

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT
ÜZERİNE ADALİMUMAB ve N-ASETİLSİSTEİNİN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MUHAMMET ALİ KIYAK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2013

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT
ÜZERİNE ADALİMUMAB ve N-ASETİLSİSTEİNİN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MUHAMMET ALİ KIYAK

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MESUT AKARSU**

İZMİR – 2013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ.....	5
2. AMAÇ.....	7
3. GENEL BİLGİLER	8
3.1. Epidemiyoloji	8
3.2. Etyoloji	9
3.3. Patogenez	11
3.4. Klinik, Laboratuvar ve Görüntüleme	19
3.5. Histopatolojik Özellikler	20
3.6. Tanı	22
3.7. Doğal Seyir	26
3.8. Tedavi.....	28
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
5. BULGULAR.....	44
6. TARTIŞMA.....	57
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
8. KAYNAKLAR.....	62
9. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	76

TEŞEKKÜR

İç hastalıkları uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi, birikim, deneyimlerinden faydalanma imkanı bulduğum, örnek aldığım, hekimlik mesleğini büyük bir onur ve zevkle gerçekleştiren başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Fatoş ÖNEN olmak üzere tüm saygıdeğer öğretim üyelerimize,

Uzun yıllar anabilim dalı başkanlığını yapmış, bizlere desteklerini esirgemeyen, değerli öğretim üyemiz Prof. Dr. İlkay ŞİMŞEK'e,

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mesut AKARSU'ya ,

Tezime teknik destek ve yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Mustafa YALÇIN, Vet. Aslı ÇELİK, Prof. Dr. Özgül SAĞOL, Dr. Özge ÇOKBANKİR ve Biyolog Sunay TUNALI'ya,

İç hastalıkları tıpta uzmanlık öğrenciliğim süresince destekleriyle her zaman yanımda olan, iyi ve kötü anlarımı paylaştığım, kendilerinden çok şey öğrendiğim çok değerli arkadaşlarım Dr. Hakan ÖNDER, Dr. Durmuş Ali SERT, Dr. Özge DOKUZLAR, Uzm. Dr. İbrahim ÇAM, Uzm Dr. Sinan ÜNAL'a ve tüm saygıdeğer doktor arkadaşlarıma,

Başta annem olmak üzere ailem adına annemin sağlık durumunda emeği olan Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Bülent ÜNDAR, Prof. Dr. M. Ali ÖZCAN, Prof. Dr. H. Güner ÖZSAN, Prof. Dr. Fatih DEMİRKAN, Yrd. Doç. Dr. Özden Pişkin'e; Uzm. Dr. Abdullah KATĞI, Uzm. Dr. Selda KAHRAMAN, Uzm. Dr. Ömür G. SEVİNDİK ve tüm doktor arkadaşlarıma, hemşire ve personele,

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ve eğitimimde emekleri olan İç hastalıkları Ana Bilim dalındaki değerli uzman doktorlarına ve başta Mustafa YARICI olmak üzere iç hastalıkları personeline,

Her zaman yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, beni sevmekten bir an olsun vazgeçmeyen ailem ve eşim Dr. Joanna Maria KIYAK'a; sakin ve sevecen bir bebek olarak rahat ders çalışmama katkısı olan sevgili oğlum Demir KIYAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Muhammet Ali KIYAK

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Non-Alkolik yağlı karaciğer hastalığı nedenleri

Tablo 2: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Tablo 3: Non-alkolik Steatohepatit Histolojik Özellikleri

Tablo 4: Steatohepatit için Önerilen Skorlama Sistemi

Tablo 5: ilerlemiş Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı için Risk Faktörleri

Tablo 6: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı için Potansiyel Tedaviler

Tablo 7: Normal diyet kimyasal içeriği

Tablo 8: Metionin ve kolin defisit diyet kimyasal içeriği

Tablo 9: Sitokin seviyeleri

Tablo 10: Sitokin seviyelerinin gruplar arası istatistiksel verileri

Tablo 11: Biyokimyasal parametreler

Tablo 12: Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası istatistiksel verileri

Tablo 13: Histopatolojik skorlar

Tablo 14: Gruplar arası hepatosit balonlaşması ve toplam NASH skorunun istatistiksel verileri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Non- alkolik steatohepatit patogenezinde çift vuru teorisi

Şekil 2: Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında TNF- α 'nın rolü

Şekil 3: Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) önerilen patogenezi

Şekil 4: Şüpheli non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) olan hastalara tanısal yaklaşım

Şekil 5: Gruplar ve özellikleri

Şekil 6: Grupların haftalık ağırlık ortalamaları

Şekil 7: Serum TNF- α seviyeleri

Şekil 8: Serum TGF β seviyeleri

Şekil 9: Serum IL 6 seviyeleri

Şekil 10: Serum IL 8 seviyeleri

Şekil 11: Serum AST, ALT ve ALP seviyeleri

Şekil 12: Serum albümin seviyeleri

Şekil 13: Serum total protein seviyeleri

Şekil 14: Serum total bilirubin seviyeleri

Şekil 15: NASH skorları

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Ratların gruplara halinde kafeslere alınması

Resim 2: Ratlara intraperitoneal ve orogastrik gavaj ilaç uygulaması

Resim 3: Ratların eter anestezisi sonrası örneklerin alımı için hazırlanması

Resim 4: Vena Kava'dan kan örneği alınması

Resim 5: Karaciğerin total çıkarılması

Resim 6: Normal diyet alan rat karaciğerinin makroskopik görünümü

Resim 7: Metionin ve kolin defisit diyet alan rat karaciğerinin makroskopik görünümü

Resim 8: (A): Normal diyet alan grupta karaciğer histopatolojik görünümü (20X, H & E).

(B): MCD diyet alan grupta hepatosit balonlaşması ve steatoz (20X, H&E).

(C): MCD diyet alan grupta steatoz ve lobüler inflamasyon (20X, H&E).

KISALTMALAR

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri	MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
ADA	Adalimumab	NAC	N-asetilsistein
ALP	Alkalen fosfataz	NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
ALT	Alanin aminotransferaz	NASH	Non-alkolik steatohepatit
AMA	Antimitokondriyal antikor	NAYKH	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
ANA	Antinukleer antikor	NF-kappa β	Nükleer faktör kappa β
ApoB-100	Apolipoprotein B-100	PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
AST	Aspartat aminotransferaz	PPAR-α	Peroxisomal proliferator-activated reseptör-α
ATP	Adenozin trifosfat	ROS	Reaktif oksijen radikallerinin
BOP	Bilimsel Araştırma Projeleri	SLE	Sistemik lupus eritamatozus
CYP2E1	Stokrom P450 2E1	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi	SS	Standart sapma
FFA	Serbest yağ asitleri	S-AMe	S-adenozilmetionin
GGT	Gama glutamil transferaz	TGF β	Transforming growth faktör-beta
GSH	Glutatyon	TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
HCV	Hepatit C virüsü	UCP-2	Uncoupling protein-2
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-koenzim A	UDKA	Ursodeoksikolik asit
H&E:	Hematoksilen-Eozin	VKİ	Vücut kitle indeksi
IKK-β	İnhibitör kapa kinaz β	VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
IL-6	İnterlökin 6		
IL-8	İnterlökin 8		
IRS-1	İnsülin reseptör substrat-1		
İP	İntraperitoneal		
LPS	Lipopolisakkarit		
MCD	Metionin ve kolin defisit		

ÖZET

RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT ÜZERİNE ADALİMUMAB ve N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.

Amaç: Non-alkolik steatohepatitte (NASH) etkin kullanılan bir medikal tedavi olmaması ve özellikle NASH patogeneğinde tümör nekrozis faktör alfanın (TNF- α) ve oksidatif stresin önemli bir yeri olması nedeniyle, TNF- α 'yı etkileyen adalimumab ve major endojen antioksidan glutatyon prekürsörü olan N-asetilsistein (NAC) tedavilerinin NASH gelişimine etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Materyal metod: Altı hafta boyunca 7'şerli 5 grup halinde toplam 35 dişi Wistar albino rat çalışmaya alındı. Beş grubun 1.sine normal diyet, diğer 4'üne metionin ve kolin defisit (MCD) diyet verildi. MCD diyet alan 4 grubun bir kolu herhangi bir ilaç almadı. 3 gruba sırasıyla N-asetilsistein, adalimumab ve N-asetilsistein-adalimumab kombinasyonu verildi. 6 hafta sonunda ratlara ötenazi uygulandı. Serum örnekleri alınarak aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalin fosfataz (ALP), total bilirubin, total protein, albümin, TNF- α , transforming growth faktör-beta (TGF β), interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8) seviyeleri belirlendi. Karaciğer çıkarılarak doku örneklerinden yağlanma, balon dejenerasyon, lobüler inflamasyon ve fibrozis varlığı değerlendirildi.

Bulgular: MCD diyet alan grupta başarılı şekilde NASH oluşturuldu. Tedavi alan üç grupta da TNF- α seviyeleri etkili bir şekilde baskılandı. TNF- α seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 0,99 (0,13-7,42) pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 9,90 (2,23-11,64) pg/ml, MCD+NAC verilen grupta 3,75 (1,97-13,14) pg/ml, MCD+adalimumab alan grupta 1,90 (1,09-2,58) pg/ml ve MCD+NAC+adalimumab alan grupta 1,33 (1,12-4,24) pg/ml olarak tespit edildi. Histopatolojik NASH skorunda her üç ajanla istatistiksel anlamlı farklılığın gözlemlendiği azalma saptandı. Gruplar arası toplam NASH skoruna bakıldığında en yüksek toplam skor $6,15 \pm 1,07$ ile sadece MCD alan grupta görüldü. En düşük skor ise $5,00 \pm 1,16$ ile MCD+NAC+adalimumab alan grupta olduğu tespit edildi. Toplam NASH skorunda MCD+NAC ve MCD+NAC+adalimumab alan gruplar MCD+adalimumab alan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0,037-0,007$). MCD+NAC ve MCD+NAC+adalimumab alan gruplar arasında toplam NASH skoru açısından istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmedi ($p=0,381$). AST, ALT (MCD+adalimumab grubu hariç) ve ALP (MCD+NAC grubu hariç) seviyelerinde istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı iyileşme tespit edildi.

Sonuç: Bizim çalışmamız TNF α ve oksidatif stresin NASH patogenezinde önemli rol oynadığını; antioksidan ajan N-asetilsisteinin anti TNF α etki gösteren ajan adalimumabdan total NASH skorunu iyileştirmede daha üstün olduğunu gösterdi. Bu ajanların NASH gelişimini engellememesine rağmen NASH histopatoloji skorunu hafifçe geriletmişti ve karaciğer fonksiyon testlerini iyileştirebileceği gösterildi.

Anahtar kelimeler: Non-Alkolik steatohepatitis, N-asetilsistein, Adalimumab, Ratlar

ABSTRACT

A COMPARISON OF THE EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE AND ADALIMUMAB ON RATS WITH NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.

Aim: Due to the lack of effective medical treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), we aimed to evaluate an anti- TNF- α agent adalimumab as a new treatment option and compare with N-acetylcysteine that suppress oxidative stress. Since tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and oxidative stress play an important role in NASH, we aimed to investigate the treatment option affecting TNF- α during the development of NASH and compare it with N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with NASH.

Materials and Methods: Our study included a total of 35 female Wistar albino rats that were divided into 5 groups of 7 each, and evaluated over a 6 week period. One group received a normal diet, while the other four groups received a methionine and choline deficient (MCD) diet. One of the groups receiving an MCD diet did not take any medicine, while the other three were administered N-acetylcysteine, adalimumab or N-acetylcysteine-adalimumab combination therapy. Rats were sacrificed after six weeks. The aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, total protein, albumin, TNF- α , transforming growth factor-beta (TGF- β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) levels were determined from the rats' serum samples. Liver tissue samples were assessed for the presence of fatty liver, ballooning degeneration, lobular inflammation, and fibrosis.

Results: NASH was successfully created in the MCD diet group. Levels of TNF- α were effectively suppressed in the three groups that received therapy. The TNF- α levels were detected to be as follows: 0,99 (0,13-7,42) pg/ml in the group receiving a normal diet, 9,90 (2,23-11,64) pg/ml in the group receiving the MCD diet, 3,75 (1,97-13,14) pg/ml in the group treated with MCD+NAC, 1,90 (1,09-2,58) pg/ml in the group treated with MCD + adalimumab and 1,33 (1,12-4,24) pg/ml in the group treated with MCD+NAC+adalimumab. Decrease in total NASH score was statistically significant in MCD+NAC and MCD+NAC+adalimumab groups ($p=0,037-0,007$) compared with MCD+adalimumab group but it was not statistically significant between MCD+NAC and MCD+NAC+adalimumab groups ($p=0,381$). When comparing the total NASH scores between groups, the highest total score was 6.15 ± 1.07 in the group receiving MCD diet and no medication. The lowest total NASH score was 5.00 ± 1.16 in the MCD+NAC+adalimumab group. In addition, in AST, ALT

(except MCD+adalimumab group) and ALP (except MCD+NAC group) levels statistically insignificant improvement was observed.

Conclusion: Our study showed that TNF α and oxidative stress play an important role in NASH pathogenesis. Antioxidant agent N-acetylcysteine was found to be superior to the anti-TNF agent adalimumab in improvement of total NASH score. Although these drugs do not prevent the development of NASH, it was shown that they could mildly reverse the NASH histopathology score and may improve liver function tests.

Key words: Non-alcoholic steatohepatitis, N-acetylcysteine, adalimumab, rats.

RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT ÜZERİNE ADALİMUMAB ve N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.

1-GİRİŞ

Non-alkolik steatohepatit (NASH) kavramını ilk kez 1980 yılında Ludwig ve arkadaşları tanımlanmıştır (1). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH); NASH, fibrozis ve sirozdan yağlanmaya kadar karaciğer hasarının geniş bir spektrumunu kapsar. Hastalığın doğal seyrinde yalnız NASH oluştuğunda fibrozis ve siroza gidış görölmektedir. NASH patogenezi komplekstir. İlk hasar insülin rezistansı ile başlar. Steatohepatitin devamı için ikinci hasar gereklidir. Burada oksidatif stres ile sitokinlerin etkileşiminin kilit rol oynadığına inanılır. Oksidatif stres nükleer faktör kappa β (NF-kappa β)'yı aktifler. Bu model hepatosit dejenerasyon ve ölümüne neden olarak proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , TGF β , IL-6, IL-8) sentezini stimüle eder. NASH'nin rat modellerinde artmış TNF- α üretimi görölmüştür. TNF- α artmış serum konsantrasyonu NASH'li insanlarda da rapor edilmiştir. NASH patogenezinin etki eden diğeri bir sitokin IL-6'dır. IL-6 non-alkolik yağlı karaciğerli hastalarda artmış olduğu saptanmıştır. IL-8'in hepatositlerde oksidatif stres, apoptozis ve karaciğer içine inflamatuvar hücrelerin geçişini artırıcı etkisi vardır (2,3,4).

Günümüzde NASH için ideal bir tedavi yoktur. Statin ve fibratlar gibi lipid düşürücü ajanlar (154,155), vitamin E gibi antioksidanlar (71,138,139) ve ursodeoksikolik asit (UDKA) gibi sitoprotektif ajanların aminotransferaz düzeyini azalttığı ve birkaç çalışmada karaciğer histolojisini düzelttiği gösterilmiştir (156). Ancak bu ilaçların hiç birisi NASH için hedef ve spesifik tedavi seçeneği oluşturmamaktadır. Bu nedenle NASH'in tedavisi için hedefe yönelik spesifik ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Adalimumab TNF- α karşı humanize antikordur. Romatoid artrit ve crohn hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Romatoid artrit nedeniyle kullanılan NASH'li bir hastada biyokimyasal parametrelerde kalıcı yanıt görölmüştür (9). Henüz NASH'de Adalimumab kullanımı ile ilgili bir çalışma yoktur.

N-asetilsistein 40 yıldan fazladır asetaminofen zehirlenmesinde kullanılmakta olan bir antidot olup; major endojen antioksidan olan glutatyonun(GSH) prekürsörüdür. Glutatyon sistein içeren bir tripeptid olup, aminoasit transportu, serbest radikallerin, reaktif oksijen ara ürünlerinin ve bazik toksik kimyasalların temizlenmesi gibi hücresel olaylarda rol alır (161). Steatotik karaciğerde sinüzoidal aralıkların normal karaciğere oranla %54 azaldığı ve hepatik kan akımının 1/3'üne indiği gösterilmiştir (162). NAC'nin etkisi ile olan ikinci mekanizma

mikrosirkülatuvar relaksan özelliğine bağlanmaktadır. Stamler ve arkadaşları NAC'nin endotelden kaynaklanan bir relaksan gibi davrandığını göstermişlerdir (163). Mikrosirkülatuvar relaksan olduğu hipotezi kan akımının azaldığı steatotik karaciğer hastalığı için ilgi çekicidir.

NASH patogeneizde önemli rol oynayan anti-TNF- α antikoru adalimumab ile ilgili randomize kontrollü karşılaştırmalı çalışma bulunmamaktadır. NASH tedavisinde kullanılan etkin bir ilaç olmaması nedeniyle patogeneizde önemli rol oynayan sitokin TNF- α 'ya karşı kullanılan adalimumabın etkinliği araştırmak NASH için yeni tedavi seçeneğinin ortaya çıkmasında yararlı olacaktır. Uzun zamandır farklı endikasyonlarla güvenli bir şekilde kullanılan ve üzerinde çok fazla çalışma yapılan NAC ile karşılaştırılması adalimumabın etkinlik düzeyi, güvenilirliği ve maliyet etkinliği konusunda bilgi edinme açısından yararlı olacaktır.

2- AMAÇ

Non-alkolik steatohepatitte etkin kullanılan bir medikal tedavi olmaması nedeniyle yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması planlanmıştır. Özellikle NASH patogenezinde TNF- α 'nın önemli bir yeri olması nedeniyle TNF- α 'yı etkileyen tedavinin uygulanması ve NASH oluşumunun önlenmesi düşünülmüştür. Bu tedavi seçeneğinin, farklı endikasyonlar ile yaygın kullanılan ve NASH'de etkinliği, güvenilirliği ilgili çalışmaları olan NAC ile karşılaştırılması düşünülmüştür. Bu tedavi modalitesinin hem maliyet, hem de etkinliğini gösteren çalışmaların sınırlı olması, henüz rutin uygulamada yer almasa da gelecekteki yeni çalışmalar ve maliyetteki azalmalar ile birlikte NASH tedavisinde yerini alacağına inanmaktayız.

3-GENEL BİLGİLER

Non-alkolik steatohepatit (NASH) kavramı ilk kez 1980 yılında Ludwing ve arkadaşları tarafından alkolik hepatit histolojik ve biyokimyasal test bulgularına sahip olan ancak alkol kullanım öyküsü olmayan orta yaş grubu kişilerdeki bir karaciğer hastalığı olarak tanımlanmıştır (1). Ludwing ve arkadaşları hastalığı ilk kez tanımlayan değil, hastalığa bu ismi veren kişilerdir. 1968 yılında New England Journal of Medicine’de yayınlanan “Alcohol-induced hepatic injury in nonalcoholic volunteers” isimli çalışma ve Ludwing’in yayınından bir yıl önce sunulmuş olan “non-alkoholic liver disease mimicking alcoholic hepatitis and cirrhosis” başlıklı yayınlar NASH konusuna öncülük eden yayınlar olarak kabul edilebilir (166-118).

NASH’nin bu ilk tanımından sonra oldukça fazla bilgi elde edilmiştir. NASH tanımlamasından sonra yıllar içerisinde NASH ile benzer klinik özellikleri taşıdıkları halde karakteristik histopatolojik bulgularının tamamını göstermeyen olguların varlığı dikkati çekmiş ve isimlendirmedeki ortaya çıkan karışıklıklar yeni geliştirilen “Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)” / “Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH)” kavramı ile aşılmıştır (167). NASH, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAYKH) bir parçasıdır. NAYKH; NASH, fibrozis ve sirozdan basit karaciğer yağlanmasına kadar karaciğer hasarının geniş bir spektrumunu kapsar.

3.1. EPİDEMİYOLOJİ

NAYKH prevalansı genel toplumda belirsizdir. Amerika Birleşik Devletleri’nde (A.B.D) yapılan birkaç çalışmada katılımcıların % 31’de saptandı (23). Obez, alkol kullanmayan kişilerde bu oran %76’lara kadar çıkmaktadır. Prevelans alınan toplum, tanı için kullanılan kriterler ve tekniklere göre değişmektedir (Biyokimyasal test seviyeleri, radyolojik çalışma sonuçları ve karaciğer biyopsi bulguları gibi) (24,25,26).

NAYKH genellikle dört ve altıncı dekatta görülmesine rağmen obez çocuklarda, adolesanlarda ve ileri yaş erişkinlerde sıklığı giderek artmaktadır. İlk çalışmalarda hastaların çoğunluğu kadındı ancak daha sonraki çalışmalarda NASH gibi daha riskli formların erkeklerde daha sık olduğu saptanmıştır. NAYKH prevalansında etnik farklılıklarda vardır. NAYKH hispaniklerde %45 gibi yüksek prevalansta olduğu saptanmıştır. Beyaz ırkta %33 iken afrikan amerikalılarda %24 prevalansta NAYKH tespit edildi. NAYKH’de etnik ve ırksal farklılığın nedeni bilinmemektedir. Ancak ırklar arası vücut yağ dağılımı farklılığı ve

hispanikler arasındaki metabolik sendromun sıklığı buna etken olabilir (27,28,29). NAYKH'deki ailesel kümelenmeler çevresel ve genetik faktörlerinde etkili olduğunun bir göstergesi olabilir (30,31,32).

3.2. ETYOLOJİ

Birçok ajan ve durumun NAYKH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Nedenleri iki geniş kategoriye (1. ilaçlar ve toksinler 2. metabolik bozukluklar (edinilmiş veya doğuştan) olarak) ayrılabilir. NAYKH olası nedenleri Tablo 1 listelenmiştir. Obezite NAYKH ile sıklıkla birlikte görülen bir durumdur. 1980 yılından bu yana aşırı kilolu (vücut kitle indeksi (VKİ) $>25 \text{ kg/m}^2$) ya da obez (VKİ $>30 \text{ kg/m}^2$) amerikalıların oranı giderek artmıştır. 2004 yılında erişkinlerin %66,2'si ve 12-19 yaş çocukların %17,4'ü aşırı kilolu veya obez olarak tespit edildi (33). Obezite epidemik bir sağlık sorununu oluşturmaktadır. Bu nedenle de hem erişkinlerde hem de çocuklarda NAYKH buna paralel olarak sık görülmektedir. Morbid obez hastalarda (VKİ $>35 \text{ kg/m}^2$) NAYKH sıklığı %90'lara yükselmekte ve ilerlemiş hastalık (NASH gibi) %9-40 arasında görülmektedir (34-38). VKİ ile yağlanmanın derecesi ve karaciğer hasarı arasındaki ilişki birkaç çalışmada gösterilmiştir (39-41). Ancak karaciğer yağlanmasının gelişmesi için vücut yağ dağılımı total yağ kitesinden daha önemlidir. Çalışmalar bel-kalça oranı ile metabolik sendrom ve karaciğer yağlanması arasındaki korelasyonu göstermiştir. Bu nedenle NAYKH göstergesi olarak intraabdominal ve visseral yağlanmanın önemi büyüktür (42-44).

