

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI TANILI BİREYLERDE
KONVANSİYONEL İNFLAMASYON VE OKSİDATİF STRES
BELİRTEÇLERİNİN DÜZEYLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Suzan MURATOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN

ANKARA
OCAK 2014

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI TANILI BİREYLERDE
KONVANSİYONEL İNFLAMASYON VE OKSİDATİF STRES
BELİRTEÇLERİNİN DÜZEYLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Suzan MURATOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından
01/2012-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
OCAK 2014

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

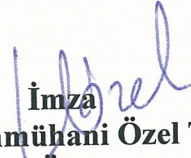
**Biyokimya (Tıp) Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 30 /01/2014


İmza

**Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**


İmza
**Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN
Gazi Üniversitesi**


İmza
**Doç Dr. Ümmühani Özel Türkçü
Muğla Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
İçindekiler.....	ii
Şekiller Listesi.....	iv
Grafikler Listesi.....	v
Tablolar Listesi	vi
Kısatmalar	vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	3
2.1.1. Epidemiyoloji	6
2.1.1.1. Risk Faktörleri.....	6
2.1.1.2 Prevalans.....	8
2.1.2. Patogenez	9
2.1.2.1. İnsülin Direnci	9
2.1.2.2. Obezite	12
2.1.2.3. Hepatik Yağların Kaynakları	13
2.1.2.4. Adipokinler	13
2.1.2.5. Leptin.....	14
2.1.2.6. Resistin	15
2.1.2.7. Ghrelin	15
2.1.2.8. TNF- α	16
2.1.2.9. İnterlökin-6	17
2.1.2.10. Hiyaluronik Asit	18
2.2. Oksidatif Stres	19
2.2.1. Mitokondrial Disfonksiyon	24
2.2.2 Mikrozomlar	26
2.2.3 Peroksizomlar	27
2.2.4. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	28
2.2.5. Protein, DNA Hasarı ve İleri Oksidasyon Protein Ürünü (AOPP)	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi.....	33
3.1.1. Hastaların Çalışmaya Alınmama Kriterleri	34

3.1.2. Hastaların Çalışmaya Alınma Kriterleri	34
3.2. Deneyler	34
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	34
3.2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	35
3.2.3.1. Serum MDA Düzeylerinin Ölçümü	35
3.2.3.2. Serum AOPP Düzeylerinin Ölçümü	37
3.2.3.3. Serum IL-6 Düzeylerinin Ölçümü	39
3.2.3.4 Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçümü	41
3.2.3.5. Serum HA Düzeylerinin Ölçümü	43
3.2.3.6. Serum İnsulin Düzeylerinin Ölçümü	45
3.2.3.7. Kan Şekeri Ölçümü	46
3.2.3.8. İnsülin Direnci Hesaplanması	46
3.3. Veri Analizi	46
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	60
7. ÖZET	63
8. SUMMARY	65
9. KAYNAKLAR	67
10. EKLER	87
11. TEŞEKKÜR	88
12. ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İki vuruş hipotezi	5
Şekil 2. Karaciğerde yağ birikimi	7
Şekil 3. Lipid peroksidasyonu	29

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. MDA standart eğrisi	37
Grafik 2. AOPP standart eğrisi	39
Grafik 3. IL-6 standart eğrisi	41
Grafik 4. TNF- α standart eğrisi	43
Grafik 5. HA standart eğrisi	45
Grafik 6. BMI'nin gruplar arasındaki farkı	49
Grafik 7. HOMA-IR'nin gruplar arasındaki farkı	49
Grafik 8. Serum MDA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı	50
Grafik 9. Serum AOPP düzeylerinin gruplar arasındaki farkı	50
Grafik 10. Serum IL-6 düzeylerinin gruplar arasındaki farkı	51
Grafik 11. Serum TNF- α düzeylerinin gruplar arasındaki farkı	51
Grafik 12. Serum HA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri 20

Tablo 2. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının klinik ve biyokimyasal
değişkenleri 48

KISATMALAR

NAYKH: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH: Nonalkolik steatohepatit
AOPP: Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri
MDA: Malondialdehit
HA: Hiyaluronik asit
IL-6: İnterlökin-6
TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α
ALT: Alanin aminotransferaz
AST: Aspartat aminotransferaz
OGTT: Oral glukoz tolerans testi
PKOS: Polikistik over sendromu
VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein
Glut-4: Glukoz taşıyıcı protein
HDL: Yüksek dansiteli protein
SREBP-1: Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein-1
ROT: Reaktif oksijen türleri
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
SOD: Süperoksid dismutaz
OH $\cdot$: Hidroksil iyonu
NO $\cdot$: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
RNT: Reaktif Nitrojen türleri
TGF- β : Transforming growth faktör β
IL-8: İnterlökin-8
GSH: Redükte glutatyon
PPAR- α : Peroksizom proliferatör aktive reseptör alfa
L $\cdot$: Lipid radikali
LOO $\cdot$: Lipid peroksit radikali
MCP-1: Monosit kemo ilgisi yüksek protein-1

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), karaciğerde kronik hasara yol açan bir hastalıktır. NAYKH, alkol kullanımı olmayan kişilerde görülen ve karaciğerde yağlanma ile devam eden bir patolojidir. NAYKH, basit steatozdan nonalkolik steatohepatite (NASH), ilerlemiş fibrozis ve siroza kadar geniş spektrumlu karaciğer hasarına neden olabilmektedir. Steatoz'da hastalarda karaciğerde yağlanma görülürken, inflamasyon bulunmamaktadır. NASH'da ise karaciğerde yağlanma, hepatositlerde balonlaşma, iltihabi infiltrasyon ve bazı olgularda Mallory cisimcikleri, megamitokondria, fibrozis gibi histopatolojik bulgular vardır. NAYKH'nin klinik önemi, genel popülasyonda sık oluşundan ve siroza ilerleme potansiyelinden kaynaklanmaktadır. NAYKH sıklıkla metabolik sendrom ve değişik derecelerde insülin direnci ile birlikte görülmektedir.

NAYKH'nin patogenezi için önerilen en son model, 'iki-vuruş' hipotezi olarak adlandırılmaktadır. 'İlk vuruş', hepatositlerde trigliserid birikiminden sorumlu olan faktördür. Olay bu noktadan sonra ilerlemezse basit bir yağlanma olarak kalmaktadır. Oksidatif stres, anormal sitokin üretimi, yağ metabolizması bozuklukları ve insülin direnci gibi 'ikinci vuruş'u gerçekleştiren faktörler nekroinflamatuvar aktiviteyi ve fibrozisi harekete geçirmektedir. NAYKH'nin hemen hepsinde insülin direnci vardır ve yapılan çalışmalarda metabolik sendromu olan hastalarda NAYKH gelişme riskinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

ALT seviyesinin yüksekliği; otoimmün hastalıklar, virüs ve ilaçlar çıkarıldığında NAYKH belirticidir. Fakat bazı hastalarda normal ALT seviyesine rağmen histopatolojik olarak bu hastalığın varlığı görülmektedir.

NAYKH'nin ileri seviyelerinde oksidatif stresin arttığı gösterilmiş ve basit steatozdan steatohepatite ilerleyişinde rolü olduğu

gözlenmiştir. Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) ve malondialdehit (MDA), oksidatif stres belirteçleridir. Literatür incelediğinde NAYKH'da AOPP düzeyi çalışılmadığı gözlenmiştir.

Hiyaluronik asit (HA) bir glikozaminoglikandır. HA, sitokinleri ve diğer inflamatuvar mediatörleri regüle etmekte, inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve kemotaksiste rol oynamaktadır. Böylelikle inflamatuvar yanıtın önemli bir düzenleyicisi olan HA, aynı zaman da bir inflamasyon belirteci olarakta kullanılmaktadır. HA'nın, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olanlar ile nonalkolik steatohepatiti olan hastaları ayırmada yararlı olabileceği düşünülmüş ve kronik hepatitlerde HA'nın karaciğer fibrozisini göstermede de önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir.

İnterlökin-6 (IL-6) ve TNF- α inflamasyon belirteçidir. TNF- α 'nın karaciğer yağlanması ile ilerleyici hastalık formlarına dönüşmesinde belirleyici olan ikinci darbeyi oluşturduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda her ikisinin de insülin direncini uyardığı için NAYKH hasta grubunda çalışılması düşünülmüştür.

Bu çalışmada, NAYKH hastaları ALT seviyesinin yüksekliğine göre sınıflandırılmış, bu hastalığın patogenezinde ve ilerlemesinde rolü olan MDA, AOPP, TNF- α , IL-6 ve HA düzeyleri çalışılarak oksidatif stres ve inflamasyon durumunun karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), alkol dışı nedenlerle meydana gelen, karaciğerin en az %5'inin veya %5'inden fazlasının etkilendiği, sık rastlanan bir karaciğer hastalığıdır.¹

NAYKH basit steatoz, nonalkolik steatohepatit (NASH), ilerlemiş fibrozis ve siroza kadar ilerleyebilen evrelere ayrılmaktadır. NASH'da steatoz, balonlaşma, mallory cisimcikleri, lobüler inflamasyon ve portal inflamasyon durumu etkindir. Fibrozda ise ilerlemiş fibrozis durumu mevcuttur. NASH, 1980 yılında Ludwig ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve siroza kadar ilerleyebileceği bildirilmiş² fakat doğal seyrine ilişkin görüşler günümüze kadar tartışmalı olarak devam etmiştir.³

NAYKH hepatitle birlikte veya hepatit olmadan ilaçlar, hepatotoksinler, gastrointestinal cerrahi, bazı metabolik ve genetik hastalıklara sekonder yağlanmadan ayırt edilmelidir. NAYKH teşhisinde yağlanmayla devam edebilen viral, otoimmün, metabolik ve herediter karaciğer hastalıkları ve alkol kullanımının da dışlanması gerekir. NAYKH'nın klinik önemi, genel popülasyondaki yaygınlığından ve siroz ile karaciğer yetersizliği gelişme riskinden kaynaklanmaktadır.⁴⁻⁵

NAYKH ve NASH'da insülin direncinin merkezi rolü olduğu, obezite, insülinin direncinin olduğu çeşitli hastalıklar ve metabolik sendromlu hastalarda NAYKH ve NASH geliştiği bildirilmiştir. Metabolik mekanizmadaki bozukluklar, hiperinsülinemi ve insülin direnci NASH'a yol açmaktadır.^{6,7}

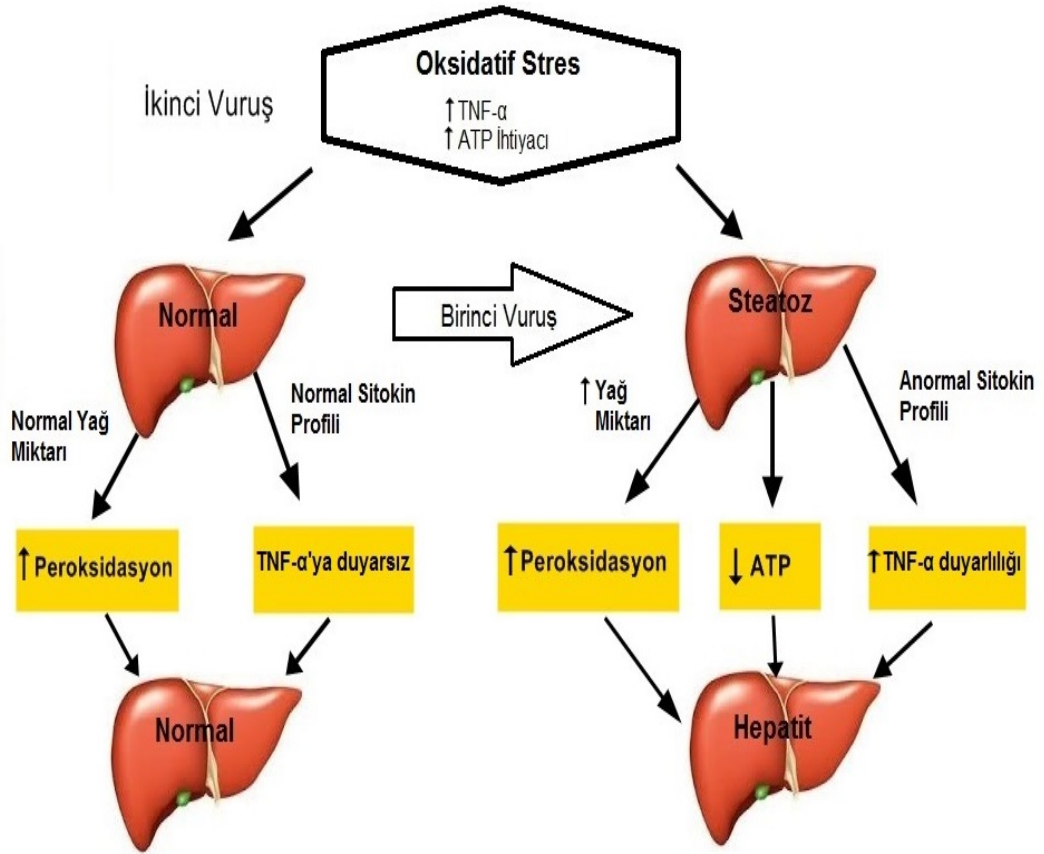
NAYKH her yaş grubunda ve hemen her ırkta görülebilen bir hastalıktır.⁸ NAYKH ile ilgili belirtilen risk faktörlerinin hiçbirini taşımayan NAYKH hastalarına klinikte sıklıkla rastlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada 144 adet biyopsi ile gösterilmiş NASH vakasının % 29 'unda obezite, diyabet veya herhangi bir lipid bozukluğu saptanmamıştır.⁹

NAYKH olan hastalarda en sık rastlanılan laboratuvar bulgusu hafif ya da orta derecede aminotransferaz (ALT, AST) yüksekliğidir. AST/ALT oranı, NAYKH ile alkolik karaciğerin ayırıcı tanısında yardımcı olmaktadır.¹⁰ Birçok NAYKH hastasında AST/ALT oranı birden küçüktür, ancak bu oran karaciğer hastalığı siroza ilerledikçe yükselmekte ve NAYKH'nın sirotik dönemde teşhisi açısından geçerliliğini kaybetmektedir. Hipoalbuminemi, artmış serum bilirubini ve uzamış protrombin zamanı, ilerlemiş hastalığı göstermektedir. NASH tanılı hastaların yarısında serum ferritin düzeyi, %6-11'inde transferin saturasyonu yükselmektedir. Hepatik demir indeksi ve hepatik demir konsantrasyonu normaldir.¹¹

Hepatositlerde en sık trigliserit şeklinde lipid birikmesi NASH gelişiminde en önemli safhadır. Lipid birikmesine (steatoz) yol açan primer metabolik bozukluk tam olarak anlaşılamamış olsa da, insülin direncinin, hepatik lipid metabolizmasında lipidlerin hücre içine alınması, sentez, yıkım veya sekresyon fazlarındaki değişikliklerde rolü olduğu düşünülmektedir.

İnsülin direnci, NAYKH hastalarında en sık rastlanılan durumlardan biridir. Steatotik karaciğer, çeşitli etkenlerin hasar verici etkilerine karşı daha hassastır. Bu durum araştırmacıların basit komplikasyonsuz steatozdan steatohepatit ve ilerlemiş fibroza ilerleyişin sebebi olarak "iki-vuruş" hipotezini ileri sürmelerine yol açmıştır.^{12,13} İlk vuruş temelde insülin direnci olup, hepatositlerde yağ birikmesine yol açar

ve çoğunlukla reaktif oksijen türevlerinden oluşan ikinci vuruşla lipid peroksidasyonu, sitokin üretimi ve Fas ligand indüksiyonu gerçekleşir. Adipositokinler (tümör nekroz faktörü- α [TNF- α], leptin, adiponektin), mitokondriyel disfonksiyon, bakteriyel endotoksin ve vasküler bozukluklar NAYKH olgularında hepatik inflamasyon ve fibrozden sorumlu tutulmuşlardır.¹⁴ Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu, steatoz gelişimi ve karaciğer hasarının ileri evrelerine progresyonunda anahtar faktörlerdir.^{15,16}



Şekil 1. İki vuruş hipotezi.

NAYKH, çocukluk döneminde de en önemli karaciğer hastalığıdır. Gelecek 10 yılda, NAYKH'nın çocuklarda ciddi oranda artacağı düşünülmektedir.^{17,18} NAYKH'nın tüm spektrumları çocuklarda gözlenmiştir. NAYKH okul öncesi çocuklarda da gözlenmektedir ve

cinsiyet üstünlüğü yoktur. Klinikte çocuklarda sık sık kaynağı belirsiz abdominal ağrılar görülmüştür. Laboratuvar çalışmaları serum aminotransferaz yükselişi, serum ALT oranının serum AST oranından daha fazla olmasıyla birlikte, hafif ve orta derece arasında değişmektedir. Kanda kolesterol artışı olmasına rağmen hipertrigliseridemi tipik kan lipid anormalitesidir. Metabolik bozukluğu olan hastalarda insülin reseptör ve sinyal anormallikleri sonucunda NASH çok daha sert seyretmektedir.^{19,20} Çocukluk dönemi obezite (ve fazla kilo) olabildiğince erken tanımlanmalıdır. Tokluk hiperinsülinemisini ve tüm yağ alımını azaltan düşük glisemik indeksli diyetlerle tedavi yoluna gidilmektedir.¹⁸ Çocuklarda ilaç tedavisinin faydası daha ileri derecede araştırmalar gerektirmektedir.

