



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**YÜKSEK YAĞLI DİYET İLE BESLENEN SIÇANLARDA,
PROBİYOTİK KULLANIMININ KARACİĞER
YAĞLANMASI VE METABOLİK ENDOTOKSEMİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Dyt. Sevan ÇETİN

DOKTORA TEZİ

ANKARA 2018



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**YÜKSEK YAĞLI DİYET İLE BESLENEN SIÇANLARDA,
PROBİYOTİK KULLANIMININ KARACİĞER YAĞLANMASI
VE METABOLİK ENDOTOKSEMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Dyt. Sevan ÇETİN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mendane SAKA

ANKARA, 2018



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı çerçevesinde Sevan Çetin tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/12/2018

Tez Konusu: “Yüksek Yağlı Diyet İle Beslenen Sıçanlarda, Probiyotik Kullanımının Karaciğer Yağlanması ve Metabolik Endotoksemi Üzerine Etkisi”

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Mendane SAKA

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Doç. Dr. Mendane Saka

Prof. Dr. Gül Kızıltan

Dr. Öğr. Üyesi Perim Fatma Türker

Prof. Dr. Nurcan Yabancı Ayhan

Doç. Dr. Aslı Akyol

Başkent Üniversitesi

Başkent Üniversitesi

Başkent Üniversitesi

Ankara Üniversitesi

Hacettepe Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 10 / 12 / 2018 tarih ve 58...5 Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 06 / 12 / 2018

Öğrencinin Adı, Soyadı : Sevan Çetin

Öğrencinin Numarası : 21420102

Anabilim Dalı : Beslenme ve Diyetetik

Programı : Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Doç. Dr. Mendane Saka

Tez Başlığı: Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda, probiyotik kullanımının karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemi üzerine etkisi

Yukarıda başlığı belirtilen Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 109 sayfalık kısmına ilişkin, 21 / 11 / 2018 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

Onay

06 / 12 / 2018

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,
Doç. Dr. Mendane SAKA

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmam süresince, her aşamada desteğini yanımda hissettiğim, sabırla ve bilgisiyle yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Mendane SAKA'ya ve diğer bölüm hocalarıma,

Değerli katkılarını ve desteğini esirgemeyen, sayın hocam Prof. Dr. Mehtap AKÇİL OK'a,

Bölüm sekreterimiz Hatice ŞAHİN'E,

Başkent Üniveritesi Denev Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi çalışanlarına ve Başkent Üniversitesine,

Öğrettikleri ilkelerle yolumu aydınlatan, sabır ve sevgileriyle her daim yanımda olan canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ÇETİN Sevan. Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda, probiyotik kullanımının karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemi üzerine etkisi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2018.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), patogenezi tam olarak anlaşılamayan, kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın patogenezi, genetik polimorfizm, çevresel faktörler ve barsak mikrobiyotasının değişimini içeren kompleks bir süreci içermektedir. Hastalığın tedavisinde, yaşam tarzı değişiklikleri ve fiziksel aktivitenin artırılması birincil hedefler arasındadır. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda probiyotik kullanımının karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada 24 adet Spraque Dawley türü sıçan kullanılmış ve hayvanlar 3 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna standart purifiye yem, diğer iki gruba sırasıyla, yüksek yağlı yem + plasebo (NaCl oral 1 damla) ve yüksek yağlı yem + probiyotik *Lactobasillus rhamnasus* GG (1×10^9 cfu/1 damla) 16 hafta süresince verilmiştir. Bu süre sonunda sıçanların kan örnekleri alınmış, mezenterik, perirenal ve gonadal yağ dokusu miktarları ölçülmüş ve histopatoloji için karaciğer dokusu çıkartılmıştır. Grupların serum AST düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık önemli bulunmuş ($p < 0.05$), en yüksek serum AST düzeyi yüksek yağlı yem + plasebo alan grupta saptanmıştır. Grupların ortalama serum ALT düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$), en düşük ALT düzeyi kontrol grubunda, en yüksek, yüksek yağlı yem + probiyotik alan grupta bulunmuştur. Gruplar arasında, kolesterol, TNF- α , CRP ve LPS düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Sıçanların AST, ALT, kolesterol ve CRP değerleri ile LPS düzeyleri arasında bir ilişki bulunmamıştır. Gruplar arasında karaciğer ağırlığı, perirenal ve mezenterik yağ miktarı ortalamaları arasındaki fark önemli ($p < 0.05$). Gruplar arasında histopatolojik incelemede, kontrol grubunda steatoz negatif, yüksek yağlı yem + plasebo alan grupta % 62,5 ve yüksek yağlı yem + probiyotik alan grupta % 12,5 oranında hepatosteatoz+hepatosellüler balonlaşma (1 hayvan) bulunmuştur.

Sonuç olarak, yüksek yağlı diyet ile oluşturulan karaciğer yağlanmasına probiyotik desteğinin koruyucu etkisi histopatolojik olarak gösterilmiş ancak

karaciğer enzimleri, inflamatuvar belirteçler ve metabolik endotoksin üzerindeki etkisi tam olarak gözlenmemiştir.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında probiyotik kullanımının önerilebilmesi için hem doz hem de suş açısından daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, endotoksin, non alkolik yağlı karaciğer, yüksek yağlı diyet.

Bu çalışma için, Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulundan 14.08.2017 tarihli 17/19 sayılı kararı ile 'Etik Kurul Onayı' alınmıştır.

ABSTRACT

CETIN Sevan. Effect of probiotics use on fatty liver and metabolic endotoxemia, in rats fed with high fat diet. Baskent University Institute of Health Science, Department of Nutrition and Dietetics. Phd Thesis, 2018.

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a complex and multifactorial disease, it's pathogenesis is not fully understood. The pathogenesis of disease is involves a complex process, genetic polymorphism, enviromental factors and change of intestinal microbiota. Lifestyle changes and physical activity are primary goals in the treatment. In this study, the effect of probiotic use on the fatty liver and metabolic endotoxemia in rats fed with high fat diet was invsetigated. Sprague Dawley rats (n=24) were used in this study and animals were divided into 3 groups. The control group received standard purified feed, the other two groups respectively, receieved high fat feed+plasebo (1 drop of NaCl), high fat feed+probiotic Lactobasillus r. GG (1×10^{10} cfu/ 1 drop) for 16 weeks. At the end of the period, blood samples were taken from rats, mesenteric, perirenal, gonadal fat tissue levels were measured and the liver was removed for the histopathology. When the serum AST levels of groups were compared, statistical difference was found as significant, the highest level was found in high fat feed+plasebo group. The difference between the mean serum ALT levels of groups was found be significant and lowest ALT level was found in the control, the highest level high fat feed+probiotic group. There was no statistical difference between groups, cholesterol, TNF- α , CRP and LPS level ($p > 0.05$). There was no correlation between LPS with AST, ALT, cholesterol and CRP levels ($p > 0.05$). The difference between in gropups, mean of liver weight, perirenal and mesenteric fat content was significant ($p < 0.05$). At the histopathological examination of the groups revealed steatosis negative in control group, 62.5 % of in high fat feed+plasebo group and 12.5% hepatosteatois + hepatocellular balloning in high fat feed+probiotic group (1 animal). As a result, the protective effect of supplementation with probiotics on high fat diet induced fatty liver was demonstrated as histopathologically but its effects on liver enzymes, inflamatory markers and metabolic endotoxemia has not been fully demonstrated. In order to recommend of the use probiotics in NAFLD, more researches are needed in terms of both dose and strain.

Key Words: Probiotics, endotoxemia, non alcoholic fatty liver, high fat diet.

For this study, Ethics Committee Approval was obtained from Experimental Animals Ethicss Committee of Baskent University with the decision no 17/19 dated 14.08.2017.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI	ii
ORJİNALLİK RAPORU	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
GRAFİKLER VE RESİMLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD)	2
2.1.2. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Epidemiyolojisi	3
2.1.3. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	5
2.1.4. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Patogenezi	6
2.1.4.1. Çoklu vuruş hipotezi	8
2.1.4.2. Birinci vuruş hipotezi: İnsülin direnci ve hepatosteatoz gelişimi	8
2.1.4.3. İkinci vuruş hipotezi: Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif Stress	12
2.1.4.4. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve endoplazmik retikulum stresi	13
2.1.4.5. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve inflamasyon	14
2.1.4.6. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve inflamazom aktivasyonu	15
2.1.5. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Teşhisi	16
2.1.6. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Tedavi İlkeleri	20
2.1.6.1. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında diyet ve yaşam tarzı değişikliği	20
2.1.6.2. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve karbonhidrat	23
2.1.6.3. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve yağ	25
2.1.6.4. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve protein	27
2.1.6.5. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve posa	28
2.1.7. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve İlaç Tedavisi	28
2.2. Probiyotikler	29
2.2.1. Probiyotiklerin Tarihçesi, Tanımı ve Türleri	29

2.2.2. Probiyotiklerin Mekanizması	30
2.2.3. Probiyotik Miktarı	32
2.2.4. Bağırsak- Karaciğer Aksı	34
2.2.4.1. İntestinal mikrobiyota.....	34
2.2.4.2. İntestinal mikrobiyota ve non alkolik yağlı karaciğer hastalığı.....	35
2.2.5. Probiyotikler ve Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	39
2.2.6. Probiyotiklerde Güvenlik, Advers Reaksiyonlar ve İlaç Etkileşimleri.....	40
3.GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Araştırma Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi	41
3.1.2. Deney Grupları ve Besin Desteği	42
3.1.3. Verilerin Toplanması ve Ölçüm Yöntemleri	44
3.1.4. Kan Örneklerinin İncelenmesi	44
3.1.5. Histopatolojik Değerlendirme	45
3.1.6. İstatistiksel Analiz ve Raporlama	46
4.BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	65
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	78
7. KAYNAKLAR	81
8.EKLER	93

Ek1: Başkent Üniveritesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 14.08.2017 tarihli 17/19 sayılı kararı

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ACC:** Asetil CoA karboksilaz
ALT: Alanin amino transferaz
AMPK: Adenozin monofosfat aktive edici protein kinaz
AST: Aspartat amino transferaz
Bcl-2: B-hücre lenfoma protein2
BKİ: Beden kütle indeksi
BT: Bilgisayarlı Tomografi
CCL2: Sistein- sistein ligand kemokini
CD 36: Yağ asidi translokaz
CHO: Karbonhidrat
ChREBP: Karbonhidrat yanıt element bağlayıcı protein
CLRs: C-tip lektin reseptörleri
CPT1: Karnitin palmitol transferaz 1 enzimi
CYP: Sitokrom P 450 enzim sistemi
CRP: C-reaktif protein
ÇDYA: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
dL: Desilitre
DAMPs: Hasarla ilişkili moleküler yapılar
DHA: Dokosaheksaenoik asit
DM: Diabetes mellitus
DNA: Deoksiribonükleik asit
DYA: Doymuş yağ asiti
EPA: Eikosapentaenoik asit
ER: Endoplazmik retikulum
F: Fibrozis evresi
FASN: Yağ asidi sentetaz enzimi
FATPs: Yağ asidi transport proteinleri
FDA: Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi
FIAF: Açlık-indükleyici adipoz faktör
FLI: Karaciğer yağ indeksi
FOS: Fruktooligosakkarit

FXR: Forsenoid X reseptör
g: Gram
GALT: Barsakla ilişkili lenfoid doku
GGT: Gamma glutamil transpeptidaz
GI: Glisemik indeks
GLUT: Glukoz taşıyıcı
GOS: Galaktooligosakkarit
GY: Glisemik yük
HCC: Hepatosellüler karsinoma
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
HOMA-IR: İnsülin direnci-homeostatik model değerlendirme testi
HSL: Hormon duyarlı lipaz
IL: İnterlökin
IgA: İmmunglobulin A
İkB: İnhibitör kappa B
IRS1: İnsülin reseptör substrat1
IU: Uluslararası birim
İD: İnsülin direnci
İM: İntestinal mikrobiyota
JNK: c-Jun N-terminal kinaz yolağı
kg: Kilogram
kkal: Kilokalori
LPS: Lipopolisakkarit
MCP1: Monosit kemoatraktan protein
mL: Mililitre
MTP: Mikrozomal transfer proteinin
NAFL: Non alkolik yağlı karaciğer
NAFLD: Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NAS: Steatozis, lobular inflamasyon ve balonlaşma skorlarının bileşimi
NASH: Non alkolik steatohepatit
NASH-CRN-NAS: NASH Klinik Araştırma Ağı NAFLD aktivite skoru
NF-κB: Nükleer faktör kappa B

NLRP: Nükleotid bağlayıcı domain ve lösin-yüklü tekrar-içeren protein
OSA: Obstrüktif uyku apnesi
PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü
PAMPs: Patojenle ilişkili moleküler yapıların
PC: Fosfotidil kolin
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PEMT: Kolin fosfatidiletanolamin yolağı
PPRs: Pattern tanıyıcı reseptörler
PPAR- γ : Peroksizom proliferasyon aktive edici reseptör gama
ROS: Reaktif oksijen türleri
RYGB: Roux-en-Y cerrahi prosedürü
SAF: Steatoz aktivite fibrozis skoru
SİBO: İnce barsak bakteriyel aşırı büyümesi
SREBP1c: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein1c
SYA: Serbest yağ asidi
TDYA: Tekli doymamış yağ asidi
TG: Trigliserit
TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TLR: Toll benzeri reseptör
TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa
T_{reg}: Düzenleyici T hücreleri
UPR: Katlanmamış protein yanıtı
VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein
ZO: Zonula okludin

GRAFİKLER VE RESİMLER

Sayfa

Grafik 4.1. Deney gruplarında 16 hafta süresince yem tüketim miktarının ortalama dağılımı	49
Grafik 4.2. Gruplar arasında AST düzeylerinin ortalama değerleri.....	51
Grafik 4.3. Gruplar arasında ALT düzeylerinin ortalama değerleri	51
Grafik 4.4. Gruplar arasında TNF- α , CRP ve LPS düzeylerinin ortalama değerleri	53
Grafik 4.5. Deney gruplarına göre karaciğer ve perirenal ağırlıklarının ortalama değerleri.....	56
Grafik 4.6. Deney gruplarına göre perirenal gonodal ve mezenterik doku ağırlıklarının ortalama değerleri.....	57
Grafik 4.7. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirme göre karaciğer ağırlığı	62
Grafik 4.8. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre gonodal, perirenal ve mezenterik ağırlıklar	64
Resim 3.1. Sıçanların ötenazi sonrası batın bölgesinin açılması	44
Resim 4.1. Purifiye yem alan kontrol gruba ait karaciğer kesiti	59
Resim 4.2. Yüksek yağlı yem+ plasebo alan gruba ait hepatosteatozlu (A) ve masson trikom boyalı (B) karaciğer kesiti. Yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta bir hayvanda oluşan hepatosteatoz+balonlaşma ve nekroinflamatuvar odak izlenen karaciğer	60

TABLolar

Sayfa

Tablo 2.1. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve ilişkili tanımlar	3
Tablo 2.2. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının nedenleri ve risk faktörleri	6
Tablo 2.3. Vücut ağırlığı ve hepatosteatoz oranı.....	7
Tablo 2.4. Non alkolik yağlı karaciğer ve alkolik karaciğer hastalığının özellikleri	17
Tablo 2.5. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında aktivite skoru (NAS)	19
Tablo 2.6. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında stratejik yönetim yaklaşımları	20
Tablo 2.7. İnsan intestinal hücrelerinde probiyotiklerin mekanizmaları.....	33
Tablo 3.1. Hayvanlarda pelet yemden purifiye yeme geçiş süreci.....	41
Tablo 3.2. Standart ve yüksek yağlı purifiye yemin diyet örüntüsü.....	43
Tablo 3.3. Klinik Araştırma Ağı Skorum Sistemi	46
Tablo 3.4. Fibrozis Belirleme Sistemi	46
Tablo 4.1. Deney gruplarına göre vücut ağırlığı ve ağırlık farkının ortalama değerleri	47
Tablo 4.2. Deney gruplarına göre karaciğer enzimleri ve serum kolesterol düzeyinin ortalama değerleri.....	50
Tablo 4.3. Deney gruplarına göre inflamatuvar belirteçlerin ortalama değerleri.....	52
Tablo 4.4. Deney gruplarına göre LPS düzeyleri ile inflamatuvar belirteçler ve biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki.....	54
Tablo 4.5. Deney gruplarına göre organ ve yağ dokusu ağırlıklarının ortalama değerleri.....	55
Tablo 4.6. Deney gruplarına göre vücut, organ ve yağ dokusu ağırlıkları ile LPS düzeyleri arasındaki ilişki.....	58
Tablo 4.7. Deney gruplarına göre karaciğerdeki histopatolojik değişimlerin dağılımı	59
Tablo 4.8. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre karaciğer ağırlığı	61
Tablo 4.9. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre perirenal, gonodal ve mezenterik ağırlıklar.....	63

1. GİRİŞ

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), obezite prevalansının artmasıyla önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (1-4). Endüstrileşmiş ülkelerde yaklaşık %20-30 arasında bir prevalansa sahiptir (5). Non alkolik yağlı karaciğer metabolik sendromun hepatik bir göstergesi kabul edilmekte; karaciğerde (>%5hepatositlerde) trigliserit formunda aşırı lipit birikimi olarak tanımlanmaktadır (3, 5-7). Hastalığın patogenezi kompleks; genetik faktörler, çevresel etmenler ve barsak mikrobiyal faktörlerini içeren etmenlerden oluşmaktadır (5, 8, 9). Hastalığın onaylı bir tedavisi bulunmamakta, yaşam tarzı değişiklikleri ve fiziksel aktivitenin artırılması tedavide temel hedefler arasında yer almaktadır (3, 4, 10). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezinde günümüzde çoklu vuruş hipotezi kabul edilmekte, hepatosteatoza neden olan ve insülin direncini içeren birinci vuruş ve inflamatuvar yolakların devreye girdiği, hepatosit hasarı ve fibrojenizi içeren ikinci vuruşa ilaveten barsak mikrobiyotasının değişimini içeren mekanizmaları kapsamaktadır (4, 5, 8). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında ince bağırsak bakteriyel aşırı büyümesi hastaların %25-75'inde görülmekte; probiyotikler bağırsaktaki mikrobiyal dengeyi sağlamaları ve kompozisyonu değiştirmeleri nedeniyle umut verici ajanlar olarak nitelendirilmektedir (1, 11). Ancak probiyotiklerin etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi nedeniyle NAFLD'de profilaktik veya terapötik önerimler için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır (2, 11, 12). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezinin aydınlatılmasında hayvan çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır (13). Bununla birlikte probiyotiklerin hepatosteatoza ve metabolik endotoksemiye etkisini araştıran çok fazla çalışma bulunmamaktadır (14). Bu nedenle bu çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda probiyotiğin karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemiye etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilerle NAFLD'de probiyotik kullanımının etkisi ve yeni bir terapötik yaklaşım olan lipopolisakkaritin (LPS) manipülasyonu değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD)

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), son yıllarda obezite ve Tip 2 diabetes mellitus (DM) prevalansının artmasıyla birlikte (1, 3, 15) gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (16). Son yirmi yıl içerisinde diğer kronik karaciğer hastalıklarının (Hepatit B, C, primer sklerozan kolanjit) prevalansı stabil veya daha az bir artış gösterirken, NAFLD ve non alkolik steatohepatit (NASH) hastalıklarının prevalansının iki katına çıktığı belirtilmektedir; çocuk ve yetişkinlerde artan obezite insidansı nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorununu oluşturmaktadır (1, 7). Ludwig ve arkadaşları tarafından (17) ilk olarak NASH'ın 1980 yılında isimlendirilmesiyle ve NAFLD prevalansının artmasıyla, bu alandaki çalışmalar da paralellik göstermiştir (6).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, karaciğer hastalıklarının geniş bir yelpazesini içermekte ve histolojik olarak hepatositlerde > %5'den fazla trigliserit formunda lipit damlacıklarının birikimi olarak tanımlanmakta; basit steatozdan inflamatuvar steatohepatite, siroza ve bazı vakalarda hepatosellüler karsinomaya ilerlemektedir (4, 6, 7, 18). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı için kullanılan terimler arasında basit veya benign steatoz ve non alkolik yağlı karaciğer kullanılmaktadır (19). Tablo 2.1'de NAFLD ile ilgili tanımlar verilmiştir. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında, görüntüleme veya histolojik yöntemlerle teşhis edilen steatozun yanı sıra, ciddi derecede alkol tüketimi, uzun süre steatojenik tedavi ve monojenik herediter bozukluklar gibi hepatik lipit birikimine neden olan ikincil problemlerin olmaması gerekmektedir (20).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, histolojik olarak iki şekilde değerlendirilmektedir. Birincisi biyokimyasal veya hepatosellüler hasar olmaksızın non alkolik yağlı karaciğer, diğeri ise, siroz olup olmaksızın steatoz, inflamasyon ve hepatik hasar (balonlaşma) ile non alkolik steatohepatittir (19-21). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, diyabet, obezite ve dislipidemi gibi kriterlerin bütünü oluşturduğu metabolik sendromla ilişkilendirilmektedir (6, 20-23).

Tablo 2.1. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve ilişkili tanımlar (20)

NAFLD	Steatozdan, steatohepatite ve siroza kadar, alkol tüketimi olmaksızın yağlı karaciğer hastalığının tümünü kapsar
NAFL	Hepatosellüler hasar veya fibrozis bulgusu olmaksızın hepatositlerin balonlaşması, \geq %5 hepatosteatozun varlığı
NASH	Fibrozis ve/veya fibrozis olmaksızın hepatosit hasarı (balonlaşma) ve inflamasyon ile \geq %5 hepato steatoz
NASH Siroz	Geçmişte steatoz veya steatohepatitin histolojik kanıtı veya mevcut durumdaki sirozun varlığı
Kriptojenik Siroz	Belli olmayan etyoloji ile sirozun varlığı Obezite ve metabolik sendrom gibi risk faktörleri mevcuttur
NAS	Steatozis, lobular inflamasyon ve balonlaşma skorlarının bileşimi. NAS, klinik çalışmalarda NAFLD' li hastalarda karaciğer histolojisindeki değişiklikleri ölçmek için kullanılan bir araçtır. Fibrozis skorlaması ayrı yapılır.
Steatoz Aktivite	Steatozis miktarının yarı nicel skorlaması, aktivitesi
Fibrozis (SAF) Skoru	(lobular inflamasyon + balonlaşma) ve fibrozis

2.1.2. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının epidemiyolojisi

Obezite ve Diabetes Mellitus (DM) gibi hastalıkların artmasıyla, NAFLD'nin de paralel olarak artış gösterdiği belirtilmektedir (6, 24, 25). Dünyada NAFLD'nin, Avrupa, Orta Doğu ve Asya'da prevalansının daha çok arttığı rapor edilmiştir (26). Gelişmekte olan ülkelerde, hastalığın yetişkin bireylerin %30'nu, çocukların ise %10'nu etkilediği belirtilmektedir (27). Batı ülkelerinde insidansın %20-30, Asya'da %5-18 arasında olduğu saptanmıştır (4). Toplam 22 ülke örneklerinin alındığı bir çalışmada, global prevalansın %25.24 ile en fazla Orta Doğu ve Güney Afrika'da olduğu rapor edilirken; en düşük oranın %13.48 Afrika'da olduğu belirtilmiştir (28). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının klinik, demografik, biyokimyasal veriler ve ultrasonografi ile birlikte değerlendirildiği National Health And Nutrition Examination Survey III (NHANES III) araştırmasından elde edilen verilere göre

Amerika'da prevelansın %18.77 olduğu ve %11.78'nin NASH olduğu gösterilmiştir (26). Dünya genelinde metabolik sendromun artmasıyla paralellik gösteren NAFLD'nin obez hastalardaki prevelansının %75, NASH'ın %19 olduğu belirtilirken, morbid obezlerde %93 ve %26-49 oranında olabileceği belirtilmektedir (21).

Ülkemizde NAFLD prevelansının %20-25 oranında olduğu belirtilmektedir (29). Ankara'da 254 sağlıklı erkekte yapılan bir çalışmada NAFLD prevelansı %10.6 bulunmuştur (30). Ülkemizde non-obez ve non-diyabetik NAFLD'li bireylerde, insülin rezistansı ve metabolik sendromun sağlıklı bireylere göre farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, NAFLD'li hastalarda metabolik sendrom, kontrol grubuna göre %32.2 ($p<0.001$) oranında bulunurken, insülin direnci kontrol grubuna göre %46.2 oranında ($p<0.001$) daha yüksek bulunmuştur (31).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının Amerika'da, yıllık olarak ekonomiye 103 milyon \$ yük getirdiği, bu oranın Almanya, İngiltere, Fransa ve İtalya gibi Avrupa ülkelerinde 35 milyon € olduğu belirtilmiştir (3).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı genellikle asemptomatik seyrederken, klinik ve patolojik rotası steatoz, fibrozis/siroz ve hepatosellüler karsinoma (HCC) şeklinde seyretmektedir (9, 25). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında hastaların %85'inde sadece steatoz görülmekte ve hastalık çok yavaş ilerlemektedir; NASH hastaların yaklaşık %10-15'inde gelişmekte ve histolojik progresyonla bazı vakalarda siroza, karaciğer yetmezliğine ve hepatosellüler karsinomaya (HCC) neden olmaktadır (21). Hepatosteatozda kısa dönemde morbidite ve mortaliteyle ilişki bulunmazken, uzun dönemde siroz, karaciğer yetmezliği, HCC ve karaciğer transplantasyonu gibi riskler ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla hastalığın ilerlemesiyle gelişen NASH, morbidite, mortalite ilişkilendirilmekte; bu hasta gruplarında en yaygın ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklar olarak belirtilmektedir (7,21).

2.1.3.Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının etiyojisi ve risk faktörleri

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının nedenleri iki grupta sıralanmaktadır. Birincisi doğuştan veya sonradan kazanılan metabolik anormallikler, diğeri ise toksinler ve ilaçlardır (32). Tablo 2.2’de NAFLD’nin olası nedenleri ve risk faktörleri gösterilmektedir (7).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve metabolik sendrom arasındaki ilişki, metabolik sendromun bu hastalığın bir manifestasyonu yönünde olup, obezite, Tip 2 DM, yaş, cinsiyet, tedaviler ve yaşam tarzı, hastalık için birer risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (19, 33). Yaşlanmayla beraber, NAFLD’nin hepatik ve ekstrahepatik komplikasyon risklerinin artması nedeniyle, bu hasta popülasyonunda mortalite beklentisi yüksektir (34). Ayrıca, intrauterin hayatta aşırı glukokortikoid kullanımı, malnütrisyon veya overnütrisyon ve çevre kirliliğine maruziyet NAFLD ile ilişkilendirilmektedir (35). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının gelişiminde ve ilerlemesinde genetik polimorfizmin hepatik yağ içeriğinin değişimi, oksidatif stres ve inflamasyon aracılığıyla etkisinin olabileceği düşünülmektedir (18). Hepatik yağ içeriğinde, genetik varyanslara etki eden farklılıkları belirlemek amacıyla Hisprik, Afrikalı-Amerikalı ve Avrupalı-Amerikan olmak üzere üç farklı etnik grupta yapılan genom çalışmasında, Patatin-benzeri fosfolipaz domain içeren 3 geninin (PNPLA3 rs738409), hepatik yağ içeriğini artırdığı, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerini yükselttiği belirtilmiştir (36). PNPLA3 geni, karaciğerde eksprese edilmekte, açlıkla inhibasyonu, yüksek karbonhidratlı bir diyetle ekspresyonunun arttığı ve dolayısıyla beslenmeyle regüle edilebildiği belirtilmektedir (37). PNPLA3 rs738409 geninin mutasyona uğradığı kişiler sayesinde, NAFLD’nin birçok histolojik özelliği açığa çıkartılmıştır (4). Etnik gruplar arasında NAFLD’e yatkınlığın lipit metabolizmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (6).

Tablo 2.2. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının nedenleri ve risk faktörleri (7)

Risk Faktörleri	Hastalığın İlerlemesi	İlişkili Durumlar
İnsülin rezistansı/Metabolik sendrom	Obezite, artmış BKİ ve bel çevresi	Hiperlipidemi
Jejunioileal by-pass cerrahi		İnsülin rezistansı /
Yaş-40-65 yaş yüksek risk	Kontrolsüz DM, hiperglisemi, hipertrigliseridemi	Metabolik sendrom
Çocuklarda <10 yaş altı	Sedanter yaşam tarzı	Tip 2 DM
Etnik köken – Hispanik ve Asyalılarda yüksek risk	İnsülin rezistansı	Hepatit C
Afrikan-Amerikalılarda düşük risk	Metabolik sendrom	Hızlı kilo kaybı
Aile öyküsü-genetik yatkınlık	Yaş	Total parenteral nütrisyon
İlaçlar ve Toksinler (amiodaron, koralgil, tamoksifen, perhexilin, sentetik östrojenler, kortikosteroidler, metoterksat, IV tetrasiklin, yüksek aktif antiretroviral ilaçlar)	Genetik faktörler	Wilson's hastalığı, Weber-Christian hastalığı, A beta lipoproteinemia, divertikül, polikistik over sendromu, obstrüktif uyku apnesi

2.1.4. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi karmaşıktır ve tamamen anlaşılabilmiş değildir (1, 21). Bununla birlikte, genetik yapı, çevresel faktörler ve barsaktaki mikrobiyal faktörlerin etkileşimi hastalığın multifaktöriyel ve daha kompleks olmasına neden olmaktadır (5, 8, 9, 21). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının nedeni aşırı enerji alımı ve harcanması arasındaki enerji homoestazının bozulmasının yanı sıra insülin direnci (İD), adipokinler ve sitokinler aracılığıyla yürütülen inflamatuvar yollar, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon gibi mekanizmaların hastalığın gelişiminde rol almaktadır (9, 17).

Metabolik Sendrom, Tip II Diyabet, aterosklerotik kardiyovasküler hastalık gibi kardiyometabolik risk faktörlerini ve mekanizmaları barından kompleks bir durum olup; NAFLD ve metabolik sendrom arasındaki ilişki, NAFLD'nin, metabolik sendromun hepatic bir bileşeni olarak kabul edilmesidir (4, 38-40). Metabolik

sendromun temelinde yatan risk faktörleri, obezite, dislipidemi, hipertansiyon, yükselmiş kan glukozu, inflamatuvar ve protrombik durumu kapsamaktadır (38). Diagnostik kriterleri arasında trigliseritin (TG) 150 mg/dl ve daha yüksek olması, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) erkeklerde 40 mg/dl, kadınlarda ise 50 mg/dl'den düşük olması, açlık glukozunun 100 g/dl veya daha yüksek olması, hipergliseminin varlığı, bel çevresinin artması ve hipertansiyon olup, bu kriterlerden üç tanesinin bulunması durumunda metabolik sendromunun varlığından bahsedilmektedir (4, 38).

Beden kütle indeksinin (BKİ) yüksekliği ve visseral obezite, NAFLD için bir risk faktörü olmakla birlikte hepatosteatozlu hastalarda obezite prevalansı %30 ve %100 oranında gösterilmiştir (20, 41). Tablo 2.3'te vücut ağırlığı ve hepatosteatoz oranı gösterilmiştir (19). Kore'de başlangıçta metabolik anormalliği olmayan ve NAFLD gelişmeyen bireylerde yapılan The Kangbuk Samsung Sağlık kohort çalışmasında, 348193 kişi takip edilmiş, bu kişilerden 10340 katılımcıda NAFLD gelişmiştir. Fazla kilolu ve obez bireylerde NAFLD, normal ağırlığa sahip bireylere göre risk oranı 2.15 ve 3.15 kat daha fazla bulunmuştur (42).