NAYKH obezite ile birlikte ve obeziteden bağımsız olarak Tip 2 diabetes mellitus ve glukoz intoleransı arasında kuvvetli bir ilişki vardır (45). NASH'li hastalarda Tip 2 diabetes mellitus ve glukoz intoleransı %20-70 arasında tanımlanmıştır ve diyabet olmayanlara göre diyabetik hastalarda NASH oranı iki kat fazladır. Diyabetik hastalarda NAYKH varlığı kardiyovasküler hastalık riskini de artırabilir (46). Morbid obez hastalarda tip 2 diyabet ve NAYKH hastalığı arasında güçlü bir ilişki vardır. NAYKH normal glukoz toleranslı zayıf kişilerde bile hiperinsülinemi ve insülin direnci ile ilişkili olabilir (47). Diabetes mellitus, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi NAYKH'nin ileri formlarının belirleyicisi olabilir (48-51).

NAYKH'li kişilerde önemli oranda hiperlipidemi saptanmıştır. Dallas Heart Study çalışmasında miks hiperlipidemili hastaların %60'ında NAYKH tespit edildi (52). Kore'de yapılan bir çalışmada potansiyel karaciğer vericilerinde steatoz riski hiperlipidemisi olanlarda iki kat artmaktaydı (53). Birçok hasta tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve santral obezite gibi multipl risk faktörüne sahip olmasına rağmen bazı kişilerde bu tanımlanan risk faktörlerinden

hiç birisi yoktur. NAYKH anormal yağ metabolizması ve mitokondriyal hasar veya disfonksiyona neden olan ilaçlar, toksinler, metabolik, cerrahi ve genetik durumlarla ilişkilidir (Tablo 1).

NAYKH; hiperlipidemi, glukoz intoleransı, obezite ve hipertansiyonu içeren metabolik sendromun hepatik komponenti olarak tanımlanmaktadır. Metabolik sendrom komponentlerindeki artış NAYKH'nin risk ve şiddetini artırmaktadır (47,54).

Tablo 1: Non-Alkolik yağlı karaciğer hastalığı nedenleri

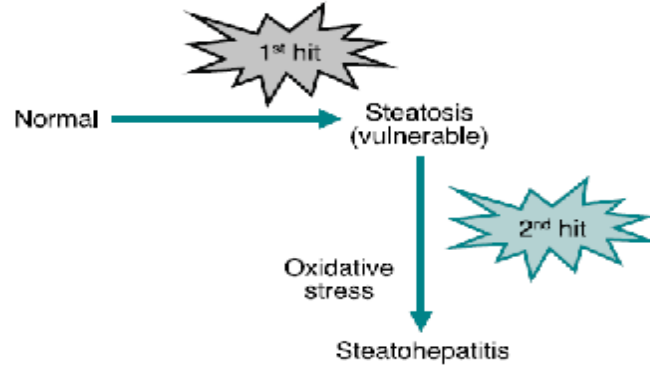
Kazanılmış Metabolik Bozukluklar		Sitotoksik ve Sitostatik ilaçlar	
Diabetes mellitus		LAsparaginase	
Dislipidemi		Azacitidine	
Kwashiorkor ve marasmus		Azaserine	
obezite		Bleomycin	
Starvasyon		Methotrexate	
		Puromycin	
		Tetracycline*	
Diğer ilaç ve Toksinler		Metaller	
Amiodarone		Antimony	
4,4'-diethylaminoethoxyhexestrol		Barium salts	
Dichlorethylene		Chromates	
Ethionine		Phosphorus	
Ethyl bromide		Rare earths of low atomic number	
Estrogens		Thallium compounds	
Glucocorticoids		Uranium compounds	
Highly active antiretroviral therapy			
Hydrazine			
Hypoglycin			
Orotate			
Perhexilene maleate			
Safrole			
Tamoxifen			

Doğuşsal metabolik bozukluklar	Cerrahi prosedürler
Galactosemia	Biliopancreatic diversion
Glycogen storage disease	Extensiv ince barsak rezeksiyonu
Hereditary fructose intolerance	Gastric bypass
Homocystinuria	Diger ilaç ve toksinler
Systemic carnitine deficiency	Amiodarone
Tyrosinemia	4,4'-diethylaminoethoxyhexestrol
Weber-Christian syndrome	Dichlorethylene
Wilson hastalığı	Ethionine

*Tetrasiklin mitokondriyal β -oksidasyonu inhibe ettiği için sitotoksikdir

3.3. PATOGENEZ

Kısmen insan benzeri NAYKH'li hayvan modellerinin eksikliği nedeniyle patogenezini anlamakta yetersizlikler vardır. NAKYK ile ilişkili çeşitli durumların varlığı düşünüldüğünde tespit edilmiş tek bir mekanizmanın olmaması sürpriz değildir. İlk olarak 1998'de Day ve James tarafından öne sürülen iki aşamalı hasar (two-hit) hipotezi hakim olan teoridir (2,3,4,55), (Şekil 1). Bu hipotezde NAYKH'de ilk hepatik hasara neden olan, steatoza yol açan yağ asidi metabolizmasındaki düzensizliktir. Steatoz ikinci hasara hepatositleri savunmasız bırakan birkaç hücrel adaptasyon ve değişik sinyal yolları ile ilişkilidir. İkinci hasar hepatik nekroz ve inflamasyona, fibrojenik kaskatı aktive ederek fibrozise ve NAYKH'li hastaların bir kısmında siroza neden olan bir veya birçok çevresel ve genetik karmaşaların sonucu olabilir. Hepatik steatoz NAYKH'nin histolojik tablosunun iyi bir belirteçidir. Normal olarak serbest yağ asitleri (FFA) intestinal emilim yoluyla (şilomikron kalıntıları formundaki) veya trigliserid olarak depolandığı adipoz dokudan lipoliz ile karaciğere gelir. Karaciğerde FFA'lar mitokondride okside edilir, trigliserid halinde esterlenir, posfolipid sentezlenir ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) olarak karaciğerden sekrete edilir. Normal şartlarda yağ asidi metabolizması katekolaminler, glukagon, growth hormon ve insülin tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Hepatik trigliserid birikimiyle serbest yağ asidi metabolizmasında lipolizden ziyade lipogenez baskın hale gelir. Bu değişim adipoz doku ve bağırsaktan karaciğere verilen serbest yağ asidi miktarında artışa neden olur. Lipoprotein sentezinde azalma veya karaciğerden lipid transportundaki azalmalar trigliseritlerin karaciğerde birikimine yol açar.

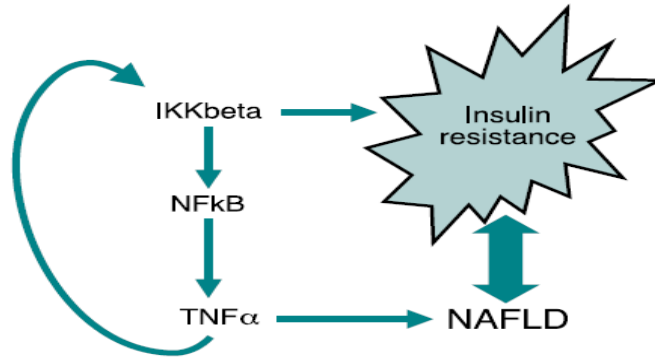


Şekil 1: Non- alkolik steatohepatit patogenezinde çift vuru teorisi

Güncel kanıtlar steatozdaki primer patolojik faktörün insülin rezistansı ve hiperinsülinemi olduğu odaklıdır. Klinik ve laboratuvar bulgular NAYKH’li kişilerde glukoz intoleransı olmasa bile periferik insülin direnci ve hiperinsülinemiyi desteklemektedir (56-58). İnsülin rezistansına yol açan moleküler mekanizma komplekstir ve tam olarak anlaşılamamıştır. Obezite ve hiperinsülinemide FFA içeren değişik birkaç molekül, TNF- α , membran glikoprotein PC-1 ve leptin insülin sinyal yoluna müdahale ederler. Diabetes mellitus ve obezite kısmen insülin rezistan adipoz doku tarafından anormal salınan FFA’larının neden olduğu artmış plazma FFA ile ilişkilidirler. Artmış FFA insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) sinyalini down-regüle ederek hepatik insülin rezistansına katkıda bulunur (59,60). Hiperinsülinemi ve insülin rezistansı bir dizi aberan FFA yıkım yoluyla steatoza neden olur. Karaciğerde insülin; yağ asidi sentezini sitümüle eder, mitokondriyal FFA β -oksidasyonunu down-regüle eder, apolipoprotein B-100 (apoB-100) ve VLDL’nin intraselüler degradasyonunu artırarak hepatositlerden trigliserid sekresyonunu bloklar ve VLDL içeren veziküllerin eksositozunu bloklar (59,61-62). Ayrıca NASH’li hastalarda apoB-100’ün bozulmuş hepatik sentezi de hepatik trigliserid birikimine katkıda bulunabilir (63). NAYKH’de insülin direnci, mitokondriyal disfonksiyon, TNF- α , leptin, resistin ve adiponektin dahil adipositler tarafından salgılanan bazı önemli peptid medyatörlerinin anormal düzey veya fonksiyonu tarafından artabilir.

Tümör nekrozis faktör alfa: TNF alfa, 1975 yılında tanımlanmış olup oksidatif stres veya endotoksin gibi uyarılar sonrası aktive makrofajlar ve T lenfositler tarafından üretilir. TNF alfa etkilerini önceden p55 ve p75 olarak adlandırılan tip 1 ve tip 2 reseptörlerine bağlanarak gösterir. IL 1-beta, IL 6 ve IL 8 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımı stimüle ederek lökositleri hasar bölgesine çekmekte kemotaktik rol oynar. Ayrıca, endotel hücrelerini uyararak çeşitli adezyon moleküllerinin salgılanmasını ve böylelikle lökositlerin doku içine

göçünü kolaylaştırır. TNF alfa, isminden de anlaşılacağı üzere tip 1 reseptörleri aracılığı ile hücre apoptozunu tetikleyebilmektedir (164). Non inflamatuvar durumlarda, TNF- α adipoz dokudan (adipoz doku makrofajları da dahil olmak üzere) elde edilir ve TNF- α plazma seviyeleri vücut yağ kitlesi ile ilişkilidir (64). TNF- α , obezite ile ilişkili insülin direncinde önemli bir rol oynayan Jun N-terminal kinaz (JNK) dahil olmak üzere strese bağlı protein kinaz aktivasyonu ile serin fosforilasyon yoluyla IRS-1 sinyalini down-regüle ederek insülin sinyaline engel olur. FFA tarafından inhibitör kapa kinaz β (IKK- β) / nükleer faktör kapa β (NF- $\kappa\beta$) yolu aktivasyonu da azalmış hepatik insülin duyarlılığında rol oynayabilir ve TNF- α ve interlökin (IL) -6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırabilir (65-67). TNF alfa üretimi , protein kinaz aktivitesini daha da uyararak lipoliz ve adipoz dokudan yeni serbest yağ asidlerinin salındığı kısır bir döngüye neden olur (165). TNF- α seviyelerindeki artışlar NAYKH'de birkaç çalışmada gösterilmiştir (68-71). Ancak TNF- α 'nın patogeneze ve NAYKH'nin progresyonuna bağımsız katkısı hale belirsizliğini korumaktadır. Oksidatif stres, nükleer faktör kapa β (NF-kappa β)'yı aktifler. Bu model hepatosit dejenerasyon ve ölümüne neden olarak proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , TGF β , IL-6, IL-8) sentezini stimule eder (2,3,4).



Şekil 2: Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında TNF- α 'nın rolü

Adiponektin: Adipositokinler visseral yağ dokusu tarafından üretilen peptidlerdir. Adiponektin VKİ ile ters orantılı olarak adipositler tarafından salgılanır ve TNF- α 'nın güçlü bir inhibitörüdür. Adiponektin reseptör I kas ve periferik dokularda, reseptör II ise öncelikle karaciğerde bulunmaktadır. Bariatrik cerrahi uygulanan olguların karaciğer dokularında adiponektin ve adiponektin reseptör II düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir (73). Serum adiponektin düzeyleri obezite, insülin direnci, diyabet ve metabolik sendromda azalır (69). Yüksek yağlı gıda, alkol içeren diyet ve genetik olarak obez (ob/ob) farelerde rekombinant adiponektin verilmesi dramatik olarak hepatomegali, inflamasyon ve yükselmiş karaciğer

testlerini iyileştirir (72). Adiponektinin bu terapötik etkileri hepatik yağ asidi β -oksidasyonunu artırması, hepatik trigliserid miktarını ve hepatik insülin direncini azaltmasının bir sonucudur. Ayrıca, adiponektin, TNF- α 'nın karaciğer ve plazma konsantrasyonlarını suprese eder. Çalışmalarda serum adiponektin düzeyleri ile steatoz derecesi ve NAYKH olan insanlarda hepatosit hasarı arasında ters bir ilişki rapor edilmiştir ve bu ilişki insülin direncinden bağımsızdır (70,73). TNF- α /adiponektin oranının steatoz gelişiminde birincil patojenik rolü veya doğrudan steatohepatitin steatozdan progresyonu ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Leptin: Leptin gıda alımı ve enerji regülasyonunu kontrol eden adipoz dokudan üretilen tokluk hormonudur. Leptin insülin sinyali ve periferik dokularda glikoz metabolizmasının regülasyonu ile yakın ilişkilidir ve mitokondriyal β -oksidasyon ve karaciğerde trigliserid sentezi arasında yağların oranını düzenlemede önemli bir rol oynar (74). Leptin defisit (ob/ob) farelerde şiddetli steatoz ve steatohepatit gelişir. İnsanlardaki obezite göreceli leptin rezistansı ve yüksek leptin seviyeleri ile ilişkilidir. Çeşitli çalışmalarda, serum leptin düzeyi ve NAYKH arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (75-78). Bir çalışmada serum leptin düzeyleri NASH olan hastalarda karaciğer yağlanması şiddeti ile VKİ'den bağımsız olarak korale olduğu görüldü. Ancak hepatik inflamasyon veya fibrozis derecesi ile korelasyon yoktu (77). Mevcut bulgularla leptinin NAYKH patogeneze katkısı belirsizdir.

Resistin: 108 amino asit içeren protein yapıdaki resistinin serum düzeyi obez hayvanlarda artmış olduğu bilinmektedir. Resistinin farelerde glukoz toleransını bozduğu ve resistinin inhibisyonunun insülin direncinde azalma meydana getirdiği bilinmektedir. NAYKH'de resistin düzeylerinin arttığı ve hastalık ağırlığı ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir (168).

İnsülin direnci: İnsülin direnci ve hiperinsülinemi steatoz gelişimi için önemli olmasına rağmen steatohepatit ve fibroze progresyonda yeterli değildir. Alkolik karaciğer hastalığı ve NAYKH arasındaki histolojik özellikleri ve doğal seyrindeki benzerlikler ortak mekanizmaların bu hastalıkların patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Kronik oksidatif stresin alkole bağlı karaciğer hasarının patogenezinde merkezi rolü olduğuna inanılmaktadır. NAYKH'li hastalarda strom P450 2E1 (CYP2E1)'in içinde olduğu mikrozomal enzimlerin aktivasyonu ve NAYKH'nin murin modellerinde reaktif oksijen radikallerinin (ROS) mitokondriyal üretiminin patogeneze kronik oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun santral rol oynayabileceğini düşündürmektedir (79-84).

Artmış serbest yağ asitleri: Artmış FFA seviyeleri birkaç mekanizma yoluyla hepatositlere direk olarak toksik olabilir. FFA konsantrasyonundaki bir artış lizozomal destabilizasyon ve TNF- α 'nın stümilasyonuna yol açar (85). FFA ayrıca ROS üretimi ve lipid peroksidasyonuna yol açan sitogram P450 izoenzimini up-regüle eder (86). Artmış intraselüler FFA konsantrasyonu peroxisomal proliferator-activated reseptör- α (PPAR- α)'nın sürekli up-regülasyonuna yol açar. PPAR- α yağ asidi oksidasyonunu düzenler fakat dikarboksilik asit derivelerinin üretimini artırarak oksidatif stresi artırabilir. PPAR- α etkilenmiş kişilerde karsinogeneze yatkınlık oluşturabilir (63). FFA direkt olarak hücre membranına toksik olabilir (64).

Endotoksin: Endotoksin ve endotoksin aracılı sitokin salınımı, artmış bakteriyel endotoksin ve lipopolisakkarit (LPS) serum seviyelerin TNF- α , IL-6 ve IL-8 hepatik üretiminin stümilasyonu ve hepatik nekroza yol açan inflamatuvar yanıtın aktivasyonuna neden olduğu için alkolik karaciğer yağlanması patogenezinde şüpheli konumdadırlar (70). Bakteriyel endotoksin de bazı durumlarda NAYKH gelişimine katkıda bulunabilir. Tartışmalı bir konu olan barsak kaynaklı endotoksin ve bunun NAYKH'deki rolü yakın zamanda rapor edilmiştir. Barsak permeabilitesinin NAYKH olan hastalarda önemli oranda arttığı, bu hastalarda ince barsak bakteri aşırı çoğalmasının daha fazla olduğu ve bu parametrelerin steatoz şiddetiyle korele olduğu gösterilmiştir. Portal endotokseminin NASH ve cerrahi jejununoileal bypass (obezite tedavisinde geçmişte yapılan) ile ilişkili karaciğer yetmezliğine katkıda bulunduğuna inanılmaktaydı. Yang ve arkadaşları karaciğer yağlanmalı ob/ob farelerin düşük doz LPS'e maruziyet sonrası endotoksin bağımlı hepatosit hasarına karşı oldukça hassas olduklarını ve bu farelerde hızla NASH geliştiğini göstermişlerdir (87). Ayrıca, Zucker diyabetik (fa/fa) sıçan ve ob/ob farelerde TNF- α aracılı karaciğer hasarına yağlanmış hepatositlerin maruziyetini artıran Kupffer hücre fonksiyonlarında azalmayı göstermişlerdir (88). Küçük çalışmalarda insan NAYKH'de bakteriyel endotoksinin olası patojenik rolü düşündürmektedir ancak bu çalışmalar ikna edici değildir (89,90).

Giderek artan kanıtlar, vücut mitokondriyal değişiklikler ve bozulmuş karaciğer enerji homeostazının NAYKH patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmalar mitokondriyal ROS oluşumunda artış ile birlikte, yağlanmış karaciğerde mitokondriyal solunum zinciri komplekslerinin aktivitesinde bir azalma göstermiştir; bu değişiklikler serum TNF- α düzeyleri, insülin direnci ve VKİ ile koreledir (91,92). Ob/ob farelerin artmış uncoupling protein-2 (UCP-2), iç mitokondriyal membran proteini aracılı proton sızıntısı ve uncoupled adenosin trifosfat (ATP) sentezi seviyeleri, ROS üretimini artırır ve yağlı

hepatositleri metabolik strese karşı duyarlı hale getirebilir (84). Ancak, insanlardaki NAYKH'de UCP-2'nin rolü bilinmemektedir. Çalışmalar NAYKH olan farelerde ve insanlarda ATP tükenmesi sonrası ATP depolama kapasitenin azaldığını göstermiştir. Mitokondriyal yapısal kusurlar azalmış ATP depolanmasının nedenlerinden biri olabilir. Megamitokondri ve kristal mitokondriyal inklüzyonlar NAYKH olan hastalarda tespit edilmiştir ve bunlar oksidatif stres ya da sekonder hasarın bir uyum süreci temsil edebilir (58,93). NASH olan hastalardaki sınırlı veriler ROS temizleyici, glikoz metabolizması ve yağ asidi metabolizması dahil olmak üzere uygun mitokondriyal fonksiyon için birçok farklı gen olduğunu düşündürmektedir (94). Ayrıca, alkolik karaciğer hastalığı ve Wilson hastalığında bulunan benzer mitokondriyal DNA hasarı da NASH gelişimine katkı sağlayabilir. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon ve ATP tükenmesinin NAYKH nedeni veya sonucu olup olmadığını belirlemek için insan ve hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

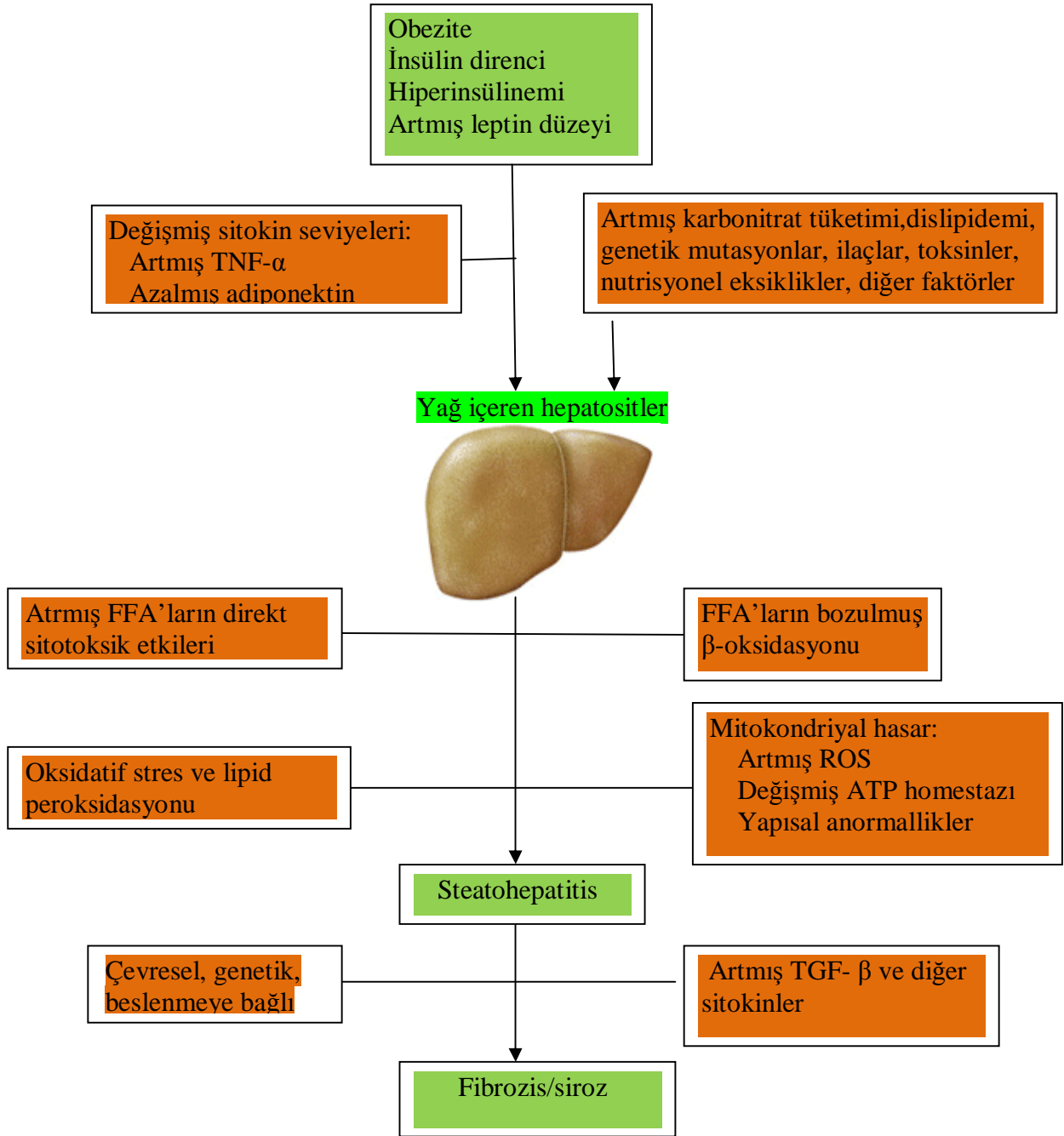
Fibrozis gelişmiş NAYKH'de bulunan sık histolojik bulgudur. Hepatik fibrozis disse ve subendotelyal alandaki hepatik stellat hücrelerin çoğalması ve aktivasyonu ile Kollajen tip I ve III dahil olmak üzere hücre dışı matriks bileşenlerinin salgılanması ile gelişir. Stellat hücrelerde fibrojenik sürecini başlatmak ve sürdürmek için gerekli faktörler arasında inflamatuvar sitokinler, anjiotensin, ekstraselüler matriks değişiklikler, büyüme faktörleri ve oksidatif stres sayılabilir.