2.1.1. Epidemiyoloji

2.1.1.1. Risk Faktörleri

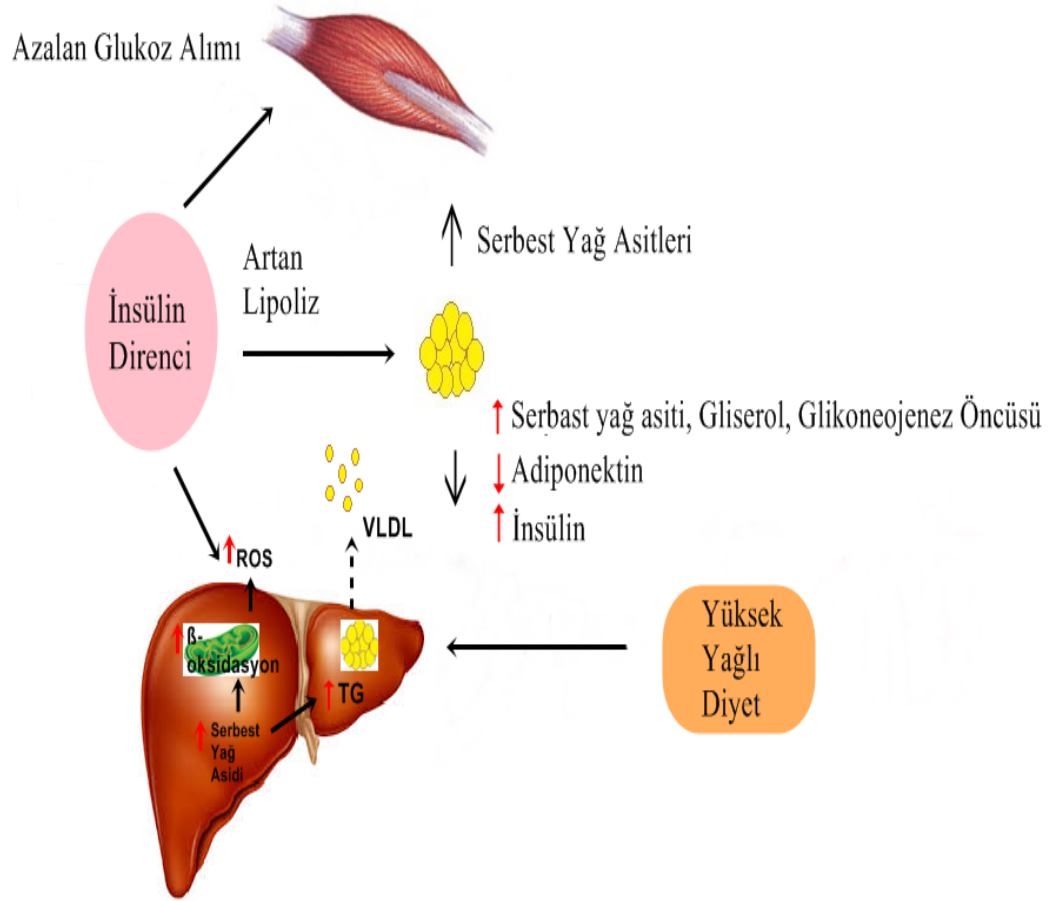
Obezite, tip II (insüline bağımlı olmayan) diyabet ve hiperlipidemi sıklıkla NAYKH'a eşlik eden durumlardır.^{2,21} NAYKH olan bazı çocuklarda tip I diyabet vardır.²¹

Obezite; vücut kitle indeksinin (kilogram cinsinden ağırlığın metre cinsinden boyun karesine bölünmesi) en az 30 olması olarak tanımlanmaktadır.²² Obezite derecesiyle NAYKH prevalansı ve ciddiyeti arasında doğru orantılı bir ilişki mevcuttur.²³ Obez kişilerde NAYKH'nın prevalansı 4-6 kat artmaktadır.²²

Tip II diyabet varlığı, vücut kitle indeksinden bağımsız olarak, NAYKH'nın riskini ve şiddetini anlamlı derecede yükseltmektedir.²⁴ Santral obezite, vücut kitle indeksi normal olan bireylerde dahi NASH için önemli bir risk faktörüdür.²⁵

Bir çalışmada, hiperlipidemili hastaların yaklaşık yarısının ultrason incelemesinde NAYKH olduğu bulunmuştur.²⁶ Ailede steatohepatit veya kriptojenik siroz hikayesinin de bu bozuklukta risk faktörü olduğu belirtilmiştir.²⁷

İki vuruş hipotezinde tip II diyabet ve obezitenin, insülin direncinin yanısıra oksidatif strese de etkili olduğu son zamanlarda önem kazanmıştır.²⁸



Şekil 2. Karaciğerde yağ birikimi

2.1.1.2 Prevalans

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı çeşitli ülkelerde genel nüfusun %10–24'ünü etkilemektedir. Prevalans %57.5'e, hatta obez kişilerde %74'e kadar yükselmektedir.²²

NAYKH çocukların %2.6'sında, obez çocukların ise %22.5 ile %52.8'inde görülmektedir.²⁹

NAYKH prevalansının (karaciğer enzimleri ve karaciğer biyopsisi tanılarına göre) belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda %2.8 ve %46 arasında değiştiği tahmin edilmektedir.³⁰

Amerika'nın Dallas ve Teksas eyaletlerinde 2004 yılında yapılan bir çalışmada, NAYKH'nın prevalans değeri %31 olarak bulunmuştur.

2007-2010 arası 400 kişiyle NAYKH ve NASH için yapılan prevalans belirleme çalışmalarında NAYKH'nın prevalans değeri %46 olarak bulunmuştur ve NAYKH hastalarının %58.9 oranında major olarak erkek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca belirgin olarak NAYKH hastalarının yaşlı (%55.9) olduğu belirtilmiştir.

NAYKH'de hipertansiyon ve diyabet hastalığı ile birlikte sırasıyla prevalans değerlerinin %68.2 ve %76.9 arttığı gözlenmiştir.

Bu hastalar arasında NASH değerinin %12.2 prevalans değerine sahip olduğu belirlenmiştir. NASH hastalarının dominant olarak erkek bireylerde gözleendiği (%64) ve insülin direncinin yüksek hastalarda olduğu belirtilmiştir. NASH hastalarında serum ALT ve AST seviyesinin belirgin olarak yüksek olduğu gözlenmiştir.³¹

2.1.2. Patogenezi

NAYKH patogenezi, tarif edildiğinden bugüne kadar iyi anlaşılmış değildir. Güncel görüşlerin çoğu varsayım düzeyindedir. Çünkü hastalığın mekanizmaları hala araştırma altındadır. NASH gelişimindeki mekanizmalar, hepatositlerde trigliserit artışı ile yağ asidi ve lipogenezis artışına neden olmaktadır. Steatoz, lipotoksidite ve bunun sonucunda apoptozis, nekrozis, oksidatif stres ve inflamasyonla sonuçlanmaktadır. Bu sonuçlar nihayetinde kronik karaciğer hastalıklarına neden olmaktadır.³²

2.1.2.1. İnsülin Direnci

‘İnsülin direnci’ insülinin kendisine duyarlı dokulardaki karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının düzenleme yeteneğinin bozulmasıdır. İnsülin direnci olan bireylerde, belirli bir biyolojik fonksiyonun yerine getirilebilmesi için, ihtiyaç duyulan insülin miktarı artmaktadır.³³ Başka bir anlatım ile belirli bir konsantrasyondaki insülinin, glukoz alımını uyarma etkisinin azalmasıdır.

Normalde, insülin, karaciğerde glukoneogenezi ve glukojenolizi inhibe ederek, hepatik glukoz üretimini baskılamaktadır. Ayrıca, glukozu, kas ve yağ dokusu gibi, periferik dokulara taşıyarak burada ya glikojen olarak depolanmasını, ya da enerji üretmek üzere okside olmasını sağlamaktadır. İnsülin direncinde, insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki bu etkilerine karşı direnç oluşarak hepatik glukoz sekresyonu bozulmaktadır. Kas ve yağ dokusunda da, insülin aracılığı ile olan glukoz alımı azalmaktadır. Bu durumda, oluşan insülin direncini karşılayacak ve dolayısıyla normal biyolojik yanıtı sağlayacak kadar insülin salgısı artışı ile metabolik durum kompanse edilmektedir. Böylelikle hipergliseminin önlenmesi için, β hücreleri sürekli olarak insülin

salgısını artırmaktadır. Sonuçta, normoglisemi sağlanırken, insülin düzeylerinde de 1.5-2 kat, hatta bazen daha da yüksek bir seviye oluşmaktadır.³⁴

NAYKH'nın patofizyolojisindeki temel olayın insülin direnci olduğu düşünülmektedir. NAYKH olanlarda, insülin direncinin ilk defa gösterilmesinden bu zamana kadar HOMA, NAYKH ile metabolik sendrom arasındaki yakın ilişkinin gösterilmesi amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Glukoz klemp tekniği ilk defa Comert ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve sonraki çalışmalarda, NAYKH olanlarda insülin direncinin yüksek oranda olduğu ve bu nedenle de aynı grup hastalarda tip II diyabete benzer bir biçimde lipolizin arttığı gösterilmiştir. İnsülin direncinde, genellikle yüksek miktarda toplam insülin sekresyonu, normal hepatik insülin alımıyla birlikte ve varlığı daha ciddi hastalığı (NAYKH) gösterir. İnsülin direnci, ilginç bir biçimde diyabetik olmayan ve metabolik sendrom kriterleri bulunmayan zayıf insanlarda da görülebilmektedir.³⁵

İnsülin direnci, obezitede sık görülmekle birlikte, obez olmayan ve normal OGTT'si olan bireylerin %25'inde; esansiyel hipertansiyonlu hastaların da, yine yaklaşık %25'inde, saptanmıştır. İnsülin direnci polikistik over sendromlu (PKOS) kadınların da, yaklaşık üçte birinde görülen bir durumdur. Bu yüzden, insülin direnci toplumda sık rastlanan ve yaygın bir fenomendir.

Hepatik yağ asitleri normalde trigliseritlerle esterleşmektedir. Trigliseritlerden bazıları çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ile hepatositlerin dışına taşınmaktadır. NAYKH olanlarda, hepatositler içinde lipit düzeyinin artması (çoğunlukla trigliserit formunda), yağ asitlerinin alımını ve sentezini uyaran enzim sistemleriyle, yine yağ asitlerinin

oksidasyonunu ve hücre dışına taşınmasını uyaran enzim sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır.

İnsülin direncinin moleküler patogenezi, anlaşıldığı kadarıyla, multifaktöryeldir. İnsülin etkisinin inhibisyonunda rol oynayan bazı moleküler hedefler tanımlanmıştır. Bunlar arasında aşağıdakiler sayılabilir:

- Rad (ras associated with diabetes), temel hücre işlevlerini (büyüme, farklılaşma, veziküler transport ve sinyal transdüksiyonu) engeller.
- PC-1 (insülin direncinde rolü olan bir membran glikoproteini), insülin tarafından uyarılan tirozin kinaz aktivitesini azaltır.
- Leptin, insülin reseptörü substrat-1'in defosforilasyonunu indükler.
- Yağ asitleri, insülin tarafından uyarılan periferik glukoz alımını engeller.
- TNF- α , insülin reseptörü substrat-1'in, insülin tarafından indüklenen fosforilasyonunu azaltır (down-regulation) ve insüline bağımlı glukoz transport molekülü, Glut-4'ün ekspresyonunu düşürür.

İnsülin direnci, aynı zamanda, iki temel mekanizma ile hepatositlerde yağ birikimine yol açar. Bunlar, lipoliz ve hiperinsülinemidir.³⁶

NAYKH'nın hem hepatik, hem de adipoz dokuda insülin direnciyle güçlü bir ilişkisi vardır. İnsülin direnci, hiperinsülinemiye neden olarak hormona duyarlı lipoproteinlipazı uyarır ve lipoliz artar. Bunun sonucunda karaciğer yağ asidi alımı artmaktadır. Kanda artmış olan insülin β oksidasyonu engelleyerek ve glikolizi uyararak yağ sentezini arttırır. Aynı zamanda serum insülin yüksekliği karaciğerde yağ asitlerinin trigliseritlerle esterleşmesini ve karaciğerde salınımını azaltır. Böylece insülin direnci NAYKH gelişiminde esas mekanizmayı oluşturmaktadır.³⁷

NAYKH bütün bedende insülin duyarlılığını %45- 50 arasında düşürmektedir. Aynı zamanda insülinin endojen glukoz üretiminin engellenmesindeki rolünü bozarak hepatik insülin direncine neden olmaktadır. NAYKH yağ asidi oksidasyonunun dokularda glukoz alımının ve glukoz kaynaklarının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular insülin direncinin NAYKH'da ve adipositlerdeki seviyesinde insülin duyarlılığının azalarak hepatik steatoza neden olabileceği belirtilmiştir.³⁸

2.1.2.2. Obezite

Obezite; hipertansiyon, yüksek serum kolesterolü, düşük HDL kolesterol ve hiperglisemi gelişmesini kolaylaştırmaktadır. Obezite NAYKH patogenezinde önemli rol oynarken, beden yağının düzensiz dağılımı da önemli bir role sahiptir.³⁸ Ayrıca abdominal yağ birikiminin insülin direnciyle birlikte tip II diyabet³⁹, glukoz toleransı⁴⁰, dislipidemi⁴¹ ve metabolik sendrom gibi hastalıklara yol açtığı gözlenmiştir. Aynı zamanda abdominal yağlanmanın hem kadın, hem de erkek bireylerde karaciğer yağlanması⁴² ve insülin direnci⁴⁰ ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir.³⁸

Birçok çalışma abdominal yağlanmanın insülin direnci ile birlikte NAYKH'da önemli olduğunu belirtse de, deri altı yağlanmanın da NAYKH patogenezinde önemi vurgulanmıştır. Deri altı yağlanma önemli ölçüde total yağ düzensizliğini arttırmış ve total yağ düzensizliğinin hepatik insülin duyarlılığını azalttığı belirtilmiştir.³⁹

2.1.2.3. Hepatik Yağların Kaynakları

Yapılan çalışmalarda karaciğerde yağ asitlerinin artışının, hepatik yağ oksidasyonun ve VLDL sekresyonunun bozulmasına neden olabileceği belirtilmiştir.

Genel eğilim olarak lipolizin artışının, yüksek yağ asitlerinin sirkülasyonu seviyesindeki artışın ne karaciğer, ne de total lipid oksidasyonunu düşürmediği; aksine fazlasıyla yükselttiği gözlenmiştir.^{43,44} Bu durumun aynı zamanda VLDL'nin sekresyonunu yükselttiği bildirilmiştir.⁴⁵ Visseral yağ dokusunun, yağ asitlerinin artışı ve bunların karaciğere toplanmasında major kaynak olduğu belirtilmiştir. Visseral yağların artışının hepatik insülin direnciyle^{46,47} ilişkili olduğu gözlenmiştir. Çünkü visseral yağ oldukça lipolitiktir ve yağ asitleri direkt olarak portal vene salınır. Hayvan çalışmalarında yüksek dozda beslenme sonucunda hem hepatik steatoz, hem de endojen glukoz üretimi bozukluğu gösterilmiştir. Buna karşılık insanlarda düşük diyet beslenmesiyle hepasellüler lipid seviyesi %40-80 oranında azalmıştır.⁴⁸ Bu durumda portal sirkülasyondaki yağ akışı, hepatik karaciğer yağ toplanmasının belirtici olarak kabul edilebilir. İç organlardaki yüksek oranda yağlanma sadece yüksek yağlı yiyeceklere dayalı diyetle değil, aynı zamanda uzun süreli açlık koşulları sonrasında da oluşabilmektedir. Visseral yağlanma güçlü bir şekilde NAYKH ile ilişkilendirilmiştir.^{47,49} Normal bireylerde açlık sırasında lipogenezis az miktardayken, NAYKH hastalarında lipogenezis yükselmekte ve ortalama %25 oranında artmaktadır.

2.1.2.4. Adipokinler

Yağ dokusunun artışı ve visseral yağlanma, insülin duyarlılığı ile antiinflamatuvar sitokinleri azaltırken, proinflamuar moleküller

ekspresyonu arttırmaktadır. İnsülin direnci yağ dokusu inflamasyonu, adipokinlerin sekresyondaki değişimi ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, kemokin monosit kemo ilgisi yüksek protein-1'in (MCP-1) yağ dokusu inflamasyon oluşumunu arttırdığı ve NAYKH ve insülin direncine sebep olduğu belirtilmiştir.⁵⁰

NAYKH hastalığında adiponektin seviyesinin düştüğü gösterilmiştir.⁵¹ NAYKH'da adiponektinin direkt rolü anlaşılamamıştır. Ancak hormonun (adiponektin) öncelik olarak glikoz ve lipit metabolizmasını arttırdığı düşünülmüştür. Adiponektin aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin, TNF- α gibi ekspresyonunu inhibe ettiği söylenmiştir.⁵² Leptinin ise hepatik trigliserit toplanmasında ve bunun sonucu olarak yağ düzenlenmesinin bozulması⁵³ ve karaciğer oksidasyonunun artışına neden olduğu belirtilmiştir.⁵⁴ Leptinin aynı zamanda inflamasyonda proinflamatuvar stimulasyonu harekete geçirerek birçok role sahip olduğu söylenmiştir.⁵⁵

2.1.2.5. Leptin

Leptin, yağların enerji dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir sensördür. Leptin, hipotalamik reseptöre bağlanır, anorektik ve termojenik etkiler gösterir. İnsülin direnci ve leptin karaciğer trigliserit toplanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Leptinin miyokardiyum, iskelet kası, pankreas ve karaciğer gibi adipoz dokunun dışındaki dokularda, yağ asitlerinin β oksidasyonunu düzenleyerek, lipit toplanmasını engellediği söylenmiştir.⁵⁶ Bu şekilde leptinin lipotoksisteyi engeleyebileceği vurgulanmıştır. Farelerde Leptin enjeksiyonu ile visseral yağlanmanın ve karaciğer trigliserit akışının azaldığı ve serbest yağ konsantrasyonunun ve periferik glukoz alınımları olmaksızın hepatik insülin aksiyonun yükseldiği bildirilmiştir. Bu durumun sadece insülin duyarlılığının artması için önemli

olduğu vurgulanmıştır. Leptin, Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein 1 (SREBP-1) düşürerek yağ asidi β oksidasyonunu artırdığı ve termojenezi düzenlediği ifade edilmiştir.⁵⁷

NAYKH hastalarında leptin seviyesinin yükselebildiği gibi⁵⁸, düşebileceği de ifade edilmiştir.⁵⁹ Serum leptin seviyesi ile C- peptitin bağımsız olarak ilişkilendirebileceği, fakat vücut kitle indeksi ile direkt ilişkilendirilebileceği söylenmiştir.^{58,89} Serum leptin, C-peptit ve yaşı birbiriinden bağımsız olarak steatozun bir belirtici olduğu vurgulanmıştır.⁵⁸

2.1.2.6. Resistin

Resistin, beyaz yağ dokusundan ve mononükleer hücrelerden salınan 108 amino asitten oluşan peptittir. Farelerle yapılan çalışmalarda insülin direnci ile ilişkilendirilmiş fakat insanlardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.⁶⁰ Resistinin inflamatuvar süreçte rol oynayabileceği belirtilmiştir.⁶¹ NAYKH hastalarında, sirkülasyondaki ve yağ dokusundaki ekspresyonu artığı söylenmiştir.⁶² Fakat serum resistin oranının NAYKH hastalarına göre NASH hastalarında daha yüksek seyrettiği gözlenmiştir. Buna rağmen kilo artışı ve periferik insülin direnci, yüksek resistin seviyesi ile ilişkilendirilememiştir. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda karaciğer insülin direnci ile ilişkilendirilirken, insanlarda bu ilişkinin belirlenmesi için daha fazla sayıda ve çok yönlü çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir.⁵⁶