Tablo 2.3. Vücut ağırlığı ve hepatosteatoz oranı (19)

Vücut Ağırlığı	Hepatosteatoz (%)
Normal	21
> İdeal vücut ağırlığından %10 fazla	75
Morbid obez	90-95

Tip 2 DM ve NAFLD sinerjik olarak birbirini etkileyebilen hastalıklar olmakla birlikte obezite ve Tip 2 DM'un artması NAFLD, siroz, HCC gibi hastalıklar için ciddi bir risk faktörüdür (9, 43). Kwok ve arkadaşlarının (44) vibrasyon kontrollü elastografi (Fibrosken) ile yaptığı bir çalışmada, diyabetik hastaların karaciğer sertliği %17.7 bulunurken, biyopsi yapılan hastaların %50'sinde steatohepatit tespit edilmiştir. Tip 2 DM'li 392 hastada ultrason ve elastografi ile yapılan bir çalışmada, diyabetik hastaların %30'unda karaciğer sertliği, steatozlu hastaların %18.8'inde fibrozis, %13.4'ünde siroz tespit edilmiştir (45)

2.1.4.1.Çoklu vuruş hipotezi

Hastalıkla ilgili olarak '*Two Hit Hypothesis*' iki vuruş hipotezi 1998 yılında öne sürülmüştür (18). Birincisi, sedanter yaşam tarzı, yüksek yağlı diyet ve İD'nin oluşturduğu ilk vuruş; İD'nin bir sonucu olarak hepatositlerde serbest yağ asitleri ve TG birikimi sonucu hepatosteatozun oluşumudur. İlk vuruş sonucu zarar gören karaciğer hücrelerinde oksidatif hasar sonucu inflamatuvar yolların devreye girdiği ve karaciğerde fibrozis/NASH gelişimiyle ilgili olduğu düşünülen ikinci vuruş hipotezidir (1, 2, 4, 5, 46). Hastalığın patogenezinde kabul görmüş iki vuruş hipotezinin yerini günümüzde 'multiple-hit', çoklu vuruş hipotezi almış; bu hipotezde, İD ve hücrel inflamasyonun eş zamanlı olduğu; insülin direnci, beslenmeyle ilgili faktörler, adipoz doku hormonları, genetik ve epigenetik faktörlerin bu hipotezde rol aldığı belirtilmiştir (47).

Hastalığın patogenezindeki klasik görüş, enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik sonucu oluşan obezitenin NAFLD patogenezindeki etkisini vurgularken, yenilikçi akım barsak karaciğer aksı aracılığıyla barsak bütünlüğünün bozulması sonucu gelişen metabolik endotoksemi ve düşük dereceli inflamasyonunun hastalığın gelişimine neden olduğunu vurgulamaktadır (48).

2.1.4.2. Birinci vuruş hipotezi: İnsülin direnci ve hepatosteatoz gelişimi

Karaciğer serbest yağ asitlerini diyetle, adipoz dokudan lipoliz ve/veya de novo lipogeneze elde etmekte ve normal koşullarda karaciğerde TG depolanması gerçekleşmemektedir (49, 50). Yağ asitleri plazmaya, oksidasyon aracılığıyla TG formunda esterifikasyona uğradıktan sonra çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) partiküllerine dönüşerek hücreden ayrılmakta veya hepatositlerde lipit damlacıkları şeklinde depolanmaktadır (49-52). Hepatositlere yağ asitlerinin alımı, karaciğerde eksprese edilen yağ asidi transport proteinleri (FATPs) ve yağ asidi translokaz (CD36) gibi membran proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (27, 49).

Karaciğerde aşırı miktarda TG birikiminin temelinde karaciğerden TG sentezi ve kullanımı arasındaki dengesizlik gösterilmekle birlikte altta yatan mekanizmalar; adipoz dokudan fazla miktarda serbest yağ asidinin taşınması, karaciğerde VLDL üretiminin veya sekresyonun azalması sonucu karaciğerden SYA'nin uzaklaştırılmasındaki azalma, de novo lipogeneze artma, yağ asitlerinin beta oksidasyonundaki bozulmadır (18, 27, 53). Çok düşük dansiteli lipoprotein,

karaciğerden mobilizasyonu için mikrozomal TG transfer proteini (MTP) ile VLDL prekürsörlerinden Apolipoprotein B-100 (ApoB) sentezlenmesi ve TG'den zengin VLDL formunun oluşması gerekmektedir. Hepatik VLDL sekresyonunun bozulmasına, familyal hipobetalipoproteinemi, farmakolojik ajanlarla MTP'in inhibisyonu veya CD36'nin azalması gösterilmektedir (54).

De novo lipogenezin, ilk aşaması Asetil Co-a'nın, Asetil Co-A Karboksilaz (ACC) enzimiyle Malonil Co-A'ya dönüşümüdür. Malonil Co-A karnitin palmitol transferaz 1 (CPT1) enzimi ile yağ oksidasyonunu regüle etmekte ve CPT1 mitokondriyaya girerek uzun zincirli yağ asitlerine transporte olmaktadır. Asetil Co-A karboksilaz ve yağ asidi sentetaz enzimi (FASN), insülin sinyalizasyonu ile upregüle olan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein1 (SREBP-1c) ve postprandiyal aktive olan karbonhidrat yanıt element bağlayıcı protein (ChREBP) ile de novo lipogenezin regülasyonunu sağlayan enzimlerdir (18, 55). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında de novo lipogenezin artmasına neden olarak, hiperinsülinemiyle eş zamanlı oluşması ve basit karbonhidratların aşırı tüketimi neden olarak gösterilmektedir (18). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerde artmış de novo lipogenezi göstermek amacıyla karaciğerdeki yağ miktarının manyetik rezonans spektroskopisi ile belirlendiği bir çalışmada, de novo yağ asidi sentezi, karaciğerdeki yağ miktarı yüksek olan bireylerde düşük olanlara göre 3 kat fazla bulunmuştur (56).

Beta oksidasyon, koenzim A aracılığı ile yağ asitlerinin mitokondriyal matrikse taşınmasını gerektirmektedir. Yağ asil-CoA, CPT1 ile yağ asil karnitine dönüşmektedir (54). Açlık durumunda, yağ asitlerinin β -oksidasyonu vücut için başlıca enerji kaynağı olup; β -oksidasyonun kullanılabilmesi için uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınması ve CPT1 ile katalize edilmesi gerekmektedir. Malonil Co-A ve insülin aracılığıyla CPT1'in inhibisyonu, endoplazmik retikulumda CYP3A4 bağımlı ω -oksidasyonun gerçekleşmesine ve lipit akümülyasyonuna neden olmaktadır (18).

Yaklaşık olarak, hepatik lipitlerin %60'ı TG'lerin periferik lipolizi ile elde edilirken, %35-40'nın diyetle alınan karbonhidrat ve yağlardan geldiği belirtilmektedir (9). Non alkolik yağlı karaciğer hastalarında hepatik ve plazma trigliseritlerin biyolojik kaynağını belirlemek amacıyla, gaz kromatografi ve kütle

spektrometre kullanılarak yapılan bir çalışmada karaciğerdeki triaçilgliserol miktarının %60'ı serum non-esterifiye yağ asitlerinden, %25'i de novo lipogenezden ve %15'i diyetten elde edildiği bulunmuştur (57).

Hastalığın patogenezinde İD başlangıç noktası olarak gösterilmektedir (5, 41, 46). Bununla birlikte, hepatik İD'nin, NAFLD'da bir neden mi, sonuç mu veya her ikisinin de birlikte olduğu bir durum mu olduğu bilinmemektedir (54). Çevresel faktörler, genetik ve beslenme alışkanlıkları İD'ne sebep olan faktörler arasındadır (5, 46). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında İD, genellikle periferik olmakla birlikte iskelet kasında ve adipoz dokuda meydana gelmektedir. İskelet kasında oluşan İD, hiperglisemiye neden olan glukoz alımının azalmasına yol açarken, adipoz dokuda meydana gelen İD, insülin hormonunun antilipolitik aktivitesini bozarak SYA'nin artmasına yol açmaktadır (47).

Endokrin ve sekresyon görevlere sahip, bir endokrin organ olarak kabul edilen adipoz doku, SYA'nin majör kaynağıdır ve TG'lerin yaklaşık olarak %60 birikiminden sorumludur. (1, 5). Visseral adipoz doku interlekin 6 (IL-6), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1), leptin, adiponektin gibi sitokin ve hormonların majör bir kaynağıdır (1). Visseral adipoz dokunun artması, adipositlerde insülinin etkisinin bozulmasına, lipolizde baskılanmaya, adiposit stresine ve makrofajlar aracılığıyla infiltrasyona neden olmaktadır. Adipokinlerden TNF- α , IL-6, monosit kemoatraktan protein 1(MCP-1), rezistin ve PAI-1 salınımı sonucu nükleer faktör kapp B (NF- κ B) aracılığıyla insülin sinyalizasyonu bozulurken, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yoluyla, İD'ne neden olmaktadır (18). Bununla birlikte insülin, plazma insülin bağımlı hücre membranına bağlanması için insülin reseptör substrat-1(IRS-1) proteinine gereksinim duymaktadır. Bu reseptörün tirozin fosforilasyonu ile fosfotidilinositol 3-kinaz, protein kinaz B ve Ras-mitojen aktive edici protein kinaz yolları aktive olmaktadır (38). Dolayısıyla IRS-1 reseptörlerindeki bir bozukluğun da insülin direncine neden olabileceği belirtilmektedir (51, 54). Hepatositlerdeki hiperinsülinemi, yağ asitlerinin de novo sentezini artırmakta, hepatik TG sentezi hepatositlerde artan SYA tarafından ve peroksizom proliferatif aktive edici reseptör gama (PPAR- γ) ve SERBP-1 gibi lipojenik enzimler yardımıyla yürütülmektedir (38).

Ciddi steatozu olan, ultrason ve bilgisayarlı tomografiyle (BT) teşhis konulmuş NAFLD'li hastalarda, BT ile ölçülen visseral yağ alanı ve steatoz arasındaki ilişkiyi araştıran obez ve obez olmayan hastada yapılan bir çalışmada, ciddi steatozun, visseral yağ alanı ve bel çevresiyle pozitif ilişki gösterdiği ($p < 0.0001$) ve visseral yağ birikiminin BKİ'ne bakılmaksızın NAFLD'de hepatik yağ infiltrasyonunu etkilediği belirtilmiştir (58).

Kolin gerek diyet yoluyla gerekse endojen olarak üretilebilen bir nütrient olup, NAFLD ile ilişkisi 50 yıl önce kolin eksikliği ve hepatik lipit birikimi ile gösterilmiştir. Kolin-fosfatidilkolin metabolizmasının değişmesinde hepatosteotoza neden olan yolaklar mevcuttur ve bu total parenteral beslenmede kolin takviyesi ile yağ infiltrasyonunun tersine çevrilmesiyle gösterilmiştir. Kolin fosfatidiletanolamin (PEMT) yolağı ile sentezlenir ve kolinin PEMT'e oranının azalması: Diyetle alımın azalması ve/veya fosfatidilkolin (PC) yolağında kolin biyoyararlanımının azalması, PEMT aktivasyonunda genetik çeşitlilikten dolayı azalma ve metilasyon kapasitesinin azalması neden olarak gösterilmektedir (59). Non alkolik yağlı karaciğer şüphesi olan hasta grubunda, lipidomik analizin yapıldığı bir çalışmada, PC oranının hem NAFLD hem de NASH grubunda düşük bulunduğu gösterilmiştir (60).

Seramidler, hücre membranının bir kompartımanı ve sfingolipit türevleri olup, insülin rezistansı, oksidatif stres ve inflamasyon gibi mekanizmalarda rol almaktadırlar (61). Seramidler oksidatif stres sonrası, palmitol Co-A ve serin palmitol Co-A transferaz ve nötral sfingomiyelinazın aktivasyonu ve salvage yolağıyla üretilmektedir (61, 62). Sfingozinler çoğunlukla, seramidlerin üretimi veya türevlerinden elde edilen re-açılma aracılığıyla kurtarılır. Sfingozinlerin bu geri dönüşümü 'salvage-kurtarma yolağı' olarak tanımlanmaktadır. Seramidlerin iskelet kasında ve karaciğerde insülinin sinyalizasyonunu azaltarak ve karaciğerde birikerek İD'ne neden olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte seramidlerin TNF- α ile birlikte, reaktif oksijen türlerinin üretimine katkıda bulunması apoptozise ve hepatik inflamasyona yol açmaktadır (63). Kemirgenlerde tetrakloridkarbon maruziyeti sonucu karaciğerde seramid düzeylerinin artmasıyla hepatik hücre ölümünün ve plazma seramid düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (64). Ayrıca insan ve hayvan modellerinde lipopolisakkaritlerin (LPS) uyarılmasıyla oluşan akut faz yanıtının hepatik seramid üretiminin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (65).

2.1.4.3. İkinci Vuruş: Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres

Mitokondride gerçekleşen disfonksiyonel durum NAFLD'nin patogenezi, yapısal değişiklik olarak mitokondriyal deoksiribonükleik asidin (DNA) azalması, fonksiyonel değişiklik olarak mitokondriyal β -oksidasyon yönünde etkilemektedir (5, 46). Lipotoksisite terimi, Unger tarafından pankreatik beta hücrelerinde aşırı SYA'lerinin toksik etkisini tanımlamada kullanılmıştır (66). Karaciğere serbest yağ asidi akışı sonucu gelişen inflamasyonun vücudun adaptif mekanizmasını baskılaması, ROS üretimine, endoplazmik retikulum stresine, hepatosellüler disfonksiyona ve hasara neden olmakta ve bu sürece lipotoksisite denilmektedir (18). Aşırı ROS üretiminin DNA, protein ve lipit hasarına neden olduğu, NK- κ B, p38MAPK ve JNK gibi sinyalizasyon yollarını aktive ederek hücre ölümüne yol açtığı belirtilmektedir (52). Hepatik lipotoksisiteye etkisi olan lipitler SYA'leri, TG'ler, lisofosfatidilkolin, seramid, serbest kolesterol ve safra asitleridir (61).

Yağ asitleri ve metabolitlerinin farklı biyolojik görevleri ve hücre yapısında bulunmalarının yanı sıra bazılarının lipotoksik, bazılarının ise protektif özelliklerinin olması, metabolik ve davranışsal farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Doymuş yağ asitleri (DYA) hücre kültürlerinde toksik iken, tekli doymamış yağ asitlerinin (TDYA) toksik veya sitoprotektif olduğu belirtilmektedir (67). In vitro oleik ve palmitik asidin hepatositlere etkisini inceleyen çalışmada; hepatosit hücre kültüründe oleik asidin, palmitik asitten daha fazla steatojenik ve daha az apoptotik olduğu gösterilmiştir (68). Tekli doymamış yağ asitlerinin, DYA'lerinden PPAR için daha baskın ligandlar olması, PPAR aktivasyonunda hücrenin viyabilitesinde (yaşayabilme yeteneği) TDYA'nin farklı etkileriyle açıklanmaktadır (67). Doymuş yağ asitlerinin, JNK ve mitokondriyal yollar aracılığıyla hepatik inflamasyonu ve apoptozisi indüklediği, JNK yolağının insülin direnci ve hepatotoksisitenin anahtar medyatörü olduğu belirtilmektedir (9, 61). Hepatosit hücrelerinde bulunan JNK1 ve JNK2 genlerinden özellikle JNK1, proapoptotik B-hücre lenfoma protein 2 (Bcl-2) ailesinden BH-3 proteinlerinin ekspresyonunun regüle edilmesiyle, apoptozis indüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (61).

İnsülin direnci ve mitokondriyal anormallikleri araştırmak için, BKİ >40 olan, NASH'lı hastalarda yapılan bir çalışmada karaciğer hücrelerinin elektron mikroskopisiyle değerlendirilmesi sonucu hücre morfoloji ve mitokondriyal

disfonksiyon gösterilmiş; insülin direncinin yağ asidi β -oksidasyonunu ve oksidatif stresi artırdığı belirtilmiştir (69). Reaktif oksijen türleri ve okside olmuş düşük dansiteli lipoprotein, Kupffer ve yıldız hücrelerini uyararak inflamasyon ve fibrozise neden olabileceği bu durumun NASH'ın başlangıç evresiyle ilişkilendirildiği belirtilmektedir (5, 18).

Adiponektin adipositlerden üretilen bir sitokindir; adiposit boyutu ve insülin duyarlılığı aracılığıyla dokulardan ne miktarda adiponektin salınacağı belirlenir (70). Adiponektin, karaciğerde glukozun regülasyonuna katılarak glikoneogenez inhibisyonunu sağlamakta, NF- κ B ve TNF- α 'yı inhibe ederek lipogenez baskılamasıyla organizmada koruyucu bir rol almaktadır (1, 70,). Bu etki, adiponektin reseptörleri aracılığıyla, karaciğerde adipokin sinyalizasyonunun adenosin monofosfat aktive edici protein kinaz (AMPK) yolağının ve peroksizom proliferatif aktive edici reseptör alfanın (PPAR- α) aktivasyonu ile sağlanmaktadır (71). Adenosin monofosfat aktive edici protein kinazın aktif duruma gelmesi, yağ asitlerinin oksidasyonunu uyarmakta, yağ asidi akışını ve de novo lipogenez baskılamaktadır (1,72). Adiponektin düzeylerinin NAFLD'li hastalarda daha düşük olması, SYA birikimi ve lipid oksidasyonunun artmasıyla paralel olup, steatozdan NASH'a ilerleyen süreçte negatif bir etkiye yol açabilmektedir (1, 5).

2.1.4.4. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve endoplazmik retikulum stresi

Hepatosteatozdan NASH'a ilerleyen süreçte, endoplazmik retikulum stresi ile karakterizedir. Endoplazmik retikulum intraselüler, hücre nükleusuna komşu bir organeldir ve proteinlerin transportu, lipid sentezi ve kalsiyum homeostazı gibi hayati görevlerinin yanı sıra diğer bir görevi, proteinlerin katlanmasıdır. Herhangi bir fizyolojik veya patolojik durumda, hatalı veya katlanmamış proteinlerin birikimi 'katlanmamış protein yanıtı (UPR)' olarak tanımlanırken bu durum aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi nedeniyle olmaktadır (5, 61, 73). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında UPR aktivasyonu, hiperglisemi ve mitokondriyal hasarı indükleyerek oksidatif strese neden olmakta ve uzamış UPR aktivasyonu hücre ölümüne neden olan apoptotik yolağın başlamasıyla sonuçlanmaktadır (5, 61). Endoplazmik retikulum stresinin diğer bir tetikleyicisi de inflamasyon ve apoptozisde bir aktivatör olan JNK yolağıdır (9).

Çeşitli ksenobiyotiklerin transformasyonundan sorumlu olan, yağ asitlerinin omega hidroksilasyonunu gerçekleştiren ve endoplazmik retikulumun integral bir membran proteini olan sitokrom P450 (CYP)2E1'in steatozdaki rolü, CYP2E1 monoksijenazın, lipotoksisitede ekspresyonunun ve aktivasyonunun artması yönündedir (52, 61). Metiyonin-kolin yetersiz diyetle beslenen farelerde NASH gelişiminde CYP2E1 etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, CYP2E1'in hepatik mikrozomal lipid peroksidasyonu ile ilişkisinin pozitif yönde olduğu ve lipid peroksitlerinin 100 kat arttığı gösterilmiştir (74). Ayrıca hepatosteatoz ve steatohepatit şüpheli hastalarda biyopsi aracılığı ile, CYP2E1 ekspresyonu ve aktivasyonun incelendiği bir araştırmada ise, BKİ ve CYP2E1 arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (75).

2.1.4.5. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve inflamasyon

Hepatositlerde SYA'lerinin artışı sonucu oluşan lipotoksisite, insülin direnci, adipoz doku disfonksiyonu ve bağırsakta endotoksinlerin üretimi, pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmaktadır (5). Bu sitokinlerin en önemlileri hepatik yıldız hücreleri ile (crosstalk) iletişimi sağlayan TNF- α ve IL-6'dır (5, 76). İki önemli inflamatuvar yolak, JNK-API ve NF- κ B, kronik inflamasyonda, NAFLD'de etkinlik göstermektedir (5). Nükleer faktör kappa B yolağı, proinflamatuvar sitokinlerin ve (sistein-sistein kemokin ligandı) CCL2 kemokinlerin salınımıyla hepatosit hasarını indüklerken, mitojen aktive edici protein kinaz-JNK yolağı ise inflamasyon ve apoptozisi indüklemektedir (76, 77). Ayrıca NF- κ B yolağının inflamasyonu tetiklemesi, hepatosit proliferasyonu ve ölümüne neden olarak karsinogenezisin gelişimine katkıda bulunması, hepatosellüler karsinomada da rol aldığını göstermektedir (5, 77).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının gelişimi ve TNF- α arasındaki ilişkiyi inceleyen, 363 sağlıklı bireyin dört yıl süreyle takip edildiği kohort araştırmada, NAFLD gelişen bireylerin insidansı yüksek bulunurken, AST, ALT, İD ve HOMA-IR değerlerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadığı belirtilmiştir. Yaş, cinsiyet ve BKİ ayarlandıktan sonra TNF- α düzeyleri, NAFLD gelişmeyen gruba göre daha yüksek ve anlamlı bulunmuştur (78).

2.1.4.6. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve inflamazom aktivasyonu

İnflamazomlar, endojen ve ekzojen uyaranlara karşı inflamasyonu indükleyen, kaspaz içeren ve patojen mikroorganizmalardan veya serbest kalan hasarlı hücrelerden elde edilen sitoplazmik multi-protein kompleksleridir (5, 79). Mikroorganizmada, patojenle ilişkili moleküler yapıların (PAMPs) veya hasarla ilişkili moleküler yapılarının (DAMPs) algılayıcıları olarak hareket etmektedirler (5). İnflamazomların aktivasyonunu indükleyen, Toll benzeri reseptörler (TLR), DAMPs veya PAMPs gibi endojen tehlike sinyallerini tanımaya yardımcı olurken, Kuffer hücreleri, hepatositler ve yıldız hücreler gibi hepatik hücrelerin aktivasyonunda rol almaktadır (9). Nükleotid-bağlayıcı oligomerizasyon domain-içeren protein NOD-benzeri reseptörler, immun sensörlerin bir üyesi olup, proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyaran sitoplazmik protein yapısındaki inflamazomlardır (21). İnflamazomların birleşmesinde etkin olan NOD-benzeri reseptörler (NLR), NASH patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (9). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında inflamazomların aktivasyonu, PPAR- α 'nın baskılanmasıyla ve hücre ölümünü indükleyen TNF- α 'nın indirek etkisinin desteklenmesiyle sonuçlanmaktadır (5).

Leptin, adipoz dokulardan salınan ve bir sitokin türevi olan anoreksijenik bir hormon olup, enerji homeostazında, glukoz ve lipit metabolizmasında görev almaktadır (70, 72). Leptin 16kDa proteini ilk tanımlanan adipokindir; dolaşımdaki miktarı adipoz dokuya ve enerji dengesinin durumuna bağlıdır. Leptin ve NAFLD arasındaki ilişki net olmamakla birlikte, leptinin antisteatotik etkisinin olduğu ancak leptinin yüksekliğinin, hepatik inflamasyona ve fibroze neden olabileceği belirtilmektedir (72). Leptin yetersizliği ve alkolle indüklenen NAFLD arasındaki ilişkiyi farelerde araştıran çalışmada, ilk basamakta hayvanlar etanol içeren diyetle 2, 4 veya 8 hafta süreyle alkole maruz bırakılarak adipokin üretimi araştırılmış, çalışmanın ikinci fazında farelere çalışmanın son iki haftası subkutanöz 0.5 mg/gün/kg leptin verilmesiyle NAFLD ve leptin yetersizliği ilişkisi incelenmiştir. Alkol maruziyetinin, adipokin konsantrasyonuna etkisi bulunmazken, adipoz doku kütlelerinde ciddi derecede azalma olduğu belirlenmiştir. Plazma leptin konsantrasyonlarının azalması ile alkolik yağlı karaciğer hastalığı, beyaz adipoz doku ve vücut ağırlığı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p < 0.05$) (71).

Demirin hepatik düzeydeki artışının NASH'ın gelişiminde etkin olabileceği belirtilmektedir. İnsülin direnci artmış hepatik demir düzeyleriyle ilişkilendirilirken tam tersi yönünde düzelmiş glisemik yanıt, serum ferritin ve hepatik demir konsantrasyonlarında düzelmeye ilişkilendirilmektedir. Bu mekanizmanın nekroinflamasyondaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye dönüşümü sonucu açığa çıkan ROS ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (53).

2.1.5. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Teşhisi

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, karaciğer yetmezliğine kadar asemptomatik seyretmekte; biyokimyasal veya farklı amaçlar için görüntüleme sonucunda karaciğerde steatoza özgü işaretler ortaya çıktığında tesadüfi bulunmaktadır. İnsülin direnci, obezite gibi metabolik sendromla ilişkili faktörlerin ortaya çıkması teşhiste erken tanı için başarı sağlamaktadır (1, 4). Klinik semptomlar, spesifik ve hastalığın şiddetini değerlendirmede güvenilir değildir. En fazla görülen semptomlar, sağ üst kadranda ağrı ve yorgunluk belirtileridir. Hastaların %50'sinde obezite ve hepatomegali rapor edilmiştir (38).

Biyokimyasal parametreler arasında en fazla görülen anormallikler AST ve ALT düzeylerindedir ve nadiren normal limitin 3-4 kat üstüne çıkmaktadır. Çoğu vakada ALT düzeyinin AST düzeyinden yüksek olduğu ancak siroz varlığında AST düzeyinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (38). De Ritis Oranı, AST ve ALT'nin serum düzeyleri arasındaki orandır ve hepatitin etyolojisinde önemli bir indikatör olarak kabul edilmektedir (80). Hepatosteatozdan NASH'a ilerleyen süreçte AST düzeyinin yüksek olması, AST/ALT düzeyinin de yüksek olmasının bir sonucudur (81). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında, transaminaz düzeyleri normal sınırlar arasında çıkabilir ve AST/ALT oranı genellikle <1 olmakla birlikte, ciddi karaciğer hasarlarında bu oran artabilmektedir (82). Tablo 2.4'de NAFLD'in ve alkolik yağlı karaciğer hastalığının karakteristik özellikleri verilmiştir. Bununla birlikte ultrason taraması, düşük duyarlılıkla <%30 steatozu belirleyebilirken, %93 duyarlılıkla >%33 orta derecede steatozu değerlendirmekte ve bu nedenle yalnızca başlangıçtaki diagnostik yaklaşımı sergilemede önemli olduğu belirtilmektedir (2).

Çoklu etnik gruplarla yapılan Dallas Kalp Çalışmasına göre, 2287 bireyin %31'inde hepatosteatoz pozitif ve %79'unda ALT düzeyi normal sınırlarda bulunmuştur (83). Amerika'da 1999-2002 yılları arasında 6823 katılımcıyla yapılan

Ulusal Sağlık ve Beslenme Anketine (NHANES) göre, steatohepatitin diyagnozunda rol oynayan diğer bir biyokimyasal belirteç olan AST düzeyi %3.6 yükselmiştir (84).

Bir akut faz reaktanı ve inflamatuvar durum belirteci olan C-reaktif protein (CRP), NAFLD insidansının güçlü bir göstergesidir (85). Ülkemizde, NAFLD tanısı konulmuş 296 hastada yapılan bir çalışmada, tanı almış hastaların CRP düzeyleri kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş; CRP'nin non-invaziv bir belirteç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (86).

Tablo 2.4. Non alkolik yağlı karaciğer ve alkolik karaciğer hastalığının özellikleri (81)

Özellik	Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
Vücut Ağırlığı	Artmış	Değişken
Açlık plazma glukozu veya HbA1c	Artmış	Normal
Günlük alkol tüketimi	<20g-kadın, <30 g-erkek	>20 g-kadın, >30g-erkek
ALT	Artmış veya normal	Artmış veya normal
AST	Normal	Artmış
AST/ALT oranı	<0,8(>0,8 hastalığın ilerlemesi)	>1,5
GGT	Artmış veya normal	Oldukça yüksek
TG	Artmış	Değişken, oldukça yüksek olabilir
HDL kolesterol	Düşük	Artmış
Korpüsküler volüm	Normal	Artmış

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının teşhisinde ultrason, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme gibi tekniklerden faydalanılırken, NASH'da inflamasyonun varlığı, lokasyonu ve özelliklerinin teşhis edilebilmesi ve NAFLD'dan belirgin farklılığın ayırtebilebilmesi için biyopsi gerekmektedir (3). Bilgisayarlı tomografi, ultrasonografiden daha pahalıdır ancak daha hassas olmamakla birlikte, diğer karaciğer patolojilerini belirlemede etkin olduğu

belirtilmektedir (82). Bazı bireylerde invaziv diagnostik teknikler uygulanmaz iken, steatoz ve fibrozis için non-invaziv belirteçler gereklidir (9).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının teşhisinde kullanılan dörtlü yaklaşım, hepatosteatozun varlığı (görüntüleme veya histoloji aracılığıyla), alkol tüketiminin, viral etyolojilerin ve diğer kronik karaciğer hastalıklarının olmamasıdır. Alkol kullanımı, kronik hepatit B ve C ilaç tedavisi, total parenteral nutrisyon, Wilson hastalığı, malnütrisyon, otoimmün hepatit gibi hastalıklarda da hepatosteatoz görülebileceğinden bu hastalıkların tanı koymada göz önünde bulundurulması gerekmektedir (4).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının teşhisinin konulmasında karaciğer biyopsisi altın standart olarak kabul edilmektedir. Karaciğer biyopsisi, aminotransferaz düzeyleri normal olduğunda ve görüntüleme yöntemlerinde bir bulgu olmadığında önerilmemektedir (19). Dünya genelinde en çok kullanılan teşhis metodu NASH Klinik Araştırma Ağı skorlama sistemidir (15). Teşhisin tutarlı ve tekrarlanabilir olması ve klinik çalışmalarda kullanılabilmesi için yarı nicel olması gerektiği belirtilmektedir (4). Tablo 2.5’de aktivite skoru gösterilmiştir (4).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında aktivite derecesini belirlemek için sayısal skorlamalar kullanılır: Steatoz 0-3 puan, hepatosellüler balonlaşma 0-2 puan ve asiner inflamasyon 0-3 puanı içermektedir. Eşik değeri <3 aktivite skorlaması, NASH’ın histolojik teşhis olarak bulunmamasıyla bir korelasyonu gösterirken, eşik değeri 5 veya ≥ 5 NASH’ın teşhisinde iyi bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Eşik değerinin ≥ 4 olması durumunda NASH için girişimsel yöntemler önerilmektedir (4). NASH CRN skorlaması ile ilişkilendirilmeyen NAFLD’li hastalardan elde edilen 386 karaciğer biyopsisinin tek patolog tarafından bu skorlamanın yeniden incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada, NAFLD aktivite skoru ve histolojik teşhis arasındaki ilişkinin klinik çalışmalar için iyi bir örnek olduğu; ≥ 4 NAFLD aktivite skorunun NASH’ın öngörüsünde hassas ve spesifik bir gösterge olduğu belirtilmiştir (88).

Obezite, DM ve OSA gibi hastalıkların varlığında NAFLD’den şüphelenilmesi vurgulanmaktadır (6). Fiziksel değerlendirmede BKİ ve visseral adipozite, NAFLD’nin tanısı konusunda ipuçları sağlarken, zayıf hastalarda tanı koyma zorlaşmaktadır. Taramanın yapılması risk altındaki hastalarda önemli olmakla

birlikte, karaciğer fonksiyon testlerinin normal değerler arasında çıkması, ultrasonun pahalı olması ve taramanın geniş bir toplulukta yapılmasının güçlüğü tanı koymadaki zorluklar arasında sayılmaktadır (4).

Tablo 2.5. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında aktivite skoru (NAS) (4).

Steatoz Derecesi (0-3)	Skor
<%5	0
%5-33	1
%34-66	2
>%66	3
Lobular İnflamasyon	
Odak yok	0
<2 odak için 20 x alan	1
2-4 odak için 20 x alan	2
>4 odak için 20 x alan	3
Hepatositlerde Balonlaşma	
Yok	0
Birkaç balon hücresi	1
Birçok balon hücresi/belirgin balonlaşma	2
Fibrozis Evresi	
Yok	0
Perisinusoidal veya periportal	1
Hafif, 3 bölge, perisinusoidal	1A
Orta, 3 bölge/ perisinusoidal	1B
Portal/periportal	1C
Perisinusoidal ve portal/periportal	2
Köprüleşme fibrozisi	3
Siroz	4

2.1.6.Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Tedavi İlkeleri

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı önemli bir halk sağlığı sorunu olmasına karşın, yetersiz bilimsel veriler nedeniyle Amerikan Besin ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir farmakolojik ajanı bulunmamaktadır (2, 89). Tedavide temel amaç hastalığın erken teşhisi ile progresyonun ve mümkün olabildiğince hepatik hasarın engellenmesidir (2). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında, onaylanmış terapötik yaklaşım diyet ve fiziksel aktiviteyi de içeren yaşam tarzı değişikliğidir. (7, 20, 41). Tablo 2.6’da NAFLD’de stratejik yönetim yaklaşımları verilmiştir (90).

