

**T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

Prof. Dr. Cansel TÜRKEY

**DENEYSEL DİYET MODELİ İLE NON ALKOLİK YAĞLI
KARACİĞER HASTALIĞI OLUŞTURULAN RATLARDA
SİLYMARİNİN PROTEKTİF ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehtap ERKMEN UYAR

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Cansel TÜRKEY**

Ankara – 2008

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	ii
Kısaltmalar	iv
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı.....	3
2.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Risk faktörleri.....	7
2.1.3. Histopatogenez	8
2.1.4. Klinik ve Laboratuvar Bulgular	17
2.1.5. Tanı.	18
2.1.6. Klinik Seyir ve Prognoz	20
2.1.7. Tedavi.....	22
2.2. Silymarin	24
2.2.1. Silymarinin Farmokokinetiği	25
2.2.2 Silymarinin Klinik Endikasyonları	25
2.2.3 Etki Mekanizması.....	26
2.2.4 Dozaj/Toksisite.	29
3. Materyal ve Metod	30
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Protokolü.....	30
3.2. Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Çalışılması.....	30
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	31
3.4. İstatistiksel Analiz.....	31
4. Bulgular.....	32

4.1. Deney Sonunda Ratların Özellikleri	32
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	32
4.2.1. Karaciğer enzimleri, glukoz ve lipid parametreleri.....	32
4.2.2. Serum inflamatuvar sitokin düzeyleri	35
4.3 Histopatolojik Bulgular	38
5. Tartışma ve Sonuç.....	44
6. Özet	50
7. Summary	52
8. Teşekkür.....	54
9. Kaynaklar	55

KISALTMALAR

NAYKH	:	Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	:	Non alkolik steatohepatit
FFA	:	Serbest yağ asidi
TG	:	Trigliserid
MS	:	Metabolik Sendrom
VKİ	:	Vücut kitle indeksi
AST	:	Aspartat aminotransferaz
ALT	:	Alanin aminotranferaz
NF- $\kappa\beta$:	Nükleer faktör-kappa beta
TNF- α	:	Tümör nekrozis faktör-alfa
IFN- γ	:	İnterferon gama
IL	:	İnterlökin
PG E2	:	Prostaglandin E2
PPAR α	:	Peroksizom-prolifere olmuş aktive reseptör
TGF β -1	:	Transforming growth factor beta-1'
CTGF	:	'Connective tissue growth factor'
ALP	:	Alkalen fosfataz
GGT	:	Gama-glutamiltransferaz
UDKA	:	Ursodeoksikolik asid
H&E	:	Hematoksilen-Eozin
PAS	:	Periodic-acid Schiff

1. GİRİŞ

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) basit yağlanmadan, fibrozis, karaciğer sirozu ve maligniteye ilerleyebildiğinin gösterilmesiyle birlikte son 20 yılda önem kazanmıştır (1). NAYKH, günümüzde asemptomatik karaciğer enzim yüksekliğinin en sık sebebi ve en çok tanı alan karaciğer hastalığıdır. Yağlı karaciğer üzerine çevresel veya genetik nedenlerle eklenen inflamasyon oksidatif stres ve oksidatif stres sonucunda non alkolik steatohepatit (NASH) oluşur. Son çalışmalara göre, genel popülasyonda yağlı karaciğere %20, steatohepatite ise %3 civarında rastlanmaktadır (2).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı'nın daha ciddi seyirli formu olan NASH karaciğer sirozu ve hepatoselüler kansere ilerleyebilmektedir (3). NAYKH'nın histolojik spektrumu tek başına yağlı karaciğeri veya nekrozlu veya nekrozsuz steatohepatiti içermektedir. Hastalığın klinik sonucu histolojik değişikliklerin ciddiyetine, sonuçta oluşabilecek sirozun varlığına bağlıdır ve nekrozun eşlik ettiği tiplerde karaciğer kaynaklı ölümler daha sık olarak görülmektedir (4). Bu nedenle hastalığı prenekrotik safhada tanımlamak ve mümkün olabildiğince erken dönemde müdahale edebilmek önem kazanmaktadır.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı oluşmasına sebep olan faktörlerin en başında diyabetes mellitus, obezite ve hiperlipidemi gelmektedir (5). Daha az olarak ilaçlar, by-pass cerrahisi, gebelik, yağ metabolizması hastalıkları ve total parenteral beslenme gibi faktörler sebep olabilir. NAYKH'nın toplumda yaygın olarak görülen, insülin direnci, obezite ve tip 2 diyabet ile yakın ilişkisi vardır (6).

Non alkolik steatohepatit patogenezi iki darbe hipotezine göre açıklanmaya çalışılmış, buna göre metabolik faktörler ilk darbeyi oluştururken, serbest radikaller, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu gibi olaylar ikinci darbeyi oluşturmuştur (7). İlk darbe ile NAYKH gelişir. Karaciğerde serbest yağ asidi (FFA) ve trigliserid (TG) depolanması ile steatoz oluşur. Hücrel adaptasyon mekanizmalarının bozulmuş sinyalizasyonu ile değişik stres faktörleri hepatositlerde hasarlanmaya neden olur. İnsülin direnci, hem nonalkolik yağlı karaciğer hem de nonalkolik steatohepatitte ortak patofizyolojik faktördür. Yağlı karaciğer oluşumunda karaciğer yağ dengesinin

bozulması söz konusudur. Hiperinsülinemi ile insülin rezistansı, periferik lipoliz artışı, karaciğerde endojen yağ asidi oluşumunun artışı, karaciğere gelen serbest yağ asidi miktarının artışı ve yağ asidi beta oksidasyonunun azalması meydana gelir (8). İkinci darbe ile NASH gelişir. Yağlı karaciğer üzerine çevresel veya genetik nedenlerle varolan inflamasyon oksidatif stres ve oksidatif stres sonucunda hücresel nekroz, apoptoz ve fibrozis oluşur. Steatozu olan hastalarda NASH gelişimini etkileyen faktörler konusunda yeterli bilgi yoktur (9).

Silymarin deve dikenini bitkisinden elde edilen ve günümüzde karaciğer ve safra yolları hastalıkları tedavisinde üzerinde en fazla çalışılmış bir flavanoiddir. Silymarin ve aktif bileşeni silybin serbest radikalleri temizleyerek ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek anti oksidan etki gösterirler. Yapılan çalışmalarda ayrıca genomik hasarı önlediği, hepatosit protein sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivasyonunu azalttığı ve mast hücre stabilizasyonu sağladığı gösterilmiştir.

Silymarin Amanita mantar zehirlenmesinde, alkole bağlı karaciğer hastalığında, kronik hepatitlerde, kanser, hepatit C, HIV, diyabet, ve hiperkolesterolemi gibi pek çok durumda etkileri araştırılmış ve olumlu etkileri bildirilmiş bir moleküldür. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda antikanser, antidiyabetik, ve kardiyoprotektif etkileri gösterilmiştir. Silymarin ekstresi tüm çalışmalarda güvenli bulunmuş ve iyi tolere edilmiştir, tedavi bırakılmasına neden olacak yan etki gözlenmemiştir. Bu bitkisel maddenin hepatosteatoz vakalarında çok fazla çalışılmamış olması ve anti inflamatuvar etkileri nedeni ile yağlanmadan steatohepatite geçişi önleyici etkisini araştırmak için bu çalışmayı planladık.

Biz çalışmamızda yüksek yağ içerikli diyet modeli ile ratlarda oluşturulan NASH modelinde, bir antioksidan anti-inflamatuvar olan silymarinin karaciğer histopatolojisi ve serum markerları üzerine etkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAYKH)

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, batı dünyasında en yaygın kronik karaciğer sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Karaciğer yağlanması bir histopatolojik bulgu olarak uzun yıllardan beri biliniyor olmasına rağmen yakın zamana kadar özel bir hastalık olarak dikkate alınmamıştır. Bunun nedeni, karaciğer yağlanmasının çoğu zaman başka karaciğer hastalıklarının veya sistemik hastalıkların bir bulgusu olarak görülmesi ve bu hastalıkların klinik tablosu içerisinde değerlendirilmesidir (10).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ilk olarak 1980 yılında Ludwig ve arkadaşları tarafından Mayo kliniğinde patolojik olarak alkolün yol açtığı karaciğer yağlanmasına benzeyen, ancak alkol kullanmayan hastalarda gelişen bir karaciğer sorunu olarak belirtilmiştir (11). Steatozisten ilerlemiş fibrozise ve siroza kadar ilerleyebilen NAYKH'nin patolojik şekli, alkolün neden olduğu karaciğere hastalığına benzemektedir (12). Ne kadar alkol tüketiminin bu tanımlamanın dışında tutulacağı tartışmalı olmakla beraber erkeklerde günde 30, kadınlarda ise günde 20 grama kadar alkol alımı non-alkolik olarak kabul edilmektedir (13).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı; temel olarak Metabolik Sendrom (MS) ile karakterize olan obezite, diyabet, dislipidemi ve insülin direnci gibi özellikler ile ilişkilidir. Hastalığın seyri; asemptomatik yüksek karaciğer enzim düzeylerinden karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinom gibi komplikasyonlarla birlikte siroza kadar farklılıklar gösterir (14).

2.1.1 Tanım ve Epidemiyoloji

Karaciğer yağlanması, histopatolojik incelemede hepatositlerin %5'ten fazlasında yağ vakuollerinin görülmesi veya lipid miktarının karaciğer ağırlığının %5'inden daha fazla olması şeklinde tanımlanmaktadır (14). Non alkolik Laënnec's hastalığı, diyabetik hepatit, alkol benzeri karaciğer hastalığı gibi isimlerde verilmiş olmakla beraber, NAYKH bugün tercih edilen terimdir ve basit steatozdan, steatohepatit, ilerlemiş fibrozis ve siroza kadar uzanan geniş bir spektrumu yansıtır.

NAYKH, kronik karaciğer hastalığının önemli bir sebebi olarak gösterilmesinin yanında, alkol, toksinler, hepatotrofik virüsler gibi nedenlerle olan karaciğer hasarını da artırması açısından önemlidir (15).

Karaciğer yağlanması çok değişik nedenlere bağlı olarak gelişebileceğinden dolayı terminolojik olarak 3 ana sınıfta toplanabilir. Bunlar:

A. Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalıkları

- Alkolik Yağlı Karaciğer
- Alkolik Steatohepatit

B. Non alkolik Yağlı Karaciğer Hastalıkları (NAYKH)

- Non alkolik Yağlı Karaciğer (Non-alkolik Steatoz)
- Non alkolik Steatohepatit (NASH)

C. Yağlı Siroz

Non-alkolik steatoz selim seyirlidir, karaciğerde basit yağlanma vardır, ancak iltihabi infiltrasyon henüz gelişmemiştir. Buna karşılık NASH; hiç alkol kullanmayan veya az miktarda (günde 20-30 gr'ın altında) alkol kullanan, histolojik bulguları alkolik karaciğer hastalığından ayırt edilemeyen, yağlanma ile birlikte nekroinflamasyon ve fibrozun geliştiği kronik seyirli klinik tabloyu ifade eder. Mikst tipte iltihabi infiltrasyonun dışında, hepatositlerde balonlaşma ve bazılarında Mallory cisimcikleri (zon-3'te balonlaşmış hepatositler içinde yer alan asidofilik yapılar) ve fibroz gibi bulgular gelişmiştir. Her ne kadar bu 2 grup birbirinden farklı gibi görünse de, klinik spektrumun ilk basamağını steatoz oluşturmaktadır. Daha sonra çeşitli faktörlerin etkisi ile gelişen inflamasyon, klinik olarak daha önemli olan ve siroza kadar ilerleyebilen olaylar dizisini başlatmaktadır (16). NAYKH, alkole bağlı olmayan tüm karaciğer yağlanmasını kapsar.

Son yıllarda yapılan sınıflamaya göre NAYKH etyolojik faktörler açısından 3 gruba ayrılabilir. Bu sınıflamaya göre:

1. Primer NAYKH: MS ile ilgili hastalıklar (tip 2 DM, obezite, hiperlipidemi) nedeniyle ortaya çıkan karaciğer yağlanması.

2. Sekonder NAYKH:

- İlaçlar
- Cerrahi
- Metabolik/Genetik

- Diğer faktörlere bağlı ortaya çıkan karaciğer yağlanması

3. Gruplandırılmayan NAYKH:

- İntestinal bakteriyel aşırı gelişim
- Demir yüklenmesi
- Kronik HCV hepatitinde görülen karaciğer yağlanması

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının sekonder nedenleri Tablo 2.1’de verilmiştir (17).

Tablo 2.1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının sekonder nedenleri.

Metabolik/Genetik	İlaçlar	Cerrahi	Diğer
✓ Disbetalipoproteinemi	✓ Kortikosteroidler	✓ Obezite	✓ İBD
✓ Parsiyel lipodistrofi	✓ Sentetik östrojen	tedavisinde	✓ Çevresel toksinler
✓ Weber-Christian hastalığı	✓ Tamoksifen	✓ Gastropleksi	✓ AIDS
✓ Wolman hastalığı	✓ Amiodaron	✓ Geniş ince bağırsak	✓ İBH
✓ Gebeliğin yağlı karaciğeri	✓ Perheksilin	✓ Rezeksiyonu	
✓ Wilson hastalığı	✓ Valproik asit	✓ Jejuno-ileal bypass	
✓ Galaktozemi	✓ Kokain	✓ Biliopankreatik diversiyon	
✓ Glikojen depo hastalığı	✓ Aspirin		
✓ Hızlı kilo verme	✓ KKB		
✓ Total parenteral beslenme	✓ Tetrasiklin		
✓ Akut açlık	✓ Metotreksat		
	✓ Zidovudin,		
	✓ Didanosin		
	✓ Warfarin		
	✓ L-asparaginaz		

İBH: İnflamatuvar barsak hastalığı İBD: İnce barsak diversiyonu KKB: Kalsiyum kanal blokerleri

Amerika ve batı toplumlarında yapılan görüntüleme yöntemleri ve otopsi çalışmalarının sonuçlarına göre yetişkinlerin yaklaşık %20-30’unda karaciğer yağlanması olduğu ve bunların %10’unda NASH olduğu bildirilmiştir (18). Amerika’da 12241 kişinin incelendiği “Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması”nda tüm populasyonun %24’ünde non alkolik yağlı karaciğer hastalığı vardır (19).

NAYKH prevelansı, erkeklerde ve bazı etnik gruplarda (Hispanik Amerikalılarda %45' i aşkın) daha yüksek olma eğilimindedir. Prevelans yaşla birlikte artar; çocuklarda %2,6 iken, 40-59 yaş arası bireylerde %26 oranında görülür (14). Bilinen bir karaciğer hastalığı olmayan populasyonda anormal karaciğer enzim yüksekliğinin %90 sebebi non alkolik yağlı karaciğer hastalığıdır (20).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ülkemizde NAYKH sıklığı kadınlarda %16,5 iken erkeklerde %23,7 olarak bulunmuştur ve santral obezitenin önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (21). NAYKH'nın prevelansı; tip 2 diyabet ve trigiserid yüksekliği olan hastalarda %50-55'e, obez bireylerde %75'e çıkmaktadır ve obez olan diyabetik bireylerin hemen tamamında mevcuttur (14, 22). Obezite, diyabet ve MS; NAYKH ve ilerlemiş fibrozisin risk faktörlerindedir. "National Health and Nutrition Examination Survey" III (NHANES III) çalışmasında da bazı demografik özellikler çarpıcıdır: NAYKH postmenapozal dönemde premenapozdakilere göre 2 kat fazla bulunmuştur. Yaş ve etnik farklılıklar eşitlense de hastalığın sıklığı artan VKİ' i ile artmaktadır. Tip 2 diyabeti olanlarda risk 2-5 kat fazladır (19). Tablo 2.2'de farklı çalışmalardaki demografik özellikler topluca görülmektedir (2).

Tablo 2.2. Değişik NAYKH Çalışmalarından Demografik Veriler (2)

Yazar	Sayı	Yaş (yıl)	Kadın (%)	Diyabet (%)	Obezite (%)	Hiperlipidemi (%)
Ludwig	20	54	65	50	90	67
Diehl	39	52	81	55	71	20
Lee	49	53	78	51	69	Belirtilmemiş
Powell	42	49	83	36	95	81
Bacon	33	47	42	21	39	21
Matteoni	132	53	53	33	70	92
Angulo	144	51	67	28	60	27

2.1.2 NAYKH için risk faktörleri

İlerlemiş hastalık için risk faktörlerini belirlemek çok önemlidir, çünkü hangi kişilerde fibrotik hastalık olduğunu tahmin ederek klinisyen karaciğer biyopsisi yapma ihtiyacını daha doğru belirleyebilecektir.

1) Yaş: Siroz için yaş bir risk faktörü olarak görülmüştür. Yaşın ne zaman hepatik steatoz sürecinde fibrozis için riskli olduğunu göstermek açısından önemlidir. Çünkü çocukluk dönemi hepatosteatoz ve yetişkin dönemi obezite oranları artmaktadır. Çalışmalarda 45 yaş üstü bir risk faktörü olarak ileri sürülse de tartışmalar devam etmektedir (2).

2) AST/ALT Oranı: Viral hepatitlerde olduğu gibi bu oran NAYKH'da da fibrotik evreyi gösterir (2).

3) Obezite: Obezite hepatik steatoz ve fibrotik karaciğer hastalığı için bir risk faktörüdür. Lipid yüklü hepatositler hepatotoksik ajanlar için kaynak gibi davranır ve ikinci darbe hasarına daha duyarlı hale gelir (2, 19). Gastrik bypass operasyonu olan 100 morbid hastada %36 oranında değişik derecelerde steatohepatit bulunmuştur. Bu çalışmada obezite derecesi, steatoz şiddeti ve sıklığı ile uyumlu bulunmuştur. NASH sıklığı da steatoz şiddeti ile orantılı bulunmuştur. Ratziu ve arkadaşları VKİ'i > 25 kg/m² ve karaciğer enzim anormallikleri olan 93 obez hastanın karaciğer biyopsilerinde %30 oranında septal fibrozis ve %10 oranında siroz tespit edilmiştir (2, 23).

4) Diyabetes Mellitus: Karaciğer hastalığı tip 2 diyabeti olanlarda siktir ve NAYKH diyabetiklerde %75'e kadar görülebilir. Obez ve diyabetik kişilerdeki hepatik fibrozis, sadece obez olanlara göre daha belirgindir. NASH obeziteyle ilişkisiz olarak tip 2 diyabet ve glukoz intoleransı ile de ilişkilidir (5, 23).

5) Dislipidemi: Hepatik lipid dengesi NAYKH'da bozuk olabilir. Fakat bunun yağlanma nedeni mi olduğu ya da yağlanma sonucu mu oluştuğu belli değildir (19). Hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi veya her ikisi NASH hastalarında %20-81 oranında görülür. Bir çalışmada metabolizma bozuklukları kliniğine başvuran hastaların 2/3'ünde karaciğer enzimlerinde artma ve yaklaşık yarısında USG'de yağlanma bulunmuştur. Hiperkolesterolemi hastalarının çoğu normal USG bulgularına sahipken, hipertrigliseridemi veya karışık tip hiperlipidemisi olanlarda risk 5-6 kat fazladır. NHANES III çalışmasında yaş, etnik özellikler, VKİ ve tip 2

diyabet farklılıkları düzeltildikten sonra trigliserid seviyesi >200 mg/dl olan erkek ve kadınlarda 3 kat ve HDL< 35 mg/dl olanlarda 2 kat fazla risk bulunmuştur (24).