2.1.2.7. Ghrelin

Ghrelin mideden salınan, glukoz, enerji homeostazisini ve besin alınımlı düzenleyen oreksijenik bir hormondur. Ghrelin, lateral

hipotalamus üzerinde etki göstermekte ve teorik olarak inflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu inhibe ederek, leptin aktivitesini antogenize etmektedir. Plazma ghrelin seviyesi diyetle birlikte artmakta ve hızla tekrar düşerek, insülin duyarlılığı artışına ve obezitenin azalmasına etki göstermektedir. Deney hayvanlarında ghrelin iştahın artmasına neden olarak vücut ağırlığının düzenlenmesine etki etmektedir. İnsan ve deney hayvanlarında plazma ghrelin konsantrasyonu artışı, vücut ağırlığı ve beden yağı düzenlenmesinde ile doğrudan ilişkilidir.⁶³

Ghrelinin NAYKH hastalarında insülin direnci ile birlikte düştüğü gözlenmiştir. Ghrelin, dokularda mitokondrial ve lipit metabolizmasının gen ekspresyonu değişiminde, karaciğerde trigliserit depolanmasının lehine, yağ asit oksidasyonu ve AMP aktive edici protein kinazı (AMPK) indüklerken mitokondrial oksidatif enzim aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir.⁶⁴

2.1.2.8. TNF- α

TNF- α enfeksiyon varlığında başlıca yağ dokusunda sentezlenen ve salınan proinflamatuvar sitokindir. İnflamasyonun dışında hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis gibi görevleri vardır.⁶⁵ TNF- α artışı insülin direnci ile birlikte hem obez hayvan modellerinde hem de obez insanlarda gösterilmiştir.^{66,67} Buna karşı TNF- α plazma seviyesinin kilo kaybıyla azaldığı belirtilmiştir.⁶⁷ NAYKH ve NASH'da plazma TNF- α plazma seviyesinin yükseldiği belirtilmiştir^{68,69} ve farelerde TNF- α antikor infüzyonlarının hepatik steatozu geliştirdiği gösterilmiştir.⁷⁰ TNF- α hücre yüzey transmembran proteini olarak salınmakta ve otokrin ve parakrin hormon gibi etki edebilmektedir. TNF- α lipolizi indükte ederek lipogenezisi inhibe etmektedir.⁶⁵ THF- α yağ dokusunda transkripsiyonun artışı ve bunun sonucu olarak plazma TNF- α seviyesinin yükselmesiyle yağ dokusu

düzensizliğine neden olmaktadır.⁶⁷ Yağ dokusunda TNF- α 'nın artışı yağ asitlerin salınımının artışı ile birlikte periferik lipolizisi hızlandırarak adiponektin sentezini düşürerek ve glukoz taşıyıcısı olan GLUT-4'ün membran ekspresyonunu azaltarak, insülin direncini indükleyebilmektedir.⁶⁵ TNF- α yağ dokusunda lipoprotein lipaz aktivitesini inhibe ettiği, serbest yağ transportu ekspresyonunu düşürdüğü ve lipogenik enzimlerin ekspresyonunu azalttığı söylenmiştir.⁷¹ TNF- α 'nın adipositlerde apoptozisi indükleyebileceği söylenmiştir.⁶⁵ Hem hayvan, hem de insan modellerinde insülin duyarlılığı ajanlarıyla yapılan tedavi ile TNF- α konsantrasyonunu azaltarak karaciğer yağlanması azalmasında önemli gelişmeler sağlanmıştır.^{69,72}

2.1.2.9. İnterlökin-6

İnterlökin-6 (IL-6) yaklaşık 26 kD'luk bir sitokin olup, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilmektedir. IL-6'nın reseptörü 60 kD'luk bağlayıcı bir protein ile 130 kD'luk sinyal ileten alt birimden oluşmaktadır. IL-1 ve TNF- α 'nın etkisi ile salgılanır ve bu sitokinlerle sinerjistik etkilere sahiptir. IL-6'nın en iyi tanımlanan iki etkisi hepatositler ve B lenfositleri üzerine olup, akut faz yanıtına katkıda bulunan birçok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olmaktadır.⁷³

IL-6 insülin direncinde rol oynayan inflamatuvar sitokindir.⁶⁰ Klinik çalışmalar, obezitede insülin direncinin artışı ile plazma ve yağ dokusu IL-6 seviyesinin artışı ile ilişkilendirmiştir.⁷⁴ Kilo azalmasıyla birlikte plazma ve yağ dokusu IL-6 seviyesinin de azaldığı gösterilmiştir.⁷⁵ Abdominal yağlanmada IL-6 üretiminin, deri altı yağlanmadaki IL-6 üretiminden 3 kat fazla olduğu ve böylelikle abdominal yağlanmanın

hepatik insülin direncinin artışında güçlü bir aktivatör olduğu söylenmiştir.⁷⁶ IL-6'nın plazma serbest yağ asitlerinin artışına neden olabileceği ve böylelikle insülin direncinin artışına ve adiponektin sekresyonun azalmasına etki edebileceği söylenmiştir.⁶⁵

2.1.2.10. Hiyaluronik Asit

Hiyaluronik asit (HA), glukuronik asit ve N-asetilglukozamin'den oluşan disakkarid ünitelerinden meydana gelmiş doğal bir linear polisakkariddir. Özellikle sinovyal sıvıda, gözün vitrousunda, bağ dokusunda, göbek bağı ve dermiste bulunmaktadır. HA, birçok dokuda ekstrasellüler matrikste var olan bir bileşendir. Çeşitli inflamatuvar koşullar altında ve HA'nın serum seviyesi yükseldiğinde kollajen sentezi artmaktadır. Bu da hiyaluronik asit üretiminin artmasına sebep olmaktadır.⁷⁷

İlerlemiş karaciğer hasarındaki azalan sinüzoidal endotel hücre fonksiyonu Hyaluronat reseptörünün azalmasıyla, serum HA seviyesini artırabilmektedir.⁷⁸ Ayrıca endotel hücrelerindeki HA azalması serum HA seviyesini azaltmaktadır.⁷⁹ Serum HA seviyesi hepatik fibrozis ilerlemesiyle birlikte artmaktadır.⁸⁰

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, serum HA ölçümünün, diğer karaciğer hastalıkları arasında ilermiş fibrozisinin saptanması açısından oldukça faydalı olduğu söylenmiştir.^{81,82}

Karaciğer hastalığının tanısında az çeşitlilik gösteren populasyon çalışmalarında, serum HA seviyesinin tanı koymak açısından oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca sitokeratin-18 ve HA'in çocuk NAYKH'da karaciğer fibrozisi belirlemek açısından iyi bir serum

belirteci olduğu söylenmiştir.⁸² Bu durum NAYKH hastalarında serum HA'nın ölçümünü içermemektedir. NAYKH hastaları arasında serum HA'nın belirlenmesinin hepatik fibrozis için iyi bir belirteci olduğu söylenmiştir.⁸³

2.2. Oksidatif Stres

Aerobik organizmalar sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan moleküler oksijenden türetilen reaktif molekülleri üretmektedirler. Bu serbest radikaller dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Özelliklerinden birisi kısa ömürlü olmaları, bir diğeri ise radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek yeni radikaller oluşturmaları ve zincir reaksiyonu başlatabilmeleridir.

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşabilmektedir:

- 1-Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında bir ortalanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması
- 2- Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi
- 3- Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi⁸⁴

Serbest radikaller Tablo 1'deki gibi gruplandırılabilir:

Tablo 1: Reaktif Oksijen Türleri⁸⁵

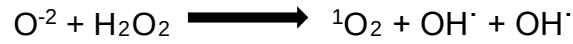
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksid (H_2O_2)
Hidroksil ($HO^{\cdot}$)	Singlet oksijen ($^*O_2$)
Peroksil ($ROO^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Alkoksil ($RO^{\cdot}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Lipit hidroperoksid ($LOOH$)
Semikinon radikali ($HQ^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller ($R^{\cdot}$)	N-halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksid radikali ($RCOO^{\cdot}$)	Hipohalöz asid (HOX)

Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir. Bu yüzden bazen oksijen bir radikal olarak değerlendirilmektedir. Oksijen molekülü, reaktif bir özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir.⁸⁶

Süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), zayıf reaktif bir serbest radikal olan süperoksid anyonu moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelmektedir. Süperoksid oluşumu, özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelmektedir. Süperoksid radikali ksantin oksidaz ve bir grup flavoenzimler tarafından oluşturulmaktadır. Diğer süperoksit üreten enzimler lipooksijenaz ve siklooksijenazdır. Fagositik hücrelerin NADPH bağımlı oksidaz enzim kompleksi fazla miktarda süperoksit radikali oluşturmaktadır. İki molekül süperoksit molekülü süperoksid dismutaz (SOD) tarafından hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmektedir.⁸⁷

Ortamda biriken süperoksid radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali ($\text{HO}_2^\cdot$) oluşturabilir.
2. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.



3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.⁸⁶

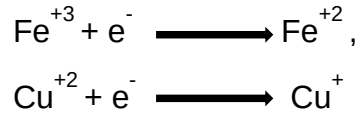


Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa, peroksid oluşmaktadır. Peroksid molekülü iki H molekülü ile birleşirse H_2O_2 oluşmaktadır. H_2O_2 süperoksidin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak da üretilabilmektedir. H_2O_2 aslında radikal değildir. Ancak üretildiği bölgede kalan süperoksidin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinmektedir. Bu nedenle, süperoksidin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilmektedir. Burada süperoksidle reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilmektedir. Hidrojen peroksid başka bir şekilde de serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşmaktadır. Bu da doku hipoksisi ve endotel hasarına yol açabilen vazodilatasyon kaybına neden olmaktadır. Bu reaktif oksijen türü de bakterilere karşı lokosit defansının diğer bir komponentidir.⁸⁶

Hidroksil ($\text{OH}^\cdot$), bilinen en reaktif radikaldır. Amino asitler, nükleik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir

çoğuyla reaksiyona girebilmektedir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H^+ 'in birleşmesinden oluşmaktadır. Gamma radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilmektedir. Alınan enerji hücre suyu tarafından absorbe edilmekte ve sudaki oksijen-hidrojen kovalent bağının parçalanmasına neden olmaktadır. Böylece hidrojen ve oksijen üzerinde dış orbitalde tek elektron kalmakta ve 2 radikal oluşmaktadır. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden H atomu çıkarılmasını sağlamaktadır.⁸⁴

Geçiş metalleri elektronların alınması ve verilmesi durumlarında bu serbest metal iyonları radikal reaksiyonunu hızlandırmaktadır.



Metal iyonları lipid peroksidasyonu reaksiyonunda da rol oynarlar. Oluşmuş lipid hidroperoksitlerin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize eder. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonda Fe^{+2} iyonlarının H_2O_2 'i indirgeyip $OH\cdot$ oluşturabildikleri bilinmektedir.



Seruloplazmin Fe^{+2} 'ni Fe^{+3} 'e oksitler ve Fe^{+3} 'ün transferrine bağlanmasını kolaylaştırır. Seruloplazminin antioksidan aktivitesi: Ferroxidaz aktivitesi, askorbat oksidaz aktivitesi, oksijen radikali temizleyici aktivitesi ve GSH-bağımlı peroxidaz aktivitesi şeklinde 4 yolla olmaktadır. Transferrin de H_2O_2 'den demir iyonu bağımlı hidroksil oluşumunu inhibe etmektedir.

NO (Nitrik oksit), nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşmaktadır. Vasküler tonun regülasyonunda guanilat siklazı aktive eden NO major rol oynamaktadır. Oksijen bağlanan bölgeye kompetitif bağlanarak direkt olarak sitokrom oksidazın inhibisyonu ile hücresel solunumu düzenlemektedir. NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranmakta ve lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Bununla birlikte süperoksid düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksitle reaksiyona girmekte ve bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturmaktadır.⁸⁸

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar:

- 1) DNA hasarı,
- 2) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- 3) Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- 4) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- 5) Protein ve lipitlerle kovalan bağlantılar yapması,
- 6) Zar proteinlerinin hasarı, taşıma sistemlerinin bozulması,
- 7) Protein hasarı ve protein “turnover”ının artması,
- 8) Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi,
- 9) Kollajen ve elastin uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması ve
- 10) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir.⁸⁹

ROT; mikro organizmalara karşı savunmada, kardiyovasküler hastalıklar, interstisyel akciğer hastalığı, kanser, viral ya da alkolik karaciğer hastalığı ve NAYKH gibi farklı biyolojik sistemlerde rol oynamaktadır.

Oksidatif stres oksidan / antioksidan dengesinin bozulmasına yol aarak organizmada potansiyel hasara yol aarmaktadır. Oksidatif stres ROT ve Reaktif Nitrojen turlerini (RNT) artırmak ve bunun sonucunda antioksidanların azalmasına neden olmaktadır. Farklı kaynaklardan tureyen (mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksisom gibi) ROS ya da RNT, NAYKH patagonezinde önemli rol oynamaktadır.⁹⁰ Steatoz oluşumundan sonra karaciğer, ikinci vuruş olarak adlandırılan oksidatif strese duyarlı hale gelmektedir. Oksidatif stres NAYKH'de steatozun steatohepatite ilerlemesinin nedenidir. Serbest yağ asitlerinin oksidasyonu süresince, mitokondride çoğu H₂O₂ formunda olan ROT birirmektedir.

Oksidatif stres varlığı nedeni ile ROT ile karaciğerdeki antioksidanlar arasında sürekli bir denge bulunmaktadır. Dengesizlik oluştuğunda ROT fasligand oluşumu, sitokin oluşumu ve lipid peroksidasyonu yoluyla steatohepatit oluşumunu tetiklemektedir. Lipid peroksidasyonu karaciğer hücre nekrozuna ve kollajen sentezinde artışa neden olmakta ve aynı zamanda ROT ve TNF- α , transforming growth faktör β (TGF- β) ve interlökin-8 (IL-8) gibi sitokinlerin sekresyonunu artırmaktadır.⁹¹

2.2.1. Mitokondrial Disfonksiyon

Mitokondri karaciğer serbest yağ asidi oksidasyonunda, ATP oluşumunda ve bazal reaktif oksijen metabolitleri oluşumunda temel rol oynamaktadır. Mitokondride yağ asitlerinin girişi karnitinpalmitoiltransferaz enzimi ile denetlenmekte, bu enzim de malonilkoenzim-A ile kontrol altında tutulmaktadır. Malonil koenzim-A'nın yüksek olduğu durumlarda mitokondrial oksidasyon azalacak ve yağ asitleri trigliserid olarak karaciğerde depo edilecek ve steatoz gelişecektir. Mitokondride yağ asitleri oksidasyona uğrarken, oluşan asetil-koenzim-A trikarboksilik asid

siklusuna girmekte ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi devam etmektedir. Ancak bunun sonucunda yan ürün olarak çok fazla miktarda serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmakta ve oksidatif hasar ile NAYKH gelişimine katkıda bulunmaktadır.⁹¹

ROT özellikle elektron transport sistemindeki kompleks 1 (NADH dehidrojenaz) ve kompleks 3'den (ubikinin- sitokrom c redüktaz) kaynaklanmaktadır. NAYKH'da serbest yağ asitlerinin aşırı yüklenmesi sonucunda β oksidasyonun artışıyla elektron sızıntısının arttığı söylenmiştir.⁹² Bu sızıntının ortalama %2-4'ünün ROT'a dönüştüğü belirtilmiştir. ROT, Kupfer hücrelerinden ve hepatositlerden TNF- α salınımını arttırmakta ve adipoz doku kökenli TNF- α mitokondrial solunum zincirini olumsuz yönde etkilemekte ve mitokondrial geçirgenlik delikleri açılarak ve sitokrom-c yoluyla elektron transferi bozulmaktadır.⁹³ Bu şekilde ATP üretiminde azalma ve nekrozis meydana gelmektedir. Farelerde anti TNF- α tedavisiyle kompleks 1, 2, 3 ve 4 enzimlerinin aktivitesinin arttığı, β oksidasyonun harabiyetinin düzeldiği ve karaciğer histolojisinde önemli düzeltilmeler olduğu gözlenmiştir.⁹⁴ ATP homeostazında bozukluk olması NASH hastalarında gösterilmiştir.⁹⁵ Mitokondrial disfonksiyon ikincil olarak lipidlerin β oksidasyonu engelleyebileceği ve daha ileri steatoza neden olacağı söylenmiştir.⁹² ROT, lipid peroksidasyon ürünleri olan MDA ve 4-hidroksinonenalın mitokondriyal sitokrom c oksidazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda sitozolde pürin metabolizmasında önemli rol oynayan ksantin oksidazın serbest radikal oluşumuna katkı yapmakta ve lipid peroksit ürünleri olan MDA, 4-hidroksinonenal ürünlerini artırarak ikincil olarak sitokrom c oksidazı inhibe ettiği belirtilmiştir. ROT indüklediği mitokondriyal DNA'da (mtDNA) steatoz ve karaciğer lezyonları gözlenmiştir. mtDNA bozulması ile elektron transport zincirinin elemanları olan kompleks 1, 2, 3, 4 enzimleri kodlayan 13 gende hatalı kodlamalar sonucunda ATP sentezinde azalmaya neden olduğu söylenmiştir.⁹⁶

Birçok NASH hastasında mega-mitokondri ya da lineer kristalin inklüzyonları gibi çok sayıda yapısal mitokondri anomalisi de gösterilmiştir. NAYKH hastalarında mitokondrideki anomaliler; elektron transport sisteminin aktivitesinde azalma, mitokondri β oksidasyonunda bozulma olarak sıralanabilmektedir. NAYKH hastalarında karaciğer hücreleri elektron mikroskopuyla incelendiğinde hücreler büyük, şişkin ve seyrek gözlenmiştir. Mitokondrial matriksin ise parakristal inklüzyonları içerdiği ve yoğunluğunun az olduğu gözlenmiştir.⁹⁶

2.2.2 Mikrozoimler

Sitokrom P450 enzim ailesi yağ asit metabolizması, kolesterol, safra asitleri, ilaçlar ve alkol gibi eksojen kaynaklar metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. İnsanda şimdiye kadar saptanmış olan sitokrom P450 enzim ailesinin enzimlerinden etanol ile indüklenen CYP2E1 ve fibrik asitle indüklenen CYP4A, NAYKH ve NASH patogenezinde önemli rol oynamaktadır. CYP2E1 ve CYP4A uzun zincirli yağ asitlerinin oksijenasyonun toksik etkilerini önlemek amacıyla fonksiyon göstermekte fakat bu sırada ROT üretimine katkıda bulunmaktadır.⁹⁷

CYP2E1 seviyesi serbest yağ asitleri, ketonlar, insülin direnci ve etanol ile artmaktadır.⁹⁸ CYP2E1 aktivitesi, süperoksit radikalini artıran NADPH oksidaz tarafından yükselmektedir. Birçok çalışmada NAYKH'da oksidatif stres, CYP2E1 ekspresyonu ve elektron transport sisteminde elektron sızıntıları artışı gözlenmiştir.^{99,100} CYP2E1 ekspresyonunun ve aktivitesinin artışı oksidatif stresi artırarak ROT artmasına ve nihayetinde karaciğer yağlanmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda steatozdan steatohepatite ilerlemesine neden olmaktadır. Steatoz olan NASH hastalarında CYP2E1'nin seviyesi, NAYKH hastalarına göre daha yüksek belirlenmiştir.¹⁰¹

Aynı zamanda CYP2E1, yüksek oranla beslenen obez ratlarda, düşük diyetle beslenen ratlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum yüksek miktarda yağ oranının CYP2E1 tarafından artan ROT'un, NASH patagonezinde önemli olduğunu düşündürmektedir.