Tablo 2.6. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında stratejik yönetim yaklaşımları (90)

Kategori	Öneri
Diyet modifikasyonu	Hipokalorik diyet ve/veya egzersiz ile en az %3-5 ağırlık kaybı sağlanır ve hepatosteatoz azalır; nekroinflamasyonu düzeltmek için %10 kilo kaybı gerekebilir
Fiziksel aktivitenin artırılması	Orta yoğunlukta 200 dak/hafta düzenli egzersiz programı
Davranışsal müdahaleler	Kendini izleme, ağırlık kaybı hedefi koyma, uzun dönem yaşam tarzındaki değişimi korumaya çalışma
Farmakolojik ajanlar	İştah azaltıcı, yağ emilimini engelleyici, mide hacmini azaltıcı
Bariatrik Cerrahi	Uygun obez NAFLD/NASH’lı hastalarda
Besin Destekleri	Birçok besin desteği olmasına rağmen, uzun dönemde çok azı etkindir ve sağlıklı kilo vermede önerilmez

2.1.6.1.Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında diyet ve yaşam tarzı değişikliği

Farmakolojik ajanlar ve bariatrik cerrahiyle ilgili gelişmeler söz konusu olmasına karşın, daha güvenilir ve ekonomik bir yöntem olan ve obezite başta olmak üzere diğer metabolik hastalıkların, NAFLD’nin gelişiminin ve progresyonunun engellenebilmesi beslenme tarzının değişimiyle mümkün olmaktadır (90, 91). Dengeli bir diyetle sağlanan ağırlık kaybı, obez ve obez olmayan NAFLD’li hastaların yönetiminde önemli bir faktördür (90). Yaşam tarzı değişikliği ile hastaların en az %5 ve ideal %10 ağırlık kaybı, NAFLD’de rezolüsyon, NASH’da ise

fibrozisin gerilemesi sağlanmıştır (2, 91). Ağırlık kaybının sağlanmasında enerji alımının enerji harcamasından daha az olmasına ilaveten düzenli fiziksel aktivitenin eklenmesi, vücut yağ kütesinin azalması ve kontrolünde temel hedefler arasındadır (91). Kılavuzlarda, günlük enerjinin 500-1000 kkal arasında kısıtlanmasının yanı sıra, diyetin örüntüsü açısından makronütrient kompozisyonunun da sağlanması gerekmektedir (87, 90, 91).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında glukoz metabolizması, kardiyovasküler risk ve mevcut tedavilerin incelendiği sistematik derleme ve meta analizde, en az %5 ağırlık kaybının hepatosteatozu düzelttiği, hastaların ancak <50'sinin bu hedefe ulaşabildiği belirtilirken, \geq %7 ağırlık kaybının NASH'da düzelmeye ilişkili olduğu gösterilmiştir (92). Yaşam tarzı değişiklikleri ile sağlanan ağırlık kaybının, NASH'ın histolojik özelliklerindeki değişime etkisini incelemeyi hedefleyen prospektif bir çalışmada, 293 hasta 52 hafta süreyle takip edilmiş, düşük yağlı bir diyet ile günlük enerji ihtiyaçlarından 750 kkal/gün azaltılmıştır. Haftalık 200 dakika yürüyüş ile hastaların %80'inde ağırlık kaybı gözlemlenirken, %48'inde steatozda düzelmeye, %39'unda balonlaşma skorunda azalma ve %50'sinde lobular inflamasyonda düzelmeye kaydedilmiştir (93).

Non alkolik steatohepatitte ağırlık kaybını hedefleyen bir çalışmada diyet, egzersiz ve davranış değişikliğinin üçlü kombinasyonu uygulanmıştır. Hastalar 48 hafta takip edilerek müdahale grubuna başlangıç kiloları 91 kg'dan <ise 1000-1200 kkal /gün veya başlangıç kiloları 91kg'dan>ise 1200-1500 kkal /gün enerji alımı hedeflenmiş, diyetin yağ içeriği %25 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ise, sağlıklı beslenme, fiziksel aktivite ve NASH hakkında eğitim verilmiştir. Çalışmanın sonunda müdahale grubunda ağırlık kaybı %9.3 bulunurken, bu oran kontrol grubunda %0.2 ($p<0.05$) daha düşük bulunmuştur. Araştırmacılar, müdahale grubunda \geq %7'den fazla kilo kaybının, steatohepatitte ($p<0.001$), lobular inflamasyonda ($p=0.03$) ve NAFLD aktivite skorunda ($p<0.001$) anlamlı derecede düzelmeye neden olduğunu göstermişlerdir (94).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının tedavisinde enerji kısıtlamasının etkinliğine karşın, aşırı enerji kısıtlamasının ve hızlı ağırlık kaybının hepatosteatoz gelişimine ve bunun da inflamasyona veya periportal fibrozise neden olabileceği belirtilmektedir (95, 96). Roux-en-Y cerrahi prosedürü (RYGB) sonrası hızlı ağırlık

kaybı veya malnütrisyonlu (18-91kg) 8 hastada agresif gelişen NASH'ı inceleyen çalışmada, bütün hastalarda akut veya subakut hepatik disfonksiyon gerçekleşmiş; hastaların kaybına veya karaciğer transplantasyonuna kadar agresif ilerleyen bir süreç kaydedilmiştir. Morbid obezlerde bariatrik cerrahi sonrası hızlı kilo kaybıyla gelişen agresif steatohepatitin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hızlı yağ mobilizasyonunun oksidatif strese neden olabileceği belirtilmiştir (97). Dolayısıyla NAFLD'li, özellikle ilerlemiş karaciğer hastalığı olan bireylerde, ağırlık kaybının yavaş, kontrollü, belirli bir periyoda yayılmış ve sürdürülebilir olmasının önemli olduğu vurgulanmaktadır (90, 95).

Ağırlığın kaybedilmesi kadar, kaybedilen ağırlığın korunmasında 60 dak/gün orta derecede fiziksel aktivite, düzenli kahvaltı alışkanlığının kazanılması, manevi desteğin artırılması, asitli ve şeker ilave edilmiş içeceklerin azaltılması gibi yöntemlerin yanı sıra hastanın uzun dönemli hedefler koyması, ağırlık yönetiminde kendi sorumluluğunu, yönetimini ve izlemine alabilmesi teşvik edilemelidir. Buna karşın bu hastalarda fiziksel, ekonomik ve diğer bazı sebepler ağırlık kaybının korunmasında karşılarına engel olarak çıkmaktadır. Özellikle ileri derecede karaciğer hastalıklarında ağırlık kaybındaki ani artış ve azalmalar karaciğer hasarını tetikleyebileceğinden, hastanın yavaş ve sürdürülebilir ağırlık kaybının sağlanması önemlidir (95).

Egzersiz haftada 3-4 kez düzenli yapılması, NAFLD'nin gelişiminde ve progresyonunun engellenmesinde olumlu etkileri bulunmakla birlikte, karaciğer histolojisine etkisi tam olarak bilinmemektedir (2). Egzersizin intrahepatik TG içeriğini azaltmadaki etkisinin minimal olduğu veya ağırlık kaybı oluşmadan bu etkinin oluşabileceği, bu nedenle diyet ve fiziksel aktivitenin birlikte kombinasyonunun farklı yollar aracılığıyla etkin olabileceği belirtilmektedir (98). Orta yaşlı obez 169 NAFLD'li hastada orta şiddette fiziksel aktivite ve diyetin 12 hafta NAFLD'na etkisini araştıran bir çalışmada, ≥ 250 dakika/hafta orta şiddette fiziksel aktivite yapan grupta, < 250 dak/hafta fiziksel aktivite yapan diğer gruba göre hepatosetatozda önemli derecede azalma olduğu, ağırlık kaybına bağlı olarak gösterilmiştir (99).

2.1.6.2. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve karbonhidrat

Enerji kısıtlaması aracılığıyla ağırlık kaybının, NAFLD üzerinde olumlu etkisinin yanında diğer önemli bir faktör de diyet içeriğinin kompozisyonudur (95, 96). Düşük karbonhidratlı (CHO) diyet, 1860 yılında William Banting tarafından tanımlanmış ve bu diyetle açlık hissedilmediği vurgulanmıştır. Son zamanlarda popülaritesinin artmasıyla hızlı kilo vermede, insülin direncinde, potansiyel olarak da NAFLD'nın tedavisinde kullanımı söz konusudur. Düşük CHO'lu diyetle CHO miktarı %40 iken, yüksek CHO'lu diyetle bu oran %50-65 kabul edilmektedir (100). Karbonhidratın hipertrigliseridemiye indüklemesinin 12 sağlıklı gönüllüde araştırıldığı izokalorik diyetle yapılan bir çalışmada, bireylere %60 ve %40 oranında CHO verildikten sonra, TG ve insülin düzeylerine bakılmıştır. Her iki diyet de açlık kan glukoz ve SYA miktarı benzer olmasına karşın, karbonhidrat miktarı %60 olan diyetle, plazma TG konsantrasyonu ($p<0.05$) ve insülin miktarı ($p<0.05$) yüksek bulunmuştur (101). Düşük yağlı, yüksek CHO'lu diyetin de novo yağ asidi sentezini artırması aracılığıyla steatoz gelişimine katkı sağladığı belirtilmektedir (95). Ancak uzun vadede düşük CHO'lu diyetler konusunda dikkatli olunması gerektiği; NAFLD, insülin direnci ve metabolik risk faktörlerinin yeniden oluşmasına neden olabileceği belirtilmektedir (100).

Karbonhidratlar kısaca basit ve kompleks CHO'lar olarak ikiye ayrılırken, basit CHO'ların dolaşımdaki insülini ve TG'leri artırdığı, hepatik de novo lipogeneze yol açtığı ve fruktozun karaciğerde metabolize olduğu süreç boyunca lipojenik olması nedeniyle hepatik insülin hassasiyetini azalttığı bilinmektedir (90). Çapraz kesitsel, 26790 Çin'li, NAFLD'li bireyde yapılan bir çalışmada soft içeceklerin tüketimiyle NAFLD arasındaki ilişki incelenmiş; NAFLD prevalansı %27.1 olarak bulunurken, ALT düzeyi %6.5 oranında yükselmiştir. Hastaların %26.9'nun \geq 1/hafta bardaktan fazla soft içecekleri tükettiği belirlenmiş, Odds oranı >1 bardak/hafta içinlerde 1.32 ($p<0.05$) bulunmuştur (102).

Serbest fruktoz direk olarak intestinal lümeninden emilirken, büyük CHO moleküllerindeki fruktoz lümeninden ayrılır. İntestinal fruktozun, glukoz taşıyıcı 5 (GLUT 5/SLC2A5) ve GLUT 2 aracılığıyla transportu kolaylaşır ve portal dolaşıma girdikten sonra hekzoz taşıyıcıları ile karaciğere taşınır. Hepatik fruktoz metabolizması, fruktozun ketohekzokinaz aracılığıyla fruktoz-1-fosfata

fosforilasyonu ile gerçekleşir. Fruktoz-1fosfat, aldolaz B ve trirokinazın aktivasyonu ile, gliserolaldehit ve dihidroksiaseton fosfata dönüşür. Glikoliz basamağında, fruktoliz bypass edilerek hızı azalır ve fruktozun sindirimi ara metabolitlerle sonuçlanır ve bu aşamayla glikoz ve fruktoz metabolizması birleşir. Gliserolaldehit fosforlanarak gliserolaldehit-3 fosfata dönüşür. Fruktoliz, glikoneogenez, glikojen sentezi, laktat üretimi veya asetil- CoA üretimi için kullanılabilir. Asetil-CoA da lipogenezde kullanılmak üzere okside olabilir. Subakut dönemden uzun döneme fruktozun de novo lipogenezde destekleyici etkisi, kronik fruktoz maruziyetinin, prolipojenik mekanizmayı indüklediği yönündedir (103).

Fruktozun, hepatic de novo lipogenezde ve insülin duyarlılığında uyarıcı rolünü değerlendiren çalışmada, 16 Tip 2 DM'li bireylerin sağlıklı erkek çocuklarına yüksek enerjili ve fruktozlu diyet (3.5 g fruktoz/kg yağsız vücut kütlesi-enerji gereksinmesinin %35'i) verilirken, kontrol grubuna 7 gün süreyle izokalorik diyet verilmiştir. Fruktoz alan müdahale grubunda intrahepatik yağ depolanması (%94) ve toplam triaçilgliseroller (%35) artarken, insülin hassasiyeti (%27) azalmıştır ($p<0.05$). Fruktoz tüketiminin proinflamatuvar olabileceği ve hücrel stres yolağını aktive edebileceği belirtilmiştir (104).

Kohort Framingham Kalp Çalışmasında, şekerli içeceklerle yağlı karaciğer hastalıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğu gösterilirken, Finlandiya'da yapılan çalışmada ise yüksek fruktoz tüketimiyle NAFLD arasındaki ilişkiyi desteklemeyen bir sonuç gösterilmiştir (105, 106). Dolayısıyla fruktoz tüketimi ve NAFLD arasındaki ilişkiyi destekleyen kesin bir sonucun eksikliği söz konusudur (103).

Glisemik indeks (GI), 50 g CHO içeren bir test besininin iki saat içerisinde oluşturduğu kan glukoz artış alanının, aynı miktarda CHO içeren referans bir besinin oluşturduğu kan glukoz artış alanına göre yüzde ifadesi olup, düşük GI'li besinlerin daha yavaş sindirilmesi ve CHO emilim oranını yavaşlatması nedeniyle sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Glisemik yük (GY) ise CHO içeren besinlerin kalitesini ve tüketilen besin miktarını kapsayan, besinin postprandiyal insülin sekresyonu üzerine etkisini gösteren, gramında glikozun kesin miktarını belirten bir ölçüttür (107, 108). Özellikle GI'in NAFLD üzerindeki etkisini araştıran insan çalışmalarının olmamasına karşın, NAFLD'li hastaların diyetlerinde

önerilmesinin, postprandiyal glikoz ve insülin yanıtını belirleyici olması nedeniyle NAFLD ile ilişkilendirilen komorbiditelerde etkili olacağı düşünülmektedir (90, 95).

Batı Avrupa ülkelerinde GI, GY, diyet CHO'ı ve posa alımının karaciğer ve safra kesesi kanserleriyle ilişkisinin incelendiği kanser ve beslenme kohort Avrupa prospektif araştırmasında, GI, GY ve toplam CHO alımı ile hepatosellüler karsinoma (HCC) arasında bir ilişki bulunmamıştır. Ancak toplam şeker tüketimiyle HCC arasında (HR=1.88 %95 CI 1.16-3.03; p<0.05) pozitif bir ilişki gösterilmiştir (109).

2.1.6.3. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve yağ

Batı tipi beslenmeyle birlikte artmış yağ alımı, insülin direnci ve lipit metabolizmasında bozulma NAFLD'nın gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (90, 95, 108). Batı tarzı beslenmede daha fazla doymuş yağ, n-6 içeren ÇDYA ve daha az n-3 içeren ÇDYA bulunmaktadır (95).

Diyette yağ miktarı, demir ve enerji kısıtlamasının NAFLD üzerine etkisini araştıran bir çalışmada hastalar (17 NASH ve 10 basit steatoz) izlem grubu (n=2 NASH ve n=4 steatoz) ve diyet grubu (n=9 NASH ve n=3 basit steatoz) olarak ikiye ayrılmış, izlem grubuna spesifik bir tedavi verilmemiş ve en az 6 ay izlenmiştir. Diyet tedavisi verilen grup her ay takip edilmiş, yağ miktarı toplam enerjinin %20'si, demir ≤ 6 mg/Fe ve protein 1.1-1.2 g/kg/gün olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda, başlangıçta tüketilen %27 yağ miktarı %19'a gerilemiş, AST ve ALT düzeyleri de anlamlı derecede (p<0.001) azalmıştır (110). Doymuş yağ asidi tüketimi (DYA), glikoz ve lipit homeostazı üzerine etkisinden dolayı metabolik sendromla ilişkilendirilmekte ve postprandiyal TG düzeyini artırmaktadır (95, 111).

İsrail Ulusal Sağlık ve Beslenme araştırmasında, NAFLD teşhisi alanların daha az n-3 yağ asidi (p=0.056), daha fazla DYA tükettiği bulunmuştur (112). Beslenme alışkanlığının NASH'da insülin direncine ve postprandiyal lipemiye etkisinin araştırıldığı çalışmada, NASH'lı bireylerin, kontrol grubuna göre doymuş yağları daha fazla tükettiği gösterilmiştir (p=0.001) (113). Diyetle alınan farklı tipteki yağ asitlerinin, NASH üzerinde çeşitli mekanizmalarda etkisinin olduğu ve oksidatif stresin yağ tipiyle ilişkili olduğu vurgulanmıştır (96). Diyetdeki DYA oranının <10 düzeyinde tutulmasının olumlu etkisi, ancak <%6 oranında aşırı kısıtlamanın, plazma lipit düzeyinde zararlı etkisinin olabileceği belirtilmektedir (90, 95).

Tekli doymamış yağ asiti tüketiminin artması, özellikle DY A ile yer değiştirmesi, DY A'nin pro-inflamatuvar etkisini dengeleyebileceği, lipit birikimi ve postprandiyal adiponektin ekspresyonunu azaltarak lipit profilini olumlu yönde etkileyebileceği, İD'ni azaltarak metabolik sendrom, NAFLD ve NASH riskini azaltabileceği belirtilmiştir (90, 96). Tekli doymamış yağ asitlerinin (TDYA), PPAR- α 'nın aktivasyonu aracılığıyla yağ asidi oksidasyonunu artırarak veya SREBP aktivasyonunun azalmasıyla veya lipogenezin inhibisyonu ile TG miktarını azalttığı belirtilmektedir (114). Özellikle zeytin yağının, postprandiyal TG düzeyini düzelttiği gibi karaciğerde TG birikimini azalttığı belirtilmektedir (95). Zeytinyağının TG içeriğine etkisi, yağ hücrelerinin lipolitik etkisini değiştirdiği ve vücut yağ dağılımını düzenlemesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (114). Sıçanlarda TDYA'nin, NAFLD hepatik lipit içeriğine etkisini inceleyen bir çalışmada sıçanlar, pelet diyet alan 1.gup, metionin-kolinden fakir diyet (MKFD) verilen 2. grup, zeytin yağı artırılmış MKFD 3. grup ve balık yağı ilave edilmiş MKFD 4. grup, tereyağı ilave edilmiş MKFD olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Ciddi hepatosteatoz, MKFD +balık yağı ve MKFD +tereyağı gruplarında görülürken, MKFD ve MKFD+ zeytin yağı alan grupta gözlenmemiştir. Hepatik TG miktarı, MKFD+zeytin yağı grubu, MKFD grubu ile karşılaştırıldığında %30, MKFD+zeytin yağı grubu MKFD+balık yağı grubuyla karşılaştırıldığında %37, MKFD+zeytin yağı grubu, MKFD+tereyağı grubuyla karşılaştırıldığında %33 baskılanmış, serum TG düzeyi, MKFD+zeytin yağı grubu MKFD ile karşılaştırıldığında %10 daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$) (115).

Esansiyel yağ asidi olan n-3 ve n-6 serisi yağ asitlerini içeren ÇDYA'nin diyet ile alımı zorunludur. Balık yağı, eikozapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asitten (DHA) zengin olup, PPAR- α 'nın aktivasyonu ile yağ asitlerinin oksidasyonunu sağlar ve yağ asidi sentezini azaltarak düzenler (95). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında n-3 yağ asidi suplementasyonunun etkisini inceleyen bir meta analizde, n-3 ÇDYA karaciğer yağını azaltırken, serum AST düzeylerinde azalma olmadığı belirtilmiştir (116). Dolaşımda n-3 yağ asitlerinin düşük seviyelerde olması, de novo lipogenezin artması, dolaşımdaki yağ asiti alımının artması ve yağ asidi oksidasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmektedir. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, yüksek TG ve düşük HDL düzeyi ile karakterize olduğundan dolayı, n-3 yağ asitlerinin supleman olarak verilmesi destekleyici

görülmektedir (95). Çoklu doymamış yağ asitlerinden n-3 yağ asitlerinin koruyucu olmasına karşın, daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır (61)

2.1.6.4. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve protein

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında protein tüketiminin etkisi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır (90, 95). Yüksek miktarda protein tüketiminin ağırlık kaybını desteklediği, İD olan bireylerde glikoz homeostazını dengelemede ve intrahepatoselüler lipitlerde yüksek yağlı diyetin etkisini azaltmada yardımcı olduğu ancak yüksek protein tüketiminin, böbrek fonksiyonlarını olumsuz etkileyebileceği belirtilmektedir (90). Kesin bir kanıtın olmaması nedeniyle NAFLD'da protein tüketiminin etkisinin değerlendirilmesi olanaksızdır (90, 95).

Yüksek proteinli diyetin hepatosteatoza etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, fareler düşük yağ (%8) + düşük protein (%11) veya düşük yağ (%8) +yüksek protein (%35), yüksek yağ (%42) +düşük protein (%11), yüksek yağ (%42) + yüksek protein (%35) veya yüksek yağ + ekstra yüksek proteinli (%58) diyetle üç hafta süreyle beslenmişlerdir. Yüksek proteinli (%35) diyet alan farelerde hepatik yağ içeriği, serbest yağ asitleri, kolesterol ve fosfolipit içeriği, %11 protein alan farelere göre %50 oranında ($p<0.01$) azalmış ve her %10 protein ilavesinin hepatik yağ içeriğini ~%1.5 g azalttığı bulunmuştur (117).

Bazı mikronütrientler ve besin destekleri, NAFLD'nın gelişimine neden olmakta veya tedavisinde kullanılmaktadır (90). Yüksek miktarda flavanoid içeren ve antioksidant özelliği olan yeşil çay (*camellia sinensis*) tüketimi dünya genelinde yüksektir. Randomize çift kör plasebo kontrollü NAFLD'li 80 hastada yapılan bir çalışmada, bir gruba 500 mg/gün yeşil çay özütü verilirken, diğer gruba plasebo verilmiştir. Oniki haftalık periyot sonunda yeşil çay alan grupta AST ve ALT düzeylerinde anlamlı derecede azalma ($p<0.001$) gözlenmiş, alkalen fosfataz düzeyi her iki grupta da azalma göstermiştir (118). Kahve tüketimi ve NAFLD riski arasındaki ilişkiyi inceleyen bir sistematik derleme ve meta analizde, kahve içen hastalarda NAFLD riskinin ve NAFLD'li kahve içen hastalarda da fibrozis riskinin önemli derecede azaldığı belirtilmiştir (119).

Zingiber kökü olan zencefil, gingerol, shogaol, zingeron ve β -bisabolen gibi birçok aktif bileşen içermektedir. Zencefil suplementasyonunun NAFLD'de etkisini

inceleyen randomize çift kör plasebo (nişasta) kontrollü çalışmada, hastalara 12 hafta süreyle 2 g/gün zencefil supplementasyonu, %30 yağ, %15-18 protein ve %52-55 CHO ve 20-30 g/gün posa içeren bir diyet ve ≥ 30 dakika/3 kez haftada egzersiz önerilmiştir. İnflamatuvar sitokinler, ALT, GGT gibi biyokimyasal parametrelerde zencefil alan grupta önemli düzeyde azalma gösterilmiştir. Ancak uzun dönem zencefil kullanımının etkisini değerlendiren çalışmalara gereksinim duyulmaktadır (120).

2.1.6.5. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve posa

Diyet posası koroner kalp hastalığı, diyabet, gastrointestinal bozukluklar ve obezite gibi hastalıkların gelişme riskini azaltarak, sağlık üzerinde olumlu etkiler göstermektedir (121). Posa tüketiminin artırılması, doyumlukta ve inkretin sekresyonunda artma, glisemik kontrolün sağlanması, mikrobiyotanın modülasyonu, karbonhidrat ve protein absorpsiyonunda azalma gibi birçok metabolik etkiye neden olmaktadır (108). İran'da NAFLD'li hastalarda yapılan bir çalışmada, sağlıklı bireylerde toplam diyet posası alımı NAFLD'li hastalara göre anlamlı derecede farklılık göstermiş ($p < 0.04$) ancak posanın çözünürlüğü açısından herhangi bir farklılık bulunmamıştır (122).

2.1.7. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve İlaç Tedavisi

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında uygulanan tedavi yöntemlerinin amacı, NASH'ın olumsuz sonuçlarını düzeltebilmek, steatozdan NASH'a, siroza ve HCC'ye ilerleyen süreci ve mortaliteyi azaltabilmeyi hedeflenmektedir (87).

2.2.PROBİYOTİKLER

2.2.1.Probiyotiklerin Tanımı, Tarihçesi ve Türleri

Hipokrat (MÖ 370-460) ‘Bütün hastalıklar barsakta başlar’ sözüyle barsak ve hastalıklar arasındaki ilişkiye dikkat çekmiştir. Modern araştırmalar, 1886 yılında Theodor Escherich’in infantlarda sindirim fizyolojisinin intestinal bakterilerle ilişkisini göstermesiyle başlamış; 1892 yılında Ludwig Doderlein vajinal enfeksiyonlarda Laktobasillerin kullanılabileceğini önermiş ve 1907 yılında Eli Metchnnikoff kolonik bakterilerin yaşlanmada ve sağlıkta önemli bir rol oynadığını, ekşi sütün ve laktik asit üreten bakterilerin tüketimiyle yararlı mikroorganizmaların sağlanabileceği ve barsak florasının değiştirilebileceği görüşünü yayınladığı bir kitapta belirtmiş ve probiyotiklerin babası kabul edilmiştir. Eli Metchnnikoff’un bu teorisi Bulgar köylülerinin uzun yaşam süreleriyle desteklenmiştir. Birinci Dünya Savaşında, Alfred Nissle, askerlerin gaitasından Escherichia Coli’nin non-patojenik suşunu izole etmiş, bu suş gastrointestinal shigella ve salmonella tedavisinde kullanılmıştır (123).

Yunancadan gelen probiyotik kelimesi ‘yaşam için’ anlamına gelmektedir (124, 125). Dünya Sağlık Örgütü ve Gıda ve Tarım Örgütü probiyotikleri, yeterli miktarda tüketildiğinde konağa fayda sağlayan canlı organizmalar olarak tanımlamaktadır (123, 126).

Probiyotikler, cins, tür ve suşlarına göre tanımlanmakta ve protiyotik amaçlı kullanılan birçok mikroorganizma bulunmaktadır (123, 124). Probiyotik suşları, familya, tür ve alt türler aracılığıyla belirlenmektedir (127). Dünya Sağlık Örgütü/Gıda ve Tarım Örgütü, Uluslararası Yaşam Bilimleri Enstitüsü ve Avrupa Besin ve Beslenme Birliği, probiyotikler için birtakım kriterler belirlemiştir. Güvenirlik, teknolojik ve fonksiyonellik özelliklerine göre probiyotiklerin seçilme kriterleri: İnsan orijinli olmalı, gram (+) organizma olmalı, gastrik ve safra asidine karşı dirençli olmalı, barsakta mukozaya ve epitelyal yüzeylere tutunabilmeli, barsakta çoğalabilmeli, dozaj ve kullanım süresi tanımlanmalı, patojenik ve karsinojenik bakterilere karşı antagonistik aktiviteye sahip olmalı, sağlığa yararlı etkisi, in vitro/hayvan ve /veya insan testleriyle belirlenmiş olmalı, klinik olarak sağlık etkisi kanıtlanmış olmalıdır (125, 128).

Probiyotiklerin tanımlanmasında polimeraz zincir rekasyonu (PCR), 16S rRNA dizilimi ve DNA parmak baskı tekniği gibi mevcut yöntemler kullanılmaktadır (128).

En yaygın kullanılan probiyotik türleri, laktobasiller, bifidobakteriler ve saccharomyces türleridir (123, 124). Laktobasiller, non-spor formunda fakültatif anaerob veya zorunlu olarak laktik asit üreten gram (+) ve insan mikroflorasında doğal olarak bulunan yararlı bakterilerdir (123-125). Glukoz ütilizasyonu sonucu oluşan laktik asitle birlikte, asetik asit ve hidrojen peroksit gibi maddeleri üretmektedir (125). Sağlıklı bir bireyin ağızında 10^3-10^4 cfu/g, ileumda 10^3-10^7 cfu/g ve kolonda $10^4 -10^8$ cfu/g laktobasil bulunmaktadır ve en yaygın olarak vajinada yer almaktadır. Gram (+), anaerobik, çubuksu veya çatallı bir organizma olan Bifidobakteriler, insan intestinal florasında ve anne sütünde doğal olarak bulunmaktadır. Yaşlanmayla azalan bifidobakteriler kolonda $10^{10} -10^{11}$ cfu/gram bulunmaktadır (125). Süt, peynir, yoğurt ve dondurma gibi besinlerde bulunan bifidobakterilerin probiyotik olarak kullanılan türleri, Bifidobakterium bifidum, longum, lactis, breve, infantis, thermophilum ve pseudolongumdur (123). Saccharomycesler, S. cerevisiae gibi patojenik olmayan birçok maya türünü içermektedir (123-125). Diyarenin önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır (125, 127).

2.2.2.Probiyotiklerin Mekanizması

Probiyotiklerin barsak üzerinde olumlu etkileri bulunmakla birlikte, moleküler detayları netlik kazanmamıştır (124, 129). Probiyotiklerin mekanizmaları arasında, epitelyal bariyer fonksiyonunun güçlendirilmesi, antimikrobiyal maddelerin üretimi, intestinal mukozaya adezyonda rekabet, immun sistemin modülasyonu bulunmaktadır (123, 130). İntestinal bariyer, epitel bütünlüğünü sağlayan ve çevresel organizmalara karşı koruyucu bir savunma mekanizmasıdır (130). Barsak epiteli bariyer göreviyle seçici davranarak nütrientlerin, iyonların ve su gibi maddelerin geçişine izin verirken zararlı mikroorganizmaların ve diğer maddelerin geçişini tight junction proteinlerle engellemektedir (131). Probiyotikler, goblet hücreleri aracılığıyla mukus sekresyonunu indükleyerek, tight junction proteinleri ve hücre iskeletini koruyarak, antimikrobiyal maddeler üreterek ve sekretuar IgA salınımını artırarak korumaktadır (129, 130).

Probiyotikler, intestinal hücrelerin apoptozisini azaltarak bariyeri etkilemektedirler. *Lactobasillus rhamnosus* GG'nin, tümör nekrozis faktörü inhibe etmesiyle, apoptozis-indükleyici sitokini engelleyerek anti-apoptotik etki gösterdiği belirtilmiştir (130, 132).

Probiyotikler, patojenik organizmaların virulansını ve büyümesini inhibe eden bakteriosin, rutein, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve kısa zincirli yağ asiti (KZYA) gibi maddeler üreterek antimikrobiyal etki göstermekte ve barsak mikro çevresini değiştirebilmektedir (123,124,129,133,134). Probiyotikler, antibakteriyel görev yapan müsin üretimini ve bazıları antibakteriyel peptit olan defensinlerin salınımını artırmaktadır (123). Laktik asit ve asetik asit gibi KZYA'leri, barsak lümeninin pH'sını azaltarak antimikrobiyal bir ortam yaratmakta ve gram (-) bakterilerin büyümesini engellemektedir (123, 129, 133, 134, 135).

Probiyotikler, safra tuzlarından elde edilen organizma için güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergileyen de-konjuge safra asitlerini üretebilmektedir (136). Safra asitleri aracılığıyla forsenoid X reseptörü (FXR) tarafından kontrol edilen gen ekspresyonunun, mikrobiyotada değişimine neden olduğu belirtilmekte ve safra havuzunun büyüklüğü, metabolit içeriği ve hücre konsantrasyonu mikrobiyotayla ilişkilendirilmektedir (137).

Probiyotikler barsakta kolonize olduktan sonra patojen mikroorganizmalarla adezyon alanları için rekabete girmekte; bu mikroorganizmaların barsak yüzeyine tutunmasını ve dolayısıyla disbiyozisi engellemekte (123, 124, 135), patojen bakterilerin reseptörlerini engelleyerek yüzeye bağlanmasını inhibe etmektedirler (130). Yapılan bir çalışmada, *Lactobasillus helveticus* R0052'den elde edilen yüzey katman proteinlerinin, *Eschrechia coli* O157:H7'nin epitelyal yüzeye bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (138).

