların başlangıç değerleri arasında fark bulunmadı. Yağlanma derecesi azalan ve azalmayan hastaların tedavi öncesi ve sonrası klinik ve laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11. Yağlanma derecesi azalan ve azalmayan hastaların tedavi öncesi ve sonrası klinik ve laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

	Yağlanması azalan (n=19)			Yağlanması azalmayan (n=9)			p ^x değeri
	Tedavi öncesi (ort.±SD)	Tedavi sonrası (ort.±SD)	p değeri	Tedavi öncesi (ort.±SD)	Tedavi sonrası (ort.±SD)	p değeri	
USG	2.11±0.73	1.05±0.70	0.001	2.00±0.70	1.56±1.01	0.10	0.65
VA (kg)	74.82±23.00	72.04±21.29	0.004	62.66±9.01	64.77±9.66	0.012	0.78
VKİ (kg/m ²)	30.55±6.60	28.65±6.15	0.001	27.50±2.51	27.37±2.64	0.624	0.84
VKİ z-skoru	2.11±0.39	1.93±0.47	0.001	1.91±0.34	1.91±0.35	0.623	0.94
Vücut Yağ Oranı (%)	35.52±6.22	29.82±7.61	0.001	32.43±5.51	30.67±5.88	0.066	0.62
CRP (mg/dl)	0.58±0.52	0.41±0.44	0.003	0.43±0.17	0.41±0.28	0.37	0.60
AST (U/L)	39.21±17.39	30.42±10.41	0.008	51.56±24.95	67.89±59.53	0.77	0.11
ALT (U/L)	50.63±37.36	31.79±17.95	0.004	58.71±26.35	52.86±30.65	0.090	0.06
Kolesterol (mg/dl)	174.36±28.42	157.36±27.27	0.002	169.11±22.54	161.88±22.13	0.26	0.60
TG (mg/dl)	139.79±67.15	141.31±79.45	0.84	150.78±92.74	86.67±13.5	0.59	0.64
LDL (mg/dl)	102.78±22.69	84.68±20.05	0.001	64.22±27.89	89.66±13.94	0.59	0.96
AKŞ (mg/dl)	85.37±11.95	86.52±7.74	0.49	83.89±6.97	84.66±7.12	0.40	0.96
HOMA-IR	4.08±3.52	4.38±2.77	0.6	4.86±4.70	3.84±1.86	0.59	0.47
Etanol (mg/dl)	5.32±4.00	0.94±1.47	0.001	5.89±4.01	1.11±1.36	0.008	0.50
TNF-α (pg/mL)	9.66±7.18	5.55±3.06	0.026	10.99±9.20	10.87±10.88	0.16	0.95
CK-18 (ng/mL)	36.07±25.30	38.31±26.89	0.94	30.00±15.93	24.48±12.08	0.44	0.71
TAS (mmol trolox Eq/L)	1.44±0.39	1.81±0.38	0.003	1.28±0.32	2.02±0.48	0.015	0.78
TOS (µmol H ₂ O ₂ Eq/L)	15.29±30.66	19.22±33.25	0.5	23.77±41.88	29.04±42.79	0.51	0.47
OSİ	649±1078	1275±1896	0.98	863±1457	833±915	0.77	0.68
Zonulin (ng/mL)	3.29±2.58	3.58±1.72	0.32	2.57±1.45	2.97±1.28	0.40	0.22
Kalprotektin (ng/mL)	18.59 ±22.29	7.96±1.25	0.017	7.71±1.22	8.77±4.39	0.77	0.22

p^x: Yağlanması azalan ve azalmayan hastaların tedavi öncesi değerlerinin karşılaştırması