Transforming growth factor- β : NAYKH'de, lipid peroksidasyon ürünleri stellat hücreleri aktive eden transforming growth factor- β 'nin (TGF- β) hepatik üretimini artırabilir. Endotel hücreleri, lökosit ve Kupffer hücreleri muhtemelen trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), TGF- β ve diğer sitokinlerin salınımı ile stellat hücre proliferasyonunu tetikler (95). İlave olarak, NAYKH ile ilişkili hiperinsülinemi ve hiperglisemi fibrozis ile ilişkili bağ dokusu büyüme faktörü salınımı uyarabilir (96). Son olarak, hayvan çalışması verileri leptinin TGF- β üreten sinüzoidal hücreler ve Kupffer hücrelerini uyararak NAYKH fibrojenizinin devamlılığını sağladığını düşündürmektedir (97).

NAYKH patogenezi ile ilgili araştırmalar artmakta olmasına rağmen tam olarak netlik yoktur (şekil 3). Büyük olasılıkla, NAYKH bir "multi-hit" sürecinin bir sonucu olarak gelişir. İlk "hit" öncelikle insülin direnci ve hiperinsülinemi ile tetiklenen steatozdur. Steatoz geliştikten sonra, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres, sitokin değişiklikler, mitokondriyal disfonksiyon ve Kupffer hücre aktivasyonu gibi faktörlerin, bir dizi genetik ve çevresel duyarlılığı olan hastalarda inflamatuvar bir yanıt ve fibrozisi indükler. Bunlar ve diğer faktörler arasındaki etkileşim tam olarak aydınlatılmış değildir.

Metionin ve kolin defisit: Metionin ve kolin defisit (MCD) diyet VLDL sentezi için gerekli olan fosfotidil kolin sentezini bozar. Fosfotidil kolin VLDL sentezi için esansiyel olup eksikliğinde serum trigliserid seviyeleri azalırken karaciğer trigliserid seviyeleri artar. Sonuç olarak steatozda artış meydana gelir (159,160). MCD diyet ratlarda glutatyon (GSH) ve S-adenozilmetionin (S-AMe) gibi hepatik antioksidanları deplase eder (11). MCD diyet oksidatif defans mekanizmalarını baskılayarak oksidatif stresi artırır (12). Bu durum TNF- α ve diğer proinflamatuvar sitokinleri indükler (13). Benzer mekanizmalarla non-alkolik yağlı karaciğer ve insülin rezistansına yol açar. Bu yüzden MCD modelle yapılan çalışmalar hepatik steatoz ve steatohepatitin patogenezi (obeziteden bağımsız olarak) oksidatif stresin önemini vurguladığı için aydınlatıcıdır. MCD diyet ile beslenen farelerde aminotransferaz düzeyinde yükselmeler, steatoz ile karakterize karaciğerde histolojik değişiklikler, fokal inflamasyon, hepatosit nekroz ve fibrozis indüklenir. Bu hızlı histolojik değişiklikler insan NASH'de görülenlerle morfolojik olarak benzerdir (15, 16).

Sonuç olarak NASH patogenezi komplekstir. İlk hasar insülin rezistansı ile başlar ve hepatosteatoz gelişir. Steatohepatit için ikinci hasar gereklidir. Burada oksidatif stres ile sitokinlerin etkileşiminin kilit rol oynadığına inanılır. Oksidatif stres, nükleer faktör kapa β (NF-kappa β)'yı aktifler. Bu model hepatosit dejenerasyon ve ölümüne neden olarak proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , TGF β , IL-6, IL-8) sentezini stimüle eder (şekil 1,2,3) (2,3,4)



Şekil 3. Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) önerilen patogenezi

NAYKH'nin çoklu-hasar sürecinin bir sonucu olarak ortaya çıktığına inanılmaktadır. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi NAYKH olan birçok hastada mevcut olan ve muhtemelen diğer metabolik veya genetik anormallikler ve değişmiş sitokin düzeyleri ile birlikte, hepatik steatoza yol açabilir. Steatohepatit yol açan hepatoselüler hasar, muhtemelen örtüşen hakaretlerin bir sonucu olarak, yağlı karaciğer olan hastaların bir kısmında ortaya çıkar. Serbest yağ asidi (FFA) düzeylerindeki artış, kompanse edilmemiş oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, sitokin düzensizlikleri, mitokondriyal disfonksiyon ve diğer çevresel ve genetik faktörleri yatkın kişilerde hepatoselüler hasarın ve fibrozis gelişimine katkıda bulunabilir. ATP: adenozin trifosfat, ROS: reaktif oksijen radikalleri, TNF- α : tümör nekroz faktörü- α , TGF- β : Transforming Growth Factor - β

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (182).

3.4. KLİNİK, LABORATUAR VE GÖRÜNTÜLEME

NAYKH klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo 2 özetlenmiştir. NAYKH genellikle klinik durumla ilgisi olmayan yüksek karaciğer testleri veya hepatomegali saptanmasıyla tesadüfî olarak tespit edilir. NAYKH sahip hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir, ancak sağ üst kadranda ağrı, yorgunluk ve kırıklık tarif edebilirler. Hepatomegali NAYKH olan hastaların % 75'e kadar tarif edilmiştir ancak obez hastalarda fizik muayenede bunu saptamak zordur. Kronik karaciğer hastalığı belirtisi, spider anjiom ve asit, NAYKH ile ilişkili sirozlu hastalar hariç nadirdir.

Tablo 2: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

SEMPTOMLAR	BULGULAR	LABORATUAR
Yaygın		
Yok (hastaların %48–%100)	Hepatomegali	AST ve ALT seviyelerinde iki-dört kat yükselme AST/ALT oranı 1'in altında Serum alkale fosfat seviyelerinde hastaların 1/3'ünde ılımlı yükseklik Normal bilirubin ve albümin seviyeleri ve protrombin zamanı Yükselmiş ferritin seviyeleri
Yaygın olmayan		
Müphem sağ üst kadranda ağrısı Halsizlik Kırgınlık	Splenomegali Spider anjiom Palmar eritem Asit	Düşük titre (1:320'den az) ANA Artmış transferrin saturasyonu HFE gene mutasyonu (C282Y)

ANA, antinuclear antibodies; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (182).

Yükselmiş karaciğer biyokimyasal testleri basit yağlanması olan hastaların %50'si kadarında, ileri NAYKH olan hastaların yaklaşık % 80'inde görülebilir. Serum aspartat aminotransferaz (AST) veya alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi veya her ikisinin hafif-orta derecede (1.5-4 kat kadar) yükselmesi olağandır ancak nadiren normalin 10 katına çıkabilir. Serum ALT seviyesi, genellikle AST seviyesinden daha fazla artar bu AST seviyesinin ALT seviyesinden 2 kat fazla olduğu alkolik hepatitin tersi bir durumdur. Alkale fosfataz ve gama

glutamil transpeptidaz (GGT) düzeyleri yükselebilir, ancak serum bilirubin seviyesi, protrombin zamanı ve serum albümin düzeyi genellikle NAYKH ilişkili sirozlu hastalar hariç, normaldir. NAYKH'li hastaların dörtte birinde düşük titrede (<1:320) antinükleer antikor (ANA) pozitifliği olabilir (98). Antimitokondriyal antikor (AMA) ve hepatit B yüzey antijeni tespit edilmez. Hepatit C virüsü (HCV) antikorunun, karaciğer biyokimyasal test seviyesi yüksekliğinin tek nedeni olarak NAYKH düşünmek için negatif olduğunun gösterilmesi gerekir. Bununla birlikte, steatoz, obezite ve HCV enfeksiyonu birlikteliği sürecin daha agresif seyretmesine neden olur (99). Serum seruloplazmin ve α_1 Antitripsin düzeyleri normal sınırlar içindedir. Serum ve karaciğer demir düzeyleri NAYKH olan hastalarda yükselebilir. Özellikle, serum ferritin düzeyi NAYKH hastaların %20-%50'sinde yüksek saptanabilir bu ileri bir hastalığın işareti olabilir (48,100). Bununla birlikte, NAYKH olan hastalar arasında genetik hemokromatoz sıklığı yüksek değildir. Klinik ve laboratuvar bulgular NAYKH histolojik şiddeti ile korale değildir. Siroz da dahil olmak üzere NAYKH histolojik spektrumunda, normal veya normale yakın serum aminotransferaz düzeyleri görülebilir (50).

Görüntüleme çalışmaları genellikle açıklanamayan karaciğer biyokimyasal anormalliklerin değerlendirilmesi veya NAYKH şüphelenilmesi ile elde edilir. Karaciğer ultrasonografi en sık kullanılan görüntüleme yöntemidir. Karaciğer yağlanması ile birlikte ekojenitede artış ortaya çıkarabilir. Yağlı karaciğer de abdominal bilgisayarlı tomografide yağlı bir karaciğerin yoğunluğu dalağa göre daha düşüktür. Manyetik rezonans (MRG) T1 ağırlıklı görüntülemelerde yağlanma parlak görülür. Basit steatozdan NASH ayrımı için BT ile ultrasonografiyi değerlendirilen çalışmada karaciğerin %33'den fazlasını kapsayan hepatik yağlanmanın tespiti için duyarlılığın %100 ve %93 olduğunu gösterildi, pozitif prediktif değerleri ise sırasıyla %62 ve %76 olarak bulundu (101). Radyolojik görüntüleme dışı yöntemlerde NAYKH'nin ileri formları ile basit steatozu ayırt etmede kullanılabilir. Ultrasonografi gibi görüntüleme çalışmaları NAYKH teşhisi destekleyebilir ancak hastalığın şiddetini tahmin edemez ve kesin teşhis koymak için karaciğer biyopsisinin yerini alamaz.

3.5. HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLER

NAYKH'nin majör histolojik özellikleri alkole bağlı karaciğer hastalığına benzer ve steatoz (karaciğer yağlanması), steatohepatit (yağlı karaciğer+fokal nekrozlu veya nekrozsuz parankimal iltihap), ve sirozda dahil olmak üzere fibrozisi değişen derecelerde içerir. Mikroveziküler yağlanma görülmesi ve zon 3 (perivenüler) steatoz zaman zaman bildirilmesine rağmen steatoz, ağırlıklı olarak makrovezikülerdir ve genellikle karaciğer lobülü boyunca diffüz olarak dağılır. Hafif lenfositik, nötrofilik veya karışık inflamatuvar infiltrasyonlar gözlenebilir ve glikojenlenmiş çekirdekler yaygındır.

NASH, NAYKH'nin ilerlemiş bir formudur. Alkolik hepatitten histolojik olarak ayırt edilemez (Tablo 3). Steatoz tüm olgularda mevcuttur ve diffüz veya primer olarak santral zonlardaki hepatik lobülleri etkileyebilir. Steatoz derecesi hastanın VKİ ile korale olabilir ve genelde alkolik hepatitten NASH'de daha şiddetli olabilir (102). Lobüler inflamasyon NASH'nin bir işaretidir. Lenfositler, diğer mononükleer hücreler ve polimorfonükleer nötrofil infiltrasyonu ile karakterizedir. İnflamasyonun yoğunluğu steatohepatit şiddetine göre değişir ve alkolik hepatitten NASH'de daha hafif olabilir (103). Glikojenlenmiş çekirdek bulunabilir. Hepatosit balonlaşması ve çeşitli derecelerdeki hepatosit nekrozu sıklıkla mevcuttur ve kötü prognoz habercisi olabilirler (104,105). Mallory (veya Mallory-Denk) cisimciği küçük, seyrek ve göze çarpmayabilir fakat sık görülür. Hafif boyanabilen demir hastaların %50'si kadarında mevcut olabilir. Perisellüler, perisinüzoidal ve periportal fibroz NASH olan hastaların %84 ile %37'sinde tariflenmiştir. Fibrozis dağılımı değişkendir. Perisinüzoidal fibrozis özellikle yetişkinlerde yaygındır, başlangıçta hafif ve terminal hepatik venler etrafında ağırlıklı olarak zon 3 bölgesindedir (50). Siroz NAYKH ve anormal karaciğer biyokimyasal testi olan hastaların karaciğer biyopsisinde %7 ile %16 arasında saptanmıştır (34,48). NAYKH'li morbid obez hastalarda siroz olma riski daha fazladır. NAYKH ile ilişkili sirozda, NAYKH'nin tipik histolojik özellikleri çok az veya yok olması hastaların kriptojenik siroz yanlış tanısı almasına yol açmaktadır.

Tablo 3: Non-alkolik Steatohepatit Histolojik Özellikleri

Tüm veya pek çok olguda mevcut
Makroveziküler steatoz Diffüz veya sentrilobüler yağlanma; derecesi VKİ ile ilişkili olabilir
Parankimal inflamasyon Polimorfonükleer nötrofiller, lenfositler, diğer mononükleer hücreler
Hepatosit nekrozu Balon hepatosit dejenerasyonu
Çeşitli frekanslar ile gözlenen
Perivenüler, perisinüzoidal veya periportal fibrozis (%37 - %84), hafif -şiddetli % 15- %50; en baskın zon3 (perivenüler)
Siroz (biyopsi örneklerinde %7 - %16)
Mallory cisimcikleri
Glikojenlenmiş çekirdekler
Lipogranulomas
Boyanabilen hepatik demir

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (182).

NASH'nin tanımlanması için tam bir histolojik kriter henüz tanımlanmamıştır. En az iki skorlama sistemi önerilmektedir. NASH patolojik sınıflandırma konusunda fikir birliğine ulaşmak için, Pathology Committee of the National Institutes of Health NASH 14 histolojik özellikleri içeren bir skorlama sistemi önermiştir (106,107). Ancak şimdiye kadar, NAYKH veya NASH için bir skorlama sistemi yaygın olarak kabul edilmiş değildir. Brunt'un önerdiği skorlama sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır (tablo 4), (22).

Tablo 4. Steatohepatit İçin Önerilen Skorlama Sistemi

Değişken	Skor	Tanımlama
Steatozis	0 1 2 3	Yok Asininin %33'e kadar, özellikle makroveziküler Asininin %34-66, Asininin %66'nın üzerinde (panasiner), sıklıkla mix steatoz
Hepatosit balon dejenerasyon	0 1 2	Yok Ara sıra zon III' de Belirgin, dominant olarak zon III' de
Lobüler İnflamasyon	0 1 2 3	Yok Seyrek nötrofiller, ara sıra mononükleer hücreler, 20x objektifte her odakta 1 yada 2 Balonlaşmış hepatositle ilişkili nötrofiller, hafif kronik inflamasyon, 20x objektifte her odakta 3 yada 4 Akut ve kronik inflamasyon, nötrofiller zon III' de konsantre olabilirler, 20x objektifte her odakta 4'ün üzerinde
Evre	0 1 2 3 4	Fibrozis yok Zon III perivenüler, perisinüzoidal fibrozis Evre 1 değişimler+ periportal fibrozis Köprüleşme fibrozis Siroz

Kleiner et al., Hepatology 2005;41:1313-21 (106).

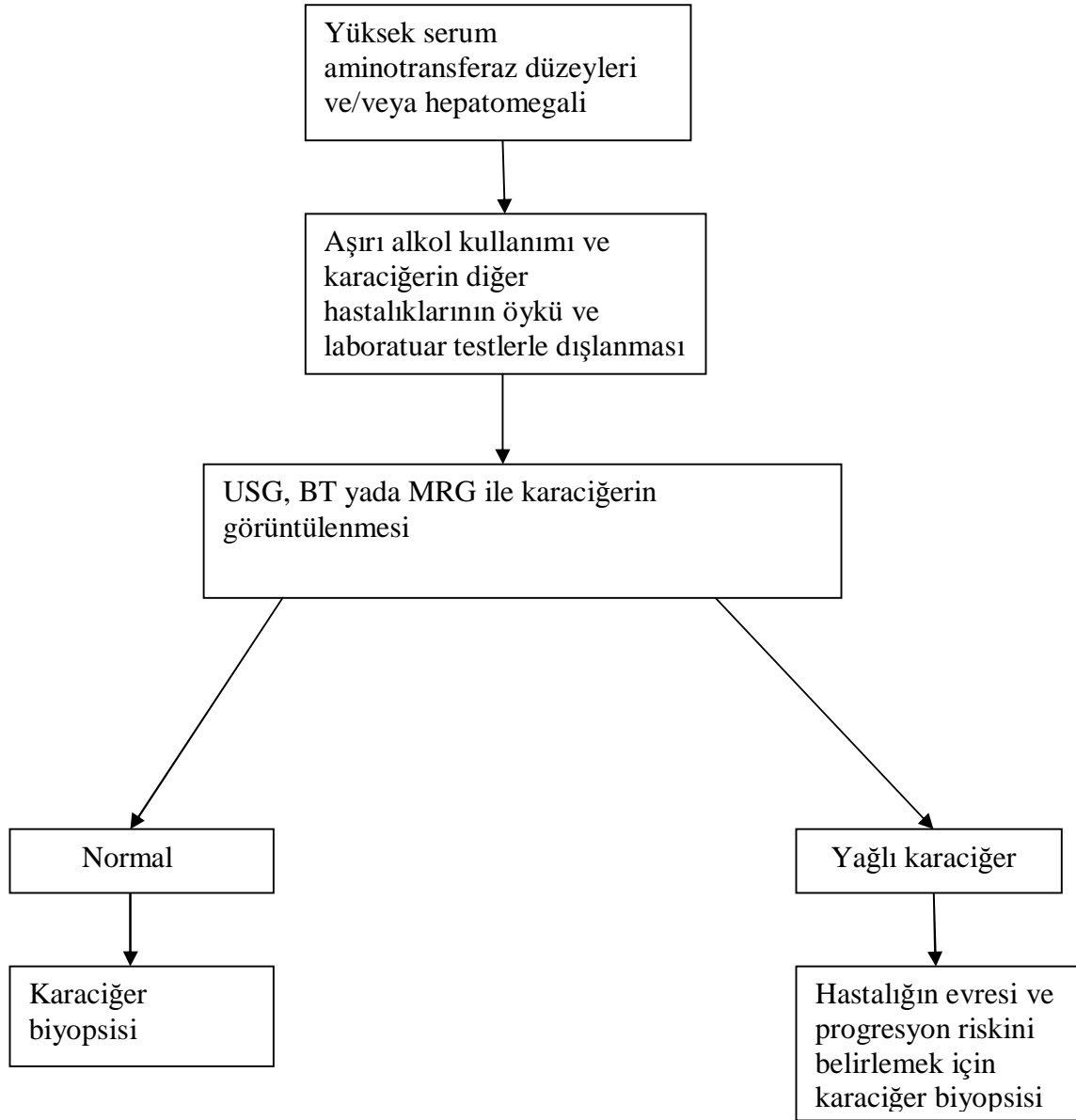
3.6. TANI

NAYKH kesin tanısı hem klinik hem histopatolojik verileri (Şekil 4) gerektirir. NAYKH olan hastaların çoğu hepatomegali olsun veya olmasın yüksek kronik karaciğer biyokimyasal test düzeyleri nedeniyle değerlendirilir. Hastanın öyküsü, fizik muayene, kan testi sonuçları ve radyolojik bulgularının kombinasyonu karaciğer hastalığının diğer nedenleri dışlamak için yararlıdır. Laboratuvar testleri, karaciğer biyokimyasal testleri, tam kan sayımı, protrombin zamanı, anti-HCV, hepatit B yüzey antijeni, demir endeksleri, α_1 -Antitripsin, 40

yaşından daha genç kişilerde seruloplazmin ve AMA içermelidir. Görüntüleme yöntemleri tanıyı destekler, ancak karakteristik bulguların yokluğunda NAYKH tanısı dışlanamaz. NAYKH tanısının konulması için alkolik karaciğer hastalığı ekarte edilmelidir. Klinik ve histolojik veriler ayaktan tetkik edilen hastalarda alkolik karaciğer ile NAYKH'yi ayırt ettirmede güvenilir değildir. Bu nedenle, NAYKH tanısında önemli miktarda alkol kullanımının olmadığı gösterilmesi gerekmektedir, buda birçok klinik çalışmada en çok günde 20-40 g alkol tüketimi olarak ele alınmaktadır.

a-Karaciğer Biyopsisinin Rolü:

NAYKH tanısında karaciğer biyopsi rolü tartışılmaktadır. Birçok uygulayıcı klinik ve laboratuvar incelemelerinin kronik karaciğer hastalığının bir başka nedenini ortaya çıkarmak için başarısız olduklarını düşünmektedir. Laboratuvar ve NAYKH histolojik bulgular arasındaki korelasyon zayıftır ve normal karaciğer biyokimyasal test sonuçları olan hastalarda biyopsi örneklerinde belirgin karaciğer hasarı olabilir (50). Karaciğer biyopsisi karaciğer yağlanması, nekroz ve fibrozisi belirleyerek NAYKH'de en iyi prognoz göstergesidir (108). Ayrıca, NAYKH'nin doğal seyrini anlama ve tedavi kararında gecikmelere histolojik veri eksikliği neden olmaktadır. Karaciğer biyopsisi yapılacak hastayı seçmek için dikkatli davranılmalıdır. İlerleyici hastalık için birçok klinik ve biyokimyasal risk faktörleri tespit edilmiştir ve bunlar karaciğer biyopsi için hasta seçimi kolaylaştırabilir. Obez hastalar, uzun süreli veya kalıcı karaciğer biyokimyasal test anormallikleri (hatta iyi glisemik kontrol ve kilo kaybından sonra), ileri yaş, metabolik sendrom, 1'den büyük bir AST/ALT oranı, belirgin yüksek karaciğer biyokimyasal test seviyeleri, portal hipertansiyon belirti ve bulguları veya bir görüntüleme fibrozis kanıt bulguları olması ileri evre karaciğer hastalığının muhtemel bir göstergesidir (Tablo 5) (48,105). Karaciğer biyopsi sonuçları bu hastalarda daha agresif bir tedavi stratejisi ve sirozun diğer komplikasyon ve hepatoselüler karsinom için ayrıntılı tetkik edilmesini sağlayabilir.



Şekil 4. Şüpheli non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) olan hastalara tanısal yaklaşım

NAYKH tanısı klinik ve histolojik kriterlere dayanmaktadır. Çoğu hasta serum yüksek aminotransferaz düzeyleri ve /veya hepatomegali nedeniyle değerlendirilir. Aşırı alkol kullanımı yoktur ve laboratuvar test sonuçları karaciğer hastalığının diğer nedenlerini dışladığı zaman NAYKH tanısı düşünülmelidir. Radyolojik çalışmalarda yağlı karaciğer gösterilebilir. Karaciğer biyopsisi, fibrozis değerlendirilmesi ve basit steatozla ileri karaciğer hastalığı ayrımı için ayrımı için gereklidir.

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (182).