İmmun sistem, doğuştan ve adaptif immunité olarak ikiye ayrılmakta; doğuştan gelen immün sistem PAMPs'lara yanıt oluştururken, adaptif immün yanıt B ve T lenfositlerle ilişkilidir (130). Probiyotikler, metabolitler, DNA ve hücre duvarı bileşenleri ile immün sistemi etkilemektedir (136). Probiyotiklerin etkileşime girdiği hücreler, dentritik hücreler (DCs), epitelyal hücreler, T hücreleri ve düzenleyici T (T_{reg}) hücreleri, IgA üreten hücreler, doğal öldürücü hücreler, monositler ve makrofajlardır (139). Patojenlere karşı ilk yanıtı pattern tanıyıcı reseptörler (PPRs)

oluşturmakta ve ekstrasellüler C-tip lektin reseptörleri (CLRs) ve intrasellüler NOD-benzeri reseptörler de (NLRs) bakterilerle etkileşimde sinyal iletiminde rol almaktadır (130). Probiyotikler, Toll benzeri reseptörlerden (TLR) özellikle TLR2, TLR4 aracılığıyla ve pattern tanıyıcı reseptörler ile intestinal epiteli etkilemekte, bu olay IL-10 ve değiştirici büyüme faktörü (TGF- β) gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarabilmekte ve böylece epitelyal hücrelerin apoptozisi inhibe edilirken hücre yenilenmesi sağlanabilmektedir (139). Lipopolisakkarit (LPS) ve lipoteikoikasit gibi patojenler, TLR aracılığıyla tanınmakla birlikte, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımı sonucu immünolojik savunma kaskatını başlatmaktadır. Toll benzeri reseptörlerin aktivasyonu, dendritik hücrelerin yanıt oluşturmaya yol açmaktadır (140). Toll benzeri reseptörlerin ekspresyonunun azalması, probiyotiklerden oluşan metabolitlerin TNF- α 'nın inhibisyonu ve enterositlerde NF- κ B'nin inhibisyonu ile intestinal inflamasyon baskılanmaktadır (130).

Dendritik hücreler, immün sistem yanıtı aracılığıyla bakterileri tanımakta; T ve B hücre yanıtını oluşturmaktadırlar. Bazı probiyotikler tarafından uyarılan Treg hücreleri anti-inflamatuvar etkiyi ortaya çıkarmaktadır (139).

Probiyotikler, sekretuvar IgA salınımını artırarak, immün sistemi stimule etmektedirler (123, 124). Randomize kontrollü, çift kör, prospektif 12 hafta yapılan bir çalışmada, probiyotiklerin (*L. paracasei* ve *L. casei* 431® en az 3×10^7 cfu/ml⁻¹, *L. fermentum* PCC® en az 3×10^6 cfu/ml⁻¹) oral yolla verilmesiyle sekretuvar IgA düzeylerinde artış ($p < 0.010$) olduğu gösterilmiştir (141). Bazı probiyotik suşlarının, bakterilerin sinyal molekül salınımı ve yoğunluğunu ölçen 'quorum algılamasını-yeterli çoğunluğu algılamayı' engellediği belirtilmektedir (123, 142). Tablo 2.7'de insan intestinal hücrelerinde probiyotiklerin mekanizmaları gösterilmiştir (133).

2.2.3. Probiyotik Miktarı

Probiyotiklerin optimal kullanım miktarı hakkında bilgi kesin olmamakla birlikte; bu miktarın belirlenmesi de zor bir süreçtir (132). Besinlerde ve ticari ürünlerde bulunan probiyotik dozu, üründe mevcut olan canlı bakteri sayısına bağlıdır (124). Probiyotik miktarının kullanımı, kullanım alanına göre farklı miktarlar gerektirebileceğinden, probiyotiğin suşu, türü ve hangi klinik etki için

kullanıldığı önemlidir (132, 143). Aynı türün farklı suşları dahi klinik açıdan farklı sonuçların çıkmasına neden olmaktadır (143).

Tablo 2.7. İnsan intestinal hücrelerinde probiyotiklerin mekanizmaları (133).

Biçim	Proses (İşlem)	Mekanizma	Örnekler
Bariyer Fonksiyonu	Epitelyal hücrelerin apoptozisinde azalma Musin üretiminin artması	TNF- α üretiminde azalma Mucin 2 ekspresyonunun artması	Lactobasillus rhamnasus GG Lactobasillus sp
Konak Hücre Antimikrobiyal Peptitler	Defensinler (Hbd protein) Kathelisinler	Defensinlerin upregülasyonunun artması Bütirat üretiminin artmasıyla	E. coli suş DSM 17252S2
Probiyotik Antimikrobiyal Faktörler	Lümen pH'sının azalması Bakteriosin üretimi Mikrosin üretimi	KZYA'nin sekresyonu ile Gram (+) probiyotikler ile Gram (-) probiyotikler ile	Probiyotik bakterilerin çoğu
Epitelyal Bağlanma	Patojenlerle rekabet	Protein üretimi ile direk veya indirek	
İmmun Modülasyon	Pro-inflamatuvar moleküllerin engellenmesi Mukozal immunitenin artması	IL-8 sekresyonunun azalması veya karşı düzenleyici faktör (inhibitör κ B) I κ B'nin degradesyonuyla ImmunglobulinA (IgA) üretiminin artması	Salmonella tyhimurium VSL#3 probiotikler Laktobasillus paracesi
Quarum Algılaması Sinyalizasyonunun Engellenmesi	Patojenik bakteriler arasındaki iletişimin engellenmesi	Quarum algılaması sinyalizasyonunu engelleyen moleküllerin salgılanması ile	Lactobasillus asidophilus

2.2.4.Bağırsak Karaciğer Aksı

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogeneğinde mikrobiyotanın rolü karmaşıktır (5, 48). İnsan fizyolojisine mikrobiyomların etkisinin farkedilmesi, hastalıkların patogeneğinde rol alan mikrobiyotanın daha iyi anlaşılması için bir başlangıç kabul edilmiştir (25).

2.2.4.1.İntestinal mikrobiyota

Mikrobiyota terimi, ökaryotlar, bakteriler, virüsler gibi kompleks bir ekosistemi içeren mikroorganizmaların tümünü içeren ve bulunduğu yeri belirten bir kavramdır (144-146). Yetişkin bir insan bağırsağında 500-1000 farklı türden 10-100 trilyon mikroorganizma bulunmakta ve bu mikroorganizmalar metabolik ve biyolojik fonksiyonları açısından konağa fayda sağlamaktadır (2, 9, 144).

İntestinal mikrobiyota (İM) her insanda heterojen bir yapıya sahiptir. Doğumla birlikte hızla şekillenmeye başlayan bu heterojeniteye, genetik yapı, yaş, immun sistem, coğrafik yapı, diyet, antibiyotik kullanımı, doğum şekli gibi faktörler neden olmaktadır (25, 131, 147). İnsan vücudunda bakteri miktarları farklılık göstermekle birlikte midede pH nedeniyle düşüktür ve laktobasilleri, streptokokları, stafilokokları, enterobakterleri ve mantarları içermektedir. Gastrointestinal sistemde, 0-10⁵ cfu/g olan miktar duodenumdan ileuma 10⁸ artış göstermekte ve kolonda pH, nütrientlerin varlığı ve transit geçişin yavaşlaması nedeniyle 10¹⁰ , maksimum 10¹⁴ cfu/g birime ulaşmaktadır (2, 148). İntestinal mikrobiyotada mikrobiyal anlamda birçok çeşitliliğin olmasına karşın temelde baskın olarak bulunan bakteriler firmucutesler, bakteriodesler, actinobakteriler ve proteobakterilerdir (21,149).

İntestinal mikrobiyotanın, enerji alımı, immunite, prokarsinojenik maddelerin dönüşümü, safra asitlerinin yıkımı, nütrientlerin emilimi, patojenlere karşı bariyer oluşturma ve metabolizmadan uzaklaştırma, duyuşal motor fonksiyonlarla ilişkili olan ve bağırsağın kasılmasını sağlayan bağırsak motilitesi gibi birçok görevi bulunmakta ve homeostazı korumada önemli bir rol üstlenmektedir (18, 146, 148, 150-152). Mikrobiyota, mukus salınımı ile intestinal bariyerin korunmasını, mikrobiyomların Paneth hücreleri ile etkileşimi ile intestinal villüs yapısının korunmasını ve sekreteruar IgA salınımını artırarak organizmayı patojenlere karşı korumayı sağlamaktadır. Paneth hücrelerinden salgılanan, anjiogenin 4 ve α -

defensinler gibi antimikrobiyal peptitleri indükleyerek mikrobiyotanın şekillenmesine katkıda bulunmaktadır (153).

Mikrobiyotanın kompozisyonunu belirlemede kültüre dayalı ve kültür bağımsız gibi iki farklı metodolojik yöntem kullanılmaktadır. Mikrobiyota analizinde kullanılan en yaygın teknik kültür bazlı olup, mikrobiyomların %30'u hakkında bilgi vermektedir. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ve yerinde floresan melezleme teknikleri, spesifik bakterileri belirlemede hassas tekniklerdir. Filogenetik mikro dizilim tekniği yeni gelişmiş, kullanışlı, hızlı ve yarı nicel bir tekniktir (147).

2.2.4.2. İntestinal mikrobiyota ve non alkolik yağlı karaciğer hastalığı

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) pathogenezi ve İM ilişkisi kompleks, multifaktöriyel ve tek bir mekanizmaya bağlı değildir (18). Hastalığın patogenezi ve mikrobiyotanın ilişkisi, mikrobiyota ile karaciğer reseptörleri arasındadır ve bu durum 'Bağırsak-karaciğer eksenini' olarak tanımlanmıştır (5, 148, 153, 154). Karaciğer ve bağırsak arasında portal kan akışıyla gerçekleşen fonksiyonel ilişki, karaciğerin yaklaşık olarak %75 oranında kanı, intestinal portal dolaşımdan almasıyla gerçekleşmektedir (25, 144, 154). Karaciğere kan akımının intetinal bölgeden gelmesi, bariyerde bir bozulma söz konusu olduğunda, karaciğerin toksik maddelere maruziyetine neden olmaktadır (154).

Sağlıklı bir İM'da homeostazın korunması hedeflenirken, faydalı ve patojen bakteriler arasındaki dengesizlik ve sonucunda oluşan patoloji 'disbiyozis' olarak adlandırılmaktadır (2, 144). Disbiyozisin obezite, metabolik sendrom, malnütrisyon, kanser, inflamatuvar barsak hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve nörolojik hastalıklarla ilişkili olduğu belirtilmektedir (9, 155). Disbiyoziste gerçekleşen durum, mikrobiyal yapının büyük bir kısmını oluşturan Firmucutes ve Bacteriodeslerin oranındaki değişim olarak belirtilmektedir (9). Yüksek yağlı diyetle indüklenen obez sıçanlarda yapılan bir çalışmada, hayvanlar 8 veya 12 hafta süreyle düşük ve yüksek yağlı diyetle beslendikten sonra PCR yöntemiyle yapılan mikrobiyal analizde, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda toplam bakteri sayısında azalma, Bacteriodes ve Clostridiales oranında artış gösterilmiş; obezitenin TLR4'ün aktivasyonuna, plazma LPS'nin artmasına, inflamasyona ve mikrobiyal değişime neden olduğu belirtilmiştir (156). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi ile disbiyozis ilişkisini inceleyen bir çalışmada, 47 insan feçesi incelenmiş, NAFLD

olan grupta, Proteobakterilerin (%13.50) ve Fusobakterilerin (%2.76), Eshrerichia-shigellanın (%10.84), Enterobakterilerin (%12.02), Streptokokların (1.39) ve diğer türlerin kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.01$) daha fazla olduğu gösterilmiştir (157). Disbiyozisle ilgili diğer bir çalışmada NAFLD'li hastaların mikrobiyotasının taksonomik kompozisyonu çıkartılmış, NASH'lı ve perisinusoidal ve portal/periportal fibrozisi olan hastalarda Bacteriodeslerin oranı artarken, Prevotella miktarının azaldığı, perisinusoidal ve portal/periportal fibrozisi olan hastalarda ise Ruminococcus miktarının arttığı gösterilmiştir (158).

Hastalığın patogeneğinde, bakteriyel translokasyon da önemli bir rol oynamaktadır (18). Normal koşullarda doğal bir bariyer olarak görev yapan intestinal mukoza, patojen bakterilerden ve endotoksinlerden mikroorganizmayı korumakla görevli iken, bariyerin bozulması sonucu bakterilerin ve endotoksinlerin gastrointestinal kanala invazyonu, organ ve dokulara patojenlerin ulaşması bakteriyel translokasyon olarak adlandırılmaktadır (1). İntestinal motilitenin ve permeabilitenin bozulmasıyla, mikrobiyotanın kalitatif ve kantitatif olarak mikrobiyal değişimi ince barsak bakteriyel aşırı büyümesi (SİBO) olarak adlandırılmaktadır (146, 148). Bakteriyel çoğlama ile PAMPs'ların miktarındaki yükselişin paralellik gösterdiği; SİBO'nun NAFLD'de endotoksemiye katkıda bulunduğu belirtilmektedir (146, 148, 155). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında oluşan disbiyozis nedenleri arasında intestinal permabilitede artış ve diyetle değişen metabolizma sonucu toksik maddelere ve endotoksinlere (LPS, etanol) maruziyetin artması gösterilmektedir (21). İntestinal permeabilitedeki artış, dinamik yapıda olan ve özellikle zonula okludin-1 ve okludin gibi tight junction proteinleri ile epitelyal hücreler arasındaki iletişim ağının bozulmasına ve 'Sızdıran Bağırsak' olarak adlandırılan bakterilerin portal sistem kanalıyla vücudun diğer alanlarına yayılmasına yol açan bakteriyel translokasyona neden olmaktadır (25, 154). Non alkolik steatohepatitli hastalarda, SİBO prevelansını, intestinal permeabilitenin artışını, entotoksin ve TNF- α düzeylerindeki yükselişi araştıran çalışmada, SİBO'nun NASH'lı hastaların %50'sinde, sağlıklı kontrol grubunun %22'sinde tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, TNF- α düzeyinin NASH'lı hastalarda daha yüksek olduğu ($p<0.01$), intestinal permeabilite ve endotoksin düzeylerinin her iki grupta da farklılık göstermediği belirtilmiştir (159).

İntestinal mikrobiyotanın değişiminde etkili olan ve kendi bölgesinde ilk karşılaştığı etmenlerden biri nütrientler olup (160), beslenmenin mikrobiyotayı genetik faktörlerden daha fazla etkilediği belirtilmektedir (149). Mikrobiyotada, bakteriler enerjiyi diyetten sağlamaktadır ve disbiyozis sonucu Firmucuteslerin artması, Bakteriodeslerin azalması, yaklaşık olarak 150 kkal'lık bir enerji artışıyla ilişkilendirilmekte; diyetten gelen enerjinin, bakterilerin kolonizasyonuna ve artmasına etki eden bir faktör olduğu belirtilmektedir (155). Ayrıca mikrobiyal kolonizasyondaki herhangi bir değişimin, bağırsak-beyin ekseninin hormonlara etkisi nedeniyle enerji homeostazını da etkilediği belirtilmektedir (149). Enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik hepatosteatoza yol açmaktadır (149, 160). Hepatik TG üretiminin uyarılması, lipoprotein lipaz inhibitörü olan açlık-indükleyici adipoz faktörün (FIAF) baskılanmasına, lipoproteinlipazın sürekli ekspresyonuna ve karaciğerden yağ asidi salınımına neden olmaktadır (146, 149). Açlık-indükleyici adipoz faktörün azalması, obezite ve metabolik sendromun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (148).

Yüksek yağlı diyet ve fruktozun aşırı tüketimi intestinal permeabilitede artışa ve bakterilerden LPS üretimine neden olmaktadır. Metabolik endotoksemi, diyet faktörü gibi bir etken ile intestinal bariyer yapısının değişmesi sonucu kanda LPS düzeylerinin artması ve diğer organlara taşınmasıdır (48, 131). Lipopolisakkaritler, gram (-) bakteriler tarafından üretilmekte, mukozada eser miktarda bulunmakta ve karaciğer tarafından vücuttan detoksifiye edilmektedir (11). Lipopolisakkaritler, lipoprotein bağlayıcı proteinlere bağlanarak taşınmakta ve Kupffer hücrelerinde bulunan (farklılaştırma kümesi) CD14 ile etkileşime girerek Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) mekanizmasını aktive etmektedirler (21, 131). Patojenleri tanıyan TLR'lerin aktivasyonu, nükleer faktör kappa B (NF-κB) sentezinin aktivasyonuna, inflamatuvar sitokinlerin üretimine, TNF-α'nın ve interlökin (IL)10'un artmasına, hepatik hasara ve inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır (25, 48, 131). Metabolik endotoksemiye tetikleyen diğer bir sistem endokannabinoid reseptörlerinin LPS ile etkileşime girmesidir. Endokannabinoidler intestinal permeabilitede değişime ve LPS'nin translokasyonuna neden olmakta ve metabolik endotoksemiye indüklemektedir (161).

Yüksek yağlı ve kolesterollü diyetin C57B1/6 farelerde LPS'ye inflamatuvar yanıtını ve plazma LPS konsantrasyon artışını göstermek için yapılan bir çalışmada

hayvanlar, yüksek yağlı diyet ve kontrol diyeti ile 4 hafta beslenmişlerdir. Bu sürenin sonunda hayvanlara, intraperitoneal olarak 0 veya 1 mg LPS/kg steril salin solüsyonu içerisinde enjekte edilmiştir. Tedavinin sonunda, kolesterol düzeyi ve karaciğer ağırlığı yüksek yağlı diyetle beslenen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.0001$) yüksek bulunurken, vücut ağırlıkları ve besin tüketimleri arasında farklılık gözlenmemiştir. Plazma CD14 düzeyi yüksek yağlı diyet alan grupta, kontrol grubuna göre 4.1 kat artarken ($p<0.05$), diyetin LPS-plazma konsantrasyon zamanına etkisi bulunmamış, dolaşımdaki CD14'ün LPS aktivasyonunu engelleyebileceği belirtilmiştir (162). Zucker cinsi sıçanlarda, NAFLD'nin patogeneğinde LPS'nin rolünü değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada sıçanlar, 12 hafta süresince beslenenler, 12 hafta disakkaritten zengin diyet+LPS (intraperitoneal-100 µg/kg/2 hafta) enjekte edilenler ve 24 hafta disakkaritten zengin diyetle beslenenler olarak 3 gruba ayrılmıştır. Hepatosteatoz, LPS enjekte edilen ve 24 hafta süresince disakkaritten zengin diyetle beslenen sıçanlarda histopatolojik görüntüleme belirlenmiştir. Lipit damlacıklarının birikimi, LPS enjekte edilen grupta, 24 hafta beslenen sıçanlara göre önemli derecede fazla bulunmuş ($p<0.05$), LPS'nin hepatosteatozu hızlandırabileceği belirtilmiştir (163).

Polisakkaritler, intestinal bakteriler tarafından sakkarolitik fermentasyona uğrayarak, kısa zincirli yağ asitlerini (KZYA), asetat, propiyonat ve enterositlerin majör enerji kaynağı olan, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkileyen, mukus sekresyonunu artıran ve inflamasyonun azalmasına yardımcı olan bütiratı üretmektedirler (2, 5, 25, 148). Mikrobiyotada oluşan KZYA'leri, tümör nekrozis faktör (TNF- α), IL-2 ve IL-10 gibi inflamatuvar belirteçlerin modülasyonunda rol alan, vücut ağırlığının korunmasında, glukoz ve lipit metabolizmasında, intestinal homeostazda, peptit YY ve glukagon benzeri peptit artışını indüklemesi nedeniyle intestinal hormon metabolizmasında rolü olan bileşenlerdir ve epitelyal hücreler için bir besin kaynağıdır (2, 25, 153).

Safra asitleri, karaciğerde kolesterolden sentezlenen moleküllerdir (137). Glisin veya taurine rekonjuge olduktan sonra ince barsağa ulaşırlar ve diğer safra bileşenleri ile diyetle elde edilen yağ, kolesterol ve yağda eriyen vitaminlerin emilimine yardımcı sonrası bir kısmı tekrar karaciğere taşınmaktadır. Karaciğerin safra asitlerinin geri dönüşümünü sağlaması ve safra kanalında tekrar salgılanması

enterohepatik dolaşım olarak tanımlanmaktadır (164). Safra asitleri, ileum ve karaciğerde forsenoid X reseptörü (FXR) aktivasyonu ile sentezlenmekte, FXR'ü glikoz ve lipit metabolizmasını etkilemektedir (18, 164, 165). Safra asitlerinin FXR'ne bağlanması, antimikrobiyal peptitlerin üretimine, patojen bakterilerin ve bariyer disfonksiyonunun inhibisyonuna yol açmaktadır. Mikrobiyal bozulma, primer ve sekonder safra asitleri arasındaki dengesizliğe kısaca enterohepatik dolaşımın bozulmasına yol açmaktadır (137, 164).

2.2.5. Probiyotikler ve Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Farmakolojik müdahalelere karşın NAFLD'da, hastalığa yönelik spesifik ilaç tedavisi bulunmamakla birlikte, intestinal mikrobiyotanın manüplasyonu yeni yaklaşımlar arasında yer almaktadır (166). Bu yeni yaklaşımların düşük maliyetli, yenilikçi, özgün, kolay ve sağlığa faydası beklenirken, probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler bu hedefte umut verici ajanlar olarak değerlendirilmektedir (134, 166). Prebiyotikler, olugofruktoz, fruktooligosakkarit (FOS) gibi sindirilemeyen, faydalı bakterilerin büyümesini ve artışını sağlayan besin maddeleri olarak tanımlanırken sinbiyotiklerin, prebiyotik ve probiyotiklerin beraber kullanımı sonucu sinerjetik bir etkileşimle sağlık üzerine olumlu etki yarattıkları belirtilmektedir (2, 134). Bununla birlikte antibiyotiklere alternatif olarak gösterilen, toksik ve patojenik olmayan, enzimlere karşı direnç gösterebilen ve bariyer fonksiyonu ve yolaklarında koruyucu etki gösteren, bakteriosinler, organik asitler, etanol, asetaldehit gibi bakteriyel biyoürünler 'postbiyotik' olarak tanımlanmaktadır. Ancak bu ürünler probiyotiklerden elde edilen metabolik biyoürün veya uygulanabilirliği olmayan bakteriyel ürünlerdir (134).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı için, Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Derneği, Amerikan Gastroenteroloji Akademisi ve Amerikan Gastroenteroloji Derneğinin 2013 yılında yayınladığı kılavuzda probiyotik kullanımı ile ilgili her hangibir kanıt ve öneri bulunmamaktadır (167). Ayrıca İngiltere'nin 2016 yılında çıkardığı kılavuzda, NAFLD'de probiyotik kullanımı ile ilgili olarak çalışmaların yetersiz olduğu ve çift kör, randomize plasebo kontrollü çalışmalara gereksinim duyulduğu belirtmiştir (168). Dünya Gastroenteroloji Organizasyonu tarafından 2017 yılında yayınlanan Global Kılavuzda probiyotiklerin, HOMA, kolesterol, TNF- α , AST ve ALT değerlerinde düzelmeye sağladığı ancak sağlık üzerine

uzun dönem etkisinin değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğunu belirtilmiştir (127). Ülkemizde Türk Gastroenteroloji Derneği de Amerikan kılavuzlarına atıfta bulunarak, NAFLD’de rutin probiyotik kullanımından bahsetmemektedir (169).

Probiyotiklerin, NAFLD’nin önlenmesi ve tedavisinde etkisinin değerlendirilmesi, farklı hayvan türleri ve suşların kullanımı nedeniyle zor olarak kabul edilmektedir (11). Probiyotikle yapılan insan çalışmalarında ise probiyotiklerin etkin olduğu ancak daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğu belirtilmektedir (170).

2.2.6. Probiyotiklerde Güvenlik, Advers Reaksiyonlar ve İlaç Etkileşimleri

Mikrobiyal ürünlerin güvenilirliği düzenleyici otoriteler tarafından önemli bir konudur (124). Probiyotikler ilaçlar gibi düzenleyici süreçlerden geçmemeleri nedeniyle, kalite standartları düzenleyici otoriteler tarafından denetlenmemektedir (127). Avrupa Besin Güvenliği Otoritesi (EFSA), bu ürünlerin ‘Nitelikli Güvenlik Varsayımı-Qualified Presumption of Safety’ sınıfında değerlendirilmesi için uygun olmadığı görüşünü belirtmiştir (171). Amerikan Besin ve İlaç Dairesi, probiyotikleri bir ilaç gibi değerlendirmeyip, besin destekleri sınıfında değerlendirirken, kullanımı bir ilaç gibi kullanılmaya yönelik ise bu durumda ilaç için gerekli düzenleyici süreçleri yerine getirmesi gerektiğini vurgulamaktadır (172, 173). Probiyotik ürünlerin kaliteli olması, ürünün raf ömrü sonundaki canlı bakteri sayısına (koloni forming birimine) ve ürün içerisindeki organizmaların tür, familya ve suşların belirlenmesi için nomenklatürün kullanılmasına bağlıdır (127).

Probiyotiklere ilişkin advers etkilerin yaygın olmadığı belirtilmiştir (124). Bir vaka derleme çalışmasında, LGG’nin hastalarda sepsis, karaciğer apsesi ve endokardite neden olduğu (124), S. boulardii’nin fungemiye neden olduğu belirtilmiştir (123). Probiyotiklerle ilgili diğer bir etkileşimin antibiyotiklerle ilişkili olduğu belirtilmektedir (123, 124). Genel olarak advers etkilerin semptomları gaz ve şişkinlik olup, immunsupresif ve ciddi hastalığı olan bireylerin probiyotik kullanmamaları önerilmektedir (124, 174).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırma yeri zamanı ve örneklem seçimi

Araştırmaya, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu tarafından 14.08.2017 tarihli ve 17/19 sayılı kararı ile başlanmıştır. Araştırma örneklem büyüklüğü ve güç analizinin hesaplanması için G-Power 3.1.3 paket programı kullanılmıştır. Başkent Üniversitesi Deneyle Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde üretilen 24 adet, 6-8 haftalık Sprague Dawley erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 10 günlük alıştırmaya dönemi için deneyle hayvanları üretim merkezinden deneyle hayvanları laboratuvarına taşınmış ve bu süre içerisinde pelet yemden purifiye yeme geçiş süreci Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hayvanlarda pelet yemden purifiye yeme geçiş süreci

GÜN	VERİLEN YEM
1. Gün	%75 pelet yem +%25 purifiye yem
2. Gün	%50 pelet yem +%50 purifiye yem
3. Gün	%25 pelet yem +%75 purifiye yem
4. Gün	%100 purifiye yem
5. Gün	%100 purifiye yem
6. Gün	%100 purifiye yem
7. Gün	%100 purifiye yem
8. Gün	%100 purifiye yem
9. Gün	%100 purifiye yem
10. Gün	%100 purifiye yem
11. Gün	Deneyle Başlangıç

Sıçanlar deneyle süresince $20 \pm ^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık döngüsünde ve havalandırma sisteminin mevcut olduğu bir ortamda barındırılmışlardır. Sıçanlar her grupta toplam 8 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrılmış ve ikişerli olarak kafeslere yerleştirilmiş; yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak sağlanmıştır. Sıçanların vücut ağırlıkları, yem tüketim miktarları, bazı

biyokimyasal bulguları (AST, ALT, GGT, kolesterol, TNF- α , CRP) ile metabolik endotoksemi için LPS düzeyine bakılmış ve karaciğer histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Sıçanlardan kan örneği 16 haftanın sonunda ve her gruptan 1 kez alınmıştır.

3.1.2. Deneş grupları ve besin desteği

Üç gruba ayrılan sıçanlar 16 hafta süreyle izlenmiştir.

1. Grup: Purifiye yem (Kontrol grubu)
2. Grup: Yüksek yağlı purifiye yem + plasebo (YYY+plasebo, %0.9'luk NaCl, 1 damla oral yolla damlalık ile verilmiştir)
3. Grup: Yüksek yağlı purifiye yem + probiyotik (YYY+probiyotik, Lactobasillus rhamnasus GG 1×10^9 cfu/sıçan/gün = 1damla, oral yolla damlalık ile verilmiştir)

Çalışmaya başlamadan önce hayvan yemleri standart ve yüksek yağlı purifiye yem şeklinde iki türde, Arden Araştırma Deneşsel Tıp Malzemeleri firması tarafından Ankara'da hazırlanmıştır. Sıçanların yem özellikleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Yüksek yağlı purifiye yemin diyet örüntüsü %20 karbonhidrat, %20 protein ve %60 yağ iken purifiye yemin diyet örüntüsü %70 karbonhidrat, %20 protein ve %10 yağ içerecek şekilde ayarlanmıştır. Üretici firma tarafından vitamin ilavesi olarak Premix V 10001 ve mineral takviyesi olarak S 10026 karışımı yemlere ilave edilmiştir.

Çalışma süresince sıçanların yem tüketimi, günlük verilen yem miktarından artan yem miktarı çıkartılarak tüketilen yem miktarı bulunmuş ve 16 hafta süreyle kayıt altına alınmıştır. Sıçanların vücut ağırlığı haftada 1 kez aynı saatte ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Tablo 3.2. Standart ve yüksek yağlı purifiye yemin diyet örüntüsü

Yem İçeriği	Standart Purifiye Yem		Yüksek Yağlı Purifiye Yem	
Protein	19.2 g	% 20	26.2 g	% 20
Karbonhidrat	67.3 g	% 70	26.3 g	% 20
Yağ	4.3 g	% 10	34.9 g	% 60
Kazein	200 g	800 kkal	200 g	800 kkal
L-sistin	3 g	12 kkal	3 g	12 kkal
Mısır nişastası	550 g	2200 kkal	0	0
Maltodekstrin	150 g	600 kkal	125 g	500 kkal
Sükroz	0	0	68.8 g	275.2 kkal
Sellüloz	50 g	0	50	0
Ayçiçek	25 g	225 kkal	25 g	225 kkal
Koyun kuyruk yağı*	20 g	157 kkal	245 g	1928 kkal

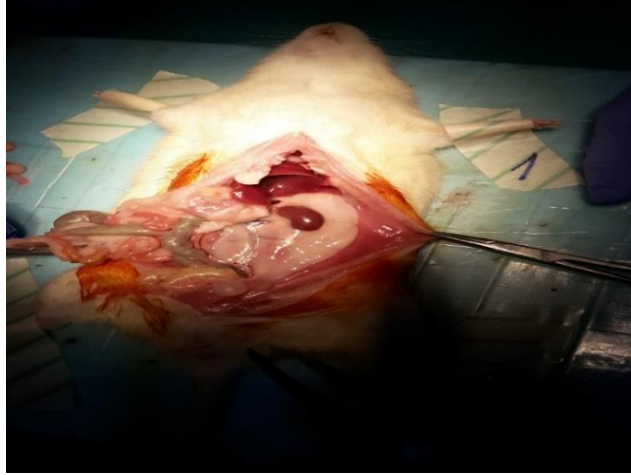
*Kolesterol: Ortalama 68 mg/100 g (175).

Ad libitum beslenen sıçanlara verilen probiyotik takviyesi için ticari bir firmanın ürünü kullanılmıştır. Üründeki probiyotik içeriği *Lactobasillus Rhamnasus* GG 12×10^{10} /5 ml canlı bakteri içermektedir. Ürün ışıktan korunmuş ve 20 °C'nin altında muhafaza edilmiştir. Sıçanlara probiyotik uygulaması 1 damla (1×10^9) ve oral yolla her gün aynı saate/16 hafta süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmada *Laktobasillus rhamnasus* GG, intestinal mukozada uzun süre kalabilme yeteneği, mukozaya adezyonu ve mukus ile etkileşime girmesi, intestinal epitelyumu bariyer oluşturarak koruması, antibakteriyal maddeleri üretebilmesi ve intestinal iflamasyonu önleyebilmesi nedeniyle kullanılmıştır (176, 177). Plasebo uygulanan gruba ise serum fizyolojik damlalık ile 1 damla/gün oral yolla verilmiştir. Probiyotik ve serum fizyolojik uygulamaları her gün aynı saate ve aynı grup sırası izlenerek yapılmıştır.

Hayvanların yemlerinde üretici firma tarafından koyun kuyruk yağı kullanılmıştır. Ancak kokusunun keskin olması ve hayvanların yem tüketimlerinin normalden biraz düşük olması nedeniyle 7. haftanın sonunda sığır kuyruk yağına geçilmiş bu haftadan itibaren hayvanların yem tüketimleri artmıştır.

3.1.3. Verilerin toplanması ve ölçüm yöntemleri

Çalışmanın 6. haftasında hepatosetatozu değerlendirmek amacıyla ‘kontrol grubu’ ve ‘‘yüksek yağlı yem+plasebo’’ alan gruptan 1’er hayvana histopatolojik değerlendirme için ötenazi yapılmıştır. Histopatolojik değerlendirmenin hepatosetatoz açısından negatif çıkması üzerine ‘Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kuruluna’ başvurularak 4 hafta ek süre istenmiş ve kurul kararının uygun görmesiyle çalışma süresi 16 haftaya çıkartılmıştır. Kontrol grubu ve YYY+plasebo grubunun biyokimyasal bulguları, karaciğer histopatolojik bulguları ve organ ağırlıkları, yağ dokusu ağırlıkları 7 hayvan üzerinden değerlendirmiştir. Onaltı haftalık çalışma sonunda hayvanlara 150 mg/kg ketamine intreperitoneal uygulayarak ötenazi yapılmıştır. Hayvanların bıyıklarından veya ayağından uyanlar vererek ölüm durumu kontrol edilmiştir. Tıraşlanan hayvanlardan intrakardiyak olarak 5cc kan örnekleri alındıktan sonra batın bölgesi batikonlanarak cerrahi prosedüre geçilmiştir. Histopatolojik değerlendirme için karaciğer rezeksiyonu yapılmış, karaciğer %10 formalin solüsyonuna konulmuştur. Ayrıca sıçanların perirenal, gonadal, mezenterik doku ağırlıkları ve karaciğerin organ ağırlığı tartılarak kayıt altına alınmıştır.