Obez bireylerde, CYP2E1'nin ekspresyonu ile lipit peroksidasyonu ile arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmış ve CYP2E1 ile birlikte serum indirgenmiş glutatyon (GSH) artarken hepatik GSH oranının azaldığı görülmüştür. GSH'deki bu düşüşün yağ asidi toksisitesiyle olabileceği düşünülmüştür.¹⁰²

Diğer sitokrom P450 enzim ailesinden olan CYP4A, heptositlerin endoplazmik retikulumunda yağ asitlerinin ω oksidasyonu ile ilişkili enzimdir. CYP4A başlıca PPAR- α 'yı indüklemektedir. Mikromozal ve peroksizomal oksidasyonu genel olarak yağ asit metabolizmasında minör rol oynamaktadır fakat CYP2E1 seviyesi düşük olduğunda ve uzun zincirli yağ asidi birikimi arttığından önem kazanmaktadır. Bu nedenle CYP4A enzimleri hepatik oksidatif strese maruz kalmada alternatif olarak düşünülmüştür.⁹⁸

2.2.3 Peroksizomlar

Peroksizomal β oksidasyon ile serbest yağ asitleri asetil-CoA'ya çevrilmektedir. Daha sonra oluşan asetil-CoA'lar mitokondriye transport edilmektedir. Peroksizomlar uzun zincirli yağ asitlerini mitokondriye göre daha hızlı okside etmekte ve bu şekilde serbest yağ asitlerinin metabolik ürünleri hücrede artmaktadır. Fakat β oksidasyonu süresince H_2O_2 artarak kolayca OH radikallerine çevrilmekte ve hücre oksidatif strese maruz kalabilmektedir.¹⁰³

Hepatik yağ yüklenmesinin, hepatik peroksizom artışı ile PPAR- α situmulasyonu engellenmesi sonucu olduğundan şüphelenilmiştir. Çünkü PPAR- α , hepatik peroksizomal açıl koenzim oksidaz kodlar ve bu enzim peroksizomal β oksidasyonu tarafından kısıtlanmaktadır.¹⁰⁴

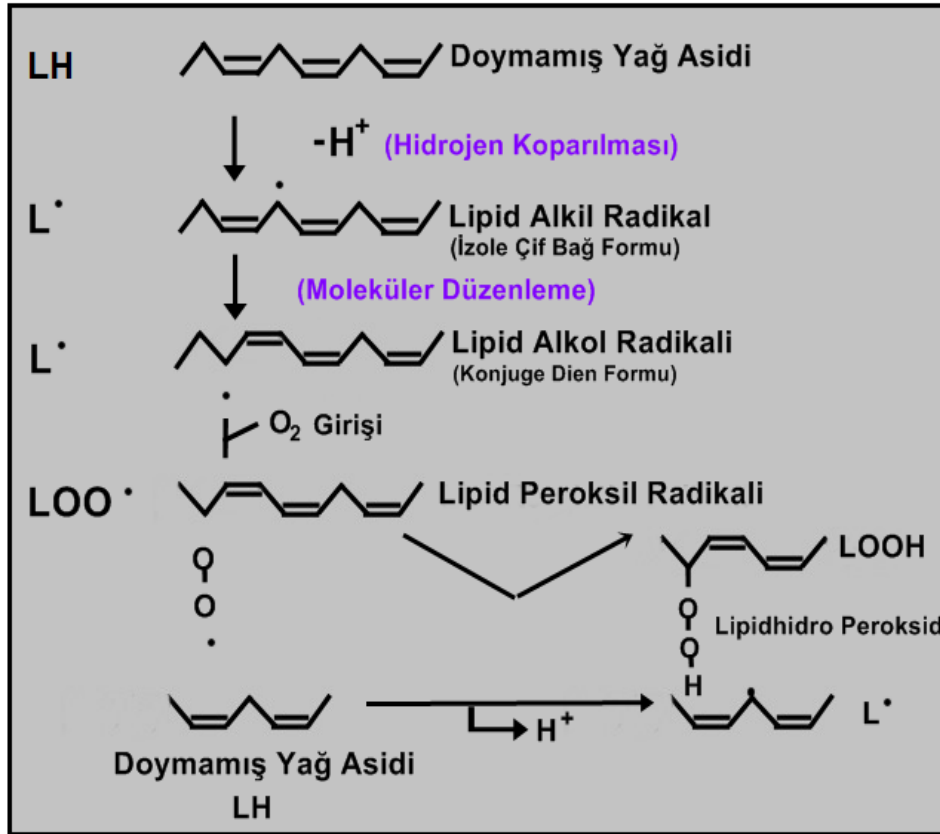
Histolojik çalışmalar karaciğer biyopsisinde demirin hepatoselüler karsinoma gelişiminde katkı sağladığını belirlemiştir.¹⁰⁵ Buna karşın demirin artışı ile NAYKH arasındaki bağlantının güçlü olmadığını gözlemleyen çalışmalar da bulunmaktadır.¹⁰⁶

2.2.4. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalin süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonunda asıl etkili radikalin ($\text{OH}^\cdot$) olduğu belirtilmektedir.

Yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Oluşan lipid radikali ($\text{L}^\cdot$) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra lipit radikalin oksijen ile reaksiyonu ile lipid peroksit radikali ($\text{LOO}^\cdot$) meydana gelmektedir. Bu radikal de zardaki poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta ve kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşmektedir. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.¹⁰⁷

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de, in vivo lipid peroksitlerinin düzeyini yansıtmaları açısından giderek önem kazanmaktadır. Lipid hidroperoksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de, lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir.¹⁰



Şekil 3. Lipid peroksidasyonu

Birçok çalışma ROT'nin hepatik lipotoksisiteyi artırdığını söylemektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda, genel olarak NASH ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki üzerinde yoğunlaşmıştır. NAYKH ile lipid proksidasyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi için yapılan

alışmalar çok azdır ve genellikle ratlar üzerinde yapılmıştır.^{109,110,111} NASH'da osidatif stresin artışı birlikte, okside LDL oranının ve serum lipit peroksidasyon rnleri MDA ve 4-hidroksi-2,3 transnonenal (4-HNE) artmaktadır.¹¹² Palmitatla indüklenen oksidatif stres, rat hepositlerde insülin direncine katkı yaptığı rapor edilmiştir.¹¹³ Karaciğerde yağ asidinin birikimiyle β oksidasyonu ve elektron transport sisteminin elektron sızıntısı ROT üretimini tetiklemektedir.¹¹⁴

Lipid peroksidasyonun ürünleri steatotik karaciğer tayini açısından önemlidir. MDA ve 4-HNE, steatozis durumuna kıyasla NASH hastalarında %90 oranında artmaktadır.¹¹⁵ Lipid metabolizmasında diğer belirteçler izoprostanlar ve 3-nitrotirozindir. F2-izoprostan, enzimatik olmayan araşıdonik asit peroksidasyon ürünüdür ve plazma ya da idrar belirteci olarak kullanılmaktadır.¹¹⁶ F2-izoprostanlar NASH hastalarında yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca NAYKH ratlarında oksidatif hasarın belirlenmesinde kullanılabileceği önerilmiştir.¹¹⁷

2.2.5. Protein, DNA Hasarı ve İleri Oksidasyon Protein rn (AOPP)

Serbest radikaller bazı aminoasitlerle reaksiyona girerek enzimlerin aktivitelerini ortadan kaldırarak modifiye, fonksiyon görmeyen proteinlerin oluşmasına sebep olmaktadır. En çok sorumlu tutulan aminoasitler sülfür içerenlerdir . Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi halkalı amino asidler oksidasyona en fazla maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler, fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonlar bozulmaktadır. Protein yapısındaki

hasarın gösterilmesi için, protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir.¹⁰⁷

Protein oksidasyonunun yeni bir belirtici olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır.¹¹⁸

AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile kolerasyon gösterdiği fakat lipid peroksidasyon belirteçleri ile kolerasyon göstermediği belirtilmiştir.¹¹⁹

Karaciğer yağlanmasında lipid peroksidasyonun yanı sıra oksidatif stres sonucunda proteinler de hasara uğramaktadır. Bu zamana kadar yağlı karaciğer hastalığında ileri protein oksidasyon ürünü olan AOPP seviyesi irdelenmemiştir fakat farklı ürünler incelenmiştir. Nükleer ve mitokondirial DNA hasarı, karaciğer hücrelerinde çekirdek ve sitoplazma nekro-inflamasyonu indüklemektedir. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) serbest radikal tarafından modifikasyona uğramış DNA bazıdır ve inflamasyonda modifiye olmuş Guanin bazının gen düzeyinde artışına neden olmaktadır.¹²⁰ NASH'da 8-OHdG bazı kontrol grubuna göre kıyaslandığında daha yüksek seviyede tespit edilmiştir.

Yağ asidi birikimi sonucunda oksidatif strese neden olarak, karaciğer lipid oksidasyonu artmakta ve enzimatik olmayan glikasyon yoluyla Maillard reaksiyonu (amino asit ve indirgenmiş şeker arasındaki kimyasal reaksiyon) gerçekleşmekte ve glikasyon son ürünü (AGEs) ile sonuçlanmaktadır. NASH hastalarında AGEs'in arttığı ve serum AGEs seviyesinin NASH ile NAYKH hastalarında ayırmada önemi

vurgulanmıştır.¹²¹ AGEs aynı zamanda fibrozis ve hepatosit apoptozisi oluşumuna katkı yaptığı söylenmiştir.^{122,123}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda çalışılmış olup, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 01/2012-14).

3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi

Numuneler Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Rıdvan EGE Hastanesi Gastroenteroloji A.B.D. ve İç Hastalıkları Polikliniğinden temin edilmiştir. Araştırma için Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Rıdvan EGE Hastanesi Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır. Çalışmada toplam 133 hastaya ait serum örnekleri interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü (TNF- α), hiyaluronik asit (HA), malondialdehit (MDA) ve proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) tayinlerinde numune olarak kullanılmıştır. Numuneler, çalışılan zamana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Çalışmaya Gastroenteroloji A.B.D ve İç Hastalıkları polikliniğine dispeptik semptom ya da rutin kontrol için başvuran non-obez ve non-diabetik bireyler katılmıştır. Gruplar serum ALT seviyelerinin yüksekliği ve ultrasonografi bulgularına göre 3'e ayrılmıştır.

Grup 1'i ultrasonografide hepatosteatoz teşhisi konulmuş ve ALT seviyesi yüksek olan bireyler oluşturmaktadır. Grup 1'i oluşturan hasta sayısı 35'tir. (n=35)

Grup 2'yi ultrasonografide hepatosteatoz teşhisi konulmuş ve ALT seviyesi normal olan bireyler oluşturmaktadır. Grup 2'yi oluşturan hasta sayısı 35'tür. (n=53)

Grup 3 ise sağlıklı kontrol grubundan oluşmaktadış. Grup 3'ü oluşturan hasta sayısı 45'tir (n=45).

Tüm hastaların serumlarından HA, TNF- α ve IL-6 düzeyleri ELISA yöntemiyle, AOPP ve MDA ise spektrofotometrik yöntemlerle çalışılmıştır.

3.1.1. Hastaların Çalışmaya Alınmama Kriterleri

1. Diabetes mellitus
2. Tip II diyabete neden olacak ilaçlara maruz kalma (steroidler gibi)
3. Hepatik enzim yüksekliği ve/veya hepatosteatoza neden olacak ilaçlara maruz kalma (steroidler, oral kontraseptifler, metotreksat, tetrasiklin, amiodoron gibi)

3.1.2. Hastaların Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Grup 1 ve 2 için ultrasonografi ile hepatosteatoz tanısı konulması
2. Tüm viral, otoimmün ve metabolik karaciğer bozukları gibi biyomarkerların negatif olması
3. Ethanol alınımlı olmaması

3.2. Deneyler

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Vorteks (Heidolf Reax 200, Labinco L 24)
- Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

- pH metre (Jenway)
- Su banyosu (Barnstead / lab-line)
- Santrifüj (Hermle Z 380K)
- Soğutmalı santrifüj (Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323 K)
- Orbital çalkalayıcı (Nüve SL 350)
- HITACHI U-2900 Spektrofotometre
- BIOTEK ELx50 ELISA plaka yıkayıcı
- BIOTEK ELx800 ELISA plaka okuyucu

Ayrıca araştırma laboratuvarında var olan ve biyokimyasal analizler için gerekli olan diğer malzemeler de kullanılmıştır.

3.2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sülfürik asit (H_2SO_4), Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), Monopotasyum fosfat (KH_2PO_4), Kloramin-T, Asetik asit (CH_3COOH), Potasyum iyodür (KI), 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), Trikloroasetik asit (TCA), Tiyoarbitürik asit (TBA), n-butanol.

3.2.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.2.3.1. Serum MDA Düzeylerinin Ölçümü

Lipit peroksidasyonu, daha önce de belirtildiği gibi serbest radikaller ile uyarılan membranlarda çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu kapsayan ve oksidatif hücre hasarının bir göstergesi olan zincir reaksiyonudur. Aktif oksijen türleri ve serbest radikaller son derece

kısa ömürlü oldukları için insanlarda oksidatif stresin direkt ölçümü zordur.¹²⁴ Bunun yerine, oksidatif süreç ürünleri ölçülmektedir.

Lipit peroksidasyonu ürünleri, geliştirilen bir yöntem¹²⁵ ile kanda MDA üretiminin bir göstergesi olarak ölçülmüştür. MDA' nın asidik koşullar altında tiyobarbitürik asit (TBA) reaktifi ile reaksiyonu sonucu pembe renkli bir ürün oluşmaktadır ve metod, oluşan pembe renk absorbansının 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü esasına dayanmaktadır. Sonuçlar, nmol MDA/ml olarak verilmiştir.

Reaktifler

- % 20 Trikloroasetik asit
- % 0.67 Tiyobarbitürik asit
- n-butanol
- 20 nmol/ml stok standart: 25 µl 1,1,3,3-tetraetoksipropan 100 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı. Bu karışımdan 1 ml alınarak %1 Sülfürik asit ile 50 ml' ye tamamlandı ve 2 saat oda ısısında bekletildi.

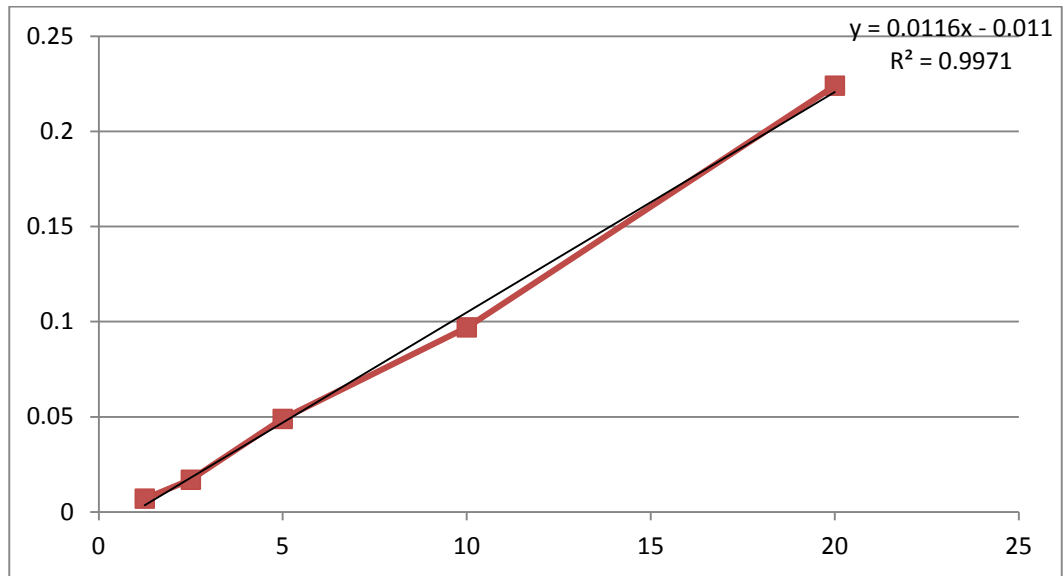
Deneyin Yapılışı

1. Standart olarak stok standarttan 0.625 nM, 1.25 nM, 2.5 nM, 5 nM, 10 nM 1,1,3,3 tetraetoksipropan (TEP) hazırlandı. % 20 TCA ve % 0,67 TBA çözeltileri hazırlandı.
2. Numune ve standartlar için tüpler hazırlandı. 125 µl serum ve standartlar üzerine sırasıyla; 625 µl TCA ve

250 µl TBA eklenerek vortekslendi. Tüpler, 90 °C' deki sıcak su banyosunda 30 dk bekletildi ve sonrasında hemen soğutuldu. Tüplere 1 ml n-butanol eklendi ve 3000 x g' de + 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi.

3. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 120 µl alınarak plaka kuyucuklarına konuldu ve spektrofotometrede n-butanole karşı 532 nm' de okundu.

4. Numunelerdeki MDA değerleri standart eğri üzerinden (Grafik 1) hesaplanarak, nmol/ml olarak ifade edildi.



Grafik 1: MDA Standart Eğrisi.