Tablo 5. İlerlemiş Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı İçin Risk Faktörleri

Klinik	
İleri yaş (>50)	
Obezite	
Diabetes mellitus/insülin direnci	
Hipertansiyon	

Laboratuvar	
AST/ALT oranı > 1	
Serum ALT seviyesi > normalin iki katı	
Serum trigliserid seviyeleri > 155 mg/dL	

Histolojik	
şiddetli steatoz	
Nekroinflamatuvar aktivite (hepatosit balonlaşma, nekrozis)	
Boyanabilir demir	

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (182).

b-NAYKH'de Fibrozisin Non-invaziv Belirteçleri:

Perkütan karaciğer biyopsisi NAYKH tanısı için standart olmasına rağmen, pahalı, invaziv ve küçük de olsa komplikasyon riski vardır. Örnekleme değişkenliği yaygındır ve NAYKH olan kişilerin çok sayıda olması nedeniyle karaciğer biyopsisi yapmak gerekli insan gücünü aşmaktadır. Önemli bir ilerleme basit, non invaziv hepatik fibrozis derecesini tahmin etmek için geliştirilen yöntem FibroTest yöntemidir. Bu non invaziv testlerin en iyisidir. Hepatik fibrozis tahmin etmek için kullanılan kan testleri paneli serum α_2 Makroglobulin, apolipoprotein A-1, haptoglobulin, total bilirubin ve GGT düzeyleri ve nekroinflamatuvar aktivite indeksi ve serum ALT düzeyini birleştirir. NAYKH olan 167 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, Fibrotestin köprü fibrozisi ve sirozu tespit için çok hassas olduğu görüldü (109). Fibrotest cutoff değeri 0.70 olarak alındığında ileri fibrozis için pozitif prediktif değeri % 73 ve spesifitesi % 98 olarak tespit edildi. Fibrotest cutoff değeri 0.30 ilerlemiş fibrozis için

% 90 negatif prediktif değere sahipti. Ne yazık ki, hastaların %33'ünde 0.30 ve 0.70 arasında bir fibrotest puanı vardı ve bu aralıkta test fibrozis evresi değerlendirmek için yetersizdir. Bu nedenle, bu aralıkta bir puan ile hastaların doğru evrelenmesi için karaciğer biyopsisi gerekir.

Ultrason kullanarak Fibroscan yöntemi fibrozis tahmini ve karaciğer sertliğini tespit etmede başarılı bulunmuştur (110). Serum dehidroepiandrosteron düzeyleri ve serum hyaluronik asit düzeyleri değişken başarı ile değerlendirilmiştir (111,112). Fibrozisin non invaziv endeksleri NAYKH olan hastalarda, gelecekte karaciğer biyopsisinin yerine kullanılması mümkündür ancak tüm hastalarda bu söz konusu değildir.

3.7. DOĞAL SEYİR

NAYKH'nin doğal seyri büyük ölçüde bilinmemektedir, çünkü NAYKH olan hastalarda histolojik takipli prospektif yeterli çalışma yoktur. Retrospektif çalışmalardan elde veriler NAYKH hastaların çoğunda iyi seyirli bir hastalık olduğunu desteklemektedir. Hepatosit nekroz ve fibrozisi olmayan steatozlu hastalarda histolojik veya progresyonun çok az olduğu görülmüştür (113). Bazı hastalarda, bununla birlikte, NAYKH siroz, karaciğer yetmezliği veya hepatoselüler karsinoma yol açabilir. 2003 ve 2008 yılları arasında beş retrospektif, karaciğer biyopsisi uygulanan NAYKH olan toplam 215 hastanın dahil olduğu çalışma yayınlanmıştır (28,114-116). İzlem süreleri 1 ila 14 yıl arasında değişmekteydi ve fibrozisin histolojik progresyonu %32-%41 hastada rapor edildi. NAYKH %50-%34 hastada histolojik olarak stabil olduğu ve %16-%29 hastada progresyon görüldü. Fibrozis ilerleme hızında önemli ölçüde değişkenlik hastalar arasında gözlenmiştir; histolojik progresyonlu çoğu hastada klinik bozulma olmadı ve klinik veya laboratuvar verileri karaciğer hastalığının seyrini tahmin etmede güvenilir değillerdir. Histolojik evrelemedeki değişkenlik örnekleme hatası sonucu olabilir, bu veriler dikkatle yorumlanmalıdır (117).

Olmsted, Minnesota'dan NAYKH olan 420 hastanın dahil edildiği geniş toplum tabanlı çalışmada; siroz 7.6 yıl takip sırasında hastaların %3'ünde gelişti (118). Bu kohortta karaciğer hastalığı, kanser ve iskemik kalp hastalığı sonrası üçüncü sıradaki ölüm nedeniydi. Bu sınırlı veriler hastaların çoğunda NAYKH yavaş seyirli bir durum olduğunu göstermektedir. Ancak etkilenen kişilerin küçük bir kısmında kısa bir süre içinde, klinik olarak karaciğer hastalığı ciddi klinik tablolara ilerleyebilir. Bu sonuç, NAYKH olan 132 hastanın alındığı, 18 yıl takipli klasik bir çalışmanın verileri tarafından desteklenmektedir (119). Bu çalışmada karaciğer biyopsi örneğinin histolojik hasar derecesi ile klinik sonuçları karşılaştırıldı. Her biyopsi örneği kümülâtif steatoz oluşumu, inflamasyon, hepatosit nekrozu ve fibrozis tarafından belirlenen giderek şiddeti artan hastalığı temsil eden 1 ile 4 alt grup tiplerine ayrıldı. Tip 3-4 hastalarda (steatoz, inflamasyon ve nekroz, fibrozis olan veya

olmayan) siroz ve karaciğer hastalığı ile ilişkili ölüm Tip1-2 hastalardan (nekrozsuz setatoz) daha sık (sırasıyla %25 ve %11) olmasına rağmen mortalite açısından iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu.

NAYKH ve alkolik hepatit histolojik olarak benzer, ancak klinik sonuçları önemli ölçüde farklıdır. Alkolik hepatit'li hastaların beş yıllık sağ kalım oranı %50-%75'tir. Bir çalışmada NASH olan hastaların uzun süreli sağkalım oranının alkolik hepatit olan hastalardan önemli ölçüde daha iyi olduğunu gösterilmiştir (102). NAYKH ilişkili siroz gelişimi hastaların minör bir kısmını oluşturur. Bununla birlikte siroza neden olan diğer hastalıklarda da durum benzerdir. NAYKH'nin kriptojenik sirozlu birçok olgunun olası nedeni olduğunu ileri süren güçlü bulgular mevcuttur (120-122) ve hepatoselüler karsinom gelişimi ile ilişkili olabilir (49,121,123). Bir çalışmada 5-10 yıl içinde NAYKH ile ilişkili siroz gelişimi ile HCV ilişkili siroz gelişimi benzerdi ancak hepatoselüler karsinom NAYKH olan hastalarda anlamlı olarak daha az görülmektedir (124).

Büyük prospektif çalışmalar NAYKH doğal seyrini tanımlamak için gereklidir, ancak ortaya çıkan deliller NAYKH'nin progresif olabileceğini ve bazı hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğunu teyit etmektedir. Karaciğer ile ilişkili morbidite ve mortalite riski ilk karaciğer biyopsi örneğinde ileri NAYKH (nekroz ve fibrozisli steatohepatit) kanıtı olan kişilerde yüksektir (119). İlerleyici hastalık için klinik ve biyokimyasal risk faktörleri tespit edilebilir. Kadınların sayısı NAYKH çalışmalarında yüksektir, ancak cinsiyetin ilerlemiş hastalık için bağımsız bir risk faktörü olup olmadığı açık değildir. İleri yaş, obezite, diabetes mellitus, 1'den büyük bir AST/ALT oranının NAYKH olan hastalarda şiddetli fibrozis (köprüleşme/siroz) önemli bir prediktörü olduğu bir çalışmada gösterildi (48).

Biyokimyasal karaciğer testlerinde anormallik olan aşırı kilolu hastaların alındığı başka çalışmada, karaciğer fibrozu ile bağımsız hepatik nekroinflamatuvar aktivite indeksi, BKİ'nin 28 kg/m² den fazla olması, 50 yaşın üzeri, 1,7 mmol/L daha yüksek serum trigliserid düzeyi ve normalden 2 kat daha fazla ALT düzeyleri arasında bir ilişki vardı (52). Obezite cerrahisi için sevk edilen morbid obez hastalarda, sistemik hipertansiyon, yükselmiş serum ALT düzeyi ve yüksek insülin direnci indeksi ileri NAYKH için yüksek prediktif değere sahipti (34). Daha önce de belirtildiği gibi siroz, normale yakın karaciğer biyokimyasal testli obez olmayan hastalarda gösterilmiştir.

3.8. TEDAVİ

NAYKH'nin belirlenmiş etkin tedavisi henüz yoktur. Bugüne kadar NAYKH hastalarda steatoz, inflamasyon ve fibrozisin iyileştiğini gösteren randomize kontrollü büyük bir çalışma yoktur. Yayınlanmış çalışmaların hasta sayısı az, dahil edilme kriterleri, sonlanım noktaları ve klinik etkileri sınırlı kalmaktadır. Tarihsel olarak, NAYKH tedavisi kilo kaybı, soruna neden olan ilaç ve toksinlerin uzaklaştırılması ve diabetes mellitus ve hiperlipidemi gibi metabolik bozuklukların kontrolünden oluşmuştur. Birkaç vaka takdiminde ve küçük çalışmada diyet ve egzersizin NASH'li çocuk ve erişkinlerde biyokimyasal, ultrasonografik ve bazen histolojik anormallikleri düzettiği gösterilmiştir (71,125-127). Yoğun beslenme danışmanlığı ve sürekli kilo kaybı bazı hastalarda belirgin histolojik iyileşmeye yol açabilir (128). Birkaç küçük, ölçüde kontrolsüz çalışmada, mide ve pankreas lipazının reversibl bir inhibitörü olan orlistat ile kilo kaybı elde birkaç hastada karaciğer biyokimyasal test sonuçları, steatoz ve fibroziste iyileşmeler görüldü (129,130). Obezite cerrahisi (bariatrik cerrahi) oldukça iyi kilo kaybına yol açar ve hastaların çoğunda insülin duyarlılığını artırır, NAYKH patogenezinde rol alan metabolik anormallikleri bazılarını normalleştirir, karaciğer inflamasyonu ve fibrozis mediyatörlerin hepatik ekspresyonunu azaltır ve NAYKH olan hastalarda karaciğer histolojisini iyileştirir (131-135).

Hiçbir bilimsel veri NAYKH'li tüm hastalar için uygun belli bir ticari veya tıbbi diyet planı ve doğru beslenme yaklaşımı için mevcut değildir (136). Ne yazık ki diyet, tıbbi yardımlar, egzersiz veya cerrahi ile sağlanan kilo kaybı ile sonlanım noktası histolojik iyileşme olan randomize, prospektif çalışma yoktur. Bu tür çalışmalarda NAYKH'li aşırı kilolu hastalarda orta derecede kilo kaybı sağlanır ancak kalıcı kilo kaybı nadir görülür. Hızlı kilo kaybı, özellikle obezite cerrahisi (137) sonrası, morbid obez hastalarda steatohepatit şiddetlenebilir, bu nedenle kilo kaybı ve karaciğer biyokimyasal testleri kilo verme rejimi uygulanan hastalarda dikkatle izlenmelidir. Yapılan bir derlemede NASH'in ve basit karaciğer yağlanması iki ayrı antite olarak ele alınıp, lipit düşürücü ve insülin duyarlılaştırıcıların basit yağlanma tedavisinde; antioksidan ve sitoprotektif ilaç grubunun NASH tedavisinde kullanımının daha uygun olabileceğini belirtilmektedir (19). Yeni tedavi yöntemleri için NAYKH'nin patogenezinin anlamak gerekir (Tablo 6).

Tablo 6. Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı için Potansiyel Tedaviler

Toksinlerden Kaçınma
Potansiyel ilaçlar/toksinler kesilmeli Alkol alımını en aza indirmeli
Egzersiz ve diyet
Kilolu hastalarda orta, sürekli egzersiz ve kilo kaybı Belirli diyetlerin etkileri bilinmemektedir
Anti diyabetik / insülin duyarlılığını arttırıcı ajanlar
Metformin Tiazolidinedionlar
Lipid düşürücü ajanlar
Gemfibrozil Statinler
Antioksidanlar
Betain N-asetilsistein Süperoksit dismutaz E vitamini
Flebotomi ile demir azaltma
İnflamatuar mediatörlere etkililer
Mitokondriyal ATP depolama ve/veya aktivitesini arttıranlar Leptin aktivitesini düzenleyenler TNF- α aktivitesini düzenleyenler Adiponektin seviyelerini yükseltenler
Morbid obezite için Obezite cerrahisi

ATP, adenozin trifosfat. TNF- α , tümör nekroz faktörü- α .

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (182).

a-Antioksidanlar

Oksidatif stresi en aza indiren ilaçlar yararlı olabilir. E vitamini, ucuz ama güçlü antioksidandır, Birkaç küçük pediatrik ve erişkin çalışmasında NAYKH tedavisi için incelenmiştir, sonuçlar değişkendir (71,138,139). Tüm çalışmalarda, E vitamini iyi tolere edildi ve çoğu çalışmada serum aminotransferaz düzeylerinde, karaciğer ultrasonografik görünüm ve seyrek olarak histolojik bulgularda iyileşmeler görüldü. NAYKH histolojik iyileşmeye sağlayıp sağlamadığını belirlemek için histolojik kriterleri sonlanım noktası olan randomize kontrollü E vitamini tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır. Kardiyovasküler hastalılarda potansiyel negatif etkileri göz önüne alınarak E vitamini NAYKH tedavisinde kullanırken dikkatli olunmalıdır (140).

Betaine, SAM düzeylerini yükselten ve hücrel oksidatif hasarı azaltan bir kolin metabolitidir. NASH için terapötik bir ajan olarak küçük bir pilot çalışmada umut verici olarak görülmüştür (141). N-asetilsistein, süperoksit dismutaz ve ragaglitazar gibi PPAR- α agonistleri ümit verici ajanlar olarak görülmektedir ancak klinik insan çalışmaları yetersizdir (83,142,143).

N-asetilsistein:

1963 yılında sistein metabolizmasının bir ürün olan N-asetilsistein mukolitik olarak kronik akciğer hastalığında yaygın kullanılmaya başlandı. Başlangıçta sadece inhalasyon yolu ile kullanılan NAC, oral yolla kullanıldığı zamanda etkili olduğu gösterildi. N-asetilsistein aynı zamanda 40 yıldan fazladır asetaminofen zehirlenmesinde kullanılmakta olan bir antidot olup; major endojen antioksidan olan glutatyonun (GSH) prekürsörüdür. Akciğer hastalıkları ve mukus viskozitesi üzerindeki etkilerinin, direk mukus yıkıcı etkisinden çok glutatyon aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Glutatyon sistein içeren bir tripeptid olup, aminoasit transportu, serbest radikallerin, reaktif oksijen ara ürünlerinin ve bazik toksik kimyasalların temizlenmesi gibi hücrel olaylarda rol alır (161). NAC oral uygulamadan sonra hızla emilir ve 1 saatte kan pik düzeyine ulaşır. Bağırsak ve karaciğerde hızla metabolize edilmesinden dolayı N-asetilsisteinin kan düzeyi düşüktür. Metabolizmasındaki önemli yollardan bir tanesi N-asetilsisteinin L-sisteine dönüşmesi, daha sonra da sisteinin glutatyon içine girmesi ve çözünür olmayan L-sistine okside olamamsıdır. Nakano ve arkadaşları yaptıkları çalışmada steatotik ratların karaciğer dokusundaki redükte glutatyon düzeylerinin, nonsteatotik olanlara oranla belirgin düşük olduğunu saptadılar. Aynı çalışmada steatotik ratlarda N-asetilsistein uygulaması sonrası redükte glutatyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (169).

N-asetilsisteinin etkisi ile ilgili ikinci mekanizma mikrosirkülatuvar relaksan özelliğine bağlanmaktadır. Steatotik karaciğerde sinüzoidal aralıkların normal karaciğere oranla %54 azaldığı ve hepatik kan akımının 1/3'üne indiği gösterilmiştir (162). Stamler ve arkadaşları NAC'nin endotelden kaynaklanan bir relaksan gibi davrandığını göstermişlerdir (163). Bu araştırmacılar N-asetilsisteinin hızla S-nitrosisteine metabolize olduğunu ve bununla endotel hücrelerde nitrik okside benzer etkileri olduğunu buldular. Mikrosirkülatuvar relaksan olduğu hipotezi kan akımının azaldığı steatotik karaciğer hastalığı için ilgi çekicidir.

b-İnsülin-Sensitize Ajanlar

Hiperinsülinemik insülin direncinin ve NAYKH arasındaki ilişki tedavi için mantıklı bir hedef sağlamaktadır. Metformin, hiperinsülinemi azaltan ve hepatik insülin duyarlılığını

artıran bir biguaniddir ve ob/ob farelerde karaciğer yağlanması ve hepatomegaliyi azaltmıştır (144), ancak insan çalışmalarında daha az etkilidir (145,146). Tiazolidinedionlar (TZD), güçlü PPAR- α agonistleridir, ayrıca NAYKH tedavisi için araştırılmaktadır. PPAR- α yağ dokusu, kas ve karaciğerde eksprese olan bir nükleer reseptördür. Adipositte, PPAR- α hücre farklılaşması teşvik eder ve lipolizi ve FFA'nın serbest ekspresyonunu azaltır. TZD kas dokusunda glikoz yıkımını artırarak ve hepatik glikoz çıkışını azaltarak insülin duyarlılığı ve hiperinsülinemi iyileştirir. Troglitazon, birinci nesil TZD'dur ve NASH'li hastalarda histolojik ve biyokimyasal iyileşmeler sağladı, ancak troglitazon nadir görülen fakat ciddi hepatotoksisite yan etkisi nedeniyle piyasadan kaldırıldı. Rosiglitazon ve pioglitazon, hepatotoksisite oranları düşük olan TZD'dir. Histolojik olarak kanıtlanmış NASH olan hastalarda 48 haftalık tek kollu çalışmada incelenmiştir (147,148). Hem iyi tolere edilerek insülin duyarlılığını artırdığı, karaciğer biyokimyasında normalleşme ve çoğu hastada histolojik düzelmeye sağladığı tespit edilmiştir. Ancak her iki TZD'nun dezavantajı önemli ölçüde kilo alınması (%4.0-%7.3) ve artmış total vücut yağı olarak saptandı. Ayrıca, tedavinin tamamlanmasından sonra, biyokimyasal ve histolojik iyileştirmelerin devamlılığı incelenmedi. Bir takip çalışmasında ilaç kesildikten sonra pioglitazon yararlı etkileri de ortadan kalktı (149). Plasebo kontrollü bir Avrupa çalışmasında NAYKH olan 63 hastada rosiglitazon tedavisiyle steatoz ve serum aminotransferaz seviyelerinde düzelmeye gösterildi ancak nekroinflamasyon veya fibroziste iyileşme görülmedi (150). Rosiglitazonla tedavi edilen hastalarda belirgin kilo artışı görüldü. TZD'un NAYKH olan hastalarda rutin kullanım için tavsiye edilebilmesi için büyük, plasebo-kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

c-Demir Redüksiyonu

Yüksek serum demir ve ferritin düzeyleri genetik hemokromatoz veya karaciğer demir yükü olmayan NAYKH'li bazı hastalarda tespit edilmiştir. Çoğu araştırmacılar artmış serum demirinin NAYKH patogenezinde rol oynadığından çok hepatik inflamasyonun bir yan ürünü olduğuna inanır ama birkaç küçük çalışma, demir azalması, plazma glikoz, insülin ve aminotransferaz düzeylerini azaltarak NAYKH'de terapötik bir role sahip olabileceğini ortaya koymuştur (151,152). Demir ve insülin arasındaki ilişki karmaşıktır, ama demir depleksiyonunun insülin koruyucu etkisi, iskelet kısıtlı glikoz transportu ve metabolizmasında artma, insülinin artmış hepatik ekstraksiyon ve metabolizması sonucu olabilir (153). Bu çalışmaların temel sınırlaması histolojik kriterlerin sonlanım noktaları olmamasıdır, ama sonuçlar ilginçtir ve daha fazla araştırma yapılmasına değerlidir.

d-Lipid düşürücü ve sitoprotektif Ajanlar

NAYKH tedavisi için lipid düşürücü ve sitoprotektif ilaçları yararlılığıyla ilgili farklı sonuçlar, birkaç küçük çalışmada değerlendirilmiştir. Gemfibrozil tedavisi alan ile almayan kontrol grubu karşılaştırıldığında, tedavi grubunda hastaların %74, almayan kolda %30 biyokimyasal iyileşme olduğu saptanmış, ancak histolojik özellikleri değerlendirmeye alınmamıştır (154). Bir 3-hidroksi-3-metil-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü olan atorvastatin ile NASH tedavisi küçük bir pilot çalışmada ümit verici görüldü (155), ancak statinlerle büyük bir klinik çalışmada yoktur. Bir sitoprotektif ajan olan ursodeoksikolik asit, NASH'de bir pilot çalışmada ümit verici sonuçlar gösterdi ancak bir randomize plasebo-kontrollü çalışmada etkili bulunmadı (156). Ursodeoksikolik asit ve E vitamini kombinasyonu bazı yararlı etkinlikleri görülmüştür.

e-Gelecek tedaviler:

Adiponektin düzeylerini artırmak, TNF- α nötralize etmek, mitokondriyal ATP dengesini iyileştirmek veya leptin düzeyleri değiştirecek ajanları içerebilir. NAYKH patogenezine daha fazla anlaşıldığında yeni terapötik ajanlar olasılıkla geliştirilecektir.

Anti TNF ajanlar:

Günümüzde klinik kullanımda infliksimab, etanersept, adalimumab, golimumab ve sertolizumab pegol olmak üzere beş tane anti- TNF- α ilacı bulunmaktadır.

İnfliximab: Biyolojik tedavi grubundaki anti-TNF ajanların prototipidir. İnfliksimab TNF-alfa'ya spesifik şimerik monoklonal IgG1 antikoru olup %75 insan ve %25 sıçan sekanslarından oluşmuştur ve TNF-alfa reseptörüne bağlanarak TNF-alfa'nın biyolojik aktivitesini nötralize eder. TNF- α antikoru olan infliximab rat-insan kimerik monoklonal antikordur. inflamatuvar bağırsak hastalığı ve romatoid artrit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5,6). Bir kaç çalışmada İnfliximab'ın ratlarda NASH modelinde karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir (7,8).

Adalimumab: TNF- α karşı tamamıyla insan IgG1 monoklonal antikordur (171). 2008 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından romatoid artrit, psöriatik artrit, ankilozan spondilit, crohn hastalığı, ciddi psoriasis ve juvenil idiyopatik artrit tedavilerinde, 2012 yılının sonlarında ise ülseratif kolit tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. Romatoid artrit nedeniyle kullanılan NASH'li bir hastada biyokimyasal parametrelerde kalıcı yanıt görülmüştür (9). Henüz NASH'de Adalimumab kullanımı ile ilgili bir çalışma yoktur.

Etanercept: Rekombinant TNF- α reseptör füzyon proteindir ve insan IgG1'in Fc parçasına bağlı insan TNF- α reseptör 2'nin iki ekstrasellüler parçasından oluşur (171).

Etanercept sadece trimerik çözümlü TNF' yi monoklonal antikorlardan daha yüksek affinite ile bağlar ancak affinitesi düşüktür. Bağladığı TNF'nin %90'I 2-3 saat içinde serbest hale gelir. İnfliksimuma göre transmembran TNF'yi daha düşük affinite ile ve geri dönüşümlü olarak bağlar, buna bağlı olarak da biyolojik aktivite inhibisyonu daha düşüktür (172). Diğer anti-TNF- α ilaçlardan farklı olarak TNF- α 'nın yanında makrofaj ve T hücrelerinden salgılanan lenfotoksin- α 'yı da bağlar (173). Ağır ve orta aktif romatoid artrit, poliartiküler idiyopatik artrit ve plaklı psöriazisin; psöriatik artrit ve ankilozan spondilitin tedavisinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Henüz NASH'de Etanercept kullanımı ile ilgili bir çalışma yoktur

Golimumab: Adalimumab gibi TNF- α karşı tamamıyla insan IgG1 monoklonal antikordur. 150 kDa molüler ağırlıkta olup çözümlü TNF ve transmembran TNF üzerine olan nötralizan etkisinin gücü konusunda yeterli veri yoktur (171). Yetişkinlerde ağır ve orta aktif romatoid artrit, psoriatic artrit ve ankilozan spondilitin tedavisinde aylık cilt altı uygulama şeklinde kullanımına FDA tarafından onay verilmiştir.