Resim 3.1. Sıçanların ötenazi sonrası batın bölgesinin açılması

3.1.4. Kan örneklerinin incelenmesi

Sıçanlardan 16 haftanın sonunda alınan kan örneği, 45 dakika bekledikten sonra 4000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiş, serum kısmı ayrıldıktan sonra biyokimya ve mikrobiyoloji için ayrı tüplere koyulmuştur. Biyokimya için -20

C⁰ 'de, mikrobiyoloji için -80 C⁰ 'de muhafaza edilmiştir. Hepatosteatozu değerlendirmek için serum AST ve ALT düzeyleri Abbot® Architect C8000 (Abbot, Wiesbaden Almanya) Analizör ile standardize edilmiş metoda göre UV testi ile değerlendirilmiştir. Serum kolesterol ve GGT düzeyleri aynı firmanın standardize edilmiş metodlarına göre enzimatik test aracılığıyla ölçümleri yapılmıştır. Gama glutamil transferaz düzeyleri kategorik olarak değerlendirilmiş ve tüm sıçanlarda <4 bulunduğu için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. Tümör nekrozis faktör (TNF- α), C reaktif protein (CRP) düzeyleri, enzim bağlantılı bağışıklık testi (ELISA) kiti ile (Sunredbio, Shanghai, Çin) belirlenmiştir. ELISA kiti, sıçanlarda test edilmek istenen belirteç, çift-antikör sandviç tekniği prensibine dayalı yapılmıştır

Metabolik endotoksemiye değerlendirmek amacıyla; sıçanların serumlarında lipopolisakkarit düzeyleri ticari ELISA kiti ile (Sunredbio, Shanghai, Çin) belirlenmiştir. -80°C saklanan serumlar eritilerek 3 grup tek kör olarak çalışılmıştır.

Sıçan lipopolisakkarit/lipooligosakkaritine (LPS/LOS) özgül monoklonal antikörlerle kaplı kuyucuklara, LPS/LOS konsantrasyonları bilinen standartlar ve serum örnekleri eklenmiştir. Ardından kuyucuklara biotinle işaretlenmiş LPS/LOS antikörleri ile enzimle işaretli streptavidin eklenmiştir. 37°C'de 60 dakika inkübasyonun ardından özgül olmayan bağlanmaların giderilmesi amacıyla yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara kromojen/substrat solusyonu ilave edilmiştir. 37°C'de 10 dakika inkübasyonun ardından tüm kuyucuklara stop solusyonu eklenmiştir. Her bir kuyucuğun absorbans değerleri belirlenmiştir.

3.1.5.Histopatolojik örneklemelerin incelenmesi

Yüksek yağlı diyetle indüklenen hepatosteatozu değerlendirmek amacıyla karaciğer çıkartılarak %10'luk formalinde bekletildikten sonra doku testi yapılmıştır. Dokular rutin takibe alınarak parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan 3-5 μ 'luk kesitler alınarak hemotoksilen eozin ile boyanmış, fibrozisi değerlendirmek için masson trikrom boyası yapılmıştır. Çalışmanın 6. haftasında yüksek yağlı diyetin hepatosteatozu indüklemesini değerlendirmek amacıyla purifiye yem alan ve YYY+plasebo alan gruplardan birer hayvana ötenazi yapılmış, dolayısıyla denek sayısı 7 üzerinden istatistiksel analizler yapılmıştır. Histopatolojik skorlama NASH Klinik Araştırma Ağı Skorlama Sistemine ve Fibrozis belirleme sistemine göre

yapılmış ve Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te gösterilmiştir (4). Histopatolojik incelemeler körleme yapılmıştır.

Tablo 3.3. Non Alkolik Steatohepatit Klinik Araştırma Ağı Skorlama Sistemi (4).

Steatoz		Lobular İnflamasyon		Hepatosellüler Balonlaşma	
0	<%5	0	Yok	0	Yok
1	%5-33	1	<2 odak / x 20 alan	1	Hafif (az)
2	%34-66	2	2-4 odak / x 20 alan	2	Orta (belirgin)
3	>%66	3	>4 odak / x 20 alan		

Tablo 3.4. Fibrozis Belirleme Sistemi (4).

0	Yok
1a	Hafif Zone 3 perisinüsoidal fibrozis (ipucu gerektirir)
1b	Orta (yoğun) 3 perisinüsoidal fibrozis
1c	Sadece portal fibrozis
2	Zone 3 perisinüsoidal fibrozis ile periportal fibrozis
3	Köprüleşme fibrozisi
4	Siroz

3.1.6. İstatistiksel analiz ve raporlama

İstatistiksel analizlerde SPSS 22 paket programı kullanılmıştır. Ağırlık ve besin tüketiminin başlangıç ve son hafta arasındaki değişimlerini analiz etmek için bağımlı gruplarda t-testi kullanılmıştır. Gruplar arasında değişkenlerin karşılaştırılması amacıyla yapılan varyans analizinde tek yönlü varyans analizi, deney gruplarının birbirleriyle çoklu karşılaştırmalarda post hoc test analizleri (Bonferroni, Tukey HSD) kullanılmıştır. Grupların haftalara göre yem tüketim miktarlarını değerlendirmede tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanılmıştır. Tekrarlayan ölçümlerde Patoloji sonuçları çapraz tablolar oluşturularak istatistiksel analiz yapılmıştır. Örneklem sayısının az olması nedeniyle bağımsız gruplar arasında Fisher's Exact Ki-kare testi uygulanmış, p değeri olarak 'Exact Sig. (-2 sided)' değeri alınmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Tanımlayıcı istatistiklerin bir kısmı grafiklerle gösterilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmaya, 24 adet erkek Sprague Dawley soyu sıçanlar alınmış ve çalışmanın başlangıcında ortalama ağırlıkları 104.7 g (77-119 g) belirlenmiştir. Sıçanlar 3 gruba ayrılarak, 16 hafta süreyle purifiye yem (kontrol), yüksek yağlı yem+plasebo ve yüksek yağlı yem+probiyotikle beslenmiştir. Sıçanların besin tüketimleri, vücut ağırlıkları, biyokimyasal bulguları (AST, ALT, GGT, kolesterol, LPS) ve hispatolojik değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.1.Sıçanların vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi

Sıçanların başlangıç ve son hafta (16. hafta) arasındaki ağırlık değişimleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Yüksek yağlı yem+plasebo alan gruptaki hayvanların başlangıç ve 16. hafta sonundaki ağırlık değişimleri arasındaki fark ortalaması istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Yüksek yağlı yem+plasebo alan gruptaki ağırlık kazanımı ortalama 180.2 g olarak belirlenmiştir. Ortalama ağırlık kazanımı 198.325 g olan yüksek yağlı yem+probiyotik alan hayvanların başlangıç ve son ağırlık değişimleri arasındaki fark ortalaması istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). En fazla ağırlık kazanımı kontrol grubunda ortalama 288.69 g olmuştur ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Deney gruplarının birbirlerine göre 16 hafta sonundaki ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli ($F=16.62$; $p < 0.05$) bulunmuştur.

Tablo 4.1. Deney gruplarına göre vücut ağırlığı ve ağırlık farkının ortalama değerleri

Gruplar	Başlangıç Ağırlık, g $\bar{x} \pm SS$	Son Ağırlık, g $\bar{x} \pm SS$	Fark Ortalaması g $\bar{x} \pm SS$	p†
Kontrol Grup (n=7)	101.85 ± 9.66	390.54 ^a ± 50.79	288.69 ± 42.53	0.000*
YYY+plasebo (n=7)	106.43 ± 14.64	286.63 ^b ± 44.20	180.20 ± 42.01	0.000*
YYY+probiyotik (n=8)	105.75 ± 10.44	304.08 ^b ± 32.53	198.33 ± 30.88	0.000*

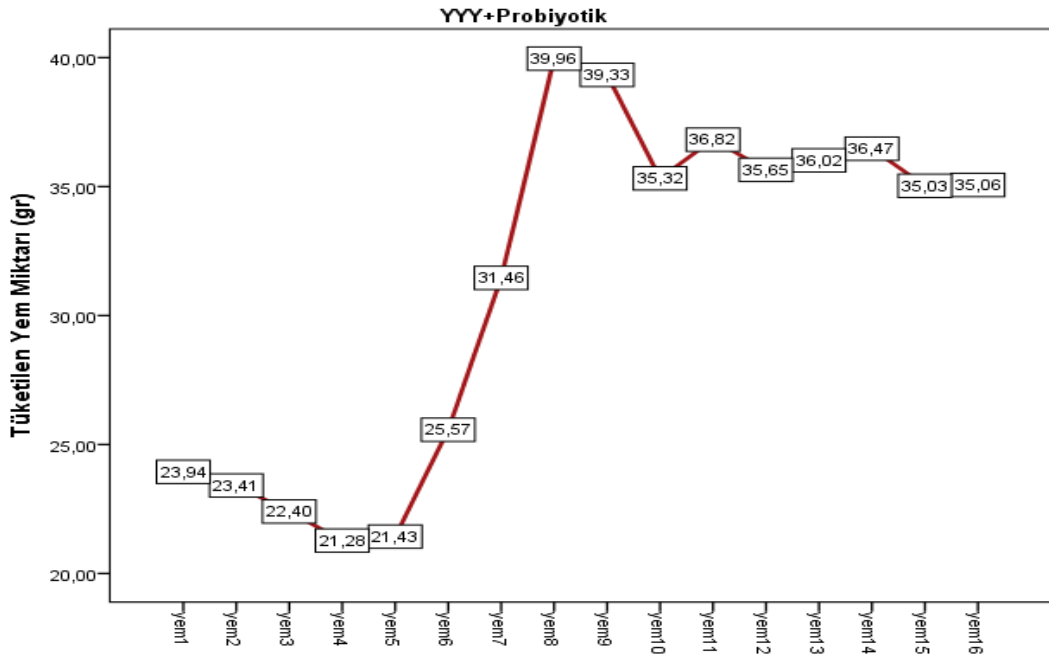
†Bağımlı gruplarda t-testi * $p<0.05$. #Gruplar arasında son ağırlık ortalamalarının karşılaştırılması ANOVA (F testi) (Analize başlangıç ağırlıkları dahil edilmiştir)

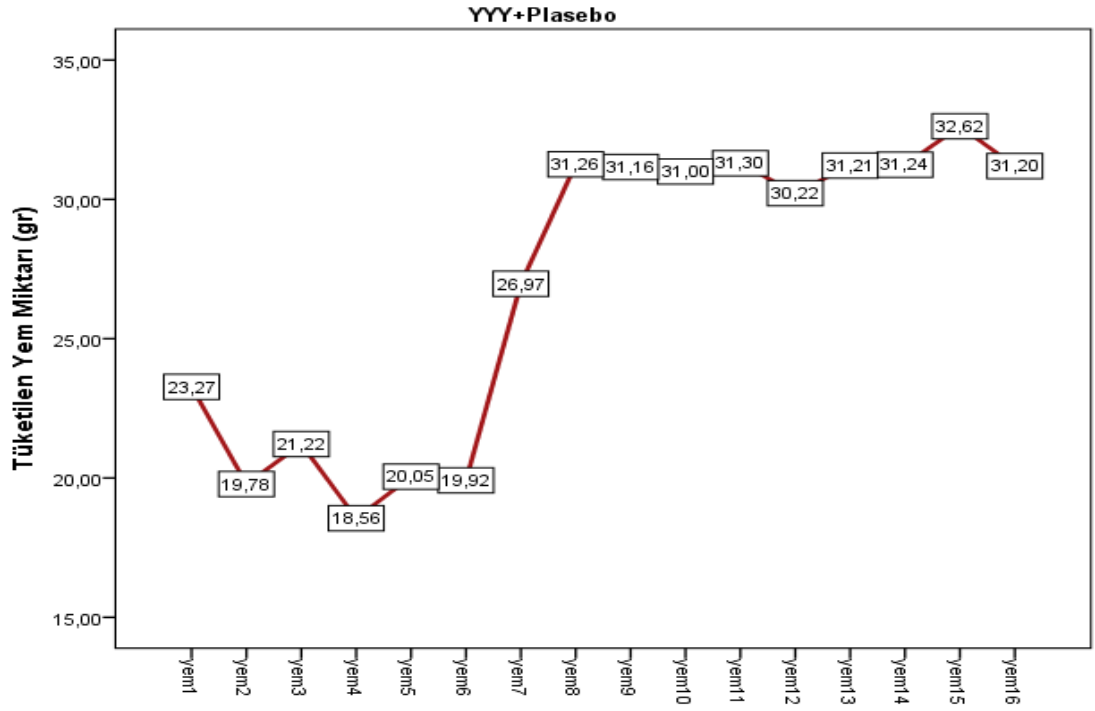
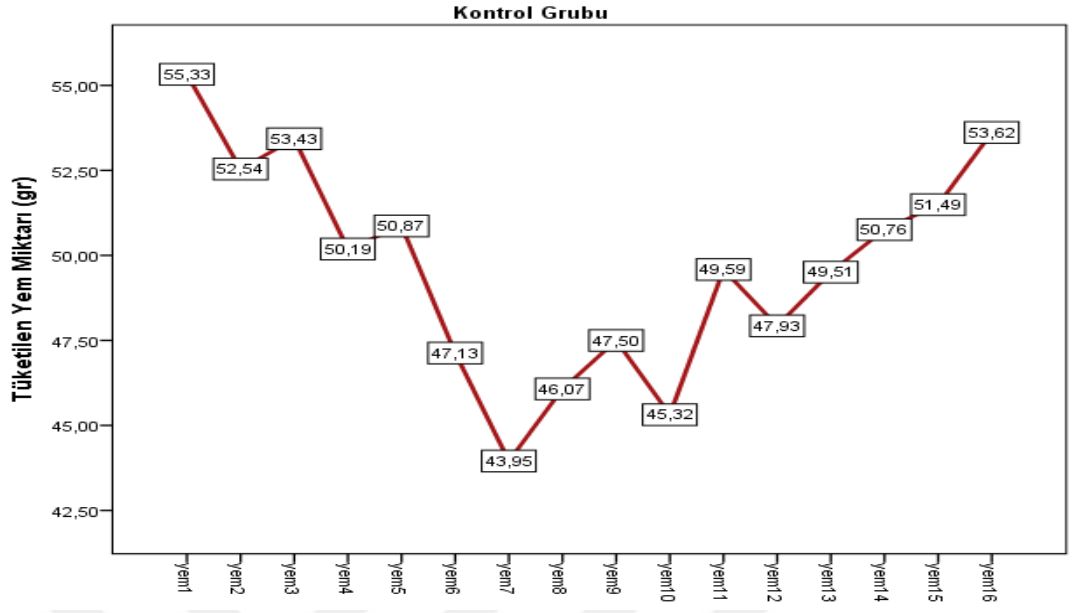
^{a,b}Farklı üstle aynı sütunda gösterilen harfler istatistiksel olarak önemli farklılık göstermektedir (Bonferonni Çoklu Karşılaştırma Testi)

4.2. Sıçanların yem tüketimlerinin değerlendirilmesi

Bütün deney gruplarında 8 hayvandan oluşan sıçanlar 2'şerli kafeslerde beslenerek yem tüketimleri verilen ve artan yem miktarı farkı bulunarak kaydedilmiştir. Kafeslerde ikişerli hayvanların yem tüketim ortalamaları Grafik 4.1'de gösterilmiştir.

Deney grupları arasında başlangıç ve 16. hafta sonunda tüketilen yem miktarları incelendiğinde yüksek yağlı yem (YYY)+probiyotik alan grubun ilk hafta yem tüketim ortalaması 23.94 g'dan, 8. haftada 39.96 g'a yükselmiş, 16. haftada ise 35.06 g olarak bulunmuştur. Tekrarlı ölçümlerde yapılan varyans analizi sonucuna göre YYY+probiyotik alan grubun 16 hafta süresince tükettikleri yem miktarı istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($F=41.721$ ve $p<0.05$). Yüksek yağlı yem+plasebo alan grupta başlangıç yem tüketimi 23.27 g'dan, 8.haftada 31.26 g'a yükselmiş, 16. haftada ise 31.20 g olarak bulunmuştur. Tekrarlı ölçümlerde yapılan varyans analizi sonucuna göre YYY+plasebo alan grupta 16 hafta içerisinde tüketilen yem miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($F=4.5$, $p<0.05$). Kontrol grubunda başlangıç yem tüketimi 55.33 g bulunmuş, yedinci haftadan itibaren azalmıştır. Ancak 16 hafta içerisinde tekrarlı ölçümlerde yapılan varyans analizi sonucuna göre istatistiksel olarak farklılık belirlenmemiştir ($F=0.886$, $p>0.05$).





Grafik 4.1. Deney gruplarında 16 hafta süresince tüketilen yem miktarının ortalama dağılımı

4.3. Sıçanların karaciğer enzimlerinin ve serum kolesterol düzeylerinin değerlendirilmesi

Hayvanlardan 16 hafta sonunda alınan kan örneklerinin istatistiksel analizi Tablo 4.2’de ve Grafik 4.2 ve 4.3’te gösterilmiştir. Deney gruplarının ortalama AST düzeyleri karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Farklılığı yaratan grubu bulmak için yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre YYY+plasebo grubu (147.44 ± 43.01 U/L), kontrol (93.63 ± 13.07 U/L) ve YYY+probiyotik alan grupla (112.25 ± 12.49 U/L) karşılaştırıldığında en yüksek AST düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir. En düşük AST düzeyi kontrol grubunda bulunmuştur. Deney gruplarının ortalama ALT düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Farklılığı yaratan grubu bulmak için yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre gruplar arasında kontrol grubunun (38.38 ± 6.05 U/L), YYY+plasebo (57.75 ± 13.27 U/L) ve YYY+probiyotik alan gruba (60.13 ± 12.44 U/L) göre en düşük ALT düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir. En yüksek ALT düzeyi YYY+probiyotik grubunda (60.13 ± 12.44 U/L) bulunmuştur.

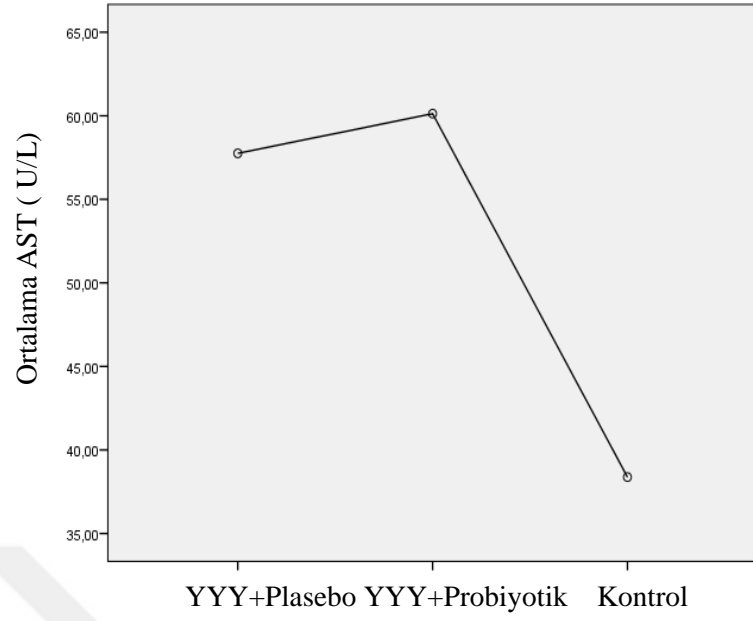
Deney grupları arasında kolesterol düzeyleri açısından aralarındaki farklılık önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.2. Deney gruplarına göre karaciğer enzimleri ve serum kolesterol düzeyinin ortalama değerleri

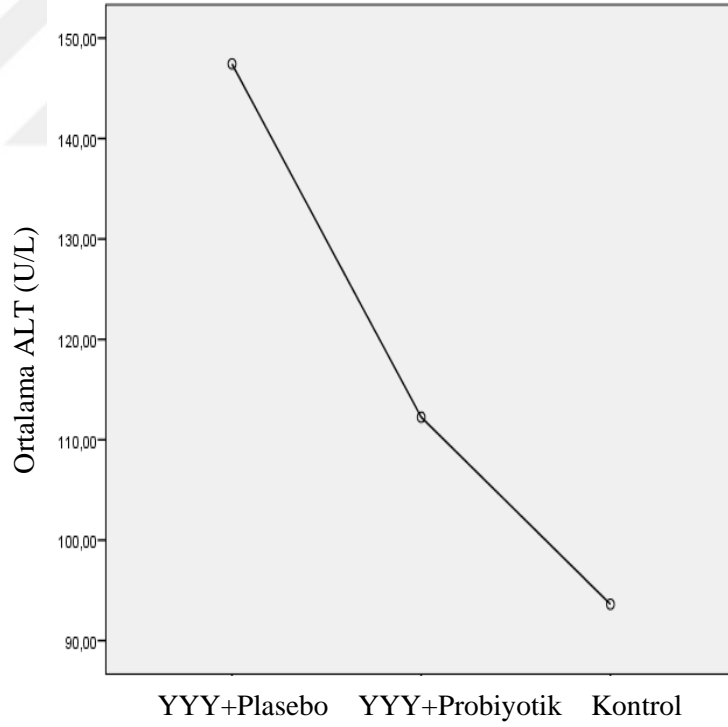
Biyokimyasal Bulgular	Gruplar			p†
	Kontrol (n=8)	YYY+plasebo (n=8)	YYY+probiyotik (n=8)	
	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	
AST (U/L)	93.63 ± 13.07^b	147.44 ± 43.01^a	112.25 ± 12.49^b	0.002*
ALT (U/L)	38.38 ± 6.05^a	57.75 ± 13.27^b	60.13 ± 12.44^b	0.001*
Kolesterol (mg/dl)	57.13 ± 9.30	50.38 ± 6.95	54.00 ± 6.02	0.225

†ANOVA, $p<0.05$

^{a,b}Farklı üst ile aynı satırda gösterilen harfler istatistiksel olarak önemli farklılık göstermektedir (Tukey HSD Çoklu Karşılaştırma Testi)



Grafik 4.2. Gruplar arasında serum AST düzeyinin ortalama değerleri



Grafik 4.3. Gruplar arasında serum ALT düzeyinin ortalama değerleri

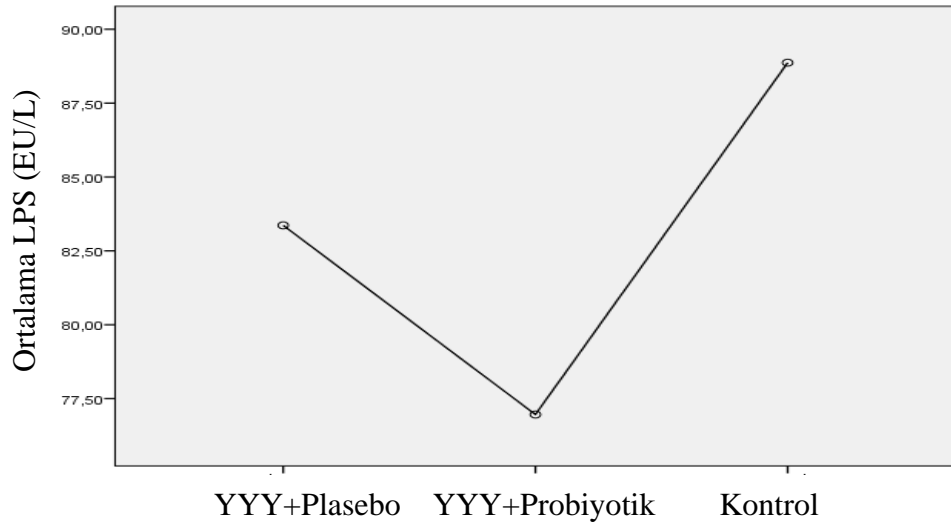
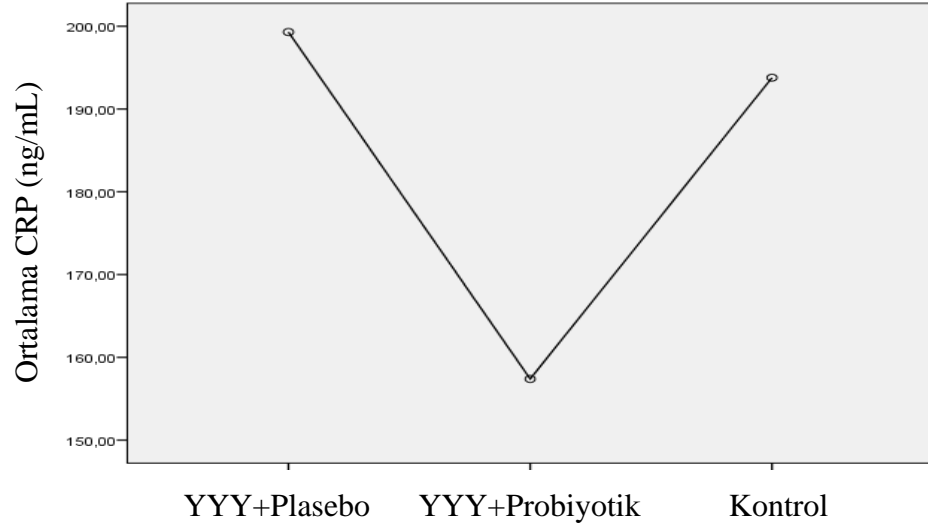
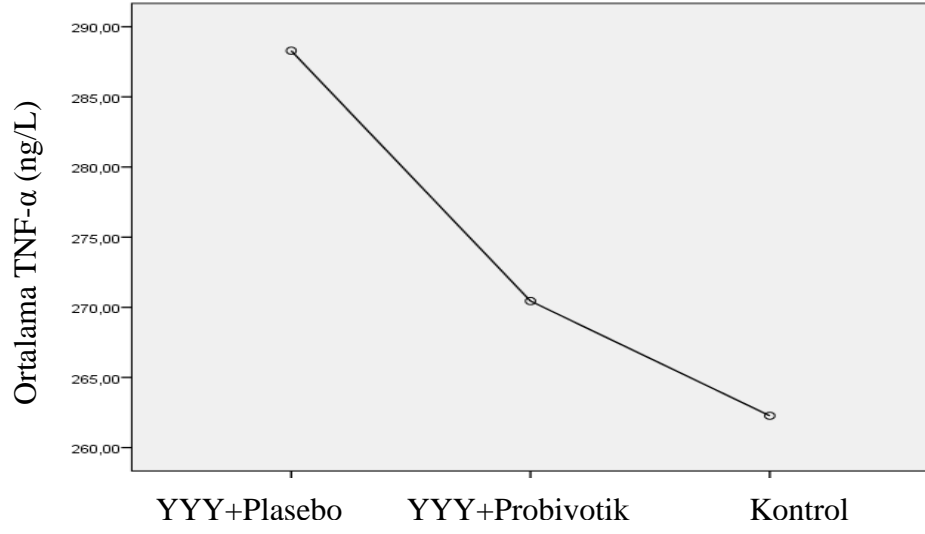
4.4. Deney gruplarına göre inflamatuvar belirteçlerin değerlendirilmesi

Deney grupları arasında serum inflamatuvar belirteçlerin değerlendirilmesi Tablo 4.3 ve Grafik 4.4'te gösterilmiştir. Serum TNF- α düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında TNF- α düzeyi, en yüksek YYY+plasebo alan grupta (288.29 ± 107.42 ng/L) ve en düşük kontrol grubunda (262.27 ± 49.28 ng/L) bulunmuş ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Serum CRP düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında en yüksek CRP düzeyi, YYY+plasebo (199.30 ± 69.20 ng/mL), en düşük CRP düzeyi YYY+probiyotik alan grupta (157.39 ± 62.66 ng/mL) bulunmuş ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Lipopolisakkarit düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında en yüksek LPS düzeyi kontrol grubunda (88.86 ± 5.88 EU/L), en düşük LPS düzeyi ise YYY+probiyotik alan (76.96 ± 25.04 EU/L) bulunmuş ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.3. Deney gruplarına göre inflamatuvar belirteçlerin ortalama değerleri

Biyokimyasal Bulgular	Gruplar			p†
	Kontrol (n=8)	YYY+plasebo (n=8)	YYY+probiyotik (n=8)	
	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	
TNF- α (ng/L)	262.27 ± 49.28	288.29 ± 107.42	270.44 ± 46.34	0.771
CRP (ng/mL)	193.79 ± 37.56	199.30 ± 69.20	157.39 ± 62.66	0.313
LPS (EU/L)	88.86 ± 5.88	83.36 ± 18.80	76.96 ± 25.04	0.446

† ANOVA



Grafik 4.4. Gruplar arası serum TNF- α , CRP ve LPS düzeylerinin ortalama değerleri.

4.4.1. Deney gruplarına göre LPS düzeyi ile inflamatuvar belirteçler ve biyokimyasal bulguları arasındaki ilişki

Deney grupları arasında AST, ALT, kolesterol ve CRP değerleri ile LPS düzeyleri açısından bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.4). Purifiye yem alan kontrol grubunda TNF- α ve LPS düzeyi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur ($r=-0.835$ ve $p<0.05$). Lipopolisakkarit düzeyi arttıkça, TNF- α düzeyi azalmıştır.

Tablo 4.4. Deney gruplarına göre LPS düzeyi ile inflamatuvar belirteçler ve biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki

Biyokimyasal Bulgular	Gruplar					
	Kontrol (n=8)		YYY+plasebo (n=8)		YYY+probiyotik (n=8)	
	LPS (EU/L)		LPS (EU/L)		LPS (EU/L)	
	r	p	r	p	r	p
AST (U/L)	-0.436	0.280	0.076	0.859	-0.359	0.376
ALT (U/L)	0.047	0.912	-0.740	0.862	-0.262	0.451
Kolesterol(mg/dl)	0.681	0.063	0.658	0.076	-0.315	0.408
TNF- α (ng/L)	-0.825	0.012*	-0.190	0.651	0.303	0.418
CRP (ng/mL)	-0.519	0.187	0.020	0.962	0.483	0.292

* $p<0.05$, Pearson Korelasyon Analizi

4.5. Deney gruplarına göre organ ve yağ dokusu ağırlıklarının değerlendirilmesi

Ötenazi sonrası sıçanlardan alınan karaciğer ağırlıkları, perirenal, gonadal ve mezenterik yağ miktarı Tablo 4.5’de ve Grafik 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir. Sıçanların karaciğer ağırlık ortalamaları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Karaciğer ağırlığı YYY+plasebo alan grupta (9.27 ± 1.34 g) en düşük, purifiye yemle beslenen kontrol grubunda en yüksek (11.24 ± 1.35 g) bulunmuştur. Farklılığın yaratan grubu bulmak için yapılan post-hoc test analizi sonucuna göre kontrol grubu ile YYY+plasebo alan grupta karaciğer ağırlıkları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Gruplar arasında karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı incelendiğinde, karaciğer ağırlığı vücut ağırlığı oranına göre en düşük kontrol grubu, en yüksek YYY+plasebo alan grupta bulunmuştur. Farklılığı yaratan grubu bulmak için yapılan post-hoc test analizine göre (Tukey) YYY+probiyotik alan grup ile YYY+plasebo

alan grup arasında fark bulunmazken ($p>0.05$), kontrol grubu ile YYY+plasebo ve YYY+probiyotik alan gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

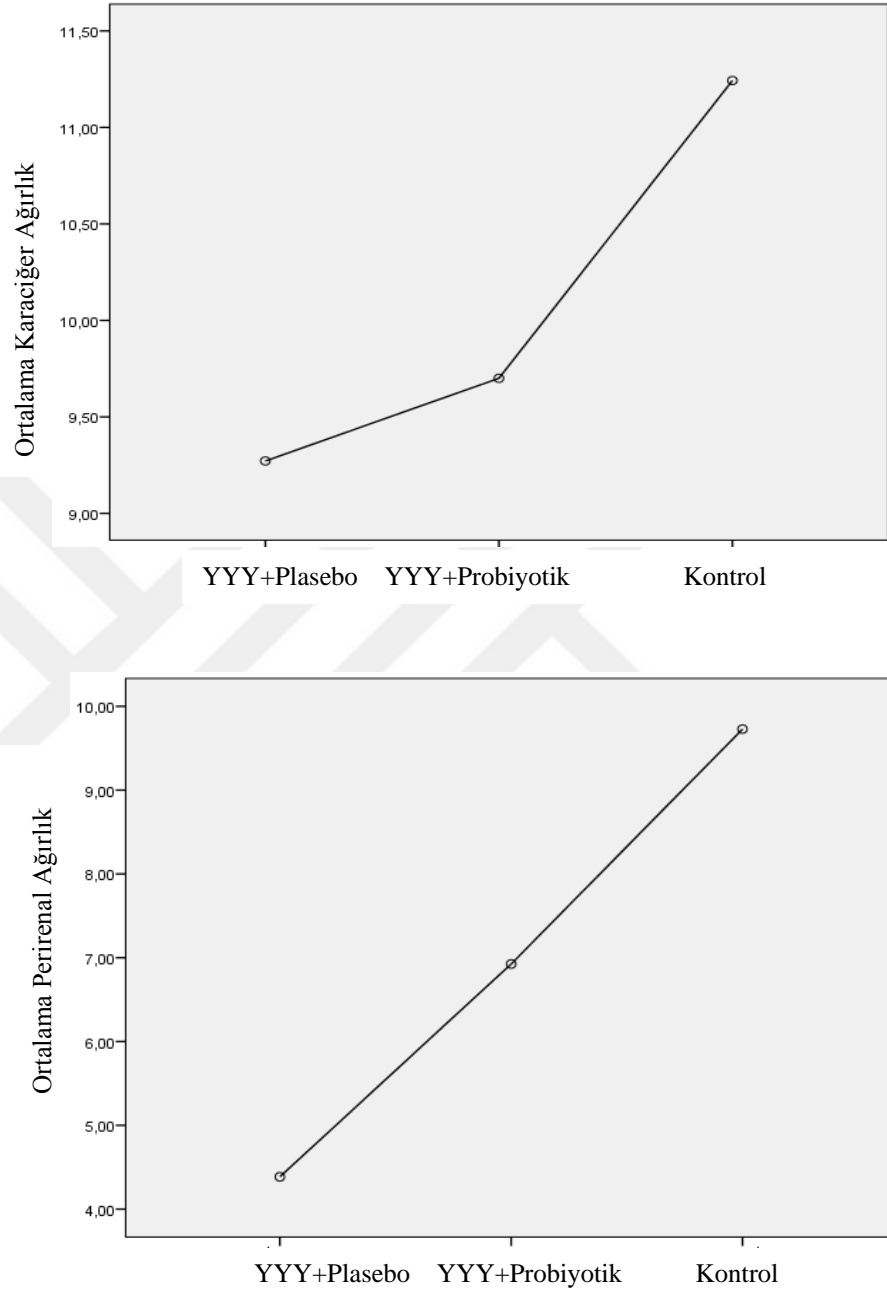
Tablo 4.5. Deney gruplarına göre organ ve yağ dokusu ağırlıklarının ortalama değerleri

Organ ve Doku	Gruplar			p†
	Kontrol	YYY+plasebo	YYY+probiyotik	
	(n=7)	(n=7)	(n=8)	
Ağırlığı (g)	$\bar{x} \pm SS$	$\bar{x} \pm SS$	$\bar{x} \pm SS$	
Karaciğer ağırlığı	11.24 ± 1.35^a	9.27 ± 1.34^b	$9.7 \pm 1.31^{a,b}$	0.029*
Karaciğer Ağırlığı/Vücut Ağırlığı	2.89 ± 0.13^a	3.24 ± 0.21^b	$3.19 \pm 0.23^{b,c}$	0.005*
Perirenal yağ miktarı	9.73 ± 3.90^a	4.39 ± 1.47^b	$6.93 \pm 3.02^{a,b}$	0.012*
Gonodal yağ miktarı	7.17 ± 2.40	4.56 ± 1.43	5.33 ± 1.91	0.058
Mezenterik yağ miktarı	5.56 ± 2.36^a	2.74 ± 0.96^b	3.35 ± 1.28^b	0.010*

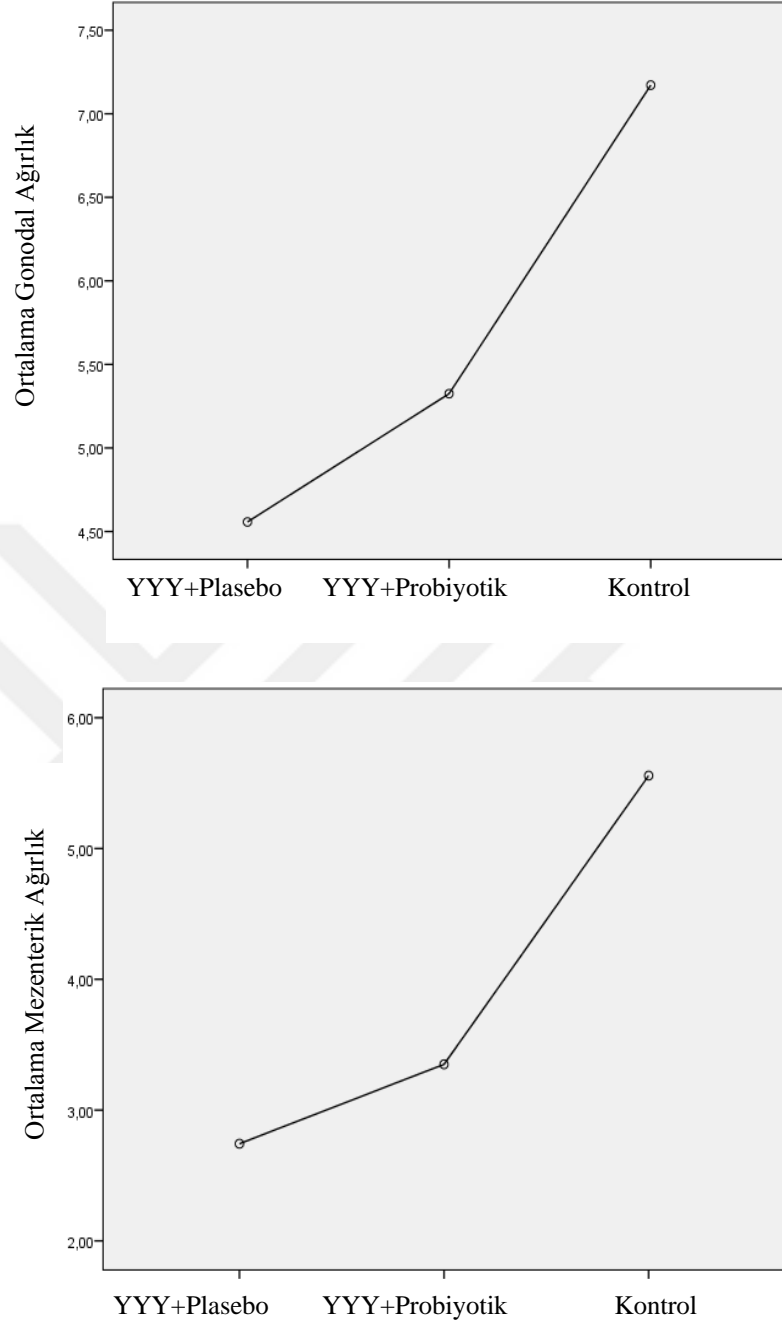
†ANOVA * $p<0.05$. ^{a,b,c}Farklı üstle aynı satırda gösterilen harfler istatistiksel olarak önemli farklılık göstermektedir (Tukey HSD Çoklu Karşılaştırma Testi)

Deney grupları arasında perirenal ağırlık ortalamaları arasında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubu ve YYY+plasebo alan grup arasında perirenal ağırlık ortalamaları açısından farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). En yüksek perirenal ağırlık (9.73 ± 3.90 g) kontrol grubunda belirlenmiştir.

Deney grupları arasında, gonadal ağırlık miktarları açısından istatistiksel olarak farklılık önemli bulunmamış ($p>0.05$), mezenterik ağırlık ortalamaları arasında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubunun mezenterik ağırlığı, YYY+plasebo alan ve YYY+probiyotik alan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.05$). En yüksek mezenterik ağırlık (5.56 ± 2.36 g) kontrol grubunda, en düşük (2.74 ± 0.96 g) YYY+plasebo grubunda bulunmuştur.



Grafik 4.5. Deney gruplarına göre karaciğer ağırlığı ve perirenal doku ağırlığının ortalama değerleri



Grafik 4.6. Deney gruplarına göre gonodal ve mezenterik doku ağırlığının ortalama değerleri.

4.5.1. Deney gruplarına göre vücut, organ ve yağ dokusu ağırlıkları ile LPS düzeyleri arasındaki ilişki

Tüm gruplarda 16. hafta sonunda vücut ağırlıkları ve serum LPS düzeyleri arasında bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 4.6). Kontrol grubundaki hayvanların karaciğer ağırlıkları ve LPS düzeyi arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır ($p<0.05$). Karaciğer ağırlığı arttıkça, LPS düzeyi artmıştır. Diğer yağ dokusu ağırlıkları ve deney grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Tablo 4.6. Deney gruplarına göre vücut, organ ve yağ dokusu ağırlıkları ile LPS düzeyi arasındaki ilişki

Organ ve Yağ Dokusu Ağırlıkları (g)	Gruplar					
	Kontrol (n=7)		YYY+plasebo (n=7)		YYY+probiyotik (n=8)	
	LPS (EU/L)		LPS (EU/L)		LPS (EU/L)	
	r	p	r	p	r	p
Vücut ağırlığı	0.684	0.090	-0.017	0.972	0.157	0.711
Karaciğer ağırlığı	0.793	0.033*	-0.262	0.571	0.380	0.353
Perirenal yağ miktarı	0.606	0.149	0.376	0.406	0.010	0.981
Gonodal yağ miktarı	0.687	0.088	0.207	0.656	-0.535	0.172
Mezenterik yağ miktarı	0.732	0.061	0.197	0.671	0.443	0.272

* $p<0.05$, Pearson Korelasyon Analizi

4.6. Sıçanların karaciğer histopatolojisinin değerlendirilmesi

Deney gruplarına ait histopatolojik değerlendirme Tablo 4.7’de ve Resim 4.1, 4.2 ve 4.3’te gösterilmiştir. Gruplar arasındaki histopatolojik incelemede hepatosteatoz oluşma düzeyi önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. En fazla steatoz sıklığı YYY +plasebo ile beslenen grupta %62.5 oranında, en az hepatosteatoz sıklığı

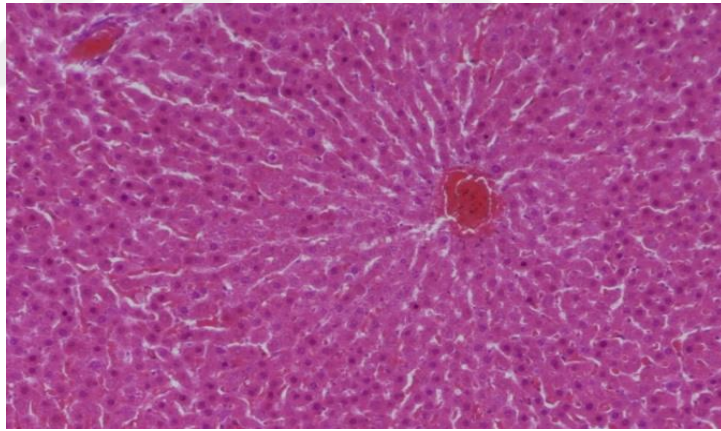
kontrol grubunda belirlenmiştir (%0). Probiyotik + yüksek yağlı yem ile beslenen grupta 1 hayvanda (%12.5) steatoz (balonlaşma) belirlenmiştir.

Tablo 4.7. Deney gruplarına göre karaciğerdeki histopatolojik değişimlerin dağılımı

Histopatolojik Değişim	Gruplar						
	Kontrol (n=8)		YYY+plasebo (n=8)		YYY+probiyotik (n=8)		
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Steatoz	Var	0	0	5	62.5	1	12.5
	Yok	8	100	3	37.5	7	87.5

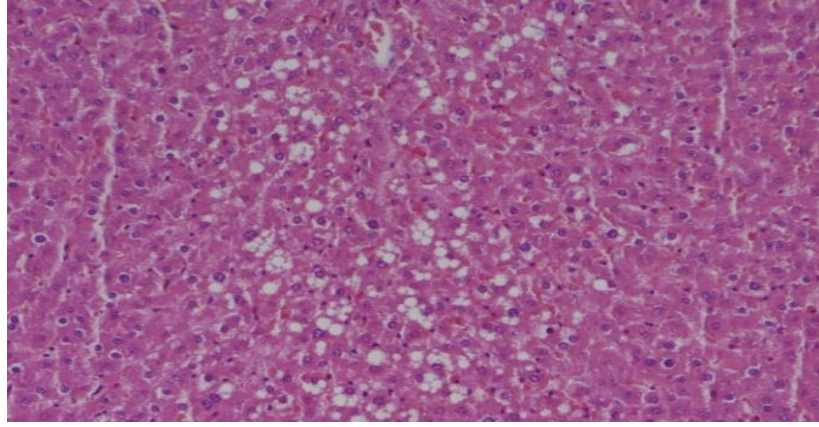
*p<0.05, Fisher's Exact Ki-kare Testi

N sayılarının farklılığı, 6. haftada kontrol grubu ve YYY+plasebo grubundan 1 hayvana ötenazi yapılmasından kaynaklanmaktadır.

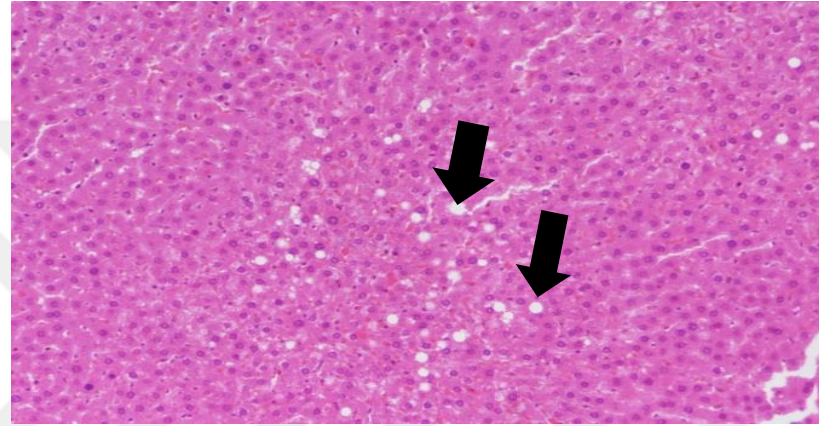


Resim 4.1. Purifiye yem alan kontrol grubuna ait karaciğer kesiti. Hepatosteatoza rastlanmamıştır.

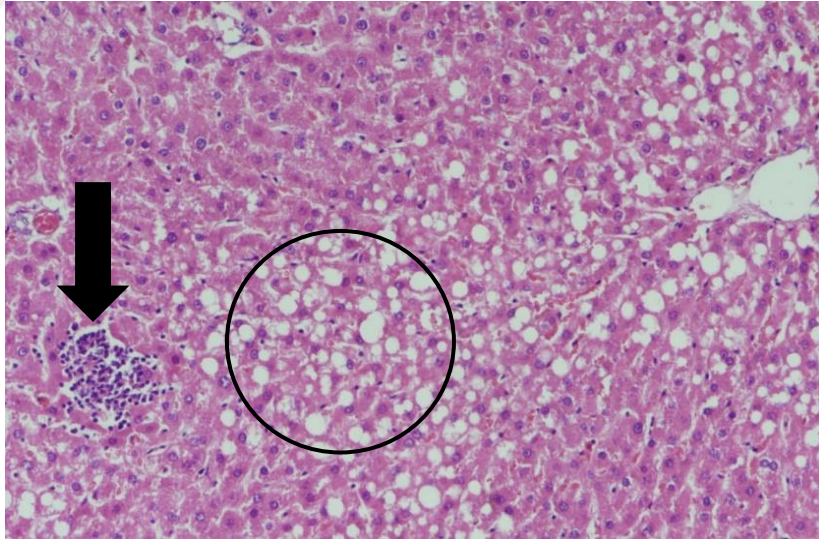
A



B



C



Resim 4.2.Yüksek yağlı yem+plasebo alan gruba ait hepatosteatozlu (A) (okla gösterilen beyaz alanlar) ve masson trikrom boyalı (B) karaciğer kesiti. (C) Yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta bir hayvanda oluşan hepatosteatoz+balonlaşma (siyah daire içindeki alan) ve nekroinflamatuvar (siyah okla gösterilen) odak izlenen karaciğer dokusu

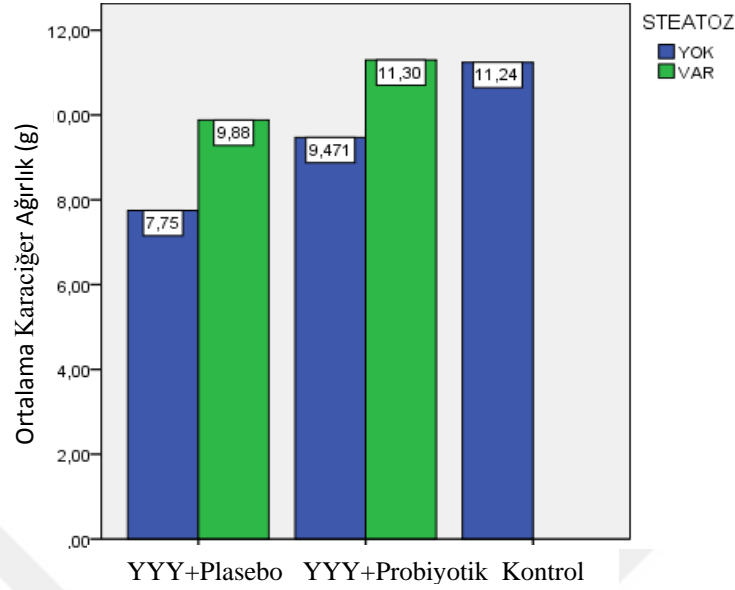
4.6.1. Sıçanların organ ve yağ dokusu ağırlık ortalamalarına göre karaciğer histopatolojisinin değerlendirilmesi

Deney gruplarında organ ve doku ağırlık ortalamalarına göre hepatosteatozun değerlendirilmesi Tablo 4.8, Tablo 4.9 ve Grafik 4.8 ve 4.9’da gösterilmiştir. Yüksek yağlı diyet+plasebo alan grupta hepatosteatozu olan 5 hayvanın karaciğer ağırlıklarının ortalaması 9.98 g, hepatosteatozu olmayan 3 hayvandan ikisinin (1 hayvana 6.haftada ötenazi sebebiyle) karaciğer ağırlık ortalaması 7.75 g bulunmuştur. Probiyotik verilen grupta, balonlaşma görülen 1 hayvanın karaciğer ağırlığı 11.30 g bulunmuş, bu grupta hepatosteatozu olmayan hayvanların karaciğer ağırlıkları ortalaması 9.47 g bulunmuştur. Kontrol grubunda 8 hayvanda hepatosteatoz negatif olup, 7 (6.haftada ötenazi sebebiyle) hayvanın karaciğer ağırlık ortalaması 11.24 g bulunmuştur.

Tablo 4.8. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre karaciğer ağırlığı

Hepatosteatoz	Karaciğer Ağırlığı		
	Kontrol	YYY+plasebo	YYY+probiyotik
	n:7	n:7	n:8
	$\bar{x} + SS$	$\bar{x} + SS$	$\bar{x} + SS$
Var	-	9.88±1.00	11.30
Yok	11.24±1.35	7.75±0.49	9.47±1.24

N sayılarının farklılığı, 6. haftada kontrol grubu ve YYY+plasebo grubundan 1 hayvana ötenazi yapılmasından kaynaklanmaktadır.



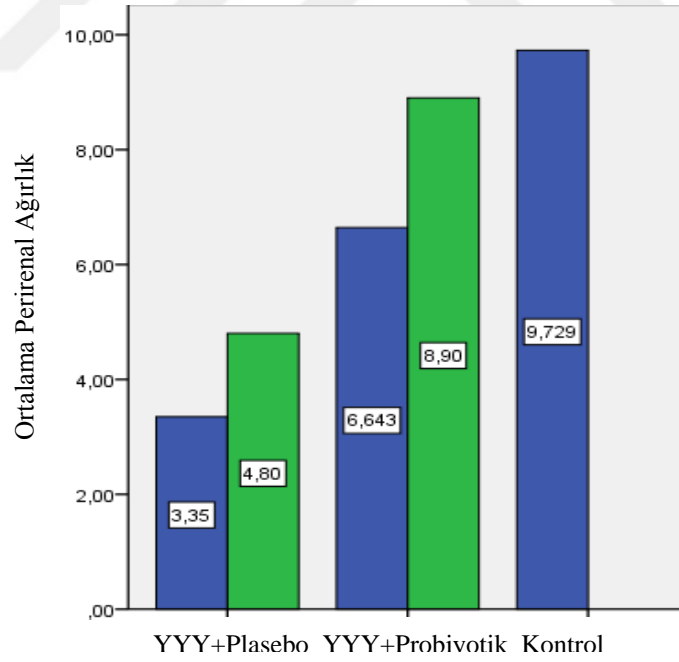
Grafik 4.7. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre karaciğer ağırlığı

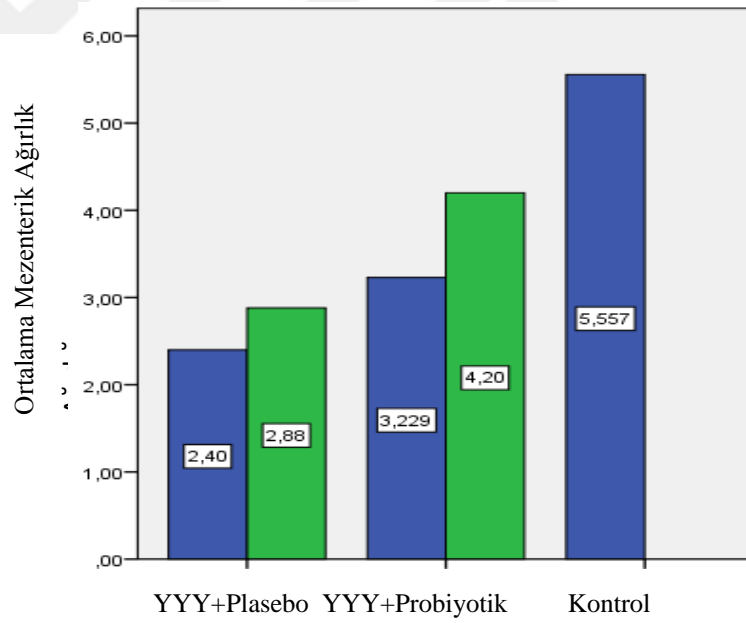
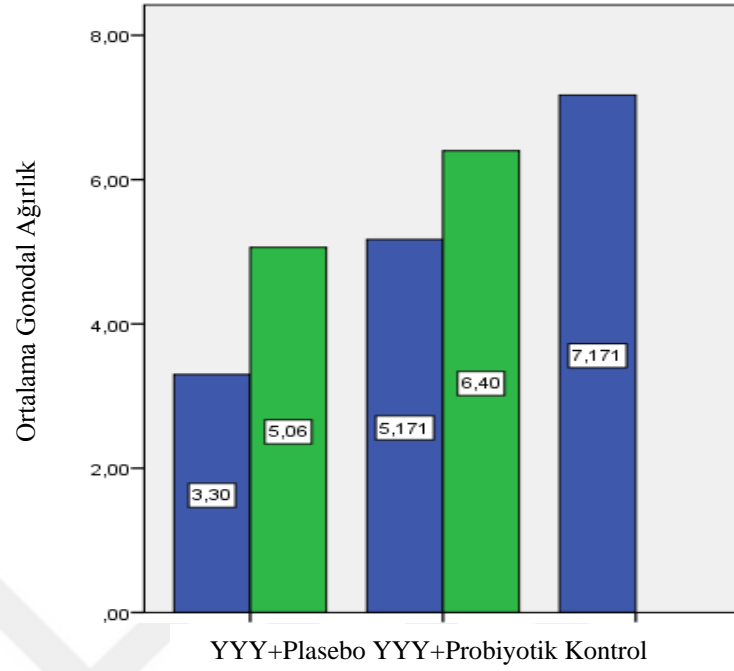
Hepatosteatoz bulunmayan kontrol grubunda 7 hayvanın perirenal ağırlık ortalaması 9.73 g bulunmuştur. Yüksek yağlı diyet+plasebo alan grupta steatozu olan 5 hayvanın perirenal ağırlık ortalaması 4.80 g, steatozu olmayan 2 hayvanın perirenal ağırlıklarının ortalaması 3.35 g bulunmuştur. Probiyotik alan grupta hepatosellüler balonlaşma gelişen bir hayvanın perirenal ağırlık ortalaması 8.90 g, hepatosteatoz bulunmayan 7 hayvanın perirenal ağırlık ortalaması 6.43 g bulunmuştur. Gonodal ağırlık ortalaması hepatosteatozu olmayan kontrol grubundaki hayvanlarda 7.17 g bulunmuştur. Yüksek yağlı diyet+plasebo alan grupta hepatosteatozu olan 5 hayvanın gonodal ağırlık ortalaması 5.06 g, hepatosteatozu olmayan diğer 2 hayvanın 3.30 g bulunmuştur. Probiyotik alan grupta hepatosellüler balonlaşması olan bir hayvanın gonodal ağırlık ortalaması 6.40 g, hepatosteatoz bulunmayan 7 hayvanın gonodal ağırlık ortalaması 5.17 g bulunmuştur.

Mezenterik ağırlık ve hepatosteatoz arasındaki ilişkiyi inceleyen Grafik 4.5'e göre, hepatosteatozu olmayan kontrol grubunun tüm hayvanlarında mezenterik ağırlık ortalaması 5.58 g bulunmuştur. Yüksek yağlı diyet+plasebo alan grupta steatozu olan 5 hayvanın mezenterik ağırlık ortalaması 2.88 g, steatozu olmayan 2 hayvanın mezenterik ağırlık ortalaması 2.40 g bulunmuştur.

Tablo 4.9. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre perirenal, gonodal ve mezenterik ağırlıklar

Gruplar- Hepatosteatoz		Perirenal Ağırlık (g)	Gonodal Ağırlık (g)	Mezenterik Ağırlık (g)
		$\bar{x} + SS$	$\bar{x} + SS$	$\bar{x} + SS$
Kontrol	Var	-	-	-
	Yok	9.73±3.90	7.17±2.40	5.56±2.36
YYY+plasebo	Var	4.80±1.49	5.06±1.34	2.88±1.08
	Yok	3.35±1.06	3.30±0.85	2.40±0.71
YYY+probiyotik	Var	8.90	6.40	4.2
	Yok	6.64±3.14	5.17±2.00	3.23±1.33





Grafik 4.8. Deney gruplarında histopatolojik değerlendirmeye göre gonodal, perirenal ve mezenterik ağırlık

5.TARTIŞMA

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), obezite ve obeziteyle ilişkili hastalıkların artmasıyla beraber dünya genelinde prevalansı artan bir hastalıktır (3, 8, 32). Hastalığın patogenezi, çevresel, metabolik, genetik ve bağırsak mikrobiyal faktörlere bağlı olmakla birlikte tam olarak çözümlenememiştir (8).

Hastalığın tedavisinde ağırlık kaybı, sağlıklı beslenme ve fiziksel aktivitenin artırılması gibi yaşam tarzı değişiklikleri birinci basamağı oluşturmaktadır (8, 9). Non alkolik steatohepatitin tedavisinde Amerikan Besin ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır (3, 8, 9). Mevcut ilaç tedavileri steatozu azaltmaya, inflamasyonu ve fibrozisi önlemeye yöneliktir (9).

Literatürde NAFLD'nın gelişiminde bağırsağın önemli bir rol oynadığı ve disbiyozisin intestinal permeabilityyi artırmasıyla endotoksemiye zemin hazırladığı belirtilmektedir (131, 164, 178). Probiyotiklerin mikrobiyota üzerindeki manipasyonu sayesinde NAFLD'de umut verici bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Bu bilgilere paralel olarak bu çalışmada sıçanlarda yüksek yağlı diyetle beslenmenin indüklediği hepatosteatoz ve metabolik endotoksemiye probiyotik desteklerinin etkileri incelenmiştir.

5.1.Ağırlık değişimi

Kemirgen hayvan modellerinde yüksek yağlı diyet uygulamasının etkileri farklılıklar içermektedir (179). Beslenmeyle ilgili modeller, insan beslenmesini taklit etmekte ve karaciğer hasarı, steatoz, lobular inflamasyon ve fibrozis oluşumu hedeflemektedir (180). Bu çalışmada ağırlık değişim farkı her 3 grupta (Kontrol, YYY+plasebo ve YYY+probiyotik) başlangıca göre 16 haftanın sonunda artmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$; Tablo 4.1). En fazla ağırlık değişimi kontrol grubunda gözlenmiştir ($F=16.62$, $p<0.05$).

De La Serre ve ark.'nın (156) yüksek ve düşük yağlı diyetle, başlangıç ağırlıkları 262 g olan Sprague Dawley sıçanlarla, 8 veya 12 hafta süreyle yaptıkları çalışmada, obezite yatkınlığı olan sıçanlar, obezite dirençli sıçanlarla veya düşük yağlı beslenen sıçanlarla karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarında önemli derecede artış gözlenmiştir.

Lieber ve ark.'nın (181), yüksek yağlı likit diyet ve standart diyet ile Sprague Dawley sıçanlarda 3 hafta süreyle yaptıkları çalışmada, her iki grup arasında başlangıç ve bitiş vücut ağırlıklarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Liang ve ark.'nın (182), aynı tür sıçanlarla (6 haftalık) 16 hafta süre ve yüksek yağlı diyetle indüklenen NAFLD'da, probiyotiklerin etkisini araştıran çalışmada ise, yüksek yağlı diyet alan grubun vücut ağırlığının kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı gösterilirken, probiyotik alan grupta önemli derecede azalma olduğu gösterilmiştir.

Sprague Dawley ve Wistar türü sıçanlarda yüksek yağlı diyetle indüklenen obezite modelinin araştırıldığı bir çalışmada 17 hafta süreyle her iki gruba da standart ve yüksek yağlı diyet verilmiştir. Bu sürenin sonunda yüksek yağlı diyetle beslenen Wistar sıçanlarda ağırlık artışı 4. haftadan itibaren gözlemlenirken, yüksek yağlı diyetle beslenen Sprague Dawley sıçanlarda bu etki 7. haftadan itibaren gerçekleşmiştir (183). Çalışmalarda kullanılan hayvanların fenotipi önem taşımaktadır. Fareler ve sıçanlar, NAFLD'de sık kullanılan modellerdir (13).

Bu çalışmada ağırlık kazanımının yüksek yağlı yemde bulunan koyun kuyruk yağının ağır kokusu nedeniyle yem tüketimini etkilediği düşünülmektedir. Koyun kuyruk yağının sığır kuyruk yağıyla değişimi sonucu yem tüketimlerinin arttığı Grafik 4.1'de gösterilmiştir. İlaveten 6. haftada hepatosteatozu değerlendirmek kontrol ve yüksek yağlı yem (YYY)+plasebo gruplarından 1'er hayvana ötenazi yapılmış, bu gruplardaki istatistikler 7 hayvan üzerinden, yüksek yağlı yem+probiyotik alan grubunda ise 8 hayvan üzerinden yapılmıştır. Yüksek yağlı yem+probiyotik alan gruptaki ağırlık artışının kontrol grubundan daha düşük olması bu grupta kullanılan probiyotiğin iştah azaltıcı etkisine, YYY+plasebo alan ve kontrol grubunun denek sayılarının farklılığına dayandırılmaktadır. Probiyotiklerin antiobezite etkisi, bağırsak mikrobiyotasının değişimi ve glukoz, lipit metabolizması ve enerji homeostazı üzerinden gerçekleştirdiği belirtilmektedir (184). Ağırlık kaybı, sempatik sinir sisteminin uyarılması sonucu termojenik ve lipolitik yanıtın oluşmasıyla gerçekleşmektedir (134).

Literatürde deney gruplarında homojenizasyonun sağlanabilmesi için müdahale ve kontrol gruplarına aynı tür yem verilmesi gerektiği belirtilmektedir. Purifiye yeme karşı kontrol grubunda pelet yemin kullanılması çalışmalarda farklı

sonuçların çıkmasına neden olmaktadır (185). İçeriği bilinmeyen pelet yem ve tanımlanmış diyet iki açıdan farklılık göstermektedir. Birincisi pelet yemde soya kaynaklı fitoöstrojen içeriği, diğeri ise tanımlanmış diyetle bulunan sükrozdur. Fitoöstrojenler, leptin ve tiroid hormon düzeylerini, lipogenez ve lipoliz gibi metabolik fonksiyonları, besin alımını ve lokomotor aktiviteyi etkilemekte; sükroz alımı ise ağırlık kazanımı, insülin direnci ve dislipidemi gibi etkileri ortaya çıkarmaktadır (186). Bununla birlikte deneysel çalışmalarda diyetin yalnızca besin olarak görülmesi, farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (187). Bu nedenle bu çalışmada her 3 grupta da purifiye yem kullanılmıştır.

Ayrıca outbred soydan türeyen Spargue Dawley ratlarda, yüksek yağlı diyetle indüklenen obezitede farklılıklar olabileceği gösterilmiştir. Bazı sıçanların yüksek yağlı diyete karşı hiperfaji ve ağırlık artışı gibi obezogenik bir etki-yatkınlık gösterirken diğerlerinin direnç gösterdiği belirtilmektedir (156).

Probiyotiğin oral yolla 16 hafta süreyle verildiği yüksek yağlı diyetle yapılan çalışmada, probiyotik alan grubun ağırlık kazanımı diğer yüksek yağlı diyet alan gruba göre daha düşük bulunmuştur (182).

Probiyotiğin supleman olarak 12 hafta süreyle verildiği diğer bir çalışmada ise yüksek yağlı diyet alan 3 grup, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ağırlık kazanımı istatistiksel olarak önemli bulunmuş ancak yüksek yağlı diyet alan gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (188). Bu çalışmada benzer sonuç bulunmuş, yüksek yağlı yem+plasebo ve yüksek yağlı yem+probiyotik alan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında özellikle kemirgen grubu hayvanlarda yapılan çalışmalarda 'Batı Tarzı Beslenmeye' benzemesi nedeniyle yüksek yağlı diyet uygulaması insan beslenmesine yakın olduğu için tercih edilmektedir (180). Ancak NAFLD'de kullanılan tekli doymamış, çoklu doymamış veya doymuş yağ asidi türlerinin etkisi bilinmemektedir (24).

Pelet yem ve tanımlanmış diyet arasındaki farklardan bir diğeri de diyetin yağ içeriğidir. Diyetteki yağ türünün diğer bileşiklerle farklı etkiler ortaya çıkarması muhtemel görülmektedir (186). Diyetle doymuş yağ asidine (DYA) fazla miktarda maruziyet, proinflatuvar sitokinlerin salınımına, insülin sinyalizasyonunda

bozulmaya, endoplazmik retikulum ve oksidatif stresin oluşumuyla apoptozisin indüklemesine ve lipotoksik kaskatın başlamasına neden olmaktadır (189). Kontrol grubunun yeminde bulunan ayçiçek yağı tekli doymamış yağ asidi (TDYA) (%21) ve çoklu doymamış yağ asidinden (ÇDYA) (%66) zengin olup, n-6/n-3 oranının yüksekliği, hepatik lipit ve insülin metabolizmasında bozulmaya, inflamatuvar yolaklarda düzensizliğe neden olmaktadır (190). Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyona uğraması, inflamatuvar yolaklarda rol alması NAFLD ile ilişkilendirilmektedir (190). Yüksek yağlı yem+probiyotik ve yüksek yağlı yem+plasebo alan grubun yemlerinde bulunan kuyruk yağı ise %57 DYA ve %38 TDYA örüntüsünü içermektedir (191). Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin alımındaki dengesizlik hepatositlerde trigliserit (TG) sentezinin artması ve depolanmasıyla sonuçlanırken, özellikle DYA'nin tümör nekrozis faktör (TNF- α) üretimini uyaran toll benzeri reseptör 4 (TLR4) aktivasyonu, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağı ve proapoptotic BH3-tek protein PUMA'nın (apoptozisin upregüle edici modülatörü p53) upregülasyonuna neden olmaktadır (52, 111).

Yapılan diğer çalışmalarda kullanılan domuz yağının kolesterol miktarının sığır kuyruk yağına göre daha fazla olması, sonuçların farklı çıkmasındaki etkenlerden biri olduğunu düşündürmektedir (domuz kolesterol=0.72/100 g, sığır kuyruk yağı =0.68 g/100g) (175).

Yemlerde kullanılan karbonhidrat türü farklı etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilebilmektedir. Bu çalışmada karbonhidrat kaynağı olarak maltodekstrin ve mısır nişastası kullanılmıştır. Kendig ve ark.'nın (192) Wistar sıçanlarda farklı karbonhidrat kaynaklarının, metabolik ve davranışsal etkilerini inceledikleri çalışmada, sıçanlar başlangıç ağırlıklarına göre 3 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba 78 gün boyunca ve 2 saat süreyle, karbonhidrat kaynağı olarak sükroz solüsyonu veya maltodekstrin solüsyonu veya standart pelet diyet izokalorik verilmiştir. İkinci ve üçüncü gruba zaman kısıtlaması olmaksızın aynı diyetler uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda vücut ağırlıkları, toplam enerji alımları ve kan glukoz düzeyleri arasında farklılık bulunmamıştır. Ancak maltodekstrin alan grupta retroperitoneal yağ miktarı, kontrol grubuna göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, sükroz grubuyla aralarında farklılık bulunmamıştır. Sükroz gibi aşırı maltodekstrin tüketiminin, hızlı ağırlık artışına ve retroperitoneal yağlanmada artışa

neden olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada ise kontrol grubunun daha fazla ağırlık kazanımının ve perirenal, gonadal ve mezenterik yağ dokusunun diğer gruplara göre yüksek olmasının, maltodekstrinin bu etkisiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

5.2.Yem tüketimi

Birçok hayvan çalışmasında yem tüketim miktarı değerlendirilmemiş; ancak ağırlık kazanımı veya biyokimyasal veriler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (163, 182, 193-195). Bu çalışmada gruplar arasında yem tüketiminin değişkenliği standart purifiye yem ile yüksek yağlı purifiye yem içeriklerinin, yağ çeşidi ve örüntüsünün farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kontrol grubunda purifiye yeme karşı yüksek yağlı yemde bulunan koyun kuyruk yağının, tüketimi etkilediği Grafik 4.1’de gösterilmiş, koyun kuyruk yağının sığır kuyruk yağı ile yer değiştirmesiyle bu gruplardaki yem tüketiminin ivmelenmesi artmıştır. Hayvanların yemlere alışma döneminin de yem tüketimindeki artışa etkisinin olacağı düşünülmektedir. Yağlar enerji yoğunluğu yüksek olan bir besin grubu olduğu için (196) yüksek yağlı yem tüketen plasebo ve probiyotik gruplarının kontrol grubuna göre daha düşük miktarda yem tüketmeleri yağların bu özelliğine dayandırılmaktadır.

5.3. Biyokimyasal belirteçler

Klinikte aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerindeki anormallikler hepatik hasarın göstergesi olarak kabul edilmektedir (82, 85). AST /ALT oranının >2 ’den olması karaciğer hasarının göstergesidir (82). Bu çalışmada, yüksek yağlı yem+plasebo alan grubun, kontrol ve yüksek yağlı yem+probiyotik alan gruplara göre istatistiksel olarak daha yüksek AST düzeyine sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum histopatolojik olarak NAFLD’nin bir yansıması olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmanın benzer sonuçları, Esposito ve ark.’nın (193) Sprague Dawley sıçanlarda, 3 hafta süreyle standart ve yüksek yağlı likit diyet uygulayarak karaciğer inflamasyonuna probiotiklerin etkisini değerlendirdiği çalışmada gösterilmiş, yüksek yağlı diyet alan grupta AST oranı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

Umbreen ve ark.'nın (197) %71 likit diyet yağının NAFLD'ye etkisini araştırdığı çalışmada, sıçanların AST ve ALT düzeylerinde 3 ve 5 haftalık periyotlarda istatistiksel olarak bir önemlilik bulunmamıştır.

Liang ve ark.'nın (182) oral probiyotik kullanımının yüksek yağlı diyetle indüklenen disbiyozise ve kronik metabolik inflamasyona etkisinin 16 hafta süreyle araştırıldığı çalışmada, probiyotik alan grupta ALT düzeyleri, standart diyet alan kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş, probiyotiğin inflamatuvar yanıtı ve hepatik hasarı azalttığı belirtilmiştir.

Xu ve ark.'nın (188) probiyotik suplementasyonunun mikrobiyal flora ve hepatik lipit akümülyasyonuna etkisini 12 hafta süreyle araştırdığı diğer bir çalışmada, kontrol grubu (standart diyet), model grubu (yüksek yağlı diyet), Lactobasillus grubu (yüksek yağlı diyet+ Lactobasillus asidophilus 10^{10} /ml) ve Bifidobakteri grubu (yüksek yağlı diyet+Bifidobacterium longum 10^{10} /ml) arasında serum ALT düzeyleri açısından istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır.

Esapasio ve ark.'nın (193), VSL#3 probiyotik suşunun yüksek yağlı likit diyetle indüklenen inflamasyona etkisini araştırdığı çalışmada, yüksek yağlı likit diyet alan grupta ALT düzeyleri, probiyotik alan gruba ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada VSL#3'ün, antiinflamatuvar ve antioksidatif aktivite gösterdiği, bu koruyucu etkisinin barsak bütünlüğünü korumasından kaynaklandığı belirtilmiştir.

Bu çalışmada yukarıda bahsedilen çalışmadan farklı bir sonuç bulunmuş, (Tablo 4.2) kontrol grubunun ALT düzeyinin, yüksek yağlı yem+probiyotik ve yüksek yağlı yem+plasebo alan gruba göre daha düşük olduğu, ALT düzeyinin en yüksek probiyotik alan grupta olduğu bulunmuştur. Yüksek yağlı yem alan gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Probiyotik alan grupta hepatosit hasarının bir göstergesi olan ALT düzeyinin yüksekliği, Lactobasillus rhamnasus GG'nin karaciğer fonksiyonlarını koruyamadığı yönündedir. Ayrıca bu sonucun probiyotik dozu veya laboratuvar analizleriyle ilgili olduğu düşünülmektedir.

Xu ve ark.'nın (198) yaptığı diğer bir çalışmada, Sprague Dawley sıçanlarda 4,8,12,16,24,36 ve 48 hafta süreyle yüksek yağlı ve pair-fed diyete maruziyetin fibrozise etkisini araştıran çalışmada hayvanların serum ALT düzeyleri yüksek yağlı

diyet alan grupta 12. haftadan itibaren artmaya başlamış ve 48. haftada en üst düzeye ulaşmıştır.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında, karaciğerde trigliserit (TG) birikimi sonucu serbest kolesterol miktarının ve sentezinin artması, safra asit sentezinin ve taşınmasının azalmasıyla paraleldir (5, 61). Serbest kolesterolün artması, membrandaki kolesterol/fosfolipit oranını değiştirerek endoplazmik retikulum stresine yol açmaktadır (199). Bu çalışmada serum kolestrol düzeyleri (Tablo 4.2) açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığından, yüksek yağlı yemin ve verilen probiyotiğin lipit düzeylerine etkisi gözlenmemiştir. Espasito ve ark.'nın (193) çalışmasında farklı bir sonuç olarak yüksek yağlı yem alan grupta serum kolesterol düzeylerinin daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Al-muzafar ve ark.'nın (195), yağlı karaciğer hastalığında probiyotik kullanımının lipit profili, leptin ve inflamatuvar belirteçlere etkisini araştırdığı çalışmada albino sıçanların 16 hafta sonunda kolesterol miktarı, yüksek yağlı-sükrozlu yem alan grupta yüksek yağlı-sükrozlu+probiyotik alan ve standart pelet yemle beslenen gruba göre anlamlı derecede yüksek çıktığı gösterilmiştir. Probiyotiğin lipit profilini düzelttiği belirtilmiştir.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında serbest yağ asitlerinin birikimi, insülin direncinin oluşması ve barsak mikrobiyotasının bozulması sonucu oluşan endotokseminin (LPS) portal venle karaciğere ulaşması, Kupffer hücrelerinden ve hepatositlerden immun resertörlerin aktivasyonu, pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-8 ve IL-1 β) üretimiyle sonuçlanmaktadır (5, 182, 200). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında bir endotoksin olan LPS'nin, barsak mikroflorasında önemli bir rol aldığı ve inflamatuvar hasara neden olduğu belirtilmektedir (5, 23).

Esposito ve ark.'nın (193) yaptığı çalışmada, yüksek yağlı diyet alan grupta TNF- α düzeyi yüksek bulunmuş, yüksek yağlı diyet ile inflamatuvar yanıtın indüklendiği, VSL#3 probiyotik alan grupta ise TNF- α 'nın baskılandığı belirtilmiştir. Benzer şekilde Liang ve ark.'nın (182) yüksek yağlı diyetle probiyotik ve prebiyotik kullandığı çalışmada, TNF- α düzeyi, yüksek yağlı diyet alan grupta, kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, probiyotik alan grup yüksek yağlı diyet alan grupla karşılaştırıldığında azalma göstermiş ancak istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Lipopolisakkarit düzeyi yüksek yağlı diyet alan grupta kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek çıkmış, probiyotik alan grupta ise yüksek yağlı diyet alan gruba göre önemli derecede düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada TNF- α , CRP ve LPS düzeyleri (Tablo 4.3) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır. Yüksek yağlı yem+plasebo alan grubun TNF- α düzeyi, diğer gruplara göre yüksek görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Liposakkarit düzeylerinin yüksek bulunmaması, sıçanlarda bariyer bütünlüğünün bozulmadığını, TLR'in aktive olmaması nedeniyle inflamatuvar kaskatının başlamadığını ve paralel olarak TNF- α salınımının oluşmadığını göstermektedir (1, 161). C-reaktif protein ve NAFLD arasında pozitif ilişki olduğuna ilişkin insan çalışmaları mevcuttur (200-203).

Tablo 4.4'de sıçanların LPS düzeyi ile inflamatuvar belirteçler arasındaki ilişki incelendiğinde, LPS düzeyi arttıkça TNF- α miktarı azalmaktadır. Ancak literatürde LPS'nin indüklenmesi, NF- κ B ve p38 yolağının aktive ederek TNF- α 'nın salınmasına neden olmakta; ancak mekanizmanın tam anlaşılmadığı belirtilmektedir (204). Bu çalışmada LPS ve TNF- α düzeyi arasındaki negatif ilişki literatürde 'Endotoksemi Toleransı' ile açıklanmaktadır. Organizmanın LPS maruziyetine yanıtı pro inflamatuvar sitokin üretimiyle gerçekleşmektedir. Ancak makrofajlar, LPS dozlarına maruziyette azalmış bir sitokin yanıtı olurturmakta, bu durum endotoksemi toleransı olarak adlandırılmaktadır (205). Endotoksinin patolojik etkisine, organizma karşı toleransı oluşturarak TNF- α , IL-6, IL-1 ve IL-10 gibi sitokinleri azaltmaktadır (206). Bu çalışmada LPS'nin 16 hafta süren kronik maruziyetine karşı, endotoksemi toleransının oluştuğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada yüksek yağlı yemin ve probiyotiğin organ yağ dokusu ağırlık ortalamalarına etkisi değerlendirildiğinde (Tablo 4.5) karaciğer ağırlığı en fazla kontrol grubunda bulunmuştur. Ağırlık kazanımının en fazla kontrol grubunda olması, bu sonuçlara paralel olarak karaciğer ağırlığının artışıyla sonuçlanmıştır. Ancak Liang ve ark.'nın (182) yaptığı çalışmada, yüksek yağlı diyet alan grupta karaciğer ağırlığı, indeksi ve yağ oranı kontrol grubuna göre önemli derecede artmıştır. Benzer şekilde Esposito ve ark.'nın (193) yüksek yağlı likit diyetle yaptığı çalışmada da yüksek yağlı likit diyet alan grupta karaciğer ağırlığı, standart pelet

yem alan ve yüksek yağlı likit diyet +probiyotik alan gruba göre önemli derecede arttığı gösterilmiş, yüksek yağlı diyetin inflamatuvar yolakları tetiklediği belirtilmiştir. Kimn ve ark.'nın (177) farelere, 13 hafta yüksek yağlı diyet ve oral yolla *Lactobasillus rhamnasus GG* (1×10^8) uygulamasının adipoziteye ve adiponektin üretimine etkisini araştıran bir çalışmada karaciğer ve epididimal adipoz doku, yüksek yağlı diyet+LGG tedavisi alan grupta, kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı incelendiğinde (Tablo 4.5) yüksek yağlı diyet+plasebo alan grupta yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum non alkolik yağlı karaciğer hastalığının klinik göstergesi olan hepatositlerde $>5\%$ 'ten fazla trigliserit birikimiyle paralel olarak karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına göre artışının bir göstergesidir (7). Probiyotik alan grup ile plasebo grubu arasındaki farklılık probiyotiğin antiobezite ve *Lactobasillus rhamnosus GG*'nin antiinflamatuvar etkisine dayandırılmaktadır (176, 184). Bu çalışmaya benzer şekilde Esposito ve ark.'nın (193) yaptığı çalışmada da yüksek yağlı diyet alan kontrol grubunda karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı, standart diyet alan ve yüksek yağlı diyet+VSL#3 probiyotik alan gruba göre daha yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada perirenal ve mezenterik yağ dokusu miktarı kontrol grubunda, YYY+plasebo ve YYY+probiyotik alan gruplara göre önemli derecede artmıştır. Visseral adipoz doku insülin direnci üzerinden NAFLD'de etkinlik gösterirken, visseral adipoz dokunun bir parçası olan mezenterik yağ dokusunun etkisi tam olarak bilinmemektedir (207). Dolayısıyla bu çalışmada mezenterik dokunun kontrol grubunda artışının, diyetdeki yağ ve karbonhidrat türüne bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sıçanların LPS düzeyleri ile vücut, organ ve perirenal, gonadal, mezenterik, yağ dokusu ağırlıkları arasındaki ilişkide (Tablo 4.6), karaciğer ağırlığı dışında diğer parametrelerde önemlilik bulunmamıştır. Obezite düşük dereceli bir inflamasyon olarak kabul edilmektedir. Bağırsakta oluşan endotoksin (LPS) düzeyinin artması obeziytle ilişkilendirilmekte, LPS'nin TLR-4'e bağlanarak pro ve anti inflamatuvar sinyalizasyon kaskatını başlattığı belirtilmektedir (208). Bu çalışmada en fazla ağırlık kazanımı ve yem tüketimi kontrol grubunda olmasına karşın, vücut

ağırlığı ve LPS düzeyi düzeyi arasında bu hipotezi destekleyici bir sonuç bulunamamıştır. Kontrol grubunda karaciğer ağırlığı arttıkça, LPS düzeyi artmaktadır. Karaciğer ağırlığının artması, hepatik lipit içeriğinin artmasıyla ilişkilendirilmektedir. Hepatik trigliserit miktarındaki artış, histopatolojik olarak biyopsi ile veya karaciğer hacminin veya ağırlığının >%5 fazlası olması durumunda gerçekleşmektedir (209). Dolayısıyla kontrol grubunda karaciğer ağırlığının artması teorik olarak intrahepatik TG miktarının arttığını göstermekte, histopatolojik değerlendirme bu hipotezi desteklememektedir.

5.4.Histopatoloji

Literatürde sıçanlarda probiyotikle yapılan çalışmalarda steatozu değerlendiren çok fazla çalışma bulunmamaktadır (210). Xu ve ark.'nın (188) probiyotik suplementasyonunun mikrobiyal flora ve hepatik lipit birikimine etkisini araştırdığı bir çalışmada, Laktobasil grubunda mikroveziküler steatoz oluşmuş ve lobun yapısına harabiyet verdiği gösterilmiştir. Bididobakteri grubunda ise dağınık mikroveziküler steatoz gösterilmiştir. Yüksek yağlı diyet alan model grubunda, santral ven çevresinde lipit birikimi ile mikro ve makroveziküler steatoz oluşmuştur. Kontrol grubunda, hayvanların karaciğerinde hepatik lipit birikimi oluşmamış ve karaciğer lobları normal yapıda değerlendirilmiştir.

Vajro ve ark.'nın (211), Lactobasillus rhamnus GG'nin (LGG) pediatrik obeziteyle ilişkili karaciğer hastalığına etkisini araştırdıkları çalışmada, çocuklarda, LGG ve plasebo alan grupta ALT düzeyi önemli derecede azalmıştır. Ancak probiyotik grubundan 10 hastanın 8'inde ve plasebo grubundan 10 hastanın 3'ünde ALT düzeyi azalmış ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Probiyotik alan grupta peptidoglikan-polisakkarit IgA önemli derecede azalmış, visseral yağ, TNF- α , hepatorenal ultrasonografi oranı, BMIz skorunda herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. İnce bağırsak bakteriyel aşırı büyümesi probiyotik alan grupta önemli derecede azalmıştır. Çalışmanın sonucu olarak LGG'nin hipertransaminasemiada terapötik bir araç olabileceği ancak, NAFLD'nin patogenizinde rol oynayan TNF- α 'daki etkisinin değerlendirilmesi için uzun süreli çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada, Xu ve ark.'nın (188) yaptığı çalışmaya benzer sonuçlar bulunmuş; Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda tamamında steatoz

oluşmazken, yüksek yağlı yem+plasebo grupta 7 hayvandan (1 hayvana 6. haftada ötenazi yapıldı ve steatoz negatif çıktı) 5'inde steatoz oluşmuştur. Yüksek yağlı yem +probiyotik alan grupta yalnızca 1 hayvanda %20 oranında steatoz+hepatosellüler balonlaşma tespit edilmiştir. Yüksek yağlı yemin AST yüksekliğine etkisi yalnızca kontrol grubunda biyokimyasal belirteçlere yansırken, karaciğerde steatoz oluşumu histopatolojik olarak %62,5 oranında olmuştur. Literatürde hayvan çalışmalarının çok az bir kısmında steatoz oluşumunun gösterildiği ve bu farklılıkların kemirgenlerin türünden kaynaklandığı belirtilmiştir (179).

Aller ve ark.'nın (212), probiyotiğin (*Lactobasillus bulgaricus*+*Streptococcus thermophilus* 500x10⁶ /gün) NAFLD'li hastalarda ALT'ye etkisini araştıran çalışmada, başlangıç ve 3 ay sonundaki BKİ, vücut ağırlığı, yağ kütlesi, bel/kalça oranı, glukoz, insülin, HOMA-IR, kolesterol, trigliserit, IL-6 ve TNF- α parametrelerinde istatistiksel bir önemlilik bulunmamıştır. Besin tüketim kaydına göre başlangıç ve 3 ay sonundaki enerji alımları, besin öğeleri, posa ve kolesterol alımları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Probiyotik alan grupta AST, ALT ve GGT düzeyleri istatistiksel olarak önemli derecede azalırken, plasebo grubunda değişiklik olmamıştır. Probiyotiğin karaciğer enzimleri üzerinde olumlu bir etkisi olduğu belirtilirken, hastalığın patogenezinde rol oynadığı belirtilen TNF- α ve IL-6'nın değişmediği gösterilmiştir.

Plaza-Diaz ve ark.'nın (194) Zucker sıçanlarda probiyotiklerin hepatosteatoza etkisini araştıran bir çalışmada, *Lactobasillus rhamnasus* CNCM I-4036, *Bifidocacterium Breve* CNCM I-4035 ve *Lactobasillus paracasei* CNCM I-4034 kullanılmıştır. Zucker ratların, *fa* alleli genetik olarak leptin reseptöründe mutasyonuna uğramıştır ve homozigottur. Kontrol grubu olarak heterozigot *fa* (zayıf) sıçanlar kullanılmaktadır (180). Zucker-Lepr^{*fa*}□^{*fa*} sıçanlara *Lactobasillus paracasei* CNCM I-4030, *Bifidocacterium breve* CNCM I-4035 ve *Lactobasillus rhamnasus* CNCM I-4036 suşlarından biri veya *Lactobasillus paracasei* CNCM I-4030 ve *Bifidocacterium breve* CNCM I-4035 karışım olarak 10¹⁰ cfu/30 gün süreyle veya plasebo verilmiştir. Zucker-lean^{*+fa*} grubuna da plasebo verilmiştir. Çalışmanın sonunda, *Lactobasillus* suşlarını alan bütün obez Zucker-lepr^{*fa*}□^{*fa*} grubunda ve Zucker-lean^{*+fa*} gruplarında LPS konsantrasyonları benzer bulunmuş, serum TNF- α , düzeyleri Zucker-lepr^{*fa*}□^{*fa*} *Bifidocacterium bereve*, *Lactobasillus rhamnasus* veya

karışım alan gruplarda azalırken, IL-6 düzeyi *Lactobasillus paracasei* alan Zucker-lepr^{fa}□^{fa} grubunda azalmıştır. AST ve ALT düzeyleri, her 2 grup sıçanda farklılık gösterirken, plasebo alan Zucker-lepr^{fa}□^{fa} grubunda önemli derecede artış göstermiştir. Ancak *Lactobasillus* suşları alan grupların hiçbirinde biyokimyasal belirteçler açısından (HOMA-IR, AST, ALT, kolesterol, non esterifiye yağ asiti, insülin) önemli bir farklılık bulunmamıştır. *Lactobasillus* suşları alan Zucker-lepr^{fa}□^{fa} gruplarında, karaciğer TG içeriği üzerinden yapılan değerlendirmeyle steatozun Zucker-lepr^{fa}□^{fa} plasebo grubuna önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (194).

Probiyotiklerin NAFLD'daki koruyucu etkisini, bakteriyel translokasyonu ve patojenlerin mukozal yüzeye invazyonunu engelleyerek, antimikrobiyal peptitler üreterek, inflamasyonu azaltarak kronik karaciğer hasarını engellediği belirtilmektedir (130, 133, 210). Ayrıca birçok çalışmada probiyotiklerin farklı suşları kullanırken, tek suş kullanan çalışmalar çok azdır (188, 193-195). Bu çalışmada kullanılan *Lactobasillus rhamnasus* GG'nin, yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta hepatosteatoz oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Ancak klinik olarak biyokimyasal bulgulara bu durumun yansımadağı görülmektedir.

Sıçanların histopatolik değerlendirmeye göre karaciğer ağırlıkları Tablo 4.8 ve Grafik 4.7'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre steatoz gelişmeyen kontrol grubu ile yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta karaciğer ağırlıkları birbirine çok yakın bulunmuştur. Yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta, steatoz gelişmeyen sıçanların toplam karaciğer ağırlığı 9.47 g bulunurken, balonlaşma görülen 1 hayvanın karaciğer ağırlığı 11.30 g, kontrol grubunda 11.24 g bulunmuştur. Probiyotik 7 hayvanda olumlu sonuç göstermiştir. Ancak balonlaşma gelişen hayvanda karaciğer ağırlığı artmıştır. Kontrol ve yüksek yağlı yem+plasebo alan grupta 6. haftada 1'er hayvana ötenazi yapılması nedeniyle, bu hayvanların karaciğer ağırlıkları tartılmadığından, bu gruplarda istatistiksel hesaplama 7 hayvan üzerinden yapılmıştır.

Histopatolojik değerlendirmeye göre perirenal, gonodal ve mezenterik ağırlıklara yapıldığı Tablo 4.9'de ve Grafik 4.8'da hepatosteatoz gelişen kontrol ve yüksek yağlı yem+probiyotik alan grup karşılaştırıldığında, LGG'nin koruyucu etkisi görülmektedir. Mezenterik ağırlık hepatosteatoz gelişen yüksek yağlı yem+plasebo

alan grupta 2.88 g, yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta balonlaşma görülen 1 hayvanda 4.2 g bulunmuştur. Ancak hepatosteatoz görülmeyen kontrol grubunda perirenal, gonodal ve mezenterik ağırlığın artması, bu grubun daha fazla yem tüketimi ve ağırlık kazanımına dayandırılmakta, bu artışa rağmen hepatosteatoz gelişmemesi diyetin içeriğiyle veya farklı bir mekanizmayla ilişkilendirilmektedir. Kontrol ve yüksek yağlı yem+plasebo alan grupta 6. haftada 1'er hayvanın ötenazi yapıldığında bu hayvanların perirenal, gonodal ve mezenterik yağ dokuları tartılmadığından dolayı bu gruplarda istatistiksel hesaplama 7 denek üzerinden yapılmıştır.

Bu çalışmada 16 haftalık süre içerisinde LGG uygulaması sırasında, yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta 3 hayvanda göğüs bölgesinde tüy dökümü gözlenmiş, bunun dışında herhangi bir ters etki gözlenmemiştir. Yüksek yağlı diyet+plasebo alan grupta çalışmanın 10. haftasında bir hayvanda bir abse tespit edilmiştir. Veteriner hekim tarafından eksizyon yapılarak sütür atılmış ve antibiyotikli krem uygulaması sonrası diğer sıçana zarar vermemesi için bu sıçan 5 gün süresince tekli kafesde barındırılmıştır. Ancak sıçanlar tekrar bir araya getirildiğinde, aralarında uyum problemi yaşandığından dolayı çalışmanın sonuna kadar 2 hayvan tekli kafeslerde barındırılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında hayvan deneylerinde uygulanan modellerin, insan NAFLD modeline tanımlanmasında güçlükler bulunmaktadır. İnsan modellerine göre çalışmaların bazılarında morfolojik uyum bazılarında ise patofizyolojik farklılıklar bulunmaktadır. Klinik pratikte probiyotik kullanımının artması ancak sonuçların heterojen olması bu konuda net bir karara varılmasını zorlaştırmaktadır. Çalışmalarda kullanılan hayvan cinsi ve türü, probiyotiklerin türü ve dozu, çalışmanın süresi sonuçların heterojenliğine neden olmaktadır.

Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda, probiyotik kullanımının karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemiye etkisini araştıran bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar belirlenmiştir.

1. Her 3 grupta başlangıca göre ağırlık kazanımı anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$). En fazla ağırlık kazanımının kontrol grubunda olduğu saptanmıştır ($F=16.62$, $p=0.000$).
2. Yüksek yağlı yem+probiyotik ve yüksek yağlı yem+plasebo alan gruplarda haftalar arasındaki yem tüketim miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $F=41.721$, $p<0.05$; $F=4.5$, $p<0.05$). Kontrol grubunda ise haftalar arası tüketilen yem miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($F=0.886$, $p>0.05$).
3. Gruplar arası AST düzey farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$). En yüksek AST düzeyinin, kontrol ve yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupla karşılaştırıldığında yüksek yağlı yem+plasebo alan grupta (147.44 ± 43.01 U/L) olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasında ALT düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.001$). Kontrol grubunun, yüksek yağlı yem+plasebo alan ve yüksek yağlı yem+probiyotik alan gruba göre en düşük ALT düzeyine sahip olduğu saptanmıştır. Gruplar arasında kolesterol düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p=0.225$).

4. Gruplar arasında, TNF- α , CRP ve LPS düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.771$, $p=0.313$ ve $p=0.446$).

5. Lipopolisakkarit düzeyi ile inflamatuvar belirteçler ve biyokimyasal bulgular değerlendirildiğinde, kontrol grubunda, TNF- α ve LPS düzeyi arasında negatif bir ilişki saptanmış; LPS düzeyi arttıkça TNF- α düzeyi azalmıştır ($r=-0.835$ ve $p=0.012$).

6. Sıçanların karaciğer ağırlık ortalamaları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. En fazla karaciğer ağırlığı kontrol grubunda saptanmıştır (11.24 ± 1.35 g, $p=0.029$). Yüksek yağlı yem+plasebo alan grup ile kontrol grubunda, karaciğer ağırlıkları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p=0.031$). Sıçanların perirenal yağ miktarı arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p=0.012$). Gruplar arasında karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0.05$), bu oran en fazla, yüksek yağlı yem+plasebo alan grupta bulunmuştur.

En fazla perirenal ağırlık kontrol grubunda (9.73 ± 3.90 g) saptanmış ve yüksek yağlı yem+plasebo alan grupla perirenal ağırlık açısından farklılık önemli bulunmuştur ($p=0.009$). Gruplar arasında gonadal yağ miktarı açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p=0.058$). Mezenterik yağ miktarı açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p=0.010$). En fazla mezenterik yağ miktarı yüksek yağlı yem+probiyotik ve yüksek yağlı yem+plasebo alan grupla karşılaştırıldığında kontrol grubunda (5.56 ± 2.36 g) bulunmuştur (sırasıyla $p=0.012$ ve $p=0.043$).

7. Vücut ve organ ağırlıkları ile plazma LPS düzeyi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde sadece kontrol grubunda karaciğer ağırlığı ile LPS düzeyi arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir ($r=0.793$, $p=0.033$).

8. Gruplar arasında histopatolojik incelemede hepatosteatoz oluşma düzeyi önemli bulunmuştur ($p=0.021$). En fazla hepatosteatoz oranı %62,5 ile yüksek yağlı yem+plasebo alan gruptadır.

9. Histopatolojik değerlendirmeye göre en fazla karaciğer ağırlığı hepatosteatoz oluşan tek hayvanın karaciğer ağırlığı 11.30 g ile yüksek yağlı yem+probiyotik alan grupta bulunmuştur. En düşük karaciğer ağırlığı yüksek

yağlı yem+plasebo alan grupta bulunmuştur. Hepatosteatoz oluşmayan kontrol grubunda karaciğer ağırlığı toplam 11.24 g olarak bulunmuştur. Perirenal, gonodal ve mezenterik ağırlık en fazla hepatosteatoz oluşmayan kontrol grubunda (n=7 ve sırasıyla 9.73±3.90 g, 7.17±2.40, 5.56±2.36) bulunmuştur.

6.2. Öneriler

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, patogenezi tam olarak anlaşılamayan, kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinin anlaşılması ve insan patogenezi uyarlanabilmesi için hayvan çalışmaları önem taşımaktadır. Ancak bu modellemelerde kullanılan hayvan türü, diyetin içeriği ve çalışma sürelerinin farklı olması, sonuçların da farklı çıkmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla modellemelerin, hastalığın klinik seyrini ve patolojisini birlikte yansıtması ilerde oluşacak tedavi protokolleri için önem taşımaktadır.

Probiyotik ajanlar, NAFLD'da umut verici ajanlar olarak kabul edilmektedir. Probiyotik olarak kullanılan türlerin ve suşların sayıca fazlalığı ve etki alanlarının farklı olması sonuçların farklı çıkmasına etki eden diğer faktörlerdendir. Kullanılan suşların yanı sıra verilen doz, süre ve uygulama yöntemi, uzun dönem etkileri bilinmeyen probiyotiklerin bu konuda aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Literatürde probiyotiklerin metabolik endotoksemiye etkileri ile ilgili çalışmalar mevcut iken, steatoza etkisini araştıran çalışma azdır. Lactobasillus rhamnasus GG ile yapılan bu çalışmada, karaciğer histopatolojisi hastalığın patogenezi yansıtırken, metabolik yansıma tam anlamıyla gerçekleşmemiştir. Gelecekte Lactobasillus rhamnasusun alt türleriyle yapılacak çalışmalar, yüksek yağlı diyetin gerek metabolik gerekse patolojik etkilerini aydınlatmaya yardımcı olacaktır. Bununla birlikte probiyotiklerin non alkolik yağlı karaciğer hastalığında rutin kullanımını destekleyen çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Than NN, Newsome NP. A concise review of non -alcoholic fatty liver. *Atherosclerosis* 239:192-202, 2015.
2. Doulberis M, Kotronis G, Gialamprinou D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. *J Metabol* 71:182-197, 2017.
3. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Medicine* 15:45, 2017. *BMC Medicine* 15:45, 2017.
4. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol* 8; 9(16): 715-732, 2017.
5. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism Clinical and Experimental* 1038-1048,2016.
6. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: The diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 33: 525–540, 2011.
7. Zaigham A, Anania F, Ferenci P, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. WGO Guideline, 2012. Erişim: (www.worldgastroenterology.org/). Erişim Tarihi:30/1/2018
8. Rinella EM. Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review. *JAMA* 313 (22):2263-2273, 2015.
9. AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. The Italian Association for the Study of the Liver (AISF). *Dig and Liver Dis.* 49:471–483, 2017.
10. Nassir F, Rector S, Hammoud MG, et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & Hepatology* 11(3), 2015.
11. Abenavoli L, Scarpellini E, Rouabhia S, et al. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: Which and when. *Annals of Hepatology* 12 (3) 357-363, 2013.
12. Iacono A, Raso MG, Canani BR, et al. Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: Focus on molecular and biochemical mechanism. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22: 699-711, 2011.
13. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease-A starter's guide. *Nutrients* 9, 1072, 2017.
14. Lau CKJ, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol* 241: 36-44, 2017
15. Haas T J, Francque S, Staels B. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease, *Annual Review of Physiology*, 78:181-205, 2018.
16. Balaban HY. Alkol-dışı yağlı karaciğer hastalığının g¼ncel tedavisinde metformin ve UDKA'nın temel veya yardımcı ajan olarak yeri var mıdır? Ufuktaki yeni tedavi ajanları nelerdir? *G¼ncel Gastroenteroloji* 21(4), 2017.
17. Baysal B, Sonsuz A. Karaciğer yağlanması ve non alkolik steatohepatit. *G¼ncel Gastroenteroloji* 15(2), 2011.
18. Arab PJ, Arrese M, Trauner M. Recent insight into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Pathology: Mechansim of Disease*13:321-350, 2018.

19. Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. Handbook of liver disease. (Friedman SL, Keeffe BE, ed). Third edition. Chapter 7: 106-114, 2012.
20. Chalasani N, Younossi Z, Lavine EJ, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practise guidance from the American association for the study of liver diseases. *Hepatology* 67(1):328-358,2018.
21. Aqel B, DiBaise KJ. Role of the gut microbiome in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition in Clinical Practise* 30 (6):780-786, 2015.
22. Cheng YH, Wang HY, Chang HW, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Prevalance, influence on age and sex, and relationship with metabolic syndrome and insulin. *International Journal of Gerontology* 7:194-198, 2013.
23. Piano de A, Estedella D, Oyama ML, et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a manifestation of the metabolic syndrome: New perspectives on the nutritional therapy. *Endocrinol Metab Synd* 3(3), 2014.
24. Ferolla MS, Silva CL, Ferrari MLA, et al. Dietary approach in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 28:7(24):2522-2534, 2015.
25. Bashlarden S, Shapiro H, Shibolet O, et al. Non-alcoholic fatty liver and gut microbiota. *Moleculer Metabolism* 5:782-794, 2016.
26. Younossi MZ, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine* 91(6):319-327, 2012.
27. Birkenfeld LA, Shulman IG. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology* 59(2):713-723, 2014.
28. Younossi MZ, Koenig BA, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64(1):73-84,2015.
29. Marmara Üniveristesi Gastroenteroloji Enstitüsü Yağlı Karaciğer Araştırma Birimi. Erişim: (<http://gastro.marmara.edu.tr/bolumler/bolumlerimiz/yagli-karaciger-arastirma-birimi/>). Erişim Tarihi: 28/9/2011.
30. Okur G, Karacaer Z. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in healthy young persons. *North Clin Istanbul* 3(2):111-117, 2016
31. Erkan G, Sayın I, Polat FB, et al. The relationship between insülin resistance, metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease in non-obese non-diabetic Turkish individuals: A pilot study. *Turk J Gastroenterol* 25(1):63-68,2014.
32. Abd El-Kader MS, Salah El-Den Ashmawy ME. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol* 7(6):846-858,2015.
33. Streba MAL, Vere CC, Rogoveanu I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: An open question. *World J Hepatol* 21(14):4103-4110, 2015.
34. Lonardo A, Bellentani S, Argo KC, et al. The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) study group. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk group. *Dig and Liver Dis.* 47:997-1006, 2015.
35. Lynch C, Chan CS, Drake AJ. Early life programming and the risk of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Developmental Origins Of Health and Disease* 8(3):263-272.
36. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in *PNPLA3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics* 40(12): 1461-1465, 2008.

37. Schuppan D, Schattenberg MJ. Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28 (1): 68–76, 2013.
38. Paschos P, Paletas K. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 13, 1: 9-19, 2009.
39. Duseja A, Singhy PS, Saraswat AV, et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome—Position Paper of the Indian National Association for the Study of the Liver, Endocrine Society of India, Indian College of Cardiology and Indian Society of Gastroenterology. *J Clin Exp Hepatol* 5:51–68, 2015.
40. Verrijken A, Francque S, Gaal VL. The role of visceral adipose tissue in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *European Endocrinology* 7(2):96–103, 2011.
41. Weiß J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease. *Dtsch Arztebl Int* 111: 447–52, 2014.
42. Chang Y, Jung H-S, Cho J, et al. Metabolically healthy obesity and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 111:1133–1140, 2016.
43. Hazlehurst MJ, Woods C, Marjot T, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism Clinical and Experimental* 65:1096-1108, 2016.
44. Kwok R, Choi CK, Wong LHG, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut* 65:1359–1368, 2016.
45. Sporea I, Mare R, Lupuşoru R, et al. Liver stiffness evaluation by transient elastography in type 2 diabetes mellitus patients with ultrasound-proven steatosis. *J Gastrointestin Liver Dis* 25 (2): 167-174, 2016.
46. Nursalim A, Hasan A. Update 2013: The role of probiotic in non-alcoholic fatty liver disease, an evidence-based approach. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy* 14(2), 2013.
47. Alam S, Mustafa G, Alam M, et al. Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 7(2): 211-217, 2016.
48. Kirpich AI, Marsanoa SL, McClain JC. Gut–liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry* 48:923–930, 2015.
49. Nassir F, Rector SR, Hammoud MG, et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & Hepatology* 11(3): 167-176, 2015.
50. Matsuzaka T, Shimano H. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *J Diabetes Invest* 2(3):170-175, 2011.
51. Saka M, Köşeler E, Metin S. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları ve Beslenme Tedavisi. *Hastalıklarda Beslenme Tedavisi (Alphan TE)*. 1. Baskı, Ankara, Hatipoğlu Basım ve Yayın San Tic Ltd Şti, 541-638, 2013.
52. Zámbo V, Simon-Szabó L, Szelényi P, et al. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol* 5(10): 550-557, 2013.
53. Tendler AD. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *UpToDate (elektronik dergi)* 2018. Erişim: <https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-nonalcoholic-fatty-liver-disease>
54. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. *Nutrients* 7: 4995-5019, 2015.

55. Sanders WBF, Griffin LJ. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev.* 91:452–468, 2016.
56. Lambert EJ, Ramos–Roman AM, Browning DJ, et al. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 146:726–735, 2014.
57. Donnelly LK, Smith IC, Schwarzenberg JS, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115:1343–1351, 2005.
58. Eguchi Y, Eguchi T, Mizuta T, et al. Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 41:462–469, 2006.
59. Sherriff LJ, O’Sullivan AT, Properzi C, et al. Choline, its potential role in nonalcoholic fatty liver disease, and the case for human and bacterial genes. *Adv Nutr* 7:5–13, 2016.
60. Puri P, Baillie AR, Wiest MM. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46 (4):1081–1090, 2007.
61. Mota M, Banini AB, Cazanave CS, et al. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 65(8): 1049–1061, 2016.
62. Pagadala M, Kasumov T, McCullough JA, et al. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab.* 23(8): 365–37, 2012.
63. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun AY. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 20(6): 1010–1018, 2008.
64. Ichi I, Nakahara K, Fujii K, et al. Increased of ceramide in the liver and plasma after carbontetrachloride intoxication in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 53:53–66, 2007.
65. Lightle S, Tosheva R, Lee A, et al. Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice: role of serine–palmitoyl transferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419:120–128, 2003.
66. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 52(2): 774–778, 2010.
67. Nolan JC, Claire ZL. Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturated protect against it. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:830–840, 2009.
68. Ricchi M, Odoardi RM, Carulli L, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:830–840, 2009.
69. Sanyal JA, Campbell–Sargent C, Misshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183–1192, 2001.
70. Petta S, Gastaldelli A, Rebelos E. Pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 17 (12), 2016.
71. Tan X, Sun X, Li Q, et al. Leptin deficiency contributes to the pathogenesis of alcoholic fatty liver disease in mice. *Am J Pathol* 181:1279–1286, 2012.
72. Polyzos AS, Aronis NA, Kountouras J, et al. Circulating leptin in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 59:30–43, 2016.

73. Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: Dynamics and metabolic integration (Jeon WK, ed). *International Review of Cell and Molecular Biology* 301:215-290, 2013.
74. Leclercq AL, Farrell CG, Field J, et al. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* 105:1067–1075, 2000.
75. Chtioui H, Semela D, Ledermann M, et al. Expression and activity of the cytochrome P4502E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Liver International* 27(6):764-771 2007.
76. Koyama Y, Brenner AD. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest.* 127(1):55–64, 2017.
77. Harmon CR; Tiniakos GD, Argo KC. Inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Medscape (elektronik dergi)*, 2018. Erişim: (<https://www.medscape.com/viewarticle/741172>).
78. Seo YY, Cho KY, Bae CJ, et al. Tumor necrosis factor- α as a predictor for the development of nonalcoholic fatty liver disease: A 4-year follow-up study. *Endocrinol Metab* 28:41-45, 2013.
79. So A, Ives A, Jooste ABL, et al. Targeting inflammasomes in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9: 391–399, 2013.
80. Mona Botros M, Sikaris AK. The De Ritis Ratio: The test of time. *Clin Biochem Rev* 34, 2013.
81. Sattar N, Forrest E, Preiss D. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ* 349,2014.
82. Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician* 73:1961-1969, 2006.
83. Browning DJ, Szczepaniak SL, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 40:1387–1395, 2004.
84. Ioannou NG, Boyko JE, Lee PS. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999–2002. *Am J Gastroenterol* 101:76–82, 2006.
85. Hadizadeh F, Faghihimani E, Adibi P. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World J Gastrointest Pathophysiol* 8(2): 11-26, 2017.
86. Yeniova ÖY, Küçükazman M, Ata N, et al. High-sensitivity C-reactive protein is a strong predictor of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato-Gastroenterology* 61:420-423, 2014.
87. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO) Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 64:1388-1402, 2016. Erişim: (<http://www.easl.eu/medias/cpg>) Erişim Tarihi:28/2/2018.
88. Hjelkrem M, Stauch C, Shaw J, et al. Validation of the non-alcoholic fatty liver disease activity score. *Aliment Pharmacol Ther* 34: 214–218, 2011.
89. Oseini MA, Sanyal JA. Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver International* 37:97-103, 2017.
90. Fan G-J, Cao X-H. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28: 81–87, 2013.

91. Perumpail JB, Cholankeril R, Yoo RE, et al. An overview of dietary interventions and strategies to optimize the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diseases* 5(4) 23, 2017.
92. Musso G, Cassader M, Rosina F, et al. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia* 55:885–904, 2012.
93. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 149:367–378, 2015.
94. Promrat K, Kleiner ED, Niemeier MH, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatology* 51(1): 121–129, 2010.
95. McCarthy ME, Rinella EM. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic fatty liver disease. *J Acad Nutr Diet.* 112:401-409, 2012.
96. Asrih M, Jornayvaz RF. Diet and nonalcoholic fatty liver disease: The good and the bad. *Clinical Nutrition* 33:186-190, 2014.
97. Tsai H-J, Ferrell DL, Tan V, et al. Aggressive non-alcoholic steatohepatitis following rapid weight loss and/or malnutrition. *Modern Pathology* 30: 834–842, 2017.
98. Adinolfi EL. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol* 23(36):6571-6592, 2017.
99. Oh S, Shida T, Yamagishi K, et al. Moderate to vigorous physical activity volume is an important factor for managing nonalcoholic fatty liver disease: a retrospective study *hepatology* 61:1205-1215, 2015.
100. York WL, Puthalapattu S, Wu YG. Nonalcoholic fatty liver disease and low carbohydrate diets. *Annual Review of Nutrition* 29:365-379, 2009.
101. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, et al. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: An insight into the link between plasma insulin and triglyceride concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (9): 3085-3088, 2000.
102. Meng G, Zhang B, Fei Yu F, et al. Soft drinks consumption is associated with nonalcoholic fatty liver disease independent of metabolic syndrome in Chinese population. *Eur J Nutr* 57(6):2113-212, 2018.
103. Ter Horst WK, Serlie JM. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 9(9), 2017.
104. Le A-K, Ith M, Kreis R. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 89:1760–1765, 2009.
105. Ma J, Fox SC, Jacques FP, et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *J Hepatol.* 63(2): 462–469, 2015.
106. Kanerva N, Sandboge S, Kaartinen EN, et al. Higher fructose intake is inversely associated with risk of nonalcoholic fatty liver disease in older Finnish adults. *Am J Clin Nutr* 100:1133–1141, 2014.
107. Türker FP. Glisemik indeks, glisemik yük ve obezite. *Türkiye Klinikleri Beslenme ve Diyetetik Özel Sayı* 1:35-39, 2016.

108. Freidoonya L, Kong DI. Practical approaches to the nutritional management of nonalcoholic fatty liver disease. *Integr Med Res* 3:192–197, 2014.
109. Fedirko V, Lukanova A, Bamia C, et al. Glycemic index, glycemic load, dietary carbohydrate, and dietary fiber intake and risk of liver and biliary tract cancers in Western Europeans. *Annals of Oncology* 24:543–553, 2013.
110. Yamamoto M, Iwasa M, Iwata K, et al. Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22:498–503, 2007.
111. Estedella D. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids, Mediators of Inflammation (elektronik dergi). 2013, 2012. Erişim: <https://www.hindavi.com/journals/mi/2013/137579> .
112. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, et al. Long-term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A population-based study. *Journal of Hepatology* 47: 711–717, 2007.
113. Musso G, Gambino R, Michieli DF, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37:909-916, 2003.
114. Assy N, Nassar F, Nasser G, et al. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 15(15): 1809-1815, 2009.
115. Hussein O, Grosovski M, Lasri E, et al. Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 13(3): 361-368, 2007.
116. Parker MH, Johnson JA, Burdon AC, et al. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology* 56: 944–951, 2012.
117. Caraballoa GCS, Comhaira MT, Houtend MS, et al. High-protein diets prevent steatosis and induce hepatic accumulation of monomethyl branched-chain fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25: 1263–1274, 2014.
118. Pezeshki A, Safi S, Feizi A, et al. The effect of green tea extract supplementation on liver enzymes in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Prev Med*. 2016; 7: 28, 2016.
119. Wijarnpreecha K, Thongprayoona C, Ungprasertb P. Coffee consumption and risk of nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 29:8–12, 2017.
120. Rahimlou M, Yari Z, Hekmatdoost A, et al. Ginger supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Hepat Mon*. 16(1), 2016.
121. Anderson JW, Baird P, David RH Jr, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev*. 67(4):188-205, 2009.
122. Zolfaghari H, Askari G, Sotoudeh G. Intake of nutrients, fiber, and sugar in patients with nonalcoholic fatty liver disease in comparison to healthy individuals. *Int J Prev Med* 7:98, 2016.
123. Mizock AB. Probiotics. *Disease-a-Month* 61:259–290, 2015.
124. Khalighi A, Reza Behdani R, Kouhestani S. Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health* (Rao V, ed), 19-39, 2016.
125. Singh S, Kolta GN, Lal RU. Omnipresence of probiotics in diversified clinical practices. *J Prob Health* 3 (1):1-9, 2014.

126. Patel D, Patel F, Mandal P. Potential molecular mechanism of probiotics in alcoholic fatty liver disease. *Alcohol Drug Depend* 5(4):1-11, 2017.
127. Guarner F, Sanders EM, Eliakim R, et al. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Global Guidelines*, 2017. Erişim: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>. Erişim Tarihi: 17/10/2017
128. Ganguly NK, Bhattacharya SK, Sesikeran B, et al. ICMR-DBT Guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian J Med Res.*134(1): 22–25, 2011.
129. Jain M, Gupta K, Jain P. Significance of probiotics and prebiotics in health and nutrition. *Malaya Journal of Biosciences* 1(3):181–195, 2014.
130. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, et al. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 61:160–174, 2012.
131. Vajro P, Paoletta G, Fasano A. Microbiota and gut-liver axis: a mini-review on their influences on obesity and obesity related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 56(5): 461–468, 2013.
132. Aurelli P, Capursob L, Castellazzi MA, et al. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research* 63: 366–376, 2011.
133. Gogineni KV, Morrow EL, Malesker AM. Probiotics: Mechanisms of action and clinical applications. *J Prob Health* 1:1, 2013
134. Kerry GR, Patra KJ, Gouda S, et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* 26: 927-939, 2018.
135. Doğan M. Probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemdeki etki mekanizması, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi (elektronik dergi)*. 7(1): 20-27, 2012. Erişim: www.teknolojikarastirmalar.com.
136. Oelschlaeger AT. Mechanisms of probiotic actions—A review. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 57–62, 2010.
137. Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. The gut microbiome, probiotics, bile acid axis and human health. *Trends Microbiol.* 22 (6): 306-308, 2014.
138. Johnson-Henry CK, Hagen EK, Gordonpour M, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology* 9(2): 356–367, 2009.
139. Patel R, DuPont LH. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases* 60(S2):108–12, 2015.
140. Ashraf R, Shah PN. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:7, 938-956, 2014.
141. Zhang H, Yeh C, Jin Z. Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. *Synthetic and Systems Biotechnology* 3:113-120, 2018.
142. Açıkgöz E. Quorum quenching. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi (elektronik dergi)* 10(2):27-44, 2012. Erişim: www.mikrobiyoloji.org/pdf/702120203.pdf.
143. Parker AE, Roy T, D’Adamo RC, et al. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition* 45:125-134, 2018.
144. Wieland A, Frank ND, Harnke B. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 42:1051–1063, 2015.

145. Kirpich AI, Parajuli D, MacClain JC. The gut microbiome in NAFLD and ALD. *Clinical Liver Disease* 6(3), 2015.
146. Quigley MME, Stanton C, Murphy FE. The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. *Journal of Hepatology* 58:1020-1027, 2013.
147. Tilg H, Cani DP, Mayer AE. Gut microbiome and liver diseases. *Gut* 65:2035-2044, 2016.
148. Federico A, Dallio M, Godos J, et al. Targeting gut-liver axis for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: translational and clinical evidence. *Trans Res* 167(1):116-124, 2016.
149. Mokhtari Z, Gibson LD, Hekmatdoost A. Nonalcoholic fatty liver disease, the gut microbiome, and diet. *Adv Nutr* 8: 240-252, 2017.
150. Cesaro C, Tiso A, Prete DA, et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease* 43: 431-438, 2011.
151. Bibbo S, Ianiro G, Dore PM, et al. Gut microbiota as a driver of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Mediators of Inflammation*, 2018.
152. Dimidi E, Christodoulides S, Scott M, et al. Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. *Adv Nutr* 8: 484-494, 2017.
153. Li DY, Yang M, Edwards S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: For better or worse, blame the gut microbiota. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 37(6):787-793, 2013.
154. Saltzman TE, Palacios T, Thomsen M, et al. Intestinal microbiome shifts, dysbiosis, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Front Microbiol.* 9: 61, 2018.
155. Llorente C, Schnabl B. The gut microbiota and liver disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1(3): 275-284, 2015.
156. Serre LBC, Ellis LC, Lee J, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: 440-448, 2010.
157. Wang YX, Zheng DR, Sun QX, et al. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 16(4):375-381, 2017.
158. Boursier J, Mueller O, Barret M. The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 63(3): 764-775, 2016.
159. Wigg JA, Roberts-Thomson CI, Dymock BR. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 48:206-211, 2001.
160. Cani DP, Everard A. Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. *Mol. Nutr. Food. Res.* 60:58-66, 2016.
161. Festi D, Schiumerini R, Eusebi HL, et al. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 20(43): 16079-16094, 2014.
162. Huang H, Liu T, Rose LJ. Sensitivity of mice to lipopolysaccharide is increased by a high saturated fat and cholesterol diet. *Journal of Inflammation* 4:22, 2007.

163. Fukunishi S, Sujishi T, Takeshita A, et al. Lipopolysaccharides accelerate hepatic steatosis in the development of nonalcoholic fatty liver disease in Zucker rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 54 (1): 39-44, 2014.
164. Tripathi A, Dedeliu J, Brenner AD, The gut-liver axis and intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 15(7):397-41, 2018.
165. Sayin IS, Wahlström A, Felin J. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metabolism* 17, 225–235, 2013.
166. Brandi G, Lorenzo DS, Candela M. Microbiota, NASH, HCC and the potential role of probiotics. *Carcinogenesis* 38(3), 231–240, 2017.
167. Chalasani N, Younossi Z, Lavine EJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55(6):2005-2023, 2012.
168. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): assessment and management. NICE guideline. Erişim: (<https://www.nice.org.uk/guidance/ng49>). Erişim Tarihi: 28/9/2018.
169. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının tanısı ve yönetimi. Erişim: (http://www.tgd.org.tr/pdf/Non-AlkolikYagli_KaracigerHastaliginin.pdf). Erişim Tarihi: 28/9/2018.
170. Gratz WS, Mykkanen H, El-Nezami SH. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol* 16(4): 403-410, 2010.
171. Barlow S, Chesson A, Collins DJ, et al. Introduction of a qualified presumption of safety (qps) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *The EFSA Journal* 587, 1-16, 2007. Erişim: (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.58>). Erişim Tarihi: 09/7/2018
- Barlow S, Chesson A, Collins DJ, et al. Introduction of a qualified presumption of safety (qps) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *The EFSA Journal* 587, 1-16, 2007. Erişim: (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.58>). Erişim Tarihi: 09/7/2018.
172. Naidu BSK, Adam KJ, Govender P. The use of probiotics and safety concerns: A review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(41):6871-6877, 2012.
173. De Simone C, The unregulated probiotic market. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018.
174. Risks and Benefits of Probiotics. Erişim: (<https://www.webmd.com/digestive-disorders/probiotics-risks-benefits#1>). Erişim Tarihi: 09/7/2018.
175. Ulusal Kompozisyon Gıda Veri Tabanı. www.turkcomp.gov.tr. Erişim Tarihi: 4/7/2018.
176. Yan F, Polk BD. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An updated strategy to use microbial products to promote health. *Funct Food Rev* 4(2):77-84, 2012.
177. Kim W-S, Park Y-K, Kim B, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431 258–263, 2013.
178. Ma Y-Y, Li L, Yu C-H. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 19(40): 6911-6918, 2013.

- 179.Larter ZC, Yeh MM. Animal models of NASH: Getting both pathology and metabolic context right. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23:1635–1648, 2008.
- 180.Sheila CLS, Non alcoholic steatohepatitis: A search for factual animal models, *Biomed Research International (elektronik dergi)* 2015, 2014. Erişim: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/574832>.
- 181.Lieber SC, Leo AM, Mak MK, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79:502–509, 2004.
- 182.Liang Y, Liang S, Zhang Y, et al. Oral administration of compound probiotics ameliorates HFD-induced gut microbe dysbiosis and chronic metabolic inflammation via the G protein-coupled receptor 43 in non-alcoholic fatty liver disease rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018.
- 183.Marques C, Meireles M, Noberto S, et al. High-fat diet -induced obesity rat model: A comparison between Wistar and Sprague-Dawley rat. *Adipocyte* 5(1):11-21, 2016.
- 184.Anora T, Singh S, Sharma KR. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* 29:591-596, 2013.
- 185.Ricci M. The importance of a proper control diet. Erişim: (<https://www.researchdiets.com>). Erişim Tarihi: 28/9/2018.
- 186.Warden HC, Fisler SJ. Comparisons of diets used in animal models of high fat feeding. *Cell Metab* 7(4):277, 2008.
- 187.Ricci RW, Ulman AE. Laboratory animal diets: A critical part of your in vivo research. Erişim: (<https://www.laboratoryequipment.com/article/2008/04/laboratory-animal-diets-critical-part-your-vivo-research>). Erişim Tarihi:28/9/2018.
- 188.Xu R, Wan Y-P, Fang Q, et al. Supplementation with probiotics modifies gut flora and attenuates liver fat accumulation in rat nonalcoholic fatty liver disease model. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50 (1): 72–77, 2012.
- 189.Leamy KA, Egnatchik AR, Young DJ. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* 52(1), 2013.
- 190.Hernández -J E, Tapia-Chávez CCN, Uribe M, et al. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Journal* 15: 72, 2016.
- 191.Baysal A. Lipidler, Beslenme. 12'inci baskı. Ankara, Hatipgolu Yayınları, 47-53, 2009.
- 192.Kendig DM, Lin SC, Beilharz EJ, et al. Maltodextrin can produce similar metabolic and cognitive effects to those of sucrose in the rat. *Appetite* 77:1-12, 2014.
- 193.Esposito E, Iacono A, Bianco G, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J. Nutr.* 139: 905–911, 2009.
- 194.Diaz-PJ, Llorente-GC, Molina-AF, et al. Effects of lactobasiilus paracasei CNCM I-4034, bifidobacterium breve CNCM I-4035 and laktobasillu rhamnasus CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats. *Plos One* 9 (5), 2014.
- 195.Al-muzafar MH, Kamal Adel Amin AK. Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17:43, 2017.

196. Tayfur M, Köseoğlu AZ, Tayfur ÇA. Enerji yoğunluğu ve vücut ağırlığının denetimi, Beslenme ve Diyetetik Güncel Konular-3, (Tayfur M, Çiçek B, ed). 1'inci Baskı. Ankara, Hatipoğlu Yayınevi, 15-33, 2016.
197. Umbreen A, Redgrave GT, Oates SP. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24:1463–1471, 2009.
198. Xu J-Z, Fan G-J, Ding D-X, et al. Characterization of high-fat diet, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 55:931-940, 2010.
199. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 15: 7352-7379, 2014.
200. Solga FS, Diehl MA. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen–liver interactions and possible role for probiotics. *Journal of Hepatology* 38: 681–687, 2003.
201. Foroughi M, Maghsoudi Z, Khayyatzadeh S, et al. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver. *Adv Biomed Res* 5: 28, 2016.
202. Oruc N, Ozutemiz O, Yuce G, et al. Serum procalcitonin and CRP levels in non-alcoholic fatty liver disease: a case control study. *BMC Gastroenterology* 9:16, 2009.
203. Nigam P, Bhatt PS, Misra A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is closely associated with sub-clinical inflammation: A case-control study on asian indians in north India. *Plos One* 8(1),2013.
204. Hoareau L, Bencharif K, Rondeau P, et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNF alpha production in human adipocytes. *Journal of Inflammation* 7:1, 2010.
205. Loosbroock C. LPS-induced tolerance to TNF- α in human pro-monocytic THP-1 cells. *J Clin Cell Immunol* 4:5,2013.
206. Flohe´ S, Fernandez DE, Ackermann M, et al. Endotoxin tolerance in rats: Expression of TNF- α , IL-6, IL-10, VCAM-1 and HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine* 11(10):796-804, 1999.
207. Wu Z, Tan J, Chi Y, et al. Mesenteric adipose tissue contributes to intestinal barrier integrity and protects against nonalcoholic fatty liver disease in mice. *American Journal of Physiology* 35(5):2018.
208. Boutagy EN, MacMillan PR, Frisard IM, et al. Metabolic endotoxemia with obesity: is it real and is it relevant? *Biochimie* 124: 11–20, 2106.
209. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. *Nutrients* 7: 4995-5019, 2015.
210. Eslamparast T, Eghtesad S, Hekmatdoost A, et al. Probiotics and Nonalcoholic Fatty liver Disease. *Middle East J Dig Dis* 5:129-36, 2013.
211. Vajro P, Mandato C, Licenziati RM, et al. Effects of *Lactobasillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *JPGN* 52:740-743, 2011.
212. Aller R, D.A. De Luis DA, Izaola O, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15: 1090-1095, 2011.

**Ek1: Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulunun 14.08.2017 tarihli
17/19 sayılı kararı**



Sayı : 94603339-604.01.02/

Konu : Proje Onayı

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Beslenme ve Diyetetik Bölümünde görev yapmakta olan Doç. Dr. Mendane Saka'nın danışmanlığında Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı öğrencisi Sevan Çetin'in sorumluluğunda yürütülecek olan DA17/21 nolu "Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda, probiyotik kullanımının karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemi üzerine etkisi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 14/08/2017 tarih ve 17/19 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Research on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.






HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
15	17/19	14/08/2017

Sağlık Bilimleri Fakültesi / Beslenme ve Diyetetik Bölümünde görev yapmakta olan Doç. Dr. Mendane Saka tarafından yürütülecek olan DA17/21 nolu "Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda, probiyotik kullanımının karaciğer yağlanması ve metabolik endotoksemi üzerine etkisi" başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.


Prof. Dr. Hakan Özkardes


Prof. Dr. A. Eftal Yücel

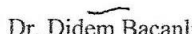

Prof. Dr. Ali Varan

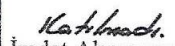

Prof. Dr. Feride Şahin


Prof. Dr. Adnan Fuat Büyüklü


Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos


Öğr. Gör. Dr. Şebnem İlhan


Dr. Didem Bacanlı


İmdat Akmermer