Bazı klinikopatolojik özelliklerin NAYKH'da fibrozis ile ilişkisi araştırılmıştır. Balonlaşma lezyonu ve Mallory cisimcikleri bağımsız olarak sinuzoidal ve perivenüler fibrozis ile ilişkili bulunmuştur. AST/ALT oranı ve balonlaşma lezyonu bağımsız olarak periportal-portal tip fibrozis ile ilişkili bulunmuştur. Balonlaşma lezyonu ve Mallory cisimciklerinin hastalığın histolojik ilerlemesinde fibrozis için en iyi göstergeler olduğu ileri sürülmüştür (25).

Birçok değişik çalışmada NASH olan hastalarda siroz gelişimi gösterilmiştir ve siroz sıklığının %26'ya kadar yüksek olduğunu gösteren bildiriler vardır (26, 27). 1-7 yıl izlenen NASH hastalarının karaciğer biyopsilerinde %43'ünde fibrozisde ilerleme ve %3'ünde düzelmeye görülürken, %54'ünde histolojik değişiklik izlenmemiştir (27). Ciddi ilerleyici hastalığı olanları belirlemek için biyokimyasal, klinik ve/veya histopatolojik belirteçler üzerinde çalışılmaktadır. Angulo ve arkadaşları 104 hastayı inceleyerek, ileri yaş, obezite, diyabet ve AST/ALT>1 oranının, istatistiksel olarak biyopside köprüleşme fibrozisi veya sirozla orantılı bulmuşlardır (26). Younossi ve arkadaşları 132 karaciğer biyopsisini incelemişler ve şiddetli histolojik bulguları olan hastalarda, karaciğer hastalığından ölüm ve siroz için risk olduğunu vurgulamışlardır. Bu lezyonlar balonlaşma dejenerasyonu, Mallory cisimciği veya fibrozisdir (28). Ratziu ve arkadaşları enzim anormallikleri olan obez hastaların hangilerine biyopsi yapılması gerektiği konusunda klinikobiyolojik derecelendirme ileri sürmüşlerdir; VKİ, yaş, ALT ve trigliseridi 4 değişken olarak belirlemişlerdir (29).

2.1.3 Histopatogenez

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının histolojik bulguları alkole bağlı karaciğer hastalığında görülenlerle benzerdir. Karaciğer biyopsisi bulguları steatoz (yağlı karaciğer), steatohepatit (yağlı karaciğere ek olarak fokal nekrozun eşlik edebildiği parankim inflamasyonu) ve siroz dahil olmak üzere değişen derecelerde fibrozisdir (30). Alkolik karaciğer hastalığında olduğu gibi, NAYKH'de de yağlanma makroveziküler ve genellikle yaygındır. Fakat baskın olarak mikroveziküler veya zone 3 (perivenüler) steatoz da bildirilmektedir. Nonalkolik

steatohepatitte, akut veya kronik inflamatuvar hücrelerle lobüler inflamasyon, balon dejenerasyon, Mallory cisimcikleri ve fibrozis bulunur (30). Hücrel yanıt baskın olarak nötrofilik, lenfositik veya miks olabilir. Mallory cisimciklerinin varlığı değişkendir (%9-90). Genellikle zone 3'te bulunurlar. NASH'de değişen ağırlıkta perisinüzoidal, sentrilobüler veya septal fibroz bulunabilir (31). Angulo ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 673 karaciğer biyopsisi bulguları ışığında, hastaların % 66'sında hafif orta, % 20'sinde ciddi fibrozis, % 14'ünde oturmuş siroz olduğu bildirilmiştir (15).

Karaciğer histopatolojisine göre bir NAYKH sınıflandırması ileri sürülmüştür:

Tip 1: Steatoz

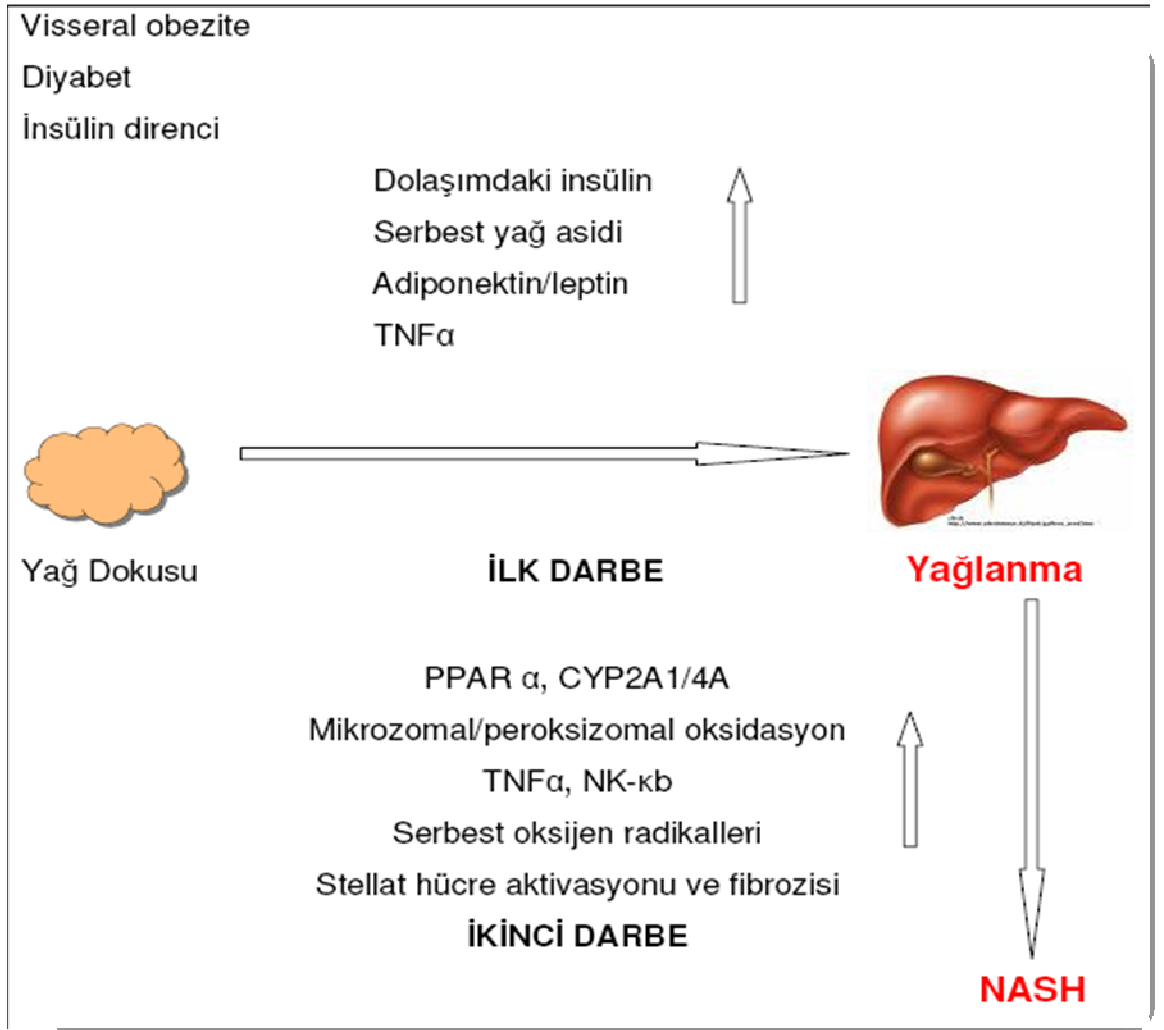
Tip 2: Steatoz + lobüler inflamasyon

Tip 3: Tip 2 + balonlaşmış hepatositler

Tip 4: ' Mallory's hyaline' veya fibrozis (32, 33)

Yapılan bir çalışmada 32 kişilik NAYKH grubunun 9 yıllık izlemi sonucunda; Tip 1 ve 2 grubunda %3.4, Tip 3 ve 4 grubunda ise %24.7 oranında siroz geliştiği bildirilmiştir (33).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi net değildir. Bazı hastalarda sadece steatoz, diğerlerinde steatohepatit ve progresif fibroz gelişmesinin nedenleri bilinmemekle beraber, vücut yağ dağılımı veya antioksidan sistemlerdeki farklılıklarla beraber genetik yatkınlık suçlanmaktadır. İlk olarak patogenez iki darbe hipotezine göre açıklanmaya çalışılmış, buna göre metabolik faktörler ilk darbeyi oluştururken serbest radikaller, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu gibi olaylar ikinci darbeyi oluşturmuştur (Şekil 2.1) (7).



Şekil 2.1. Nonalkolik Steatohepatit Patogenezis Mekanizması

İlk Darbe

Bugün için yağlı karaciğer hastalığı patogenezinde “two hits” (iki darbe) en geçerli kuram durumundadır (34). İlk darbe karaciğerin yağlı dejenerasyonu ya da hepatik steatoz için substrat olan yağın hepatositlerde birikimidir. Bu yağlı dejenerasyon organın ikinci darbeye (second hit) duyarlılığını artırır (10, 34).

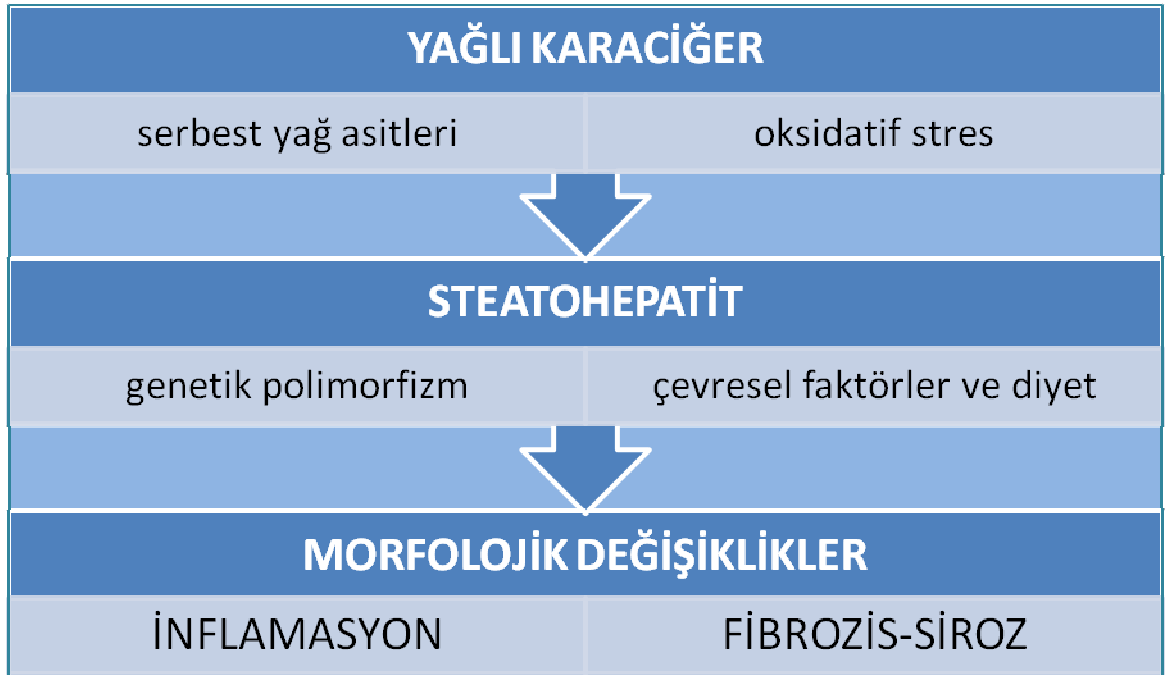
İnsülin direncinin NAYKH oluşumundaki ilk basamak olan “birinci darbe” gelişiminde en önemli faktör olduğu düşünülmektedir (7). İnsülin direnci hiperinsülinemiye neden olarak hormona duyarlı lipoprotein lipazı uyarır ve periferik lipolizi artırır. Karaciğere gelen yağ asidi miktarında artışa bağlı olarak karaciğer yağ asidi alımı artar. Hiperinsülinemi, karaciğerde yağ asitlerinin mitokondriyal beta-

oksidasyonunu engelleyerek ve glikolizi uyararak yağ sentezini artırır. Hiperinsülinemi aynı zamanda karaciğerde yağ asitlerinin trigliseridlere esterleşmesini ve karaciğerden salınımını da azaltır. Böylece insülin direnci NAYKH gelişiminde esas mekanizmayı oluşturmaktadır. Steatozis oluşuktan sonra karaciğer, ikinci vuruş olarak adlandırılan oksidatif strese duyarlı hale gelir.

İkinci Darbe

Steatozlu bireylerde hepatosit inflamasyonu, balonlaşma dejenerasyonu, nekroz ve fibroze gidişte oksidatif stres önemli rol oynar. NASH'da hepatosit zedelenmesinin temelidir (35) (Şekil 2). Serbest oksijen radikalleri mitokondrilerde üretilmektedir (36). Serbest radikal üretimi için önemli bir enzim sistemi endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 (CYP2E1) sistemidir.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında yağlanamadan sonra siroza ilerleme aşamaları Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. NAYKH'da ilerleme

İnsülin direnci, lipoliz artışı, karaciğere gelen serbest yağ asitlerinin artışı, artmış β -oksidasyon ile serbest oksijen radikallerin üretiminin arttığı saptanmıştır. CYP2E1 ve CYP3A4 sistemlerinin aktivasyonu ve hepatik demir birikimi serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur (şekil 3) (37).

Böylece serbest radikallerin, lipid peroksidasyon ürünlerinin ve sitokinlerin elektron transport zincirinin ve tüm hücre metabolizmasının aktivitesini azaltmaları anlamına gelir. Buna bağlı olarak steatohepatit hastalarında elektron mikroskopik mitokondri değişiklikleri, hücre solunumunda ve enerji elde edilmesinde azalma olur (36). Fazla demir varlığında serbest yağ asitleri peroksizomal β -oksidasyonu şant yaparak hidrojen peroksid oluşturmakta ve bu da reaktif hidroksil radikallerine dönüşmektedir (38).

Serbest oksijen radikalleri; lipid membranların peroksidasyonuna ve adipoz doku, hepatositler ve kuppfer hücrelerinden proinflamatuvar sitokin olan TNF- α salınımına sebep olur (39). TNF- α diğer redoks sensitif kinazlardan, I kappa B kinase (IKK- β) aktivasyonuna sebep olur. Bu da, proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) aktivasyonuna, daha fazla TNF- α salınımına ve daha fazla insülin rezistansına sebep olmaktadır (39). TNF- α insülin ile hepatosit membranlarında eksprese olan insülin reseptörü veya reseptöre bağımlı sinyal transdüksiyonu için rekabete girerek, Tip 2 diyabetteki insülin direncini arttırmakta veya diyabetik olmayanlarda glukozun hücreye alınmasını azaltmaktadır (40). Artan TNF- α , lipoliz ve serbest yağ asitlerinin artışına yol açmaktadır. Nötrofil kemotaksisi, apoptotik süreç ve fibrojenizde artmış TNF- α 'nın rolü gösterilmiştir (41). Hayvan deneylerinde kronik oksidatif stres varlığında hepatosit mitokondrilerinde adaptasyonlar geliştiği gösterilmiştir. NASH'lı hastalarda mega mitokondriler, mitokondriyal "uncoupling protein-2" (UCP-2) sentez artışı, mitokondrilerde inklüzyon kristal oluşumu ve ATP sentez defektleri saptanmıştır (42). NASH'lı hastalarda Kuppfer hücreleri TNF- α aktivasyonunu modüle eden interferon- γ (IFN- γ), interlökin (IL) IL-6, 10,12 ve prostaglandin E2 (PGE2) salgılar (43).

Lipopolisakkarit muamelesi sonrasında karaciğerde IFN- γ ve m-RNA'sında artış olmaktadır. Obezite ile ilişkili olan NAYKH'da Kuppfer hücre disfonksiyonu

söz konusudur. Kupffer hücreler steatohepatitte fibrozis gelişiminde anahtar rol oynar. İntestinal etanol üretimi obez steatohepatitlilerde daha yüksek saptanmıştır. Olasılıkla bu hastalarda intestinal bakteriyel aşırı çoğalmanın patofizyolojideki rolü, sebep olduğu etanol oluşumu, inflamasyon ve sitokrom P450 aktivasyonudur (44). UCP-2'nin mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aksamaya, ATP depleksiyonuna ve hepatositte hasarlanmasının kolaylaşmasına sebep olduğu öne sürülmektedir (44).

Serbest yağ asitleri, periferik dokularda ve özellikle hepatositlerde; insülin-reseptör etkileşmesi, postreseptör sinyalizasyon, glukoz taşıyıcı proteinlerin sentez ve hücre membranına yerleşmesi basamaklarında aksamalara yol açar. Serbest yağ asitleri insülin direnci yaratması yanında direk hepatositlere de toksik etki göstermektedir. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri lipid peroksidasyonunu arttırarak hepatosit hasarına sebep olur, doymuş yağ asitleri ise koruyucudur (45).

Serbest Yağ Asidi Toksikite Mekanizmaları;

1. Yüksek düzeylerde deterjan etkisiyle membran toksisitesi
2. Na⁺ / K⁺ ATPase inhibisyonu
3. Glikoliz inhibisyonu
4. Mitokondri fonksiyon bozuklukları
5. Protein kinaz C aktivasyonu
6. Mitokondrial β -oksidasyon inhibisyonu
7. Hücre içi Ca⁺⁺ homeostaz değişiklikleri
8. Uzamış peroksizom-prolifere olmuş aktive reseptör (PPAR α) aktivasyonu
9. Toksik serbest yağ asidi esterlerinin oluşumu
10. Lipid peroksidasyonu ürünü reaktif aldehidlerin oluşumu
11. Mitojen aktive protein (MAP) kinaz aktivasyonu.

Deneysel steatohepatit geliştirilmiş farelerde rejenerasyon azalmıştır. Bu farelerde yağlı hepatositlerin, G1 fazından S fazına geçemedikleri gösterilmiştir (46).

Steatohepatitte azalmış hücre rejenerasyon kapasitesi de patofizyolojide rol oynamaktadır (Tablo 3).