Sertolizumab Pegol: Humanize monoklonal anti-TNF pegile Fab fragmanıdır (171). Yapısında bulunan polietilen glikol plasantadan geçemediği için gebelerde kullanımının güvenli olacağı düşünülmektedir. FDA tarafından standart tedaviye yeterli yanıt alınamamış crohn hastalığında kullanımına onay verilmiştir.

Anti-TNF- α ilaçların yan etkileri:

Anti-TNF- α ilaçlar crohn hastalığı ve romatoid artritte standart tedavilere göre daha hızlı etki etmekte, semptomları daha erken düzeltmekte ve genel olarak iyi tolere edilmektedirler. Enjeksiyon ve infüzyona bağlı yan etkiler, fırsatçı, fungal ve tüberkülozu içeren enfeksiyonlar, lenfoproliferatif hastalıklar "hodgkin ve non-hodgkin lenfoma", demiyelizan hastalıklar "optik nörit ve multipl sklerozun reaktivasyonu", SLE benzeri sendrom ve konjestif kalp yetmezliğinin şiddetlenmesi anti-TNF ilaçlara bağlı gözlenen major yan etkilerdir. Enjeksiyon ve infüzyona bağlı yan etkiler orta ve hafif şiddette olup antihistaminikler ve glukokortikoidlerle kontrol edilebilmekte nadiren de ilacın bırakılmasını gerektirmektedir (174-175). Tüberküloz ve pnömosistis gibi fırsatçı enfeksiyonlar ve septik artrit, protez enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir (176). Anti-TNF ilaçların uygulanmasından sonra erken dönemde özellikle duyarlı kişilerde ve latent tüberkülozu olanlarda reaktivasyon ve milier yayılım gözlenmiştir (177). Lenfoproliferatif hastalık insidansının özellikle yüksek hastalık aktivitesi olan romatoid artrit hastalarında arttığı ancak bu artışın metotrexat tedavisi alan hastalarda da olduğu gözlenmiştir (179-180). Anti-TNF ilaçların yeni malignitelerin gelişmesine ve önceki malignitesi klinik olarak kontrol

altında olan hastalarda nükse yol açtığına dair kanıt yoktur ancak bu konuda kontrollü çalışmalara ve daha fazla gözleme ihtiyaç vardır. Bildirilen diğer nadir yan etkiler pansitopeni, aplastik anemi ve konjestif kalp yetmezliğinin şiddetlenmesidir (178). Hepatit B ve C enfeksiyonlu hastalarda, gebelerde ve laktasyonda kullanımlarının güvenilirliği anektodal bildiriler dışında bilinmemektedir.

f-Karaciğer Nakli

Son dönem karaciğer hastalığı gelişen NAYKH olan hastalar karaciğer nakli için değerlendirilmelidir. NAYKH karaciğer nakli sonrası tekrarlayabilir olmasına rağmen nakil sonuçları iyidir (157,158). Rekürrens veya de novo NAYKH için risk faktörleri muhtemelen multifaktöryeldir ve bunlar arasında hipertrigliseridemi, obezite, diabetes mellitus ve glukokortikoid tedavisi sayılabilir.

4-GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanan 35 adet 194-250 (ortalama 223,6) gr. ağırlığında dişi Wistar Albino rat internasyonel hayvan deney ve bakım kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 saat gündüz/gece siklusu) kafeslere alındı (resim 1).

Diyet:

İçeriği ve kimyasal yapısı hayvan diyet uzmanlarınca standardize edilmiş MCD ve normal diyet ratlara verildi (tablo 7, 8). Rat yemleri Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BOP) tarafından sağlanan kaynak ile sağlandı (Harlan Teklad, Madison WI, US). Ratlara günlük 10 gr/100gr yem ve 10-12ml/100 gr su verildi.



Resim 1. Ratların gruplara halinde kafeslere alınması

Tablo 7: Normal diyet kimyasal içeriği

Normal diyet (amino asit yeterli)	
İçerik	gr/kg
L-Alanine	3.5
L-Arginine HCl	12.1
L-Asparagine	6.0
L-Aspartic Acid	3.5
L-Cystine	3.5
L-Glutamic Acid	40.0
Glycine	23.3
L-Histidine HCl, monohydrate	4.5
L-Isoleucine	8.2
L-Leucine	11.1
L-Lysine HCl	18.0
L-Methionine	8.2
L-Phenylalanine	7.5
L-Proline	3.5
L-Serine	3.5
L-Threonine	8.2
L-Tryptophan	1.8
L-Tyrosine	5.0
L-Valine	8.2
Sucrose	351.68
Corn Starch	150.0
Maltodextrin	150.0
Soybean Oil	80.0
Cellulose	30.0
Mineral Mix, AIN-93M-MX (94049)	35.0
Calcium Phosphate, monobasic, monohydrate	8.2
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	13.0
Choline Bitartrate	2.5
TBHQ, antioxidant	0.02

Tablo 8: Metionin ve kolin defisit diyet kimyasal içeriği

Metionin ve Kolin Defisit Diyet	
İçerik	gr/kg
Sucrose	455.294
Corn Starch	200.0
Corn Oil	100.0
Cellulose	30.0
Mineral Mix, AIN-76 (170915)	35.0
Calcium Phosphate, dibasic	3.0
L-Alanine	3.5
L-Arginine HCl	12.1
L-Asparagine	6.0
L-Aspartic Acid	3.5
L-Cystine	3.5
L-Glutamic Acid	40.0
Glycine	23.3
L-Histidine HCl, monohydrate	4.5
L-Isoleucine	8.2
L-Leucine	11.1
L-Lysine HCl	18.0
L-Phenylalanine	7.5
L-Proline	3.5
L-Serine	3.5
L-Threonine	8.2
L-Tryptophan	1.8
L-Tyrosine	5.0
L-Valine	8.2
Vitamin Mix, w/o choline, A, D, E (83171)	5.0
Vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g)	0.242
Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g)	0.0396
Vitamin D3, cholecalciferol (500,000 IU/g)	0.0044
Ethoxyquin, antioxidant	0.02

Çalışmanın tasarımı:

Otuz beş adet dişi Wistar Albino rat 7'şerli beş eşit gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=7, kontrol): Bu gruptaki ratlar kontrol grubu olarak ele alınarak ve normal standart gıda ve su verildi.

Grup 2 (n=7, MCD alan grup): Bu gruptaki ratlar 6 hafta boyunca MCD diyet ve su aldı.

Grup 3 (n=7, MCD+N-asetilsistein): Bu gruptaki ratlara 20 mg/kg/gün NAC (NAC dozu ratlar için ayarlandı.) orogastrik gavaj ile uygulandı ve 6 hafta boyunca MCD diyet ve su aldılar. NASH'li ratlarda NAC ile yapılan çalışmalarda 20 mg/kg/gün dozu güvenli bulunduğu için bu doz uygulandı. Orogastrik gavaj uygulaması resim 2'de gösterildi.

Grup 4 (n=7, MCD+adalimumab): Bu gruptaki ratlarda 7 mg/kg adalimumab 0, 2, 4. haftalarda intraperitoneal uygulandı ve 6 hafta MCD diyet ve su aldılar. NASH'li ratlarda adalimumabla yapılan çalışma bulunmamakla birlikte invitro modeller ve standart hayvan çalışmalarında 7mg/kg dozu güvenli olarak bulunduğu için bu dozda uygulandı. İntraperitoneal uygulama resim 3'de gösterildi.

Grup 5 (n=7, MCD+N-asetilsistein+adalimumab): Bu gruptaki ratlara 20 mg/kg/gün NAC (NAC dozu ratlar için ayarlandı.) orogastrik gavaj ile uygulandı, 7 mg/kg adalimumab 0, 2, 4. haftalarda intraperitoneal uygulandı ve 6 hafta boyunca MCD diyet ve su aldılar. Çalışma boyunca ratlar yakından gözlendi. Ratların ağırlıkları haftalık takip edildi.

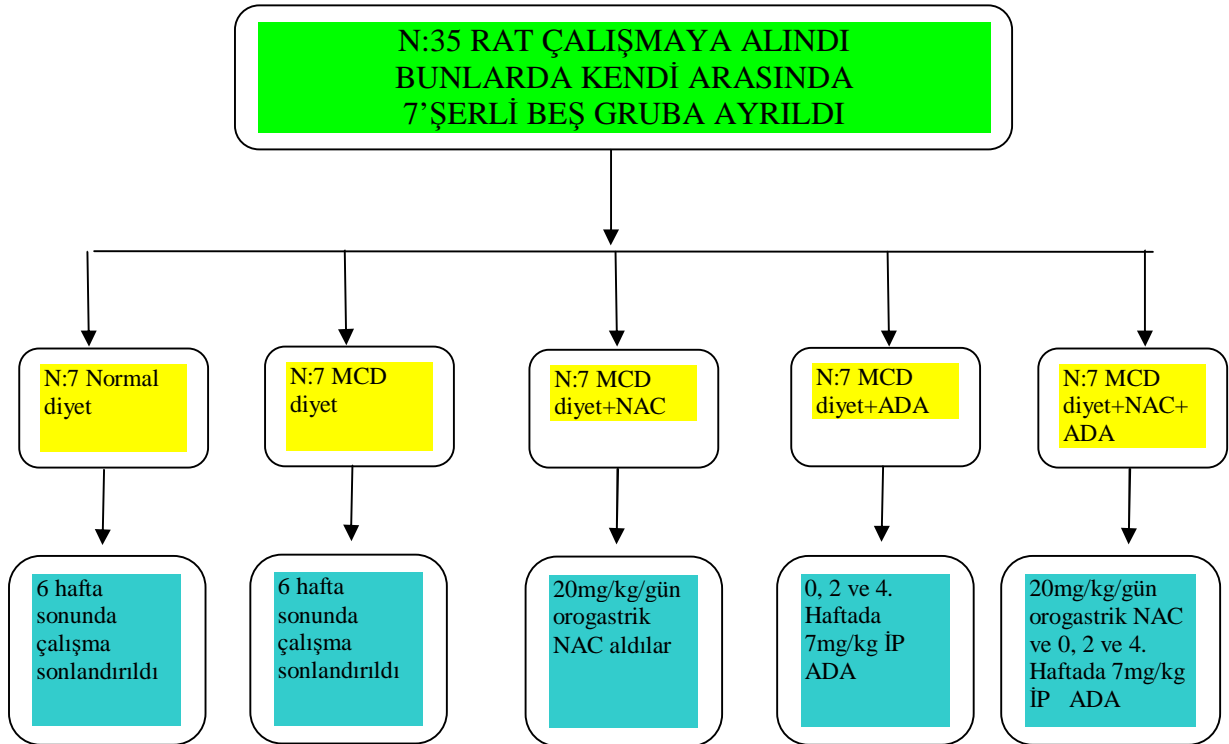




Resim 2. Ratlara intraperitoneal ve orogastrik gavaj ilaç uygulaması

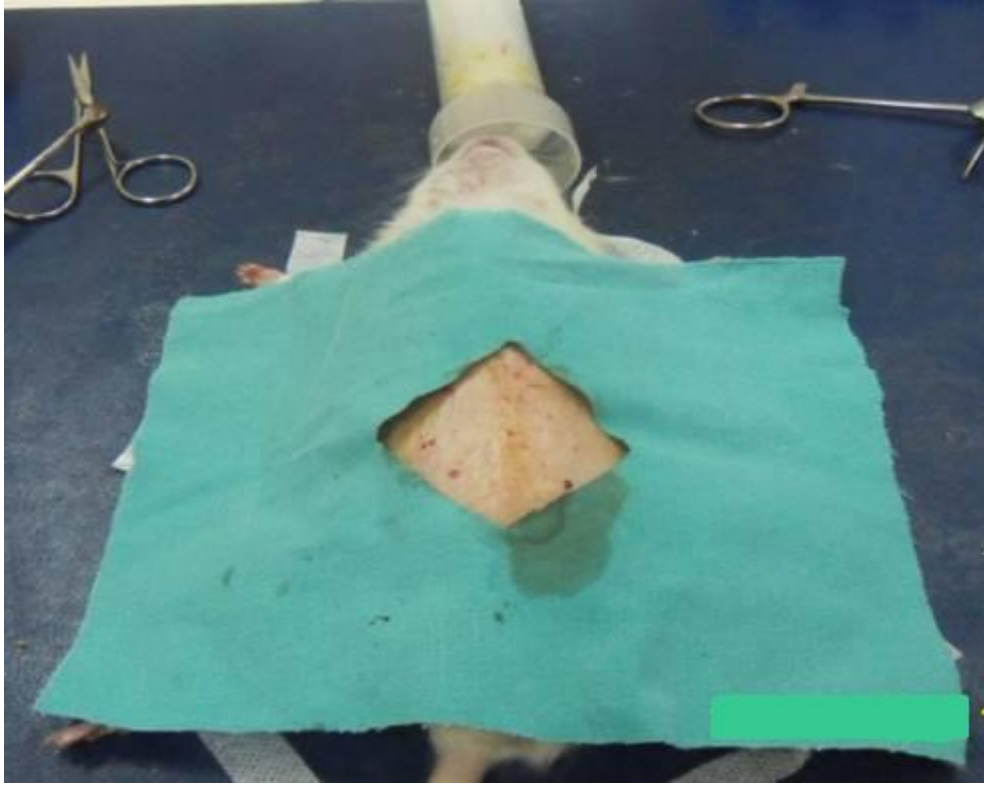
Deneyin sonlandırılması ve örneklerin toplanması

Çalışmanın başlangıcından 6 hafta sonra eter anestezisi altında karın açılarak vena kavadan yaklaşık 6cc kan tüplere alındı. Alınan Kan örnekleri 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra analiz yapılncaya kadar -80°C’de saklandı. Karaciğer dokuları %10’luk formaldehitlere konulup histopatolojik incelemeler için patoloji laboratuvarına gönderildi. Ratlara inhalasyon yoluyla uygulanan eter ile ötenazi uygulandı.



Şekil 5: Gruplar ve özellikleri

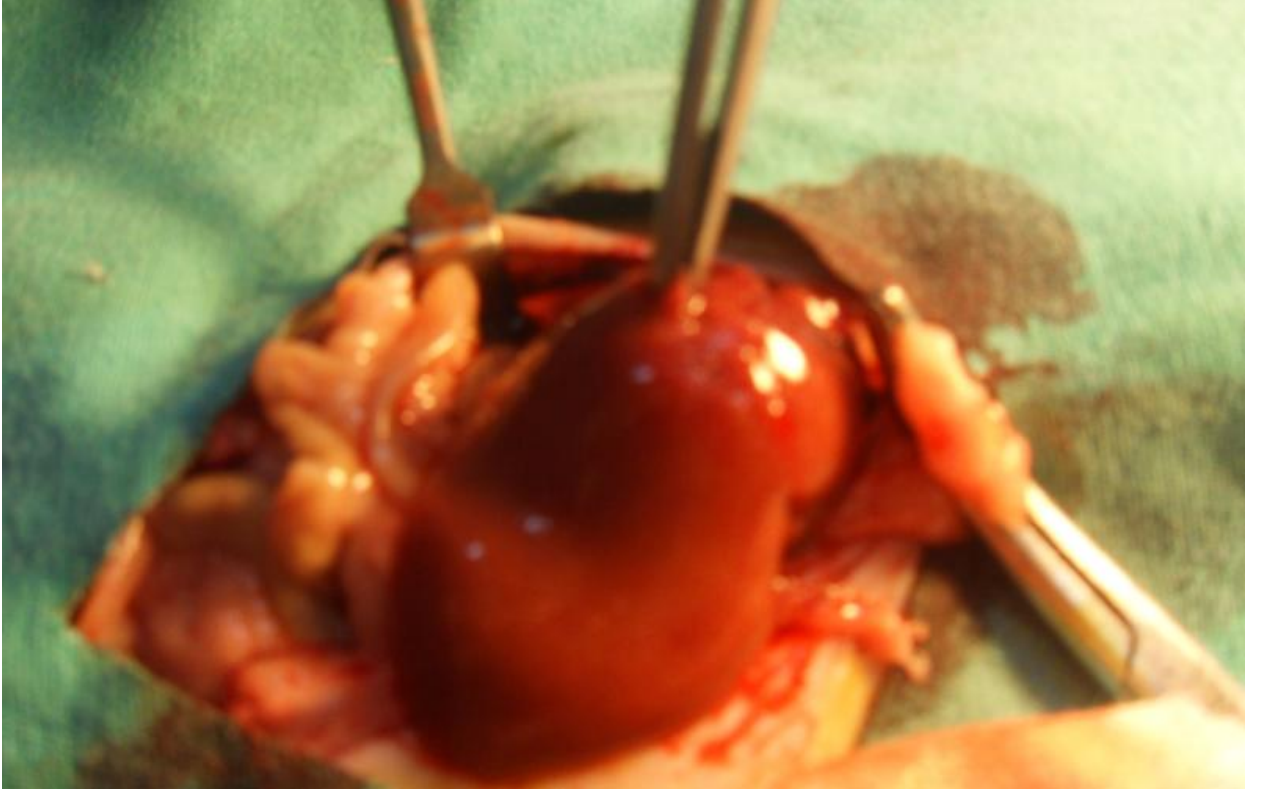
MCD: Metionin ve kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab, **İP:** İntraperitoneal



Resim 3. Ratların eter anestezisi sonrası örneklerin alımı için hazırlanması



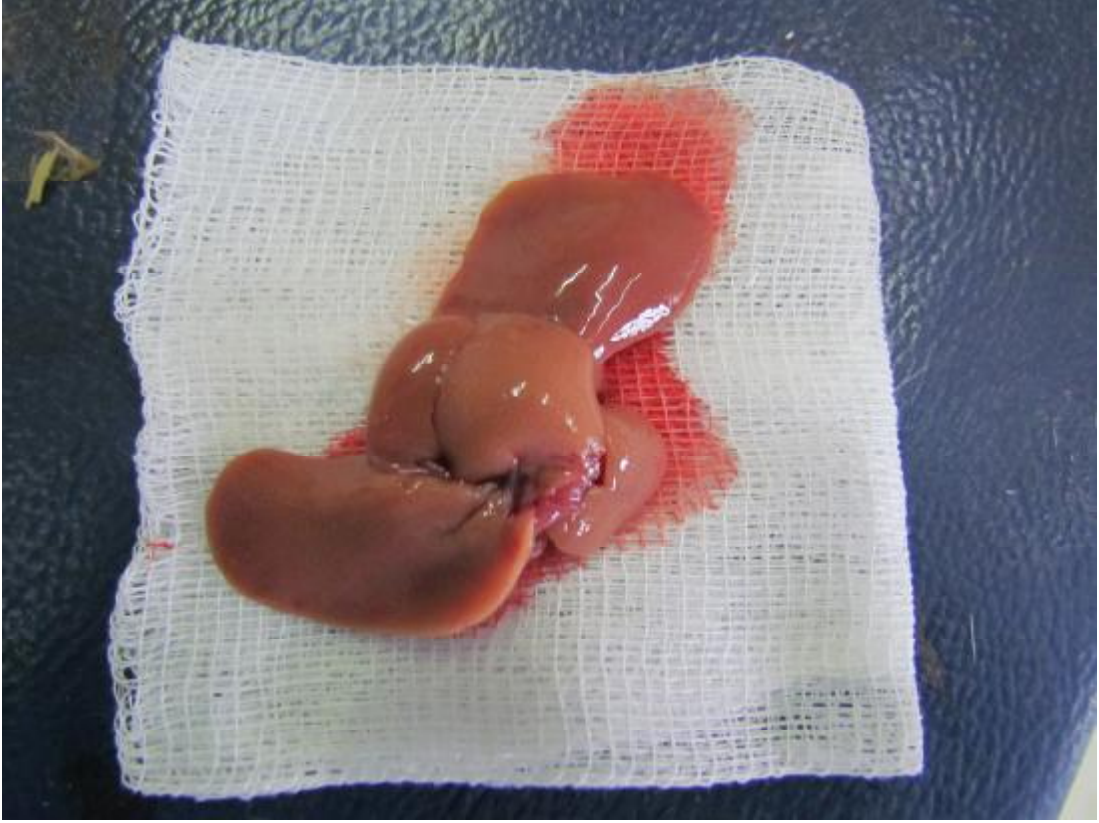
Resim 4. Vena Kava'dan kan örneği alınması



Resim 5. Karaciğerin total çıkarılması



Resim 6: Normal diyet alan rat karaciğerinin makroskopik görünümü.



Resim 7: Metionin ve kolin defisit diyet alan rat karaciğerinin makroskopik görünümü.

Sitokin seviyeri

TNF- α (Invitrogen, KRC3011, USA), TGF β , IL-6 (Boster, EK0514, China) ve IL-8 (Cusabio Int, CSB-E07273r, China) seviyeleri ELİSA yöntemi kullanılarak yapıldı.

Biyokimyasal analizler

Serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkaleen fosfataz (ALP), total bilirubin, total protein ve albümin seviyeleri otoanalizör kullanılarak yapıldı (Abbott Architect 16000, Abbott Inc, Princeton, NJ, USA).

Histopatolojik inceleme

Karaciğer çıkarılarak doku örnekleri geleneksel metotlarla histoloji için işlenerek parafin bloklarda fixe edildi. Hemotoksilen eozin boyama için karaciğer kesildi. Fibrozis yaygınlığı Mason Trichrom ile belirlendi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda uzman patolojist tarafından örnekler ışık mikroskop altında incelendi.

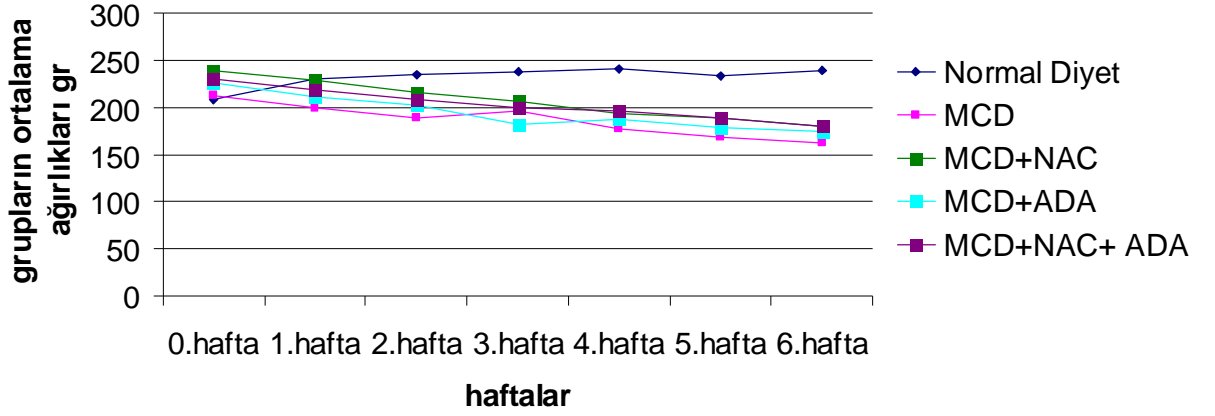
Yağlanma, balon dejenerasyon, lobüler inflamasyon, fibrozis varlığı veya yokluğu tespit edilerek Brunt NASH skorlaması yapıldı.

İstatistik

SPSS 15.0 bilgisayar programı (SPSS Inc., Sostware Chicago, IL, USA) istatistiksel analiz için kullanıldı. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis test ve Mann-Whitney U test ile belirlenerek, $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tablolarda ortalamalar (standart sapma) belirtildi. Tablolar dışında gruplarda normal dağılıma sahip olanların ortalamaları (standart sapması), normal dağılıma sahip olmayanların ise ortanca değerleri (en yüksek ve en düşük değer) belirtildi.