5. TARTIŞMA

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığında probiyotik tedavisinin etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmanın sonucunda; (i) hastaların tedavi sonrası ultrasonografik olarak %67.8'inin yağlanmasında azalma gözlemlendi, (ii) USG'e göre yağlanma azalmasıyla beraber hastaların büyük kısmında antropometrik ölçümlerinde (VA, VKİ, VKİ z-skoru) azalma gözlemlendi, (iii) yine tedavi sonucunda laboratuvar parametrelerinden ALT, AST, kolesterol, LDL, CRP, etanol, TNF- α değerlerinde azalma ve TAS değerlerinde artış saptandı. Bu bulgular eşliğinde; probiyotiklerin NAFLD'si olan çocuklarda tedavide etkin biçimde kullanılabileceği ve probiyotiklerin etkisini, özellikle inflamasyonu azaltarak (TNF- α , CRP ve dışkı kalprotektin gibi) gösterdiği, bunun yanında kan etanol seviyesini dışürmesi ve antioksidan kapasiteyi artırmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Daha önce yapılmış birçok çalışmada gösterildiği gibi; dislipidemi, İD ve inflamasyon NAFLD patogenezindeki en önemli parametrelerdir (4). Hatta NAFLD'nin düşük derecede kronik inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmesinde, artmış inflamatuvar sitokinlerin hastalığın hem birinci, hem ikinci hem de daha sonraki basamaklarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (1). Farklı olarak da, çalışmamızda kan etanol seviyesinin NAFLD'li çocuklarda yüksek olduğunu saptadık. NAFLD'li hastalarda kan etanol seviyesi ile ilgili ilk çalışmada (69); kan etanol seviyesindeki yükseklik bağırsak disbiyozisi sonucu florada artan *Proteobacteria* ailesinden olan *Escherichia*'ların artışı ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada; çalışma gruplarını sağlıklı ve NAFLD'li hastalar oluşturmaktadır. Buna karşılık Zhu ve ark. (83) tarafından NAFLD'nin tüm obez hastalarda gelişmediği düşünülerek, çalışma grubu olarak sağlıklı, obez ve NAFLD'li hastalar alınmış ve özellikle obez hastalarla NAFLD'si olan hastalar karşılaştırılmıştır. Özellikle NAFLD'li hastalar obez hastalarla kıyaslandığında diğer çalışmaya paralel olarak bağırsak florasında *Escherichia*'ların arttığı ve kan etanol seviyesinin de sadece NAFLD'li hastalarda artmış olduğu gösterilmiştir.

Bağırsakta endojen etanol üretiminin artması hastalık patogenezinde tek başına yeterli olmayıp, hem intestinal inflamasyonun hem de diğer patojenik faktörlerin portal ven yolu ile karaciğeri etkilemesi için bağırsak geçirgenliğinin de artmış olması gerekmektedir. Çalışmalarda NAFLD'li hastalarda; TJs yapısında