3.2.3.2. Serum AOPP Düzeylerinin Ölçümü

Serum AOPP düzeylerinin ölçümü Witko-Sarsat ve arkadaşlarının tanımladığı spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Metodun prensibi, plazma/serumda bulunan uzun ömürlü klorlu oksidanlar ile proteinlerin çapraz bağlama ürünlerinin, potasyum iyodürü oksitlemesi

ve açığa çıkan triiyodid iyonunun, 340 nm' de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle göre; AOPP oluşumu klorlu oksidanların (kloraminler ve hipokloröz asit gibi) oluşumu ile indüklenmektedir. Bu nedenle konsantrasyonu da bunlara korele olarak değişmektedir. AOPP konsantrasyonu ölçümünde bu ilişki nedeni ile Kloramin - T standart olarak kullanılmıştır.¹²⁶

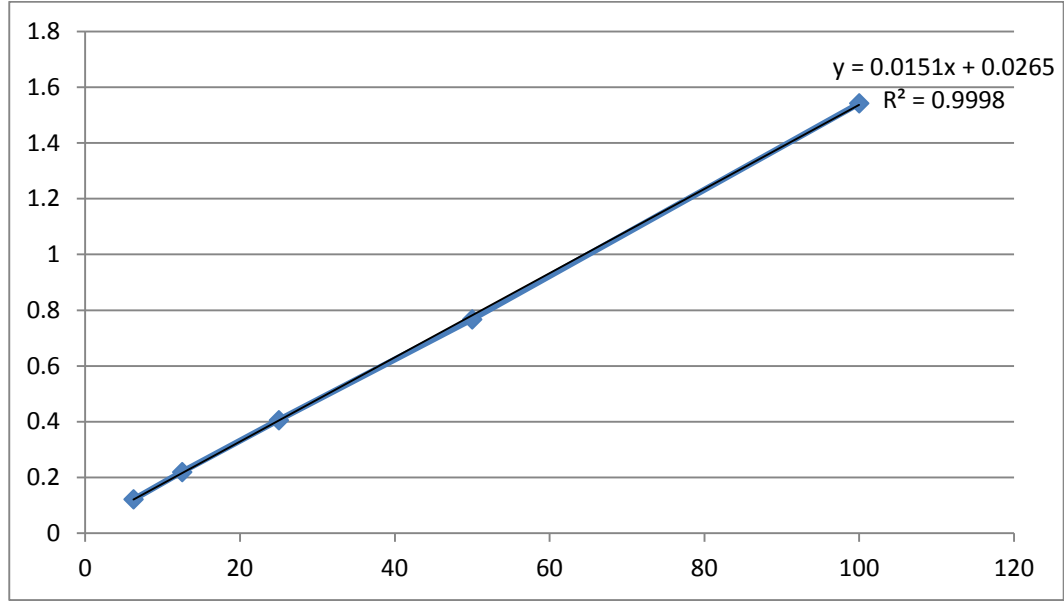
Reaktifler

- ✦ 20 mM PBS (Fosfat tampon solüsyonu, pH: 7,4)
- ✦ 1.16 M KI (Potasyum iyodür)
- ✦ Asetik asit % 100
- ✦ Kloramin-T (0-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda standart olarak hazırlandı).

Deneyin Yapılışı

1. 200 µl serum 1:5 oranında fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile dilüe edildi. Linearite sınırı üzerine çıkılmayan durumda, 40 µl serum üzerine 160 µl PBS reaktifi eklenip üzerine 10 µl KI ve 20 µl asetik asit eklenerek numuneler vortekslendi ve 340 nm absorbansta PBS'e karşı spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.
2. 100 µmol/l, 75 µmol/l, 50 µmol/l, 25 µmol/l, 12.5 µmol/l, 6.25 µmol/l' lik Kloramin - T standartları da numune gibi çalışıldı. Linearite sınırının üzerinde çıkan serumlar dilüe edilerek çalışıldı.

Sonuçlar standart eğri üzerinden (Grafik 2) hesaplanarak, $\mu\text{mol/l}$ kloramin eş değeri olarak ifade edildi.



Grafik 2: AOPP Standart Eğrisi.

3.2.3.3. Serum IL-6 Düzeylerinin Ölçümü

Serum IL-6 düzeyleri, Diasource marka hazır ticari elisa kiti (Katalog No: KAP1261) ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

Reaktifler

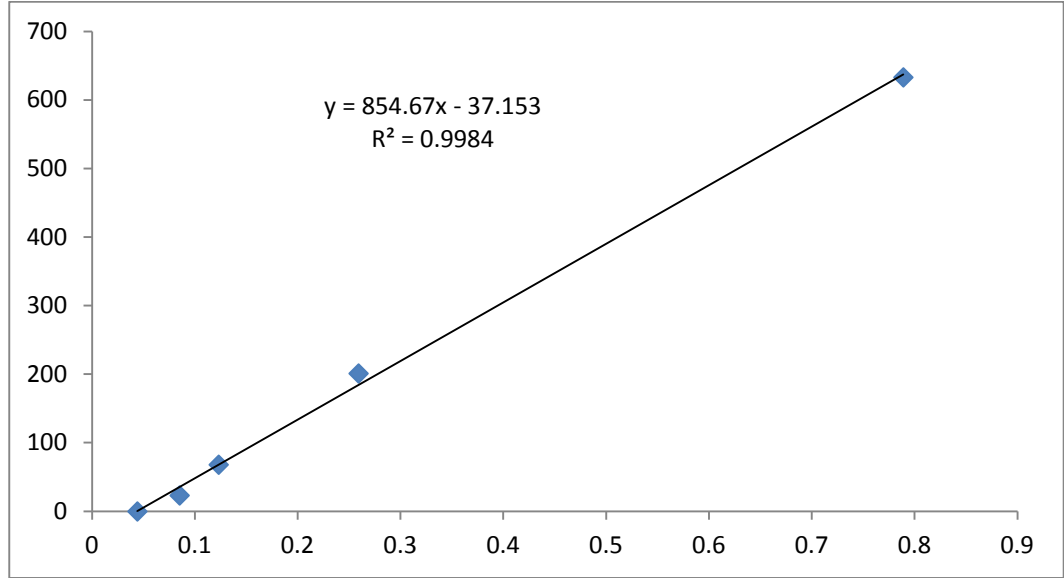
- ✦ Kalibratör (Her biri 1ml deiyonize su ile hazırlanacak olan altı adet kalibratör)
- ✦ Kontrol (Her biri 1ml deiyonize su ile hazırlanacak olan iki adet kontrol)
- ✦ Örnek seyreltici (Her biri vialler üzerinde yazan miktar kadar deiyonize su ile hazırlanacak olan üç adet örnek seyreltici)

- ✦ Yıkama solüsyonu (10 ml hacimli bir adet vial; 1990 ml deiyonize su eklenip magnet kullanılarak karıştırılır.)
- ✦ Konjugat (Kullanıma hazır 11 ml hacimli bir adet vial)
- ✦ İnkübasyon tamponu (Kullanıma hazır 11 ml hacimli bir adet vial)
- ✦ Kromojen TMB solüsyonu (Kullanıma hazır 25 ml hacimli bir adet vial)
- ✦ Durdurma solüsyonu (Kullanıma hazır 25 ml hacimli bir adet vial)

Çalışma Prosedürü

1. Tüm kuyucuklara 50 µl inkübasyon tamponu konulur.
2. Kalibratörler (0 pg/ml, 23.3 pg/ml, 68 pg/ml, 201 pg/ml, 633 pg/ml, 2560 pg/ml), kontroller (L ve H) ve tüm numunelerden 100 µl kuyucuklara konulur.
3. 1 saat oda ısısında, çalkalayıcıda inkübe edilir.
4. 400 µl Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılır.
5. Tüm kuyucuklara 100 µl anti-IL-6-HRP konjugat ve 50 µl örnek seyreltici konulur.
6. 1 saat oda ısısında, çalkalayıcıda inkübe edilir.
7. 400 µl Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılır.
8. Yıkamayı takiben, 15 dk içinde tüm kuyucuklara 200 µl kromojen koyulur.
9. 15 dk oda ısısında, karanlıkta, çalkalayıcıda inkübe edilir.
10. Tüm kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu konulur.
11. 450 nm ve 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır.

Sonuçlar standart eğri üzerinden (Grafik 3) hesaplanarak, pg/ml olarak ifade edildi.



Grafik 3. IL-6 Standart Eğrisi.

3.2.3.4 Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçümü

Serum TNF- α düzeyleri, Diasource marka hazır ticari elisa kiti (KAP 1751) ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

Reaktifler

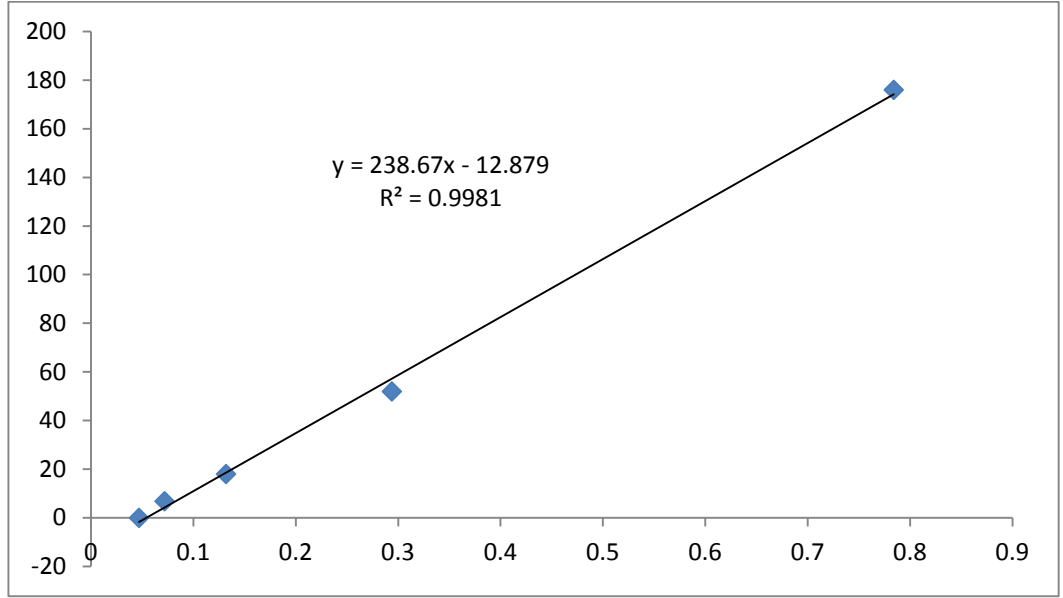
- ✦ Konjugat (Kullanıma hazır bir adet vial)
- ✦ Kalibratör (Her biri 1ml deiyonize su ile hazırlanacak olan beş adet kalibratör)
- ✦ Kontrol (Her biri 1ml deiyonize su ile hazırlanacak olan iki adet kontrol)
- ✦ İnkübasyon tamponu (Kullanıma hazır 6 ml hacimli bir adet vial)

- ✦ Yıkama solüsyonu (10 ml hacimli bir adet vial; 1990 ml deiyonize su eklenip magnet kullanılarak karıştırılır.)
- ✦ Kontrol (Her biri 1ml deiyonize su ile hazırlanacak olan iki adet kontrol)
- ✦ Kromojen TMB solüsyonu (Kullanıma hazır 25 ml hacimli bir adet vial)
- ✦ Substrat (Kullanıma hazır 21 ml hacimli üç adet vial)
- ✦ Durdurma solüsyonu (Kullanıma hazır 6 ml hacimli bir adet vial)

Çalışma Prosedürü

1. Tüm kuyucuklara 50 µl inkübasyon tamponu koyulur.
2. Kalibratörler, kontroller ve tüm numunelerden 200 µl kuyucuklara konulur.
3. 2 saat oda ısısında, çalkalayıcıda inkübe edilir.
4. 400 µl Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılır.
5. Tüm kuyucuklara 100 µl kalibratör konulur.
6. Tüm kuyucuklara 50 µl anti-TNF- α -HRP konjugat konulur.
7. 2 saat oda ısısında, çalkalayıcıda inkübe edilir.
8. 400 µl Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılır.
9. Yıkamayı takiben, 15 dk içinde tüm kuyucuklara 200 µl 200 µl yeni hazırlanmış revelation solüsyonu konulur.
10. 30 dk oda ısısında, karanlıkta, çalkalayıcıda inkübe edilir.
11. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu koyulur.
12. 450 nm ve 490 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapılır.

Sonuçlar standart eğriden (Grafik 4) hesaplanarak, ng/ml olarak ifade edildi.



Grafik 4: TNF-α Standart Eğrisi.

3.2.3.5. Serum HA Düzeylerinin Ölçümü

Serum HA düzeyleri, Cusabio marka hazır ticari elisa kiti (Katalog No: CSB-E04805h) ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

Reaktifler

- Standart (2 adet) (10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.312 ng/ml, 0.156 ng/ml, 0 ng/ml' lik standartların oluşturulması için Örnek seyreltici ile dilüsyon yapılır.)
- Biotin-antikör (1x120 µl) (Biotin-antikör çalışma solüsyonu hazırlamak için; Biotin-antikör 1:100

oranında dilüe edilecek şekilde 20 µl biotin-antikör üzerine 1980 µl Biotin-antikör seyreltici eklenir.)

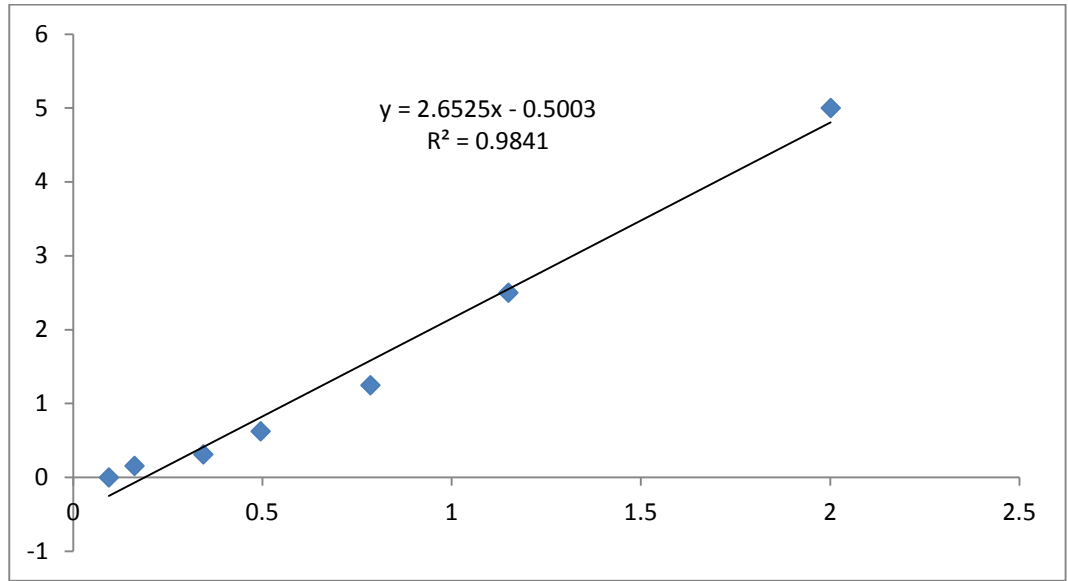
- HRP-avidin (1x120 µl) (HRP-avidin çalışma solüsyonu hazırlamak için; HRP-avidin 1:100 oranında dilüe edilecek şekilde 20 µl HRP-avidin üzerine 1980 µl HRP-avidin seyreltici eklenir.)
- Biotin-antikör seyreltici (1x10 ml)
- HRP-avidin seyreltici (1x10 ml)
- Örnek seyreltici (1x20 ml)
- Yıkama tamponu (1x20ml) (Yıkama solüsyonu hazırlamak için, Yıkama tamponu 1:25 oranında dilüe edilecek şekilde 20 ml yıkama tamponu üzerine toplamda 500 ml olacak şekilde 480 ml deiyonize su eklenir.)
- TMB substratı (1x10 ml)
- Durdurma solüsyonu (1x10 ml)

Çalışma Prosedürü

1. Standartlar, kör ve/veya tüm numunelerden 100 µl kuyucuklara konulur. Bant ile kapatılan plaka 37 °C' de 2 saat inkübe edilir.
2. Tüm kuyucuklardaki sıvı alınır, yıkama işlemi yapılmaz.
3. Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin-antikör çalışma solüsyonu konulur. Yeni bir bant ile kapatılan plaka 37 °C' de 1 saat inkübe edilir.
4. 200 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılır.
5. Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin-avidin çalışma solüsyonu konulur. Yeni bir bant ile kapatılan plaka 37 °C' de 1 saat inkübe edilir.

6. 1 saat oda ısısında, çalkalayıcıda inkübe edilir.
7. 200 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapılır.
8. Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat konulur. Yeni bir bant ile kapatılan plaka 37 °C' de 1 saat inkübe edilir.
9. Yeni bir bant ile kapatılan plaka 37 °C' de 15 – 30dk karanlıktan korunarak inkübe edilir.
10. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu konulur.
11. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır.

Sonuçlar standart eğriden (Grafik 4) hesaplanarak, ng/ml olarak ifade edildi.



Grafik 5: HA Standart Eğrisi.

3.2.3.6. Serum İnsulin Düzeylerinin Ölçümü

Hazır ticari kitlerle Abbott Architect i2000 cihazında, çalışılmıştır.

3.2.3.7. Kan Şekeri Ölçümü

Kan şekeri değerleri retrospektif olarak hasta dosyalarından temin edilmiştir.

3.2.3.8. İnsülin Direnci Hesaplanması

İnsülin direnci HOMA-IR yöntemi ile hesaplanmıştır.

HOMA-IR: Açlık insülin(U/L)xAçlık glukoz(mmol/L) /22.5

2.5 ve üstü değer çıkanlarda insülin direnci olduğu kabul edilmiştir.

3.3. Veri Analizi

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve tablonun oluşturulması amacıyla SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 18.0 kullanılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ilk olarak parametrik test koşullarının (denek sayısı ve normal dağılıma uygunluğunun) sağlanıp sağlanmadığı Shapiro-Wilk testi ile araştırıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Verilerin karşılaştırmalarında Kruskal Wallis varyans analizi, ikili karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bütün istatistiksel analizlerde önemlilik seviyesi (anlamlılık düzeyi) olarak $p<0.05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

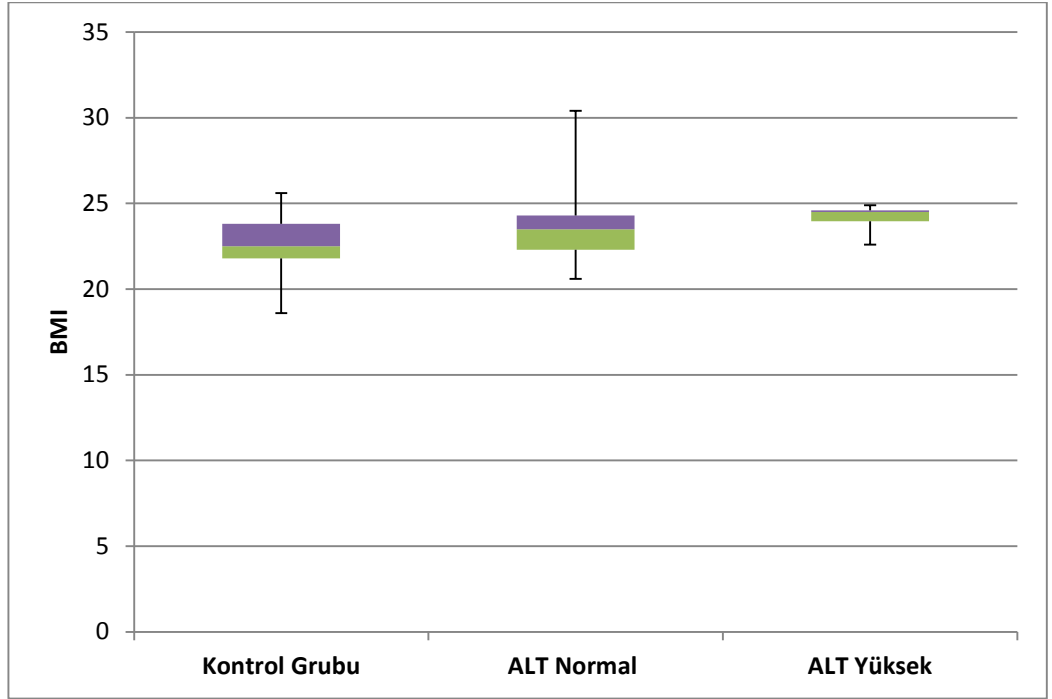
Çalışmamızda nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT yüksek olan hastalar grup1'i, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT normal olan hastalar ise grup 2'yi oluşturdu. Bilinen sistemik hastalığı olmayan, fizik muayenesi, karaciğer fonksiyon testleri normal olan ve USG'de steatoz olmayan hastalar ise kontrol grubu olarak çalışıldı.

Çalışmamızdaki her 3 gruba ait MDA, AOPP, IL-6, TNF- α ve HA düzeylerinin yer aldığı istatistiksel sonuçlar Tablo 2' de gösterilmektedir.

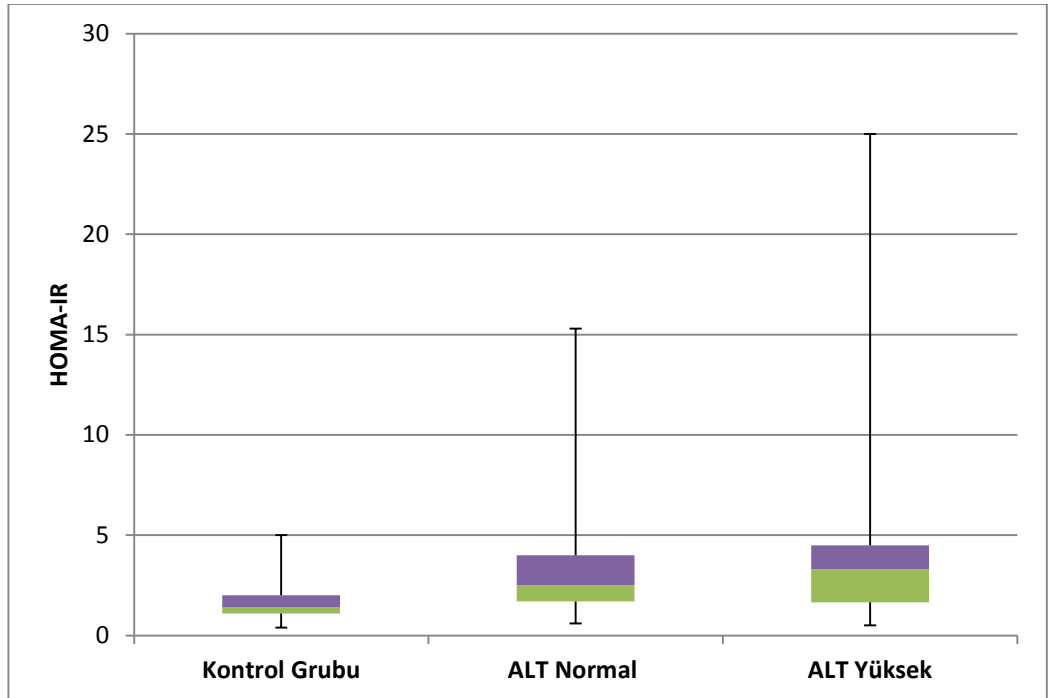
Tablo 2: Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının klinik ve biyokimyasal değişkenleri. (Sonuçlar medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir. *p<0.05 kontrol grubuna göre, **p<0.05 ise ALT normal grubuna göre anlamlıdır)

	NAYKH		Kontrol, n=45 Med (min-max)
	ALT normal, n=53 Med (min-max)	ALT yüksek, n=35 Med (min-max)	
Yaş	61 (22-80)*	45 (23-73)*, **	32 (20-68)
BMI	23.50 (20.60-30.40)*	24.50 (22.60-24.90)*, **	22.50 (18.90-24.90)
MDA (nmol/mL)	1.70 (0.5-5.90)	2.0 (0.9-3.70)*	1.55 (0.30-3.00)
AOPP (µmol/L)	40.20 (13.0-88.20)	39.10 (21.80-97.70)	30.65 (11.90-87.30)
IL-6 (pg/mL)	19.30 (10.70-41.50)*	21.00 (11.60-244)*, **	17.95 (11.60-33.80)
TNF-α (pg/mL)	5.74 (0.96-14.81)*	5.5 (1.68-16.0)*	3.83 (0.73-12.18)
HA (ng/mL)	0.39 (0.24-2.01)	0.47 (0.21-1.74)*, **	0.33 (0.26-1.77)
HOMA-IR	2.5 (0.7-15.30)*	3.3 (0.5-25)*	1.4 (0.6-2.40)

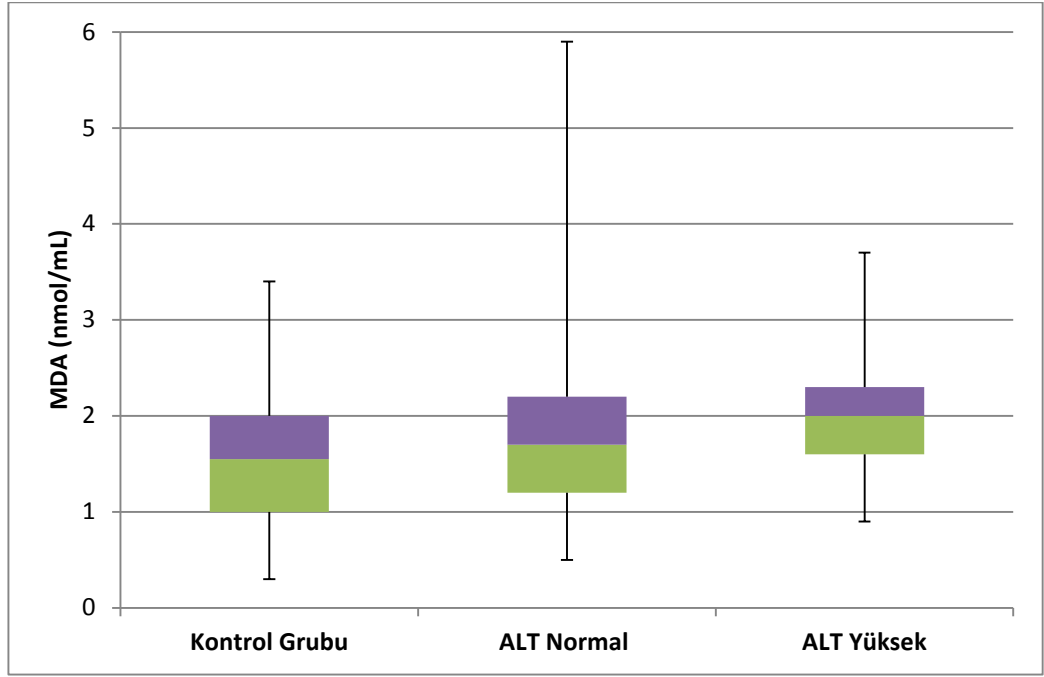
Serum AOPP düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0.05$). Oksidatif stres belirteçlerinden MDA düzeyleri grup 1'de yüksek, konvansiyonel inflamasyon belirteçlerinden HA grup 1'de, IL-6 ve TNF-α ise grup 1 ve 2'de yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Her iki hasta grubuna ait HOMA-IR değerleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).



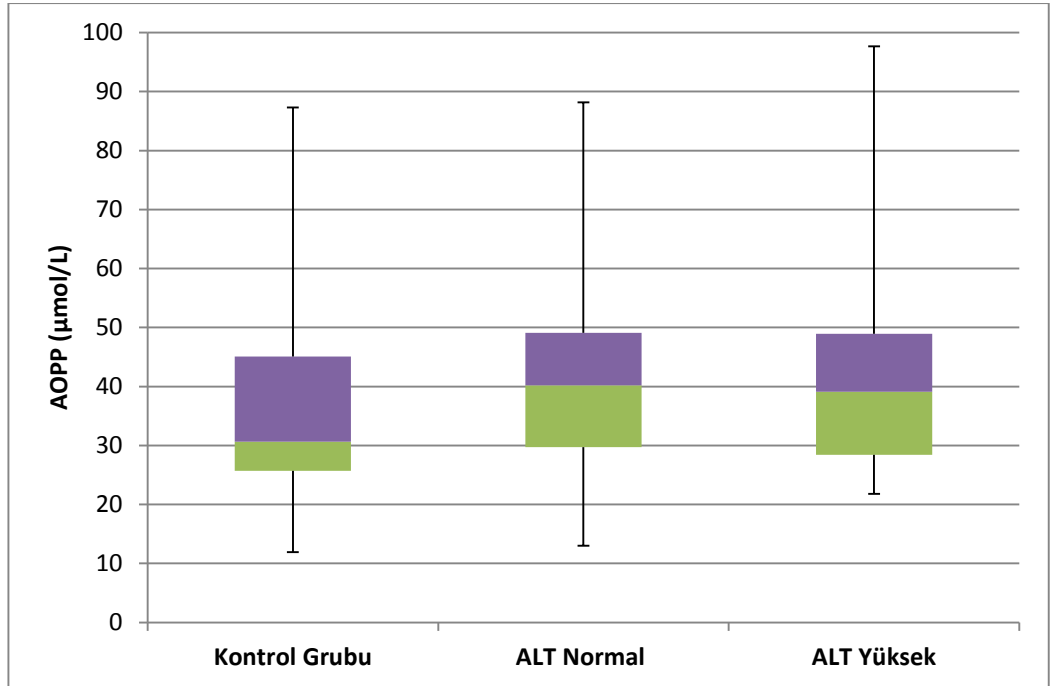
Grafik 6: BMI'nın gruplar arasındaki farkı.



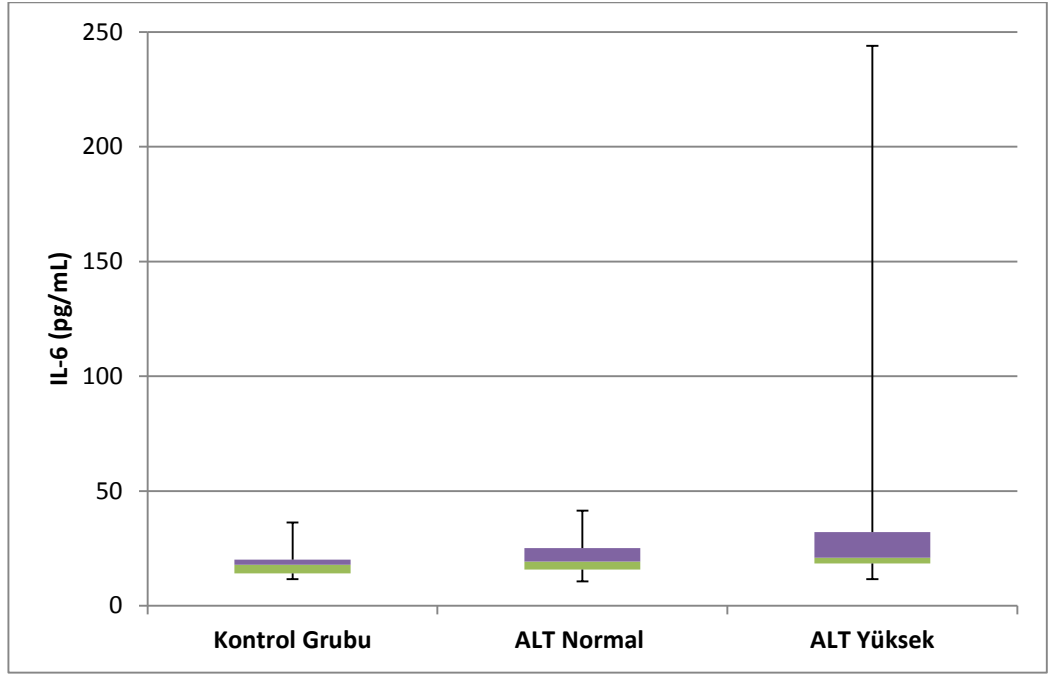
Grafik 7: HOMA-IR'nin gruplar arasındaki farkı



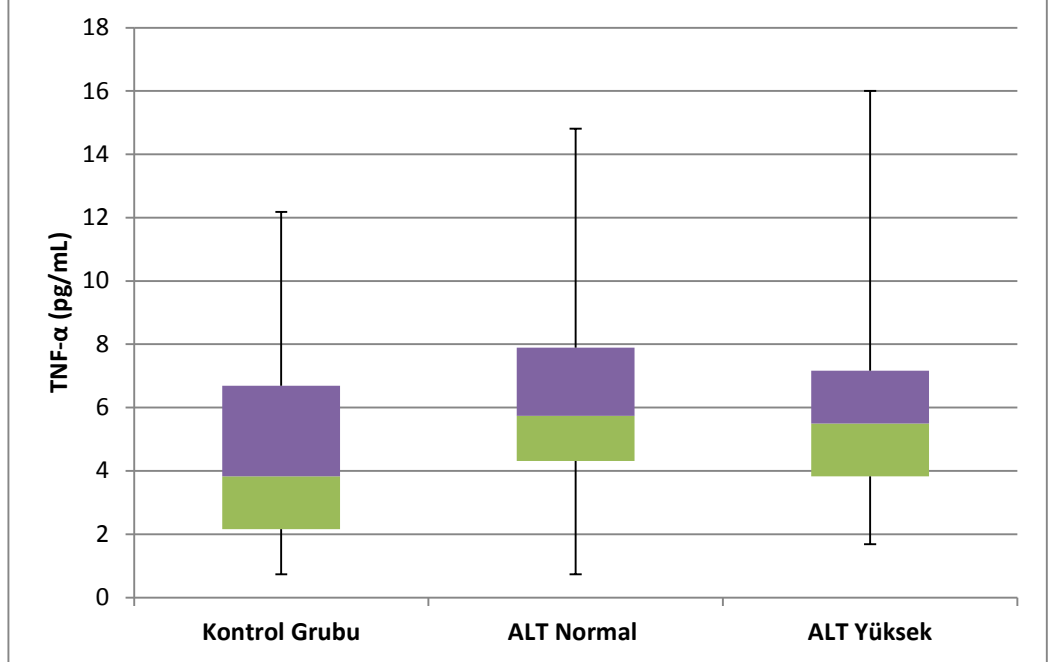
Grafik 8: Serum MDA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı.



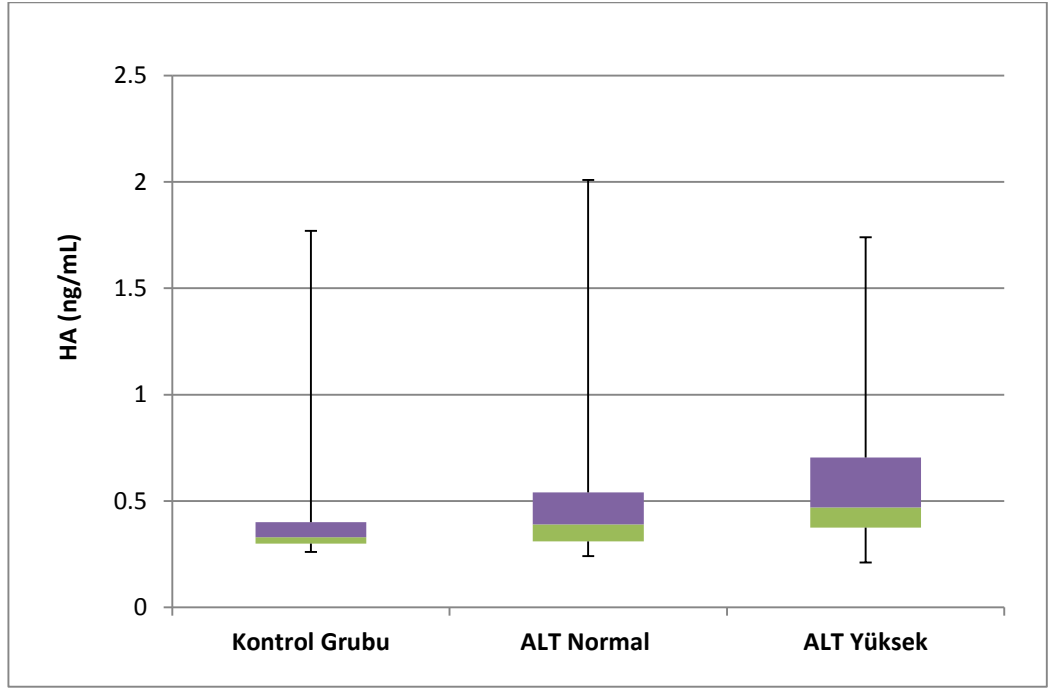
Grafik 9: Serum AOPP düzeylerinin gruplar arasındaki farkı.



Grafik 10: Serum IL-6 düzeylerinin gruplar arasındaki farkı.



Grafik 11: Serum TNF-α düzeylerinin gruplar arasındaki farkı.



Grafik 12: Serum HA düzeylerinin gruplar arasındaki farkı.

5. TARTIŞMA

Karaciğerde santral rol oynayan majör metabolitler; glukoz, yağ asitleri ve kolesteroldür. Obezite periferel dokularda insülin direncinin artışına neden olarak karaciğerde yağ birikimine ve bunun sonucunda nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAYKH) ilerlemesine yol açmaktadır. NAYKH, karaciğerde yağ artışı ve yağ asitlerinin alımının artışı ile karakterize edilmekte ve hastalığın ilerlemesi ile birlikte nonalkolik seteatohepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya neden olmaktadır. Karaciğerde yağ birikimi serbest yağ asitlerinin karaciğere alınımının artışına neden olarak, β oksidasyonunun bozulması ile sonuçlanmaktadır.¹²⁷

NAYKH'da mitokondrial fonksiyon bozukluğu da insülin artışı ile ilişkilendirilmektedir. Karaciğerde yağ asidinin alımındaki artış yağ asidi β oksidasyonun artışına neden olmakta¹²⁸ ve yağ asitlerinin de novo sentezi karaciğerde hepatik steatoza büyük katkı sağlamaktadır.¹²⁹ Sonuç olarak lipit klerensindeki azalış insülin direncinde ciddi bozukluğa yol açmaktadır.¹³⁰

NAYKH çeşitli ülkelerde genel nüfusun %10–24'ünü etkilemektedir. Prevalans %57.5'e, hatta obez kişilerde %74'e kadar yükselmektedir.²² NAYKH çocukların %2.6'sında, obez çocukların ise %22.5 ile %52.8'inde görülmektedir.²⁹

NAYKH sıklıkla kan anomalileriyle belirlenen bir hastalıktır. Özellikle NAYKH sonrasında karaciğer harabiyeti sonucunda aminotransferaz enzimler %90 oranında yükselmektedir.¹³¹ Clark ve arkadaşları randomize yaptığı çalışmada ABD'nin genel popülasyonunun %5,4'ünde aminotransferaz enzim yüksekliği tespit ederlerken,

hipertransaminaz tanısı konulan hastaların %80-90'ında NAYKH'nın artmış olduğunu bildirmiştir.¹³²

NAYKH'nın hem hepatik, hem de adipoz dokuda insülin direnciyle güçlü bir ilişkisi vardır. NAYKH'da insülin direncinin yüksekliği birçok çalışmada gösterilmiştir.^{133,134,135} İnsülin duyarlılığı sadece kaslarda değil aynı zaman karaciğer ve yağ dokuda azaldığı bildirilmiştir.^{43,47,136} İnsülin direnci, hiperinsülinemiye neden olarak hormona duyarlı lipoprotein lipazı uyarır ve lipoliz artar. Bunun sonucunda karaciğer yağ asidi alımı artmaktadır. Kanda artmış olan insülin β oksidasyonu engelleyerek ve glikolizi uyararak yağ sentezini artırır. Aynı zamanda serum insülin yüksekliği karaciğerde yağ asitlerinin trigliseritlerle esterleşmesini ve karaciğerde salınımını azaltır. Böylece insülin direnci NAYKH gelişiminde esas mekanizmayı oluşturmaktadır.³⁷

Ghamar ve arkadaşları NAYKH'da serum ALT seviyesi artışının dislipidemi ile ilişkili olmadığını fakat insülin direnciyle bağımsız olarak ilişkili olduğunu belirtmiştir. Benzer sonuçlar Oh ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir.¹³⁷ Oh ve arkadaşları serum ALT seviyesinin yüksek olduğu NAYKH hastalarında santral obezitenin prevelans değeri %30.7, trigliserit azalışının prevelans değeri % 32, HDL azalışının prevelans değeri %22.6, kan basıncı yükseliğinin prevelans değeri % 28.1 ve glukoz artışının prevelans değerinin %29 olduğunu belirlemişlerdir.¹³⁸ Hickman ve arkadaşları NAYKH hastalarında kilo kaybı ve egzersiz ile birlikte serum ALT ve insülin direncinin anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir.¹³⁹ Bulgular, santral obezite ile birlikte artan insülin direncinin NAYKH'da önemini vurgulamaktadır. Benzer şekilde serum ALT seviyesi yüksekliği de NAYKH'da önemlidir fakat insülin direnci ile ALT serum seviyesi ilişkisinin bağımlı olup olmadığı irdelenmelidir.

Çalışmamızda nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT yüksek olan hastalar (Grup1) ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT normal olan hastalar (Grup 2)' da insülin direnci, kontrol grubu ile kıyaslandığı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bizim bulgularımız Ghamar ve arkadaşları, Oh ve arkadaşlarını desteklemektedir. Farklı bir yoldan her iki grupta da insülin direncinin anlamlı olarak yükselişindeki bulgularımız, NAYKH'da insülin direnci ile serum ALT seviyesinin yüksekliğinin bağımsız olduğunu vurgulamaktadır. Bu yönüyle bulgularımız Ghamar ve arkadaşlarını desteklemektedir.

Hiyaluronik asit (HA), glukuronik asit ve N-asetilglukozamin'den oluşan disakkarid ünitelerinden meydana gelmiş doğal bir linear polisakkariddir.⁷⁷ İlerlemiş karaciğer hasarındaki azalan sinüzoidal endotel hücre fonksiyonu hyaluronat reseptörünün azalmasıyla, serum HA seviyesini artırabilmektedir.⁷⁸ Ayrıca endotel hücrelerindeki HA azalması serum HA seviyesini azaltmaktadır.⁷⁹ Serum HA seviyesi hepatik fibrozis ilerlemesiyle birlikte artmaktadır.⁸⁰ Bu yönüyle, NAYKH hastaları arasında serum HA'nın belirlenmesinin hepatik fibrozis için iyi bir belirteç olduğu belirtilmektedir.⁸³

Suzuki ve arkadaşları ile Pawitpok ve arkadaşları basit steatozdan fibrozise doğru hastalığın ilerleyişi ile serum HA ve ALT seviyesinin birlikte arttığını göstermiştir. ALT/AST oranının 1'den büyük olması fibrozise ilerleyişini gösteren değerin paralel olarak arttığını göstermiştir.^{77,140} Öte yandan Kaneda ve arkadaşları fibrozisden şiddetli fibrozise doğru serum HA artışı ile birlikte serum ALT seviyesinin arttığını gözlemlemiştir.¹⁴¹

Bizim çalışmamızda hastaların biyopsi örnekleri yoktu, bu yüzden fibrozisi değerlendiremedik. Ancak bizim sonuçlarımıza göre serum HA seviyesinin kontrol grubuna göre Grup 1'de anlamlı olarak

yükseldiğini ($p<0.05$) gözlemlerken, Grup 2'de farkın anlamlılığı arasında herhangi bir ilişki saptamadık. Bu sonuçlarımız NAYKH'da serum HA seviyesi ile birlikte serum ALT seviyesinin birbirine bağımlı olarak yükseldiğini göstermektedir. Bu bulgular; Suziki ve arkadaşları, Pawitpok ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

TNF- α malign ve enfeksiyon varlığında başlıca yağ dokusunda sentezlenen ve salınan proinflamatuvar sitokindir. İnflamasyonun dışında hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis gibi görevleri vardır.⁶⁵ TNF- α artışı insülin direnci ile birlikte hem obez hayvan modellerinde hem de obez insanlarda gösterilmiştir.^{66,67} İnterlökin-6 (IL-6) yaklaşık 26 kD'luk bir sitokin olup, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilmektedir. IL-6'nın plazma serbest yağ asitlerinin artışına neden olabileceği ve böylelikle insülin direncinin artışına ve adiponektin sekresyonun azalmasına etki edebileceği söylenmiştir.⁶⁵

Loguercio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anormal yüksek serum ALT seviyesi gösteren NAYKH hastalarında insülin direnci ile birlikte TNF- α ve IL-6 gibi inflamasyon parametrelerinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir.¹⁴² Wong ve arkadaşları 52 farklı karaciğer hastalığı gösteren hastaların arasından seçtiği basit steatoz gösteren 13 hastanın 3 yıllık değişimini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda basit steatozdan, NASH sınırında olanlar ve NASH tanısı konulan hastalarının farklı yüzdeleri verilmiştir. NASH ilerleyişi ile birlikte serum ALT seviyesinin artışı ve insülin direnci, TNF- α ve IL-6 gibi değerlerin arttığını gözlemişlerdir.¹⁴³ Fakat bu çalışmalarda ALT seviyesi artışının TNF- α ve IL-6'ya bağımlı olup olmadığına dair herhangi bir ilişkiye değinilmemiştir.

Biz çalışmamızda Grup 1 ve Grup 2 de IL-6, TNF- α değerinin kontrol grubuna anlamlı olarak arttığını gözlemledik ($p<0.05$). Bu şekilde

NAYKH'da serum ALT seviyesinin artışı ile, insülin direncinde olduğu gibi, TNF- α ve IL-6 artışı arasında bağımsız bir ilişki olduğunu saptadık. Bulgularımız, insülin direncinin artışı ile inflamasyon parametrelerinin artışının gözlenmesi ile diğer çalışmalara uyumluluk göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır.¹⁰⁷ Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.¹⁰⁸ Lipid peroksidasyonun ürünlerinin derecesi steatotik karaciğer tayini açısından önemlidir. MDA, steatoz durumuna kıyasla NASH hastalarında %90 oranında artmaktadır.¹¹⁵

Albano ve arkadaşları oksidatif stres sonucunda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın, NAYKH'dan fibrozise ya da siroza ilerleyişinde anlamlı şekilde arttığını göstermiştir. Serum ALT seviyesinin NASH hastalarında steatoza göre yükseldiğini fakat siroz hastalarında her iki gruba göre düşük olduğunu gözlemlemiştir.¹⁴⁴ Araya ve arkadaşları, serum MDA seviyesinin steatoz ve NASH hastalarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiğini gözlemlemişler fakat bu gruplarda serum ALT seviyesi farkın anlamlılığını saptayamamıştır.¹⁴⁵ Benzer sonuçlar, Malaguarnera ve arkadaşları tarafından da gözlemlenmiştir. Malaguarnera ve arkadaşları da serum lipid peroksidasyon ürünü seviyesinin steatoz ve NASH hastalarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiğini gözlemlemiştir. Aynı zamanda serum ALT seviyesinin steatoz ve NASH hastalarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiğini göstermiştir.¹⁴⁶ Bu durum serum ALT seviyesi için her iki çalışmada da çelişki göstermektedir.

Bizim sonuçlarımıza göre serum MDA seviyesinin kontrol grubuna göre Grup 1'de anlamlı olarak yükseldiğini ($p<0.05$) gözlemlerken, Grup 2'de farkın anlamlılığı arasında herhangi bir ilişki saptamadık. Bizim bulgularımız serum ALT seviyesinin için Araya ve arkadaşları yaptığı çalışma ile çelişirken Malaguarnera ve arkadaşları yaptığı çalışmayla uyumludur. Bizim bulgularımız diğer çalışmalardan farklı olarak NAYKH'da serum MDA seviyesi ile birlikte serum ALT seviyesi değerinin yükseldiğini göstermektedir.

Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonlar bozulmaktadır. Protein yapısındaki hasarın gösterilmesi için, protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir.¹⁰⁷ Protein oksidasyonunun belirteci olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır.¹¹⁸ Karaciğer yağlanmasında lipid peroksidasyonun yanısıra oksidatif stres sonucunda proteinler de hasara uğramaktadır.¹²⁰

Literatürleri taradığımızda bu zamana kadar yağlı karaciğer hastalığında ileri protein oksidasyon ürünü olan AOPP seviyesinin çalışıldığı bir makaleye rastlamadık fakat farklı protein karboksilasyon ve oksidasyon ürünlerinin NAYKH'da arttığı bildirilmiştir.^{145,147} Araya ve arkadaşları protein karboksilasyonun NAYKH ve NASH hastalarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiğini gözlemlemişler fakat bu gruplarda serum ALT seviyesi farkın anlamlılığını belirleyememiştir.¹⁴⁵ Videla ve arkadaşları protein oksidasyonunun NAYKH hastalarında, NASH ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiğini göstermiştir.¹⁴⁷ Iwamoto ve arkadaşları, ROT'un artışı sonucunda enzimatik olmayan protein ve şekerler arasında gerçekleşen glikasyon reaksiyonunun son

ürününü (Advanced glycation end products -AGEs) NASH'da belirgin olarak arttığını gözlemlemiştir.¹⁴⁸

Biz çalışmamızda NAYKH'da Grup 1 ve Grup 2 serum AOPP seviyesinin kontrol grubuna göre farkın anlamlılığını gözlemleyemedik ($p>0.05$). Çalışmadan önce beklentimiz serum AOPP seviyesinin yükseleceği yönündeydi. Çünkü oksidatif stres sonucunda lipit peroksidasyonu gibi protein oksidasyonu da artmaktadır. Bizim çalışmamızda serum AOPP seviyesinin NAYKH'da istatistiksel olarak artmamasının nedeni olarak ROT artışı sonucunda protein ürünlerinin glikasyon reaksiyonuna girdiği şekilde yorumlanabilir.

Çalışmamızda nonalkolik karaciğer hastalığında ALT düzeylerine göre sınıflandırılmış hasta gruplarında

- 1- AOPP'ye ilave olarak AGEs düzeylerinin bu hasta grubunda proteinlerin oksidasyonunu göstermek için daha uygun olduğu,
 - 2- HA ve MDA'nın ALT yüksekliğine bağımlı olarak arttığı,
 - 3- TNF- α , IL-6 serum düzeylerinin ise ALT düzeylerinden bağımsız olarak yükseldiği
- sonuçlarına varılmıştır.

NAYKH 'da karaciğer biyopsisi gibi bir invaziv yöntemle hastalığın prognozunu değerlendirmek en uygunudur. Ancak son yıllarda non invaziv yöntemlerle prognozu belirleme çalışmaları önem kazanmıştır. ALT yüksekliği veya HA düzeyleri prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre MDA düzeyleri de ALT yüksekliği ve HA yüksekliği gibi prognoz açısından değerli bir parametre olabilir. Hedefimiz sonraki çalışmamızda bu grup hastalarda karaciğer biyopsi örnekleri de alarak steatoz, steatohepatit, fibrozis ve hepatoselüler karsinoma gibi durumların ayırt edilmesinde MDA ve diğer biyokimyasal parametrelerin prognoz belirleyici gücünü araştırmaktır.

6. SONUÇ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), Dünya ve Türkiye’de toplumun büyük bir çoğunluğunu etkileyen, periferel dokularda insülin direncinin artışı ve ikincil olarak oksidatif stres ile birlikte karaciğerde yağlanmaya neden olan bir hastalıktır. NAYKH, serbest yağ asitlerinin karaciğere alınımının artışına neden olarak, β oksidasyonunda anormal artışa sebep olmaktadır. Bu anomalilerin artarak ilerlemesi ile birlikte nonalkolik steatohepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi daha tehlikeli hastalıklara yol açmaktadır.

NAYKH’da serum alanin aminotransferaz (ALT) sıklıkla yükselmektedir. Çalışmamızda nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT seviyesi normal olan hastalar Grup 1 (n=53), nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT seviyesi yüksek olan hastalar Grup 2 (n=35) olarak belirlenmiştir. Bu grupların inflamasyon ve oksidatif stres parametreleri, NAYKH belirtisi olmayan kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

İnsülin direnci NAYKH’da sıklıkla görülen bir durumdur. Çalışmamızda Grup 1 ve Grup 2’nin insülin direncinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlarımız NAYKH’da insülin direnci ile serum ALT seviyesinin yüksekliğinin bağımsız olduğunu göstermektedir.

Hiyaluronik asit (HA), glukuronik asit ve N-asetilglukozamin’den oluşan disakkarid ünitelerinden meydana gelmiş doğal bir linear polisakkariddir. Çalışmamızda serum HA seviyesinin kontrol grubuna göre Grup 2’de anlamlı düzeyde arttığını ($p<0.05$) gözlemlerken, Grup 1’de farkın anlamlılığı arasında herhangi bir ilişki saptamadık. Bu sonuçlarımız NAYKH’da serum HA seviyesi ile birlikte

serum ALT seviyesinin birbirine bağımlı olarak yükseldiğini göstermektedir.

Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) malign ve enfeksiyon varlığında başlıca yağ dokusunda sentezlenen ve salınan proinflamatuvar sitokindir. İnterlökin 6 (IL-6), mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilen proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokindir. Çalışmamızda Grup 1 ve Grup 2 de IL-6, TNF- α değerinin kontrol grubuna anlamlı düzeyde arttığını saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlarımız NAYKH'da serum ALT seviyesinin artışı ile TNF- α ve IL-6 artışı arasında bağımsız bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülen ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılan bir belirteçtir. Çalışmamızda serum MDA seviyesinin kontrol grubuna göre Grup 2'de anlamlı düzeyde arttığını ($p<0.05$) gözlemlerken, Grup 1'de farkın anlamlılığı için herhangi bir ilişki saptamadık. Bu sonuçlarımız NAYKH'da serum MDA seviyesi ile birlikte serum ALT seviyesinin birbirine bağımlı olarak yükseldiğini göstermektedir.

AOPP, protein oksidasyonunun belirteci olan ileri oksidasyon protein ürünüdür. Çalışmamızda NAYKH'da Grup 1 ve Grup 2 serum AOPP seviyeleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

Çalışmamızda nonalkolik karaciğer hastalığında ALT düzeylerine göre sınıflandırılmış hasta gruplarında

- 1- AOPP'ye ilave olarak AGEs düzeylerinin bu hasta grubunda proteinlerin oksidasyonunu göstermek için daha uygun olduğu,
- 2- HA ve MDA'nın ALT yüksekliğine bağımlı olarak arttığı,

3- TNF- α , IL-6 serum düzeylerinin ise ALT düzeylerinden bağımsız olarak yükseldiği sonuçlarına varılmıştır.

NAYKH'da karaciğer biyopsisi gibi bir invaziv yöntemle hastalığın prognozunu değerlendirmek en uygunudur. Ancak son yıllarda non invaziv yöntemlerle prognozu belirleme çalışmaları önem kazanmıştır. ALT yüksekliği veya HA düzeyleri prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre MDA düzeyleri de ALT yüksekliği ve HA yüksekliği gibi prognoz açısından değerli bir parametre olabilir. Hedefimiz sonraki çalışmamızda bu grup hastalarda karaciğer biyopsi örnekleri de alarak steatoz, steatohepatit, fibrozis ve hepatoselüler karsinoma gibi durumların ayırt edilmesinde MDA ve diğer biyokimyasal parametrelerin prognoz belirleyici gücünü araştırmaktır.

7. ÖZET

NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI TANILI BİREYLERDE KONVANSİYONEL İNFLAMASYON VE OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİNİN DÜZEYLERİ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) periferik dokularda insülin direncinin artışı ve ikincil olarak oksidatif stres ile birlikte karaciğerde yağlanmaya neden olan bir hastalıktır.

Bu çalışmada, NAYKH hastaları ALT seviyesinin yüksekliğine göre sınıflandırılmış, bu hastalığın patogeneğinde ve ilerlemesinde rolü olan oksidatif stres belirteçlerinden serum MDA, AOPP ve inflamasyon belirteçlerinden serum TNF- α , IL-6 ve HA seviyelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dispeptik semptom ya da rutin kontrol için başvuran non-obez ve non-diabetik toplam 133 birey dahil edilmiştir. Gruplar serum ALT seviyelerinin yüksekliği ve ultrasonografi bulgularına göre ayrılmıştır.