5-BULGULAR

Ratlar 5 grup halinde ilk günden itibaren her hafta tartıldı. Normal diyet rat yemi verilen grupta belirgin kilo artışı meydana geldi. MCD diyet alan dört grupta ise kilo kaybı mevcuttu. En fazla kilo kaybı sadece MCD diyet alan grupta olup MCD diyet ve tedavi alan gruplarda daha az kilo kaybı gözlemlendi. Grupların ağırlık ortalamaları haftalara göre şekil 6'de verildi. Çalışma süresince ratlarda herhangi bir yan etki görülmedi.



Şekil 6: Grupların haftalık ağırlık ortalamaları

MCD: Metionin ve kolin defisit, NAC: N-asetilsistein, ADA: Adalimumab

İmmünolojik parametreler:

Tüm grupların serum TNF- α , TGF β , IL6 ve IL8 düzey ortalamaları tablo 9'da gösterildi. Kruskal-Wallis Testi ile gruplar arasında istatistiksel farklı olan parametreler belirlendi. İstatistiksel anlamlık saptanan parametreler Mann-Whitney U Testi ile gruplar arasında değerlendirildi (tablo10).

Tablo 9. Sitokin seviyeleri

İmmünolojik Parametreler	Tüm Ratlar (n=35)	Normal Diyet (n=7)	MCD (n=7)	MCD+NAC (n=7)	MCD+ADA (n=7)	MCD+NAC+ADA (n=7)	p*
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
TNF alfa (pg/ml)	3,80(3,71)	1,70(2,59)	8,60(3,53)	4,87(3,97)	1,82(,60)	2,02(1,15)	0,002
TGF beta (pg/ml)	29,60(15,14)	15,87(3,80)	50,93(13,92)	27,87(8,70)	29,63 (11,82)	23,68(8,90)	<0,001
IL6 (pg/ml)	301,88(123,90)	157,10(19,75)	412,60(84,85)	382,02(118,50)	314,56(110,50)	243,09(51,65)	<0,001
IL8 (pg/ml)	147,14(107,39)	86,96(69,24)	179,10(145,88)	187,01(127,92)	142,04(68,44)	140,60(104,29)	0,381

*Kruskal-Wallis Testi

MCD: Metionin kolin defisit**ADA:** Adalimumab**NAC:** N-asetilsistein**Tablo 10.** Sitokin seviyelerinin gruplar arası istatistiksel verileri

Gruplar	TNF alfa		TGF beta		IL6	
	Z	p*	Z	p*	Z	p*
Normal Diyet vs MCD	-2,875	0,004	-3,130	0,002	-3,130	0,002
MCD vs MCD+NAC	-1,663	0,096	-2,686	0,007	-0,831	0,406
MCD vs MCD+ADA	-2,747	0,006	-2,435	0,015	-1,663	0,96
MCD vs MCD+NAC+ADA	-2,747	0,006	-2,814	0,005	-3,130	0,002
MCD+NAC vs MCD+ADA	-1,981	0,048	-,128	0,898	-1,214	0,225
MCD+NAC vs MCD+NAC+ADA	-1,853	0,064	-1,214	0,225	-2,364	0,018
MCD+ADA vs MCD+NAC+ADA	-,064	0,949	-1,151	0,250	-1,469	0,142

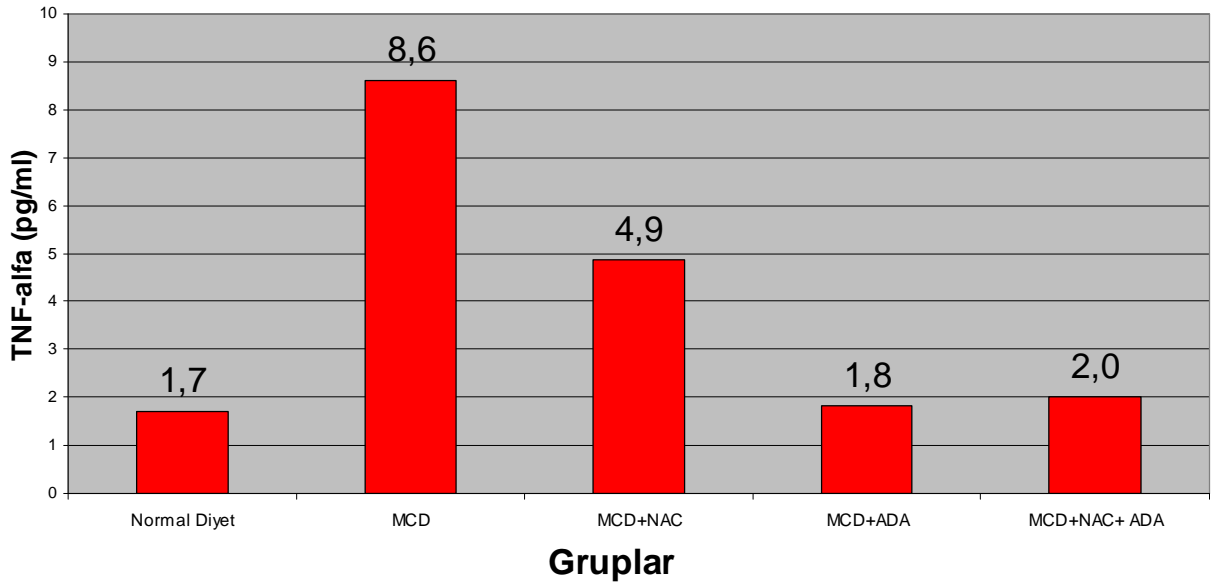
* Mann-Whitney U Testi

MCD: Metionin kolin defisit**ADA:** Adalimumab**NAC:** N-asetilsistein**TNF- α seviyeleri:**

TNF- α seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 0,99 (0,13-7,42) pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 9,90 (2,23-11,64) pg/ml, MCD+NAC verilen grupta 3,75 (1,97-13,14) pg/ml, MCD+adalimumab alan grupta 1,90 (1,09-2,58) pg/ml ve MCD+NAC+adalimumab alan grupta 1,33 (1,12-4,24) pg/ml olarak tespit edildi. TNF- α en yüksek grup 2'de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 1'de olduğu görüldü (şekil 7).

Normal diyet alan birinci grup ile MCD alan ikinci grup arasında serum TNF- α seviyeleri, ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu (p=0.004). Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta TNF- α seviyelerinin anlamlı şekilde yükseldiğini göstermekteydi. Grup 2 ile 3 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında grup 3'de NAC tedavisine bağlı olarak TNF- α 'nın baskılandığı ancak istatistiksel anlamlılığın olmadığı tespit

edildi (p=0.096). Grup 2 ile 4 arasında serum TNF- α seviyelerinde ise grup 4’de adalimumab tedavisine bağlı olarak TNF- α ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi (p=0.006). Grup 2 ile 5 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında grup 5’de ADA+NAC kombinasyon tedavisine bağlı olarak TNF- α ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi (p=0.006). Grup 3 ile 4 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında adalimumab tedavisi alan grup 4’de TNF- α ’nın NAC tedavisi alan grup 3’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi (p=0.048). Grup 3 ile 5 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında kombinasyon tedavisi alan grup 5’de TNF- α ’nın yalnızca NAC tedavisi alan grup 3’e göre daha fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü (p=0.064). Grup 4 ile 5 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında adalimumab tedavisi alan grup 4’de TNF- α ’nın kombinasyon tedavisi alan grup 5’e göre fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü (p=0.949).



Şekil 7: Serum TNF- α seviyeleri

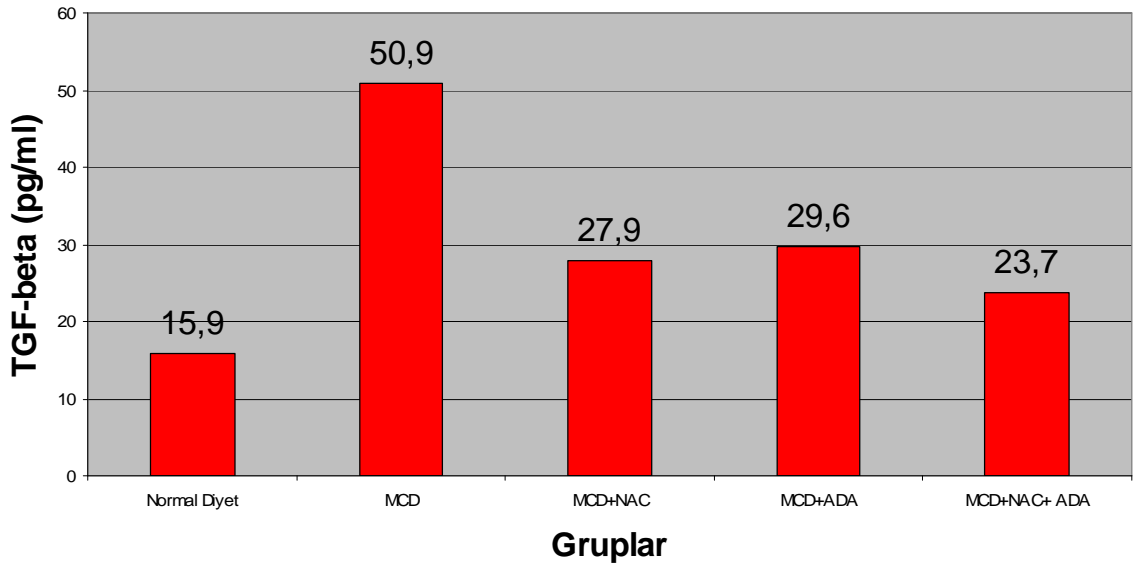
MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

TGF β seviyeleri:

TGF β seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 15,29 (12,27-22,36) pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 50,78 (32,07-70,29) pg/ml, MCD+NAC verilen grupta 25,81 (19,32-43,51) pg/ml, MCD+ADA alan grupta 24,57 (19,32-52,78) pg/ml ve

MCD+NAC+ADA alan grupta 21,36 (12,32-38-84) pg/ml olarak tespit edildi. TGF β en yüksek grup 2’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 1’de olduğu görüldü (şekil 8).

Normal diyet alan birinci grup ile her hangi bir tedavi almayan sadece MCD alan ikinci grup arasında serum TGF β seviyeleri arasında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0.002$). Bu NASH modeli oluşturduğumuz grupta TGF β seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi. Grup 2 ile 3 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında grup 3’de NAC’ye bağlı TGF β ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.007$). Grup 2 ile 4 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında grup 4’de adalimumaba bağlı TGF- β ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.015$). Grup 2 ile 5 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında grup 5’de kombinasyon tedavisine bağlı TGF β ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.005$). Grup 3 ile 4 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında NAC alan grup 3’de TGF β ’nın ADA alan grup 4’e göre daha fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.898$). Grup 3 ile 5 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında kombinasyon tedavisi alan grup 5’de TGF β ’nın NAC alan grup 3’e göre daha fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.225$). Grup 4 ile 5 arasında TGF β seviyelerine bakıldığında kombinasyon tedavisi alan grup 5’de TGF β ’nın ADA alan grup 4’e göre daha fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.250$).



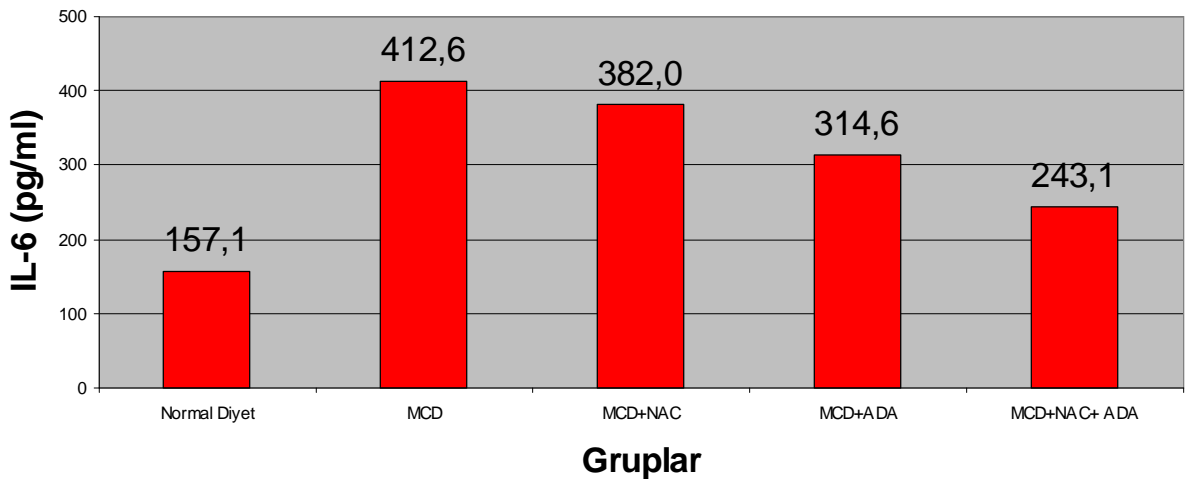
Şekil 8: Serum TGF β seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

IL6 seviyeleri:

Serum IL6 seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 156,26 (136,25-195,36) pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 411,32 (311,65-568,71) pg/ml, MCD+NAC verilen grupta 371,19 (245,37-562,30) pg/ml, MCD+ADA alan grupta 288,09 (198,25-505,79) pg/ml ve MCD+NAC+ADA alan grupta 235,21 (186,36-311,65) pg/ml olarak tespit edildi. IL 6 en yüksek grup 2'de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 1'de olduğu görüldü (şekil 9).

Normal diyet alan birinci grup ile her hangi bir tedavi almayan sadece MCD alan ikinci grup arasında serum IL 6 seviyeleri arasında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0.002$). Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta IL 6 seviyesinin beklendiği şekilde yükseldiğini göstermekteydi. Grup 2 ile 3 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında grup 3'de NAC'ye bağlı IL 6'nın baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.406$). Grup 2 ile 4 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında grup 4'de adalimumaba bağlı IL 6'nın baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.96$). Grup 2 ile 5 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında grup 5'de kombinasyon tedavisine lehine IL 6'nın istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi ($p=0.002$). Grup 3 ile 4 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında adalimumab alan grupta IL 6'nın NAC alan gruba göre daha fazla baskılandığı, ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.225$). Grup 3 ile 5 arasında IL 6 seviyelerine bakıldığında IL 6'nın kombinasyon tedavisi alan grupta NAC alan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.018$). Grup 4 ile 5 arasında IL 6 seviyelerine bakıldığında kombinasyon tedavisi alan grup 5'de IL 6'nın ADA alan grup 4'e göre daha fazla baskılandığı, ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.142$).

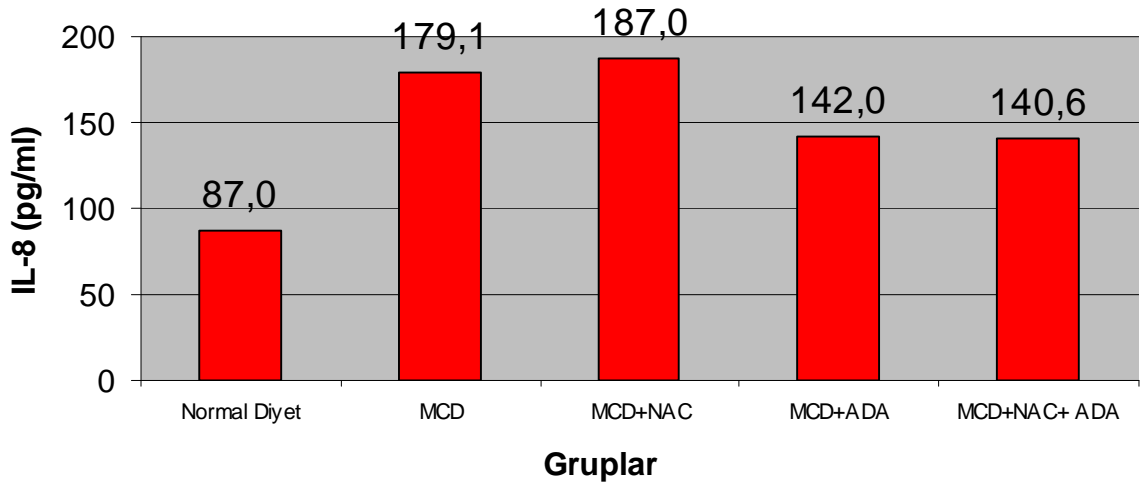


Şekil 9: Serum IL 6 seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

IL8 seviyeleri:

Serum IL8 seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 51,08 (12,01-169,01) pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 165,24 (67,58-485,54) pg/ml, MCD+NAC verilen grupta 225,16 (30,72-331,19) pg/ml, MCD+ADA alan grupta 113,09 (81,99-275,72) pg/ml ve MCD+NAC+ADA alan grupta 82,66 (32,10-296,18) pg/ml olarak tespit edildi. IL8 en yüksek grup 3'de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 1'de olduğu görüldü (şekil 10). MCD diyet alan grupta IL8 seviyesinin yükseldiği, ADA ve kombinasyon tedavisi alan grupta MCD alan gruba göre IL8 seviyesinin gerilediği görüldü. Ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu (p: 0,381).



Şekil 10: Serum IL 8 seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

Biyokimyasal parametreler:

Tüm grupların serum AST, ALT, ALP, total bilirubin, total protein ve albümin seviyeleri ortalamaları tablo 11'da gösterildi. Kruskal-Wallis Testi ile gruplar arasında istatistiksel farklı olan parametreler belirlendi. İstatistiksel anlamlık saptanan parametreler Mann-Whitney U Testi ile gruplar arasında değerlendirildi (tablo12).

Tablo 11. Biyokimyasal parametreler

Biyokimyasal Parametreler	Tüm Ratlar (n=35)	Normal Diyet (n=7)	MCD (n=7)	MCD+NAC (n=7)	MCD+ADA (n=7)	MCD+NAC+ADA (n=7)	p*
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama(SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
AST (U/L)	123 (40,93)	134,14 (66,16)	139,86 (42,54)	115,72 (32,67)	112,71 (14,28)	112,57 (35,27)	0,594
ALT (U/L)	56,77 (20,29)	44,71 (19,68)	62,71 (29,75)	58 (14,25)	63,57 (12,23)	54,86 (20,90)	0,314
ALP (U/L)	392,89 (206,60)	472,43 (337,30)	429,29 (137,69)	468,57 (212,43)	314,29 (122,10)	279,86 (106,64)	0,283
Total Bilirubin (mg/dl)	0,40 (0,10)	0,28 (0,02)	0,41 (0,10)	0,42 (0,12)	0,43 (0,09)	0,46 (0,10)	0,005
Total Protein (gr/dl)	6,71 (0,61)	7,6 (0,57)	6,67 (0,38)	6,36 (0,36)	6,5 (0,37)	6,44 (0,47)	0,002
Albümin (gr/dl)	2,99 (0,49)	3,69 (0,43)	2,79 (0,46)	2,80 (0,30)	2,79 (0,27)	2,89 (0,25)	0,006

* Kruskal-Wallis Testi

MCD: Metionin kolin defisit**NAC:** N-asetilsistein**ADA:** Adalimumab**Tablo 12.** Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası istatistiksel verileri

Gruplar	Total Bilirubin		Tprotein		Albümin	
	Z	p*	Z	p*	Z	p*
Normal Diyet vs MCD	-2,564	0,010	-2,830	0,005	-2,628	0,009
MCD vs MCD+NAC	,000	1,000	-1,489	0,136	-,780	0,435
MCD vs MCD+ADA	-,319	0,749	-,712	0,476	-,581	0,561
MCD vs MCD+NAC+ADA	-,448	0,654	-1,160	0,246	-,966	0,334
MCD+NAC vs MCD+ADA	-,193	0,847	-,837	0,403	-,517	0,605
MCD+NAC vs MCD+NAC+ADA	-,704	0,482	-,193	0,847	0,771	0,441
MCD+ADA vs MCD+NAC+ADA	-,512	0,609	-,321	0,748	-,853	0,393

* Mann-Whitney U Testi

MCD: Metionin kolin defisit**NAC:** N-asetilsistein**ADA:** Adalimumab**AST:**

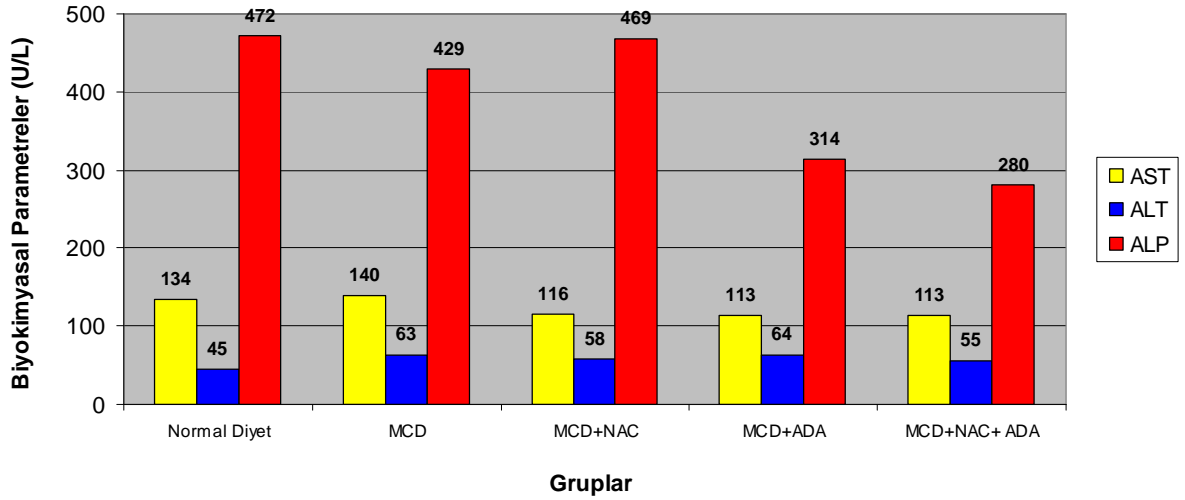
Serum AST seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grup 1’de 104 (68-241) U/L, sadece MCD diyet alan grup 2’de 140 (95-226) U/L, MCD+NAC verilen grup 3’te 114 (67-161) U/L, MCD+ADA alan grup 4’te 110 (99-140) U/L ve MCD+NAC+ADA alan grup 5’te 103 (82-176) U/L olarak tespit edildi. AST en yüksek grup 2’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 5’de olduğu görüldü (şekil 11). Gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0,594).

ALT:

Serum ALT seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grup 1’de 37 (30-87) U/L, sadece MCD diyet alan grup 2’de 59 (29-118) U/L, MCD+NAC verilen grup 3’te 58 (34-80) U/L, MCD+ADA alan grup 4’te 60 (49-83) U/L ve MCD+NAC+ADA alan grup 5’te 53 (27-90) U/L olarak tespit edildi. ALT en yüksek grup 4’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 1’de olduğu görüldü (şekil 11). Gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0,314).

ALP:

Serum ALP seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grup 1’de 370 (127-967) U/L, sadece MCD diyet alan grup 2’de 443 (180-616) U/L, MCD+NAC verilen grup 3’te 412 (246-803) U/L, MCD+ADA alan grup 4’te 275 (201-543) U/L ve MCD+NAC+ADA alan grup 5’te 270 (163-464) U/L olarak tespit edildi (şekil 11). ALP en yüksek grup 2’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 5’de olduğu görüldü. Ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu (p: 0,283).