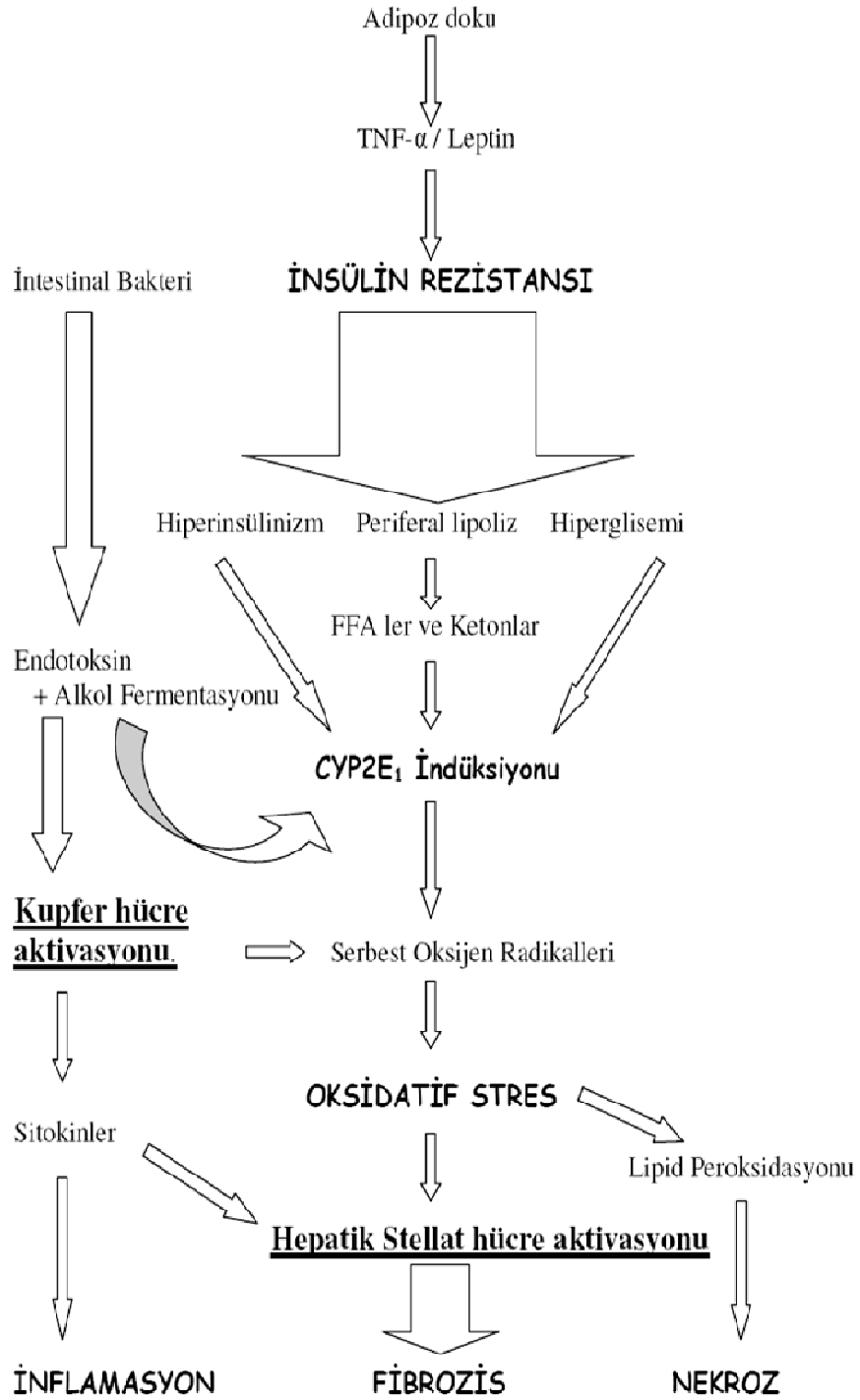
Tablo 2.3. Steatohepatitin Patogenetik Mekanizmaları

GÖRÜŞ	MEKANİZMA
İlk Darbe	
Steatoz	Dolaşımdaki insülin artışı Lipoliz ve FFA sentezinde artış β -oksidasyonda azalma
İkinci Darbe	
Oksidatif stres	CYP2E1 aktivite artışı
Genetik modifikasyon	PPAR α , CYP2E1/ 3A4 polimorfizmi
Besin depleasyonu	VLDL yapımında azalma
Sitokin artışı	TNF- α , IKK- β , NF- κ B artışı
Kupffer hücre disfonksiyonu	Endotoksin sensitivitesi, fagositik aktivite kaybı, artmış fibrojenez
Mitokondri disfonksiyonu	ATP homeostaz değişikliği UCP-2 artışı Oksidatif stres artışı
Hepatosit adaptasyonu	Rejenerasyon sürecinde yetersizlik
Fibrojenez	Stellat hücrelerde fibrojenik sitokinler ve büyüme faktörleri

Non-alkolik steatohepatitli bireylerin %40'ında karaciğerde orta derecede demir birikimi saptanmıştır (47). Bir sebep HFE gen mutasyonu olabilir. Alkolik steatohepatitte HFE genotipleri, bu populasyonda kontrol grubu ile aynı sıklıktadır (47). Nonalkolik steatohepatitte ise mutasyonların prevalansı yükselmiştir. C282Y heterozigot prevalansı %19-32 ve H63D mutasyonu için %31-56'ya ulaşmaktadır, kötü histolojik tablo ve transaminaz yüksekliği ile ilişkili olabilir (48).

Karaciğerde demir birikimi, artmış transaminaz değerleri hiperferritinemi ve normal transferin saturasyonu ile karakterize bir sendrom tariflenmiştir (49). Bu sendromun histolojik olarak steatohepatit ve insülin rezistansı ile yakın ilişkisi anlaşılmıştır (50). İnsülin rezistansında transferin reseptörlerinin doku dağılımlarının değişmesi ile bu tablonun oluştuğu öne sürülmüştür (51).

Hepatik demir serbest oksijen radikal oluşumunu katalizleyerek ve kuppfer hücre aktivasyonu yaparak lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi arttırmaktadır (52). Demir makrofajlarda NF- κ B ve TNF- α aktivasyonu yapmaktadır (53). Hastalık patogenezinde bir diğer olası faktör intestinal bakteriyel aşırı çoğalmadır (54).



Şekil 2.3. Nonalkolik Steatohepatiti ve Fibrozis Patogenezi

Fibrozis Patogenezi

Hepatik stellat hücreler, disse aralığında yerleşmiş sitokin ve büyüme faktörü sentezi ve sekresyonu yapabilen özelleşmiş hücrelerdir. Karaciğer fibrozisindeki hücre dışı matriks ve kollajen sentezinden sorumludurlar (Şekil 3). Oksidatif stres ve “transforming growth factor beta-1” (TGF β -1) hepatik stellat hücreleri aktive ederler. NASH’da hepatik stellat hücre aktivasyonu vardır ve fibrozis derecesi ile direkt ilişkilidir (55). Kupffer hücreleri ve hepatik stellat hücreler arasında sitokin aracılar ile kurulan bu ilişki fibrojeniz ile sonuçlanır. Hepatik stellat hücreler zone-III de perivenüler bölgede yoğunlaşmıştır. Buralarda Cyp2E1, 2A1 ve 3A4 aktivitesi fazladır (56). Nieto ve arkadaşları invitro deneylerde Cyp2E1 inhibitörleri ile hepatik stellat hücre aktivasyonunun tamamen geri döndürebildiğini göstermişlerdir (57). TGF β -1 hepatik stellat hücreleri myofibroblast benzeri hücrelere dönüştürerek kollajen sentezini artırır. NASH’lı bireylerde karaciğerde artmış TGF β -1 konsantrasyonları saptanmıştır. TGF β -1 hem Kupffer hem de stellat hücrelerden salınabilmektedir. Bir diğer büyüme faktörü stellat hücrelerden salınan “Bağ dokusu büyüme faktörü” olan “Connective tissue growth factor” CTGF’dir. İnsülin ile muamele edilmiş stellat hücrelerde artmış CTGF m-RNA düzeyleri saptanmıştır. Karaciğer sirozu ve nonalkolik steatohepatitteki fibrozisten sorumlu bu aracı molekülün insülin ile arasındaki bu ilişki, hiperinsülineminin direkt fibrozis üzerindeki etkisini göstermesi bakımından önemlidir. TNF- α ’ da CTGF salınımını arttırmaktadır (57). Leptin de fibrojenizi indükleyen bir diğer aracı moleküldür (58).

2.1.4 Klinik ve Laboratuvar Bulgular

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı olanların çoğu asemptomatiktir. Hastalarda tesadüfen hepatomegali veya karaciğer fonksiyon test bozuklukları görülebilir. Hastaların çoğu tanı konulduğunda karaciğer hastalığı ile ilgili semptom ve bulgu göstermez. Bununla beraber hastaların büyük bir kısmında yorgunluk kırılgılık ve sağ üst kadranda hassasiyet veya dolgunluk mevcuttur (59). Bacon ve ark.’nın bir çalışmasında, bu şikayetler ile başvuran hastaların üçte birinde histolojik olarak steatohepatit saptanmıştır (59). Tek fizik muayene bulgusu olabilen hepatomegali, hastaların yaklaşık %25’inde saptanır (60). Jinekomasti, telenjektazi, palmar eritem, spider anjiom gibi bulgular kronik karaciğer hastalığı gelişmeden

görülmez. Çocuklarda akantosis nigrikans gözlenebilir. Kriptojenik sirozlu hastaların büyük kısmı, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olanlarla benzer klinik ve demografik özelliklere sahiptir ve bu da etiyojide nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının olduğunu düşündürür (15).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan hastaların çoğunda sıklıkla saptanan tek laboratuvar bulgusu ALT, aspartat aminotransferaz (AST) veya her ikisinde birden hafif veya orta derecede artıştır. Hastaların bazılarında enzimler normaldir (61). AST-ALT oranı genellikle 1'in altında olup, fibrozisin ilerlemesi ve siroz gelişimi ile oran 1'in üzerine çıkar (26). Hastaların yarısına yakınında alkalen fosfataz (ALP) ve/veya γ -glutamilttransferaz (GGT) genellikle 2 kattan daha az olmak üzere, bir miktar artmış olarak bulunur (62). GGT artışının, insülin direncinin duyarlı bir belirteci olduğuna dair bazı kanıtlar mevcuttur. Bu nedenle GGT artışı, NAYKH için erken biyokimyasal bulgular arasında yer alır (62). 1/3'ten fazla hastada anti nükleer antikor (ANA) pozitif olabilir (63). Bazı hastalarda artmış ferritin ve/veya transferin saturasyonu söz konusudur (23). Bir çalışmada 80 NAYKH hastasının 50'sinde karaciğer fonksiyon testi anormalliği saptanmış, %26'sında fibrozis, %8'inde ise siroz görülmüştür (64). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı popülasyonunda hemokromatozis (HFE) gen mutasyon heterozigotluğu yüksek oranda saptanmış olup artmış demir varlığı bu hastalarda prognozu kötü etkilemektedir (47). Asit, varis kanaması ve hepatik ensefalopati dekompanse sirozu düşündürür. Sarılık geç evrede olur ve ilerlemiş karaciğer yetmezliğini gösterir (65).

2.1.5 Tanı

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısı genellikle asemptomatik karaciğer enzim yüksekliği, karaciğer yağlanması radyolojik bulguları veya açıklanamamış hepatomegalisi olan hastalarda düşünülür. Tanı için alkol kullanımının olmaması gerekir. Erkeklerde 30 gr/gün, kadınlarda 20 gr/gün alkol kullanımı alkolik karaciğer hastalığının ortaya çıkması için yeterli olur. NAYKH tanısı için viral, metabolik, otoimmün ve herediter faktörler ile ilaç veya toksin kullanımı dışlanmalıdır (21). Klinik tanı ve karaciğer testleri histolojik evre ile direk ilişkili değildir. Noninvazif görüntüleme yöntemlerinden ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve magnetik rezonans hepatik steatozu saptayabilir ve tanısal test olarak kullanılabilirler. Fakat bu

metodların hiçbiri hastalığın evresi hakkında güvenilir bilgi veremez. Direkt BT ve USG karşılaştırıldığında, USG yağlı değişikliği saptamada daha duyarlı bulunmuştur. Fakat fokal ya da yamalı yağlı infiltrasyonda BT ve MRI daha üstündür. Kantitatif bir değerlendirme gerekliyse veya multipl karşılaştırmalı bir çalışma planlandıysa BT ve Proton manyetik rezonans spektroskopisi (PMRS), USG'ye göre daha üstün olduğundan tercih edilmelidir (25, 65). Bu görüntüleme yöntemlerinin hiç biri yağlı karaciğer ve steatohepatit ayırımını yapamaz. Bu konuda az olan çalışmaların başını çeken Saadeh ve arkadaşlarının çalışmasında biyopsi ile NAYKH saptanan (8 hasta sadece yağlı karaciğer ve 17 hasta NASH) 25 hastada USG, kontrastsız BT ve MRI incelemesi yapılmış ve bu görüntüleme yöntemlerinin hiç biri NAYKH'da NASH ayırımını sağlamada başarılı bulunmamıştır (66). Klinik şüpheyi desteklemek ve histolojik evreleme yapabilmek için altın standart olan yöntem karaciğer biyopsisidir (30). Histolojik evreleme, NAYKH hakkında önemli prognostik bilgiler sağlar, takip ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi konusunda klinisyeni yönlendirir.

Histolojik kriterler üzerine çok fazla sayıda görüş birliği olmasa da Brunt klasifikasyonu patolojide genel olarak kabul görmektedir (tablo 2,4) (27).

Tablo 2,4. Brunt Klasifikasyonu (Non-alkolik Steatohepatitte Hastalık Aktivitesinin Derecelendirilmesi ve Steatozis Evrelendirilmesi)

Grade	Tanımlayıcısı	Steatozis	Hepatosit Balonlaşması	Lobüler İnflamasyon	Portal İnflamasyon
1	Hafif	Esas olarak %5-33 Makroveziküler Lobüllerin %66'ya varan bir kısmını etkileyebilir.	Ara sıra, zon 3	Dağınık nötrofiller, ara sıra mononükleer hücreler	Yok veya hafif
2	Orta derecede	>%33 Herhangi bir derecede olabilir, genellikle miks makro ve mikroveziküler	"Belirgin" (veya kesin), zon 3	Balonlaşmış hepatositlerle ve perisellüler fibrozisle ilişkili nötrofiller saptanabilir, hafif kronik enflamasyon görülebilir.	Hafif veya orta derecede
3	Şiddetli	Tipik olarak >%66 (Panasiner) Çoğunlukla miks steatozis	Belirgin, baskın olarak zon 3	Dağınık akut ve kronik enflamasyon, zon 3 balonlaşma ve perisinüsoidal fibrozis alanlarında nötrofiller konsantre olabilir.	Hafif veya orta şiddette

Stage	Açıklama	Yorum
1	Zon 3 perivenüler, perisinüsoidal (perisellüler) fibrozis	Bu yerlerdeki fibrosis fokal veya yaygın olabilir.
2	Evre 1 değişiklikleri + periportal fibrozis	Periportal fibrosis fokal veya yaygın olabilir.
3	Köprüleşme fibrosisi	Fokal veya yaygın olabilir.
4	Siroz	Siroz

2.1.6 Klinik Seyir ve Prognoz

Hastaların % 45-100'ü asemptomatiktir. Bazı hasta gruplarında ve özellikle çocuklarda sağ üst kadranda ağrı, dolgunluk, karında rahatsızlık hissi, yorgunluk ve halsizlik olabilir (2). Hastalık genelde hasta başka nedenlerden dolayı tetkik edilirken saptanır. Hepatomegali % 12-75 oranında görülür (2). Ciddi karaciğer hasarı olan az bir grup hastada kaşıntı, anoreksi ve bulantı olabilir. Asit, varis kanaması ve hepatik

ensefalopati dekompanse sirozu düşündürür. Sarılık geç evrede olur ve ilerlemiş karaciğer yetmezliğini gösterir (65).

Prognozu halen net olarak bilinmemektedir, çünkü biyopsi ile izlenen uzun dönem çalışmalar çok az ve yetersizdir (2). Genelde iyi huylu bir hastalık olarak kabul edilir. NAYKH seyri histolojik tipe göre değişkendir. Sadece hepatik steatozu olanlarda iyi bir klinik gidiş varken, ilerlemiş forma sahip hastalarda ise kronik sekeller, siroz ve ölüm olabilir (2). Bir derlemede 3 çalışmadan alınan ve 9 yıl izlenen 28 hastada görülen histolojik değişiklikler bildirilmiştir. Hastaların %27'sinde fibroziste ilerleme, % 19'unda ilerlemiş siroz, % 4'ünde iyileşme ve %50'sinde değişiklik olmamıştır (2). 132 hastaya sahip bir çalışmada; siroz sıklığı NASH grubunda steatozu olanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Yine bu çalışmada siroz sonuçları ve karaciğer ile ilişkili hastalıklardan ölüm NAYKH'da aynı değildir. Karaciğer biyopsisinde balonlaşma lezyonu ve Mallory cisimciği olanlarda klinik sonuçlar daha kötüdür. Bazı çalışmalarda da NAYKH'nın kriptojenik sirozun nedeni olabileceği bildirilmiştir (2, 25).

Kriptojenik siroz grubunda diğer hastalıklardan siroz olan gruplara göre daha fazla oranda diyabet ve obezite görülür (25). Bugianesi ve arkadaşları siroz zemininde hepatosellüler karsinom gelişen 786 vakayı incelemişler. 44 vakada kriptojenik siroz tespit edilmiş. Bu grubun 23 tanesi takip edilerek viral ve alkol nedenli diğer vakalarla karşılaştırılmıştır. Bu grupta obezite ve diyabet sıklığı anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Ayrıca glukoz, kolesterol ve trigliserid seviyeleri ve insülin direnci yüksek bulunmuştur. Demir durumu ve HFE mutasyonu yönünden fark saptanmamıştır. Sonuçta kriptojenik siroz zemininde hepatosellüler karsinom olanlarda NAYKH'nı destekleyen bulgular, viral ve alkolik etiyolojilere göre daha fazladır. Fakat hepatosellüler karsinomun NAYKH seyrinin bir parçası olup olmadığı belli değildir. Hayvan deneylerinde leptinden yoksun farelerde lipid birikimi ve hepatosit çoğalması ile hepatomegali oluşmuştur. Buna hepatosit apoptozisinde baskılanmanın eşlik ettiği gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak obeziteye bağlı metabolik değişiklikler ile karaciğerde neoplastik süreçlerin başlatılabildiği söylenebilir (25).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında yaklaşık %15-20'sinde daha sonradan NASH gelişir. NASH olan hastaların yaklaşık %25'inde de yıllar içersinde

siroz gelişir. 10 yıl içinde %10-12'lik kısmında karaciğer ile ilişkili ölüm olur (28). Neden bazı hastaların NASH'e ilerlediği ve komplikasyonlarla seyrettiği belli olmamakla beraber, birçok çalışmada risk faktörleri tanımlanmaya çalışılmıştır (29, 30). NAYKH'nın uzun dönem prognozu bugün için tam bilinmemektedir (31).

2.1.7 Tedavi

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının tedavisi, eşlik eden hastalıkları kontrol etmek ve hepatotoksik ajanlardan kaçınma esasına dayanır (65, 68). En önemli tedavi yaklaşımı, kilo kaybı, hiperlipidemi ve hipergliseminin tedavisi ve toksik olan ilaçların bırakılmasıdır (30).

Eşlik Eden Hastalıkların Tedavisi:

- **Metabolik ve Kalıtsal Durumlar:** Klinik ve epidemiyolojik bilgiler, obezite ve tip 2 diyabetin major birlikte görülen hastalıklar ve hastalık sürecine zemin hazırlayan durumlar olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bunların önlenmesi ve uygun tedavileri de iyileşmeye veya hastalığın kontrol altına alınmasına yardımcıdır (65).
- **Kilo Verme:** Kilo kaybı eğer yavaş ve aşamalı ise histopatolojide düzelme sağlanabilir. Karaciğer histolojisini normale döndürmek için gerekli kilo kaybı derecesi tanımlanmamıştır. Yüksek derece yağlı infiltrasyonu olan hastalarda hızlı kilo kaybı ve belirgin yağ azalması portal inflamasyon ve fibrozisi artırır (29). Benzer olarak uzun süren açlık da perisellüler ve portal fibrozis, safra stazı ve fokal nekroz yapabilir. Bu paradoksal etki, yağ mobilizasyonuna sekonder artmış serbest yağ asidi seviyelerine bağlı olabilir. Aşamalı kilo kaybı ortalama 0.45-0.9 kg/1 hafta olmalı ve toplamda ilk başta normalin %30 üstünde olanlar için %10 kilo kaybı hedeflenmelidir (69). Tip 2 diyabetli ve/veya obez hastalar diyet ve egzersiz programına alınmalıdır. Diyabetiklerde HbA1C mutlaka <7 olmalıdır. hiperlipidemi kontrol altına alınmalıdır. Obezite için gastrik ve intestinal by-pass cerrahisi ciddi yan etkileri nedeniyle önerilmez (35).
- **İnsülin direncinin tedavisi:** İnsülin direncini düzeltmek için 2 çeşit ilaç grubu vardır (65):

1. Biguanidler (örnek; metformin)
2. Tiazolidineodionlar (örnek; rosiglitazon ve pioglitazon)

Metforminin mekanizması tam bilinmemekle beraber serum aminotransferazlarda düzelmeye yaptığı gösterilmiştir, fakat histolojik çalışmalar azdır (70). Tiazolidineodionlar, PPAR-gama reseptörüne etki ederek insülin duyarlılığını artırır. Biyokimyasal ve histolojik iyileşme görülmüştür (71).

- **Lipid düşürücü ajanlar:** Klofibrat, gemfibrozil ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri kullanılmıştır. Amaç trigliserid içindeki yağ oranının azaltmaktır. Antihiperlipidemikler ile az sayıda çalışma vardır. Çalışmalarda kişi sayısı, takip ve biyopsi kontrolleri yetersizdir. Klofibrat çalışmalarda başarılı bulunmazken, gemfibrozil ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile olumlu sonuçlar alınmıştır (72, 73).

Hepatosit koruyucu ajanlar:

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında bazı ajanlar kullanılmış ve olumlu bulunmalarından dolayı hepatik koruyucu etkileri olduğuna inanılmıştır. Bunlar ursodeoksikolik asid (UDKA), N-asetilsistein, betain, vitamin E, vitamin C, lesitin, beta-karoten ve selenyumdur (67).

Ursodeoksikolik asid, hepatotoksik endojen safra asitlerini hepatotoksik olmayanlarla değiştirir, ayrıca membran koruyucu, sitoprotektif ve immünolojik etkileri de vardır. NASH olan hastalarda UDKA tedavisi ile serum aminotransferaz, alkalen fosfataz, GGT seviyelerinin düzeldiği, hepatik steatozun gerilediği gösterilmiş fakat inflamasyon ve fibroziste düzelmeye olmamıştır (74).

Betain, S-adenosin metiyonin seviyelerini artırarak etanole bağlı trigliserid depolanmasını engeller. N-asetilsistein hepatositlerde glutatyon seviyelerini artırarak oksidatif stresi önler. NASH'li hastalarda serum aminotransferaz ve GGT seviyelerinde önemli oranda düşme olmuştur (75).

Antioksidanlar, potansiyel olarak hücreleri lipid peroksidasyonunun reaktif ürünleri ve serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasardan korurlar. Steatohepatitli, obez, pediatrik hasta grubunda yapılan bir çalışmada, E vitamininin,

kilodan bağımsız olarak aminotransferaz düzeylerinde düşmeye neden olduğu gösterilmiştir (76). Oksidanlar, mitokondriyal disfonksiyona ve nükleer DNA'ya zarar vermek yoluyla, DNA tamir enzimlerinin aktivasyonuna neden olurlar. Sonuçta enerji açığı artar. Bu enzimlerin inhibisyonu veya alternatif enerji kaynaklarının sağlanması NAYKH olan hastalarda faydalı olabilir (30).

TNF- α üretiminin veya aktivitesinin engellenmesi ile NASH olan hastalarda karaciğer fibrozisi gelişiminin önlenebileceği düşünülmektedir. Anti TNF- α etkisi olan pentoksifilinin akut alkolik hepatitte yararlı olduğu görülmüştür (77).

Karaciğer demirinin karaciğerde fibrozisi ve oksidatif stresi artırması nedeni ile NASH'te insülin direncine eşlik eden patogenetik bir faktör olduğu düşünülmektedir. NASH hastalarında yüksek serum ferritin seviyeleri ve karaciğer demir boyamalarında pozitiflik sıklıkla görülür. NASH olan metabolik sendromlu hastalarda hiperferritinemi ve orta derece demir yükü sıklıkla bulunur. 6-12 ay flebotomi uygulanan NASH'li hastalarda serum aminotransferaz seviyelerinde önemli oranda düşme, karaciğer biyopsilerinde inflamasyonda önemli bir gerileme gösterilmiştir (78).

3. Karaciğer Transplantasyonu:

Non-alkolik steatohepatit karaciğer transplantasyonu gereken siroza ilerleyebilir. NASH transplantasyon sonrası sıklıkla tekrar eder. Karaciğer transplantasyonu, NASH oluşumuna neden olan metabolizma bozukluğunu düzeltmediği için bu hastalarda kilo verme, hipergliseminin ve hiperlipideminin düzeltilmesi çok önemlidir (67).

2.2 Silymarin



Silybum marianum (deve diki) günümüzde karaciğer hastalığı tedavisinde en çok araştırılmış bitkidir. Bu bitkinin aktif bileşenlerinin tümüne silymarin adı verilmektedir. Silymarinin bileşenlerinin yapısı 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır.

Silymarini % 70-80 flavonolignanlar ve % 20-30 oranında tanımlanmamış polifenolik bileşenler oluşturur. Silymarinin doğal bileşenlerinden olan silybin en etkili olandır ve silymarinin % 80'ini oluşturur. Bunun dışında isosilybin, silychristin ve silydianin diğer bileşenlerdir (79). Silybum tohumları kanıtlanmış bir hepatoprotektif madde olan betaine ve esansiyel yağ asitleri de içerir. Bu maddeler silymarinin antiinflamatuvar etkisine katkıda bulunmaktadır.

2.2.1 Silymarinin Farmokinetiği

Silymarin suda çözünmez, bu nedenle bitkisel çay olarak tüketilememektedir. Standart kapsüllenmiş bitki ekstresi olarak kullanılır. Oral alımı sonrası emilim nispeten az olup, yapılan çalışmalarda ratlarda oral uygulamadan 24 saat sonra safrada %2-3 oranında tespit edilmiştir. Hayvanlarda ve insanlarda oral alımı takiben pik plazma konsantrasyonuna 4-6 saat sonra ulaşılır (79). Vücuttan atılımı esas olarak safra yolu ile, az bir kısmı da böbrekler yolu ile olmaktadır. Yarılanma ömrü 6-8 saattir (79).

2.2.2 Silymarinin Klinik Endikasyonları

Silymarinin klinikte en önemli kullanım alanı Amanita mantar zehirlenmesidir. Amanita genusuna ait mantarlar Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak bulunmaktadır. Bu genusta aşırı toksik pek çok mantar cinsi bulunmaktadır. Amanita mantarları amanitin ve phalloidin adı verilen çok güçlü hepatotoksinler içermektedir. Bu mantarların yanlışlıkla alımına bağlı her yıl Amerika ve Avrupa'da ortalama 60 zehirlenme vakası olmakta ve mortalite % 30 olarak bildirilmektedir (80).

Farelerde silymarinin Amanita zehirlenmesinden hemen önce veya 10 dakika içinde uygulanması karaciğer toksitesini %100 engellemiştir. Silymarinin ilk 24 saat içinde uygulanması ağır karaciğer hasarı ve ölümü engellemiştir (81). Köpeklerde yapılan bir çalışmada silymarinin belirgin hepatoprotektif etkisi karaciğer enzimleri ve karaciğer biyopsisi üzerinde gösterilmiştir.

Silymarinin hepatoprotektif etkisi insanlarda amanita toksini maruziyeti sonrası defalarca gösterilmiştir. Silymarin ile tedavi edilen 18 hasta serisinde, 1 hasta hariç tüm hastalar hayatta kalmıştır. Silymarinin *Amanita phalloides* mantar

alımından 48 saat sonra dahi uygulanması ağır karaciğer hasarını engellemede etkilidir (82). 1995 yılında yayınlanmış bir çalışmada 41 mantar zehirlenmesi vakasında silymarin ile tedavi edilen grupta ölüm olmamıştır (83). Amanita mantarı zehirlenmesi sonrası tedavi altındayken 3. günde kötüleşen ve intravenöz silybin tedavisi başlanan vakada klinik düzelme gözlemlendiği bildirilmiştir (83).

Silymarinin hepatoprotektif etkisini gösteren pek çok çalışma bildirilmiştir. Bir askeri hastanede karaciğer enzim yüksekliği olan (çoğunlukla alkol alımına bağlı) hastaların 4 haftalık takibinde 420 mg/gün silymarin uygulanmasının enzimleri belirgin olarak düşürdüğü gözlenmiştir. Histolojik incelemede karaciğer biyopsilerinde anlamlı düzelme saptanmıştır (84). Kronik aktif hepatiti olan 20 hasta ile yapılan bir çalışmada 240 mg/gün silybin-fosfatidilkolin kompleksinin 7 gün uygulanması serum AST, ALT, GGT, ALP ve total bilirubin düzeylerinde anlamlı düşüş sağlamıştır (85).

Kronik alkolik karaciğer hastalığı olan 36 hasta ile yapılan başka bir çalışmada 6 ay süreyle 420 mg/gün silymarin uygulanması serum AST, ALT, GGT, total bilirubin düzeylerinin normale gelmesini ve karaciğer biyopsilerinde düzelme sağlamıştır. Ayrıca tedavi grubunda prokollajen III (aktif fibrozis markeri) belirgin düşük saptanmıştır (86). Karaciğer sirozu olan 170 hasta ile yapılan bir Avusturya çalışmasında ortalama 41 ay 420 mg/gün silymarin uygulaması sağ kalım süresini belirgin olarak uzatmıştır (tedavi grubunda %58, plasebo grubunda %39) (87). Yukarıda belirtilen tüm çalışmalarda silymarinin bir yan etkisi bildirilmemiştir.

Silymarinin etkili bulunmadığı çalışmalar da bildirilmiştir. Biyopsi ile alkolik hepatit tanısı konmuş 116 hasta ile yapılmış bir Fransız çalışmasında 3 ay süreyle 420 mg/gün silymarin uygulaması hastalık seyrini etkilememiştir. Alkolik hepatit skorunun iyileşmesi ve serum aminotranseferaz düzeylerindeki gerileme tedavi ve plasebo gruplarında benzer bildirilmiştir. Çalışma süresince 4 hasta hepatik yetmezlikten kaybedilmiş, ölüm oranında gruplar arasında bir fark saptanmamıştır. Diğer çalışmalara benzer olarak yan etki bildirilmemiştir (88).

2.2.3 Etki Mekanizması

Silymarinin karaciğer hücrelerine pek çok toksine karşı koruduğu bildirilmiştir; örneğin asetaminofen, etanol, karbontetraklorid ve D-galaktozamin.

Ayrıca iskemik hasar, radyasyon, demir toksitesi ve viral hepatitte etkili bulunmuştur (89).

Silymarinin hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidasyon, anti lipid peroksidasyonu, güçlü detoksifikasyon ve glutatyon azalmasına karşı koruyucu etkileridir (90). Silymarin liopoksijenaz enzimini inhibe ederek karaciğerden lökotrien oluşumunu engellemektedir (90). Çalışmalarda ayrıca silymarinin hepatosit protein sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, mast hücrelerini stabil ettiği, immun fonksiyonları modüle ettiği ve anti-inflamatuvar ve antifibrotik etkileri gösterilmiştir (90).

Silymarinin hepatic dokuda rejenerasyonu stimule etmesi hasarlı karaciğerde protein sentezini arttırmasıyla olmaktadır. Hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde artmış protein senteziyle beraber ribozom oluşumu ve DNA sentezinde belirgin artış bulunmuştur. Artmış protein sentezi sadece hasarlı karaciğerde (parsiyel hepatotektomi) saptanmış, kontrol grubunda gözlenmemiştir (91). Protein sentezi artış mekanizması bilinmemektedir. Ancak bazı yazarlar silymarinin fizyolojik bir regülatörü taklit ettiğini ve silybinin polimeraz enzimine bağlanarak ribozom oluşumunu arttırdığını düşünmektedirler. Silymarinin protein sentezini arttırıcı etkisi malign karaciğer dokusunda gözlenmemiştir (91).

Günümüzde non-viral kronik hepatit tedavisinde immunosupresif/anti-inflamatuvar ajanlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hayat kurtarıcı olsa da uzun dönemde ciddi yan etkilere sahiptir. Botanik anti-inflamatuvar ilaçlar güvenli ve etkili alternatif tedavi seçenekleri sunmaktadır.

Silymarinin hepatic dokuda belirgin anti-inflamatuvar etkileri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu etkiler mast hücre stabilizasyonu, nötrofil migrasyon inhibisyonu, kuppfer hücre inhibisyonu, lökotrien ve prostoglandin sentez inhibisyonudur (92).

Karaciğer fibrogenezinde hepatic stellat hücreler merkezi rol oynamaktadır. Bazı fibrotik etkilere cevap olarak profilere olurlar ve miyofibroblastlara dönüşürler ve bu hücrelerde karaciğerde kollajen liflerin depozisyonundan sorumludur. Silybin (10^{-4} mol/l konsantrasyonda) izole edilmiş rat hepatic stellat hücrelerinde proliferasyonu %75 oranında geriletmiştir. Stellat hücrelerinin miyofibroblastlara

dönüşümünü ve fibrozis için gerekli ekstraselüler matriks bileşenleri gen ekspresyonunu azaltmıştır (93).

Silymarinin hayvanlarda karaciğer fibrozisini yavaşlattığı ve iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Safra yolları total oklüze edilmiş ratlarda inflamasyon olmadan progresif karaciğer fibrozisi gelişmektedir. Silymarin (50 mg/kg/gün) bu fibrozisi kontrol grubuna oranla %30-35 oranında azaltmıştır. Safra kanalı oklüzyonu sonrası sürekli 6 hafta veya sadece son 2 hafta silymarin uygulaması eşit derecede etkili bulunmuştur. Düşük dozda (25/mg/kg/gün) etkili bulunmamıştır (94).

Kolşisin fibroziste makrofaj stimülasyonunu inhibe ederek antifibrotik ve anti-inflamatuvar etki gösterir. Bu etkileri ile karaciğer fibrozisini engellemede kullanılmıştır ancak ciddi yan etki profiline sahiptir. Silymarin karbon tetraklorid ile ratlarda oluşturulan karaciğer fibrozis çalışmasında kolşisine benzer derecede etkili bulunmuştur, ayrıca yan etki gözlenmemiştir (95).

Silymarin sitokrom P450 (Faz I) detoksifikasyon sisteminde inhibitör etkiye sahiptir. Farelerde yapılan bir çalışmada silybinin spesifik pek çok P450 enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (96). Bu etki Amanita zehirlenmesinde protektif etkilerini açıklayabilir. Amanitin toksini P450 sistemi ile biyoaktif edildikten sonra hepatositler için ölümcül hale gelir. Ayrıca, silymarin ve diğer antioksidanlar P450 enzimleri ile oluşan serbest radikallere karşı koruma sağlarlar.

Glukuronidasyon önemli bir Faz II detoksifikasyon yolağıdır. Vücuttan en sayıda çok toksinin atılma yolu glukuronidasyon yolağıdır. Toksinler safra ile vücuttan atılmak üzere glukuronik asitle konjuge edilmektedir. Ayrıca östrojen de vücuttan bu yolla atılır. Barsaktaki bazı bakterilerde bulunan beta-glukuronidaz enzimi glukuronik asidi bağlı bulunduğu maddeden ayırır ve enerji kaynağı olarak kullanır. Bu reaksiyonla orijinal madde yeniden gastrointestinal sistem tarafından emilerek kişide yeniden maruziyete neden olur. Silymarinin sağlıklı kişilerde beta-glukuronidaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (97).

Silymarinin karaciğer üzerine immunomodulator etkisi pek çok çalışmada araştırılmıştır. İki Macar çalışmasında silymarinin immün fonksiyon üzerine pozitif etkisi gösterilmiştir. İlk çalışma biyopsi ile kanıtlanmış kronik alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda yapılmış ve bu hastalarda görülen düşük T-hücre sayısı,

yüksek CD8+ hücre sayısı ve artmış lenfosit sitotoksitesi 6 aylık silymarin uygulaması ile gerilemiştir (86).

İkinci çalışmada 40 alkolik siroz hastasına silymarin, aminoimidazole-karboksamide-fosfat veya plasebo 1 ay süre ile çift-kör olarak verilmiştir. Tedavi gruplarında silymarin serum AST, ALT, GGT ve total bilirubin düzeylerini normale çevirmiş ve lenfositotoksiteyi baskılamıştır (98).

2.2.4 Dozaj/Toksisite

Silymarin suda çözünmez, standart kapsüllenmiş bitki ekstresi olarak kullanılır (%70-80 silymarin). Hayvanlarda silymarinin yüksek dozda kısa ve uzun süreli kullanımında herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. İnsan çalışmalarında da genelde yan etki saptanmamıştır. Erişkinler için silymarin dozu iki veya üç bölünmüş doz halinde 240-900 mg/kg/gün'dür. Daha yüksek dozlarda (>1500 mg/gün) silymarinin laksatif ve safra sekresyonunu ve akımını arttırıcı etkisi oluşmaktadır. Hafif alerjik reaksiyonlar bildirilse de, hiç biri tedavi kesilmesini gerektirecek düzeyde olmamıştır (98).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları ve Deney Protokolü

Çalışmamızda ağırlıkları 230 ± 20 gr olan 21 adet Wistar cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Ratlar sınırlama olmadan standart rat yemi (Bil Yem, Ankara) veya yüksek yağ içerikli diyetle ve şehir şebeke suyu ile 12 hafta boyunca beslendi. NASH modeli oluşturmak için model ve silymarin grubundaki ratlara standart rat yemine %20 oranında domuz yağı ve %2 oranında saf kolesterol (≥ 95 lanolin kolesterolü, Fluka, Sigma-Aldrich) eklenerek verildi. Ortam ısı $20-24^{\circ}$ C arasında tutuldu ve gündüz-gece ışık siklusuna uyacak şekilde aydınlatıldı. Çalışmanın tüm prosedürleri için Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi'nden onay alındı.

Ratlar, ortama uyum sağlamaları için deney başlangıcından iki hafta önce her grupta 7 adet olacak şekilde üç gruba randomize edildi ve Grup II ve III'teki ratlara 2 hafta boyunca yüksek yağ içerikli diyet verildi.

Grup I (7 rat): Kontrol grubu (C). Bu ratlara 1 ml distile su intragastrik gavaj yoluyla 12 hafta verildi.

Grup II (6 rat): Model grup (M). Yüksek yağ içerikli diyet Bu ratlara 12 hafta boyunca NASH modeli oluşturulmak üzere yüksek yağ içerikli diyet verildi.

Grup III (7 rat): Silymarin tedavi grubu (SM). Bu ratlara 12 hafta boyunca intragastrik gavaj yoluyla 40 mg/kg/gün Silymarin (SM) ve yüksek yağ içerikli diyet verildi.

Deneyin 10. haftasında model grubundan bir rat servikal yumuşak doku enfeksiyonu nedeni ile kaybedildi.

3.2. Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Çalışılması

Deney sonunda ratlar bir gece önceden aç bırakıldı. Ertesi gün ratlar, ketamin anestezisi altında kardiyak 5-10 ml kan alınmasını takiben 'ekssanguiasyon' metodu ile sakrifiye edildi ve karaciğer doku örnekleri alındı. Anestezi altında rat ağırlıkları ve ardından çıkarılan karaciğer doku ağırlıkları tartıldı. Doku örneklerinin bir parçası

histopatolojik incelemeler için formaldehit solüsyonu içine konuldu. Kalan kısmı, daha sonra doku tetkikleri için kullanılmak üzere vakit kaybedilmeden -80° C buzdolabına kaldırıldı.

Kan örnekleri 5000 devirde 3 dakika santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve serum alanin aminotransferaz (ALT), gama glutamil transferaz (GGT), total kolesterol, HDL, trigliserid, açlık kan şekeri düzeyleri Cobas İntegra 800, Roche cihazında çalışıldı.

İnflamatuvar sitokinlerden serum IL-1 β , IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeyleri ELISA yöntemi ile sırası ile Biosource rat IL-1 β ELISA kiti, Biosource rat IL-6 ELISA kiti, Biosource rat TNF- α ELISA kiti ve Biosource rat TGF- β ELISA kiti ile çalışıldı.

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Karaciğer doku histolojisi ‘Hematoksilen-Eozin’ ve ‘periodic-acid Schiff’ boyamaları ile ışık mikroskopisi ile incelendi ve ‘Brunt skorlaması’ kullanılarak nekroinflamatuvar aktivite ve steatoz derecesi değerlendirildi. Brunt skorlama sistemi tablo 4’ te gösterilmiştir (27). Mason trikrom ve Gomory retikülün boyaları ile fibrozis ve yapısal değişiklikler değerlendirildi. Fibrozis değerlendirilmesi için zon 3 perisinüzoidal, portal ve köprüleşme fibrozisi değerlendirildi.

Brunt ve arkadaşlarınca önerilen sistem ana yapısı bakımından kronik hepatitlerdekine benzemekteyse de doğal olarak değerlendirmeye alınan kriterler bakımından farklılıklar taşımaktadır. Bu yöntemde yağlanma ve nekroinflamatuvar aktivite grade I, II, II (hafif, orta, ağır) olarak derecelendirilmektedir. Çalışmamızda karaciğer doku örneklerinde NASH’da yağlanma ve nekroinflamatuvar aktivite grade değerlendirmesinde esas etkili parametreler olan makroveziküler steatoz, balon dejenerasyon, lobuler inflamasyon ve portal alan inflamasyonunu inceledik.

3.4. İstatiksel Analiz

Sonuçlar SPSS istatistik analiz programı yardımı ile one way ANOVA yöntemi ile değerlendirildi. Takiben gruplar arası karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama değer \pm standart sapma (\pm sd) olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Deney Sonunda Ratların Özellikleri

Araştırmaya dahil edilen sağlıklı kontrol grubundaki (grup I) ratların çalışma sonu ağırlıkları $344,4 \pm 11$ mg, Grup II'deki (model grubu) ratların $342,16 \pm 14$ mg, grup III slimarin grubunda $361,2 \pm 16$ olarak bulundu. Rat ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Silymarin grubunda hem rat ağırlıkları hem de karaciğer ağırlıkları kontrol ve model gruba göre yüksekti. Karaciğer ağırlıkları ve karaciğer ağırlıklarının total rat ağırlığına oranında açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Tüm gruplarda deney sonu ratların özellikleri tablo 4.1'te verilmiştir.

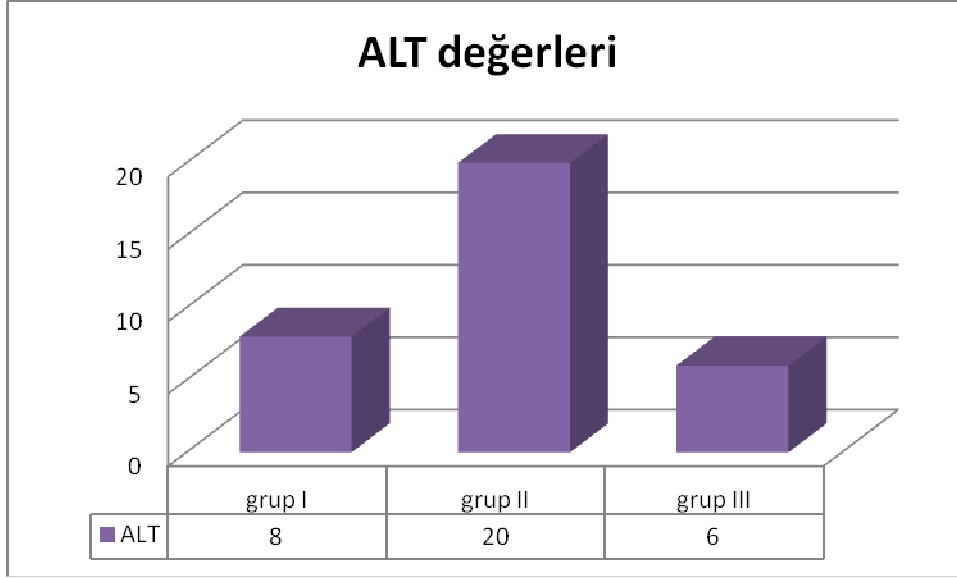
Tablo 4.1. Deney sonunda ratların özellikleri

Özellik	Grup I	Grup II	Grup III	P değeri
Ağırlık (mg)	$344,4 \pm 11$	$342,16 \pm 14$	$361,2 \pm 16$	$P > 0.05$
Karaciğer ağırlığı (mg)	$11,4 \pm 0.8$	11.6 ± 1.1	12.9 ± 0.4	$P > 0.05$
KC/rat ağırlığı oranı	$0,033 \pm 0.003$	0.034 ± 0.003	0.036 ± 0.001	$P > 0.05$

4.2. Biyokimyasal bulgular

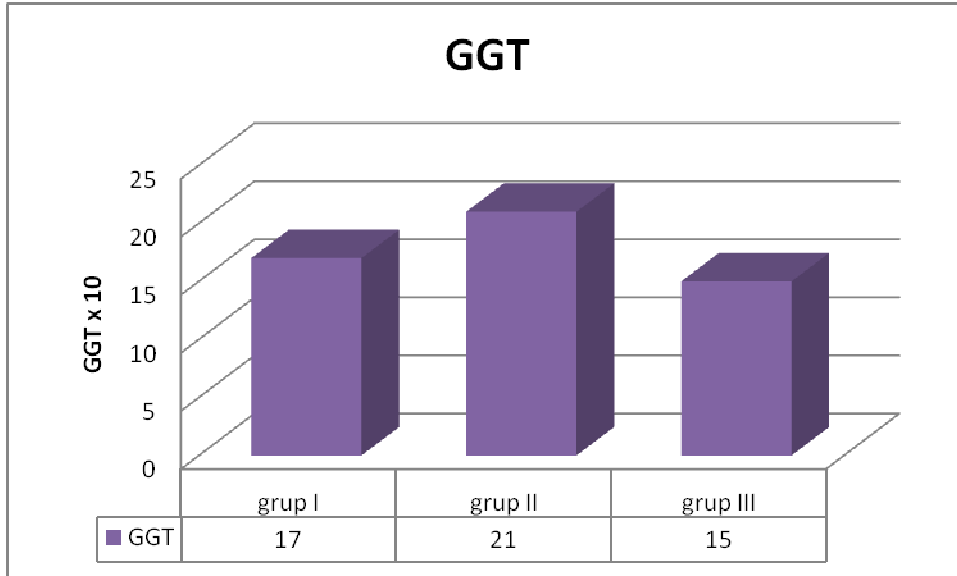
4.2.1. Karaciğer enzimleri, glukoz ve lipid parametreleri

Deney sonunda serum ALT düzeyleri model grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p = 0.04$). Silymarin grubunda ALT düzeyleri model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış ve kontrol gruba benzer şekilde normal düzeylere yaklaşmıştır ($p = 0.018$) (Şekil 5).



Şekil 4.1. Gruplara göre serum ALT değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Serum GGT düzeyleri model grupta kontrol grubundan daha yüksekti ve bu değerler silymarin grubunda model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da geriledi ($p>0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Gruplara göre serum GGT değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Deney sonunda serum total kolesterol düzeyleri model grupta ve silymarin grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.003, 0.002). Silymarin grubunda total kolesterol düzeyleri model gruba göre daha yüksekti ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Serum HDL

düzeyleleri en yüksek saptanan grup silymarin grubu idi. Silymarin grubunda HDL düzeyleleri kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olmasına ($p=0.04$), karşın model grupla anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0.05$). Model grupta ve silymarin grubunda serum trigliserid düzeyleleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değereleleri 0.03, 0.009). Silymarin grubunda trigliserid düzeyleleri model gruba göre daha yüksekti ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Deney sonu alınan açlık kan şekereleleri düzeyleleri en yüksek saptanan grup silymarin grubu idi. Silymarin grubunda kan şekeri düzeyleleri model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.04$) ancak kontrol grubu ile anlamlı ilişki saptanmadı.

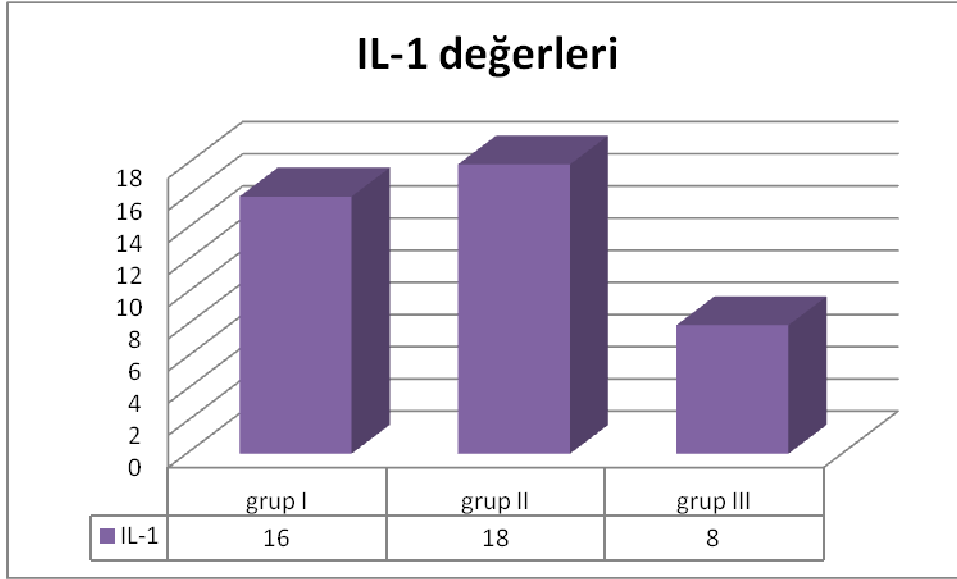
Deney sonunda alınan serum örneklelerinden çalışılan serum alanin amino transferaz (ALT), gama glutamil transferaz (GGT), total kolesterol, HDL, trigliserid ve açlık kan şekeri değereleleri tablo 4.2’de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Deney sonu serum karaciğer enzimleleri, glukoz ve lipid parametreleleri

Özellik	Grup I	Grup II	Grup III	P değerele
ALT (IU/L)	65.7 ± 5	104 ± 20	62.4 ± 7	I vs II = 0.04 II vs III = 0.018 I vs III >0.05
GGT (IU/L)	1.73±0.3	2.1±0.5	1.54± 0.2	>0.05
Total kolesterol (mg/dl)	57± 3	149± 9	160 ± 10	I vs II = 0.003 I vs III = 0.002 II vs III > 0.05
HDL (mg/dl)	49± 5	55± 3	61 ± 4	I vs III = 0.04 Diğereleleri > 0.05
Trigliserid (mg/dl)	62 ± 7	113 ± 18	117 ± 11	I vs II = 0.03 I vs III = 0.009 II vs III > 0.05
Kan Şekeri (mg/dl)	114±15	136±14	190±14	II vs III = 0.04 Diğerele >0.05

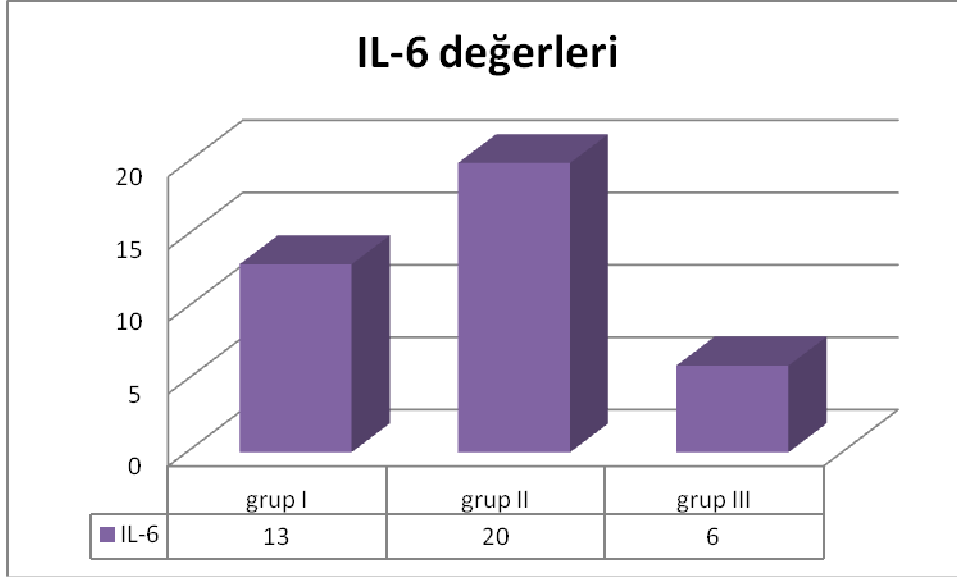
4.2.2. Serum inflamatuvar sitokin düzeyleri

Araştırmaya dahil edilen gruplar arasında serum IL-1 düzeyleri model grubunda en yüksekti. Model grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Fakat silymarin grubunda IL-1 düzeyleri model gruba ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı (sırasıyla P değerleri 0.002, 0.003) (Şekil 4.3).



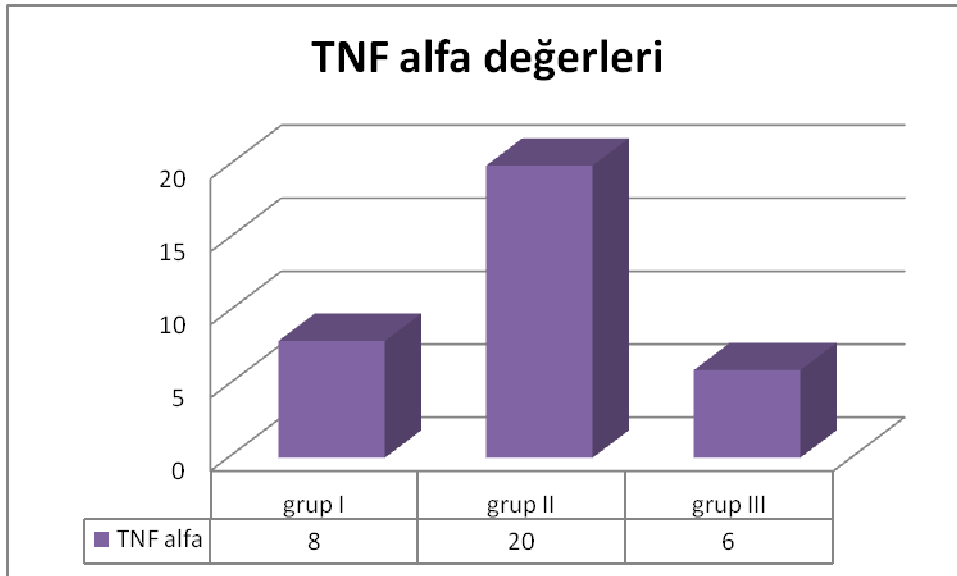
Şekil 4.3. Gruplara göre serum IL-1 değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Serum IL-6 düzeyleri model grubunda en yüksekti. Model grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Silymarin grubunda IL-6 düzeyleri model gruba ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı (sırasıyla P değerleri 0.02, 0.003) (Şekil 8).



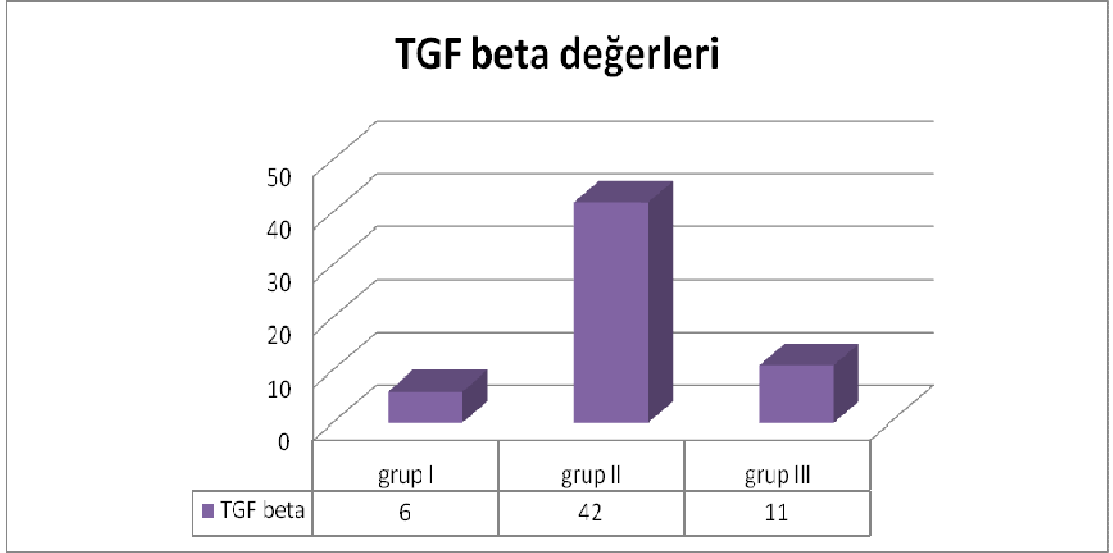
Şekil 4.4. Gruplara göre serum IL-6 değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Deney sonunda serum TNF- α düzeyleri model grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.003$). Silymarin grubunda TNF- α düzeyleri model gruba ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı (sırasıyla P değerleri 0.01, 0.003) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Gruplara göre serum TNF alfa değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Deney sonunda serum TGF- β düzeyleri model grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.003$). Silymarın grubunda TGF- β düzeyleri model gruba ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı (sırasıyla P değerleri 0.02, 0.003) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Gruplara göre serum TGF beta değerlerinin grafik ile gösterilmesi

Deney sonunda alınan serum örneklerinden çalışılan serum IL-1, IL-6, TGF beta ve TNF alfa düzeyleri tablo 4.3’da toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. Serum IL-1, IL-6, TGF beta ve TNF alfa düzeyleri

Özellik	Grup I	Grup II	Grup III	P değeri
IL-1 (pg/ml)	16.2 ± 1.3	18.1 ± 2.7	8.0 ± 0.8	I vs II >0.05 I vs III = 0.002 II vs III = 0.003
IL-6 (pg/ml)	13.2 ± 3.2	19.8 ± 2.5	5.6 ± 1.3	I vs II >0.05 I vs III = 0.02 II vs III = 0.003
TGF beta (pg/ml)	6.5 ± 0.4	42.2 ± 13.4	10.7 ± 1.1	I vs II = 0.003 I vs III = 0.02 II vs III = 0.003
TNF alfa (pg/ml)	8 ± 0.6	20.3 ± 1.9	6.5 ± 0.4	I vs II = 0.003 I vs III = 0.01 II vs III = 0.003

4.3. Histopatolojik bulgular

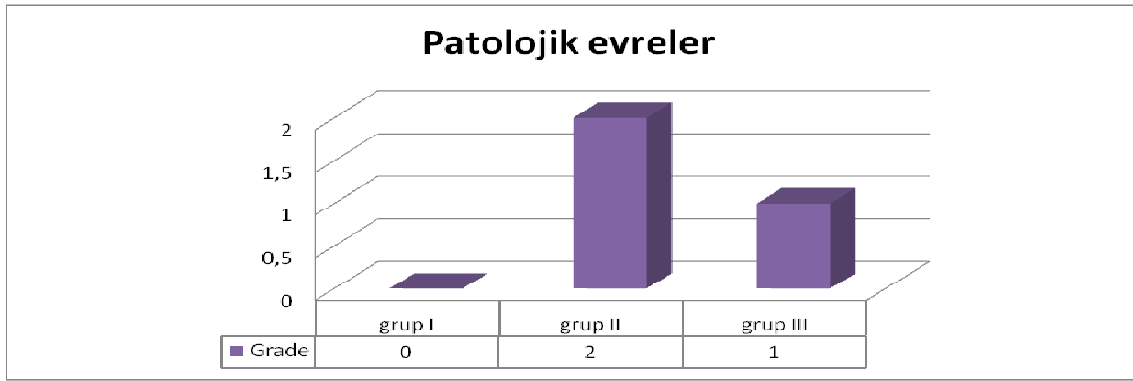
Karaciğerin histopatolojik incelemesinde kontrol grubundaki (grup I) ratlarda makroveziküler steatoz skoru 0, Grup II'deki (model grubu) ratlarda 1.8 ± 0.3 , grup III silymarin grubunda 1.14 ± 0.2 olarak bulundu. Model grup ve silymarin grubunda skorlar, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.003). Silymarin grubunda model gruba göre makroveziküler steatoz skorunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düzelme saptandı ($p>0.05$).

Balon dejenerasyon değerlendirmesinde model grup ve silymarin grubunda skorlar, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.001). Fakat silymarin grubu ve model grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptanmadı ($p>0.05$).

Lobuler inflamasyon değerlendirmesinde model grup ve silymarin grubunda skorlar, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.001). Silymarin grubunda lobuler inflamasyon açısından model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelme saptandı ($p=0.006$).

Portal inflamasyon skorlaması model grup ve silymarin grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.001). Fakat silymarin grubu ve model grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptanmadı ($p>0.05$).

Kontrol grubundaki (grup I) ratlarda total Brunt steatoz evresi 0, Grup II'deki (model grubu) ratlarda 2 ± 0.2 , grup III silymarin grubunda 1.1 ± 0.2 olarak bulundu. Model grup ve silymarin grubunda evreler, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.003). Silymarin grubunda total evre açısından model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelme saptandı ($p=0.006$) (Şekil 11).



Şekil 4.7. Gruplara göre Brunt nekroinflammatuar skorlarının grafik ile gösterilmesi

Model grup ve silymarin grubunda perisinüzoidal fibrozis skorları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.001). Silymarin grubunda model gruba göre perisinüzoidal fibrozis skorunda düzelme saptandı ancak bu düzelme istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

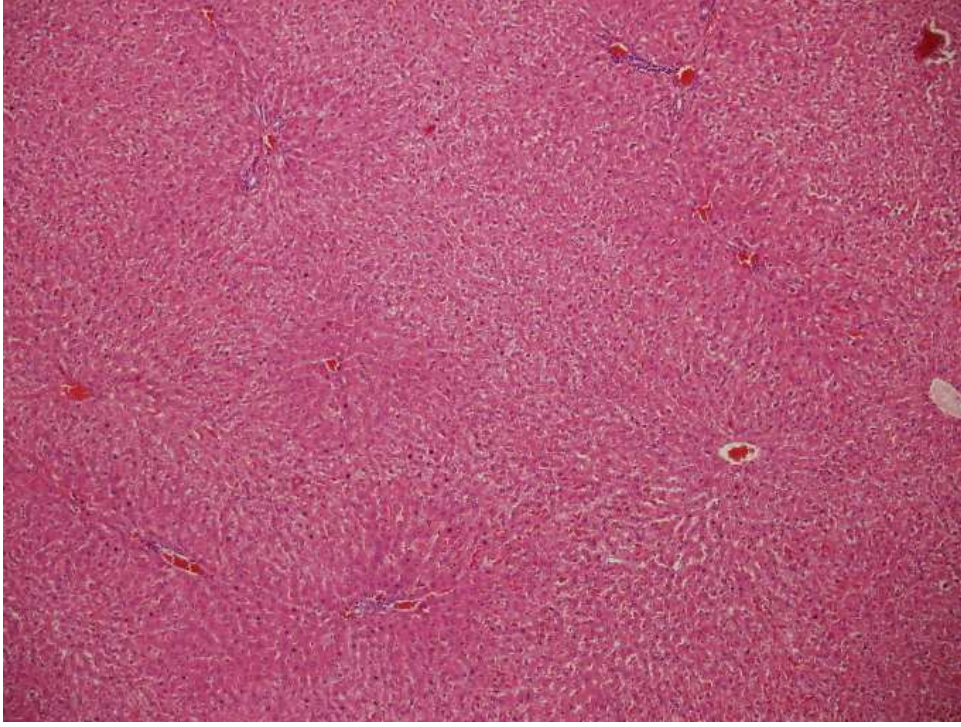
Model grup ve silymarin grubunda portal fibrozis skorları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla P değerleri 0.001, 0.002). Silymarin grubunda model gruba göre portal fibrozis skorunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düzelme saptandı ($p>0.05$).

Deney sonunda model grubunda köprüleşme fibrozis skoru kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksekti ($p>0.05$). Silymarin grubunda model gruba göre köprüleşme fibrozis skorunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düzelme saptandı ($p>0.05$).

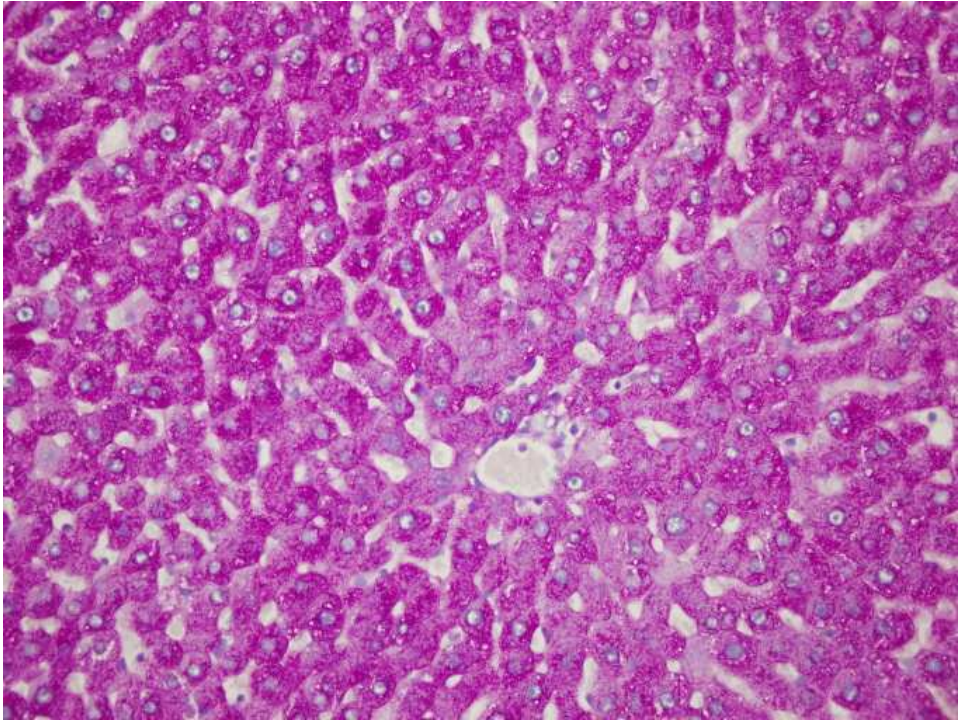
Deney sonunda karaciğer doku örneklerinin histopatolojik incelemesi ile elde edilen skorlar ve total Brunt evreleri tablo 4.4’de toplu olarak verilmiştir. Gruplara ait histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 4.8-10’da gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Grupların Histopatolojik Değerlendirilmesi

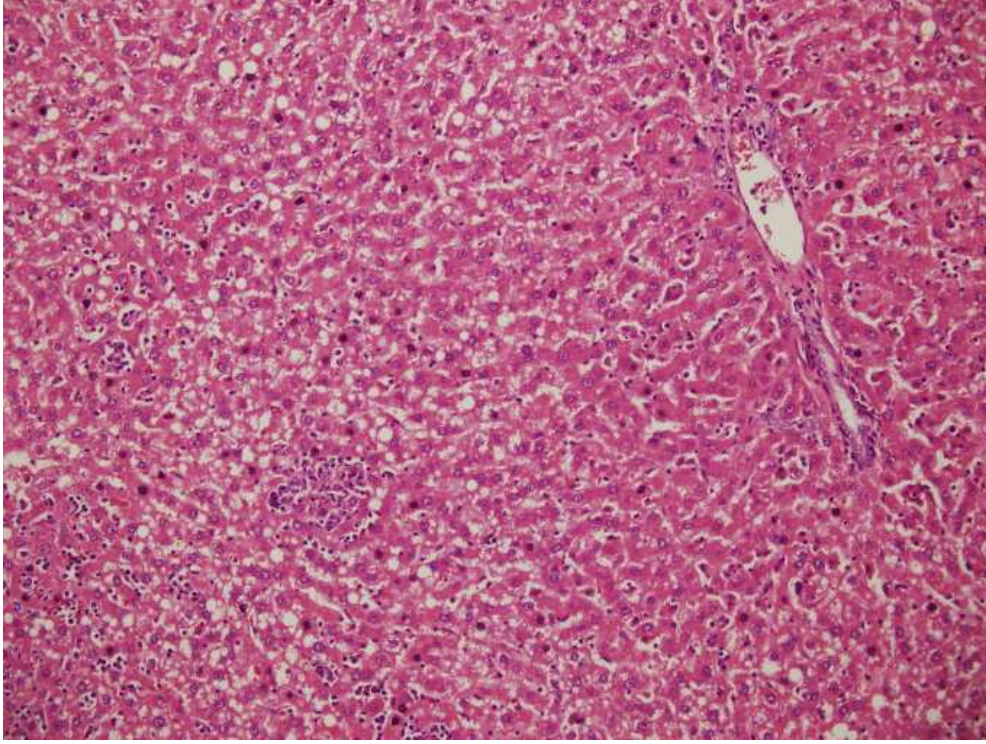
Patolojik Bulgular	Grup I	Grup II	Grup III	P değeri
Makroveziküler steatoz	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.3	1.14 ± 0.2	I vs II = 0.001 I vs III = 0.003 II vs III >0.05
Balon dejenerasyon	0.0 ± 0.0	2 ± 0	2 ± 0	I vs II = 0.001 I vs III = 0.001 II vs III >0.05
Lobuler inflamasyon	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2	I vs II = 0.001 I vs III = 0.001 II vs III = 0.006
Portal alan inflamasyonu	0.0 ± 0.0	1 ± 0	1 ± 0	I vs II = 0.001 I vs III = 0.001 II vs III >0.05
Grade	0.0 ± 0.0	2 ± 0.2	1.1 ± 0.2	I vs II = 0.001 I vs III = 0.003 II vs III = 0.04
Perisinüzoidal fibrozis	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2	1 ± 0	I vs II = 0.001 I vs III = 0.001 II vs III >0.05
Portal fibrozis	0.0 ± 0.0	1 ± 0	0.8 ± 0.1	I vs II = 0.001 I vs III = 0.002 II vs III > 0.05
Köprüleşme fibrozisi	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.12 ± 0.01	I vs II >0.05 I vs III = 0.06 II vs III >0.05



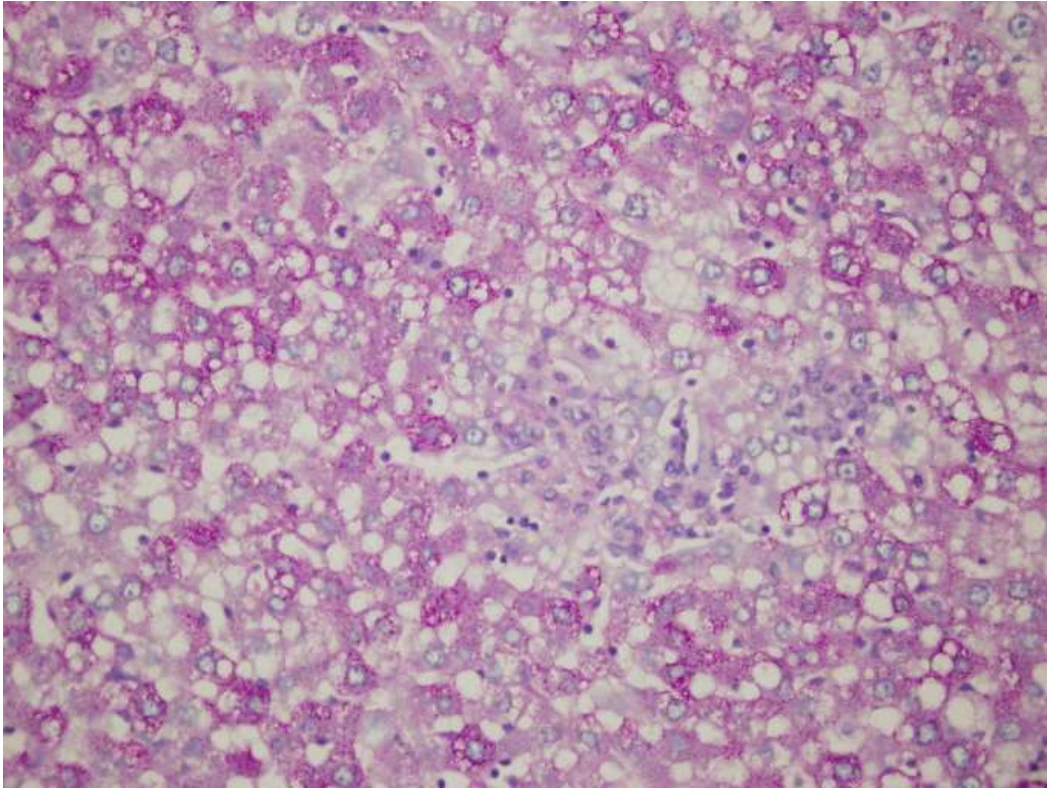
Şekil 4.8a. Kontrol grup, HE x 100, normal karaciğer histolojisi.



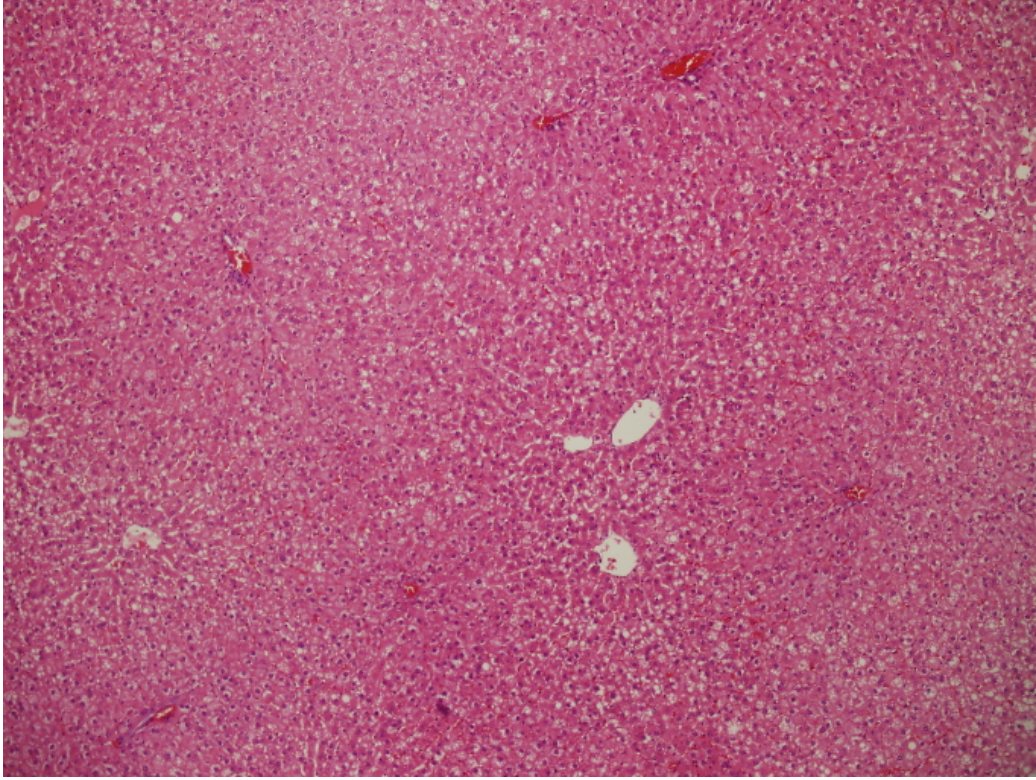
Şekil 4.8b. Kontrol grup, PAS x 400, normal karaciğer histolojisi.



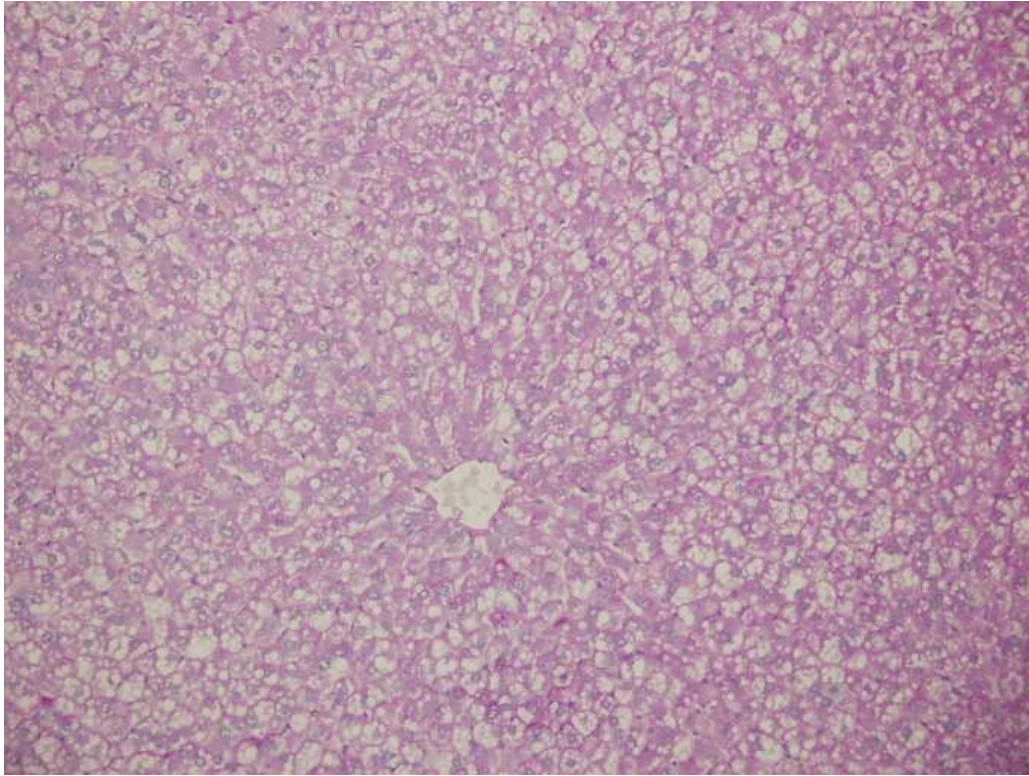
Şekil 4.9a. Model grup, HE X 200, makroveziküler steatoz, belirgin lobuler ve portal alan inflamasyon izlenmektedir.



Şekil 4.9b. Model grup, PAS x 400, makroveziküler steatoz ve portal alan inflamasyonu daha net izlenmekte.



Şekil 4.10a. Silymarin grubu, HE x 200, model gruba göre anlamlı derecede azalmış steatoz ve inflamasyon izlenmekte.



Şekil 4.10b. Silymarin grubu, PAS x 200, makroveziküler steatoz ve portal alan inflamasyonunda gerileme daha net izlenmekte.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, son yıllarda giderek artıp endüstrileşmiş ülkelerde, kronik viral hepatit ve alkolik hepatitin yanında en sık görülen karaciğer hastalığı olmuştur (19). Farklı ülkelerde genel popülasyonun % 10-24'ünde görüldüğü bildirilmiştir (24). Prevalansı dünya genelinde giderek artmaktadır. Amerika'da 12241 kişinin incelendiği "Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması"nda tüm popülasyonun %24'ünde non alkolik yağlı karaciğer hastalığı vardır (25). Değişik serilerde obeziteli popülasyonda NAYKH prevalansı %57.5-74'lerdedir (19). Bilinen bir karaciğer hastalığı olmayan popülasyonda anormal karaciğer enzim yüksekliğinin %90 sebebini oluşturmaktadır (26).

Çok sayıda farklı etiyolojik faktörlerle birlikte olabilir ve hastalığın doğal seyri altta yatan nedene göre değişkenlik gösterir. Klinik tablo masum seyredebileceği gibi ciddi nekroinflamasyon ve fibrozis yaparak karaciğer ile ilişkili anlamlı morbidite ve mortalite riski taşır. İnflamasyon ve proinflamatuvar sitokin artışına, sonuçta karaciğer harabiyetinin fibrozis ve siroza ilerlemesine sebep olabilir (3, 4, 15).Toplumda görülme sıklığı arttığı ve ciddi karaciğer hastalıklarına neden olabileceği için giderek daha fazla önem kazanmakta, literatürde her geçen gün etiopatogenez ve tedavisine ait çalışmalar giderek artmaktadır.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı'nın patogenezi tam olarak anlaşılammışsa da olguların çoğunda insülin direnci sorumlu tutulmaktadır (10, 11). Hastalığın seyri; asemptomatik yüksek karaciğer enzim düzeylerinden karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinom gibi komplikasyonlarla birlikte siroza kadar farklılıklar gösterir (2, 5, 42). NAYKH hastalarında tüm nedenlerden oluşan mortalite riski genel popülasyona göre daha yüksektir (81); bu durum kısmen artmış karaciğer ilişkili ölüm riskine bağlanabileceği gibi, altta yatan metabolik bozukluklar ve insülin rezistansının sonucu olarak ortaya çıkan vasküler hastalığa bağlı olabilir (82). Bu nedenle hastalığa erken dönemde tanı koyulmalı ve olabildiğince erken müdahale edilmelidir.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı tedavisinde öncelikle eşlik eden metabolik sendrom bileşenlerinin tedavi edilmesi önerilmektedir. Diyabetes mellitus

veya hiperlipidemisi olan hastalara mutlaka iyi metabolik kontrol önerilir. Ancak bu her zaman NAYKH'nı tersine çevirmez. Hiçbir ilacın bağımsız olarak karaciğer hasarını azalttığı ve düzelttiği ispatlanamamıştır. Gemfibrozil, E vitamini ve metforminin karaciğer testlerini düzelttiği gösterilmiştir. Ursodeoksikolik asit, betain ve tioglitazon karaciğer testlerinin sonuçlarında ve histolojik bulgularda düzelme sağlamaktadır (7, 8).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı patogenezi belirsizliğini korumaktadır ancak pek çok olguda insülin direncini ve sonuçta gelişen karaciğere artmış yağ asidi sunumu önemli olabilir. Ayrıca, yağ asitlerinin mobilizasyonu da bozulmuş glukoz toleransına ve tip 2 diyabete katkıda bulunabilmektedir. NAYKH olan hastaların %8-20'sinde lipid metabolizması bozuktur. Bu hastalarda hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi veya her ikisi de görülebilir. Çalışmamızda steatoz oluşturulan ratlarda lipid parametreleri karşılaştırıldığında total kolesterol ve trigliserid değerleri kontrol gruba göre daha yüksekti. Bu durum steatoz oluşumunda ilk darbeye hepatik yağ dengesinin bozulmasına bağlandı (21, 22). NAYKH'li hastalarda yapılmış çalışmalarda hastaların %34-75'inde yüksek kan glukoz değerleri saptanmıştır (5). Otopsi çalışmasında, tip 2 diyabetli hastalarda daha yüksek NASH prevalansı yönünde bir eğilim olduğu belirtilmiştir (8). Biz de çalışmamızda diyetle NASH oluşturulan ratlarda açlık kan şekerini kontrol gruba göre daha yüksek saptadık. Bizim çalışmamızda da diyet modeli ile NASH oluşturulan grupta rat ağırlıkları ve karaciğer ağırlıkları kontrol gruba göre daha yüksekti.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı'nda en yaygın laboratuvar bulguları; hafif yada orta düzeye yükselmiş AST veya ALT yada her ikisinde yükselme (AST/ALT >1) ve genellikle normalin üst sınırının 2-3 katını aşmayan artışlardır (35). ALT enziminde yükselme, karaciğerde oluşan inflamasyonun ve hepatosit hasarının oldukça hassas ve değerli bir bulgusudur. Olguların bir kısmında ALP ve GGT değerleri de yüksek düzeyde olabilir ve normalin üst sınırının 2-3 katı civarına yükselebilir; ve steatoz ciddiyetinin serum ALT, AST ve GGT seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (85). Çalışmamızda NASH grubu ile kontrol grubu arasında ALT değerleri karşılaştırıldığında; NASH grubunda daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,05$). ALT düzeylerinin model grupta yüksek olması model grupta

inflamasyonunun yoğun olarak devam ettiğini göstermektedir. GGT değerleri de NASH grubunda kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek saptandı.

Non alkolik steatohepatitte muhtemel sorumlu mekanizmalardan en önemlisi bozulmuş sitokin metabolizmasıdır. Hiperlipidemi ve artmış tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) düzeyi, steatoz ve daha fazla hepatosit zedelenmesine sebep olmaktadır. Akut faz cevabının şiddeti genellikle inflamasyonun büyüklüğü ve aktivitesine bağlıdır. Akut faz cevabında TNF- α , TGF- β , IL-1 ve IL-6 etkilidir (51, 55). Literatürde bildirilmiş pek çok çalışmada NASH modeli oluşturulan ratlarda artmış serum IL-1, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeyleri bildirilmiştir (58, 59). Yüksek yağ içerikli diyetle oluşturulan yağlı karaciğer modelinde serbest radikal hasarı ve oksidatif stres sonucu TNF- α ve TGF- β gibi sitotoksik sitokin salınımının arttığını gösteren çalışmaların sayısı oldukça fazladır (51, 53, 75, 79). Hepatik stellat hücrelerden salınan TGF- β artışının matriks protein sentezini ve integrinlerin ekspresyonunu arttırdığı ve sonuçta fibrozise katkıda bulunduğu bildirilmiştir (79). TNF- α ise fibrojenik yanıtta katkıda bulunarak steatozdan steatohepatite progresyonda rol alan önemli sitokinlerden biridir (54, 55). TNF- α ile aktive olan kinazlar mitokondrial etki ile serbest oksijen radikalleri oluşumuna neden olur (99). Çalışmamızda bu inflamatuvar sitokinlerden IL-1, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeylerini diyetle NASH oluşturduğumuz model grupta kontrol gruba göre anlamlı derecede yüksek saptadık ve bu yüksekliği NASH patogenezindeki ikinci darbedeki inflamasyonun göstergesi olarak yorumladık.

Non alkolik steatohepatitte karaciğer histopatolojisinde görülen belirgin morfolojik değişiklikler alkolik-hepatit benzeri bulguları içerir; makroveziküler steatoz, lobuler ve portal inflamasyon, perisinüzoidal fibrozis gibi. Ayrıca balon dejenerasyon ve Mallory hyalin cisimleri de görülebilir (36). Biz çalışmamızda diyet ile NASH oluşturduğumuz model gruptaki ratların karaciğer dokularında tüm bu histolojik değişiklikleri gözlemledik.

Silymarin deve dikenini bitkisinden (*Silybum marianum*) elde edilen bir flavonoiddir. Bu madde literatürde, pek çok kimyasal ve toksin ile oluşan karaciğer hasarını önlemede etkili olarak bildirilmiştir (90). Silymarinin hepatoprotektif etkisi in vitro ve in vivo pek çok çalışma ile gösterilmiş olsa da, etki mekanizması tam

olarak bilinmemektedir. Etkinliğinde iki muhtemel mekanizma, serbest radikallere karşı olan antioksidan etkisi ve sitokin üretimine etkisi ile oluşan immun regulatuar etkisidir (98).

Silymarin hepatosit RNA-polimeraz I aktivitesini arttırır (100), toksik serbest demiri bağlar (101), hücre membranını radikal hasarından korur (102) ve Amanita phalloides toksini gibi toksinlerin girişini engeller (82). Silymarin ratlarda CCl4 ve parasetamol ile oluşturulan karaciğer hasarını engellemede etkinliği gösterilmiştir (103, 104). Ayrıca lipid peroksidasyonunu engelleyerek hepatosit membranında lipid içeriğini düzenler (102). Singh ve Agarwal tarafından yapılan bir çalışmada silymarinin farelerde fotokarsinogenezi ve cilt tümörü oluşumunu serbest radikalleri ve reaktif oksijen ürünlerini temizleyerek engellediği gösterilmiştir (105). Yapılan bir in vivo çalışmada erkek BALB/c farelerde silymarinin parenteral uygulanması ile düşük dozlarda T-lenfositleri suprese edici etkisi gösterilmiştir (106).

Serum AST ve ALT değerleri karaciğer hasarını değerlendirmede en sensitif belirleyicilerdir. Bunun nedeni bu enzimlerin sitoplazmik yerleşimli olmaları ve hücre hasarı durumunda direkt dolaşıma karışmalarıdır (35, 83). Biz bu çalışmada diyetle oluşan NASH modeli grubunda ALT ve GGT değerlerini kontrol gruba göre yüksek saptadık. Silymarin verilen grupta ALT değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düzeldiğini ve kontrol grubu ile benzer olarak normal seviyelere gerilediğini saptadık. Serum GGT değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da gerileme saptadık. Serum enzimlerindeki bu gerilemeler silymarinin hepatosit membran hasarını önleyerek enzimlerin dolaşıma karışmalarını engellediğini düşündürmekte ve hepatoprotektif etkinliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Lipid parametreleri açısından çalışmamızda total kolesterol, HDL ve trigliserid seviyeleri çalışıldı. Yapılan bir hayvan çalışmasında silymarinin hepatoselüler kansere eşlik eden trigliserid, LDL ve VLDL yüksekliklerini geriletmediği ve HDL seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir (107). Biz çalışmamızda NASH modeli oluşturduğumuz grupta ve silymarin grubunda serum total kolesterol, HDL ve trigliserid seviyelerini kontrol gruba göre yüksek saptadık. Silymarin grubunda beklenen HDL artışı olmasına rağmen total kolesterol, glukoz ve trigliserid seviyelerinde azalma gözlemlenmedi. Bunun nedenlerinin takip süresinin kısalığı ve

NASH oluşumunda kullanılan saf kolesterol ve domuz yağı içeren yüksek yağ içerikli diyet olabileceğini düşünüyoruz.

Silymarinin anti-inflamatuvar ve anti-karsinojenik etkilerinin moleküler temelleri henüz net olarak bilinmemektedir; ancak bu etkileri transkripsiyon faktör NF- κ B'yi inhibe etmesi ile ilişkili olabilir. Transkripsiyon faktör NF- κ B inflamatuvar süreçte etkili pek çok genin ekspresyonunu regüle ve koordine eder. İnterlökinlerin üretimi IL-1, IL-6, TNF- α , lenfotoksin, granülosit-makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) ve interferon (IFN- γ) üretimini artırır. Ayrıca IL-1 ve TNF- α gibi bazı sitokinler pozitif feed back mekanizma ile NF- κ B aktivasyonuna yol açarlar. Silymarinin, çok düşük konsantrasyonlarda bile (12 μ g/ml), insan keratinosit hücrelerinde NF- κ B aktivitesini etkin bir biçimde baskıladığı gösterilmiştir (108). Mana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada silymarinin TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (109). Silymarin direkt etki ile de TNF- α (110), nitrik oksid (111), IL-6 ve IL-1 inhibisyonu yapar (112). Ayrıca lenfosit proliferasyonunu, IF- γ , IL-4 ve IL-10 düzeylerini artırıcı etkisi mevcuttur (106). Çalışmamızda silymarin grubunda serum IL-1, IL-6 ve TNF- α düzeylerini model gruba göre literatüre benzer şekilde anlamlı ölçüde düşük bulduk. Bu anlamlı azalma silymarinin anti inflamatuvar etkilerinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Silymarinin anti-inflamatuvar etkileri karaciğer dokusunda da gösterilmiştir. Pek çok çalışmada mast hücre stabilizasyonu, nötrofil göçü inhibisyonu, Kupfer hücre inhibisyonu (113), ayrıca lökotrien ve prostoglandin sentez inhibisyonunu içeren etkileri gösterilmiştir (114). Silymarinin en önemli farmakolojik etkilerinden biri de 5-lipooksijenaz döngüsünü inhibe ederek sağladığı lökotrien sentez inhibisyonudur. Bir çalışmada silymarinin izole edilmiş Kupfer hücrelerinde lökotrien B4 üzerinde güçlü inhibitör etkisi gösterilmiştir (114). Silymarin ayrıca sinyal iletiminde görevli protein kinazları ve diğer kinazları inhibe ederek hücreler arası sinyal iletişimini de engeller (114). Silymarinin bu etkisi, karaciğerde fibrozis oluşumunda en önemli basamak olan hepatik stellat hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşümü ve aktivasyonunu engeller (114). Çalışmamızda silymarin grubunda fibrojenik sitokin olan TGF- β düzeylerini model gruba göre anlamlı derecede düşük bulduk. Silymarin grubunda karaciğer patolojik incelemesinde görülen fibrozis

skorlarındaki gerilemenin TGF- β düzeylerini azaltıcı etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

ALT düzeyleri sonuçlarını destekler nitelikte Brunt nekroinflamasyon skoru model grupta, diğer iki gruptan yüksek bulundu. Silymarin ile tedavi edilen grupta ise inflamasyonun büyük oranda baskılandığı görüldü ve nekroinflamasyon skoru açısından tedavi ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Karaciğer fibrozisinin, inflamatuvar sürecin kronikleşmesinin bir sonucu olduğu düşünülürse, inflamasyonun baskılanması ile fibrozisinde önlenebileceği beklenebilir. Bizim çalışmamızda model grupta fibrozis skoru kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Tedavi grubunda ise fibrozis skorunun model gruptan bir miktar düşük olduğu izlendi ancak bu düşmenin istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadığı görüldü. Silymarin tedavisi ile inflamasyonun etkili bir biçimde baskılanmasına rağmen karaciğer fibrozisinin bir miktar daha az oluştuğu ancak önlenemediği tespit edildi. Bizim çalışmamızda da silymarin tedavi grubunda karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesinde saptanan fibrozis evrelerinde model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düzelme saptandı.

Sonuç olarak, tüm bu olumlu bulgulara rağmen histopatolojik incelemede, tedavi grubunda model gruba göre azalmakla birlikte steatohepatitin tamamen engellenemediği görülmüştür. Biz bu noktada inflamatuvar sürecin azalmasından etkilenmeyen çeşitli sitokin ve/veya medyatörlerin steatohepatit sürecini devam ettirdiğini düşünüyoruz. Bu çalışma silymarinin ratlarda, tamamen ortadan kaldıramasa da, antioksidan özelliklerinin de yardımı ile inflamasyonu azaltarak steatohepatit gelişimini yavaşlattığını ve karaciğer rezervlerinin korunmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu bulguların klinik pratiğe yansımaları açısından, silymarinin NASH gelişimini ortadan kaldırmaya da azaltabileceği veya süreci yavaşlatarak hastaların prognozunu iyileştirebileceği sonucunun çıkarılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu sonuca ulaşabilmek için çalışmamızın daha geniş ve moleküler düzeyde çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. ÖZET

Amaç: Deve diken bitkisinden elde edilen silymarin ile yapılmış pek çok klinik ve deneysel çalışmada silymarinin hepatositlerde protein sentezini arttırıcı ve serbest radikalleri temizleyici ve lipid peroksidasyonunu engelleyici antioksidan ve anti inflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Biz bu çalışmamızda NASH modeli oluşturduğumuz ratlarda silymarin maddesinin olası koruyucu etkilerini araştırdık.

Materyal ve Metod: Çalışmaya alınan Wistar cinsi 20 adet erkek rat randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki 2 gruba ilk 2 hafta yüksek yağ içerikli diyet (%10 domuz yağı, %2 saf kolesterol) verildi. Takiben 12 hafta boyunca kontrol grubuna 1 ml distile su intragastrik gavaj yoluyla, model gruba yüksek yağ içerikli diyet ve silymarin grubuna yüksek yağ içerikli diyet + 40 mg/kg/gün silymarin intragastrik gavaj yoluyla verildi. 12. hafta sonunda serum ALT, GGT, Total kolesterol, HDL, trigliserid, glukoz ve IL-1, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeyleri çalışıldı ve karaciğer histopatolojileri karşılaştırıldı. Karaciğerde NASH'a bağlı patolojik değişikliklerin evrelemesi Brunt sınıflamasına göre yapıldı. Bulunan sonuçların istatistiksel analizi SPSS bilgisayar programı ile yapıldı.

Bulgular: Deney sonunda rat ağırlıkları ve karaciğer ağırlıkları açısından üç grup arasında anlamlı fark yoktu. Silymarin grubunda ise serum ALT seviyeleri model gruba göre göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı ($p=0.018$). Serum total kolesterol, HDL ve trigliserid seviyeleri silymarin grubunda kontrol gruba göre anlamlı derecede yüksek saptandı. Tüm inflamatuvar sitokinler silymarin grubunda model gruba göre anlamlı derecede düşük saptandı. Karaciğerin histopatolojik incelemesinde kontrol grupta yağlanma saptanmadı, tüm ratlar evre 0 idi. Model grupta ise ortalama evre 2,0 idi, bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). Silymarin grubunda total evre açısından model gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelme saptandı ($p=0.006$). Silymarin grubunda model gruba göre histopatolojik gradelemede en belirgin düzelme lobular inflamasyon skorlamasında gözlemlendi; silymarin grubunda ort. skor 1,3, model grupta 2,5 idi ($p<0,05$).

Sonuç: Diyet modeli ile oluşturulan NASH'ta silymarin tedavisi ile serum ALT, GGT seviyelerinde düzelmeler saptandı. Silymarin uygulaması ile karaciğer histopatolojik evrelemesinde ve lobular inflamasyon skorlamasında anlamlı gerileme gözlemlendi. İnflamatuar sitokinlerin tamamı silymarin grubunda anlamlı derecede düştü. Bu bulgularla silymarinin karaciğer koruyucu etkisinde anti-inflamatuar özelliklerinin ön planda rol oynadığını düşünmekteyiz. Silymarinin etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılması için daha geniş ve moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. SUMMARY

The Protective Effects of Silymarin on High Fat Diet Induced NASH Model of Rat

Aim: Silymarin is a flavonoid extracted from milk thistle and in several clinical and experimental studies it was shown to be anti oxidant and anti inflammatory by increasing the protein synthesis of liver, scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation. In this present study, we investigated the protective effects of silymarin in high fat diet model of rat.

Material and Method: Twenty Wistar male rats were randomized into 3 groups. For 12 weeks, the control group was given intragastric distilled water; the model group was fed with high fat diet including % 2 pure cholesterol and % 10 lard; and the silymarin group was given intragastric 40 mg/kg/day silymarin + high fat diet. At the end of 12. week, serum ALT, GGT, Total cholesterol, HDL, trigliseride, glucose and IL-1, IL-6, TNF- α and TGF- β levels were studied and liver histopathologies were evaluated according to Brunt necroinflammatory staging.

Results: There was no significant difference between the three groups about the rat weight and liver weight at the end of the study. In silymarin group, serum ALT levels were significantly lower than the model group ($p=0.018$). Serum total cholesterol, HDL and trigliserid levels were significantly higher in silymarin group than the model group. All inflammatory cytokins were significantly lower in silymarin group than the model group. In pathological evaluation of liver tissues, the control group were all at stage 0. In model group, the avarage stage was 2,0 and this diffeerence was statistically significant ($p<0,05$). In silymarin group, total steatosis stage was significantly lower than the model group ($p=0.006$). In silymarin group, lobular inflammation was regressed most significantly than the model group; in silymarin group the avarage score was 1,3 and in model group was 2,5 ($p<0,05$).

Conclusion: In high fat diet model of NASH, silymarin revealed significant decreases in serum ALT, GGT levels. In silymarin group, liver pathological grade and lobular inflamation score were significantly regressed than the model group. All

inflammatory cytokine levels were lower than other groups. With these findings, it is probable that the hepatoprotective effects of silymarin was primarily due to its anti-inflammatory effects. Further studies are needed to fully understand the exact mechanisms of hepatoprotective effects of silymarin.

8. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime değerli katkılarda bulunan ve çalışmamın planlanması ile yürütülmesinde ihtiyacım olan her noktada güven ve desteğini esirgemeyen başta değerli tez danışmanım ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Cansel Türkay olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Kosar, Prof. Dr. Osman Kaftan, Doç. Dr. Ali Akçay, Yrd. Doç. Dr. Feridun Karakurt, Prof. Dr. Zeki Yıldırım, Doç. Dr. Duygu Özol, Yrd. Doç. Dr. Aydın Karanfil ve Prof. Dr. Yaşar Karaaslan'a ve birlikte çalışma imkanı bulduğum diğer tüm hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim süresince bana göstermiş oldukları kolaylıklar nedeniyle başta sayın dekanımız Prof. Dr. Ramazan Yiğitoğlu ve Prof. Dr. Mikdat Bozer olmak üzere tüm hastane idaresi ve personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmamda verdikleri desteklerden ötürü Dr. Burak Uz'a, Dr. M. Erol Yıldırım'a, Yrd. Doç. Dr. Sibel Yenidünya'ya ve Dr. Murat Aydın'a ve yapmış oldukları teknik yardımlardan dolayı patoloji ve biyokimya laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Asistanlığa başladığım ilk günden itibaren dostlukları ve yardımları için değerli asistan arkadaşlarımdan her birine, tüm uzmanlarıma ve İç Hastalıkları kliniği çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi ihtisas süresinde de yardım ve desteğini bütün kalbimle hissettiğim değerli eşime, canımdan çok sevdiğim kızıma ve aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Dr. Mehtap Erkmen UYAR

Kasım 2008, Ankara

9. KAYNAKLAR

1. Adams LA and Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. 2005 Diabetes UK. Diabetic Medicine,22, 1129-1133.
2. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. Semin Liver Dis 2001; 21(1): 17-26.
3. Ratzu V, Tahiri M, Bonyhay L. Nonalcoholic steatohepatitis. Ann Endocrinol (Paris) 2005 Apr;66(2 pt 2)1S71-80.
4. Lee RG. Nonalcoholic Steatohepatitis: a study of 49 patients. Hum Pathol. 1989;20:594-598.
5. Cortez-Pinto H, Camilo ME. Non-alcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): diagnosis and clinical course. Best Practice Clinical Gastroenterology 2004;18:1089-104.
6. A. Federico, M. Trappoliere, C. Loguercio. Treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: Current views and perspectives. Digestive Liver Disease 2006.
7. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? Gastroenterology 1998;114:842-5.
8. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with insulin resistance syndrome. Hepatology 2002; 35:373–9.

9. Tankurt E, Biberoglu S, Ellidokuz E, et al. Hyperinsulinemia and insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 1998 Sep;29(3):495-501.
10. Gastroenterolojide Klinik Yaklaşım. Yurdakul İ, Şentürk H, Tuncer MM, Göksoy E. (editörler). 1.baskı. İstanbul Deomed Medikal Yayıncılık; 2004: 171-80.
11. 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.
12. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005; 143(10): 722-8.
13. Becker U, Deis A, Sørensen TI, Grønbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF, Schnohr P, Jensen G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology* 1996; 23(5): 1025-9.
14. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172 (7): 899-905.
15. Angulo P. Non alcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 2002; 346(16): 1221-31.
16. Satman İ, Kocabay G. Diabet ve Karaciğer Yağlanması. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2006; 26(2): 1-12.
17. Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12(5): 398-403.

18. Neuschwander Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37(5): 1202-19.
19. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:1649–1657.
20. Daniel S, Ben-Menachem T, Vasudevan G, et al. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3010-14
21. Çelebi S, Atasever H, Mengüçük D, Açık Y, Bahçecioğlu H. Elazığ kent toplumunda nonalkolik yağlı karaciğerin epidemiyolojik özellikleri. *Akademi Gastroenteroloji Dergisi* 2006; 5(1): 41-6.
22. Akbar DH, Kawther AH. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: what we know and what we don't know. *Med Sci Monit* 2006; 12(1): 23-6.
23. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000;118:1117-23.
24. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Digestive Diseases And Sciences* 2000; 45: 1929-1934.
25. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal Of Gastroenterology* 2003; 98: 2042-2047.
26. Angulo P, Keach JC. Independent predictors of liver fibrosis in patients with. *Hepatology* 1999; 30: 1356-1362.
27. Brunt EM, Elizabeth M. Nonalcoholic steatohepatit: Definition and pathology. *Seminars In Liver Disease* 2001; 21: 3-16.

28. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, Rybicki L, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol*. 1998 Jun;11(6):560-5.
29. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, Capron F, Poynard T; LIDO Study Group. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1898-906.
30. Diehl AM, Poordad F. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 7th ed, Volume 2, Philadelphia: Saunders, 2002:1393-1401.
31. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126:137.
32. Agarwal N, Sharma BC. Insulin resistance and clinical aspects of nonalcoholic steatohepatitis (NASH).*Hepatology Research* 33 (2005) 92-96
33. Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver diseases: An emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004;444:3-12.
34. Leuschner U. Non-alcoholic Steatohepatit. Türkçe çeviri. Şensu S (çevri editörü). İstanbul Ali Arif İlaç Sanayi A.Ş; 2006: 4-35.
35. De la Maza MP, Hirsch S, Petermann M, et al. Changes in microsomal activity in alcoholism and obesity. *Alcohol Clin Res* 2000;24:605-10.
36. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, et al. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:57-69.

37. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, et al. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1067-75.
38. Bacon BR, O'Neill R, Britton RS. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology* 1993;105:1134–1140.
39. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation of obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995;95: 2111–2119.
40. Valverde AM, Teruel T, Navarro P, et al. Tumor necrosis factor- α caused insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin induced adipogenesis in fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 1998;139:1229-38.
41. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al. Gene expression of TNF- α and TNF receptors, p55 and p75. *J Hepatol* 2001;34:1158-1163.
42. Sanyal A.J, Campbell-Sangert C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
43. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-261.
44. Nair S, Cope K, Risby TH, et al. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: Potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1200-4.
45. Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, et al. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:638-644.

46. Yang S, Lin HZ, Mandal AK, et al. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: Implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* 2001;34:694-706.
47. Grove J, Daly AK, Burt AD, et al. Heterozygotes for HFE mutation have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut* 1998;43:262-6.
48. Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortelli K, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:311-8.
49. Moirand R, Mortaji AM, Loreal O, et al. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 1997;349:95-7.
50. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999;117:1155-63.
51. Ferrannini E. Insulin resistance, iron, and the liver. *Lancet* 2000;355:2181-2
52. Kuhn LC, Hentze MW. Coordination of cellular iron metabolism by posttranscriptional gene regulation. *J Inorg Biochem* 1992;47:183-95.
53. Tsukamoto H. Iron regulation of hepatic macrophage TNF α expression. *Free Rad Biol Med* 2002;32:309-13.
54. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-11.
55. Washington K, Wright K, Shyr Y, et al. Hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000;31:822-8.

56. Niemela O, Parkkila S, Juvonen RO, et al. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000;33:893–901.
57. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002;35:62–73.
58. Ikejima K, Takei Y, Honda H, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-410.
59. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
60. Diehl AM. Non alcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 221-228.
61. Garcia-Monzon C, Martin-Perez E, Iacono OL, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000;33:716-724
62. Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC. Non alcoholic steatohepatitis: clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dic Dis Sci* 1996; 41:172-179.
63. Cotler SJ, Kanji K, Keshavarzian A, et al. Prevalence and significance of autoantibodies in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin Gastroenterol* 2004;38:801-4.
64. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, et al. Silent non-alcoholic fatty liver disease—a clinical-histological study. *J. Hepatol* 2004;41:751-7.

65. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver diseases. *Gastroenterology* 2002; 123:1705-1725.
66. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 745-750.
67. Siebler J, Gale PR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12(14): 2161-2167.
68. Harrison SA, Bisceglie AMD. Advances in understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003; 63(22): 2379-2394.
69. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004; 39: 1647-1654.
70. Uygun A, Kadayifci A. Metformin in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology And Therapeutics* 2004; 19: 537-544.
71. Caldwell SH, Hespeneide EE, Redich JA. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone in nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal Of Gastroenterology* 2001; 96: 519-525.
72. Horlander JC, Kwo PY, Cummings OW. Atorvastatin for the treatment of NASH. *Gastroenterology* 2001; 120: 544-549
73. Rallidis LS, Drakoulis CK, Parasi AS. Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Atherosclerosis* 2004; 174(1): 193-196.
74. Lindor KD, Kowdley KV. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 770-778.

75. Gulbahar O, Karasu ZA, Erson G. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with acetylcysteine. *Gastroenterology* 2000; 118(A): 1444-49
76. Lavine JE. Vitamin E treatment on nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr*, 2000;136:734-738.
77. Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal Of Gastroenterology* 2004; 99: 2365-2368.
78. Nitecki J, Jackson FW, Alton M. Effect of phlebotomy on nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2000; 188: A147.
79. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1993;18:289-297.
80. Vogel G, Tuchweber B, Trost W. Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;73:355-362.
81. Desplaces A, Choppin J, Vogel G. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittelforschung* 1975;25:89-96.
82. Hruby K, Csomos G, Fuhrmann M, Thaler H. Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Hum Toxicol* 1983;2:183-195.
83. Sabeel AI, Kurkus J, Lindholm T. Intensive hemodialysis and hemoperfusion treatment of *Amanita* mushroom poisoning. *Mycopathologia* 1995;131:107-114.
84. Salmi HA, Sarna S. Effect of silymarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver; A double blind controlled study. *Scand J Gastroenterol* 1982;17:517-521.

85. Buzzelli G, Moscarella S, Giusti A, et al. A pilot study on the liver protective effect of silybin-phosphatidylcholine complex (1dB 1016) in chronic active hepatitis. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1993;31:456-460.
86. Feher I, Deak G, Muzes G. Liver-protective action of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases. *Orv Hetil* 1989;130:2723- 2727.
87. Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, et al. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol* 1989;9:105-113.
88. Trinchet IC, Coste T, Levy VG. Treatment of alcoholic hepatitis with silymarin. A doubleblind comparative study in 116 patients. *Gastroenterol Clin Biol* 1989;13:120-124.
89. Halim AB, el-Ahmady O, Hassab-Allah S, et al. Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann Clin Biochem* 1997;34:656-663.
90. Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA. Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 1994;91:51-63.
91. Sonnenbichler J, Goldberg M, Hane L, et al. Stimulatory effect of silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers:non-response in hepatoma and other malignant cell lines. *Biochem Pharmacol* 1986;35:538-541.
92. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996;23:749-754.

93. Fuchs EC, Weyhenmeyer R, Weiner OH, et al. Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittelforschung* 1997;47:1383-1387.
94. Boigk G, Stroedter L, Herbst H. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 1997;26:643-649.
95. Favari L, Perez-Alvarez V. Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl4-chronic liver damage in rats. *Arch Med Res* 1997;28:11-17.
96. Baer-Dubowska W, Szaefer H, Krajka- Kuzniak V. Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica* 1998;28:735-743.
97. Kim DH, Jin YH, Park JB, Kobashi K. Silymarin and its components are inhibitors of beta-glucuronidase. *Biol Pharm Bull* 1994;17:443-445.
98. Lang I, Nekam K, Gonzalez-Cabello R. Hepatoprotective and immunological effects of antioxidant drugs. *Tokai J Exp Clin Med* 1990;15:123-127.
98. Brown D. *Drug Store News for the Pharmacist* 1994;4:58,60.
99. Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8115-8119.
100. Sonnenbichler, J., Zetl, I., 1986. Biochemical effects of the flavolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat liver. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213, 319–331.

101. Pietrangelo, A., Borella, F., Casalgrandi, G., Montosi, G., Cecarelli, D., Gallesi, D., Giovanni, F., 1995. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* 109, 1941–1949.
102. Mira, L., Silva, M., Manso, C.F., 1994. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin hemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* 48, 753–759.
103. Mourelle, M., Muriel, P., Favari, L., Franco, T., 1989. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 3, 183–191.
104. Muriel, P., Garciapina, T., Perez-Alvarez, V., Mourelle, M., 1992. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J. Appl. Toxicol.* 12, 439–442.
105. Singh, R. P. and Agarwal, R. (2002) Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 655-663.
106. Johnson VJ, Osuchowski MF, He Q, Sharma RP. Physiological responses to a natural antioxidant flavonoids mixture, silymarin, in BALB/c mice: II. Alterations on thymic differentiation correlate with changes in *c- myc* gene expression. *Planta Med* 2002; 68 : 961-5.
107. Ramakrishnan G, Elinos-Baez CM, Jagan S, et al. Silymarin downregulates COX-2 expression and attenuates hyperlipidemia during NDEA-induced rat hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2008 Jun;313(1-2):53-61.
108. Saliou C, Valacchi G, Rimbach G. (2001) Assessing bioflavonoids as regulators of NF- κ B activity and inflammatory gene expression in mammalian cells. *Meth Enz* 335, 380–386.
109. Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. (1999) Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol* 163, 6800–6809.

110. Zi X, Mukhtar H, Agarwal R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:334-9.
111. Tager M, Dietzmann J, Thiel U, Hinrich Neumann K, Ansorge S. Restoration of the cellular thiol status of peritoneal macrophages from CAPD patients by the flavonoids silibinin and silymarin. *Free Radic Res* 2001;34:137-51.
112. Wilasrusmee C, Kittur S, Shah G, Siddiqui J, Bruch D, Wilasrusmee S, et al. Immunostimulatory effect of *Silybum marianum* (milk thistle) extract. *Med Sci Monit* 2002;8:BR439-43.
113. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996;23:749-754.
114. Gebhardt R. Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta Med* 2002; 68 : 289-96.