Çalışmamızda gruplar, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT seviyesi normal olan hastalar Grup 1 (n=53), nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı ve ALT seviyesi yüksek olan hastalar Grup 2 (n=35) ve bilinen herhangi bir sistematik hastalığı olmayan kontrol grubu (n=45) olarak belirlenmiştir.

Tüm hastaların serumlarından HA, TNF- α ve IL-6 düzeyleri ELISA yöntemiyle, AOPP ve MDA düzeyleri ise spektrofotometrik yöntemlerle çalışılmıştır.

Yapılan alışmalar sonucunda serum AOPP düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Oksidatif stres belirteçlerinden MDA ve inflamasyon belirteçlerinden HA düzeyinin ALT ykseklğine bağımlı olarak arttığı, TNF- α , IL-6 serum düzeylerinin ise ALT düzeylerinden bağımsız olarak yükseldiği ($p < 0.05$) sonuçlarına varılmıştır.

Bu sonuçların ışığında bu grup hastalarda karaciğer biyopsi örnekleri de alarak steatoz, steatohepatit, fibrozis ve hepatoselüler karsinoma gibi durumların ayırt edilmesinde MDA ve diğer biyokimyasal parametrelerin prognoz belirleyici gücünün araştırılmasını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, ALT, Oksidatif stres, MDA, AOPP, İnfamasyon, IL-6, TNF- α , HA.

8. SUMMARY

CONVENTIONAL INFLAMATION AND OXIDATIVE STRESS MARKERS OF THE NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE DIAGNOSED PATIENTS

Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a condition which causes increased insulin resistance at peripheral tissues, and secondly causes fatty liver with oxidative stress.

In this study, NAFLD patients are grouped according to their ALT levels. The aim of this study is to compare the levels of serum MDA and AOPP -which are oxidative stress markers that have a role at the pathogenesis and the progression of the disease- with serum TNF- α , IL-6, and HA levels -which are inflammation markers-.

A total of 133 non-obese and non-diabetic individuals are included in this study who applied clinics with dyspeptic symptom or for routine control. Groups are categorized according to their serum ALT levels and ultrasonography findings.

The groups are formed as follows: Nonalcoholic fatty liver disease diagnosed patients with normal ALT levels as Group 1 (n=53), nonalcoholic fatty liver disease diagnosed patients with high ALT levels as Group 2 (n=35) and the control group which includes individuals without any known systematic disease (n=45).

HA, TNF- α , and IL-6 serum levels of all patients are studied by using ELISA method; AOPP and MDA levels are studied by using spectrophotometric methods.

Results indicate that serum AOPP levels are not statistically significantly different between groups ($p>0.05$). On the other hand MDA and HA levels increased significantly depending on high ALT levels while TNF- α , IL-6 serum levels increased significantly independent of ALT levels ($p<0.05$).

In conclusion, we suggest that the prognosis decisive power of MDA and other biochemical parameters should be investigated together with their liver biopsies, in order to differ between steatosis, steatohepatitis, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in this group of patients.

Keywords: Nonalcoholic Fatty Liver Disease, ALT, Oxidative Stress, MDA, AOPP, Inflammation, IL-6, TNF- α , HA.

9. KAYNAKLAR

1. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41.
2. Ludwig J, Viggiano TR, MCgill DB, Oh BC. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55(7): 434-8.
3. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21years. *Hepatology* 1990; 11(1): 74-80.
4. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease: Quadrennial review. *The Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 17: 186-190.
5. Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Lango D, Jameson JL. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Mc Graw-Hill Medical Publishing Division. Sixteenth Edition 2005; 1869-1870.
6. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-23.
7. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379.

8. Nomura H, Koshiwagi S, Hayashi J, Kojiyama W, Tani S, Goto M. Prevalance of fatty liver in general population of Okinawa Japan. *Jpn J Med* 1988; 27(2).
9. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 6.
10. Ananina FA. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2004; 4(1).
11. Tolman KG, Fonseca V, Ton MH, Dalplaz A. Narrative review: hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 141: 946-956.
12. Collantes R, Ong J, Younossi Z. Nonalcoholic fatty liver disease and the epidemic of obesity. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* . August 2004; 71(8).
13. Fernandez-Rodriquez C, Fernandez MTP, Lleda JL. Non-alcoholic steatohepatitis- A pathogenesis based therapeutic approach. Business Briefing: European Pharmacotherapy, Business Briefings Ltd, 2003.
14. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172(7).
15. Browning JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152.
16. Russo MW, Jacobson IM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Hospital Physician* 2002; 67: 36-41.

17. Sathya P, Martin S, Alvarez F. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in children. *Curr Opin Pediatr* 2002; 14: 593-600.
18. Roberts EA. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in children. *Front Biosci* 2005; 10: 2306-2318.
19. Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling C, Newbury R, Lavine JE. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003; 143: 500-505.
20. Lavine JE, Schwimmer JB. Nonalcoholic fatty liver disease in the pediatric population. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 549-558.
21. Manton ND, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AJ, Couper RTL. Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents. *Med J* 2000; 173: 476-479.
22. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 112-117.
23. Sheth SG, Gordon F, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of Internal Medicine* 1997; 126(2): 137-145.
24. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1349-1355.
25. Kral JG, Schaffner F, Pierson RN, Wang J. Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism* 1993; 42(5): 548-51.

26. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1929-1934.
27. Struben VMD, Hespenheide EE, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000; 108: 9-13.
28. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normalweight individual revisited. *Diabetes* 1998; 47: 699-713.
29. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity: an epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2002-2009.
30. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liv Dis* 2008; 28: 339-350.
31. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* 2011; 140: 124-131.
32. Marra F, Gastaldelli A, Baroni GS, Tell G, Tiribelli C, et al. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine* 2007; 14 : 72-81.
33. G. Reaven ve T. Strom. *Tip 2 Diyabet Sorular ve Cevaplar*. Satman I (Çev), Merit Publishing International; 2003.

34. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455.
35. Bugianesi E, Mccullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 2005; 42: 5.
36. Yenigün M, Altuntaş Y. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001.
37. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-59.
38. Utzschneider KM, Kahn SE. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(12): 4753-4761.
39. Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajcberg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA, et al. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E1135-E1143.
40. Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE, et al. Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* 2003; 26: 650-655.
41. Nieves DJ, Cnop M, Retzlaff B, Walden CE, Brunzell JD, Knopp RH, et al. The atherogenic lipoprotein profile associated with obesity and insulin resistance is largely attributable to intra-abdominal fat. *Diabetes* 2003; 52: 172-179.

42. Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC, et al. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285: 906-916.
43. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005; 48: 634-642.
44. Sanyal, AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192.
45. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175-1183.
46. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2002; 87: 3023-3028.
47. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and Type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007; 133: 496-506.
48. Petersen, KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance,

and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 603-608.

49. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 3023-3028.
50. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1494-1505.
51. Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, De lasio R, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 3498-3504.
52. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473-2476.
53. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, et al. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J.* 2007; 21: 53-60.
54. Huang W, Dedousis N, O'Doherty RM. Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. *J. Appl. Physiol.* 2007; 102: 2260-2265.

55. Marra F. Leptin and liver tissue repair: do rodent models provide the answers? *J. Hepatol.* 2007; 46: 12-18.
56. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114: 232-239.
57. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19: 291-302.
58. Chitturi S, Farrell GC, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403- 409.
59. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006; 131: 934-945.
60. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(2): 447-452.
61. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005; 174: 5789-5795.
62. Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1081-1086.

63. Higgins SC, Gueorguiev M, Korbonits M. Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann Med* 2007; 39: 116-136.
64. Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, et al. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: 228-235.
65. Başaranoğlu M, Neuschwander-Tetri B.A. Pathophysiology Of Nonalcoholic Steatohepatitis. New York: Nova Science Publishers; 2009.
66. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389: 610-614.
67. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2409-2415.
68. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose R. H, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211.
69. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat. Med.* 2000; 6: 998-1003.

70. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350.
71. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2111-2119.
72. Caldwell SH, Hespenheide EE, Redick JA, Lezzoni JC, Battle EH, Sheppard BL. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastro.* 2001; 96: 519-525.
73. Flack JM, Sowers JR. Epidemiologic and clinical aspects of insulin resistance and hyperinsulinemia. *Am J Med* 1991; 91: 11-17.
74. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 2001; 280: 745-751.
75. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J. Clin. Endo. Metab.* 2000; 85: 3338-3342.
76. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 2007; 56: 1010–1013.
77. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients

with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International* 2005; 25; 779-786.

78. Tamaki S, Ueno T, Torimura T, Sata M, Tanikawa K. Evaluation of hyaluronic acid binding ability of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996; 111(4): 1049-57.
79. Eriksson S, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Smedsrod B. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Exp Cell Res* 1983; 144(1): 223-8.
80. Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, Tamaki S, Koh H, Kin M, et al. Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology* 1993; 105(2): 475-81.
81. Plevris JN, Haydon GH, Simpson KJ, Dawkes R, Ludlum A, Harrison DJ, et al. Serum hyaluronan-oninvasive test for diagnosing liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(10): 1121-7.
82. Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Nishimura Y, Kawasaki H. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(5): 459-65.
83. Lebensztejn DM, Wierzbicka A, Socha P, Pronicki M, Skiba E, Werpachowska I, et al. Cytokeratin-18 and hyaluronic acid levels predict liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Abp Biochimica Polonica* 2011; 58(4): 563-566.
84. Sen CK. Antioxidant And Redox Regulation Of Cellular Signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 368-370.

85. Onat T, Emerk K, Szmen ET, editrler. Yaşlanma Biyokimyası- İnsan Biyokimyası. 1.Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi; 2002.
86. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fak. Derg. 2005; 3: 30-39.
87. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001; 31:1287–1312.
88. Abou-Seif MA, Youssef A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. Clinica Chimica Acta 2004; 346; 161-170.
89. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim.1998; 11: 336-341.
90. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. Clin Chim Acta. 2011; 412: 15-16.
91. Gören B, Fen T. Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005; 25: 841-850.
92. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 2002; 346(16): 1221-1231.
93. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16(5): 663-678.

94. Baskol G, Baskol M, Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non alcoholic steatohepatitis. Clin Biochem 2007; 40: 776-780.
95. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. N Engl J Med 2000; 343(20): 1467-1476.
96. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. World J Gastroenterol 2008; 14: 193-199.
97. Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. Cell Mol Life Sci 2001; 58: 737–747.
98. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: 1135–1139.
99. Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16:733–747.
100. Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. Nutrition 2003; 19: 457-466.
101. Chtioui H, Semela D, Ledermann M, Zimmermann A, Dufour JF. Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. Liver Int 2007; 27: 764-771.

102. Orellana M, Rodrigo R, Varela N, Araya J, Poniachik J, Csendes A, et al. Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatol Res* 2006; 34: 57-63.
103. Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996; 47(3): 233-261.
104. Gonzalez FJ, Peters JM, Cattley RC. Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1702–1709.
105. Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı. Konya; Mimoza Yayınları: 1995.
106. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.* 1996; 25: 57-74.
107. Zhu MJ, Sun LJ, Liu YQ, Feng YL, Tong HT, Hu YH, et al. Blood F2-isoprostanes are significantly associated with abnormalities of lipid status in rats with steatosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14(29): 4677-4683.
108. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 1996; 24: 200-208.

109. Oliveira CP, da Costa GLC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a cholinedeficient diet. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 399-406.
110. Zámbo V, Simon-Szabó L, Szelényi P, Kereszturi E, Bánhegyi G, Csala M. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol* 2013 Oct; 27(5): 550-557.
111. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*. 2009;284:14809-14818.
112. Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 2010; 285: 5748-5758.
113. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.
114. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9383-9387.

115. Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006; 44: 1167-1174.
116. Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med*. 2002 Mar 1; 32 5: 377-85.
117. Friedlander MA, Witko-Sarsat V, Nguyen AT, Wu YC, Labrunte M, Verger C, et al. The advanced glycation end product pentosidine and monocyte activation in uremia. *Clin Nephrol*. 1996; 45: 379-382.
118. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K.. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62.
119. Nobili V, Manco M. Measurement of advanced glycation end products may change NASH management. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1354-1355.
120. Iwamoto K, Kanno K, Hyogo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Tazuma S, et al. Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 2008;43(4):298–304.
121. Takino J, Kobayashi Y, Takeuchi T. The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J Gastroenterol* 2012; 45(6): 646-655.

122. Joseph A, Saverymuttu S, Al-Sam S et al. Comparison Of Liver Histology With Ultrasonography In Assessing Diffuse Parenchymal Liver Disease. Clin Radiol 1991; 43: 26-31.
123. Wedemeyer H, Manns MP. Fatty liver disease-It's more alcohol and obesity. 38th Annual Meeting of the European Association for the study of the liver 2003.
124. Pryor WA, Godber SS. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. Free Rad Biol Med 1991; 10: 177-184.
125. Yoshika T, Kawada K, Shimada T, Moru M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanisms against activated oxygen toxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol 1979; 135: 372-376.
126. Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drüeke TB. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uremia. Nephrol Dial Transplant 1999; 14(1) : 76-78.
127. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. Clin Mol Hepatol. 2013; 19: 210-215.
128. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. Diabetes Metab 2004; 30: 121-138.
129. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. J Clin Invest 2008;118:829-838.
130. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese

men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008; 134: 424-431.

131. Daniel S, Ben-Menachem T, Vasudevan G, Ma CK, Blumenkehl M. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3010-3014.
132. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 960-967.
133. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192.
134. Yki-Jarvinen H. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Dig. Dis.* 2010, 28, 203-209.
135. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 15430-15435.
136. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, Webb A, Hardies J, Darland C, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012, 55, 1389-1397.

137. Ghamar-Chehreh ME, Amini M, Khedmat H, Moayed Alavian S, Daraei F, Mohtashami R, et al. Elevated alanine aminotransferase activity is not associated with dyslipidemias, but related to insulin resistance and higher disease grades in non-diabetic non-alcoholic fatty liver disease. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2: 702-706.
138. Oh SY, Cho YK, Kang MS, Yoo TW, Park JH, Kim HJ, et al. The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2006; 55: 1604-1609.
139. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut.* 2004; 53: 413-419.
140. Pawitpok C, Kongtawelert P, Ua-arayaporn S, Punyarit P, Piyanirun W, Chutaputti A. Efficacy of Serum Hyaluronic Acid Level for Predicting Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Thai J Gastroenterol.* 2006; 7: 83-87.
141. Kaneda H, Hashimoto E, Yatsuji S, Tokushige K, Shiratori K. Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21: 1459-1465.
142. Loguercio C, De Simone T, D'Auria MV, de Sio I, Federico A, Tuccillo C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver. *Dig Liver Dis.* 2004; 36: 398-405.

143. Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010; 59: 969-974.
144. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut*. 2005; 54: 987-993.
145. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 106: 635-643.
146. Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, Arena N, Malaguarnera M. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Hepatol*. 2005; 42: 585-591.
147. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 106: 261-268.
148. Iwamoto K, Kanno K, Hyogo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Tazuma S, et al. Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol*. 2008; 43: 298-304.

10. EKLER

**UFUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ONAY FORMU**

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE BAŞVURU TARİH /SAYI▶	070220122
	ARAŞTIRMANIN ADI	Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Tanılı Bireyler ve Sağlıklı Kontrol Grubu Arasında Serum Anjiyopoetin like protein 2, Anjiyopoetin like protein 6, PCSK-9 ve Konvansiyonel İnflamasyon ve Oksidatif Stres Belirteçleri Düzeylerinin Karşılaştırılması
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI	Doç. Dr. Bülent Değertekin
	ARAŞTIRMANIN YERİ	Ufuk Üniversitesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	x
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU	x
	OLGU RAPOR FORMU	-
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	-
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ (varsa)	-

KARAR BİLGİLERİ	Değerlendirme amacıyla Fakültemiz Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Bülent Değertekin sorumluluğunda tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler 07.02.2012 tarihinde Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Değerlendirme Komisyonun' nda çalışma esasları doğrultusunda ve araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırma etiğine uygun tasarlanmış olmasından dolayı onay verilmesine oybirliği ile karar verilmiştir.
------------------------	---

KOMİSYON BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	E/K	İlişki*	Katılım**	İmza
Prof.Dr. Dikmen ARIBAL	Genel Cerrahi	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr. Halil DEĞERTEKİN	İç Hastalıkları	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr. Erdener TİMURKAYNAK	Beyin Cerrahi	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr. Selda DEMİRTAŞ	Biyokimya	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç.Dr. Handan DOĞAN	Patoloji	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç.Dr. Berrin YÜKSEL KONUK	Tıbbi Genetik	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Öğr.Gör.Dr.Şahika GÜNER	Tıbbi Farmakoloji	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Ecz. Nilgün SÜER		UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

E/K: Cinsiyeti;

*Araştırmayla ilişkisi;

** Toplantıda bulunma

11.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışma sürecimde derin bilgisi, deneyimi ve desteğini benden esirgemeyen, sabır ve hoşgörüsü ile her zaman yol gösteren, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, sevgi ve saygı duyduğum değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN' a,

Yardım ve desteklerini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan tüm Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Numunelerin toplanması aşamasında ve ihtiyaç duyduğum her anımda bilgilerini, deneyimlerini, yardım ve desteklerini esirgemeyen Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Rıdvan EGE Hastanesi Gastroenteroloji A.B.D. Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülbanu CANBALOĞLU ERKAN' a,

Laboratuvar çalışması esnasında bilgilerini, deneyimlerini, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzm. Dr. Uğur ERÇİN, Sayın Doç. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ve Sayın Araş. Gör. Naki ÖKSÜZ'e,

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesinde destek ve deneyimleri ile büyük katkısı olan Sayın Doç. Dr. Ümmühanı ÖZEL TÜRKÇÜ'ye,

Tez aşamasında yardımcı olan, manevi desteğini ve yardımlarını her zaman hissettiğim Sayın Arş. Gör. Gönül Dinçer'e,

Tez aşamasında ve öncesinde bana yardımcı olan, değerli zamanını ayıran, her türlü destek, bilgi ve yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Çınar SEVERCAN'a,

Yaşamım boyunca destekleri ile yanımda olan, sevgi ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen başta annem Serçin Muratoğlu olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

12. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Suzan

Soyadı : MURATOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir, 18.04.1989

Eğitimi

2011- : Yüksek Lisans - Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ANKARA
Sağlık Bilimleri Enstitüsü - Tıbbi Biyokimya A.B.D.

2010-2012 : Pedagojik Formasyon - Celal Bayar Üniversitesi, MANİSA
Eğitim Bilimleri Enstitüsü

2007-2011 : Lisans - Celal Bayar Üniversitesi, MANİSA
Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

2003-2007 : Karşıyaka Vali Erol Çakır Lisesi (YDA), İZMİR

1996-2003: Şair Eşref İlköğretimokulu, İZMİR

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: —