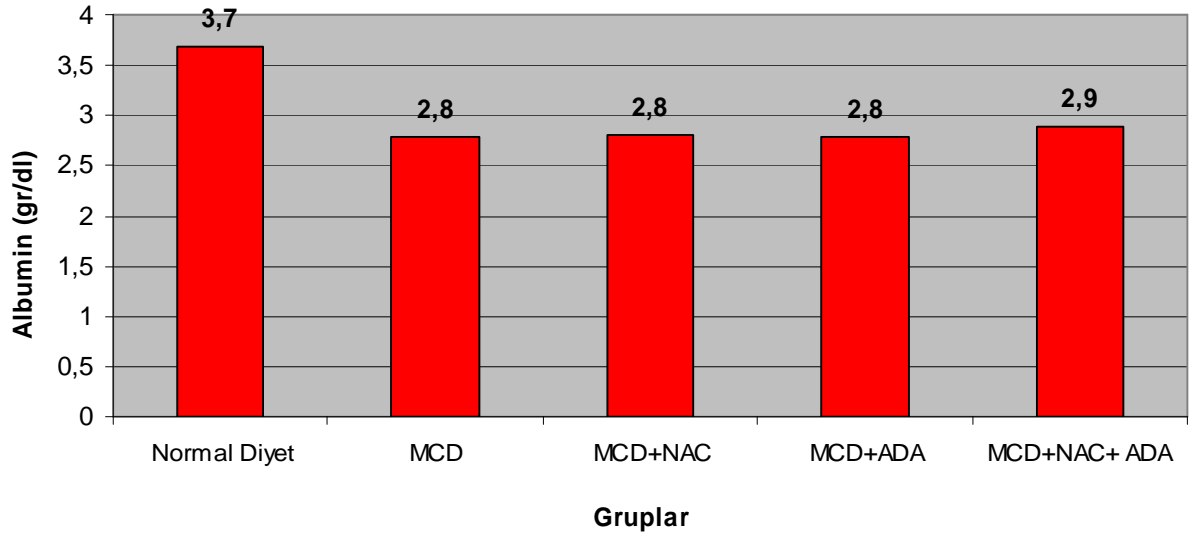
Şekil 11. Serum AST, ALT ve ALP seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

Albümin:

Serum albumin seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta $3,69 \pm 0,43$ g/dl, sadece MCD diyet alan grupta $2,79 \pm 0,46$ g/dl, MCD+NAC verilen grupta $2,80 \pm 0,30$ g/dl, MCD+ADA alan grupta $2,79 \pm 0,27$ g/dl ve MCD+NAC+ADA alan grupta $2,89 \pm 0,25$ g/dl olarak tespit edildi. Serum albumin seviyesi en yüksek normal diyet alan grupta, en düşük ise MCD diyet alan grup ve MCD+ADA alan grupta tespit edildi (şekil 12).

Normal diyet alan grup ile MCD diyet alan grup arasında serum albumin düzeyinde normal diyet grubu lehine istatistiksel anlamlı yükseklik mevcuttu (p:0.009). MCD diyet alan grup ile tedavi alan grup 3,4 ve 5 arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı.



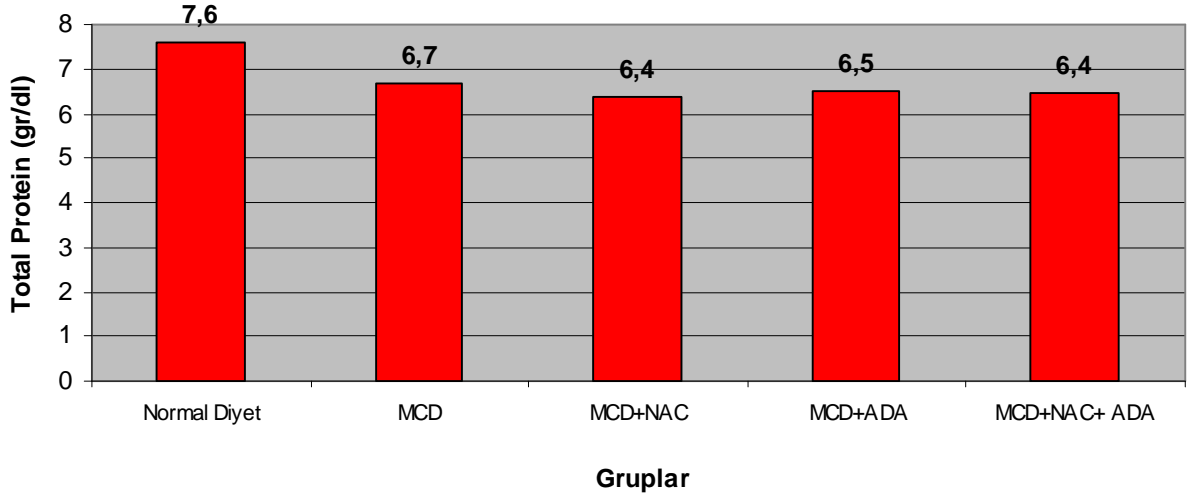
Şekil 12: Serum albümin seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

Total protein

Serum total protein seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta $7,60\pm 0,57$ g/dl, sadece MCD diyet alan grupta $6,67\pm 0,38$ g/dl, MCD+NAC verilen grupta $6,36\pm 0,36$ g/dl, MCD+ADA alan grupta $6,50\pm 0,37$ g/dl ve MCD+NAC+ADA alan grupta $6,44\pm 0,47$ g/dl olarak tespit edildi. Serum total protein seviyesi en yüksek normal diyet alan grup 1’de saptandı. En düşük ise MCD+NAC alan grup 3’te tespit edildi (şekil 13).

Normal diyet alan grup ile MCD diyet alan grup arasında serum total protein düzeyinde normal diyet grubu lehine istatistiksel anlamlı yükseklik mevcuttu (p:0.005). MCD diyet alan grup ile tedavi alan grup 3,4 ve 5 arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı.



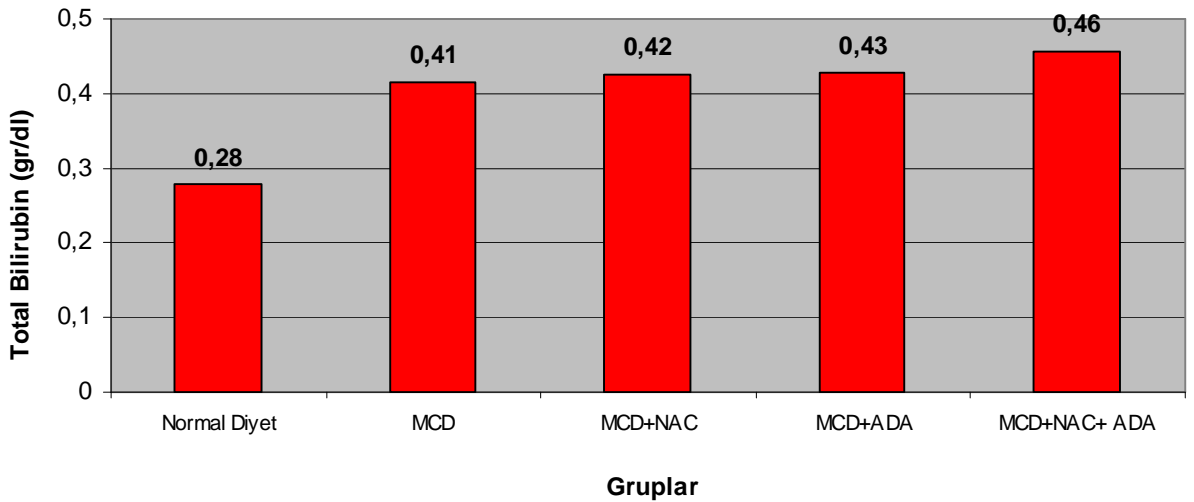
Şekil 13: Serum total protein seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

Total bilirubin:

Serum total bilirubin seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta $0,28 \pm 0,02$ g/dl, sadece MCD diyet alan grupta $0,41 \pm 0,10$ g/dl, MCD+NAC verilen grupta $0,42 \pm 0,12$ g/dl, MCD+ADA alan grupta $0,43 \pm 0,09$ g/dl ve MCD+NAC+ADA alan grupta $0,46 \pm 0,10$ g/dl olarak tespit edildi. Serum total bilirubin seviyesi en düşük normal diyet alan grup 1’de saptandı. En yüksek ise MCD+NAC+ADA alan grup 5’te tespit edildi (şekil 14).

Normal diyet alan grup ile MCD alan grup arasında serum total bilirubin seviyeleri bakıldığında 2. grupta istatistiksel olarak anlamlı yükseklik mevcuttu ($p=0.010$). Diğer gruplara arasında istatistiksel farklılık saptanmadı.



Şekil 14: Serum total bilirubin seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab

Histopatoloji:

Tüm grupların karaciğer steatoz, lobüler inflamasyon, hepatosit balonlaşması, fibrozis ve total NASH skorları tablo 13’de gösterildi. Kruskal-Wallis Testi ile gruplar arasında istatistiksel farklılık olan parametreler belirlendi. Kruskal-Wallis Testi’nde normal diyet alan grupta NASH skorları sıfır olduğu için değerlendirmeye alınmadı. İstatistiksel anlamlık saptanan hepatosit balonlaşması ve toplam NASH skoru Mann-Whitney U Testi ile gruplar arasında değerlendirildi (tablo 14). Beklenildiği gibi MCD diyet alan grupta NASH olduğu histopatolojik olarak gösterildi. Toplam skorun 5 ve üzeri olması NASH olarak kabul edildi.

Tablo 13. Histopatolojik skorlar

Histopatolojik Skorlar	Tüm Ratlar (n=35)	Normal Diyet (n=7)	MCD (n=7)	MCD+NAC (n=7)	MCD+ADA (n=7)	MCD+NAC+ADA (n=7)	p**
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
Steatoz	2,06 (1,19)	0 (0)	2,57 (0,79)	2,43 (0,79)	2,86 (0,38)	2,29 (0,95)	0,567
Lobüler İnflamasyon	1,69 (1,02)	0 (0)	2 (0,81)	1,57 (0,79)	2,57 (0,53)	2 (0,58)	0,096
Hepatosit Balonlaşması	1,14 (0,73)	0 (0)	1,71 (0,76)	1,57 (0,53)	1,29 (0,49)	0,71 (0,49)	0,029
Fibrozis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,000
Toplam NAS Skoru	4,86 (2,30)	0 (0)	6,14 (1,07)	5,57 (0,98)	6,71 (0,76)	5 (1,15)	0,032

* Kruskal-Wallis Testi

** Kruskal-Wallis Testi (Normal diyet grubu analize dahil edilmemiştir.)

MCD: Metionin kolin defisit

NAC: N-asetilsistein

ADA: Adalimumab

Tablo 14. Gruplar arası hepatosit balonlaşması ve toplam NASH skorunun istatistiksel verileri

Gruplar	Hepatosit Balonlaşması		Toplam NASH Skoru	
	Z	p*	Z	p*
MCD vs MCD+NAC	-,286	0,775	-,876	0,381
MCD vs MCD+ADA	-1,164	0,244	-1,214	0,225
MCD vs MCD+NAC+ADA	-2,422	0,015	-1,615	0,106
MCD+NAC vs MCD+ADA	-1,041	0,298	-2,089	0,037
MCD+NAC vs MCD+NAC+ADA	-2,442	0,015	-,876	0,381
MCD+ADA vs MCD+NAC+ADA	-1,927	0,054	-2,676	0,007

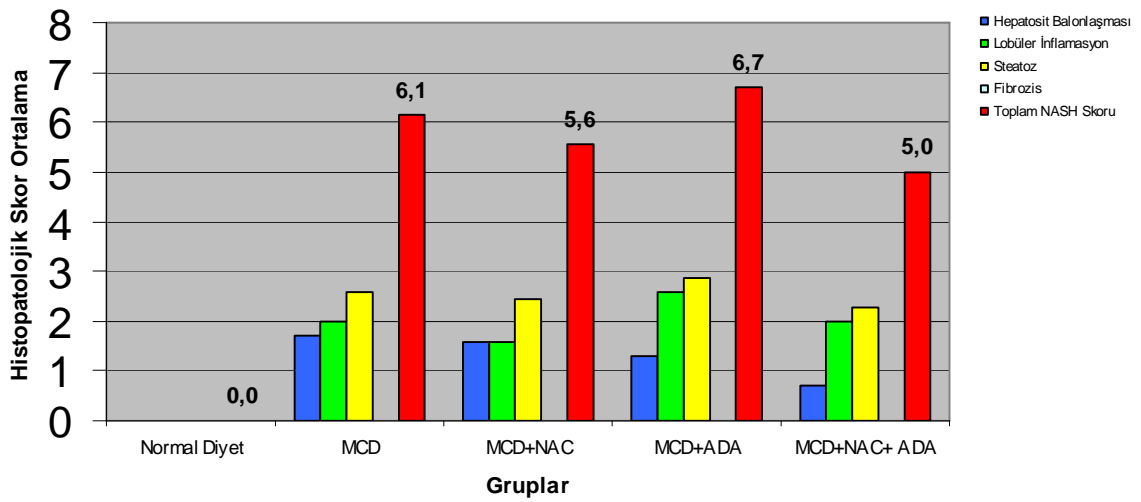
* Mann-Whitney U Testi

MCD: Metionin kolin defisit

NAC: N-asetilsistein

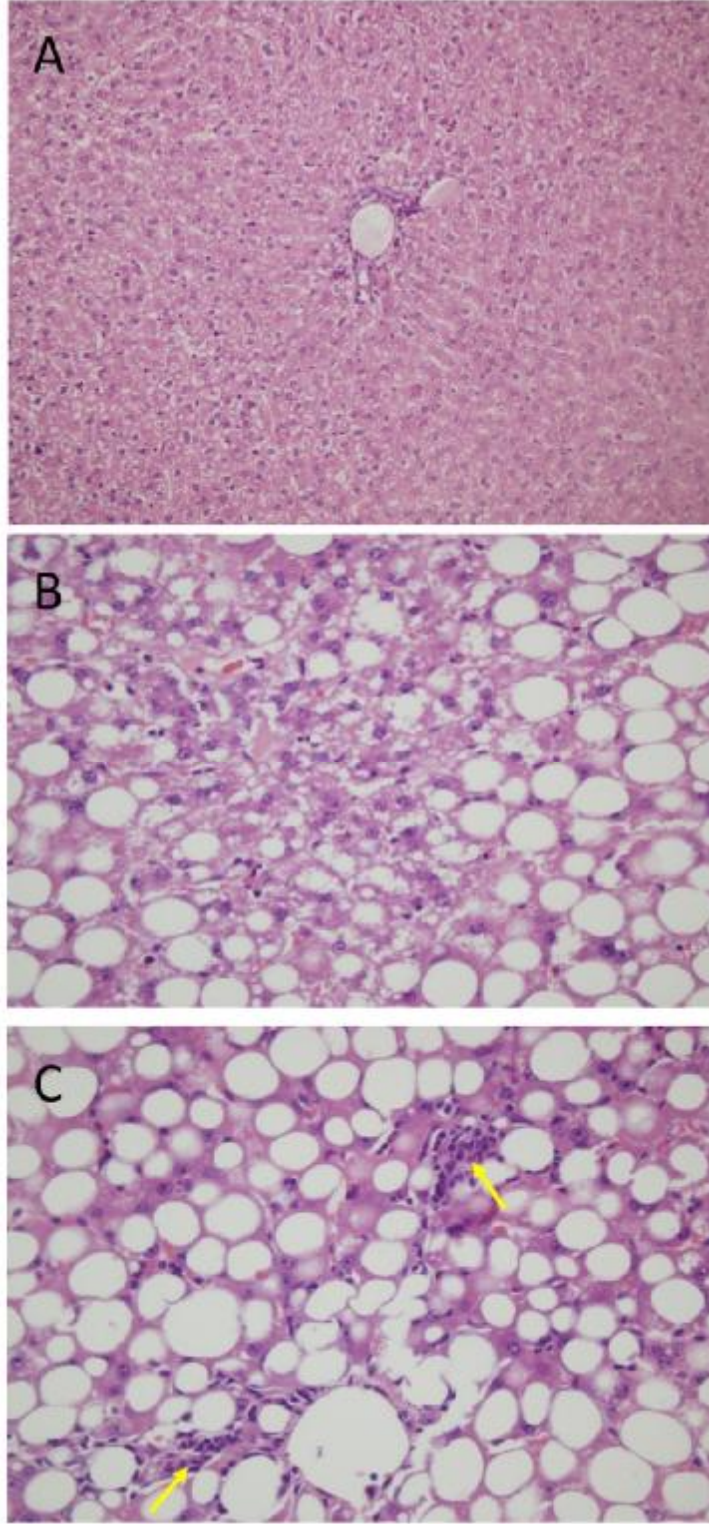
ADA: Adalimumab

Gruplar arası toplam NASH skoruna bakıldığında en yüksek toplam skor $6,71 \pm 1,06$ ile MCD+ADA alan grupta görüldü. En düşük skor ise $5,00 \pm 1,15$ ile MCD+ADA+NAC alan grupta olduğu tespit edildi. Toplam NASH skoruna bakıldığı zaman gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,032$). MCD+NAC ve MCD+ADA grubu arasında total NASH skoru iyileşmesinde MCD+NAC grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,037$). MCD+NAC+ADA ve MCD+ADA grupları karşılaştırıldığı zaman MCD+NAC+ADA grubu lehine istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,007$). Ancak sadece MCD diyet alan grup ile tedavi alan gruplar karşılaştırıldığı zaman NASH histopatoloji skoru iyileşmesinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Hepatosit balonlaşmasına bakıldığı zaman en yüksek değer MCD alan grupta $1,71 \pm 0,76$, en düşük değer $0,71 \pm 0,49$ MCD+ADA+NAC alan grupta saptandı ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,015$). Steatoz ve lobuler inflamasyona bakıldığı zaman gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. MCD+NAC ve MCD+NAC+ADA alan gruplarda steatoz ve lobuler inflamasyonda MCD alan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzelme izlenmedi. MCD+ADA alan grupta ise steatoz ve lobuler inflamasyon skorları sadece MCD alan gruptan istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde daha yüksek saptandı. Histopatolojik bulgular resim 8’de gösterildi.



Şekil 15. NASH skorları

MCD: Metionin kolin defisit, **NAC:** N-asetilsistein, **ADA:** Adalimumab



Resim 8: Normal diyet alan grupta karaciğer histopatolojik görünümü (20X, H & E) (A). MCD diyet alan grupta hepatosit balonlaşması ve steatoz (20X, H&E) (B). MCD diyet alan grupta steatoz ve lobüler inflamasyon (oklar lobüler inflamasyonu gösteriyor) (20X, H&E), (C).
MCD: Metionin kolin defisit, **H&E:** Hematoksilen-Eozin

6-TARTIŞMA

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı; NASH, fibrozis ve sirozdan yağlanmaya kadar karaciğer hasarının geniş bir spektrumunu kapsar. Hastalığın doğal seyrinde yalnız NASH oluştuğunda fibrozis ve siroza gidiş görülmektedir. NASH hem histolojik (steatohepatit) hem de klinik kriterler (non-alkolik) olarak tanımlanmıştır.

NASH patogenezi komplekstir. İlk hasar insülin rezistansı ile başlar ve hepatosteatoz gelişir. Steatohepatit için ikinci hasar gereklidir. Burada oksidatif stres ile sitokinlerin etkileşiminin kilit rol oynadığına inanılır. Oksidatif stres nükleer faktör kapp β 'yı (NF-kapp β) aktifler. Bu model hepatosit dejenerasyon ve ölümüne neden olarak proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , TGF β , IL-6, IL-8) sentezini stimule eder. Metionin ve kolin defisit (MCD) diyet VLDL sentezi için gerekli olan fosfotidil kolin sentezini bozar. Fosfotidil kolin eksikliğinde serum trigliserid seviyeleri azalırken karaciğer trigliserid seviyeleri artar. Sonuç olarak steatozda artış meydana gelir (5,6). MCD diyet glutatyon (GSH) ve S-adenozilmetionin (S-AME) gibi hepatik antioksidanları deplase eder (7). MCD diyet oksidatif defans mekanizmalarını baskılayarak oksidatif stresi artırır (8). Bu durum TNF- α ve diğer proinflamatuvar sitokinleri indükler (9). Benzer mekanizmalarla non-alkolik yağlı karaciğer ve insülin rezistansına yol açar. Bu yüzden MCD modelle yapılan çalışmalar hepatik steatoz ve steatohepatitin patogenezinde (obeziteden bağımsız olarak) oksidan stresin önemini vurguladığı için aydınlatıcıdır. Bu nedenle çalışmamızda NASH modeli oluşturmak için MCD diyet kullandık (2). MCD diyet ile beslenen farelerde aminotransferaz düzeyinde yükselmeler, steatoz ile karakterize karaciğerde histolojik değişiklikler, fokal inflamasyon, hepatosit nekrozu ve fibrozis indüklenir. Bu hızlı histolojik değişiklikler insan NASH'de görülenlerle morfolojik olarak benzerdir (10, 11). Bizim çalışmamızda da MCD diyet ile başarılı bir şekilde NASH modeli oluşturulmuştur.

Bizim çalışmamızda altı hafta sonunda serum TNF- α seviyelerine bakıldığında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Bu NASH modeli oluşturduğumuz grupta TNF- α seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi.

Serum TGF β seviyelerine bakıldığı zaman normal diyet alan ile sadece MCD alan grup arasında serum TGF β seviyeleri arasında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu. Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta TGF β seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi.

Serum IL 6 seviyelerine bakıldığı zaman normal diyet alan ile sadece MCD alan grup arasında serum IL 6 seviyeleri arasında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık

mevcuttu. Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta IL 6 seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi.

IL 8 seviyeleri ise MCD diyet alan grupta normal diyet alan gruba göre iki kattan fazla yükseldi ancak iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu.

Biyokimyasal parametrelere baktığımızda normal diyet alan gruba göre MCD diyet alan grupta AST ve ALT düzeylerinde normal diyet alan gruba yükseklikler saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. ALP düzeyinde normal diyet alan grupta MCD diyet alan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan yükseklik saptandı. Yine MCD grubunda total bilirubin, total protein ve albumin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseklik saptandı.

Histopatolojik incelemede normal diyet alan grupta total NASH skoru sıfır olarak bulundu. MCD grubunda histopatolojik olarak NASH oluşumu gösterildi. NASH grubunda fibrozis oluşumu görülmedi. NASH modeli için kullandığımız MCD diyetin daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi NASH oluşumunda patogeneze sorumlu tutulan proinflamatuvar sitokinleri artırdığı ve NASH oluşumunu başarıyla sağladığını göstermiş olduk.

Thong-Ngam ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 6 hafta %100 yüksek yağlı diyet vererek oluşturdukları rat NASH modellerinde 20 mg/kg/gün peroral NAC'nin yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda antienflamatuvar etki gösteren serum glutasyon seviyesini belirgin şekilde arttırdığı ve steatoz, nekro-enflamasyon skorunu ise geriletmediği gösterilmiştir (21).

Baumgardner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da total enteral poliansature yağ nutrisyonu ile indüklenmiş NASH'de 2 gr/g/gün NAC'nin ALT, TNF- α mRNA, sitokrom P450 2E1 düzeylerini azalttığı ve ayrıca steatoz, total NASH skoru ve portal/lobuler fibrozisi geriletmediği saptanmıştır (18).

Gülbahar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada biyopsiyle kanıtlanmış 11 NASH'li hastanın ortalama 5,5 ay diyetle izleminden sonra serum AST, ALT ve GGT değerlerinde düzelme olmadığı gözlenmiştir. Diyet sonrası hastalara 1000 mg/gün NAC peroral tedavisi uygulanmış ve serum AST, ALT ve GGT değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde gerilediği saptanmıştır (142).

Bizim çalışmamızda MCD diyet alan grup ile MCD+NAC alan grup arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında NAC alan grupta TNF- α seviyelerinin baskılandığı ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı tespit edildi.

NAC kolunda MCD koluna göre IL 6 ve TGF β seviyelerinde azalma saptandı. TGF β seviyesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. IL 8 seviyesinin ise diğer gruplardan yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

NAC alan grubun histopatolojik incelemesinde MCD alan gruba göre steatoz, lobüler inflamasyon, hepatosit balonlaşması ve toplam NASH skorunda düzelme olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

MCD ve MCD+NAC alan gruplar arasında biyokimyasal parametrelerde (AST, ALT, ALP, bilirubin, albümin ve total protein) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. AST ve ALT seviyelerinde NAC alan grupta bir miktar azalma mevcuttu.