değişiklik ve artmış bağırsak geçirgenliği sonucu plazma LPS seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (1, 84). Miele ve ark.'larının (85) yaptığı çalışmada, NAFLD'nin artmış bağırsak geçirgenliği ile ilişkili olduğu, bu hastalarda SIBO sıklığının arttığı ve bunun da bağırsak geçirgenliğini artırdığı tespit edilmiştir. SIBO varlığını göstermek için, hidrojen nefes testi, laktuloz nefes testi, dışkı mikrobiyal profili ve bağırsak TJs protein kompleksi (klaudin ve okludin) analizleri yapılmaktadır (86). Bu konu ile ilgili yapılmış bir başka çalışmada; 10 NAFLD'li, 10 sağlıklı kişi çalışmaya alınmış; SIBO'nun gösterilmesi amacıyla hastalara laktuloz nefes testi yapılmış ve NAFLD'li hastalarda laktuloz nefes testi sonuçları daha yüksek tespit edilmiştir (87). Jiang ve ark.'nın (69) yaptığı çalışmada da; 53'ü NAFLD'li, 32'si sağlıklı olan 85 kişi çalışmaya alınmış ve duodenumdan alınan biyopsi örneklerinde TJs yapısı incelenmiş, okludin proteininin NAFLD'li hastalara kıyasla, sağlıklı grupta daha fazla olduğu görülmüştür ve NAFLD'li hastalarda TJs proteinlerinin azalması ile bağırsak geçirgenliğinde artış olduğu düşünülmüştür. Bağırsak geçirgenliğinin gösterilmesinde bir diğer önemli protein zonulindir. Zonulin, hücreler arası TJs'leri değiştirerek, geri dönüşümlü olarak bağırsak geçirgenliği düzenlemektedir (88). Yapılan bir çalışmada, obez hastalarda bağırsak geçirgenliğinin belirlenmesi için serum zonulin seviyeleri çalışılmış, obez hastalarda sağlıklı normal kişilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve bağırsak geçirgenliği belirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (89). Pacifico ve ark.'larının (90) yaptığı bir çalışmada da NAFLD'li hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun serum zonulin düzeyi karşılaştırılmış ve serum zonulin seviyesi NAFLD'li hastalarda yüksek saptamıştır. Ayrıca; biyopsi yapılan olgularda serum zonulin seviyesi ile yağlanmanın şiddeti arasında pozitif korelasyon saptamıştır. Bizim çalışmamızda da bağırsak geçirgenliği göstergesi olarak çalışılan zonulin değeri, hasta grupta kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuçlanmamıştır. Bu durum hasta grubumuzda USG'ye göre ağır yağlanması olan olguların azlığı ile açıklanabilir. Çalışmamızda hastalığının şiddeti sadece USG'ye göre değerlendirilmiş olup eğer biyopsi yapılabilmiş olsaydı serum zonulin seviyesi ile ilgili daha anlamlı sonuçlar bulabileceğimizi düşünmekteyiz. Ancak çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda intestinal inflamasyon (dışkı kalprotektin) ile serum zonulin seviyesi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.

Çalışmamızda daha önceki çalışmalarla benzer şekilde; intestinal inflamasyonun göstergesi olarak kullandığımız dışkı kalprotektin seviyesi NAFLD'li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır. Yine önceki çalışmalara paralel olarak inflamasyon belirteci olan TNF- α düzeyi hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda bağırsakta inflamasyon ve geçirgenlik artışı ile bakteriyel translokasyon gerçekleşmekte, karaciğere ulaşan LPS'lerin kuppfer hücrelerini uyarması ile TLR'ler üzerinden TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımı artmaktadır (1). Bu konu ile ilgili yapılmış bir çalışmada, obez NAFLD'li hastalar ileriye dönük incelenmiş, endotokseminin NAFLD patogenezindeki rolü ve karaciğer inflamasyonu araştırılmıştır. Sonuçta hastaların plazma LPS düzeyleri ve karaciğer doku örneklerinden incelenen TNF- α gen ekspresyon seviyeleri yüksek saptanmış; NAFLD patogenezinde endotoksemi artışı, inflamatuvar sitokin artışı ile ilişkilendirilmiştir (91). Başka bir çalışmada, USG ile veya histolojik olarak NAFLD tanısı alan hastalarda mikrobiyotanın değerlendirilmesi için hastalara bağırsak biyopsisi yapılmış, biyopsi materyalinde TNF- α ve IL-6 düzeyleri değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında, TNF- α ve IL-6 düzeyleri yüksek tespit edilmiştir (69).

Hastalığın tedavisinde birincil basamak, kilo kaybı ve fiziksel aktivitede artışı hedefleyen yaşam tarzı değişikliğidir (23). Son zamanlarda probiyotikler, BM'nin düzenlenmesi ve karaciğer fonksiyonlarının iyileştirilmesi için etkili doğal bir tedavi yöntemi olarak önerilmektedir (77).

Loguercio ve ark.'larının (92) erişkin karaciğer hastalarında (22 NAFLD, 20 alkolik siroz, 20 HCV ile ilişkili kronik hepatit, 16 HCV ilişkili siroz) probiyotik kullanımı (VSL#3® tedavisi) ile ilgili yaptığı ilk çalışmada; probiyotik kullanımı sonucu karaciğer enzimlerinin, inflamasyon göstergelerinin (TNF- α , IL-6 ve IL-10) ve serbest oksijen radikallerinin (malondialdehit ve 4-hidroksinoneal) azaldığı ve probiyotiklerin kronik karaciğer hastalarında diğer tedavilere ek olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Daha sonraki çalışmalar özellikle obezitesi ve NAFLD'si olan hastalar üzerine odaklanmıştır. Obez hastalarla ilgili ülkemizde yapılan yeni bir çalışmada bir ay süre ile verilen probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu sonucunda, VA ve VKİ'de

kontrol grubuna göre anlamlı düşüş saptanmış ve kan lipid profilinde ve oksidatif stres belirteçlerinde (TAS ve TOS) iyileşme olduğu görülmüştür (93).

Alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığında probiyotik tedavisinin etkinliği ile ilgili çalışmalar son beş yılda artmıştır.

Aller ve ark. (94) tarafından 2011 yılında yayınlanan çalışmada; 30 NAFLD'li erişkin hasta iki gruba randomize edilerek (probiyotik ve plasebo grubu) karşılaştırılmıştır. Hastalara diyet önerisinin yanında bir gruba probiyotik olarak 500 milyon ünite *Lactobacillus bulgaris* ve *Streptococcus thermophilus* üç ay süreyle verilmiş ve tedavi sonunda probiyotik alan grupta karaciğer enzimlerinde anlamlı düzelme gözlenirken, antropometrik parametrelerde, lipid düzeylerinde, TNF- α ve IL-6 seviyelerinde fark saptanmamıştır. Araştırmacılar, özellikle intestinal floranın rol oynadığı hastalıklarda probiyotik kullanılabilceğini ancak etki mekanizması için daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir.

Vajro ve ark.'nın (95), 2011 yılında pediatrik hastalarda yaptığı çalışmada ise; 20 hasta plasebo ve probiyotik (VSL#3®) grubu olarak randomize edilmiş, sekiz hafta boyunca izlenmiştir. Probiyotik tedavisi alan grupta, ALT ve bağırsak geçirgenlik göstergesi olarak kullanılan peptidoglikan polisakkarit IgA seviyesinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Buna karşın VKI, VKI z-skoru, vücut yağ oranı, TNF- α ve USG skorlarında bir fark saptanmamıştır. Araştırmacılar, bu açıdan diyet uyumu olmayan ya da kilo veremeyen hastalarda probiyotik tedavisinin etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Malaguarnera ve ark.'nın (96), 2012 yılında yaptıkları çalışmada da hastalar plasebo (yaşam tarzı değişikliği) ve probiyotik grubu (*Bifidobacterium longum*, fruktooligosakkarit ve yaşam tarzı değişikliği) olarak randomize edilerek 24 hafta boyunca takip edilmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak hastalara tedavi öncesi ve sonrası karaciğer biyopsisi yapılmıştır. Tedavi sonrasında probiyotik alan grupta karaciğer enzimlerinde, CRP, TNF- α , HOMA-IR, serum endotoksin ve histolojik olarak NAFLD aktivite indeksinde anlamlı düzelme tespit edilmiştir. Probiyotiğin bu etkisini, anti-inflamatuar, metabolik ve immün modulatör etkilerine bağlamış ve erişkin NAFLD hastalarda güvenli olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Farklı probiyotiklerin kullanıldığı randomize kontrollü erişkin çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiş ve probiyotik tedavisinin diğer tedavilere göre daha

iyi tolere edildiği belirtilmiştir (97, 98). Daha sonra Ma ve ark. (84) tarafından yukarıda bahsettiğimiz çalışmaları da içeren bir meta-analizde, probiyotik tedavisi ile karaciğer enzimlerinin, total kolesterol seviyesinin ve TNF- α düzeylerinin düştüğü, İD'nin düzeldiği ve probiyotiklerin NAFLD tedavisinde yeni bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Alisi ve ark.'nın (99) 2014 yılında yaptığı pediatrik çalışmada ise 44 hasta, probiyotik (VSL#3®) ve plasebo grubu randomize edilerek dört ay boyunca takip edilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası karaciğer biyopsisi yapılan hastalarda, tedavi sonrası karaciğer yağlanması düzeldiğini ve VKİ'nin azaldığını göstermişlerdir. Bu etkinin de, ince bağırsaktan salınan ve iştah azaltıcı bir hormon olan glukagon benzeri peptid-1 üzerinden sağlandığını göstermişlerdir.

Tüm bu çalışmalara benzer olarak, biz de probiyotik tedavisinin yaşam tarzı değişikliği ile birlikte NAFLD tedavisinde etkin olduğunu saptadık. Tedaviye yanıt veren hastalarda daha fazla kilo kaybı ve VKİ'de daha fazla düşüş vardı. Bunun yanında yanıt vermeyen hastalarla kıyaslandığında yanıt veren hastalarda CRP, total kolesterol, LDL, TNF- α ve kalprotektin seviyesinde düşüş anlamlıydı. Tedavi öncesi parametrelere baktığımızda yanıt veren hastalarla vermeyen hastalar arasında herhangi bir parametrede fark bulunmadı.

Çalışmamızın kısıtlayıcı yanları; (i) tanı ve takip için karaciğer biyopsi yapılmamasıydı. Son kılavuza göre; NAFLD tanı algoritmasında, transaminaz yüksekliği ve USG'de ekojenite artışı tespit edilen çocuk hastalarda rutin karaciğer biyopsisi önerilmemektedir. Sadece; ailede NASH varlığı, hepatosplenomegali tespit edilmesi, tedaviye rağmen inatçı transaminaz yüksekliği durumlarında karaciğer biyopsisi yapılması önerilmektedir (14). Hastalarımızın bu kriterlere uymaması, biyopsinin invaziv bir yöntem olması nedeni ile çalışmamızda hastalara karaciğer biyopsisi yapılmadı. (ii) Çalışmamızın bir diğer eksik yönü de bağırsak mikrobiyota analizinin yapılamamasıydı. Bu yöntem hem çok pahalı bir yöntem olması, hem çalışma için ayrılan bütçenin sınırlı olması hem de teknik imkanlar nedeni ile yapılamadı. (iii) Son olarak probiyotik etkisinin daha doğru değerlendirilebilmesi için hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubunun yanına, tedavi verilmeden sadece yaşam tarzı değişikliği ve diyet tedavisi ile takip edilen üçüncü bir grubun çalışmaya eklenmesi daha doğru olabilirdi. Ancak hastalara sadece yaşam tarzı değişikliği ve

diyet tedavisi verilmesinin uzun dönem komplikasyonları olan bu hastalıkta çok doğru olmadığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; son yıllarda popülaritesi gittikçe artan ve devam etmekte olan İnsan Mikrobiyom Projesi "*Human Microbiome Project*" çalışması ile ufkumuzun daha da gelişeceği bu alanda, çalışmamızın değerli olduğunu ve literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Çalışmamızın sonuçlarının, özellikle inflamatuvar sitokinler üzerine etkisinin probiyotiklerle ilgili yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.



6. SONUÇLAR

Obez çocuklarda, NAFLD’de probiyotik kullanımının etkili olup olmadığını görmeyi amaçladığımız çalışmamızın sonucunda;

1. Hasta grubu sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm antropometrik değerlendirmenin yanında, serum AST, ALT, kolesterol, LDL, VLDL, TG, HOMA-IR, etanol TNF- α , dışkı kalprotektin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$).
2. Hastaların serum zonulin ve dışkı kalprotektin değerleri arasında korelasyon saptandı ($p=0.003$, $r=0.324$).
3. Yapılan korelasyon çalışmalarında, VKİ ile vücut yağ oranı, USG yağlanma derecesi, kolesterol düzeyi, VLDL düzeyi, HOMA-IR değeri, etanol düzeyi ve OSİ arasında da pozitif korelasyon saptandı ($p=0.001$, $r=0.812$, $p=0.003$, $r=0.383$, $p=0.004$, $r=0.304$, $p=0.005$, $r=0.295$, $p=0.001$, $r=0.383$, $p=0.008$, $r=0.279$, $p=0.047$, $r=0.214$).
4. USG yağlanma derecesi ile ALT, etanol ve TNF- α düzeyleri arasındaki pozitif korelasyon da istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.032$, $r=0.282$, $p=0.007$, $r=0.348$, $p=0.026$, $r=0.298$).
5. Hastaların tedavi öncesine göre sonrasında VA, VKİ, VKİ z-skoru ve vücut yağ oranı anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$).
6. Hastaların tedavi sonrası %67.8’inin yağlanmasında azalma tespit edildi. Hastaların beşinde birinci derece, 15’inde ikinci derece, yedisinde üçüncü derece yağlanma izlenirken, tedavi sonrasında dört hastanın yağlanması kayboldu ve 11’inde birinci derece, 11’inde ikinci derece, ikisinde üçüncü derece yağlanma izlendi. USG skorları anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$).
7. Tedavi sonrası serum ALT, AST, kolesterol, LDL, CRP, etanol ve TNF- α değerlerinde azalma ve TAS değerinde artış tespit edildi ($p<0.05$).
8. Tedavi sonrası yağlanması azalan grupta, azalmayan gruptan farklı olarak antropometrik değerlendirmelerde, CRP, AST, ALT, kolesterol, LDL, TNF- α ve dışkı kalprotektin değerlerinde azalma saptandı ($p<0.05$).

7. KAYNAKLAR

1. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(44): 16452-63.
2. Mavrakanas TA, Konsoula G, Patsonis I, Merkouris BP. Childhood obesity and elevated blood pressure in a rural population of northern Greece. *Rural Remote Health.* 2009; 9(2): 1150.
3. Demircioğlu F, Arslan N. Çocuklarda alkolik olmayan yağlı karaciger hastalığı. *Çocuk Sağ Hast Dergisi.* 2006; 49(4): 339-46.
4. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatr.* 2013; 13(1): 1-10.
5. Stanley A, Bennett J. Defects in Metabolism of Lipids In. Kliegman RM, editor. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 20th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 701.
6. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(1): 5-10.
7. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998; 114(4): 842-5.
8. Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 36(9): 815-23.
9. Alisi A, Nobili V. Non-alcoholic fatty liver disease in children now: lifestyle changes and pharmacologic treatments. *Nutrition.* 2012; 28(7-8): 722-6.
10. Kim HS, Park H, Cho IY, Paik HD, Park E. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus polyfermenticus*, Bispian strain, modulates natural killer cell and T cell subset populations and immunoglobulin G levels in human subjects. *J Med Food.* 2006; 9(3): 321-7.
11. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Cartenì M et al. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012; 22(6): 471-6.
12. 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.
13. Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol.* 1983; 78(6): 374-7.

14. Vajro P, Lenta S, Socha P, Dhawan A, McKiernan P, Baumann U et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54(5): 700-13.
15. Vitola E, Balistreri F. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: Kliegman RM, editor. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 20th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 1957.
16. Kelishadi R, Poursafa P. Obesity and air pollution: global risk factors for pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Hepat Mon.* 2011; 11(10): 794-802.
17. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004; 40(6): 1387-95.
18. Welsh JA, Karpen S, Vos MB. Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among United States adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. *J Pediatr.* 2013; 162(3): 496-500.
19. Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011; 48(3): 97-113.
20. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med.* 1997; 126(2): 137-45.
21. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis.* 2008; 28(4): 339-50.
22. Boyraz M, Hatipoglu N, Sarı E, Akçay A, Taskin N, Ulucan K et al. Non-alcoholic fatty liver disease in obese children and the relationship between metabolic syndrome criteria. *Obes Res Clin Pract.* 2014; 8(4): 356-63.
23. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day C, Sookoian S, Maher J et al. Non alcoholic Fatty Liver Disease. *Nat Rev.* 2015; 10.1038
24. Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2(2): 1-19.
25. Marzuillo P, Miraglia del Giudice E, Santoro N. Pediatric fatty liver disease: role of ethnicity and genetics. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(23): 7347-55.
26. Akcam M, Boyaci A, Pirgon O, Koroglu M, Dundar BN. Importance of the liver ultrasound scores in pubertal obese children with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Imaging.* 2013; 37(3): 504-8.
27. Bozic MA, Subbarao G, Molleston JP. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2013; 28(4): 448-58.

28. Uğraş M, Küçük O, Biçer S, Vitrinel A. Çocuklarda alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı. *Bozok Tıp Dergisi*. 2014; 4(1): 55-61.
29. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 19(10): 371-9.
30. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005; 42(5): 987-1000.
31. Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis*. 2009; 41(9): 615-25.
32. Paoletta G, Mandato C, Pierri L, Poeta M, Di Stasi M, Vajro P. Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(42): 15518-31.
33. Imajo K, Yoneda M, Ogawa Y, Wada K, Nakajima A. Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Immunopathol*. 2014; 36(1): 115-32.
34. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1): 59-69.
35. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44-84.
36. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 360-438.
37. Manti S, Romano C, Chirico V, Filippelli M, Cuppari C, Loddo I et al. Nonalcoholic Fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis in childhood: endocrine-metabolic "mal-programming". *Hepat Mon*. 2014; 14(5): 1-9.
38. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001; 120(5): 1183-92.
39. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2010; 103(2): 71-83.
40. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013; 14(10): 20704-28.
41. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*. 2013; 123(5): 1902-10.

42. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: A case-control study. *Hepatology*. 2000; 32(4): 689-92.
43. Kistler KD, Molleston J, Unalp A, Abrams SH, Behling C, Schwimmer JB; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN). Symptoms and quality of life in obese children and adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; 31(3): 396-406.
44. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2004; 24(1): 3-20.
45. De Bruyne RM, Fitzpatrick E, Dhawan A. Fatty liver disease in children: eat now pay later. *Hepatol Int*. 2010; 4(1): 375-85.
46. Neyzi O, Günöz H, Furman A, Bundak R, Gökçay G, Darendeliler F. Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2008; 51(1): 1-14.
47. Bradford NF. Overweight and obesity in children and adolescents. *Prim Care*. 2009; 36(2): 319-39.
48. Singer C, Stancu P, Coşoveanu S, Botu A. Non-alcoholic Fatty liver disease in children. *Curr Health Sci J*. 2014; 40(3): 170-6.
49. Cao W, Zhao C, Shen C, Wang Y. Cytokeratin 18, alanine aminotransferase, platelets and triglycerides predict the presence of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013; 8(12): 1-8.
50. Shannon A, Alkhouri N, Carter-Kent C, Monti L, Devito R, Lopez R et al. Ultrasonographic quantitative estimation of hepatic steatosis in children With NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 53(2): 190-5.
51. Kim SH, Lee JM, Kim JH, Kim KG, Han JK, Lee KH et al. Appropriateness of a donor liver with respect to macrosteatosis: application of artificial neural networks to US images--initial experience. *Radiology*. 2005; 234(3): 793-803.
52. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41(6): 1313-21.
53. Gokce S, Atbinici Z, Aycan Z, Cinar HG, Zorlu P. The relationship between pediatric nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk factors and increased risk of atherosclerosis in obese children. *Pediatr Cardiol*. 2013; 34(2): 308-15.

54. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010; 51(1): 121-9.
55. Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009; 48(5): 587-96.
56. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM et al. NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010; 362(18): 1675-85.
57. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Republished: Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Postgrad Med J*. 2015; 91(1072): 92-101.
58. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*. 2011; 305(16): 1659-68.
59. Sarkhy AA, Al-Hussaini AA, Nobili V. Does vitamin E improve the outcomes of pediatric nonalcoholic fatty liver disease? A systematic review and meta-analysis. *Saudi J Gastroenterol*. 2014; 20(3): 143-53.
60. Thomas DW, Greer FR; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*. 2010; 126(6): 1217-31.
61. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(5): 321-35.
62. Sanz Y, Santacruz A, Gauffin P. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proc Nutr Soc*. 2010; 69(3): 434-41.
63. Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe*. 2011; 10(4): 311-23.
64. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 104(2): 1-11.
65. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(44): 15718-23.
66. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide

production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90(5): 1236-43.

67. Scarpellini E, Campanale M, Leone D, Purchiaroni F, Vitale G, Lauritano EC et al. Gut microbiota and obesity. *Intern Emerg Med.* 2010; 5(1): 53-6.

68. Blaut M, Bischoff SC. Probiotics and obesity. *Ann Nutr Metab.* 2010; 57(1): 20-3.

69. Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2015; 5(1): 1-7.

70. Sharma V, Garg S, Aggarwal S. Probiotics and liver disease. *Perm J.* 2013; 17(4): 62-7.

71. Guzman JR, Conlin VS, Jobin C. Diet, microbiome, and the intestinal epithelium: an essential triumvirate? *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 1-10.

72. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology.* 2014; 146(6): 1513-24.

73. Ceyhan N, Alic H. Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 2012;5:107-13.

74. Eslamparast T, Eghtesad S, Hekmatdoost A, Poustchi H. Probiotics and Nonalcoholic Fatty liver Disease. *Middle East J Dig Dis.* 2013; 5(3): 129-36.

75. Bischoff SC, Zeitz M. Scientific evidence for the medical use of probiotics. *Ann Nutr Metab.* 2010; 57(1): 1-5.

76. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(1): 1-6.

77. Kelishadi R, Farajian S, Mirlohi M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic Fatty liver disease; a systematic review on the current evidences. *Hepat Mon.* 2013; 13(4): 7233-41.

78. Floch MH, Walker WA, Sanders ME, Nieuwdorp M, Kim AS, Brenner DA et al. Recommendations for Probiotic Use--2015 Update: Proceedings and Consensus Opinion. *J Clin Gastroenterol.* 2015; 49(1): 69-73.

79. Neyzi O, Furman A, Bundak R, Gunoz H, Darendeliler F, Bas F. Growth references for Turkish children aged 6 to 18 years. *Acta Paediatr.* 2006; 95(12): 1635-41.

80. Bundak R, Furman A, Gunoz H, Darendeliler F, Bas F, Neyzi O. Body mass index references for Turkish children. *Acta Paediatr.* 2006; 95(2): 194-8.

81. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28(7): 412-9.
82. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*. 2003; 133(41): 563-6.
83. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013; 57(2): 601-9.
84. Ma YY, Li L, Yu CH, Shen Z, Chen LH, Li YM. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(40): 6911-8.
85. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009; 49(6): 1877-87.
86. Gangarapu V, Yıldız K, Ince AT, Baysal B. Role of gut microbiota: obesity and NAFLD. *Turk J Gastroenterol*. 2014; 25(2): 133-40.
87. Soza A, Riquelme A, González R, Alvarez M, Pérez-Ayuso RM, Glasinovic JC et al. Increased orocecal transit time in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2005; 50(6): 1136-40.
88. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci*. 2000; 113(24): 4435-40.
89. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernández-Real JM. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One*. 2012; 7(5): 37160-75.
90. Pacifico L, Bonci E, Marandola L, Romaggioli S, Bascetta S, Chiesa C. Increased circulating zonulin in children with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(45): 17107-14.
91. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*. 2007; 17(10): 1374-80.
92. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C et al. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39(6): 540-3.

93. Ipar N, Aydogdu SD, Yildirim GK, Inal M, Gies I, Dinleyici EC et al. Effects of synbiotic on anthropometry, lipid profile and oxidative stress in obese children. *Benef Microbes*. 2015; 6(6): 775-81.
94. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011; 15(9): 1090-5.
95. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 52(6): 740-3.
96. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R et al. *Bifidobacterium longum* with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2012; 57(2): 545-53.
97. Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol*. 2013; 12(2): 256-62.
98. Solga SF, Buckley G, Clark JM, Horska A, Diehl AM. The effect of a probiotic on hepatic steatosis. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42(10): 1117-9.
99. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C et al. Randomised clinical trial: The beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014; 39(11): 1276-85.