Adalimumab ile NASH modellerde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak Schramm ve arkadaşlarının vaka bildiriminde romatoid artrit nedeniyle adalimumab kullanılan NASH'li bir hastada AST, ALT ve GGT düzeylerinin normal seviyelere gerilediği görülmüştür (9). Bu makalede histopatolojik değerlendirme yapılmamıştır.

TNF- α reseptörüne bağlanarak anti-TNF etki gösteren monoklonal antikor infliximab ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Koca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ralarda MCD diyet ile indüklenmiş NASH'de sekiz hafta 4 mg/kg infliximab uygulanmış. Plaseboya göre AST, ALT, TNF- α , TGF β düzeylerinin azaldığı; steatoz, lobuler inflamasyon ve fibrozisin gerilediği saptanmıştır (20).

Bizim çalışmamızda MCD diyet alan grup ile adalimumab alan grup arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında adalimumab kolunda TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi.

Adalimumabın IL6, IL 8 ve TGF β seviyelerini baskıladığı ancak istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanmanın sadece TGF β seviyesinde olduğu tespit edildi.

Adalimumab alan grupta MCD alan grup ile karşılaştırıldığı zaman sadece hepatosit balonlaşma skorunda düzelme mevcuttu ve bu düzelmesinin skorunda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Adalimumab kolunda MCD koluna göre steatoz, lobuler inflamasyon ve total NASH skoru bir miktar yüksek saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

MCD ve MCD+ADA alan gruplar arasında biyokimyasal parametrelerde (AST, ALT, ALP, bilirubin, albümin ve total protein) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. AST ve ALP seviyelerinde bir miktar azalma mevcuttu.

MCD diyet alan grup ile ADA+NAC alan grup arasında serum TNF- α , TGF β , IL 6 seviyelerinde ADA+NAC kolunda istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanma tespit edildi. IL 8 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan baskılanma gözlemlendi.

Adalimumab+NAC alan grupta MCD alan grup ile karşılaştırıldığı zaman steatoz, hepatosit balonlaşması ve toplam NASH skorunda düzelme mevcuttu ve sadece hepatosit balonlaşmasındaki düzelmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

MCD ve MCD+ADA+NAC alan gruplar arasında biyokimyasal parametrelerde (AST, ALT, ALP, bilirubin, albümin ve total protein) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. AST, ALT ve ALP seviyelerinde bir miktar azalma mevcuttu.

MCD+NAC ve MCD+ADA alan gruplar karşılaştırıldığı zaman steatoz, lobuler inflamasyon ve total NASH skorunun MCD+NAC grubunda daha fazla baskılandığı ve total NASH skorundaki baskılanmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

7-SONUÇ VE ÖNERİLER

Bizim çalışmamızda NASH modeli oluşturduğumuz grupta belirgin şekilde yükselen TNF- α , IL6, IL8 ve TGF β seviyeleri adalimumab tarafından IL8 hariç istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskılanmıştır. NAC ise sadece TGF β lehine istatistiksel anlamlı olmakla birlikte TNF- α , IL6, ve TGF β seviyelerini baskılamıştır. Sitokin seviyelerindeki baskılanma adalimumab kolunda NAC koluna göre daha iyi olduğu ve TNF- α lehine istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır.

NASH modeli oluşturduğumuz grupta kontrol grubuna göre AST, ALT ve total bilirubin seviyelerinde artma; total protein ve albumin seviyelerinde ise baskılanma izlenmiştir. Total bilirubin, total protein ve albumin seviyelerindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Adalimumab ve NAC'nin biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeltilmeler sağladığı saptanmıştır.

Adalimumab grubunda toplam NASH skoru istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte NASH modeli oluşturduğumuz gruba göre daha yüksek saptandı ve sadece hepatosit balonlaşmasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzelmeye gözlemlendi. NAC'nin tüm histopatolojik bulguları düzelttiği ve toplam NASH skorundaki düzelmelerin adalimumaba göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

Sonuç olarak bizim çalışmamız TNF- α 'nın baskılanmasının NASH oluşumunu engellemediği ve tedavide de etkisinin belirgin olmadığını ancak antioksidan etki gösteren N-asetilsisteinin toplam NASH skorunu anti-TNF etki gösteren adalimumabdan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi baskıladığını göstermiştir.

Bu da NASH patogenezinin multi faktöriyel olduğu ve NASH tedavisinde TNF- α blokajının sınırlı yararları olduğunu göstermektedir. Bu nedenle farklı mekanizmaları baskılayan ajanların birlikte kullanımını ve patogenezi araştıran yeni çalışmaların yapılması yararlı olabilir.

8-KAYNAKLAR

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980, 55:434-438.
2. Ayman Koteish, Anna Mae Diehl. Animal models of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol.16, no. 5, 679-690, 2002.
3. Metha K, VanThiel DH. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002;/60:/289-293.
4. Ionel Copaci, Laurentiu Micu, Mihai Voiculescu, The Role of Cytokines in Non-Alcoholic Steatohepatitis. A Systematic Review, *J Gastrointestin Liver Dis* December 2006 Vol.15 No4, 363-373.
5. Atzeni, F., P. Sarzi-Puttini, A. Doria L. Iaccarino, and F. Capsoni. Potential off-label use of infliximab in autoimmune and nonautoimmune diseases: a review. *Autoimmun. Rev.* 2005, 4:144–152.
6. Markham, A., and H. M. Lamb. Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2000, 59:1341–1359.
7. Iimuro, Y., R. M. Gallucci, M. I. Luster, H. Kono, and R. G. Thurman. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *J. Hepatol.* 1997, 26:1530–153
8. Tilg, H., R. Jalan, A. Kaser, N. A. Davies, F. A. Offner, S. J. Hodges, O. Ludwiczek, D. Shawcross, H. Zoller, A. Alisa, R. P. Mookerjee, I. Graziadei, C. Datz, M. Trauner, D. Schuppan, P.Obrist, W. Vogel, and R. Williams. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 2003, 38:419–425.
9. C. Schramm, A. Schneider, A. Marx, A.W. Lohse Adalimumab Could Suppress the Activity of Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Z Gastroenterol* 2008; 46:1369-1371.
10. Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology.* 1993 187:447–463.
11. Amiya K. Ghoshal, Miriam Ahluwalia, Emmanuel Farber. The Rapid Induction of Liver Cell Death in Rats Fed a Choline-Deficient Methionine-Low Diet. *Am J Pathol* 1983; 113:309-314.

12. Hensley K, Koteke Y, Sang H. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2000; vol. 21, 983-989.
13. Anna Mae Diehl. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological review*. 2002
14. Craig J. McClain, Sri Prakash L. Mokshagundam, Shirish S. Barve, Zhenyuan Song, Daniell B. Hill, Theresa Chen, Ion Deaciuc. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 34 (2004) 67-79.
15. Mary E. Rinella, Marc S. Elias, Robin R. Smolak, Tao Fu, Jayme Borennssztajn, and Richard M. Gren. Mechanism of hepatic steatosis in mice a lipogenic methionine choline-deficient diet. *Journal of Lipid Research*, volume 49, 2008.
16. Mary E. Rinella, Richard M. Gren, The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance, *Journal of Hepatology* 40 (2004) 47-51.
17. Raquel Barbuio, Marciane Milanski, Manoel B Bertolo, Mário J Saad and Lício A Velloso, Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet, *Journal of Endocrinology* (2007) 194, 539–550.
18. Jounay N. Baumgardner, Kartik Shankar, Leah Hernings, Emanuele Albano, Thomas M. Badger, Martin J. J. Ronis. N-Acetylcysteine Attenuates Progression of Liver Pathology in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Nutrition*. 138: 1872-1879, 2008.
19. Yilmaz Y. Review article: Is non alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:815-823.
20. Koca S. S., Ibrahim H. Bahcecioglu, Orhan K. Poyrazoglu, Ibrahim H.Ozercan, Kazım Sahin and Bilal Ustundag. The Treatment with Antibody of TNF- α Reduces The Inflammation, Necrosis and Fibrosis in the Non-alcoholic Steatohepatitis Induced by Methionine and Choline Deficient Diet. *Inflammation*, Vol. 31, No. 2, April 2008.
21. Duangporn Thong-Ngam, Suchitra Samuhasaneeto, Onanong Kulaputana, Naruemon Klaikeaw. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R *World J Gastroenterol* 2007 October 14; 13(38): 5127-5132.
22. Elizabeth M. Brunt, MD. Nonalcoholic steatohepatitis: Pathologic features and differential diagnosis. *Seminars in diagnostic pathology*, 2005; 22: 330-338.

23. Szczepaniak L, Nurenberg P, Leonard D, et al: Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: Prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E462-8.
24. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, et al: Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: Population based study. *Ann Hepatol* 2007; 6:161-3.
25. Ekstedt M, Franzn L, Mathiesen U, et al: Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44:865-73.
26. Park S, Jeon W, Kim S, et al: Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:138-43.
27. Perry A, Applegate E, Jackson M, et al: Racial differences in visceral adipose tissue but not anthropometric markers of health-related variables. *J Appl Physiol* 2000; 89:636-43.
28. Flores Y, Yee HJ, Leng M, et al: Risk factors for chronic liver disease in blacks, Mexican Americans, and whites in the United States: Results from NHANES IV, 1999-2004. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:2231-8.
29. Schwimmer J, Deutsch R, Rauch JB, et al: Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003; 143:500-5.
30. Abdelmalek M, Liu C, Shuster J, et al: Familial aggregation of insulin resistance in first-degree relatives of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:1162-9.
31. Willner I, Waters B, Patil S, et al: Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: Insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2957-61.
32. Merriman R, Aouizerat B, Bass N: Genetic influences in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:S30-S3.
33. Ogden C, Yanovski S, Carroll M, Flegal K: The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; 132:2087-102.
34. Dixon J, Bhathal P, O'Brien P: Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121:91-100.
35. Hsiao T, Chen J, Wang J: Insulin resistance and ferritin as major determinants of nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:167-72.

36. Boza C, Riquelme A, Ibaez L, et al: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg* 2005; 15:1148-53.
37. Luyckx F, Sheen A, Desai C, et al: Effects of gastroplasty on body weight and related biological abnormalities in morbid obesity. *Diab Metab* 1998; 24:355-61.
38. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, et al: Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:399-408.
39. Park J-W, Jeong G, Kim S, et al: Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: Comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:491-7.
40. Moretto M, Kupski C, Mottin C, et al: Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. *Obes Surg* 2003; 13:622-4.
41. Hsiao PJ, Kuo KK, Shin SJ, et al: Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:2118-23.
42. Stranges S, Dorn J, Muti P, et al: Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: A population-based study. *Hepatology* 2004; 39:754-63.
43. Church T, Kuk J, Ross R, et al: Association of cardiorespiratory fitness, body mass index, and waist circumference to nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006; 130:2023-30.
44. Cheung O, Kapoor A, Puri P, et al: The impact of fat distribution on the severity of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hepatology* 2007; 46:1091-100.
45. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:1212-18.
46. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al: Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:2119-21.
47. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al: Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917-23.
48. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD: Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30:1356-62.

49. El-Serag H, Tran T, Everhart J: Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126:460-8.
50. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al: Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37:1286-92.
51. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, et al: Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: A population based case control study. *Gut* 2005; 54:533-9.
52. Browning JD: Statins and hepatic steatosis: Perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology* 2006; 44:466-71.
53. Lee JY, Kim KM, Lee SG, et al: Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007; 47:239-44.
54. Oh SY, Cho YK, Kang MS, et al: The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2006; 55:1604-9.
55. Day C, James O: Steatohepatitis: A tale of two "hits"? (editorial). *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
56. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell G, et al: NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35:373-9.
57. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al: Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: Further evidence of an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-72.
58. Sanyal A, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al: Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120:1183-92.
59. Angulo P, Lindor K: Insulin resistance and mitochondrial abnormalities in NASH: A cool look into a burning issue. *Gastroenterology* 2001; 120:1281-5.
60. Boden G: Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 2006; 6:177-81.
61. Boden G: Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:545-9.
62. Neuschwander-Tetri B: A resistance movement in NASH. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2813-14.

63. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, et al: Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002; 35:898-904.
64. Neuschwander-Tetri B, Caldwell S: Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-19.
65. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al: Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa β . *Nat Med* 2005; 11:183-90.
66. Farrell GC, Larter CZ: Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:S99-S112.
67. Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE: Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: Implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1036-42.
68. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al: Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p53 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-63
69. Czaja M: Liver injury in the setting of steatosis: Crosstalk between adipokine and cytokine. *Hepatology* 2004; 40:19-22.
70. Hui J, Hodge A, Farrell G, et al: Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. *Hepatology* 2004; 40:46-54.
71. Kugelmas M, Hill D, Vivian B, et al: Cytokines and NASH: A pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38:413-19.
72. Xu A, Wang Y, Keshaw H, et al: The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:91-100.
73. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al: Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54:117-21.
74. Harrison S, Di Bisceglie A: Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003; 63:2379-94.
75. Canbakan B, Tahan V, Balci H, et al: Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2008; 7:249-54.
76. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, et al: Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2771-6.
77. Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al: Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36:403-9.

78. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, et al: Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:3584-9.
79. Kessova I, Cederbaum AI: CYP2E1: Biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3:509-18.
80. Hoek JB, Pastorino JG: Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver injury. *Alcohol* 2002; 27:63-8.
81. Chalasani N, Gorski C, Asghar M, et al: Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37:544-50.
82. Weltman M, Farrell G, Hall P, et al: Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27:128-33.
83. Laurent A, Nicco C, Van Nhieu J, et al: Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:1277-85.
84. Yang S, Zhu H, Li Y, et al: Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; 378:259-68.
85. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al: Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40:185-94.
86. Leclercq I, Farrell G, Field J, et al: CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105:1067-75.
87. Yang S, Lin H, Diehl AM: Fatty liver vulnerability to endotoxin-induced damage despite NF κ B induction and inhibited caspase 3 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G382-92.
88. Diehl A: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol* 2002; 282:G1-G5.
89. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, et al: Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: Evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007; 17:1374-80.
90. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, et al: Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* 2008; 138:1452-5.

91. Fromenty B, Robin M, Igoudjil A, et al: The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004; 30:121-38.
92. Perez-Carreras M, Hoyo P, Martin M, et al: Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:999-1007.
93. Le T, Caldwell S, Redick J, et al: The zonal distribution of megamitochondria with crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:1423-9.
94. Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M: Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:244-51.
95. Pinzani M, Rombouts K: Liver fibrosis: From the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36:231-42.
96. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, et al: High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: A potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34:738-44.
97. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, et al: Leptin in hepatic fibrosis: Evidence for increased collagen production in stellat cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35:762-71.
98. Adams L, Lindor K, Angulo P: The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1316-20.
99. Lonardo A, Adinolfi L, Loria P, et al: Steatosis and hepatitis C virus: Mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology* 2004; 126:586-97.
100. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, et al: Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2004; 39:179-87.
101. Saadeh S, Younossi Z, Remer E, et al: The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123:745-50.
102. Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo M, De Moura M: Nonalcoholic steatohepatitis —a long-term follow-up study: Comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 2003; 48:1909-13.
103. Zafrani E: Non-alcoholic fatty liver disease: An emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004; 444:3-12.
104. Gramlich T, Kleiner D, McCullough A, et al: Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2004; 35:196-9.

105. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al: Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118:1117-23.
106. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-21.
107. Mendler MH, Kanel G, Govindarajan S: Proposal for a histological scoring and grading system for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25:294-304.
108. Scheuer P: Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13:372-4.
109. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, et al: Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology* 2006; 6:6-19.
110. Yoneda M, Yoneda M, Mawatari H, et al: Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Liver Dis* 2008; 40:371-8.
111. Charlton M, Angulo P, Chalasani N, et al: Low circulating levels of dehydroepiandrosterone in histologically advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008; 47:484-92.
112. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al: Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25:779-86.
113. Teli M, James O, Burt A, et al: The natural history of nonalcoholic fatty liver: A follow-up study. *Hepatology* 1995; 22:1714-19.
114. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P: The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: A longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42:132-8.
115. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, et al: Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: A longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004; 40:820-6.
116. Harrison S, Torgerson S, Hayashi P: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2042-7.
117. Ratziu V, Bugianesi E, Dixon J, et al: Histological progression of non-alcoholic fatty liver disease: A critical reassessment based on liver sampling variability. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26:821-30.

118. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129:113-21.
119. Matteoni C, Younossi Z, Gramlich T, et al: Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116:1413-19.
120. Poonawala A, Nair S, Thuluvath P: Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: A case-control study. *Hepatology* 2000; 32:689-92.
121. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al: Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123:134-40.
122. Caldwell S, Oelsner D, Iezzoni J, et al: Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29:664-9.
123. Marrero J, Fontana R, Su G, et al: NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002; 36:1349-54.
124. Hui J, Kench J, Chitturi S, et al: Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:420-7.
125. Hickman I, Jonsson J, Prins J, 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; 53:413-19.
126. Knobler H, Schattner A, Zhornicki T, et al: Fatty liver—an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *QJM* 1999; 92:87-96.
127. Nobili V, Manco M, Devito R, et al: Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial. *Hepatology* 2008; 48:119-28.
128. Huang MA, Greenon JK, Chao C, et al: One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1072-81.
129. Harrison SA, Ramrakhiani S, Brunt EM, et al: Orlistat in the treatment of NASH: A case series. *Am J Gastroenterology* 2003; 98:926-30.
130. Zelber-Sagi S, Kessler A, Brazowsky E, et al: A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:639-44.

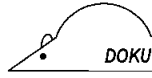
131. Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC, et al: Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006; 130:1564-72.
132. Liu X, Lazenby AJ, Clements RH, et al: Resolution of nonalcoholic steatohepatitis after gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2007; 17:486-92.
133. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE: Weight loss and non-alcoholic fatty liver disease: Falls in gamma-glutamyl transferase concentrations are associated with histologic improvement. *Obes Surg* 2006; 16:1278-86.
134. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE: Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004; 39:1647-54.
135. Clark JM: Weight loss as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(Suppl 1):S39-S43.
136. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ: Comparative review of diets for the metabolic syndrome: Implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:285-300.
137. Luyckx F, Lefebvre P, Scheen A: Nonalcoholic steatohepatitis: Association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26:98-106.
138. Harrison S, Torgerson S, Hayashi P, et al: Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2485-90.
139. Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, et al: Plasma transforming growth factor- β 1 and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1667-72.
140. 140.arke MW, Burnett JR, Croft KD: Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45:417-50.
141. Abdelmalek M, Angulo P, Jorgensen R, et al: Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2711-17.
142. Gulbahar O, Karasu Z, Ersoz G, et al: Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with N-acetylcysteine [abstract]. *Gastroenterology* 2000; 118:A1444.

143. Ip E, Farrell G, Hall P, et al: Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39:1286-96.
144. Lin H, Yang S, Chuckaree C, et al: Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nature Med* 2000; 6:998-1003.
145. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358:893-4.
146. Nair S, Diehl AM, Wiseman M, et al: Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: A pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20:23-8.
147. Neuschwander-Tetri B, Brunt E, Wehmeier K, et al: Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- α ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38:1008-17.
148. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo G, et al: A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:188-96.
149. Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, et al: The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 46:424-9.
150. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, et al: Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: One-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 2008; 135:100-10.
151. Facchini F, Hua N, Stoohs R: Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122:931-9.
152. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al: Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: Evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1251-8.
153. Fernandez-Real J, Lopez-Bermejo A, Ricart W: Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 2002; 51:2348-54.
154. Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A: A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis [correspondence]. *J Hepatol* 1999; 31:384.
155. Kiyici M, Gulden M, Gurel S, et al: Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2003; 17:713-18.

156. Lindor K, Kowdley K, Heathcote E, et al: Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Results of a randomized trial. *Hepatology* 2004; 39:770-8.
157. Contos MJ, Cales W, Sterling RK, et al: Development of nonalcoholic fatty liver disease after orthotopic liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Liver Transpl* 2001; 7:363-73.
158. Burke A, Lucey MR: Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4:686-93.
159. Kirsch, R., V. Clarkson, E. G. Shephard, D. A. Marais, M. A. Jaffer, V. E. Woodburne, R. E. Kirsch, and P. L. Hall. 2003. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18:1272–1282.
160. Chawla, R. K., W. H. Watson, C. E. Eastin, E. Y. Lee, J. Schmidt, and C. J. McClain. 1998. S-adenosylmethionine deficiency and TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *Am. J. Physiol.* 275:G125–129.
161. Buckley NA, Whyte IM, O'Connell DL, Dawson AH. Oral or intravenous N-acetylcysteine: which is the treatment of choice for acetaminophen (paracetamol) poisoning? *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999; 37:759–67.
162. Ghoshal AK, Farber E. Choline deficiency, Lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: a new perspective. *Lab Invest* 1993;68:255.
163. Stamler J, Mandelsohn ME, Amarante P. N-acetyl cysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1989;65:789.
164. Maher JJ. Cytokines: Overview. *Semin Liv Dis* 1999;19(2):109-115
165. Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis. Definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:377-384.
166. Mccullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:255-262.
167. Adinolfi LE, Durante-Mangoni E, Zampino R, Ruggiero G. Review article: hepatitis C virus-associated steatosis-pathogenic mechanisms and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2:52-5.
168. Pagano C, Soardo S, Pilon C, 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;91:1081-86.

169. Nakano H, Nagasaki H, Borama A. The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine deficient diet. *Hepatology* 1997;26:670.
170. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Splenger RN, Lynch JP, Larrick J, Kunkel SL. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:1230-1236.
171. Wallis RS. Tumor necrosis factor antagonists: structure, function and tuberculosis risk. *Lancet Infect Dis* 2008;8:601-11.
172. Scallon B, Cai A, Solowski N, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:418-26
173. Dinarello CA. Differences between anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies and soluble TNF receptors in host defense impairment. *J Rheumatol suppl* 2005;74:40-7.
174. Moreland LW, Schiff Mh, Baumgartner SW, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999;130:478-486.
175. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid arthritis with concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000;343: 1594-1602.
176. Giles J, Bathon J. Serious infections associated with anticytokine therapies in the rheumatic diseases. *J Intensive Care Med* 2004; 19:320-334.
177. Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 372-379.
178. Tauber WB. Serious adverse effects associated with the use of anti-TNF alpha drugs. Available at: http://www.fda.gov/cder/present/DIA2004/Tauber_files/frame.htm (accessed Jul 2005).
179. Baecklund E, Ekblom A, Soren P, et al. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case control study. *BMJ* 1998; 317: 180-181.
180. Wolfe F, Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18 572 patients. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1740-1751.
181. Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*, 8th Edition, Chapter 82 - Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

9. ETİK KURUL ONAY FORMU



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU


35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234
http://deu.edu.tr/idenyetik/


Toplantı No : 11/04/2012
Toplantı Tarihi : 02 Mart 2012


İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'na


11/2012 Protokol No'lu; İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı Araştırma Görevlilerinden Dr.Muhammet Ali KIYAK'ın yürütücüsü olduğu "Ratlarda Non-Alkolik Steatohepatit üzerine N-Asetilsistein, Adalimumab ve N-Asetilsistein-Adalimumab kombinasyonunun etkileri" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı


Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye


Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye (Topl.katılmadı)

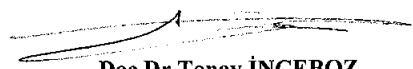

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye (Topl.katılmadı)

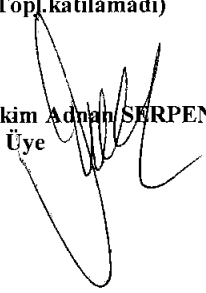
Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.katılmadı)

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye


Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

Doç.Dr.Şermin GENÇ
Üye (Topl.katılmadı)

Ayşe Nur BALİN
Üye (Topl.katılmadı)


Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye