



**NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER
HASTALIĞINDA SERUM ALBÜMİN YAĞ ASİDİ
BAĞLAMA KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esmanur ÇİÇ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR**

Doktora Tezi - 2026

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA SERUM ALBÜMİN
YAĞ ASİDİ BAĞLAMA KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esmanur ÇİĞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR**

**Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
Prof. Dr. Tuğba Raika KIRAN
Dr. Öğr. Üyesi Fatma ÖZYALIN**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2022/3130 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2026**

KABUL ONAY



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Serum Albümin Yağ Asidi Bağlama Kapasitesinin Araştırılması” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

14/01/2026

Esmanur ÇİĞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. NAFLD Tanımı	4
2.2. NAFLD'nin Önemi ve Epidemiyolojisi	5
2.3. NAFLD Patogenezi	6
2.4. Lipotoksisite, İnflamasyon ve NAFLD	7
2.5. NAFLD'de İnflamatuvar Mekanizmalar	8
2.6. NAFLD'de Bağırsak Mikrobiyotası	8
2.7. Sirkadiyen ritim ve NAFLD	9
2.8. NAFLD ve Obezite İlişkisi	10
2.9. NAFLD'den NASH ve Siroza: Patofizyolojik Süreç ve Klinik İlerlemenin Mekanizmaları	11
2.10. NAFLD Risk Faktörleri	12
2.11. NAFLD'de Klinik Özellikler	13
2.12. NAFLD'de Tanı Yöntemleri	13
2.13. NAFLD Tedavisi	15
2.14. Yağ Asitleri	15
2.15. Yağ Asitleri ve NAFLD	16
2.16. Albümin ve NAFLD	17
3. MATERYAL METOT	20
3.1. Materyal	20
3.2. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması ...	20
3.3. Biyokimyasal Analizler ve Serum Numunelerinin Saklanması	21
3.4. Serumdan Albümin Seperasyonu	22
3.4.1. Amonyum Sülfat Presipitasyonu	22
3.4.2. Cibacron Blue Affinite Kromatografisi (CBAK)	25

3.4.3. Separe Edilen Kısımların Protein Miktar Analizlerinin Hesaplanması.....	26
3.4.4. Sepera Edilen Protein Kısımlarının SDS-PAGE ile Elektroforetik Ayrımı.....	27
3.5. Serum Albümine Bağlanan Lipit Yapıdaki Bileşenlerin İnce Tabaka Kromatografi ile İncelenmesi	31
3.6. 1-Anilino-8-Naftalinsülfonat (Ans) Molekülü ile Albümin Yağ Asidi Bağlama Kapasitesinin Ölçülmesi	34
3.7. Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi ile Analizi.....	36
3.8. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Demografik Özelliklerin Karşılaştırılması	38
4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Serum Biyokimyasal Analiz Sonuçları	40
4.3. Albümin Seperasyon Yöntemlerinden Elde Edilen Albümin ve Globülin Fraksiyonlarının SDS-PAGE ile Ayrımı ve Fotodansitometrik Analizi.....	41
4.4. Albümin Ekstrakt Lipitlerinin İTK ile Seperasyonu ve Fotodansitometrik Analizleri.....	42
4.5. ANS Floresan Yer Değiştirme Yöntemi ile Kontrol ve Hasta Serum Albüminlerinin Farklı Yağ Asitlerini Bağlama Kapasitelerinin Karşılaştırılması	45
4.6. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Serum ve Albümin Yağ Asidi % Kompozisyonlarının Karşılaştırılması	65
4.7. Yağ Asitlerinin Serum Albuminine Bağlanmasına Dair ANS-floresan Yer Değiştirme Sonuçları, Yağ Asitlerinin % Kompozisyonları ve İTK Sonuçlarının 1. Ve 2. derece Karaciğer Yağlanması ve Kontrol Grupları Arasında Karşılaştırılmaları	72
4.7.1. Grade 1, Grade 2 ve Kontrol Gruplarının Albümin Ekstraktlarına Ait Lipit Kromatogram Spotlarının Fotodansitometrik % Değerlerinin Karşılaştırılması	72
4.7.2. Grade 1, Grade 2 ve Kontrol Gruplarının ANS Yer Değiştirme Yöntemi ile Serum Albümin Yağ Asidi Bağlama Parametrelerinin İstatistiksel Karşılaştırılması	73
4.7.3. Grade 1, Grade 2 ve Kontrol Gruplarının Serum ve Albümin Yağ Asidi % Kompozisyonlarının Karşılaştırılması	75

4.8. Floresan Yer Değiştirme Göstergeleri ve Yağ Asidi Yüzde Kompozisyonları ile Biyokimyasal Parametrelerin Korelasyon Analizi (Spearman's rho).....	78
4.9. NAFLD Biyobelirteçlerinde Diyabet Etkisinin Araştırılması İçin Yapılan Ek İstatistiksel Analizler	80
5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR.....	98
EKLER	109
EK-1. Özgeçmiş	109
EK-2 Etik Kurul Onayı.....	110



TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın her aşamasında değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR'e, çalışmanın hasta grubu numunelerinin toplanmasında yardımcı olan Turgut Özal Tıp Merkezi Gastroenteroloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Murat HARPUTLUOĞLU'na, çalışmanın istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ahmet Kadir ARSLAN'a, çalışmanın fotodansitometrik analizlerinin yapılmasında laboratuvarına kullanıma açan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a ve analizleri gerçekleştiren Dr. Öğretim Üyesi Muhammed DÜNDAR'a, çalışmanın kontrol grubu için kan vererek katkı sağlayan Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Biyokimya Laboratuvarı personeline ve hasta grubu için kan veren tüm gönüllü katılımcılara teşekkür ederim. Bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli anneme, babama, eşime ve kardeşlerime minnettarım.

Esmanur ÇİĞ.

ÖZET

Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Serum Albümin Yağ Asidi Bağlama Kapasitesinin Araştırılması

Amaç: Ulusal ve küresel anlamda görülme prevalansı oldukça yüksek olan NAFLD, siroz ve kansere kadar ilerleyebilen bir metabolik süreci kapsar. Hastalığın patogenezi, teşhis ve tedavisi ile ilgili literatürde yoğun çalışmalar yapılsa da hastalığa spesifik bir biyobelirteç ve farmakolojik tedavi henüz yoktur. Bu çalışma ile serum ve albümine bağlı yağ asidi kompozisyonları, albüminin yağ asidi bağlama kabiliyeti ve biyokimyasal parametrelerle olan ilişkilerini değerlendirerek NAFLD'nin lipid metabolizmasına etkileri araştırıldı.

Materyal Metot: Ultrasonografi ile NAFLD tanısı alan 20 hasta ve tanısı almayan 20 kontrol grubundan kan örnekleri alındı ve serum kısımlarından albümin AS2 presipitasyonu ile separe edildi. Sepera edilen albümin moleküllerinin yağ asidi bağlama kabiliyeti, ANS-floresan yer değiştirme yöntemiyle ölçüldü. Hasta ve kontrol grubunda serum ve albümin % yağ asidi kompozisyonları GC-MS ile analiz edildi.

Bulgular: Kontrol ve hasta grubu floresan değişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Glikoz ve HbA1c değeri ile floresan değişimler arasında korelasyon gözlemlendi. GC-MS analizlerinde stearik asit ve araşidonik asit düzeyleri NAFLD grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterdi. Serum kaproik asit düzeyi ile ALT, AST değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı.

Sonuç: NAFLD'de albüminin yağ asidi bağlama kabiliyetinde anlamlı farklılık saptanmasa da yağ asitlerinin albümine bağlanmasına dair ANS-floresan yer değiştirme yöntemi sağlıklı çalışıyor. Glikoz ve HbA1c değeri ile floresan değişimler arasında korelasyon gözlemlendi bu durum albümin glikasyonun yağ asidi bağlanma kabiliyetinde değişikliklere yol açtığını düşündürmektedir. Stearik ve araşidonik asitin hasta grubundaki farklılığı yağ asidi metabolizmasındaki değişimlere işaret etmektedir. Kaproik asidin ALT, AST enzimleriyle korelasyonu NAFLD patogeneziindeki rolünün daha çok çalışılması gerektiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Floresans spektroskopisi, İnsan serum albümini, Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, Yağ asidi, Yağ asidi bağlama.

ABSTRACT

Investigation of Fatty Acid Binding Capacity of Serum Albumin in Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Objective: NAFLD, which has a high national and global prevalence, involves a metabolic process that can progress to cirrhosis and cancer. While extensive studies have been conducted in the literature on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the disease, there are currently no specific biomarkers or pharmacological treatments. This study investigated the effects of NAFLD on lipid metabolism by assessing serum and albumin-bound fatty acid compositions, albumin's fatty acid-binding ability, and their relationships with biochemical parameters.

Materials and Methods: Blood samples were obtained from 20 ultrasonography-confirmed NAFLD patients and 20 healthy controls. Albumin was isolated using AS2 precipitation, and its fatty acid-binding capacity was assessed via the ANS-fluorescence displacement method. Serum and albumin fatty acid compositions (%) were analyzed by GC-MS.

Findings: No significant difference in fluorescence displacement was observed between the groups. However, glucose and HbA1c levels correlated with fluorescence changes. GC-MS analysis showed that stearic and arachidonic acid levels differed significantly in the NAFLD group. Serum caproic acid levels were positively correlated with ALT and AST.

Conclusion: Although albumin fatty acid-binding capacity did not differ between groups, the ANS-fluorescence method proved reliable. The correlations with glucose and HbA1c suggest that albumin glycation may alter binding properties. Differences in stearic and arachidonic acids indicate shifts in fatty acid metabolism in NAFLD. The association between caproic acid and liver enzymes highlights a potential role in NAFLD pathogenesis that warrants further investigation.

Keywords: Human serum albumin, Fatty acid, Fatty acid binding, Fluorescence spectroscopy Non-alcoholic fatty liver disease.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABiC	: Albümin Bağlama Kapasitesi
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ANS	: 1-Anilino-8-naftalinsülfonat
AS	: Amonyum Sülfat
AS2	: İki Aşamalı Amonyum Sülfat Presipitasyonu
AS4	: Dört Aşamalı Amonyum Sülfat Presipitasyonu
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CBAK	: Cibacron Blue Affinite Kromatografisi
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
DNL	: De Novo Lipogenez
DS	: Dansilsarkosine
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
EPR	: Elektron Paramanyetik Rezonans
ER	: Endoplazmik Retikulum
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HK	: Hepatoselüler Karsinom
IMA	: İskemik Modifiye Albümin
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
MASLD	: Metabolik İşlev Bozukluğuna Bağlı Steatotik Karaciğer Hastalığı
MR	: Manyetik Rezonans Elastografi
MS	: Metabolik Sendrom
MUFA	: Tekli Doymamış Yağ Asidi
NASH	: Non-alkolik Steatohepatit
NAFL	: Non-alkolik Yağlı Karaciğer
NAFLD	: Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

TAG	: Triaçilgliserol
T2DM	: Tip 2 Diyabet
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
YA	: Yağ Asidi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 3.1. AS2 presipitasyon yöntemi akış şeması	24
Şekil 3.2. İTK plakasının analize hazırlanması	32
Şekil 4.1. AS2, AS4 presipitasyon ve CBAK ile serum albümin fraksiyonasyonuna ait SDS-PAGE elektroforetogramı	42
Şekil 4.2. Hasta ve serum albümin ekstraktlarının İTK ile lipit analizlerine ait kromatogram	43
Şekil 4.3. Yağ asitlerinin albümine bağlanmasına dair ANS-floresan yer değiştirme grafiği	46
Şekil 4.4. Yağ asitlerinin albümine bağlanmasına dair ([yağ asidi]/[ΔF (%)], [yağ asidi]) lineer grafiği	47
Şekil 4.5. Yağ asitlerinin hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair ([yağ asidi]/[ΔF (%)], [yağ asidi]) lineer grafiği	48
Şekil 4.6. Yağ asitlerinin kontrol grubu albüminlerine bağlanmasına dair ([yağ asidi]/[ΔF (%)], [yağ asidi]) lineer grafiği	49
Şekil 4.7. Palmitik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri	50
Şekil 4.8. Miristik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri	51
Şekil 4.9. Stearik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri	52
Şekil 4.10. Oleik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri	53
Şekil 4.11. Palmitik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği	54
Şekil 4.12. Miristik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği	55
Şekil 4.13. Stearik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği	56
Şekil 4.14. Oleik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği	57

Şekil 4.15. GC-MS analizinde kullanılan standard yağ asitleri karışımına ait	
kromatogram	68
Şekil 4.16. Kontrol grubuna ait bir serum numunesinde gözlenen örnek GC-MS	
kromatogramı	69
Şekil 4.17. Hasta grubuna ait bir serum numunesinde gözlenen örnek GC-MS	
kromatogramı	69



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. 100 ml serumdan albüminin amonyum sülfatla çöktürülmesi.....	25
Tablo 3.2. Ayırma ve stoklama jelinin hazırlanışı	29
Tablo 3.3. Floresan spektroskopi için kuyucuklara yüklenen maddeler ve miktarları ..	36
Tablo 4.1. Kontrol grubuna ait demografik özellikler	38
Tablo 4.2. Hasta grubuna ait demografik özellikler.....	39
Tablo 4.3. Kontrol ve hasta grubuna ait demografik özelliklerin karşılaştırılması.....	40
Tablo 4.4. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması	40
Tablo 4.5. İzolatlarda % albümin(A) ve globülinin(G) kompozisyonları ve A/G oranları	42
Tablo 4.6. Kontrol grubu albümin ekstrakt kromatogramlarına ait fotodansitometrik analiz sonuçları.....	43
Tablo 4.7. Hasta grubu albümin ekstrakt kromatogramlarına ait fotodansitometrik analiz sonuçları.....	44
Tablo 4.8. Kontrol grubu albümin ekstraktlarına ait itk kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerleri	44
Tablo 4.9. Hasta grubu albümin ekstraktlarına ait itk kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerleri	45
Tablo 4.10. Hasta ve kontrol gruplarının albümin ekstraktlarına ait lipit kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerlerinin karşılaştırılması	45
Tablo 4.11. Tüm gruplarda artan yağ asiti konsantrasyonuna karşı floresan yer değiştirme derecelerinin (%) karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.12. Palmitik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları	60
Tablo 4.13. Miristik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları.....	61
Tablo 4.14. Stearik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları.....	62
Tablo 4.15. Oleik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları	63

Tablo 4.16. Hasta ve kontrol grubunda artan yağ asiti konsantrasyonlarına karşın floresan yer değiştirme derecelerinin (%) karşılaştırılması.....	64
Tablo 4.18. Hasta ve kontrol grubunda yağ asidi konsantrasyonu/ floresan yer değiştirme değerlerinin karşılaştırılması	64
Tablo 4.18. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum ve albümin yağ asiti % kompozisyonlarının karşılaştırılması	70
Tablo 4.19. Kontrol grubunda serum ve albümin; hasta grubunda serum ve albümin yağ asidi kompozisyonunun karşılaştırılması	71
Tablo 4.20. Kontrol ve hasta grubunda anlamlı farklılık gösteren bazı yağ asitleri albümin/serum oranı.....	72
Tablo 4.21. Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının albümin ekstraktlarına ait lipid kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerlerinin karşılaştırılması	73
Tablo 4.22. Palmitik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması.....	73
Tablo 4.23. Miristik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması.....	74
Tablo 4.24. Stearik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması.....	74
Tablo 4.25. Oleik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması	74
Tablo 4.26. Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının serum yağ asidi yüzde kompozisyonları	76
Tablo 4.27. Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının albümin yağ asidi yüzde kompozisyonları	76
Tablo 4.28. Grade 1 grubunda biyokimyasal parametrelerle floresan bağlanma göstergeleri ve yağ asidi yüzde kompozisyonları arasındaki Spearman's rho korelasyon analizi tablosu	79
Tablo 4.29. Grade 2 grubunda biyokimyasal parametrelerle floresan bağlanma göstergeleri ve yağ asidi yüzde kompozisyonları arasındaki Spearman's rho korelasyon analizi tablosu	79
Tablo 4.30. Kontrol grubunda biyokimyasal parametrelerle floresan bağlanma göstergeleri ve yağ asidi yüzde kompozisyonları arasındaki Spearman's rho korelasyon analizi tablosu	80

Tablo 4.31. DM–, DM+ ve Kontrol Gruplarında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması (ANOVA ve Kruskal–Wallis Analizleri.....	81
---	----



1. GİRİŞ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), bireylerde alkol kullanımı olmaksızın veya kısıtlı olarak (erkeklerde 30 mg/gün, bayanlarda 20 mg/gün) hepatositlerde %5'den fazla yağ moleküllerinin birikimi ile karakterize olan, yağlı karaciğer, steatohepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler kansere kadar uzanan geniş bir klinik yelpaze içinde karşımıza çıkabilen bir hastalıktır (1,2). Non-alkolik steatohepatit (NASH) ise yağlanmaya inflamasyon ve balonlaşmanın eşlik ettiği durumu kapsar. NASH'da fibrosiz görülme sıklığı artar. NAFLD ve NASH vakaları siroza ve kansere kadar ilerleyebilir (3,4) . NAFLD'nin NASH'a geçişinde vücutta ana etken yağlanmanın artışıyla okside lipidlerin oluşumu, inflamasyon ve oksidatif hasarın artışıdır (5). Fakat NAFLD'nin NASH'a ilerleme derecesi ve süresi kişiden kişiye değişmekte üstelik bu durumu tespit eden bir belirteç mevcut değildir. Günümüzde kullanılan karaciğer enzimleri ALT, AST, GGT ve diğer biyokimyasal belirteçler NAFLD'nin erken safhalarını tespit etmede yetersizdir, çünkü bu parametrelerdeki anormallikler çoğunlukla hastalığın ileri evrelerine veya fibrozis gelişim sürecine girildiğinde ortaya çıkmaktadır. Üstelik enzim seviyeleri normal seviyede olup NAFLD tanısı alan hastalar da vardır (6,7) . Bu nedenle erken tanı için yeni, duyarlı ve fonksiyonel belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. NASH teşhisinde ve NAFLD'nin NASH'dan ayrımında ise altın standart karaciğer biyopsisidir (5). Biyopsi ise invazif ve ağrılı bir işlem olduğundan hastaların birçoğu tarafından tercih edilmemektedir. Üstelik yağlanma olmadan NASH'a kadar ilerleyen hasta grupları da mevcuttur. NASH'a ilerleyişin erken tespit edilememesi karaciğerde oluşan hasarı artırmaktadır. Bununla birlikte yaşam kalitesi düşmekte, obezite, dislipidemi, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığı artmaktadır. Üstelik NASH'lı hastalar günümüzde karaciğer nakil sırası bekleyenler arasında hepatitten sonra ikinci sırada gelmektedir ve prevalansı gittikçe artmaktadır (8) . Yaşam kalitesini düşürmesi, tedavi ve transplantasyon aşamalarının maliyetleri düşünüldüğünde NAFLD'nin erken teşhisi, NASH'ın erken tespiti ve önlenabilirliği önem arz etmektedir.

NAFLD'li ve NASH'lı hasta gruplarında patagonez, teşhis ve tedavi için literatürde çok sayıda araştırma makalesi mevcuttur. NAFLD ortaya çıkmadan önce tespitinin yapılması hastalığının ilerleyişini durdurmak ve önlemleri almak için önemlidir. Karaciğerde yağ molekülleri adipoz dokudan lipoliz ile yağ asidi (YA) akışı,

de novo lipogenez (DNL) ve diyet ile yağ alımı yollarıyla birikebilir. Bu yollardan en çok adipoz dokudan lipolizin baskın olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (9) . Adipoz dokudan lipoliz ile plazmaya geçen kısa zincirli yağ asitleri dışındaki yağlar albümine bağlanarak taşınmaktadır. Bu nedenle albüminin yağ asidi bağlama kapasitesindeki değişimler, karaciğere ulaşan yağ asidi miktarını ve dolayısıyla hepatik yağlanmayı etkileyebilir.

Serum albümini vücuttaki en bol plazma proteindir ve onkotik basıncın korunması, moleküllerin taşınması, antioksidan savunma, antiinflamatuvar etki gibi birçok kritik fonksiyona sahiptir. Albümin başta uzun zincirli yağ asitleri olmak üzere ayrıca bilirubin, metal iyonları ve çeşitli ilaçlar gibi çok sayıda endojen ve eksojen moleküle de bağlanmaktadır. Bu bağlama fonksiyonunun bozulması, bağlanan moleküllerin biyoyararlanımı, metabolizması ve dokulara dağılımı üzerinde önemli etkiler yaratır (10) .

Albüminin bağlama kapasitesi (ABiC), dansilsarkosin gibi moleküllerin bağlanması üzerinden ölçülmekte olup, albüminin fonksiyonel bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca iskemik modifiye albümin (IMA), albüminin metal bağlama kapasitesindeki değişiklikleri gösteren bir diğer parametredir (10). Bunun yanında albüminin yağ asidi bağlama bölgelerine yönelik değişimleri değerlendirmek için 1-Anilino-8-naftalsülfonat (ANS) gibi floresan probalar yaygın olarak kullanılmaktadır (11,12).

Literatürde NAFLD, hepatit ve sirozlu hastalarda albüminin bağlama kapasitesinin azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (10,13,14) Sun ve ark. (2020) çalışmasında, NAFLD’de oksidatif stres ve inflamasyonun albüminin sentezinden ziyade post-translasyonel modifikasyonlarını etkilediği ve bunun da albümin bağlama fonksiyonunda azalmaya yol açabileceği belirtilmiştir. Dikkat çekici olarak, bu fonksiyonel bozulmanın geleneksel karaciğer enzimlerindeki değişimlerden önce ortaya çıktığı, yani albümin bağlama fonksiyonunun NAFLD’nin erken tanısında kullanılabilecek yeni bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır (10).

Bu bilgiler ışığında, albümin yağ asidi bağlama kapasitesindeki olası değişimlerin NAFLD patogenezinde rol oynayabileceği ve hastalık progresyonunun erken evrelerinde belirteç niteliği taşıyabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, NAFLD’li bireylerde albüminin yağ asidi bağlama kapasitesinin ANS kullanılarak değerlendirilmesi, elde edilen sonuçların kontrol gruplarıyla karşılaştırılması ve albümin bağlama fonksiyonundaki olası değişimlerin hastalığın

patogenezindeki rolünün belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca albümin yağ asidi kapasitesinin araştırılmasına ek olarak hasta ve kontrol grupları için bazı biyokimyasal parametreler, serum ve albümin yağ asidi analizi ve albümine bağlanan lipit yapıda moleküllerin karşılaştırması yapıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. NAFLD Tanımı

NAFLD, alkolün hiç tüketilmediği veya az tüketildiği durumlarda hepatositlerde %5'den fazla steatozun varlığıyla tanımlanan bir karaciğer bozukluğudur (1). Günümüzde en sık karşılaşılan, intra hepatik, ekstra hepatik organları ve düzenleyici yolları etkileyen çok sistemli kronik karaciğer hastalıklarından biridir ve 2030 yılına kadar karaciğer nakli gereksiniminde başlıca nedenlerden biri olması öngörülmektedir (3).

Karaciğerde yağ birikimi uzun yıllardır bilinen bir terimdir fakat non-alkolik yağlanma teriminin tanımlanması ilk kez 1980 yılında Ludwig ve arkadaşlarının yayımladığı öncü makalede ele alınmıştır. İlgili çalışmada, alkol kullanımı bulunmayan bireylerde, alkolle ilişkili karaciğer hastalarına benzer histopatolojik bulgular saptanması üzerine “non-alkolik steatohepatit” literatüre kazandırılmıştır. Non-alkolik ifadesi, bu benzerliğin altta yatan farklı bir patofizyolojik mekanizmaya sahip olabileceğine işaret etmiştir ama patofizyolojik temeli hakkında yeterli ilerleme kaydedilememiştir. Bu bağlamda, karaciğerdeki yağlanmanın yalnızca alkol ile ilişkili olmadığı, metabolik ve başka çevresel etkenlerin de bu sürece katkı sağlayabileceği fikri ortaya konmuştur (4).

Her ne kadar NAFLD ve NASH terimlerinin ilişkili patofizyolojileri ve birbirinin yerine kullanılması durumları söz konusu olsa da, iki kavram aslında patolojik süreç açısından birbirinden farklı olayları tanımlamaktadır. NAFLD, non-alkolik yağlı karaciğer (NAFL) ve daha ciddi olan non-alkolik steatohepatit (NASH) olmak üzere iki evreden oluşur (15). Özetle NAFLD, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer (NAFL) ile alkole bağlı olmayan steatohepatit (NASH) arasındaki karaciğer anormalliklerinin bir devamıdır ve değişken bir seyir izleyebilir, ancak siroz ve karaciğer kanseriyle sonuçlanabilir (16).

NAFLD terimi, son yıllarda uluslararası hepatoloji toplulukları tarafından güncellenerek Metabolik işlev bozukluğuna bağlı steatotik karaciğer hastalığı (MASLD) olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Bu değişikliğin temel nedeni, hastalığın patogenezinde metabolik disfonksiyonun belirleyici rol oynamasının daha doğru şekilde vurgulanmak istenmesidir. Bu terminoloji özellikle obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet ve metabolik sendrom bileşenlerinin karaciğer yağlanması temeli nedenleri arasında yer aldığını daha açık şekilde vurgulamaktadır. MASLD kavramı, aynı zamanda önceki sınıflamanın

eksik bıraktığı metabolik risk faktörlerini tanısal sürecin merkezine alarak daha kapsayıcı ve klinik açıdan daha yönlendirici bir çerçeve sunmaktadır. Bu nedenle mevcut literatürde NAFLD yerine giderek daha yaygın biçimde MASLD teriminin kullanıldığı görölmektedir (17–19).

2.2. NAFLD'nin Önemi ve Epidemiyolojisi

NAFLD, günümüzde birçok ülkede en yaygın kronik karaciğer hastalığı olarak öne çıkmaktadır. Global ölçekte ortalama her dört yetişkenden birinde görüldüğü bildirilen NAFLD (20), yalnızca karaciğer hastalık tablosuyla sınırlı kalmayıp kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet (T2DM) ve böbrek hastalıkları gibi çoklu sistemleri etkileyen komplikasyonları barındırmaktadır (1,16). Metabolik sendromun yükselişiiyle paralel ilerleyen bu hastalığın, 2030 yılına kadar karaciğer nakli gerektiren olgular arasında ilk sıraya yerleşmesi beklenmektedir (3).

Vücut kitle indeksinin düşük olduğı Asya ülkelerinde bile NAFLD prevalansının yüksek seyretmesi, genetik yatkınlık ve yaşam tarzı değışikliklerinin hastalığın patolojisinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Çin'de yapılan kapsamlı bir epidemiyolojik derlemede, 1999-2018 yılları arasında NAFLD prevalansının % 23,8'den %32,9'a yükseldiğı, hastalığın görölme sıklığındaki artışın ekonomik büyüme ve kentleşme ile doğru orantılı olduğı bildirilmiştir. Ayrıca, Çin gibi ülkelerde NAFLD'ye bağıli siroz ve hepatoselüler karsinom (HK) vakalarının artış gösterdiği, hatta bu hastalığın karaciğer nakli ihtiyacında önemli bir neden haline geldiğı belirtilmektedir (21).

Amerika Birleşik Devletleri'nde hepatik steatoz prevalansının yaklaşık %31 olduğı bildirilmektedir (22). Küresel düzeyde NAFLD'nin ekonomik etkisi de giderek artmaktadır, ABD'de yıllık sağılık harcamaları içinde maliyeti 100 milyar doların üzerindeyken Avrupa'da ise bu maliyet 35 milyar avronun üzerindedir. Küresel düzeyde yürütölen epidemiyolojik araştırmalar, NAFLD'nin zaman içerisinde karaciğer sirozu veya HK gelişimine yol açabileceğini göstermektedir. ABD'de gerçekleştirilen bir araştırma, NAFLD'nin HK için en yaygın nedenlerden biri olduğunu ortaya koymuş; ayrıca, 2002 ile 2017 yılları arasında Bilimsel Organ Nakli Alıcıları Kaydından elde edilen veriler, NASH'e bağıli HK vakalarının 11.5 kat arttığını ve HK kaynaklı karaciğer nakli oranlarının 8.5 kat yükseldiğini bildirmiştir (23).

Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmaları ise NAFLD'nin ölkemizdeki yaygınlığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Örneğın bir derleme çalışması, ölkemizde NAFLD prevalansının %48.3 ile %60.1 arasında değıştiğini belirtmektedir

(24). Daha özel olarak, 2007-2016 dönemini kapsayan ve 113.239 sağlıklı bireyi içeren retrospektif analizde görülen genel prevalans %48.3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca NAFLD prevalansının özellikle 50 yaşın üzerindeki bireylerde, erkeklerde, vücut kitle indeksi yirmi beşin üzerinde olan kişilerde ve Türkiye'nin Orta-Doğu ile Doğu Anadolu bölgelerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (25). Bu bulgular, artmış vücut ağırlığı ve diğer metabolik risk faktörlerinin Türkiye'de NAFLD yükünün önemli ölçüde artmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle, NAFLD Türkiye'de yaygın ve hızla artan bir halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir.

2.3. NAFLD Patogenezi

NAFLD'nin etiyopatogeneze katkıda bulunan en önemli faktörler diyabet, obezite, hiperlipidemi varlığı ve insulin direnci gibi metabolik nedenler ve genetik ve çevresel faktörler yer almaktadır. NAFLD patogenezi destekleyen iki teori mevcuttur. Bunlardan ilki 1998 yılında Day ve James tarafından ortaya atılan “çift vuruş (two hits)” hipotezidir. İlk vuruş hipotezinde yağlanma gelişimine neden olan etken metabolik faktörlerdir ve özellikle insulin direnci olarak tanımlanmıştır. İnsülin direncinin patofizyolojisi üç temel hedef doku olan kas, karaciğer ve yağ dokusuna odaklanarak açıklanabilir. İnsülin direncinin yağ dokusundaki en önemli etkisi hormon sensitif lipazın inhibisyonunun etkilenmesi ve lipoprotein lipaz aktivitesinin azalmasıyla inhibe edilemeyen lipoliz sonucu kanda lipit düzeyi artar. Periferik dokuda portal ven aracılığı ile karaciğere ulaşan serbest yağ asitleri okside olarak glikoneogenezi stimule ederler. Karaciğerde artan yağ asitleri, triaçilgliserol ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) yapımı için kullanılırlar. Artan serbest yağ asitlerinin karaciğerde mitokondri içerisinde beta oksidasyonu artar ve bu durum steatohepatit için önemli bir zemin hazırlar. Ayrıca insulin direncinin karaciğere etkisiyle karaciğerde glikoz alımı da bozulmuştur. Karaciğerde yağlanmanın artışıyla okside lipidlerin oluşumu artar, inflamasyon ve oksidatif hasarın gelişmesiyle hepatosellüler hasar ve fibroze neden olan 2. vuruş oluşur. 2. Vuruşun ana sebebinin oksidatif stres, serbest radikaller, iskemi ve sitokinlerden sorumlu olduğu kanıtlanmıştır. Ancak patogenetik mekanizma ve yolların çok çeşitliliği ortaya konuldukça 2. vuruş hipoteze ek olarak “çoklu paralel vuruş (multiple parallel hits)” hipotezi geliştirilmiştir. Çoklu vuruş hipotezinde beslenme alışkanlıkları, çevresel ve genetik faktörler; insülin direncinin gelişmesine, adiposit proliferasyonu ile obeziteye ve bağırsak mikrobiyomunda değişikliklere yol açabilir. Steatozun her zaman inflamasyondan önce geldiği söylene de, artık NASH'ın ilk

karaciğer lezyonu olabileceği kabul edilmektedir. Hepatik hasarların basit toplamından ziyade genetik, harici ve hücre içi olayların zamanlaması ve kombinasyonu steatoz ve NASH'a yol açan farklı yollarla sonuçlanır (1,5,26).

2.4. Lipotoksisite, İnflamasyon ve NAFLD

NAFLD, karaciğer hücrelerinde aşırı lipit birikimi ile karakterizedir. Bu birikimin nedeni sadece enerji fazlalığı değildir aynı zamanda lipotoksisite olarak tanımlanan zararlı lipit metabolitlerinin etkisiyle de ilişkilidir. Hepatik lipotoksisite, karaciğerin serbest yağ asitlerini triaçilgliserol olarak kullanma, depolama ve dışarı atma kapasitesinin, esas olarak yağ dokusu olmak üzere periferden gelen yoğun bir yağ asidi akışı veya artan hepatik de novo lipogenez nedeniyle aşılması durumunda ortaya çıkar (27). Triaçilgliseroller nötral ve depolanabilir formda oldukları için doğrudan toksik kabul edilmez; aksine, hücrenin serbest yağ asitlerini toksik ara metabolitlere dönüşmeden tamponladığı bir “koruyucu depolama mekanizması” işlevi görürler. Buna karşın, lipotoksisite olarak tanımlanan zararlı süreç, reaktif lipit bileşenlerinin özellikle doymuş serbest yağ asitleri, seramidler, diaçilgliseroller (DAG’lar) ve kolesterol esterlerinin aşırı birikimiyle tetiklenir (28,29).

Bu durum endoplazmik retikulum (ER) stresi, mitokondriyal disfonksiyon ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine yol açar. Bu süreç, hepatosit apoptozunu artırarak hastalığın basit steatozdan steatohepatit (NASH) evresine ilerlemesine katkı sağlar (27,30).

Lipotoksisiteye bağlı olarak aktive olan stres yolları, inflamatuvar sitokinlerin (özellikle TNF- α , IL-6 ve IL-1 β) salınımını uyarır ve bu durum karaciğerin lokal bağışıklık yanıtını güçlendirirken sistemik inflamasyonun da sürmesine neden olur. Ayrıca, Kupffer hücreleri ve monosit kökenli makrofajların aktive olmasıyla kronik inflamatuvar ortam oluşur (30,31).

Lipotoksisite, obezite, diyabet ve metabolik sendrom dahil olmak üzere NAFLD'den NASH'e ilerlemeye yatkınlık oluşturan durumlarla yakından ilişkilidir. Sonuç olarak, NAFLD'nin ilerlemesinde lipotoksisite ve inflamasyon birbirini besleyen iki temel mekanizma olarak görev yapar. Bu patofizyolojik döngü, karaciğer hücre hasarını artırırken aynı zamanda sistemik metabolik dengenin bozulmasına ve insülin direncinin artmasına da zemin hazırlar (30).

2.5. NAFLD’de İnflamatuvar Mekanizmalar

NAFLD, hepatik yağ birikiminin yanı sıra, kronik ve sistemik inflamatuvar süreçlerin de rol oynadığı kompleks bir metabolik hastalıktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, inflamasyonun yalnızca hastalığın bir sonucu değil, aynı zamanda patogenezdaki itici güçlerden biri olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle NAFLD’de inflamatuvar mekanizmalar hem karaciğer dışı (ekstrahepatik) hem de karaciğer içi (intrahepatik) kaynaklardan beslenmektedir. NAFLD’de inflamatuvar süreci besleyen ekstrahepatik kaynakların önemli ölçüde bağırsak-karaciğer eksenini, adipoz doku disfonksiyonu ve metabolik stres üzerinden şekillendiğini bildirilmiştir

Ekstrahepatik düzeyde, bağırsak mikrobiyotasındaki bozulma ve bağırsak geçirgenliğinin artması sonucu lipopolisakkarit (LPS) gibi endotoksinler portal dolaşıma geçer ve bu endotoksinler, karaciğerde TLR4–NF- κ B sinyal yolunu aktive ederek TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini tetikler. Ayrıca adipoz doku disfonksiyonu ve yüksek yağ/fruktoz içeren diyetler, oksidatif stres ve ER stresi aracılığıyla inflamatuvar yanıtı güçlendirir.

İntrahepatik düzeyde, serbest yağ asitlerinin birikimi mitokondriyal disfonksiyon ve reaktif oksijen türleri (ROS) artışına yol açar. Bu durum NF- κ B, JNK ve NLRP3 inflamasyon yollarını aktive eder. Aktivasyon sonucu IL-1 β ve IL-18 gibi sitokinlerin salınımı artar, Kupffer hücreleri ve M1 makrofajları tarafından sürdürülen kronik inflamasyon gelişir. Uzun dönemde bu süreç, TGF- β aracılığıyla stellat hücre aktivasyonu ve fibrozis ile sonuçlanır.

Sonuç olarak, NAFLD’de inflamasyon çok faktörlü bir süreçtir; bağırsak kaynaklı endotoksinler, adipoz doku sinyalleri, oksidatif stres, NF- κ B/JNK/NLRP3 yolları ve bağırsıklık hücre aktivasyonu arasında karmaşık bir etkileşim ağı bulunmaktadır. Bu nedenle inflamatuvar yolların anlaşılması, hastalığın patogenezinin çözülmesi ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (31–33).

2.6. NAFLD’de Bağırsak Mikrobiyotası

Bağırsak mikrobiyotası, enerji metabolizması, bağırsıklık dengesi ve safra asidi düzenlenmesinde kritik rol oynar. Portal dolaşım karaciğeri bağırsaktan gelen besin, metabolit ve mikrobiyal ürünlerle doğrudan temas halinde tutar ancak disbiyozis olarak

adlandırılan mikrobiyal bağırsak dengesinin bozulması bağırsak-karaciğer eksenini üzerinden NAFLD ilerlemesine katkı sağlar.

Bağırsak epitel bütünlüğünün bozulması ve bağırsak geçirgenliğinin artmasıyla bakteriyel kökenli lipopolisakkarit (LPS) gibi endotoksinler portal dolaşıma geçer ve karaciğerde TLR4–NF- κ B yolunu aktive eder. Bu süreç TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflatuvar sitokinlerin salınımını artırarak hepatik inflamasyonu başlatır (34,35).

Ayrıca disbiyozis, kısa zincirli yağ asitleri (asetat, propiyonat, bütirat) ve sekonder safra asitlerinin sentez ve dönüşüm dengesini bozar. Bu değişim, hepatositlerde lipogenez artışı, insülin direnci ve oksidatif stres yoluyla karaciğer metabolizmasını olumsuz etkiler (36).

Sonuç olarak, disbiyozis ile birlikte karaciğer-bağırsak eksenindeki bozulmalar NAFLD'nin hem metabolik hem inflamatuvar bileşenlerini etkiler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, probiyotik ve prebiyotik takviyelerinin bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek NAFLD'nin ilerlemesini yavaşlatabileceğini göstermektedir. Probiyotikler (özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri), bağırsak geçirgenliğini azaltarak endotoksin geçişini engeller ve inflamatuvar sitokin üretimini baskılar ve prebiyotikler ise yararlı bakterilerin çoğalmasını teşvik ederek kısa zincirli yağ asidi üretimini artırır; bu da lipid metabolizmasını düzenler ve karaciğerde yağ birikimini azaltır (37–40).

Bu nedenle mikrobiyotayı hedefleyen probiyotik ve prebiyotik yaklaşımlar, NAFLD'nin önlenmesi ve destekleyici tedavisi açısından umut verici stratejiler arasında değerlendirilmektedir.

2.7. Sirkadiyen ritim ve NAFLD

Organizmanın yaklaşık 24 saatlik döngüler boyunca daha çok ışığa duyarlı olarak düzenlediği metabolik, hormonal ve fizyolojik süreçleri yöneten biyolojik içsel zamanlama sistemi sirkadiyen ritim olarak adlandırılır. Sirkadiyen ritimden en fazla etkilenen organlardan biri olan karaciğer, glikoz metabolizması, lipogenez, safra asidi sentezi ve detoksifikasyon gibi temel işlevlerini büyük ölçüde CLOCK, BMAL1, PER ve CRY gibi saat genlerinin kontrolünde yürütür. Bu genlerdeki ritmik bozulmalar, hepatik metabolizmanın bütünlüğünü zayıflatarak yağ birikimi ve oksidatif stres gibi patolojik süreçleri tetikleyebilir (41,42).

Gece yapay ışığa maruz kalma, gece vardiyasında çalışma, sosyal jet lag, düzensiz uyku-uyanıklık döngüleri ve tutarsız yeme düzenleri gibi faktörlerle işaretlenen yaşam tarzları, sirkadiyen saatin doğal ritmini bozarak "sirkadiyen uyumsuzluğa" yol açar.

Sirkadiyen uyumsuzluğun obezite, NAFLD ve NASH dahil olmak küresel sağlık sorunlarına katkıda bulunduğu düşünölmektedir (42).

Sirkadiyen ritim bozukluğu, NAFLD patogeneğinde önemli bir bileşen olan bağırsak-karaciğer eksenini de etkiler. Bu durum bağırsak mikrobiyotasının mikrobiyal çeşitliliğı azaltır, bağırsak geçirgenliğini artır ve endotoksin (LPS) geçişini kolaylaştırmaktadır. Portal dolaşıma taşınan LPS, karaciğerde TLR4–NF-κB aracılı inflamatuvar yanıtı tetikleyerek hepatik hasarın ilerlemesine katkı sağlamaktadır (43).

Sonuç olarak, sirkadiyen ritmin bozulması NAFLD'nin hem metabolik hem de inflamatuvar bileşenlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle sirkadiyen ritmi destekleyen yaşam tarzı müdahaleleri örneğın; düzenli uyku, ışık maruziyeti yönetimi, zaman kısıtlı beslenme NAFLD'nin önlenmesi ve yönetimi için tamamlayıcı etkili bir yaklaşım olarak değeriendirilmektedir (41,44).

2.8. NAFLD ve Obezite İlişkisi

Obezite tablosunun karaciğer steatozuyla güçlü bir şekilde alakası olduğu düşünölse de, aşırı vücut yağ birikimi NAFLD gelişimi için olmazsa olmaz bir durum değildir. Aslında, lipodistrofi patogenezis için anahtar faktördür. Bu hastalarda belirgin insülin direnci vardır ve genellikle karaciğer steatozisi ve T2DM gelişir, bu da vücut yağ kitlesinin kendisinin tek başına NAFLD' nin patogeneğinde önemli olmadığını, güçlü bir şekilde önermektedir (45,46).

Yapılan geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarda, NAFLD'nın sıklıkla çeşitli metabolik bozukluklarla birlikte seyrettiğı gösterilmiştir. Bu bağlamda, NAFLD tanısı konan bireylerde obezite prevalansı %51.34, tip 2 diyabet %22.51, hiperlipidemi %69.16, hipertansiyon %39.34 ve metabolik sendrom %42.54 olarak bildirilmiştir. Bu oranlar, NAFLD'nin yalnızca hepatik bir hastalık olmadığını, aynı zamanda metabolik hastalıkların bir parçası veya sonucu olarak gelişebileceğini göstermektedir. Obezite ve insülin direncinin NAFLD'nin patogeneğine olan en önemli etkisinin, lipid metabolizmasında bozulma ve kronik iltihaplanmaya yol açması olduğu, bu durumun da NAFL 'nin NASH'e ve hatta siroza, HK' ya ve ölüme ilerlemesine neden olduğu yönündedir. Veriler, biyopsi yapılmış NAFL hastaları arasında NASH'in küresel prevalansının %59.1 olduğunu göstermektedir (20).

NAFLD, insülin direnci ile ilişkili beş özelliğın (T2DM, hipertrigliseridemi, plazma yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyinde azalma, artmış bel çevresi ve

yüksek kan basıncı) herhangi üçünün varlığı ile tanımlanan Metabolik Sendrom (MS) ile yakından ilişkilidir (47,48).

2.9. NAFLD'den NASH ve Siroza: Patofizyolojik Süreç ve Klinik İlerlemenin Mekanizmaları

Steatoz, bir hücre veya organ içinde lipit birikiminin anormal şekilde artmasıyla karakterize edilen bir durumdur. Hepatik steatoz terimi ise esas olarak hepatositlerin sitoplazmasında triaçilgliserol (TAG) formunda olan aşırı yağ birikimini temsil eder. Yağlar TAG şeklinde depolanır. TAG'lar yüksek enerji yoğunlukları (9 kcal/g) ve kimyasal olarak durağan yapıları sayesinde, organizma tarafından enerji depolamak için en uygun moleküllerden biridir. Birçok tür karaciğeri yağ deposu olarak kullansa da insanlar diğer türlerin aksine karaciğerlerini bir yağ depo organı gibi kullanmazlar. İnsanlarda karaciğerde TAG'ların birikmesi enerji alımı ile harcaması arasındaki dengenin bozulduğu durumlarda ortaya çıkar (49).

NAFLD; NAFL ve NASH olmak üzere kendi içinde iki ayrı tabloya ayrılmaktadır. Karaciğerde basit steatoz ile karakterize edilen tüm vakalar NAFL olarak tanımlanır ve hücre hasarının olmadığı, lobüler inflamasyonun ise az veya hiç olmadığı evresini kapsar (50).

NASH, NAFL'nin daha ilerleyici bir formudur ve yaygın steatoz, hepatoselüler balonlaşma, lobüler yangı ve neredeyse her zaman fibrozis ile karakterizedir (15). NASH, yangı ve hepatosit hasarı ile seyreden daha ciddi bir süreç olarak tanımlanır. Tipik olarak, NASH, siroza ilerleyebilecek fibrozis ile birlikte görülür ve bu süreç HK ile sonuçlanabilir (16).

Fibrozis, bir doku ya da organdaki yoğun patolojik bağ dokusu artışıdır ve patogenezinde birçok kompleks mekanizma söz konusudur. Karaciğer fibrozisi devamlılığı halinde siroz ve dolayısıyla HK tablosuna dönüşme riski bakımından önem arz etmektedir (50). Karaciğerde fibrozisin, NASH hastalarında gerçekleşme oranı %40-50 ve NASH'ın NAFLD'li insanlardaki oranı ise %30-40 olarak tahmin edilmektedir (3). NASH'deki fibrozisin ilerleyişinde karaciğer hasarı sonrası stellate hücreler tarafından salgılanan tip1 kollagen ve dolayısıyla skar dokusu oluşumu ve bu bağlamdaki devamlılığın olduğu düşünülmektedir (51). NASH'ın karaciğerdeki fibrozisin derecesiyle ilişkili olarak karaciğere bağlı mortalite riskini 5-10 kat artırdığı bildirilmiştir (52).

Siroz, karaciğerdeki hasarın devamlılığıyla gelişen, neredeyse geri dönüşsüz ve karaciğer fonksiyonlarında belirgin bozulmalara yol açan kronik ve ilerleyici bir

hastalıktır. Temel sebebi karaciğerdeki kronik fibrozistir. Bu süreçte, sağlıklı karaciğer dokusu yerini zamanla fibröz skar dokusuna bırakmakta ve organın normal fizyolojik işlevlerini önemli ölçüde engellemektedir (53). Karaciğerdeki hasara karşı koymak için devreye giren rejenerasyon-reperasyon sistemi lipotoksik hepatositlere baskın gelemeyince etkili onarım gerçekleşemez. Hasardaki anormal artış ve onarım sistemindeki bozukluklar hatalı onarımlara ve dolayısıyla karaciğerde anormal fibröz doku birikimine yani siroza komplike olur. NASH, erken müdahale edilmezse siroza dönüşebilir (54).

HK, dünya genelinde en sık görülen malign neoplazilerden biri olup, önemli bir küresel sağlık sorunu olarak öne çıkmaktadır. Her ne kadar viral hepatit enfeksiyonları ve kronik alkol tüketimi HK gelişiminde geleneksel risk faktörleri arasında kabul görmeye devam etse de, son yıllarda NAFLD bu kanserin giderek artan başlıca etiyolojik nedenlerinden biri haline gelmiştir (55).

2.10. NAFLD Risk Faktörleri

NAFLD'nin en yaygın risk faktörleri arasında obezite, Tip 2 diyabet, dislipidemi, sedanter yaşam ve genetik yatkınlık yer almaktadır (16). Obezitenin NAFLD risk faktörü olması bağlamında; 21 çalışmanın meta analizinin yapıldığı bir araştırmada obez bireylerin NAFLD geliştirme riskinin üç buçuk kat fazla olduğunu ve vücut kitle indeksi ile arasında açık bir doz bağımlı ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (56).

T2DM hastalarında genellikle insülin direnci görülmekte olup, bu bireyler sıklıkla obezite, dislipidemi ve yükselmiş karaciğer enzim düzeyleri ile karakterizedir. Ayrıca, vücut kitle indeksinden bağımsız olarak hepatik yağ birikimi eğilimleri bulunmaktadır. Nitekim T2DM' un NAFLD'nın şiddeti, NASH'e ilerleme, ileri fibrozis ve HK gelişimi ile yakından ilişkili olduğu da bildirilmiştir (57,58).

Sedanter yaşam tarzının, bağırsak mikrobiyotası bozukluğu, aşırı yağlanma, T2DM, insülin direnci gibi faktörleri beraberinde barındırdığı bilinmektedir. Bağırsak mikrobiyotasında ki dengesizlik, artmış insülin direnci, sistemik inflamasyon, obezite ve T2DM; NAFLD ile sonuçlanabilir. Sedanter yaşam tarzı ve kötü beslenme alışkanlıklarının değiştirilmesinin NAFLD tedavisi için önemli bir rol oynadığı klinik kanıtlar ile desteklenmektedir (59,60).

NASH gelişimiyle ilişkilendirilen çeşitli genetik risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en iyi araştırılanı, hepatositlerdeki lipit damlacıklarının lipolizini etkileyen PNPLA3 genindeki tek nükleotid polimorfizmidir. Bu genin I148M varyantı,

proteazomal yıkıma karşı dirençli olup lipid damlacıklarında birikerek lipolizin işleyişini olumsuz etkiler. Dikkat çekici olarak, bu varyantın neden olduğu NASH riski, obezite varlığında belirgin şekilde artmakta, bu da genetik yatkınlık ile çevresel faktörlerin etkileşimini vurgulamaktadır (61–63).

2.11. NAFLD’de Klinik Özellikler

NAFLD, genellikle belirgin bir belirti göstermeden ilerleyen sessiz bir hastalıktır. Obezite, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet gibi bazı sağlık durumları gelişme riskini önemli ölçüde artırmaktadır.

NAFLD hastalarının büyük bir kısmı asemptomatik olmakla birlikte genellikle başka nedenler için yapılan tıbbi değerlendirmeler sırasında keşfedilir. Bazı bireylerde halsizlik, sağ üst kadranda rahatsızlık hissi, karaciğer büyümesi (hepatomegali), akantosis nigrikans ve ciltte lipom benzeri oluşumlar gibi semptomlar gözlemlenebilmektedir (64).

Tip 2 diyabetli bireyler üzerinde yürütülen bir çalışmada, NAFLD tanısı konulan hastalarda, NAFLD olmayanlara kıyasla periferik vasküler hastalık, koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalıkların daha yaygın olduğu belirlenmiştir (65).

NAFLD’li bireylerde laboratuvar bulgularında sıklıkla ALT ve AST enzim düzeylerinde hafif–orta derecede artış görülebilir; ancak bu enzimler normal sınırlarda da olabilir. ALT AST’ye göre çoğunlukla daha yüksektir ancak fibrozis ilerledikçe AST/ALT oranı artış eğilimi gösterebilir. GGT’de sıklıkla yükselir ve yükselmesi daha yüksek fibrozis riski ile ilişkilendirilmiştir (7,66). Patogeneizde insülin direncinin katkısından dolayı açlık glikozu ve HbA1c değerlerinde artış ve triaçilgliserol yüksekliği ile HDL düşüklüğü gibi dislipidemik bir profil de sık karşılaşılan biyokimyasal bulgulardır. İleri evrelerde trombosit sayısında azalma ve INR’de uzama gibi fibrozis göstergeleri de ortaya çıkabilir (67).

2.12. NAFLD’de Tanı Yöntemleri

NAFLD tanısında, klinisyenler hastanın ayrıntılı tıbbi öyküsünü alır, fiziki muayene yapar ve çeşitli laboratuvar ile görüntüleme testlerinden yararlanır. NAFLD’nin tanısı; karaciğerde yağ birikiminin diğer olası nedenlerinin ekarte edilmesiyle konur. NAFLD ile NASH arasındaki ayrımın yapılabilmesi amacıyla genellikle kan testleri, ultrasonografi, manyetik rezonans elastografi (MR) gibi görüntüleme yöntemleri ve gerektiğinde karaciğer biyopsisi uygulanır. Karaciğer biyopsisi, inflamasyon ve fibrozis düzeyini değerlendirerek NASH tanısında önemli bir yöntemdir (2).

NAFLD tanısında laboratuvar testleri, hastalığın seyrine ilişkin önemli ipuçları sunar. Serum aminotransferaz düzeyleri (AST ve ALT) genellikle hafif-orta derecede artış gösterebilir; ancak bu değerler spesifik değildir ve normal sınırlarda da olabilir. ALT düzeyleri genellikle AST'ye göre daha yüksektir ve NASH'ta basit steatoza kıyasla daha belirgin artış gösterir. Bununla birlikte, yüksek ferritin ve transferrin doygunluğu da NAFLD'lı bireylerde sık gözlemlenen bulgular arasındadır. Alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri normal üst sınırın birkaç katına kadar çıkabilirken, ilerlemiş hastalık durumlarında albümin, bilirubin ve pıhtılaşma parametreleri gibi diğer biyokimyasal göstergeler de tanı sürecinde yol gösterici olabilir. Özellikle siroz gelişen olgularda, uzamış protrombin zamanı, trombositopeni ve nötropeni gibi hematolojik değişiklikler görülebilir (66,68).

Karaciğer yağlanması; ultrason, bilgisayarlı tomografi (BT) ve MR yöntemleriyle noninvaziv biçimde değerlendirilebilir. Ultrason ve BT, karaciğerin en az %20'si yağlandığında güvenilir sonuç verirken, MR %5 oranındaki yağlanmayı saptayabilir fakat maliyeti daha yüksektir. NAFLD tanısı görüntüleme ile konulabilse de, steatoz, hepatositlerde balonumsu dejenerasyon, lobüler inflamasyon ve fibrozisi kapsayan NASH tanısı için halen karaciğer biyopsisi altın standarttır. Serum ALT düzeyleri düşük duyarlılığa sahip olmakla birlikte, NASH tanısında hâlen yaygın olarak kullanılmaktadır. Geliştirilmekte olan biyobelirteçler ve görüntüleme teknikleri bu alanda umut vadederken; FIB-4 skoru ve elastografi gibi yöntemler ileri fibrozisi belirlemede yüksek negatif prediktif değere sahiptir (16).

NAFLD'de karaciğer fibrozisinin noninvaziv olarak değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri Geçici Elastografi (FibroScan)'dir. Bu yöntem düşük frekanslı titreşimler ile karaciğer dokusunda oluşturulan elastik dalgaların yayılım hızını ölçerek karaciğer sertliğini kilopaskal (kPa) cinsinden hesaplar. Karaciğer dokusunun sertliğindeki artış, fibrozis derecesi ile yakın ilişkilidir ve özellikle ileri fibrozisi (F3-F4) dışlamada yüksek negatif prediktif değer sunar. Ayrıca fibroScan cihazı, fibrozis ölçümünün yanı sıra karaciğer yağlanmasını kantitatif olarak değerlendirmeye de imkân tanır böylece ultrasonografiye kıyasla hafif ve orta düzey steatozu saptamada daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Noninvaziv olması, uygulanmasının hızlı ve kolay olması, yüksek tekrarlanabilirlik sunması ve hastalığın izleminde biyopsiye pratik bir alternatif oluşturması fibroscanı avantajlı kılar (69). Fakat bununla birlikte, obezite, inflamasyon, karaciğer konjesyonu gibi faktörler ölçüm sonuçlarında sapmalara neden

olabileceğinden, değerlendirmenin klinik bulgular ve diğer testlerle birlikte yorumlanması gereklidir (70).

2.13. NAFLD Tedavisi

NAFLD ve ilişkili hastalıkların tedavisi genellikle birden fazla basamaklı bir yaklaşımla gerçekleştirilir. Bu süreçte yaşam tarzı değişiklikleri, kilo kaybı (konservatif ve cerrahi) ve ilaç tedavisini içeren çok yönlü müdahale stratejileri ön plandadır (68).

NAFLD tedavisinde hekimler genellikle sağlıklı bir diyet kilo kaybını önermektedir; çünkü sağlıklı bir diyet ve kilo kaybı, karaciğerdeki yağ birikimini, inflamasyonu ve fibrozisi azaltmada etkili olabilir. Ayrıca günümüzde tedavi için onaylanmış spesifik bir farmakolojik tedavi bulunmamaktadır (68).

NASH tedavisinde ilaç kombinasyonları genellikle ampirik olarak belirlenmekte ve metabolik etkili ajanlarla antiinflamatuvar veya antifibrotik bileşiklerin birleştirilmesi hedeflenmektedir. Ancak, hastalığın patogeneze dair yeterli terapötik bilgi birikimi henüz oluşmamıştır. Bu nedenle, olabildiğince fazla patojenik mekanizmayı aynı tedavi stratejisinde hedefleme eğilimi vardır. Hayvan modellerinde umut verici sonuçlar elde edilse de, tüm hastaların aynı histolojik bulgulara rağmen benzer patogeneze süreçlerine sahip olduğu varsayımı, kişiselleştirilmiş tedavi uygulamalarını kısıtlamaktadır. Günümüzde bireye özgü NASH tedavileri hâlen klinik olarak uygulanabilir değildir (16).

2.14. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, hidrojen ve karbon atomlarından oluşan uzun bir hidrokarbon zinciri ile terminalde yer alan bir karboksil grubundan ($-COOH$) meydana gelen organik bileşiklerdir. Serbest formda bulunabildikleri gibi triaçilgliseroller, fosfolipitler ve kompleks lipidlerin yapısında da bulunabilirler. Bu lipidler ve yağ asidi bileşenleri doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve triaçilgliseroller, dolayısıyla yağ asitleri, insanlarda diyet yağına ana katkıda bulunan bileşenlerdir. Sağlıklı bir insanda, diyetle tüketilen yağ asitlerinin çoğu (%95'ten fazlası) sindirim ve emilim süreçleriyle kan dolaşımına ulaşır. Bunun yanı sıra yağ asitleri ayrıca insan vücudunda, glikoz gibi lipid olmayan öncüllerden veya diğer yağ asitlerinden de sentezlenebilir. Fakat diyetle alınması zorunlu olan esansiyel yağ asitleri (linoleik asit ve α -linolenik asit) insan vücudunda sentezlenemez. Yağ asitlerinin insan vücudunda enerji kaynağı olarak kullanılma, hücre zarı yapısında bulunma, ısı yalıtımı ve koruma, vitamin emiliminde rol oynama gibi birçok işlevi vardır (71,72).

Yağ asitleri; karbon zincir sayısı ve doymuşluk derecesine göre çeşitli sınıflara ayrılır. Karbon zincir uzunluğuna göre kısa zincirli (<6 karbon), orta zincirli (6-12 karbon), uzun zincirli (13-21 karbon), çok uzun zincirli yağ asitleri (>21 karbon) şeklinde sınıflandırılır. Doymuşluk derecesine göre doymuş yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri şeklinde sınıflandırılır. Doymuş yağ asitlerine örnek olarak palmitik asit, stearik asit verilebilir. Doymuş yağ asitleri hiç çift bağ içermez. Oleik asit tekli doymamış yağ asididir bir çift bağ içerir. Linoleik asit, araşidonik asit çoklu doymamış yağ asididir, birden fazla çift bağ içerir.

Doğada bitkilerde, hayvan dokularında, mikroorganizmalar ve deniz canlılarında birçok yağ asidi bulunur (72). İnsan vücudunda genel olarak 20-30 farklı türde yağ asiti bulunmaktadır. Bunlardan 8-12 tanesi beslenme açısından önemlidir. İnsan serumunda ve plazmasında yağ asitleri, serbest (non-esterified) veya esterlenmiş formda bulunurlar. Dolaşımda albümin aracılığıyla taşınırlar. Plazmada en yaygın bulunan yağ asitleri şunlardır:

- Oleik asit (C18:1, n-9) – En bol bulunan tekli doymamış yağ asididir.
- Palmitik asit (C16:0) – En yaygın doymuş yağ asididir.
- Linoleik asit (C18:2, n-6) – En bol bulunan çoklu doymamış (omega-6) yağ asididir.
- Stearik asit (C18:0) – Doymuş yağ asidi olarak serumda önemli miktarda bulunur.
- Palmitoleik asit (C16:1, n-7) – Serumda orta düzeyde bulunan bir MUFA (Tekli Doymamış Yağ Asidi) 'dır.
- Araşidonik asit (C20:4, n-6) – Hücre zarlarında ve inflamatuvar yanıt süreçlerinde rol oynayan PUFA (Çoklu Doymamış Yağ Asidi)'dır.
- Eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5, n-3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, C22:6, n-3) – Omega-3 yağ asitleri olarak düşük miktarda bulunur ancak fizyolojik etkileri büyüktür (71,72).

Bu yağ asitlerinin plazma ve serumdaki miktarları; beslenme, metabolik durum, yaş ve hastalık gibi faktörlerden etkilenebilir.

2.15. Yağ Asitleri ve NAFLD

NAFLD hem kanda hem de karaciğer dokusunda lipit türlerinin önemli ölçüde artmasıyla karakterizedir. Lipit dengesinin bozulması kolesterol esterleri, TAG,

diaçilgliserol ve sfingomiyelinlerdeki değışikliklerden oluşur (73). Karaciğerde yağ birikimine neden olan üç yol vardır: adipoz dokudan lipoliz ile YA akışı, DNL ve diyet ile yağ alımı. NAFLD'de hem serum hem karaciğer dokuda aşırı yağ asidi birikimi olduğu bilinmektedir, normal fizyolojik şartlarda karaciğere gelen yağ asitleri enerji üretimi için okside edilir veya TAG'a dönüştürülerek lipoproteinlerle dolaşıma verilir. Ancak NAFLD'de bu mekanizmalarda aksaklıklar olur ve bunun sonucunda aşırı lipit birikimi olur (9,30).

Yağ asitleri, çoğu lipit sınıfını oluşturan ve özelliklerini belirleyen temel bileşenlerdir. Önceki lipidomik çalışmalar, NAFLD hastalarında karaciğerin yağ asidi profilinde; özellikle palmitik asit, palmitoleik asit ve oleik asit gibi doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin artışı ile karakterize belirgin değışiklikler olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşın, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin (örneğin araşidonik asit, EPA ve DHA) düzeylerinde azalma ve n-6/n-3 oranında artış gibi, PUFA bileşiminde de bozulmalar bildirilmiştir (73–75).

Ek olarak NAFLD hastalarındaki plazma yağ asidi düzeyleri çeşitli lipidomik çalışmalarda değerlendirilmiştir (76–78). 2017' de Feng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NAFLD'de incelenen tüm serbest yağ asitleri tiplerinin serum konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu ve zayıf veya kilolu NAFLD hastalarında toplam serbest yağ asitleri arasında önemli bir fark olmadığı belirtilmiştir (77). Ayrıca, aynı çalışmada NAFL hastalarının yalnızca en yüksek serum YA miktarlarını değil, aynı zamanda sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, oleik asit sergilediği ortaya koyulmuştur. Bu yükseklik zayıf NAFLD hastalarında da görülmüştür (77).

2.16. Albümin ve NAFLD

Albümin karaciğerde sentezlenen 66,5 kDa molekül ağırlığına sahip ve 585 aminoasitten oluşan bir proteindir. Yüksek çözünürlüklü X-ışını kristalografisi yapıları, albüminde üç baskın alan göstermektedir ve bunlar genellikle alan I, alan II ve alan III olarak numaralandırılmaktadırlar. Her alan a ve b olmak üzere iki alt alana ayrılır (79,80).

Albüminin moleküllerin taşınması, onkotik basıncın korunması, antioksidan savunma, antiinflamatuvar etki ve endotelial stabilizasyon gibi önemli işlevleri vardır. Ayrıca ilaçlar, hormonlar, bilirubin, metal iyonları (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+), endotoksinler ve yağ asitleri gibi pek çok endojen ve eksojen molekül albümine reversibl veya kovalent olarak bağlanarak taşır. Bu nedenle albüminin bağlanma fonksiyonu,

dolaşımdaki moleküllerin biyoyararlanımını, metabolik dönüşümünü ve dokulara dağılımını etkilemektedir (79,80).

Albüminin en bilinen iki majör bağlanma bölgesi Sudlow Bölgesi I (site I) ve Sudlow Bölgesi II (site II) olarak adlandırılır. Albüminin IIA bölgesinde yer alan site I özellikle warfarin gibi aromatik karboksilik ilaçları bağlar, III A bölgesinde bulunan site II ise benzodiazepinler, ibuprofen gibi hidrofobik ilaçlara yüksek afinite gösterir. Bu iki majör bölgeye ek olarak albüminin yüzeyinde ve hidrofobik iç çukurlarında çok sayıda minör bağlanma bölgesi tanımlanmıştır (79–81).

Yağ asitlerini bağlama fonksiyonu bulunan albümin molekülü yedi adet yağ asidi bağlama bölgesine sahiptir. Bu bölgelerden üçü yüksek afinite (FA1, FA2, FA3) geri kalan dört bölge ise orta–düşük afinite göstermektedir. Albüminin yağ asitlerini bağlama mekanizması, dolaşımdaki serbest yağ asidi konsantrasyonlarını tamponlama, taşınabilir formda tutma ve hedef dokulara kontrollü iletiminin sağlaması açısından önemlidir (79,81).

NAFLD hastalarında biriken yağ moleküllerinin ana kaynağı yağ dokudur. Patagoneze bakıldığında insülin direnci hastalıkta önemli yer tutar. İnsülin direncinden dolayı inhibe edilemeyen lipoliz sonucu kanda serbest yağ asidi düzeyi artar. Artan yağ asitlerinin birçoğu özellikle orta ve uzun zincirli yağ asitleri kanda albümine bağlı olarak taşındığından, albüminin yağ asidi bağlama kapasitesi hepatik yağ yükünün belirlenmesinde önemli rol oynayabilir. Albüminin bu taşıma fonksiyonundaki değişimler, hepatositlere ulaşan yağ asidi miktarını etkileyerek karaciğer yağlanmasını ve lipotoksisteyi artırabilir (10).

Serum albümin değeri kanser, iskemi, romatoid artrit, glisemik kontrolün izlenmesi gereken hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığın değerli bir biyobelirtecidir, ayrıca hipovolemi, şok, yanıklar, kanama, hemodiyaliz, akut karaciğer yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı, hipoalbüminemi, beslenme desteği dahil olmak üzere bir çok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır (79). Karaciğer çalışma fonksiyonunu gösteren bir belirteç olmasından kaynaklı karaciğer yetmezliği ve hasarında albümin seviyeleri düşmektedir. Karaciğer yağlanmasının ileri evrelerinde albümin seviyesinde düşüşler görülmektedir fakat bu düşüş hastalığın ilk aşamalarında gözlenmeyebilir (10). Albümin dahil olmak üzere karaciğer fonksiyonunu gösteren diğer göstergeler anormal hale geldiğinde karaciğer fibrozu zaten meydana gelmiştir. Bu nedenle sadece albümin düzeyine bakarak karaciğer hasarını erken dönemde tespit etmek

mümkün değildir. Bu durum, NAFLD’de erken tanı için fonksiyonel belirteçlere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Albümin bağlama kapasitesi (ABiC), albüminin dansilsarkosine (DS) site II'ye özgü bağlanması prensibinden faydalanılarak ölçülebilir. ABiC’ ye ek olarak yapılan çalışmalarda albüminin metal iyonlarını bağlama prensibinden faydalanılarak kobalt bağlama kapasitesi de ölçülmüştür. Karaciğer yetmezliği, siroz, karaciğer yağlanması durumlarında albüminin kobalt bağlama kapasitesinde ve ABiC’de kontrol gruplarına göre düşüklük olduğu yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur (10). Bunlara ek olarak albüminin yağ asidi bağlama kapasitesi ile ilgili laboratuvar koşullarında glikoz ile inkube ederek ve T2DM hastalarda çalışmalar yapılmıştır ve glikozile albüminin yağ asidi bağlama kapasitesinde düşüklük olduğu bulunmuştur (11). Albüminin uzun zincirli yağ asidi bağlama yeteneği, elektron paramanyetik rezonans (EPR) teknikleri kullanılarak ölçülebilir (14). NAFLD’li hepatitli, sirozlu hasta gruplarıyla yapılmış bir çalışmada hem NAFLD hem de hepatit hastaları, sağlıklı gönüllülere kıyasla önemli ölçüde azalmış albümin yağ asidi bağlama kapasitesi ve yağ asidi bağlanma afinitesi göstermiştir (13). Bu bulgular, albüminin fonksiyonel özelliklerindeki değişimin karaciğer hastalıklarında erken biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

Kimyasallar: Kloroform (% 99.8, HPLC Grade) Lab-Scan (İrlanda). Kloroform (% 99.8), metanol, asetik asit (% 96) Merck KgaA, Darmstad (Almanya). Etanol, metanol, n-hekzan, toluen Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (Almanya). n-Bütanol, glasial asetik asit Carlo Erba Reagents (Fransa). Hidroklorik asit (% 38), orto-fosforik asit (%85) J. T. Baker (Hollanda). Dietil eter (% 99) Sigma Aldrich (Almanya).

Reaktif ve diğer materyaller: Sodyum hidroksit, sodyum dihidrojen fosfat Merck (Almanya). Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Bakır II sülfat 5-hidrat Sigma-Aldrich (Almanya). 25 TLC Plates 20 X 20 Silica gel 60 Merck (Almanya). Twin Through Chamber CAMAG Scientific Inc. (Wilmington N. C. ABD). Disposable Micropipettes 1 mL Eppendorf (İngiltere) ve Ergoone (Almanya). 2-20 uL Micropipettes BrandTech Scientific, 5-10 mL'lik cam pipet Iso-Lab(Almanya). Inc. 3.0 mL 5.4 mg EDTA içeren tüp BD-Polymouth (İngiltere). Vida kapaklı tüp 10 X 1.5 cm. 20 X 1.5 Vida kapaklı tüp. 1.5 mL. Mikrosantrifüj tüpü IsoLab (Almanya). Azot gazı Habaş (Türkiye).

Makine Teçhizat: Soğutmalı Santrifüj: Hettich Universal 320 R (Almanya). Mikrosantrifüj: Netheler-Hinz GmbH (Almanya). Etüv: Binder (ABD). Su banyosu: PMC series 300 Bath San Diego (Kaliforniya). Su Banyosu: Köttermann Labortechnik (Almanya). Roller Mikser: Medispec (ABD). Spektrofotometre: Shimadzu UV-1800-240V (Japonya). Vorteks: Velp Scientifica (İtalya). Saç Kurutma Makinesi: Premier Prh 03 1200W (Türkiye). pH metre: WTW xylem brand (Almanya).

Programlar: Genetools SynGene. SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Microsoft Office Excel 2007.

3.2. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması

Power analizi sonucunda, I. Tip hata miktarı (alfa) 0.05, alternatif hipotez (H 1) iki yönlü, testin gücü (1-beta) 0.8 ve etki büyüklüğü 1.012 iken bağımsız gruplarda t-testi kullanılarak anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan örneklem büyüklüğü grup bazında en az 17 (toplamda 34) öngörüsüyle 40-60 yaş arası non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan 20 kişi (hasta grubu) ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olmayan 20 kişi (kontrol grubu) kadın ve erkek gönüllü çalışmaya dahil edildi. İlgili hesaplamalar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından

geliştirilen WSPAS: Web- Based Sample Size & Power Analysis Software aracı kullanılarak yapıldı. Çalışmaya dahil edilecek kişi sayısının belirlenmesinin ardından Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 12.10.2022 tarihli 2022/101 nolu kararı ile etik kurul onayı alındı.

Kan numuneleri hasta grubu için Turgut Özal Tıp Merkezi Gastroenteroloji Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesine ve Hepatoloji Polikliniğe başvuran ultrason ve/veya fibroscan yöntemi ile yağlı karaciğer tanısı almış 40-60 yaş arası 20 kişiden (10 erkek 10 kadın) toplandı. Kontrol grubu için 40-60 yaş arası 35 gönüllü sağlıklı kişiye (15 kadın ve 20 erkek) ultrason ve/veya fibroscan yöntemi ile bakılarak karaciğerlerinde yağlanma olmadığına bakıldı. Karaciğer yağlanması tespit edilen 5 kadın 10 erkek kontrol grubuna dahil edilmedi. Çalışmaya katılan non alkolik yağlı karaciğer tanısı alan bireylerin ve kontrol grubundaki bireylerin yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi gibi bazı özellikleri, sigara kullanımı, ilaç kullanımı ve varsa ek hastalıkları kaydedildi. Çalışmaya katılan tüm bireylere gönüllü onam formları okutulup gerekli bilgilendirmeler yapıldı. Her bir katılımcıdan, biyokimyasal ve hormonal analizler için üç adet jel seperatörlü serum tüpüne (sarı kapaklı, pıhtılaştırıcı ve jel içeren vakumlu tüp; örn. BD Vacutainer® SST™, 5 mL) ve HbA1c analizi amacıyla bir adet antikoagülan (EDTA) içeren mor kapaklı tüpe venöz kan örneği alındı. Numuneler hasta grubu için H1, H2, H20, kontrol grubu için K1, K2, K20 şeklinde kodlandı. Çalışmada kan örneklerinin serum kısmı kullanıldı. Tüm kan numuneleri 16.04.2024-24.07.2024 tarihleri arasında toplandı.

3.3. Biyokimyasal Analizler ve Serum Numunelerinin Saklanması

Hasta ve kontrol gruplarının numune toplama işlemi tamamlanınca, jelli biyokimya tüpleri oda sıcaklığında yaklaşık 20–30 dakika bekletilerek kanın pıhtılaşması sağlandı. Pıhtı oluşumunun ardından tüpler 3.000 rpm’de 10 dakika (Hettich/Almanya) santrifüj edilerek, üstte ayrıışan serum fazı dikkatlice ayrıldı. Ölçümü yapılacak parametreler İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Biyokimya Merkez Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışıldı.

- hs-CRP düzeyleri Mikrobiyoloji Laboratuvarında nefelometrik yöntemle, Siemens marka Dade Behring BN-II model cihazda,
- ALT, AST, GGT, kan glikozu, bilirubin, albümin, HDL, LDL, trigliserit düzeyleri Biyokimya Merkez Laboratuvarında
- İnsülin düzeyi Biyokimya Merkez Laboratuvarında
- HbA1c düzeyi Merkez Laboratuvarında ölçüldü.

Yukarıdaki biyokimyasal parametreler çalışıldıktan sonra kalan serum numuneleri çalışma gününe kadar 500 µL'lik kısımlara bölünerek -80°C'de saklandı. Yağ asidi analizleri ve ince tabaka kromatografisi analizlerinin saklandığı tüplere antioksidan olarak %1'lik 100 mL BHT (2,6-di-terciyer-bütıl-4-hidroksitoluen) (%99 saflıkta Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisi eklendi ve azot gazı altında uçuruldu. Floresan ölçümde çalışılacak numunelere BHT eklenmedi.

3.4. Serumdan Albümin Seperasyonu

Serumdan albümin seperasyonu için literatürde kullanılan birçok metot vardır. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz; amonyum sülfat (AS) presipitasyonu, ısı-şok yöntemi, etanol ile plazma fraksiyonlama, kromatografik metotlar (kolon, affinite), aseton/trikloroasetik asit presipitasyonu (82–84). Bu çalışmada serumdan albümin seperasyonu için amonyum sülfat prensibine dayanan iki farklı metot; iki aşamalı amonyum sülfat presipitasyonu (AS2) ve dört aşamalı amonyum sülfat presipitasyonu (AS4) ve affinite kromatografisine dayanan kit yöntemi karşılaştırıldı. AS2 metodunun deneylerde kullanılmasına karar verildi.

3.4.1. Amonyum Sülfat Presipitasyonu

Amonyum sülfat presipitasyonu, proteinlerin suda çözünürlüklerini azaltarak çökeltilmesini sağlayan klasik bir fraksiyonlama yöntemidir. Bu yöntemin temelinde, çözeltideki tuz konsantrasyonunun artırılmasıyla su moleküllerinin protein yüzeyindeki hidrofilik gruplarla etkileşiminin azalması yatar. Amonyum sülfat gibi yüksek çözünürlüklü tuzlar, çözeltideki serbest su moleküllerini bağlayarak proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri artırır ve bu durum proteinlerin agregasyonuna ve çökmesine neden olur. Her proteinin izoelektrik noktası, yüzey özellikleri ve hidrofobik alanlarının dağılımı farklı olduğundan, çökelme eşiği yani tuz doygunluğuna karşı duyarlılığı da farklılık gösterir. Belirli doygunluk seviyelerinde (örneğin %40, %60, %80) kademeli çöktürme ile belirli protein fraksiyonları ayrılabilir. Özellikle albümin gibi nispeten yüksek çözünürlükte kalan proteinlerin daha düşük doygunluklarda süpernatant olarak kalması sağlanabilirken, globulin benzeri proteinler daha erken çöker (85). Bu yöntem özellikle albümin gibi bol bulunan serum proteinlerinin ön saflaştırılmasında sıkça tercih edilmektedir (86,87). Amonyum sülfat, yüksek çözünürlüğü, proteinleri denatüre etmeden çöktürmesi ve kolay uzaklaştırılabilir olması nedeniyle tercih edilen bir tuzdur. İşlem sonrası çöken protein fraksiyonları santrifüjle ayrılır ve amonyum sülfatin

uzaklaştırılması amacıyla genellikle diyaliz veya ultrafiltrasyon gibi yöntemler kullanılır (88). Bu teknik, biyolojik örneklerde protein konsantrasyonunu artırmak, ön saflaştırma yapmak veya bazı durumlarda inhibitörleri uzaklaştırmak için de kullanılır.

Çözeltilerin Hazırlanması;

Doygun (4.1 M) amonyum sülfat çözeltisinin hazırlanması: 54.1 g AS tartılıp yaklaşık 30-40 mL distile su eklendi. AS katısının çözülmesini sağlayacak şekilde kademeli olarak distile su miktarı artırıldı (89). Son hacim 100 mL'ye tamamlanmadan önce 0.1 M NaOH çözeltisi ile çözelti pH'sı 7.4'e ayarlandı. Çözelti doygun olduğundan altta bir miktar katı madde kalması normaldir. Oda sıcaklığında saklanabilir.

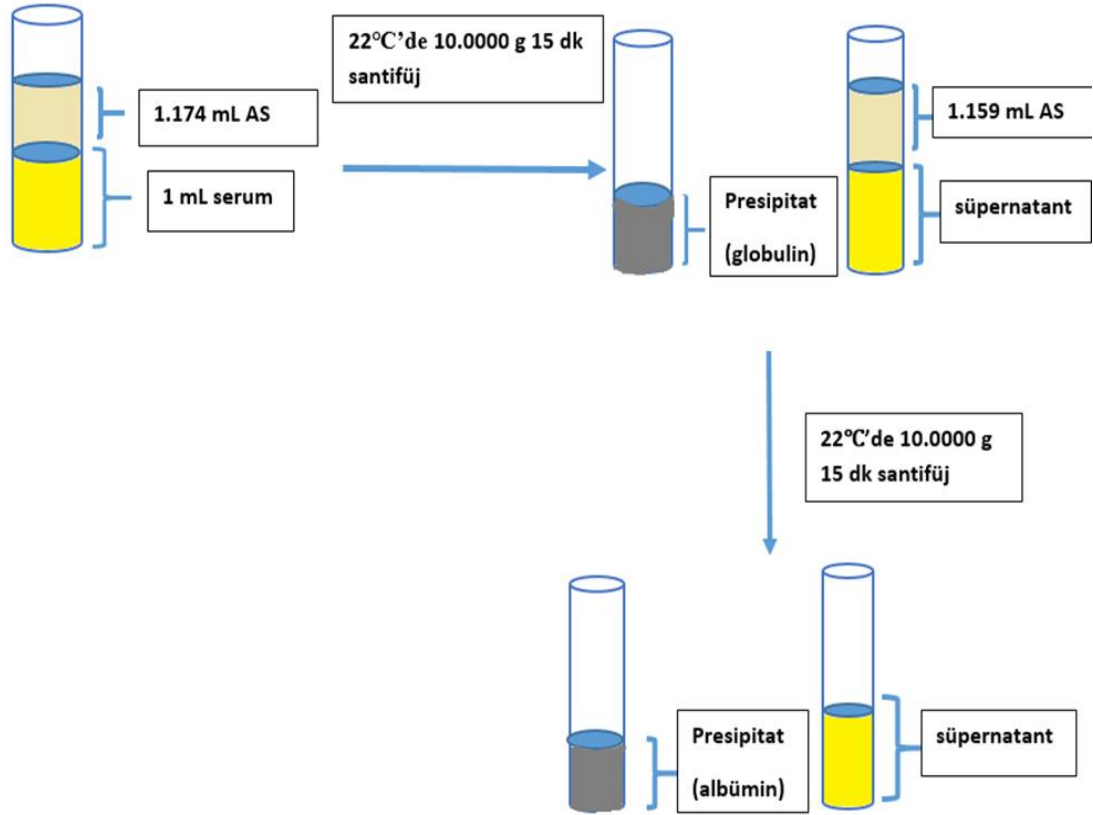
0.1 M 100 mL pH 7.4 sodyum- fosfat tamponunun hazırlanması: Na-fosfat tamponu, sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ve disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tuzlarının uygun oranlarda karıştırılmasıyla hazırlandı. 0.1 M derişimde ve pH 7.4 olacak şekilde 100 mL Na-fosfat tamponu hazırlamak için aşağıdaki adımlar izlendi.

- M NaH_2PO_4 için 1.37 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tartıldı 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı.
- M Na_2HPO_4 için 1.78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartıldı 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı.
- pH 7.4 elde etmek için 61.7 mL 0.1 M Na_2HPO_4 (bazik form) ve 38.3 mL 0.1 M NaH_2PO_4 (asidik form) ölçülerek karıştırıldı.
- Karışımın pH değeri pH metre ile ölçüldü, çoğunlukla pH 7.4'de olduğu gözlemlendi. Gerekirse 0.1 M NaOH veya HCl ile küçük düzeltmeler yapıldı.
- Elde edilen tampon çözeltisi etiketlenerek +4 °C'de saklandı.

20 mM tris pH 9 tamponunun hazırlanması: 0.242 g Tris(hidroksimetil)aminometan tartıldı ve üzerine 30-40 mL distile su eklendi. 1 M HCl ile pH 9'a ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 30 güne kadar +4'de saklandı.

AS2 presipitasyonu: AS2 presipitasyonunda albüminlerin ve globülinlerin farklı AS konsantrasyonunda presipitasyonu prensibinden faydalanılarak seperasyonu sağlandı. Metodun aşamaları Şekil 3.1'de gösterildi (90). 1 mL serum örneğine ilk aşamada 1.174 mL AS eklendi, 10.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. İlk aşamada presipitat kısmında globuinler ayrıldı. Süpernatant kısmına tekrardan 1.159 mL AS ilave edildikten sonra santrifüjleme ile presipitat ve süpernatant ayrıldı. İkinci aşamada presipitat kısmında

albümin serumdan ayrıldı (82,91). Elde edilen albümin ve globülin presipitatları pH 7.4 Na-P tamponunda çözüldü. Presipitatlar SDS-PAGE elektroforezle ayrıldı. Jel elektroforezinde mevcut olan bantların fotodansitometrik analizi gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. AS2 presipitasyon yöntemi akış şeması

AS4 presipitasyonu: AS4 yönteminde katı AS kullanılır. Dört aşamadan oluşmaktadır. Her bir aşamada seruma ve süpernatanta eklenecek katı AS miktarı Tablo 3.1.'de belirtilmiştir. Eklenen katı AS'den sonra her aşamada numuneler 2 saat buz inkübasyonuna bırakıldı ve sonrasında 4°C 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ve presipitat kısımları ayrıldı. %40, %50 AS konsantrasyonlarında presipitat kısmında çoğunlukla globülinler ayrıldı. %70 AS konsantrasyonunda numunede bulunan globülinler ve diğer proteinler önceki aşamalarda presipite edilerek çoğunlukla uzaklaştırıldığı için albüminin daha yoğun bulunduğu bir fraksiyon elde edildi (83). Presipitatlar 20 mM Tris (pH 9) tamponunda çözülerek SDS-PAGE elektroforezle ayrıldı. Jel elektroforezinde mevcut olan bantların spot analizi yapıldı.

Tablo 3.1. 100 ml serumdan albüminin amonyum sülfatla çöktürülmesi

%AS konsantrasyonu	Başlangıç hacmi (ml)	Eklenen AS (g)	Son hacim (ml)
%40	100.00	23	83.30
%50	83.30	4.6	76.50
%60	76.50	4.72	66.40
%70	66.40	4.25	60.00

3.4.2. Cibacron Blue Affinite Kromatografisi (CBAK)

Cibacron Blue affinite kromatografisinde sabit faz, kovalent olarak bağlı Cibacron Blue F3GA boyası içeren çapraz bağlı bir agar jeldir. Albümine yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Daha çok serum numunelerinden albüminin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Ancak kolon kısmında cibacron blue tarafından tutulan albümin daha sonra tekrar elüe edilebilir (92,93). Bu amaçla kullanılan bu kitin kolon başına serum kapasitesi 0.1 ml albümin kapasitesi 5 mg'dır.

Çözeltilerin hazırlanması;

20 mM Fosfat Tamponu (pH 7.0) 100 mL: 15.5 mL 0.1 M Na_2HPO_4 (bazik form), 4.5 mL 0.1 M NaH_2PO_4 (asidik form) ölçülerek karıştırıldı. Karışımın pH'sı pH metre ile ölçüldü pH 7.0'a ayarlandı. Karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Seyreltilmiş serumun hazırlanması: 100 μL serum numunesine 400 μL 20 mM fosfat tamponu eklenerek serum numunesi seyreltilti.

2X Laemli Buffer: Burada kullanılan Laemli buffer kolondan albümini çıkarmak için kullanılacağı için gliserol (yoğunluğu artırıcı), bromofenol mavisi (görsel izleyici) ve β -merkaptoetanol (redükleyici ajan) olarak kullanılmamıştır. Böylece, çözeltinin sadece SDS ile denatürasyon sağlayan ve indirgenmemiş protein örnekleriyle uyumlu bir versiyonu elde edilmiştir. 0.39 g Tris-HCl ve 1 g SDS tartıldı yaklaşık 10 mL distile suda çözüldü. pH, pH metre ile kontrol edilerek gerekirse HCl ile 6.8'e ayarlandı. Çözelti distile su ile 25 mL'ye tamamlandı (94).

Serum numunesinin CBAK kitine uygulanması;

CBAK ile albümin seperasyonu uygulanması sırasında prospektüste belirtildiği gibi sırasıyla aşağıdaki aşamalar takip edildi.

1. Mini kolon 5 mL'lik test tüpüne yerleştirildi. Reçinenin yerleşmesi için 5 dakika beklenildi.
2. Mini kolunun kapağı çıkarıldı ve alt ucundan kırıldı. Tekrar test tüpüne konuldu.

3. Kolonda yerçekimi akışını başlatılması ve kalan tamponun kolondan boşalması için 2 dakika beklenildi.
4. Kalan tampon boşaldıktan sonra, mini kolon 2 x 1 mL 20 Mm fosfat tamponu eklenerek yıkandı.
5. Yıkamadan sonra, kolon 2.0 mL'lik ependorf tüpe yerleştirildi. 10.000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Ependorf tüp atılarak kolon başka bir tüpe alındı.
6. Mini kolona 300 µL seyreltilmiş serum eklendi. 10.000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Ependorf tüpte kalan sıvı kısım albümin içermeyen serum numunesidir. Kolonda tutulan kısımda da albümin bulunmaktadır.
7. Mini kolon başka bir ependorfa alınarak 400 µL 20 Mm fosfat tamponu ile yıkandı. 10.000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Kolon başka bir tüpe konuldu.
8. Kolonda tutulan albümini elde etmek için 500 µL 2X Laemli buffer eklendi. 10.000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ependorfta biriken çözelti içerisinde kolonda tutulan albümin bulunmaktadır. Gerekirse bu aşama iki kez tekrar edilebilir.

3.4.3. Separe Edilen Kısımların Protein Miktar Analizlerinin Hesaplanması

Lowry yöntemi, biyolojik örneklerde toplam protein miktarının kolorimetrik olarak tayin edilmesini sağlayan, oldukça yaygın ve hassas bir analiz yöntemidir (95,96). İlk olarak Oliver H. Lowry ve arkadaşları tarafından 1951 yılında geliştirilmiştir (95). Yöntem, proteinlerdeki peptid bağlarının, alkali ortamda bakır (Cu^{2+}) iyonları ile kompleksleşmesi (Biüret reaksiyonu) ve ardından oluşan bu komplekslerin, Folin–Ciocalteu reaktifi ile etkileşerek mavi renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır (95,97). Bu renk değişimi, protein içeriğiyle doğru orantılıdır ve 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (97).

Yöntem, özellikle tirozin, triptofan ve sistein gibi aromatik amino asit içeriği yüksek proteinler için daha hassas sonuçlar verir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri, bilinen konsantrasyonda hazırlanmış standart bir protein çözeltisi (genellikle sığır serum albümini – BSA) kullanılarak oluşturulan standart eğri üzerinden hesaplanır.

Lowry yöntemi, yüksek duyarlılığı nedeniyle hücre lizatı, doku özütleri veya saflaştırılmış protein fraksiyonları gibi çok çeşitli biyolojik örneklerde protein miktarının tayini için yaygın olarak tercih edilmektedir.

Çözeltilerin hazırlanması;

Alkali bakır reaktifi: 0.5 N 100 mL NaOH hazırlamak için 2 g NaOH tartıldı distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. 10g Na₂CO₃, 0.1 g potasyum tartarat ve 0.05 g CuSO₄ 90 mL 0.5 N NaOH çözeltisinde çözülüp son hacim 100 mL' ye tamamlandı

Fenol ayıracı: 3.75 mL 2.0 N Folin Cioacaltue- Fenol ayıracı 63.75 mL distile suya eklendi.

Protein standartının hazırlanışı: Sığır serum albümini kullanılarak 0.8 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.0 mg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

Lowry protein analizi aşamaları;

1. Standart çözelti ve numuneler kör hariç mikropalakadaki kuyucuklara 50 µL eklendi. Kör için ilk kuyucuğa 50 µL distile su eklendi.

2. Kör, standartlar ve numuneler olmak üzere tüm kuyucuklara 50 µL bakır reaktifi eklendi.

3. 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu sırada ölçüm yapılacak spektrofotometre cihazı (Biotek SYNERGY HTX Multi-mode reader (ABD)) ölçüm için hazırlandı ve 750 nm'ye ayarlandı.

4. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 200 µL fenol reaktifi eklendi ve 55°C etüvde 5 dakika bekletildi. Ardından 40 saniye oda sıcaklığında sıcaklığın düşmesi beklendi. Mikroplaka cihaza konularak okuma işlemi yapıldı.

3.4.4. Sepera Edilen Protein Kısımlarının SDS-PAGE ile Elektroforetik Ayırımı

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi: Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alan etkisiyle sıvı veya yarı katı bir ortamda göç etmesini sağlayan bir ayırma ve analiz yöntemidir. Moleküllerin hareket hızı; elektriksel yüklerine, büyüklüklerine ve içinde bulundukları ortamın özelliklerine bağlıdır. Elektroforez sıklıkla biyolojik örneklerde protein, DNA ve RNA gibi makromoleküllerin ayrıştırılmasında kullanılır. Elektroforez yöntemleri, jel ortamı ve uygulanan koşullara göre farklılık gösterir. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan SDS-PAGE bu yöntemler arasında en çok kullanılanlardan biridir. SDS-PAGE 1970 yılında Laemmli tarafından kurulmasından bu yana dünya çapındaki laboratuvarlarda protein analizi için standart bir araç olarak kullanılmıştır. Bu teknikte proteinler, anyonik bir deterjan olan SDS ile denatüre edilerek ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları bozulur ve

protein molekülleri, uzun zincirli, negatif yüklü kompleksler hâline getirilir. SDS'nin bağlanması sonucu proteinler arasında yük-farklılığı ortadan kalktığı için, jel içerisindeki hareketlilikleri yalnızca moleküler ağırlıklarına bağlı hâle gelir. Poli-akrilamid jel matrisi, gözenekli yapısıyla moleküler ağırlığı farklı proteinleri farklı hızlarda geçirerek boyutlarına göre ayırır; daha küçük proteinler jelde daha hızlı ilerlerken, daha büyük proteinler daha yavaş hareket eder (94,98). Elektroforez sırasında uygulanan elektriksel alan sayesinde proteinler jel boyunca hareket eder ve ayrılan bantlar, boyama işlemiyle görselleştirilerek analiz edilir. Proteinler SDS-PAGE ile ayrıldıktan sonra, Coomassie parlak mavisi ve gümüş boyama gibi bir yöntem kullanılarak boyanırlar. SDS-PAGE protein saflığının kontrolü, moleküler ağırlık tayini ve proteinlerin kantitatif karşılaştırmalarında yaygın olarak kullanılan yüksek çözünürlüklü bir yöntemdir (94).

Çözeltilerin hazırlanması;

1. %30 Akrlamid stok çözeltisinin hazırlanması

14.6 g akrilamid ve 0.4 g bisakrilamid tartılarak 15 mL distile su içerisinde çözüldü ve balon jojede distile su ile son hacmi 50 mL' ye tamamlandı. Çözelti renkli şişede +4°C'de 30 güne kadar saklanabilir.

2. Ayırma jel tamponu(1.5 M TRİS pH 8.8) stok çözeltisinin hazırlanması

9.25 g tris tartıldı ve 15 mL distile su içerisinde çözüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH metre kullanılarak pH 8.8 e ayarlandı. Son hacmi distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3. Yükleme jel tamponu(1M Tris pH 6.8) stok çözeltisinin hazırlanması

6.05 g tris tartıldı ve 15 mL distile su içerisinde çözüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH metre kullanılarak pH 6.8 e ayarlandı. Son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4. %10 SDS stok çözeltisinin hazırlanması

25 g SDS tartılıp 20 mL distile suda çözüldü. Son hacmi distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

5. %10'luk Amonyumpersülfat çözeltisinin hazırlanması

0.1 g amonyum persülfat üzerine 1 mL distile su eklenerek katı madde çözüldü. Çözelti her kullanımdan önce taze hazırlanmalıdır.

6. Tank tamponunun hazırlanması

21.6 g glisin, 4.5 g tris 100 mL distile suda çözüldü ve üzerine 15 mL %10'luk SDS çözeltisi eklendi. Hazırlanan karışım son hacmi 1500 mL olana kadar distile su ile seyreltilti.

7. Boyama çözeltisinin hazırlanması

0.125 g commesie blue 50 mL metanolde çözüldü ve üzerine 10 mL asetik asit eklendi. Hazırlanan karışım distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

8. Yıkama çözeltisinin hazırlanması

70 mL distile su üzerine 5 mL metanol, 7 mL asetik asit eklenir ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

9. Örnek yükleme tamponu

100 uL 1 M tris (ph 6.8)

250 uL gliserol

400 uL %10 SDS

100 uL %1'lik bromfenolblue

40 uL distile su

Karışım hacmi 1 mL' ye tamamlanır. Çözelti renkli şişede oda sıcaklığında saklanabilir.

10. Ayırma ve stoklama jelinin hazırlanması

Ayırma ve stoklama jelinin hazırlanışı Tablo 3.2'de belirtildi.

Tablo 3.2. Ayırma ve stoklama jelinin hazırlanışı

Bileşenler	%10 ayırma jeli (5 mL)	%5 stoklama jeli(2.5mL)
Distile su	2.3 mL	1.7 mL
Akrilamid(%30)	1.65 mL	0.415 mL
SDS(%10)	0.05 mL	0.025 mL
Tris tamponu pH 6.8	-	0.315 mL
Tris tamponu pH 8.8	1.25 mL	-
APS (%10)	0.05 mL	0.025 mL
Temed	0.002 mL	mL

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (sds-page) jelin hazırlanması ve elektroforetik yürütme;

SDS-PAGE analizlerinde kullanılacak jel sisteminin hazırlanmasında Bio-Rad firmasına ait Mini-PROTEAN Tetra System vertikal elektroforez düzeneği, jel döküm aparatı, elektroforez tankı ve PowerPac 3000 model güç kaynağı kullanıldı. Jel hazırlığı ve örnek yükleme aşamaları aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır:

1. Jelinin hazırlanması için kullanılan kalın ve ince cam plakalar vertikal elektroforez sistemine yerleştirildi. Camlar arasında sızdırma olup olmadığı distile su ilave edilerek kontrol edildi.

2. Ayırma ve stoklama jelleri Tablo 3.2’de verildiği ölçülerde hazırlandı. Ayırma ve stoklama jellerine APS ve temed çözeltileri en son eklendi. Ekleme yapıldıktan sonra 30 sn vorteksleme yapılarak karışması sağlandı ve bekletmeden iki cam arasına döküldü.
3. İlk olarak ayırma jeli döküldü ve jelin üst sınırının düzgün olması için üzerine 10 uL izopropanol eklendi.
4. Ayırma jelinin polimerize olması için 10 dakika beklenildi. Polimerizasyon olduktan sonra üst kısımdaki izopropanol uzaklaştırıldı.
5. Stoklama jel çözeltisi hazırlandı ve ayırma jelin üzerine döküldü.
6. 10 kuyulu tarak iki cam arasında jelin şeklini bozmayacak şekilde uygun açı ile yerleştirildi. Polimerize olması için 10 dakika beklendi.
7. Polimerize olan jel tank tamponu içeren kapalı bir sistemde bir gece +4°C’de saklandı.
8. Ertesi gün yükleme yapılacak numune çözeltilerinin protein konsantrasyonları 20 µg olacak şekilde hesaplama yapıldı. Numuneler üzerine örnek yükleme tamponu eklendi ve örnekler yükleme yapılmaya hazır hale getirildi.
9. Bir gece +4°C’de bekletilen poliakrilamid jel alındı ve elektroforez tankına yerleştirildi ve uygun miktarda tank tamponu ilave edildi.
10. 10 kuyulu tarak iki cam arasından çıkarıldı ve kuyucukların örnek yükleme için uygunluğu kontrol edildi. Hazırlanan örnek karışımları kuyulara yüklendi.
11. Tank sistemi kapatıldı ve güç kaynağı ile bağlantısı kuruldu. 120 V 80 mA’de iki saat elektroforetik yürütme gerçekleşti.
12. Örnekler jelin alt ucuna geldiğinde akım durduruldu güç kaynağı ile bağlantı kesildi.
13. Jelin iki cam arasından uygun şekilde temiz bir kaba alınması sağlandı. Jel üzerine hazırlanan boyama çözeltisinden üzerini hafif geçecek kadar eklendi ve 1 gece boyama işlemine tabi tutuldu.
14. Boyama işleminden sonra yıkama çözeltisi eklenerek jel zemininde bulunan boyaların uzaklaşması sağlandı. Jel yıkama çözeltisi ile 3’er saat 3 kez yıkandı. Uygun zeminde jelin fotoğrafları kaydedildi.

3.5. Serum Albümine Bağlanan Lipit Yapıdaki Bileşenlerin İnce Tabaka Kromatografi ile İncelenmesi

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), karışım hâlindeki maddelerin sabit faz (stasyoner faz) ve hareketli faz (mobil faz) arasındaki farklı etkileşimleri temel alınarak ayrılması esasına dayanan bir ayırma ve analiz yöntemidir. Sabit faz olarak genellikle cam, alüminyum ya da plastik levhalar üzerine kaplanmış silika jel, alümina veya selüloz gibi adsorban maddeler kullanılırken hareketli faz ise tek bir çözücü ya da çözücü karışımından oluşan sıvı fazdır (99–101).

Numune, kromatografi plakasının alt kısmına küçük ve ince bir nokta hâlinde uygulanır. Daha sonra plaka, uygun çözücü sistemini içeren ve doygunluğu sağlanmış bir geliştirme haznesine yerleştirilir. Kapiller etkiyle mobil faz yukarı doğru ilerledikçe, numunedeki bileşenler de sabit faz ile mobil faz arasındaki çözünürlük ve adsorpsiyon özelliklerine göre farklı hızlarda taşınır. Bu farklılık, karışımdaki bileşenlerin ayrılmasına neden olur (101). Sabit faz polar, hareketli faz apolar özelliktedir. Dolayısıyla karışımdaki polar maddeler sabit faza tutunacağından daha yavaş hareket ederler. Hareketli faz ise apolar olduğundan apolar maddeler ise daha hızlı hareket ederler.

Ayrılan her bileşiğin kromatogram üzerinde ulaştığı mesafe, çözücünün ulaştığı mesafeye oranlanarak **Rf (retention factor)** değeri hesaplanır. Rf değeri aşağıdaki formül ile ifade edilir:

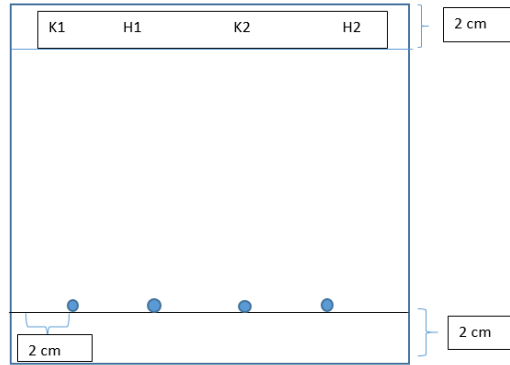
$$Rf = \frac{\text{Maddenin kat ettiği mesafe}}{\text{mobil fazın kat ettiği mesafe}}$$

Rf değerleri, bileşiklerin kimyasal özelliklerini karşılaştırmak ve tanımlamak amacıyla kullanılır. Bu değerler sabit fazın yapısına, çözücü sistemine, sıcaklığa ve diğer deneysel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (101).

Çalışmada kromatografik ayırma işlemi için sabit faz olarak 20×20 cm silika jel G kaplı plakalar kullanıldı. Hareketli faz sistemi ise n-hexan/dietil eter/formik asit (80:20:2; v/v/v) karışımı hazırlandı ve kullanıldı.

İnce tabaka kromatografisi plakalarının analize hazırlanması: Kullanılacak 20×20 cm'lik silikajel İTK plakaları temiz bir eldiven ve makas kullanılarak 20×10 cm boyutuna getirilecek şekilde kesildi. 110 °C' de etüv içine konuldu ve aktive olması için 1 saat bekletildi. Aktive edilen plakalara uygulanacak numunelerin konumları cetvel ve kurşun kalem kullanarak plakaların üstünün temiz kalması sağlanarak belirlendi. Kullanılan her plakanın alt kısmından 2 cm yükseklik işaretlendi. Uygulanacak numuneler arası boşluk her plaka için 2 cm olarak kurşun kalemle işaretlendi. Her plakada numunelerin

uygulanacağı 4 nokta belirlendi. Her bir plakada bir kontrol, bir hasta, bir kontrol, bir hasta olacak şekilde ayarlandı. Şekil 3.2’de İTK plakalarının analize hazırlanması şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. İTK plakasının analize hazırlanması

Numunelerin İTK’ya uygulanmadan önce analize hazırlanması ve uygulanması;
Numuneleri İTK işlemine hazırlamak için aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. 500 μ L serum numunesinin iki aşamalı amonyum sülfat presipitasyonu ile albümin kısmı separe edildi. Ayrılan albümin kısmı pH 7.4 tamponunda çözüldü.
2. Bligh diyer metodu ile albümine bağlı lipit yapıdaki bileşenler ekstrakte edildi. 500 μ l separe edilen albümine 1.87 ml kloroform/metanol (1/2 v/v) eklendi. Karışım 10 dakika vortekslendi. Karışıma 0.62 ml kloroform eklendi ve 1 dakika vortekslendi. 0.62 ml distile su eklendi ve 1 dakika daha vortekslendi. Karışım 4 saat oda ısısında bekletildi. 4 saat sonunda 4000 rpm 10 dk 22°C’de santrifüj edildi. Santrifüjleme sonucunda tüpte 3 faz oluştu. Her numunede alt kloroform fazı alındı.
3. Alınan kloroform gazı azot gazı altında tamamen uçuruldu.
4. Her numuneye 10 μ l kloroform eklendi, vortekslendi ve karışımdan 5 μ L alınarak aktive edilen plakada belirlenen noktalara uygulandı.
5. Daha önceden hazırlanan hareketli faz numuneler plakaya uygulanmadan 40 dakika önce yürütme tankına (Twin Through Chamber) konuldu ve hafif hareketlerle çalkalandı. İçerisine süzgeç kâğıdı konularak tankın çözücü karışımına eşit dağılıp doyması sağlandı.
6. Numuneler uygulandıktan sonra yürütme tankının içerisine tabandan itibaren 0.5 cm’lik kısmı çözücü içinde kalacak şekilde ve dik olarak yerleştirildi.

7. Hareketli faz 18 cm yürüdüğünde plakalar tanktan çıkarıldı ve 20 dakika kurumaya bırakıldı. Plaka üzerindeki çözücü tamamen uçtuğunda boyama işlemine geçildi.

Albümine bağlanan lipit yapıdaki bileşenlerin boyanması;

Boyama çözeltisinin hazırlanışı: %85'lik fosforik asitten 9.4 mL alınıp üzerine 90.6 mL distile su eklendi. 15.6 gr bakır II sülfat-penta hidrat tartıldı ve hazırlanan 100 mL fosforik asit içerisinde çözüldü böylece %10'luk (w/v) bakır II sülfat çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti, renkli bir şişede ışık almayan bir yerde saklandı.

Boyama işlemi: Kurutulan plakalara hazırlanan bakır II sülfat çözeltisi bir sprej şişesine eklenerek plakalar boyandı. Boyama işleminde plakalar, 30 derecelik bir açıyla çeker ocakta düz bir zemin üzerine yerleştirildi. Boya, plakalara dik olacak şekilde ve 45 cm mesafeden yukardan aşağıya doğru inerek ve soldan sağa doğru her yer boyanacak şekilde püskürtüldü. Yürütme işleminin gerçekleştiği alan boyandı ve plaka üzerinde her yönde eşit açık mavi renkte bir görüntü elde edildi. Boyanan plaklar öncesinde 180°C'ye ayarlanan etüve 20 dakika bırakıldı. 20 dakika sonrasında etüvden çıkarıldığında lipit bantların belirginleştiği görüldü.

Lipit bantlarının fotodansitometrik yoğunluk analizi: 500 µL serumdan separe edilen albümin kısmına ait lipit bileşenleri İTK ile ayrıldıktan sonra (SYNGENE Genetools yazılımı) fotodansitometrik olarak yoğunluk/miktar tayini yapıldı. Yöntem bilgisayar ortamına aktarılmış olan görüntü üzerindeki seçilmiş bir noktanın (lipit bantının) koyuluğuna veya açıklığına göre bir sayısal bir değer oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu sayısal değer seçilen lipit bantının yoğunluğuna göre artıp azalmaktadır. İTK ile ayrılıp boyama sonucu görünür hale gelen lipitlerin olduğu plakalar tarayıcı (Canon 5600F) ile tarandı. Taranan plakalar JPEG dosyası formatında bilgisayar ortamına kaydedildi. Kaydedilen görüntülerden plakalar üzerindeki her bir lipit bantının yoğunluk/miktar tayini yapıldı. Analiz Tipi 'Automatic Band Quantification' (Otomatik Bant Yoğunluk/Kantitasyon) olarak seçildi. Background Correction işlemi Automatic (Otomatik Arka plan) olarak seçildi. Böylece miktarı saptanacak her lipit bantına ait alan otomatik olarak seçildi. Seçilen her bir bant için bir bant yoğunluğu değeri (Raw Volume) oluştu. İTK ile ayrılmış olan her bir bireye ait hasta ve kontrol grubu için oluşan lipit bantlarının bant yoğunluğu değerleri kaydedildi. Yine her bir bireye ait lipit bantlarının bant yoğunluğu değerleri toplandı ve toplamdaki her bir bireye ait görünen yedi bandın yüzdeleri hesaplandı.

3.6. 1-Anilino-8-Naftalinsülfonat (Ans) Molekölü ile Albümin Yağ Asidi Bağlama Kapasitesinin Ölçülmesi

Serum albümini, vücutta birçok molekülün taşınmasında rol oynayan, başta yağ asitleri olmak üzere çeşitli lipofilik bileşikler bağlayabilen bir plazma proteindir. Albüminin bu bağlama kapasitesinin değerlendirilmesi, özellikle biyolojik sistemlerdeki taşıma mekanizmalarının ve farmakokinetik davranışların anlaşılması açısından önemlidir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, hidrofobik floresan probu olan ANS ile gerçekleştirilen bağlanma analizidir (12,102).

ANS, sulu ortamda zayıf floresan etki gösteren ancak hidrofobik bölgelerle etkileşime geçtiğinde floresan şiddeti ve emisyon dalga boyu önemli ölçüde değişen bir moleküldür. Albüminin hidrofobik bağlanma bölgelerine ANS bağlandığında, floresan artışı meydana gelir. Bu artış, ANS'nin hidrofobik ortama girmesiyle çevresel polaritenin azalmasından kaynaklanır (11,12). Bu bağlamda ANS, albüminin bağlanma bölgelerinin doluluk derecesini dolaylı yoldan gösterebilen bir gösterge moleküldür (11).

Yöntemin temel prensibi şu şekilde özetlenebilir albümin çözeltisine sabit miktarda ANS eklendi ve daha sonra sistematik olarak farklı yağ asitlerinin farklı konsantrasyonlarda (oleik asit, stearik asit) ilavesiyle ANS'nin albümin bağlanma bölgelerinden yer değiştirmesi floresan spektrofotometrik yöntemle değerlendirildi. Yağ asidi konsantrasyonu arttıkça ANS bağlanma bölgelerinden uzaklaştığı ve floresan şiddetinde azalma olduğu gözlemlendi.

Çözeltilerin hazırlanması;

Bu aşamada hazırlanan bütün çözeltilerde ultra saf su kullanıldı.

0.05 M pH 7.4 sodyum-fosfat tamponun hazırlanması: 61.7 mL 0.1 M Na_2HPO_4 (bazik form) ve 38.3 mL 0.1 M NaH_2PO_4 (asidik form) ölçülerek karıştırıldı ve 0.1 M pH 7.4 tamponu hazırlandı. Hazırlanan stok tampondan 50 mL alınıp 50 mL ultra saf su ile seyreltilmesi ile 0.05 M pH 7.4 tamponu elde edildi.

2.5×10^{-4} M ANS çözeltinin hazırlanması: 0.0037 g ANS maddesi tartıldı 50 mL pH 7.4 Na-P tamponunda çözülerek hazırlandı. Renkli bir şişede $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandı. 30 günden fazla bekleyen çözeltiler çalışmalarda kullanılmadı.

5.0×10^{-4} M oleik asit, palmitik asit, miristik asit çözeltisinin hazırlanması: Yağ asitlerinde çözücü olarak 1:2 etanol: Na-P tamponu kullanıldı. Oleik asit hariç bütün yağ asitleri $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandı. Oleik asiti içeren ampül içerisindeki tüm madde alükoatlara

bölünerek -20°C’de muhafaza edildi. Çalışma öncesinde anında çıkarılıp seyreltilerek kullanıldı.

Palmitik asit çözeltisinin hazırlanması: 0.0154 g palmitik asit tartıldı. 40 mL etanol ve 80 mL Na-P tamponu eklendi. +4°C’ de saklandı.

Stearik asit çözeltisinin hazırlanması: 0.0170 g stearik asit tartıldı. 40 mL etanol ve 80 mL Na-P tamponu eklendi. +4°C’ de saklandı.

Miristik asit çözeltisinin hazırlanması: 0.0137 g miristik asit tartıldı. 40 mL etanol ve 80 mL Na-P tamponu eklendi. +4°C’ de saklandı.

Oleik asit çözeltisinin hazırlanması: 47.6 µL oleik asit ampulden alındı ve 100 mL etanolde çözüldü. Kapalı mikrosantrifüj tüplerine bölündü. Çalışma anına kadar -20°C’de saklandı. Çalışma sırasında alınan alükotlardan her 1 mL’lik kısım 2 mL Na-P tamponu eklenerek çözelti hazırlandı.

5×10^{-6} M Albümin çözeltisinin hazırlanması: 0.0165 g albümin hazırlandı ve 50 mL Na-P tamponunda çözüldü.

ANS floresan molekülü ile yağ asidi bağlama kapasitesinin ölçülmesi

Çalışmada 96 kuyucuklu, siyah, floresan ölçüme uygun, F-BOTTOM GREİNER marka mikropate kullanıldı. Aşağıdaki aşamalar sırasıyla uygulandı.

1. Her bir kuyucukta albümin, ANS, yağ asidi ve Na-P tamponu vardır. Sadece ilk iki kuyucukta yani başlangıçta her hasta ve kontrol grubu için yağ asidi içermez. Bir kuyucukta toplamda 300 µL çözelti bulunur. Örnek yükleme Tablo 3.2’de belirtildi. Yükleme ışık görmeyen karanlık ortamda yapıldı.
2. Hazırlanan albümin çözeltisinden her kuyucuğa 200 µL eklendi.
3. Üzerine her bir kuyucuk için hesaplanan Na-P tamponu eklendi.
4. Her yağ asidi için artan konsantrasyonda 35, 70, 105, 140, 175 ve 210 µM olacak şekilde ekleme yapıldı.
5. En son floresan madde olarak ANS çözeltisinden alındı ve her bir kuyucuğa 30 µl eklendi.
6. 15 dakika karanlık ortamda bekletildi.
7. Bekleme sonunda eksitasyon dalga boyu 360 ± 40 nm, emisyon dalga boyu 460 ± 40 nm olacak şekilde floresan okuma yapıldı, değerler kaydedildi.

Tablo 3.3. Floresan spektroskopisi için kuyucuklara yüklenen maddeler ve miktarları

	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H
Hasta albümin	200	200	200	200	200	200	200	200
ANS	30	30	30	30	30	30	30	30
Fosfat tamponu	70	70	65	65	60	60	55	55
Palmitik asit	0	0	5	5	10	10	15	15
Floresan okuma	826	852	724	727	707	678	597	577

Artan yağ asidi miktarına bağlı olarak floresan yer değiştirme derecesindeki azalmanın hesaplanması;

Ölçüm sonrası artan yağ asidi miktarına bağlı olarak floresan okumada düşüşler görüldü. Yağ asidi çeşidi ve miktarına göre düşüşler arasında farklılıklar olduğu gözlemlendi. Hasta ve kontrol grubundaki her kişi için yağ asidi içermeyen kuyucuktaki floresan değeri 100 olarak değerlendirildi, yağ asidi eklenmesi ve buna karşılık floresan değeriindeki değişiklik başlangıçtaki değere oran olarak yüzdelik olarak hesaplandı. Artan yağ asidi konsantrasyonuna karşılık floresan söndürme yüzdesi grafiği çizildi. İkinci bir grafik olarak yağ asidi konsantrasyonuna karşı yağ asidi konsantrasyonu/floresan söndürme yüzdesi grafiği oluşturuldu (11).

3.7. Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi ile Analizi

Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS), uçucu ve yarı uçucu bileşiklerin niteliksel ve niceliksel analizinde yaygın olarak kullanılan, yüksek duyarlılığa sahip bir ayırma ve tanımlama tekniğidir. Bu yöntem iki temel ünitenin birleşiminden oluşur: Gaz kromatografisi (GC), karışım halindeki bileşenleri uçuculuklarına ve sabit faz ile olan etkileşimlerine göre ayırır; kütle spektrometresi (MS) ise ayrılan her bileşiği iyonlaştırarak kütle/yük oranına (m/z) göre tanımlar. GC ünitesinde numune, taşıyıcı gaz (genellikle helyum) ile birlikte kolona taşınır ve sıcaklık kontrollü kolon içerisinde farklı bileşenlere ayrılır. Bu ayrılan bileşikler MS dedektörüne ulaştığında, genellikle elektron çarpması (electron impact, EI) ile iyonlaştırılır. Oluşan iyonlar, kütle analizörü tarafından ayrıştırılarak dedektöre iletilir ve böylece her bileşik için karakteristik bir kütle spektrumu elde edilir (103,104).

GC-MS yöntemi, hem ayırma kapasitesi hem de tanımlama gücü açısından oldukça güçlüdür. Özellikle metabolit profillemeye, çevresel analizler, adli toksikoloji ve ilaç kalıntısı tespitlerinde tercih edilmektedir. MS spektrumları, kütle spektrum kütüphaneleri ile karşılaştırılarak bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasına olanak sağlar (104).

Hasta ve kontrol gruplarının her bir için 500 µL serum numunesi ve 500 µL serumdan separe edilen albümin kısmı yağ asidi analizi için hazırlandı. Çalışmanın bu aşaması Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında hizmet alımı kapsamında yapıldı. Numuneler Shimatzu QP2010 Ultra Gas Chromatography-Mass Spectroscopy cihazı ile çalışıldı. Kolon olarak 60 mm×0.25 mm× 0.25 µm TBR film kolon kullanıldı. Akış 0.73 mL/dak, enjeksiyon sıcaklığı 250°C'dir. İyonlaştırıcı olarak Elektron Darbe İyonizasyonu kullanıldı ve kütle analizörünün tarama aralığı 50-600 m/z olarak ayarlandı.

Her bir numune için gerekli olan 1.9 mL stok solüsyonu, 1.8 mL metanol, 100 µL asetil klorür içerir. 50 µL serum veya albümin 1.9 mL stok solüsyonu ile vidalı kapaklı cam tüplere konuldu. Tüpler kapatıldı ve 100°C'de 60 dakika ısıtıldı. Tüplerin oda sıcaklığına soğuması sağlandı. 0.75 mL heksan eklendi ve 30 dakika boyunca vortekslendi. Üstteki organik faz alındı. Toplanan solüsyon azot gazı altında kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kuru kalıntıya 500 µL hekzan eklendi, GC şişelerine aktarıldı ve azot altında kapatıldı (105). Çalışmada kullanılan çözücü ve reaktifler Sigma-Aldrich markadır. Tercih edilen mix supelco 37 Component FAME Mix'dir.

3.8. İstatistiksel Analizler

Analizlerde kullanılan değişkenler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca (çeyrekler arası genişlik) ile özetlendi. Nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında parametrik olmayan yöntemler tercih edildi. Zamana veya doza bağlı tekrarlı ölçümler için gruplar içinde değişimin değerlendirilmesinde Friedman testi kullanıldı. Friedman testi sonrasında elde edilen anlamlı sonuçlar için ikili karşılaştırmalar, Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapıldı. İki bağımsız grup arasında yapılan karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi ve nitel veriler için Pearson ki-kare testi kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 27 (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp.) yazılımı ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Demografik Özelliklerin Karşılaştırılması

Çalışmada hasta grubunda fibroscan ve/veya ultrason ile NAFLD tanısı almış 40-60 yaş aralığında 10 erkek 10 kadın hasta bulunmaktadır. Kontrol grubunda ise fibroscan ve/veya ultrason ile NAFLD olmadığı tespit edilen 10 erkek 10 kadın hasta bulunmaktadır. Çalışmaya dahil edilen kişilerin yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ek hastalık, vücut kitle indeksi hesaplaması için boy, kilo bilgileri kaydedildi. Kontrol grubuna ait demografik özellikler Tablo 4.1’de, hasta grubuna ait bilgiler Tablo 4.2’de belirtildi. Hasta grubunun yaş ortalaması 48.6, kontrol grubunun yaş ortalaması 46.42’dir.

Tablo 4.1. Kontrol grubuna ait demografik özellikler

	YAŞ	Cinsiyet	VKİ	SİGARA	EK HASTALIK
K1	41	Kadın	26.67	-	Yok
K2	48	Kadın	31.55	-	Yok
K3	58	Kadın	25.39	-	Hipertansiyon
K4	52	Erkek	23.67	30 paket/yıl	Yok
K5	54	Erkek	24.38	35 paket/yıl	Yok
K6	48	Erkek	18.52	10 paket/yıl	Yok
K7	53	Kadın	25.53	-	Yok
K8	59	Kadın	17.63	-	Yok
K9	40	Erkek	24.22	-	Yok
K10	43	Erkek	27.22	-	Yok
K11	40	Erkek	23.53	-	Yok
K12	46	Kadın	21.63	-	Yok
K13	39	Erkek	24.22	-	Yok
K14	46	Kadın	25.80	-	Yok
K15	40	Kadın	24.39	-	Yok
K16	50	Erkek	24.09	-	Yok
K17	40	Erkek	23.96	5 paket/yıl	Yok
K18	46	Kadın	27.68	1 paket/yıl	Hipotriodi
K19	46	Kadın	30.08	-	Yok
K20	40	Erkek	25.83	25 paket/yıl	Yok

Tablo 4.2. Hasta grubuna ait demografik özellikler

	YAŞ	Cinsiyet	VKİ	SİGARA	EK HASTALIK
H1	60	Erkek	26.23	60 paket/yıl	Yok
H2	40	Kadın	39.11	-	Astım, üveit, anemi, haşimato, diyabet
H3	46	Erkek	27.77	50 paket/yıl	Haşimato
H4	51	Kadın	28.52	-	Hipotiroidi
H5	40	Erkek	36.33	-	Gastrit
H6	47	Erkek	36.00	-	Diyabet, sedef
H7	40	Erkek	29.61	20 paket/yıl	Yok
H8	55	Kadın	34.29	-	Hipertansiyon, diyabet
H9	44	Erkek	29.41	-	Yok
H10	46	Kadın	27.48	20 paket/yıl	Haşimato
H11	48	Kadın	28.91	-	Yok
H12	56	Erkek	24.16	-	Hipertansiyon, diyabet
H13	51	Kadın	38.67	-	Hipertansiyon, diyabet
H14	50	Kadın	28.23	-	Hipertansiyon, diyabet, hipertiroidi
H15	46	Kadın	27.64	-	Romatoit artirit
H16	60	Erkek	29.39	-	Koroner arter hastalığı
H17	44	Kadın	30.12	-	Hipertansiyon, diyabet, hipotriodi
H18	58	Kadın	28.04	-	Hipertansiyon, diyabet, guatr
H19	44	Erkek	28.08	-	Yok
H20	46	Erkek	29.86	-	Yok

Kontrol ve hasta grubuna ait cinsiyet, yaş, boy, kilo, vücut kitle indeksi (VKİ) değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 4.3.). Kontrol grubunun yaş ortalaması 46 ± 6 yıl, ortancası 46 (11) iken; hasta grubunda bu değer 49 ± 6 yıl, ortancası 47 (9) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında yaş açısından anlamlı fark yoktur ($p=0.301$). Kontrol grubunun boy ortalaması 1.69 ± 0.07 m, ortancası 1.69 (0.10); hasta grubunda ise 1.67 ± 0.10 m, ortancası 1.65 (0.15) olarak saptandı. Boy açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.429$). Kontrol grubunun kilo ortalaması 71 ± 10 kg, ortancası 70 (12); hasta grubunda 84 ± 11 kg, ortancası 85 (16) olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Kontrol grubunda VKİ ortalaması 24.80 ± 3.24 kg/m², ortancası 24.39 (2.44); hasta grubunda ise 30.39 ± 4.17 kg/m², ortancası 29.15 (4.30) olarak hesaplandı. VKİ açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.001$). Her iki grupta da erkek ve kadın birey sayısı eşittir ($n=10$; %50). Cinsiyet dağılımı açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktur ($p=1.000$).

Tablo 4.3. Kontrol ve hasta grubuna ait demografik özelliklerin karşılaştırılması

Değişkenler	Kontrol (n=20)	Hasta (n=20)	<i>p</i> *
Yaş	46±6 46 (11)	49±6 47 (9)	0.301
Boy	1.69±0.07 1.69 (0.1)	1.67±0.1 1.65 (0.15)	0.429
Kilo	71±10 70 (12)	84±11 85 (16)	<0.001
Vki	24.80±3.24 24.39 (2.44)	30.39±4.17 29.15 (4.30)	<0.001
Cinsiyet			1
Erkek	10 (%50)	10 (%50)	
Kadın	10 (%50)	10 (%50)	

Değişkenler art.ort ± std. sapma, ortanca (çeyreklikler arası genişlik) ve sayı (yüzde) istatistikleri ile özetlendi. * Mann-Whitney U testi, Pearson ki-kare testi. $p < 0.05$ olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Serum Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Kontrol ve hasta gruplarının biyokimyasal analiz sonuçları ve istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Glikoz, insülin, HbA1c, ALT, AST ve VLDL değişkenleri için kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı fark bulundu. Total kolesterol, LDL, CRP, GGT, albümin ve direkt bilirubin değişkenleri için kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. HOMA-IR değişkeni hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0.001$). Total bilirubin için hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p = 0.010$). TAG değişkeni için hasta grubunda anlamlı artış gözlemlendi ($p = 0.018$). HDL için hasta grubunda anlamlı düşüklük saptandı ($p = 0.014$).

Tablo 4.4. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

Değişkenler	Kontrol (n=20)	Hasta (n=20)	<i>p</i> *
Glikoz	91±8 90 (12)	108±31 105 (22)	0.008
İnsülin	6.36±3.51 5.45 (3.52)	16.93±10.94 12.92 (12.62)	<0.001
HbA1c	5.1±0.3 5.1 (0.3)	5.8±0.8 5.7 (0.9)	<0.001
Homa1r	1.45±0.9 1.14 (0.77)	4.59±3.19 3.34 (4.12)	<0.001
ALT	18±10 14 (12)	43±42 33 (29)	<0.001
AST	20±7 20 (10)	31±15 27 (12)	0.002
GGT	16±7 15 (10)	63±67 28 (55)	<0.001
Total bilirubin	0.96±0.57 0.77 (0.57)	0.61±0.33 0.54 (0.35)	0.01
Direk bilirubin	0.15±0.08 0.14 (0.1)	0.11±0.05 0.11 (0.07)	0.121
Albümin	4.5±0.3 4.4 (0.3)	4.5±0.4 4.5 (0.40)	0.314

CRP	0.348±0.099 0.32 (0.011)	0.546±0.547 0.335 (0.13)	0.183
TAG	102±38 95 (38)	144±60 133 (90)	0.018
HDL	57±16 59 (26)	45±9 45 (10)	0.014
LDL	116.49±30.03 121.4 (32.3)	102.47±42.11 106.6 (48.1)	0.165
VLDL	20.4±7.5 18.9 (7.6)	28.8±12.1 26.6 (18.1)	0.018
Total kolesterol	194±36 207 (42)	183±40 182 (40)	0.157

Değişkenler art.ort ± std. sapma ve ortanca (çeyreklikler arası genişlik) istatistikleri ile özetlendi.

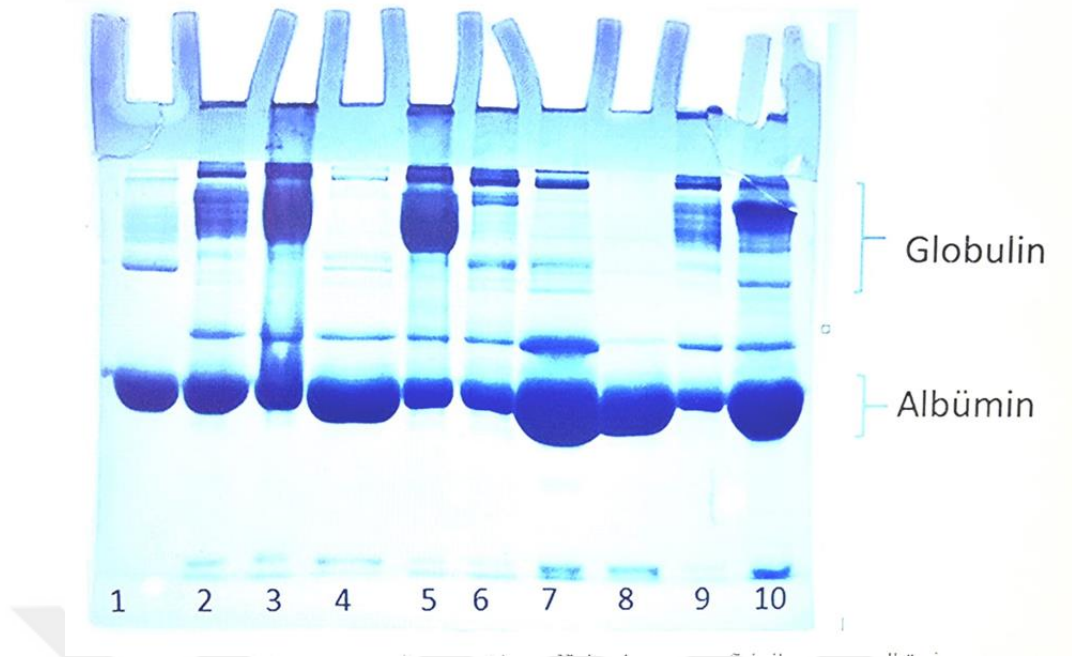
*Mann-Whitney U testi, p<0.05 olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

4.3. Albümin Seperasyon Yöntemlerinden Elde Edilen Albümin ve Globülin Fraksiyonlarının SDS-PAGE ile Ayrımı ve Fotodansitometrik Analizi

AS2, AS4 ve CBAK metodlarından elde edilen albümin ve globülin kısımları SDS-PAGE ile ayrıldı ve elde edilen görüntü kaydedildi (Şekil 4.1.). Elektroforetogramda yalnızca albümin ve globülin bantları fotodansitometrik analize tabi tutuldu. Albümin ve globüline ait fotodansitometrik verilerin toplamı %100 olarak kabul edildi.

Tablo 4.5’de G, A ve A/G’nin yüzde oranları belirtildi. Normal serumda A/G oranı 1.8 iken AS2 yöntemi sonucu izole edilen albüminde zengin fraksiyonda bu oran 9.4’e çıktığı görülmektedir. AS4 yönteminde ise albüminde en zengin fraksiyon olan AS4 %70’ de A/G oranı 21.57 olarak bulundu. CBAK yönteminde ise izole edilen albüminde zengin fraksiyonda A/G oranı 3.83 olarak belirlendi. Kullanılan yöntemler içerisinde albümin saflığının en fazla olduğu fraksiyon AS4 yöntemindeki %70’lik fraksiyon olduğu görülmektedir. İnsan serumunda albümin separasyonundan önce görülen A/G oranı 1.8’e göre 11.98 kat bir albümin seperasyonu söz konusudur. Kullanılan 3 yöntem ile elde edilen albüminde zengin fraksiyonların hepsine %9.6’dan %59.60’a kadar değişen oranlarda globülin tespit edildi. Albümin standardı numunesinde bile %14.27 globülin bandı görüldü.

Amonyum sülfat ile yapılan çöktürme işlemlerinde düşük konsantrasyonlarda önce globülinler çökerken, amonyum sülfat konsantrasyonu artırılırken daha ağırlıklı olarak albüminin çöktüğü gözlemlendi. CBAK yönteminde izole edilen albümin içermeyen serum (AFS) fraksiyonunda bile albümin ile birlikte globülin mevcudiyeti görülmektedir.



1: standart albümin 2: insan serumu, 3: AS2 globülin, 4:AS2 albümin, 5: %40 AS4 presipitatu, 6: %50 AS4 presipitatu, 7: %60 AS4 presipitatu, 8: %70 AS4 presipitatu, 9: CBAK(AFS) 10: CBAK(A) (Her bir bantta yaklaşık olarak 20-25 µg protein yüklenmiştir.)

Şekil 4.1. AS2, AS4 presipitasyon ve CBAK ile serum albümin fraksiyonasyonuna ait SDS-PAGE elektroforetogramı

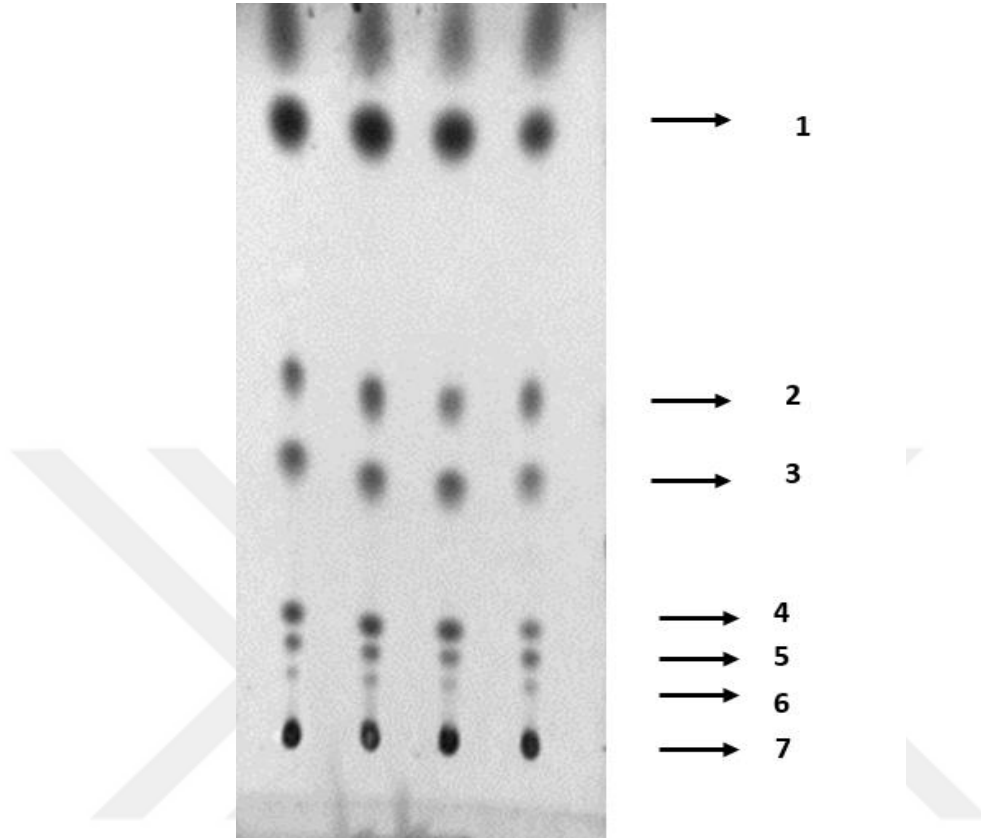
Tablo 4.5. İzolatlarda % albümin(A) ve globülinin(G) kompozisyonları ve A/G oranları

	G(%)	A(%)	A/G(%)
Standart albümin	14.27	85.72	6.00
Serum	35.11	64.88	1.8
AS2 globülin	48.71	51.28	1.05
AS2 albümin	9.6	90.36	9.4
AS4 %40	59.60	40.39	0.67
AS4 %50	42.76	57.23	1.33
AS4 %60	9.32	90.67	9.72
AS4 %70	4.43	95.56	21.57
CBAK(AFS)	84.18	15.81	0.18
CBAK(A)	18.56	71.12	3.83

4.4. Albümin Ekstrakt Lipitlerinin İTK ile Seperasyonu ve Fotodansitometrik Analizleri

Hasta ve kontrol gruplarından izole edilen albümine bağlanan lipid yapıdaki bileşenlerin İTK ile analizi yapıldı ve elde edilen görüntüler kaydedildi. Örnek görüntü Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Her numune için fotodansitometrik analiz yapıldı. Analiz

sonuçları Tablo 4.6. ve 4.7.' de belirtilmiştir. Her bir numunede yedi bant görüntüsü için fotodansitometrik değerler toplamı 100 kabul edilerek her bantın yüzde oranı hesaplandı yüzde oranları belirlendi (Tablo 4.8. ve 4.9).



Şekil 4.2. Hasta ve serum albümin ekstraktlarının İTK ile lipid analizlerine ait kromatogram

Tablo 4.6. Kontrol grubu albümin ekstrakt kromatogramlarına ait fotodansitometrik analiz sonuçları

	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5	Spot 6	Spot 7
K1	27872896	8610608	9779760	5987232	4779164	2151436	13177200
K2	10107904	2196448	3359200	2227288	2427920	929004	6114376
K3	46009024	19882688	11035120	14546280	6398568	2990380	16171560
K4	35845040	7178512	23788568	12379776	7960384	2606776	29233280
K5	82605248	32666176	12099600	20291808	9213888	4006020	15346840
K6	70683264	32065712	13226720	17704952	10230320	4606112	16146240
K7	27647568	7856400	9375464	5549276	3577392	835576	8498600
K8	38108592	11165136	17269360	8321872	5245132	2776672	16222696
K9	40280000	14989008	17926160	7631924	5261984	2890848	15430976
K10	28124320	7776144	9798256	6330428	4050876	1324308	9715168
K11	55771264	16805472	34393520	12978680	7950392	5282020	12088688
K12	105135824	32727488	36358688	18666604	16092568	8447836	5063328
K13	88254272	42822208	51785872	18295800	13108696	9142292	26970080
K14	119785904	33310656	51540912	21637876	16467692	9790452	27706416
K15	108285472	32661040	30706816	21116168	13277152	4649276	20749144
K16	25160640	7345648	12842032	4124664	3886692	2631188	6163096

K17	11512128	3015712	4422448	1970224	1351008	923476	2113560
K18	133459872	41872400	43142544	20265792	13110666	7606580	34535528
K19	134506336	42598112	48363696	20192880	13802498	8884400	33512840
K20	89056480	29536880	27090608	16366176	14568348	5542276	22542688

Tablo 4.7. Hasta grubu albümin ekstrakt kromatogramlarına ait fotodansitometrik analiz sonuçları

	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5	Spot 6	Spot 7
H1	75251072	28456000	19209528	17281192	11167904	5741264	20126496
H2	102828544	22305040	23409920	16728480	11366890	6769456	28049960
H3	19832800	7899408	6937000	3816428	4031920	1331864	8442112
H4	38371232	15166784	13389360	8541528	4925808	2956864	10338440
H5	46142560	15048560	15914368	11239472	6202640	2661696	16924064
H6	37682656	19411472	22265264	8031844	5467476	3841336	14193976
H7	65807776	27880480	37379456	15732936	11134744	7572652	25204432
H8	71344736	32498992	16464096	16066336	9613112	4504124	18023792
H9	41415200	19682576	14233968	8205308	7206120	4543948	14760960
H10	143896272	47162672	60213464	30633416	20688128	10562500	37332944
H11	13428544	3789312	5076880	2889452	2981168	1284224	6643304
H12	141919824	48364688	57469560	34288968	20932504	10864024	7259488
H13	30002192	10238256	9800352	6263452	4343024	1634484	8281288
H14	135075072	54700944	44268912	22519336	13093462	7639752	23677296
H15	74167056	20147088	25081360	11653996	11774812	6024864	17784304
H16	16721120	5690064	8264784	2905760	2837484	1851832	5703304
H17	94740688	24586736	35234336	14011004	14920000	7336488	28583312
H18	277944416	119836616	109574016	43881064	25750312	17478396	51181816
H19	81621728	44787456	45429760	19201816	11110372	7593236	21567856
H20	21020800	6829168	9850960	3349504	3083688	1899024	7075272

Tablo 4.8. Kontrol grubu albümin ekstraktlarına ait itk kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerleri

Kontrol denekleri	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5	Spot 6	Spot 7
K1	38.52	11.90	13.52	8.27	6.60	2.97	18.21
K2	36.94	8.03	12.28	8.14	8.87	3.40	22.35
K3	39.31	16.99	9.43	12.43	5.47	2.56	13.82
K4	30.12	6.03	19.99	10.40	6.69	2.19	24.57
K5	46.87	18.54	6.87	11.51	5.23	2.27	8.71
K6	42.93	19.47	8.03	10.75	6.21	2.80	9.81
K7	43.65	12.40	14.80	8.76	5.65	1.32	13.42
K8	38.45	11.27	17.42	8.40	5.29	2.80	16.37
K9	38.58	14.36	17.17	7.31	5.04	2.77	14.78
K10	41.90	11.59	14.60	9.43	6.04	1.97	14.47
K11	38.39	11.57	23.68	8.93	5.47	3.64	8.32
K12	47.25	14.71	16.34	8.39	7.23	3.80	2.28
K13	35.25	17.10	20.68	7.31	5.24	3.65	10.77
K14	42.74	11.89	18.39	7.72	5.88	3.49	9.89
K15	46.79	14.11	13.27	9.12	5.74	2.01	8.97
K16	40.48	11.82	20.66	6.64	6.25	4.23	9.92
K17	45.49	11.92	17.47	7.78	5.34	3.65	8.35
K18	45.40	14.24	14.67	6.89	4.46	2.59	11.75
K19	44.56	14.11	16.02	6.69	4.57	2.94	11.10
K20	43.51	14.43	13.23	8.00	7.12	2.71	11.01

Tablo 4.9. Hasta grubu albümin ekstraktlarına ait itk kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerleri

Hasta denekleri	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5	Spot 6	Spot 7
H1	42.46	16.06	10.84	9.75	6.30	3.24	11.36
H2	48.63	10.55	11.07	7.91	5.38	3.20	13.27
H3	37.93	15.11	13.27	7.30	7.71	2.55	16.14
H4	40.96	16.19	14.29	9.12	5.26	3.16	11.03
H5	40.43	13.19	13.94	9.85	5.43	2.33	14.83
H6	33.98	17.50	20.08	7.24	4.93	3.46	12.80
H7	34.51	14.62	19.60	8.25	5.84	3.97	13.22
H8	42.34	19.29	9.77	9.53	5.70	2.67	10.70
H9	37.63	17.89	12.93	7.46	6.55	4.13	13.41
H10	41.06	13.46	17.18	8.74	5.90	3.01	10.65
H11	37.21	10.50	14.07	8.01	8.26	3.56	18.41
H12	44.20	15.06	17.90	10.68	6.52	3.38	2.26
H13	42.52	14.51	13.89	8.88	6.15	2.32	11.74
H14	44.88	18.17	14.71	7.48	4.35	2.54	7.87
H15	44.51	12.09	15.05	6.99	7.07	3.62	10.67
H16	38.02	12.94	18.79	6.61	6.45	4.21	12.97
H17	43.18	11.21	16.06	6.39	6.80	3.34	13.03
H18	43.05	18.56	16.97	6.80	3.99	2.71	7.93
H19	35.29	19.36	19.64	8.30	4.80	3.28	9.32
H20	39.58	12.86	18.55	6.31	5.81	3.58	13.32

Yedi bantın yüzde oranlarının istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 4.10'da belirtildi. 1,3,4,5,6 ve 7 değişkenleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. 2 değişkeni için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ancak fark sınırda olabilir ($p=0.108$).

Tablo 4.10. Hasta ve kontrol gruplarının albümin ekstraktlarına ait lipit kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerlerinin karşılaştırılması

Değişkenler**	Kontrol(n=20)	Hasta(n=20)	p*
1	41.36±4.44 42.32 (12.29)	40.62±3.83 41.01 (8.87)	0.383
2	13.32±3.24 13.26 (7.54)	14.95±2.86 14.84 (7.17)	0.108
3	15.43±4.31 15.41 (10.48)	15.43±3.09 14.88 (7.92)	0.947
4	8.64±1.59 8.33 (2.61)	8.08±1.26 7.96 (2.65)	0.277
5	5.92±1.03 5.69 (1.91)	5.96±1.06 5.87 (2.36)	0.758
6	2.89±0.73 2.80 (1.92)	3.21±0.56 3.26 (1.24)	0.277
7	12.44±5.11 11.06 (9.33)	11.75±3.38 12.27 (8.23)	0.947

Değişkenler art.ort ± std. sapma ve ortanca (çeyreklikler arası genişlik) istatistikleri ile özetlendi.

** Değişkenler: 1: kolesterol esteri 2: TAG 3: serbest yağ asidi 4: kolesterol 5: diaçilgliserol 6: monoacilgliserol 7: fosfolipit

4.5. ANS Floresan Yer Değiştirme Yöntemi ile Kontrol ve Hasta Serum Albüminlerinin Farklı Yağ Asitlerini Bağlama Kapasitelerinin Karşılaştırılması

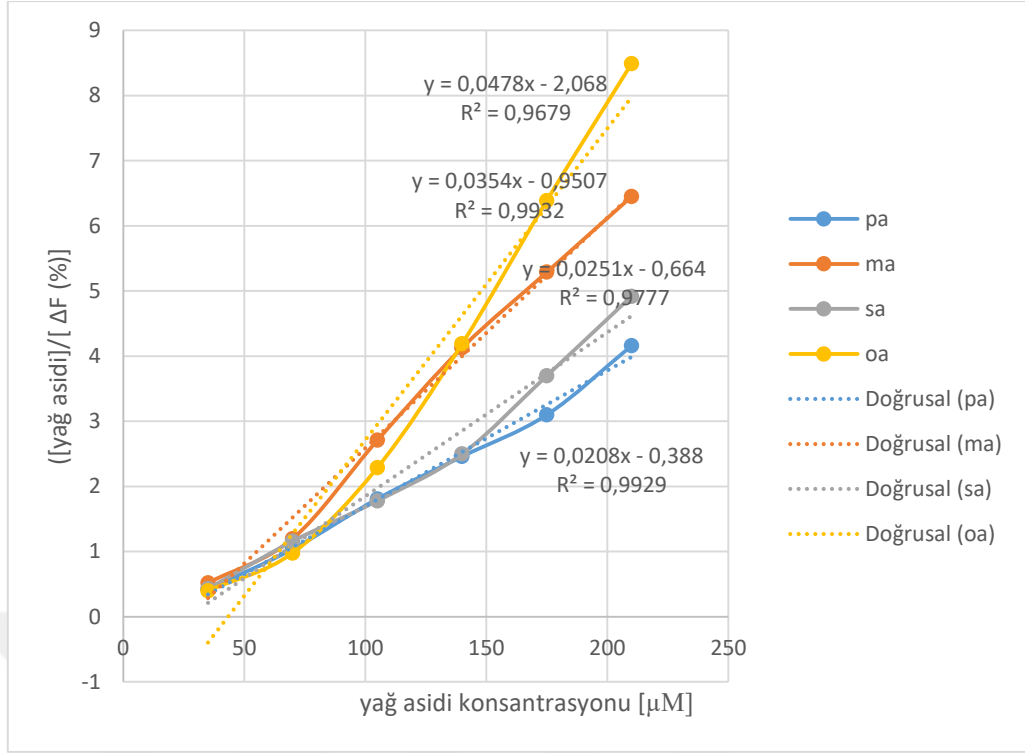
Hasta ve kontrol gruplarından separe edilen albümin üzerine artan konsantrasyonlarda farklı yağ asitleri eklendi ve floresan yer değiştirme değeri belirlendi.

Floresan değerdeki azalma albüminin ANS molekülünden ayrılarak eklenen yağ asidine bağlanma affinitesini göstermektedir. Aynı şekilde Sigma Aldrich marka yağ asidi ve globulin içermeyen ticari albümin çözeltisine artan konsantrasyonlarda yağ asidi eklendi ve floresan yer değiştirme değeri ticari albümin için de tespit edildi. Ticari albümin için deney üç kez aynı koşullarda tekrar edildi. Üç deneyin ortalaması alınarak Şekil 4.3.'te gösterilen grafik elde edildi. Grafikte verilen verilerden yağ asidi konsantrasyonu floresan yer değiştirme değerine oranlanarak yeni bir grafik oluşturuldu. Oluşturulan grafikte yağ asidi konsantrasyonu x ekseninde, yağ asidi konsantrasyonu/floresan söndürme derecesi y eksenindedir (Şekil 4.4). Şekil 4.4'deki eğilim çizgileri dikkate alınarak her bir yağ asidi için K_{dapp} değeri (ayırışma sabiti), yani x eksenini kestiği nokta hesaplandı. Palmitik asit, miristik asit, stearik asit ve oleik asit için K_{dapp} değeri sırasıyla 18.65, 26.85, 26.45 ve 43.26'dır. Çalışma koşullarında ANS-albümin kompleksine yağ asidi eklendiğinden K_{dapp} değeri en düşük olan yağ asidinin albümine bağlanması daha güçlüdür. Bu nedenle çalışmada eklenen yağ asitleri içerisinde albümine bağlanma derecesi en zayıf olan oleik asit en güçlü olan palmitik asittir. Hasta ve kontrol grupları içinde aynı grafik oluşturuldu ve Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir. Albüminlere yağ asidi bağlanmasına dair ANS-floresan yer değiştirme eğrileri Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir. Albüminlere yağ asidi bağlanmasına dair [yağ asiti] / ΔF (%)'nin [yağ asiti]'e karşı lineer grafikleri Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14'de gösterildi. Hasta ve kontrol grubu grafiklerinin eğilim çizgileri dikkate alınarak K_{dapp} değerleri hesaplandı, en yüksek değer oleik asite aittir bunu sırasıyla miristik asit, stearik asit ve palmitik asit takip etmektedir.



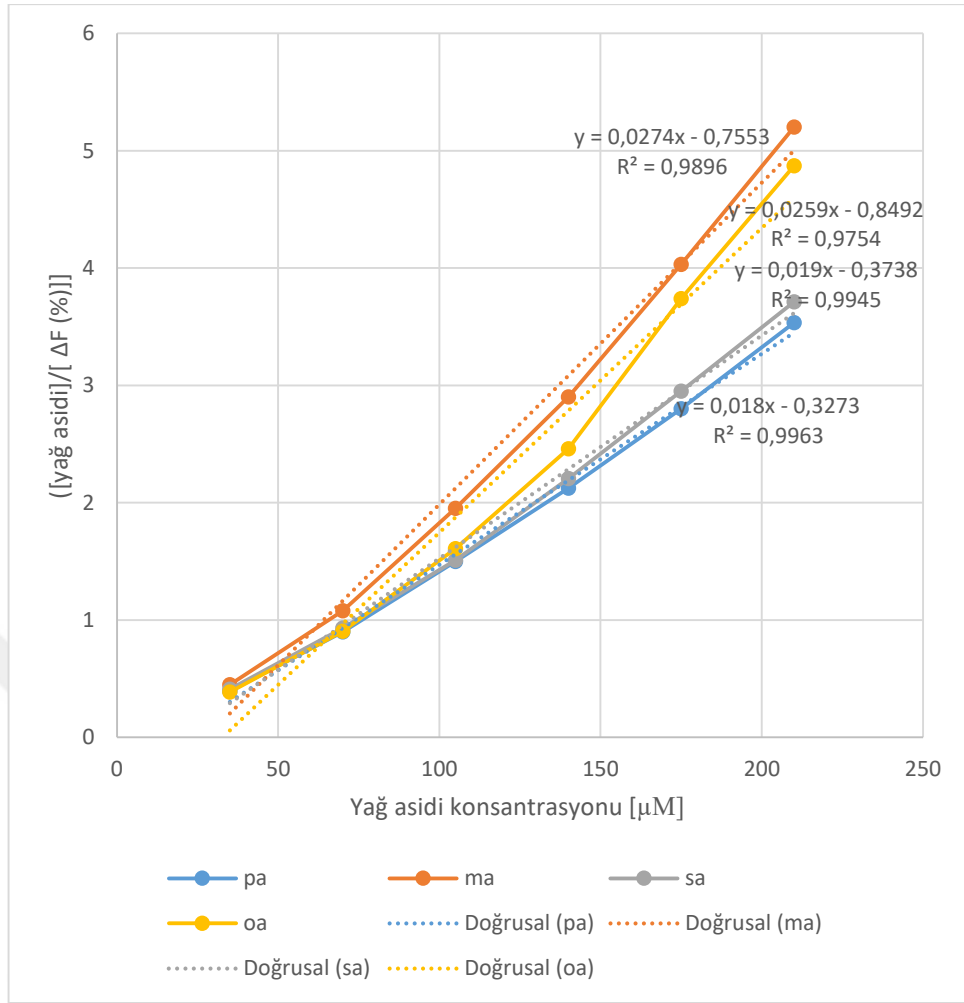
ΔF (%): ANS-albümin kompleksine farklı konsantrasyonlarda yağ asidi bağlandığında floresandaki azalmanın % ifadesi, pa: palmitik asit, ma: miristik asit, sa: stearik asit, oa: oleik asit

Şekil 4.3. Yağ asitlerinin albümine bağlanmasına dair ANS-floresan yer değiştirme grafiği

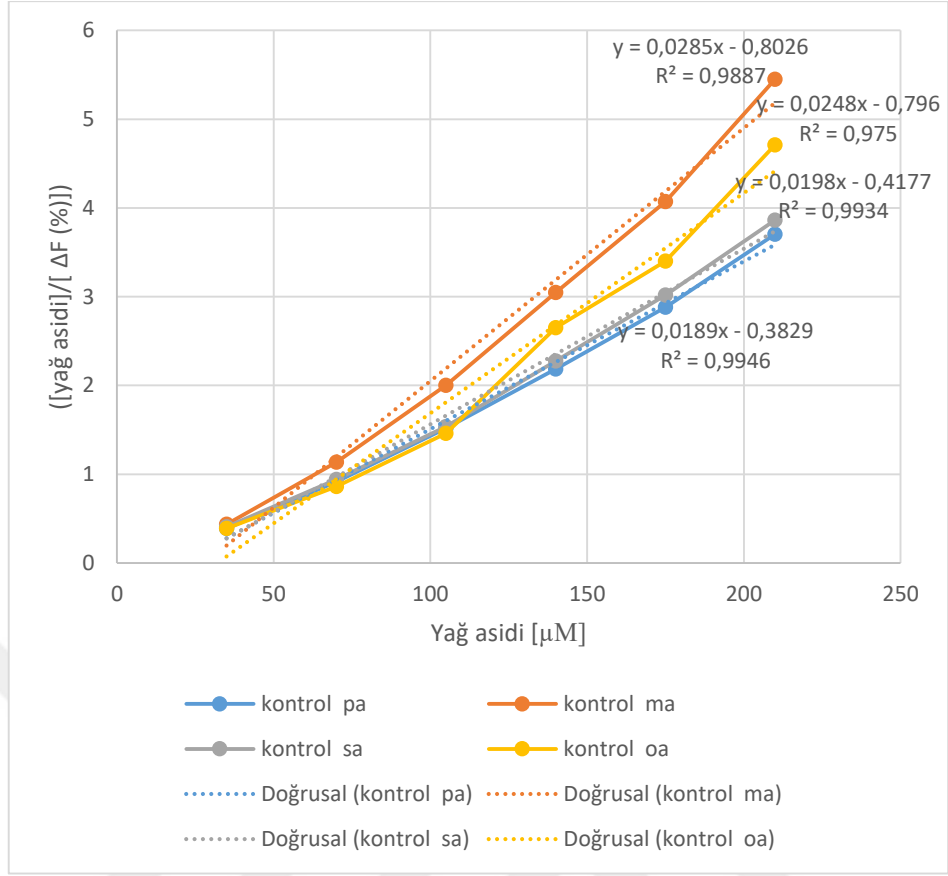


pa: palmitik asit, ma: miristik asit, sa: stearik asit, oa:oleik asit

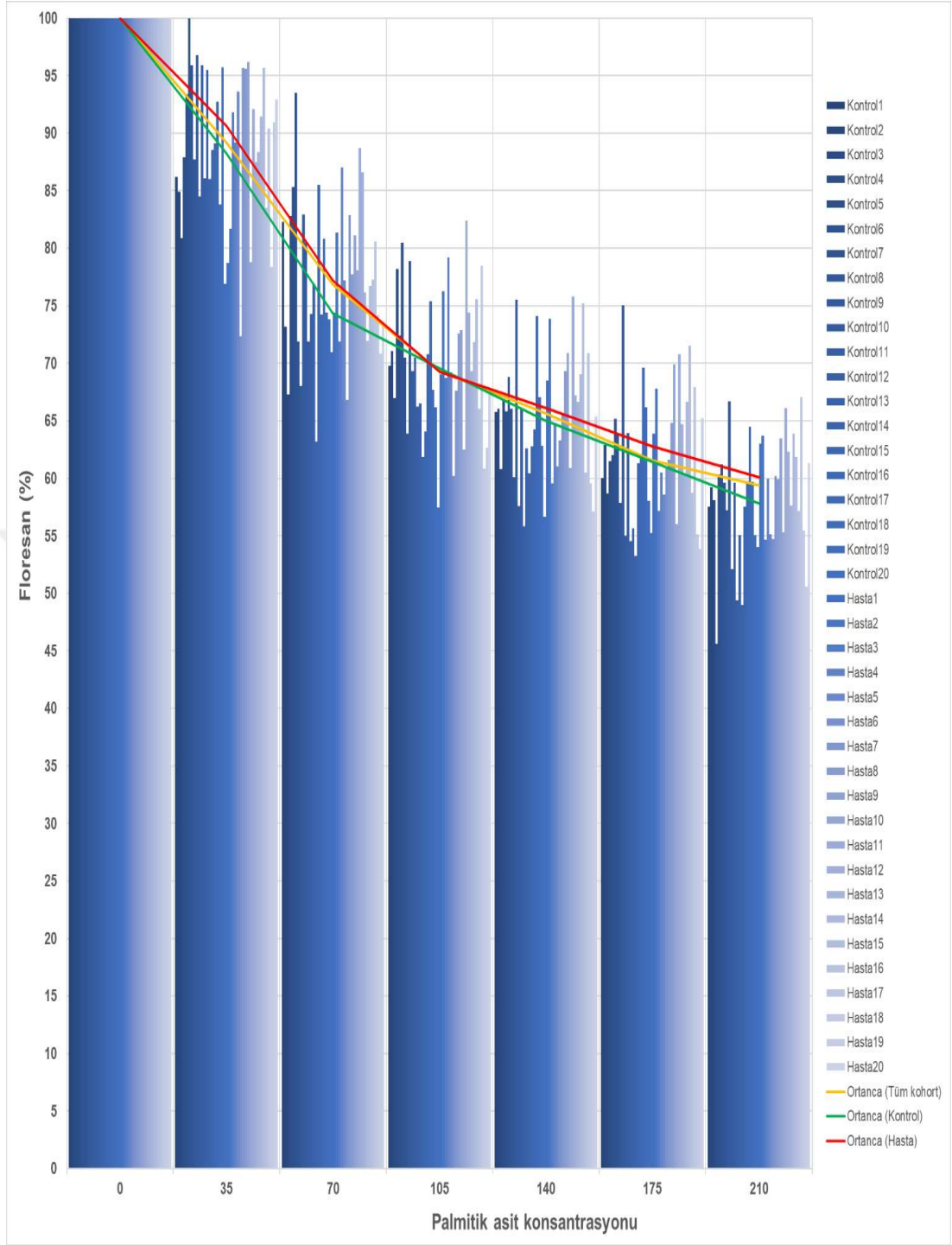
Şekil 4.4. Yağ asitlerinin albümine bağlanmasına dair ($[yağ\ asidi]/[\Delta F\ (%)]$, $[yağ\ asidi]$) lineer grafiği



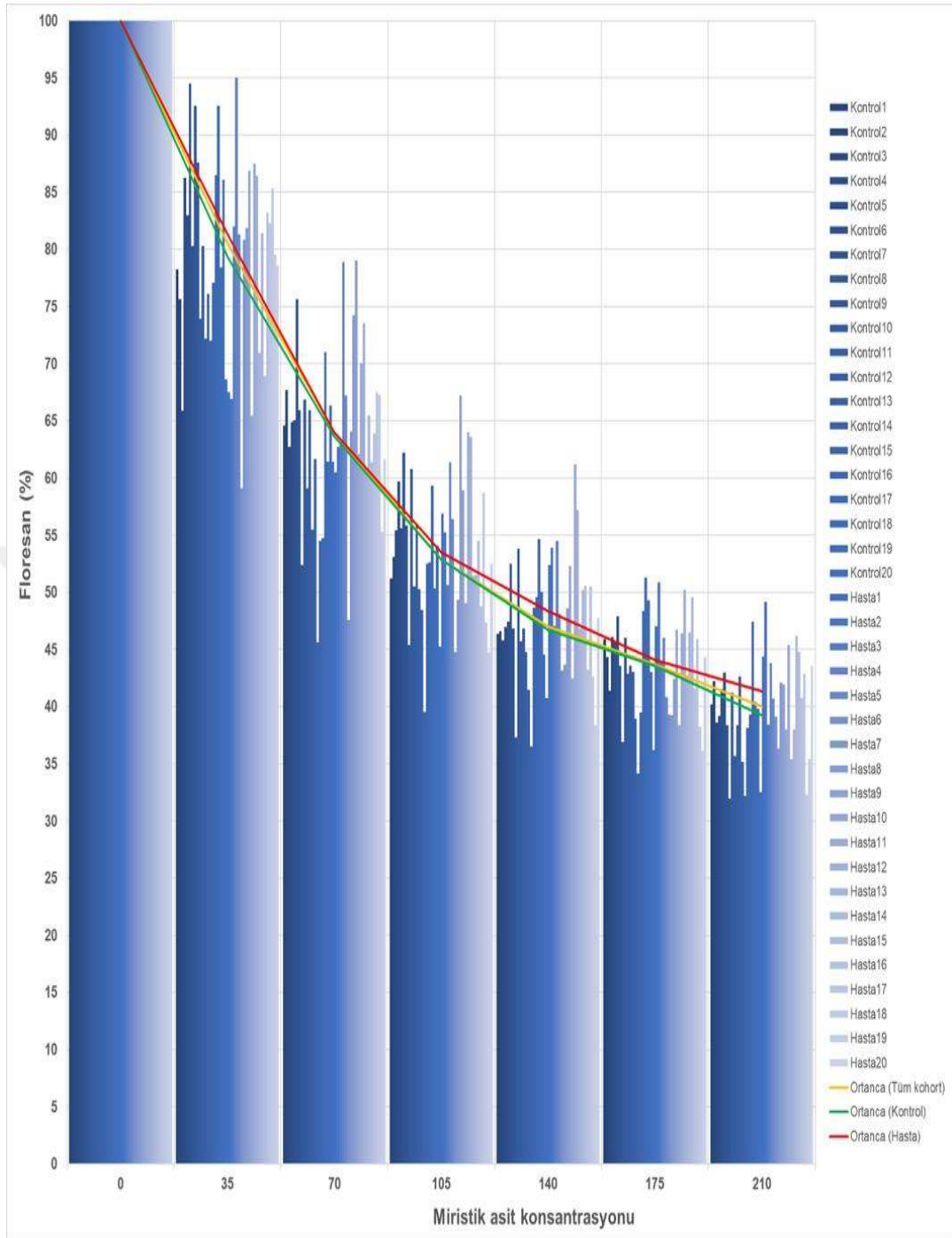
Şekil 4.5. Yağ asitlerinin hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair $\left(\frac{[\text{yağ asidi}]}{[\Delta F (\%)]}, [\text{yağ asidi}]\right)$ lineer grafiği



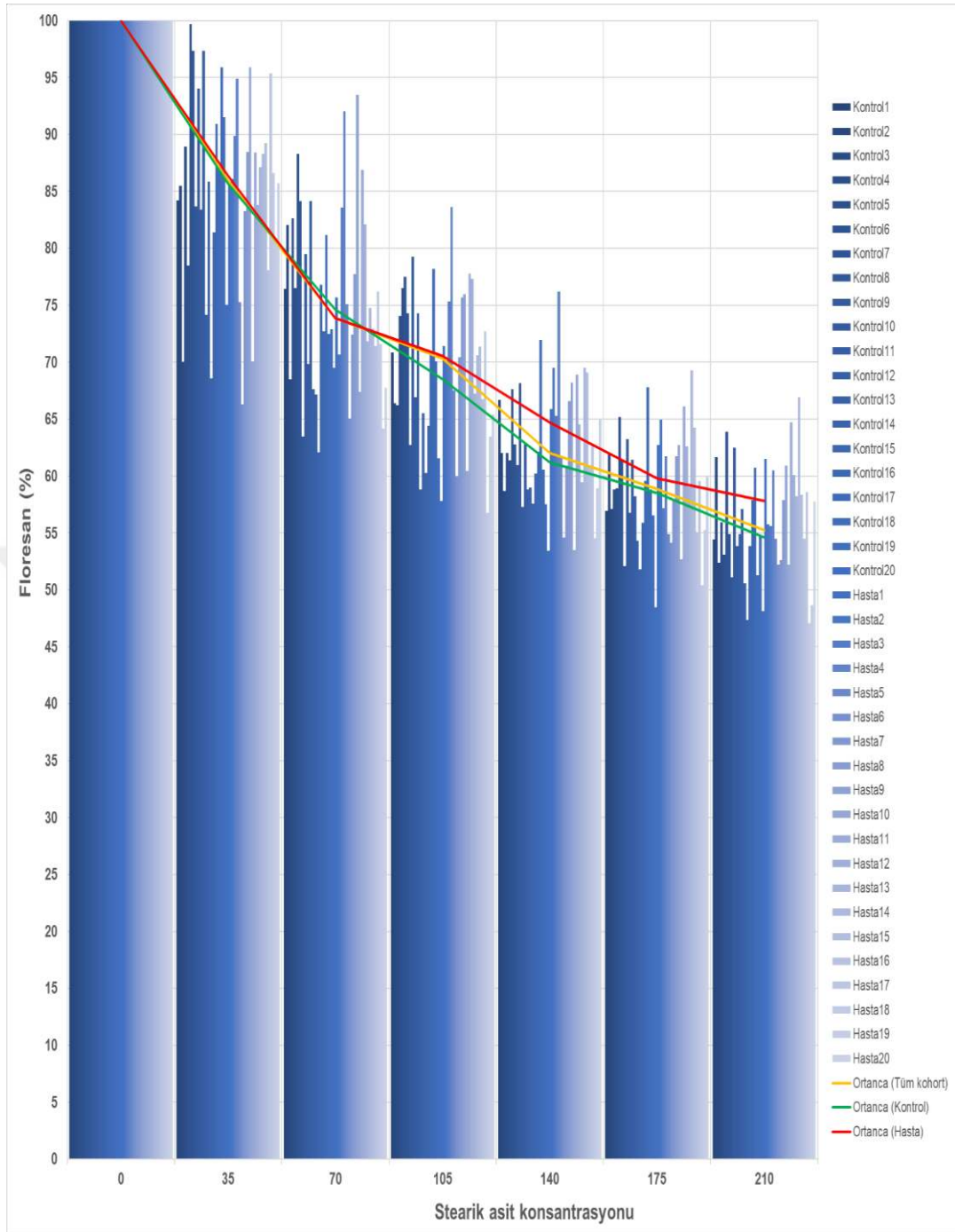
Şekil 4.6. Yağ asitlerinin kontrol grubu albüminlerine bağlanmasına dair $([yağ\ asidi]/[\Delta F (\%)])$, $[yağ\ asidi]$ lineer grafiği



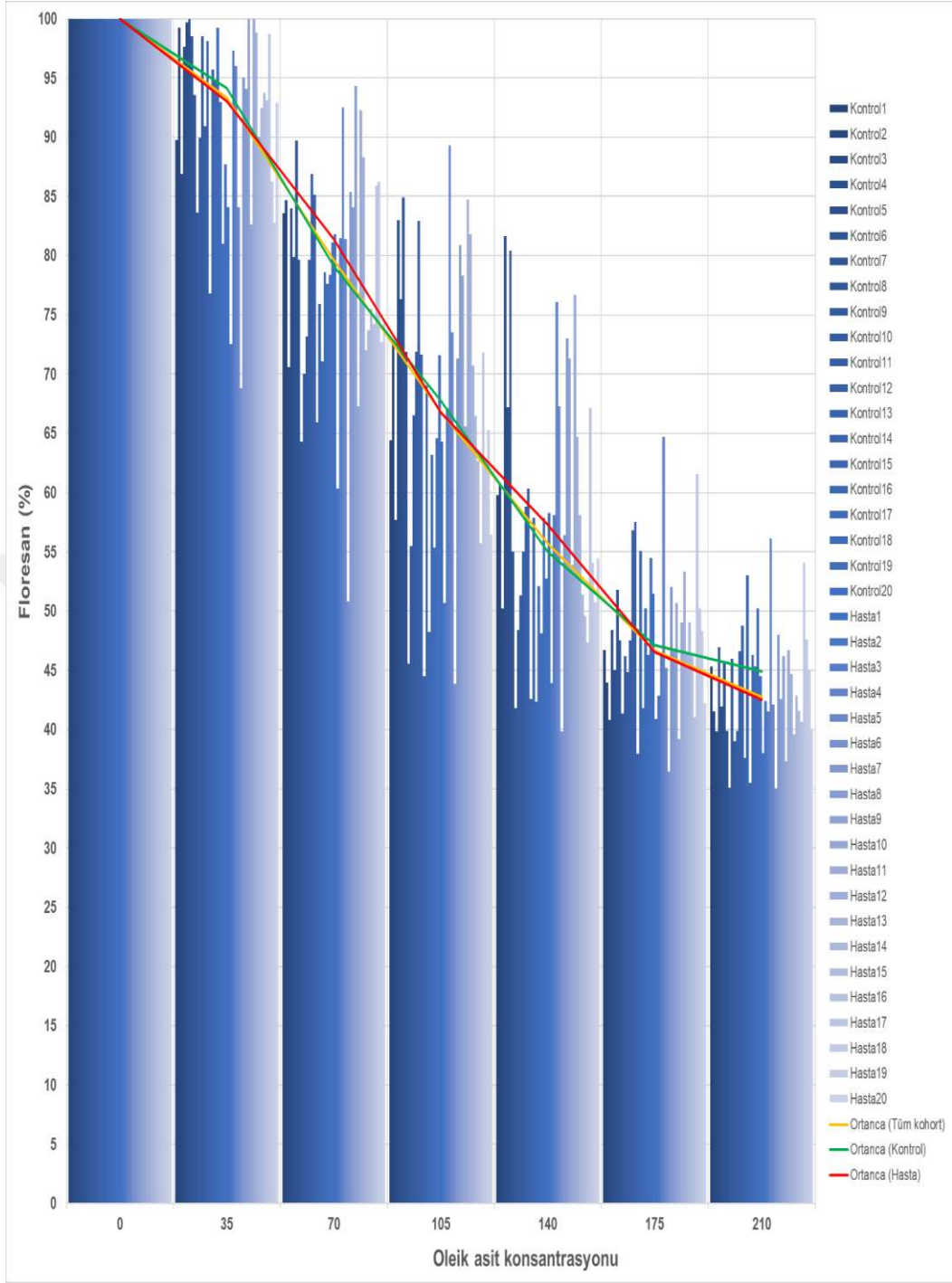
Şekil 4.7. Palmitik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri



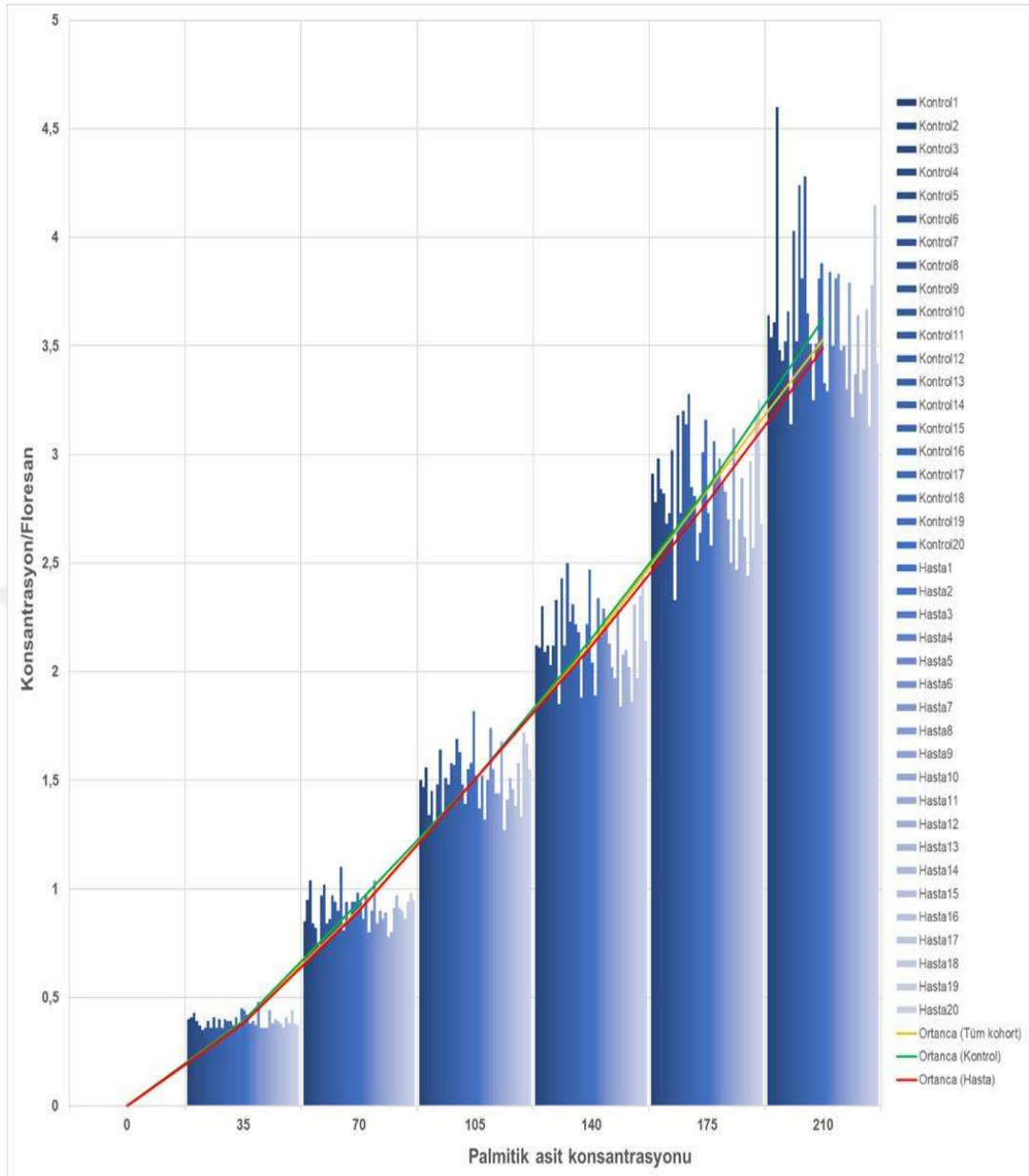
Şekil 4.8. Miristik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri



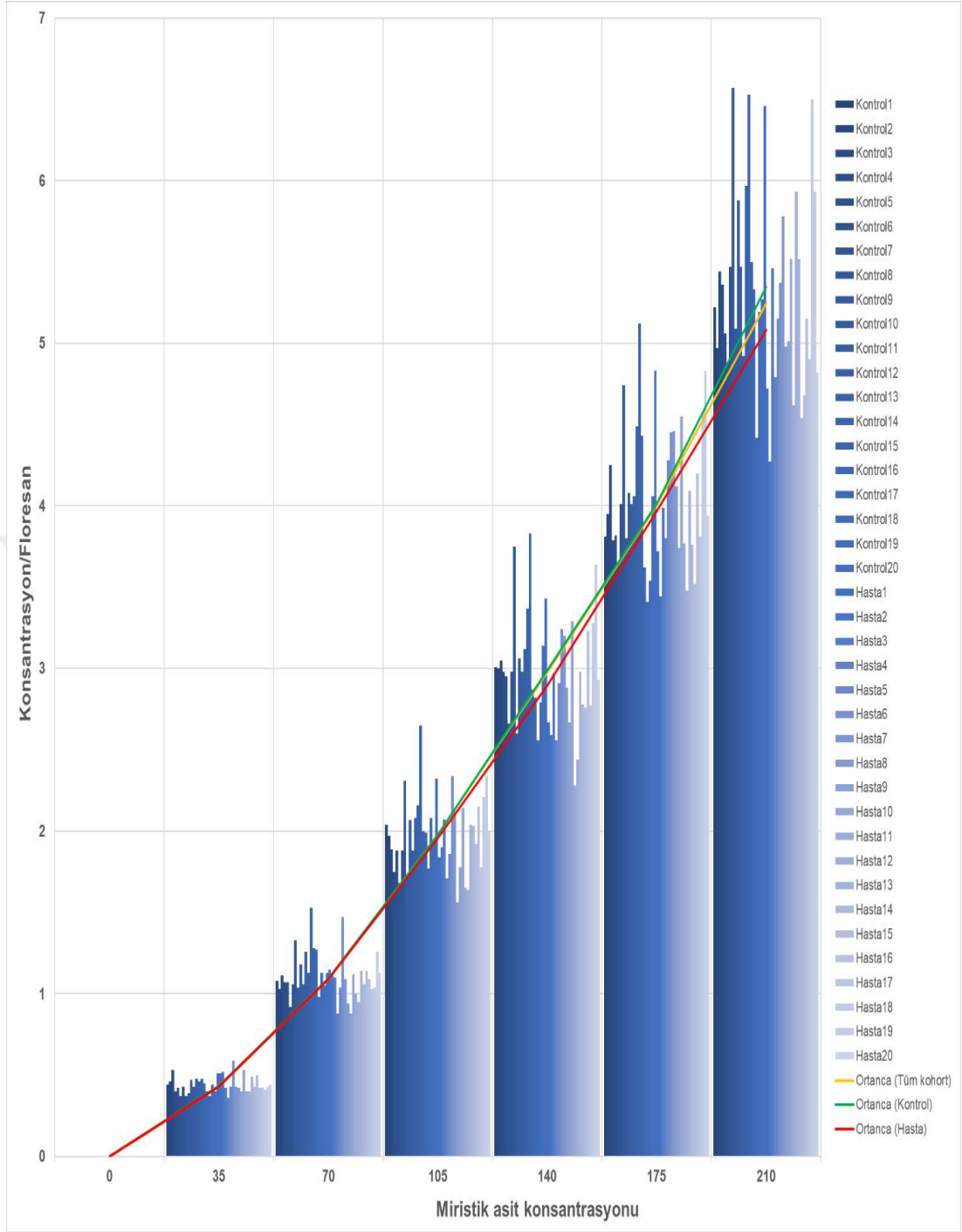
Şekil 4.9. Stearik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri



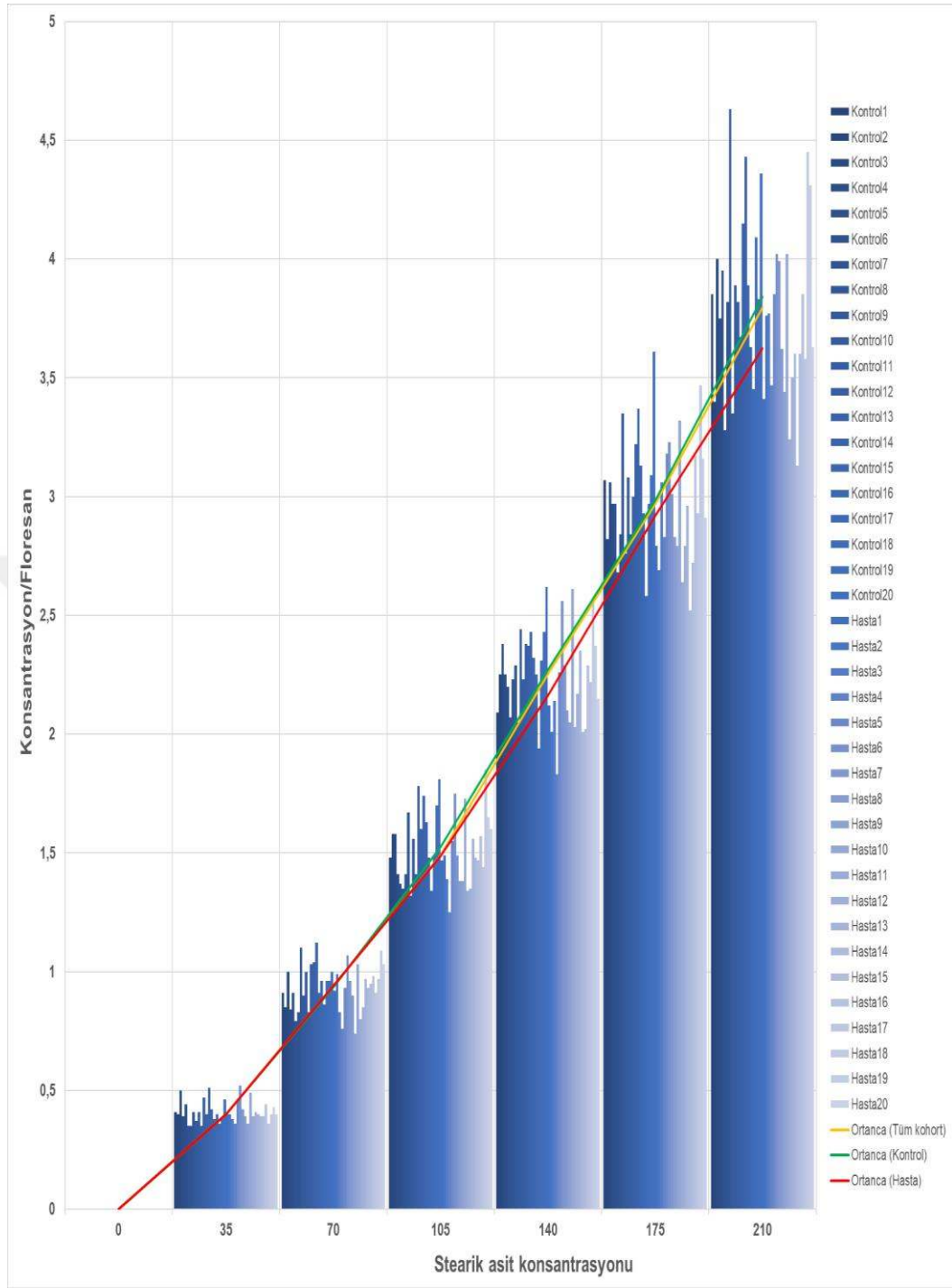
Şekil 4.10. Oleik asitin serum albüminine bağlanmasına dair ANS-floresan yerdeğiştirme eğrileri



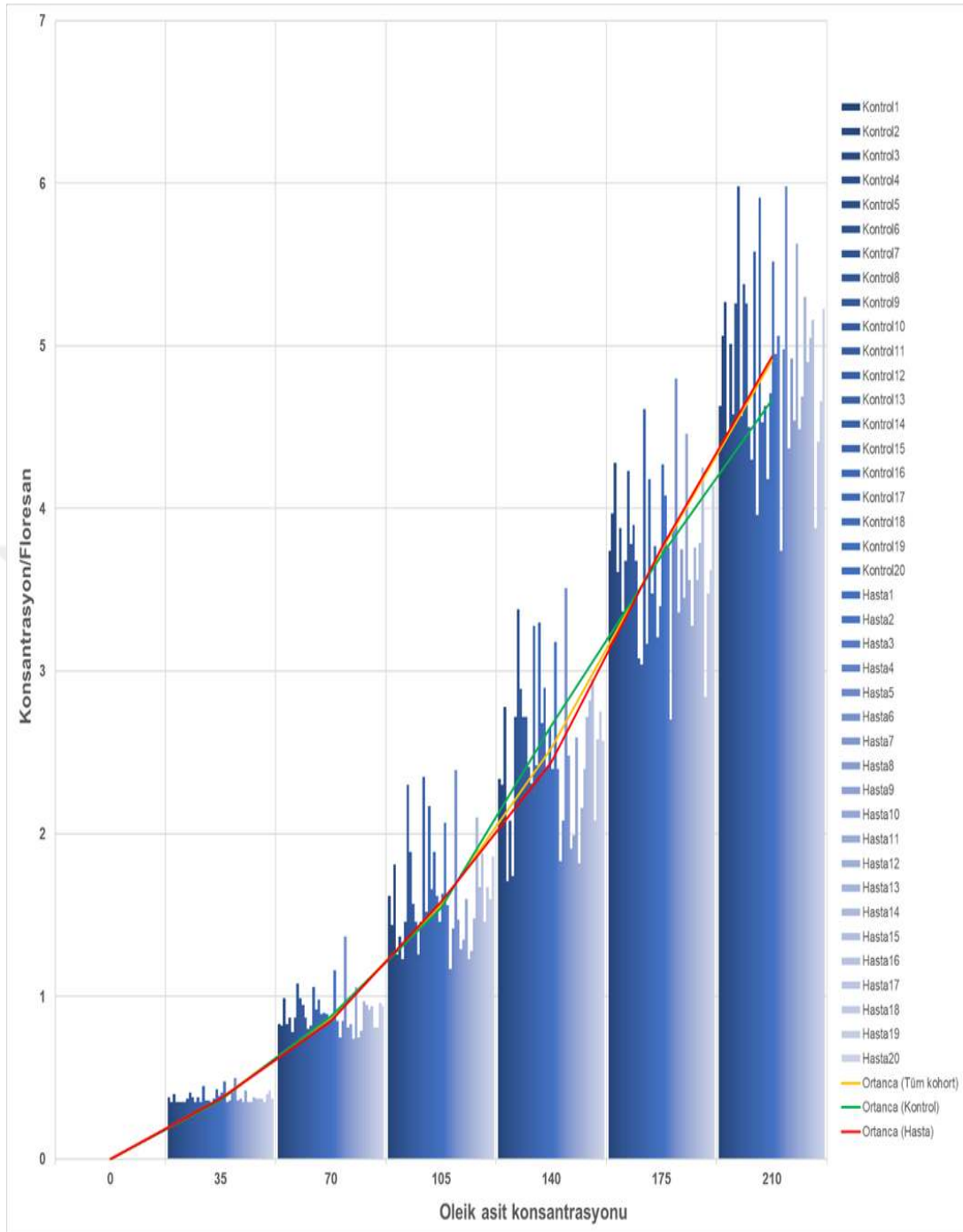
Şekil 4.11. Palmitik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği



Şekil 4.12. Miristik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği



Şekil 4.13. Stearik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği



Şekil 4.14. Oleik asitin kontrol ve hasta grubu albüminlerine bağlanmasına dair [oleik asit] / ΔF (%)’nin [oleik asit]’e karşı lineer grafiği

Tüm gruplarda bütün yağ asitlerinin artan konsantrasyonuna karşı floresan söndürme derecelerindeki (%) değişiklikler Tablo 4.11’deki gibidir. Test edilen tüm yağ asitlerinin konsantrasyonlarındaki artışa karşılık gelen floresan düzeylerindeki (%) azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu uygulanan yöntemin çalıştığına işaret etmektedir. Tüm yağ asitlerindeki anlamlı farklılığın hangi konsantrasyon ikilisinden ileri geldiğini ortaya çıkarmak için ikili karşılaştırmalar yapıldı. İkili karşılaştırmalar Tablo 4.12, 4.13,

4.14 ve 4.15’de gösterilmiştir. İkili karşılaştırmalar, özellikle en yüksek konsantrasyonlarda düşük konsantrasyondaki yağ asitlerine göre floresan düzeyinde anlamlı azalmalar meydana getirdi. En belirgin farklılıkların 140, 175 ve 210 μM konsantrasyonlarda olduğu görülmektedir.

Hasta ve kontrol grupları arasında floresan söndürme derecelerindeki farklılıkların karşılaştırması Tablo 4.16’da yağ asidi konsantrasyonu/floresan söndürme değerlerindeki farklılıkların karşılaştırması 4.17’de gösterilmiştir.



Tablo 4.11. Tüm gruplarda artan yağ asiti konsantrasyonuna karşı floresan yer değiştirme derecelerinin (%) karşılaştırılması

Değişke n	Örnekle m	Konsantrasyon								p*
PA		0	35	70	105	140	175	210		
	Tüm kohort	100±0 100 (0)	88.83±6.48 89.15 (9.83)	77.21±6.55 76.85 (9.26)	69.89±5.96 69.3 (7.46)	65.27±5.32 65.66 (7.8)	61.95±5.39 61.58 (7.26)	58.37±4.92 59.41 (6.49)		<0.00 1
	Kontrol	100±0 100 (0)	89.42±6.06 88.22 (10.12)	76.68±7.38 74.33 (10.65)	69.41±5.8 69.55 (5.55)	64.29±5.11 64.98 (5.85)	61.1±5.45 61.41 (7.19)	57.06±5.16 57.83 (5.16)		<0.00 1
	Hasta	100±0 100 (0)	88.24±6.98 90.66 (10.65)	77.74±5.73 77.22 (7.36)	70.38±6.22 69.25 (8.16)	66.25±5.47 66.11 (9.13)	62.81±5.33 62.77 (8.52)	59.67±4.41 60.11 (7.87)		<0.00 1
MA	Tüm kohort	100±0 100 (0)	79.46±8.54 80.55 (13.11)	63.73±7.3 63.98 (6.08)	53.62±6.03 52.87 (7.97)	47.55±5.29 47.03 (6.43)	43.6±4.33 4.71 (6.31)	39.91±4.17 40.01 (4.7)		<0.00 1
	Kontrol	100±0 100 (0)	80.38±8.1 79.34 (11.6)	62.15±6.95 63.63 (8.86)	52.89±5.64 52.87 (5.5)	46.35±4.78 46.72 (4.45)	43.4±4.51 43.57 (5.61)	38.89±3.92 39.24 (4.45)		<0.00 1
	Hasta	100±0 100 (0)	78.55±9.07 81.34 (14.32)	65.32±7.48 63.98 (7.22)	54.35±6.47 53.5 (9.59)	48.74±5.62 48.35 (8.88)	43.81±4.25 44.1 (6.56)	40.93±4.27 41.34 (6.07)		<0.00 1
SA	Tüm kohort	100±0 100 (0)	85.3±8.38 85.96 (9.46)	75.26±7.75 73.85 (11.95)	69.4±6.67 70.3 (9.90)	62.69±5.21 62.01 (7.69)	58.94±4.74 58.84 (6.66)	55.97±4.81 55.27 (6.84)		<0.00 1
	Kontrol	100±0 100 (0)	85.64±9.13 85.65 (12.81)	74.9±7.43 74.66 (12.61)	68.81±6.72 68.51 (10.74)	61.57±4.35 61.19 (4.01)	58.26±4.62 58.51 (5.22)	55.02±4.55 54.63 (5.64)		<0.00 1
	Hasta	100±0 100 (0)	84.96±7.77 86.37 (6.99)	75.63±8.24 73.85 (8.86)	69.99±6.75 70.52 (9.45)	63.8±5.85 64.71 (8.39)	59.61±4.89 59.79 (7.54)	56.92±4.99 57.82 (6.76)		<0.00 1
OA	Tüm kohort	100±0 100 (0)	91.44±7.85 93.33 (11.71)	78.36±9.13 79.66 (12)	67.12±11.64 66.79 (13.03)	57.42±10.65 55.72 (12.27)	47.71±6.15 46.67 (7.65)	43.53±4.97 42.73 (6.59)		<0.00 1
	Kontrol	100±0 100 (0)	92.72±6.78 94.17 (9.76)	77.99±6.98 79.13 (11.66)	66.09±11.98 67.75 (15.81)	56.22±10.81 55.01 (10.77)	47.79±5.48 47.13 (7.23)	43.44±4.85 44.91 (6.63)		<0.00 1
	Hasta	100±0 100 (0)	90.17±8.78 93.01 (12.55)	78.73±11.04 81.43 (12.88)	68.16±11.5 66.76 (13.2)	58.62±10.62 57.28 (16.14)	47.63±6.9 46.54 (7.91)	43.61±5.21 42.49 (6.09)		<0.00 1

Değişkenler art.ort ± std. sapma ve ortanca (çeyreklikler arası genişlik) istatistikleri ile özetlendi.

*: Friedman testi, p<0.05 olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

Tablo 4.12. Palmitik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları

İkili karşılaştırmalar									
Tüm kohort				Kontrol			Hasta		
Grup1 - Grup2	Test istatistiği	Std. hata	<i>p</i> *	Test istatistiği	Std. hata	<i>p</i> *	Test istatistiği	Std. hata	<i>p</i> *
PA_210-PA_175	0.975	0.483	0.914	1	0.683	1	0.95	0.683	1
PA_210-PA_140	2	0.483	0.001	2	0.683	0.072	2	0.683	0.072
PA_210-PA_105	2.925	0.483	<0.001	3	0.683	<0.001	2.85	0.683	0.001
PA_210-PA_70	3.975	0.483	<0.001	4	0.683	<0.001	3.95	0.683	<0.001
PA_210-PA_35	4.988	0.483	<0.001	5.025	0.683	<0.001	4.95	0.683	<0.001
PA_210-PA_0	5.963	0.483	<0.001	5.975	0.683	<0.001	5.95	0.683	<0.001
PA_175-PA_140	1.025	0.483	0.711	1	0.683	1	1.05	0.683	1
PA_175-PA_105	1.95	0.483	0.001	2	0.683	0.072	1.9	0.683	0.114
PA_175-PA_70	3	0.483	<0.001	3	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
PA_175-PA_35	4.013	0.483	<0.001	4.025	0.683	<0.001	4	0.683	<0.001
PA_175-PA_0	4.988	0.483	<0.001	4.975	0.683	<0.001	5	0.683	<0.001
PA_140-PA_105	0.925	0.483	1	1	0.683	1	0.85	0.683	1
PA_140-PA_70	1.975	0.483	0.001	2	0.683	0.072	1.95	0.683	0.091
PA_140-PA_35	2.988	0.483	<0.001	3.025	0.683	<0.001	2.95	0.683	<0.001
PA_140-PA_0	3.963	0.483	<0.001	3.975	0.683	<0.001	3.95	0.683	<0.001
PA_105-PA_70	1.05	0.483	0.624	1	0.683	1	1.1	0.683	1
PA_105-PA_35	2.063	0.483	<0.001	2.025	0.683	0.064	2.1	0.683	0.044
PA_105-PA_0	3.038	0.483	<0.001	2.975	0.683	<0.001	3.1	0.683	0
PA_70-PA_35	1.013	0.483	0.758	1.025	0.683	1	1	0.683	1
PA_70-PA_0	1.988	0.483	0.001	1.975	0.683	0.081	2	0.683	0.072
PA_35-PA_0	0.975	0.483	0.914	0.95	0.683	1	1	0.683	1

*: Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon işaretli sıralar testi, $p < 0,05$ olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

Tablo 4.13. Miristik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları

İkili karşılaştırmalar									
Tüm kohort				Kontrol			Hasta		
Grup1 - Grup2	Test istatistiği	Std. hata	p*	Test istatistiği	Std. hata	p*	Test istatistiği	Std. hata	p*
MA_210-MA_175	1	0,483	0,807	1	0,683	1	1	0,683	1
MA_210-MA_140	2	0,483	0,001	2	0,683	0,072	2	0,683	0,072
MA_210-MA_105	3	0,483	<0,001	3	0,683	<0,001	3	0,683	<0,001
MA_210-MA_70	4	0,483	<0,001	4	0,683	<0,001	4	0,683	<0,001
MA_210-MA_35	5	0,483	<0,001	5	0,683	<0,001	5	0,683	<0,001
MA_210-MA_0	6	0,483	<0,001	6	0,683	<0,001	6	0,683	<0,001
MA_175-MA_140	1	0,483	0,807	1	0,683	1	1	0,683	1
MA_175-MA_105	2	0,483	0,001	2	0,683	0,072	2	0,683	0,072
MA_175-MA_70	3	0,483	<0,001	3	0,683	<0,001	3	0,683	<0,001
MA_175-MA_35	4	0,483	<0,001	4	0,683	<0,001	4	0,683	<0,001
MA_175-MA_0	5	0,483	<0,001	5	0,683	<0,001	5	0,683	<0,001
MA_140-MA_105	1	0,483	0,807	1	0,683	1	1	0,683	1
MA_140-MA_70	2	0,483	0,001	2	0,683	0,072	2	0,683	0,072
MA_140-MA_35	3	0,483	<0,001	3	0,683	<0,001	3	0,683	<0,001
MA_140-MA_0	4	0,483	<0,001	4	0,683	<0,001	4	0,683	<0,001
MA_105-MA_70	1	0,483	0,807	1	0,683	1	1	0,683	1
MA_105-MA_35	2	0,483	0,001	2	0,683	0,072	2	0,683	0,072
MA_105-MA_0	3	0,483	<0,001	3	0,683	<0,001	3	0,683	<0,001
MA_70-MA_35	1	0,483	0,807	1	0,683	1	1	0,683	1
MA_70-MA_0	2	0,483	0,001	2	0,683	0,072	2	0,683	0,072
MA_35-MA_0	1	0,483	0,807	1	0,683	1	1	0,683	1

Tablo 4.14. Stearik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değıştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları

İkili karşılaştırmalar									
Tüm kohort				Kontrol			Hasta		
Grup1 - Grup2	Test istatistiğı	Std. hata	<i>p</i> *	Test istatistiğı	Std. hata	<i>p</i> *	Test istatistiğı	Std. hata	<i>p</i> *
SA_210-SA_175	1	0.483	0.807	1	0.683	1	1	0.683	1
SA_210-SA_140	2.013	0.483	0.001	2.025	0.683	0.064	2	0.683	0.072
SA_210-SA_105	3	0.483	<0.001	3	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
SA_210-SA_70	3.988	0.483	<0.001	3.975	0.683	<0.001	4	0.683	<0.001
SA_210-SA_35	5	0.483	<0.001	5	0.683	<0.001	5	0.683	<0.001
SA_210-SA_0	6	0.483	<0.001	6	0.683	<0.001	6	0.683	<0.001
SA_175-SA_140	1.013	0.483	0.758	1.025	0.683	1	1	0.683	1
SA_175-SA_105	2	0.483	0.001	2	0.683	0.072	2	0.683	0.072
SA_175-SA_70	2.988	0.483	<0.001	2.975	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
SA_175-SA_35	4	0.483	<0.001	4	0.683	<0.001	4	0.683	<0.001
SA_175-SA_0	5	0.483	<0.001	5	0.683	<0.001	5	0.683	<0.001
SA_140-SA_105	0.988	0.483	0.859	0.975	0.683	1	1	0.683	1
SA_140-SA_70	1.975	0.483	0.001	1.95	0.683	0.091	2	0.683	0.072
SA_140-SA_35	2.988	0.483	<0.001	2.975	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
SA_140-SA_0	3.988	0.483	<0.001	3.975	0.683	<0.001	4	0.683	<0.001
SA_105-SA_70	0.988	0.483	0.859	0.975	0.683	1	1	0.683	1
SA_105-SA_35	2	0.483	0.001	2	0.683	0.072	2	0.683	0.072
SA_105-SA_0	3	0.483	<0.001	3	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
SA_70-SA_35	1.013	0.483	0.758	1.025	0.683	1	1	0.683	1
SA_70-SA_0	2.013	0.483	0.001	2.025	0.683	0.064	2	0.683	0.072
SA_35-SA_0	1	0.483	0.807	1	0.683	1	1	0.683	1

*: Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon işaretli sıralar testi, $p < 0.05$ olan p değeri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

Tablo 4.15. Oleik asitin farklı konsantrasyonları için floresan yer değiştirme derecelerinin (%) ikili karşılaştırmaları

İkili karşılaştırmalar									
Tüm kohort				Kontrol			Hasta		
Grup1 - Grup2	Test istatistiği	Std. hata	<i>p</i> *	Test istatistiği	Std. hata	<i>p</i> *	Test istatistiği	Std. hata	<i>p</i> *
OA_210-OA_175	1	0.483	0.807	1	0.683	1	1	0.683	1
OA_210-OA_140	2	0.483	0.001	2	0.683	0.072	2	0.683	0.072
OA_210-OA_105	3	0.483	<0.001	3	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
OA_210-OA_70	4	0.483	<0.001	4	0.683	<0.001	4	0.683	<0.001
OA_210-OA_35	5.038	0.483	<0.001	5.025	0.683	<0.001	5.05	0.683	<0.001
OA_210-OA_0	5.963	0.483	<0.001	5.975	0.683	<0.001	5.95	0.683	<0.001
OA_175-OA_140	1	0.483	0.807	1	0.683	1	1	0.683	1
OA_175-OA_105	2	0.483	0.001	2	0.683	0.072	2	0.683	0.072
OA_175-OA_70	3	0.483	<0.001	3	0.683	<0.001	3	0.683	<0.001
OA_175-OA_35	4.037	0.483	<0.001	4.025	0.683	<0.001	4.05	0.683	<0.001
OA_175-OA_0	4.963	0.483	<0.001	4.975	0.683	<0.001	4.95	0.683	<0.001
OA_140-OA_105	1	0.483	0.807	1	0.683	1	1	0.683	1
OA_140-OA_70	2	0.483	0.001	2	0.683	0.072	2	0.683	0.072
OA_140-OA_35	3.038	0.483	<0.001	3.025	0.683	<0.001	3.05	0.683	<0.001
OA_140-OA_0	3.963	0.483	<0.001	3.975	0.683	<0.001	3.95	0.683	<0.001
OA_105-OA_70	1	0.483	0.807	1	0.683	1	1	0.683	1
OA_105-OA_35	2.038	0.483	0.001	2.025	0.683	0.064	2.05	0.683	0.057
OA_105-OA_0	2.963	0.483	<0.001	2.975	0.683	<0.001	2.95	0.683	<0.001
OA_70-OA_35	1.038	0.483	0.666	1.025	0.683	1	1.05	0.683	1
OA_70-OA_0	1.963	0.483	0.001	1.975	0.683	0.081	1.95	0.683	0.091
OA_35-OA_0	0.925	0.483	1	0.95	0.683	1	0.9	0.683	1

*: Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon işaretli sıralar testi, $p < 0.05$ olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

Tablo 4.16. Hasta ve kontrol grubunda artan yağ asiti konsantrasyonlarına karşın floresan yer değıştirme derecelerin (%) karşılaştırılması

Değişkenler	Kontrol (n=20)	Hasta (n=20)	p
PA_35	89.42±6.06 88.22 (10.12)	88.24±6.98 90.66 (10.65)	0.738
PA_70	76.68±7.38 74.33 (10.65)	77.74±5.73 77.22 (7.36)	0.512
PA_105	69.41±5.8 69.55 (5.55)	70.38±6.22 69.25 (8.16)	0.659
PA_140	64.29±5.11 64.98 (5.85)	66.25±5.47 66.11 (9.13)	0.265
PA_175	61.1±5.45 61.41 (7.19)	62.81±5.33 62.77 (8.52)	0.277
PA_210	57.06±5.16 57.83 (5.16)	59.67±4.41 60.11 (7.87)	0.086
MA_35	80.38±8.1 79.34 (11.6)	78.55±9.07 81.34 (14.32)	0.82
MA_70	62.15±6.95 63.63 (8.86)	65.32±7.48 63.98 (7.22)	0.277
MA_105	52.89±5.64 52.87 (5.5)	54.35±6.47 53.5 (9.59)	0.678
MA_140	46.35±4.78 46.72 (4.45)	48.74±5.62 48.35 (8.88)	0.165
MA_175	43.4±4.51 43.57 (5.61)	43.81±4.25 44.1 (6.56)	0.799
MA_210	38.89±3.92 39.24 (4.45)	40.93±4.27 41.34 (6.07)	0.149
SA_35	85.64±9.13 85.65 (12.81)	84.96±7.77 86.37 (6.99)	0.862
SA_70	74.9±7.43 74.66 (12.61)	75.63±8.24 73.85 (8.86)	1
SA_105	68.81±6.72 68.51 (10.74)	69.99±6.75 70.52 (9.45)	0.602
SA_140	61.57±4.35 61.19 (4.01)	63.8±5.85 64.71 (8.39)	0.134
SA_175	58.26±4.62 58.51 (5.22)	59.61±4.89 59.79 (7.54)	0.341
SA_210	55.02±4.55 54.63 (5.64)	56.92±4.99 57.82 (6.76)	0.192
OA_35	92.72±6.78 94.17 (9.76)	90.17±8.78 93.01 (12.55)	0.445
OA_70	77.99±6.98 79.13 (11.66)	78.73±11.04 81.43 (12.88)	0.478
OA_105	66.09±11.98 67.75 (15.81)	68.16±11.5 66.76 (13.2)	0.799
OA_140	56.22±10.81 55.01 (10.77)	58.62±10.62 57.28 (16.14)	0.512
OA_175	47.79±5.48 47.13 (7.23)	47.63±6.9 46.54 (7.91)	0.841
OA_210	43.44±4.85 44.91 (6.63)	43.61±5.21 42.49 (6.09)	0.968

PA: Palmitik asit MA: Miristik asit SA: Stearik asit OA: Oleik asit

Tablo 4.18. Hasta ve kontrol grubunda yağ asidi konsantrasyonu/ floresan yer değıştirme değerlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	Kontrol (n=20)	Hasta (n=20)	p
PA_35	0.39±0.03 0.39 (0.05)	0.39±0.03 0.38 (0.05)	0.738
PA_70	0.92±0.09 0.94 (0.12)	0.9±0.07 0.9 (0.09)	0.602
PA_105	1.52±0.13 1.51 (0.12)	1.5±0.13 1.51 (0.17)	0.583
PA_140	2.19±0.17 2.15 (0.2)	2.12±0.18 2.12 (0.29)	0.277
PA_175	2.88±0.25 2.85 (0.35)	2.8±0.24 2.78 (0.38)	0.265
PA_210	3.71±0.36 3.63 (0.34)	3.53±0.27 3.49 (0.47)	0.091
MA_35	0.44±0.05 0.44 (0.07)	0.45±0.06 0.43 (0.08)	0.718
MA_70	1.14±0.14 1.1 (0.16)	1.08±0.13 1.09 (0.11)	0.289
MA_105	2.003±0.232 1.98 (0.2)	1.954±0.228 1.96 (0.35)	0.718

MA_140	3.05±0.34 2.99 (0.28)	2.9±0.34 2.9 (0.55)	0.165
MA_175	4.07±0.45 4.01 (0.54)	4.03±0.4 3.97 (0.62)	0.779
MA_210	5.45±0.57 5.35 (0.62)	5.18±0.56 5.08 (0.76)	0.149
SA_35	0.41±0.05 0.4 (0.05)	0.41±0.04 0.4 (0.04)	0.883
SA_70	0.94±0.09 0.94 (0.14)	0.93±0.1 0.94 (0.11)	0.904
SA_105	1.54±0.15 1.53 (0.24)	1.51±0.15 1.49 (0.21)	0.583
SA_140	2.28±0.16 2.27 (0.16)	2.21±0.21 2.16 (0.28)	0.142
SA_175	3.02±0.25 2.99 (0.27)	2.95±0.25 2.92 (0.38)	0.355
SA_210	3.86±0.36 3.84 (0.4)	3.71±0.33 3.63 (0.43)	0.174
OA_35	0.374±0.029 0.365 (0.035)	0.387±0.043 0.37 (0.055)	0.369
OA_70	0.9±0.08 0.88 (0.14)	0.91±0.15 0.85 (0.15)	0.495
OA_105	1.64±0.33 1.55 (0.4)	1.61±0.32 1.58 (0.38)	0.904
OA_140	2.59±0.46 2.67 (0.51)	2.46±0.45 2.44 (0.66)	0.355
OA_175	3.7±0.42 3.71 (0.55)	3.74±0.51 3.76 (0.64)	0.82
OA_210	4.89±0.56 4.67 (0.75)	4.87±0.55 4.94 (0.68)	1

PA: Palmitik asit MA: Miristik asit SA: Stearik asit OA: Oleik asit

4.6. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Serum ve Albümin Yağ Asidi % Kompozisyonlarının Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları için serum ve albüminde bulunan yağ asitlerinin analizi GC-MS ile yapıldı. Çalışmada standart yağ asidi karışımı Supelco 37 Component FAME Mix kullanıldı. Yağ asidi karışımının kromatogramı Şekil 4.13’de görülmektedir. Kontrol ve hasta gruplarına ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 de belirtilmiştir. Numunelerde çoğunlukla gama linoleik asit, linoleik asit, oleik asit, stearik asit bulunduğu gözlemlendi. Bu yağ asitleri dışında farklı numunelerde farklı yağ asitleri de tespit edildi. Hasta ve kontrol serumu ile hasta ve kontrol albumin % yağ asidi kompozisyonlarının karşılaştırması Tablo 4.18 ‘de gösterilmiştir.

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular şu şekilde özetlenebilir:

- Gama-linoleik asit yüzdesi hasta albümininde kontrol albüminine göre daha düşük bulundu; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p = 0,052$), ancak p değeri anlamlılık eşiğine yakındı.
- Linoleik asit düzeyi hasta albümininde kontrol grubuna göre daha düşüktü ve fark anlamlıydı ($p = 0,038$).
- Stearik asit düzeyi hasta albümininde kontrol albüminine göre anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p = 0,003$).
- Kaproik asit düzeyi albümin fraksiyonunda hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p = 0,007$).

- Oleik asit düzeyi hasta serumunda kontrol serumuna göre anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p = 0,013$).
- Eikosapentaenoik asit (EPA) yüzdesi hasta serumunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p = 0,035$).
- Palmitik asit düzeyi hasta serumunda kontrole kıyasla anlamlı biçimde daha düşük bulundu ($p < 0,001$).
- Araşidonik asit düzeyi hasta serumunda kontrol serumuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p = 0,040$).

Kontrol grubunda serum ve albümin; hasta grubunda serum ve albümin yağ asidi kompozisyonunun karşılaştırılması ise Tablo 4.19’da gösterilmiştir.

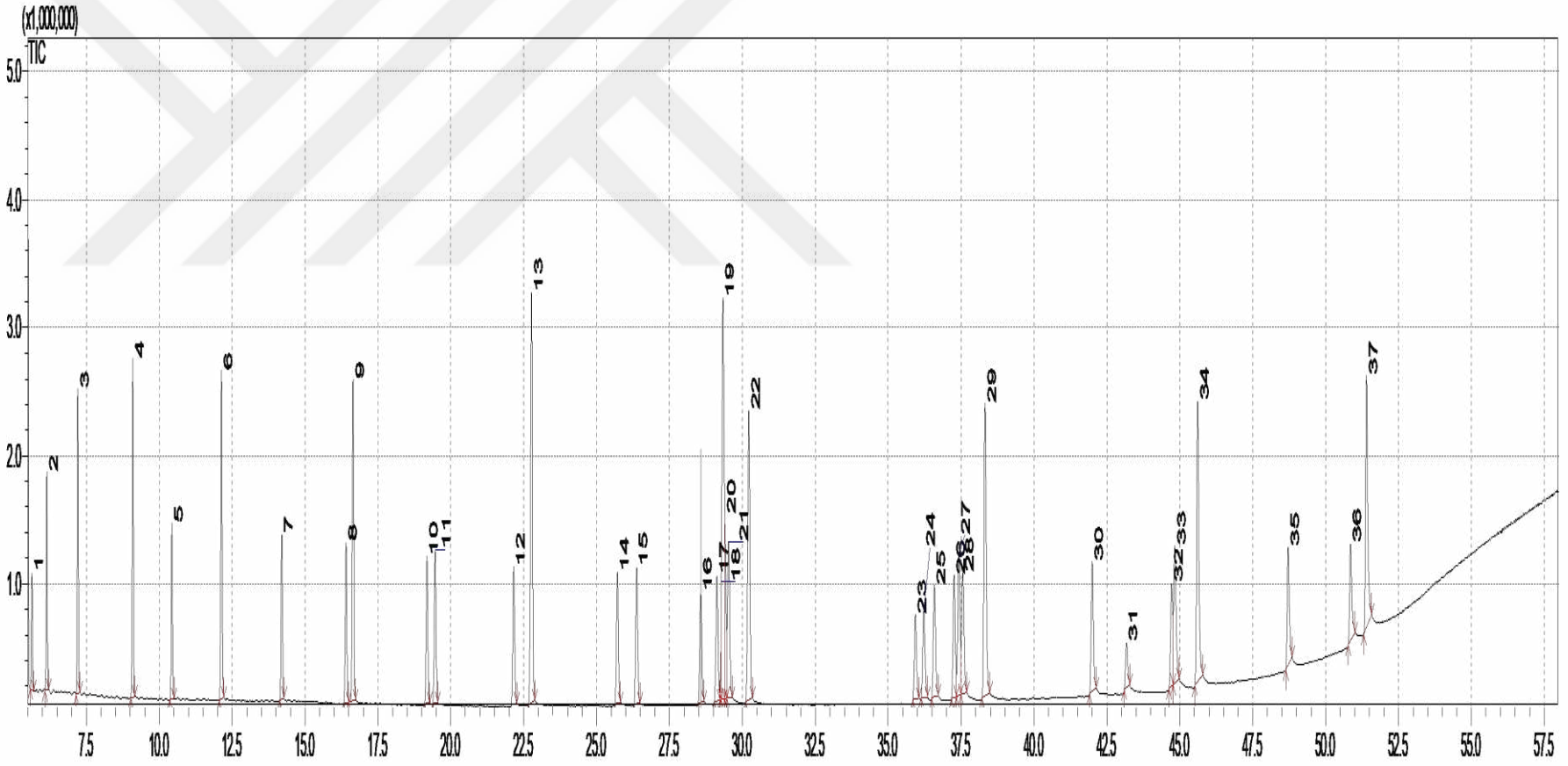
İstatistiksel olarak bulgular şu şekilde özetlenebilir:

- Gama linoleik asit kontrol albümininde kontrol serumuna göre anlamlı yüksek bulundu. Aynı anlamlılık hasta albümini ve hasta serumu arasında gözlenmedi.
- Linoleik asit hem hasta serumunda hem de kontrol serumunda albümine göre anlamlı yüksek bulundu.
- Oleik asit hem hasta serumunda hem de kontrol serumunda albümine göre anlamlı yüksek bulundu.
- Stearik asit yüzdesi hem hasta hem de kontrol albümininde seruma göre anlamlı yüksek bulundu.
- Kaproik asit yüzdesi hem hasta hem de kontrol albümininde seruma göre anlamlı yüksek bulundu.
- Linoleik ve oleik asit yüzdeleri hem kontrol hem de hasta grubunda serumda albumine göre yüksek iken stearik ve kaproik asit yüzdeleri hem kontrol hem de hasta grubunda albuminde seruma göre yüksek bulundu. Hasta serum ve albumini yağ asitleri kompozisyonlarının % karşılaştırmalarında kontrole göre anlamlı bir fark görülmemektedir. Diğer bir deyişle, albuminde yüksek olan veya serumda yüksek olan yağ asiti kontrol grubunda hangisi ise hasta grubunda da aynı yağ asiti olduğu gözlenmektedir. Öte yandan kontrol albumini ile hasta albumini karşılaştırıldığında stearik asit yüzdesinin hasta albumininde anlamlı olarak yüksek olduğu, linoleik ve kaproik asit yüzdelerinin ise daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak bu değişimlerin

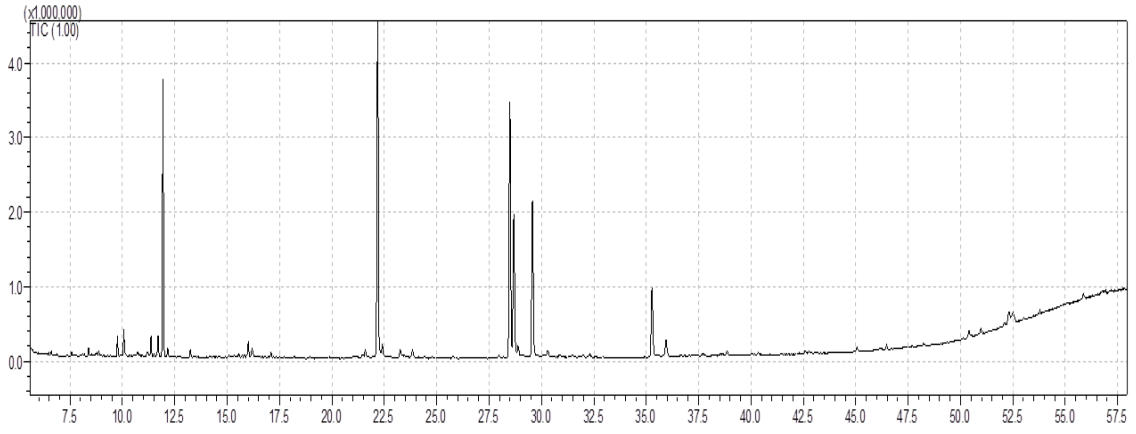
serumdaki yansımaları görülemedi. Hasta serumunda kontrole göre EPA ve palmitik asit azalırken oleik asit ve araşidonik asit yüzdeleri arttı.

İlave olarak, albümin ve serum yüzdeleri oranlararak serum ve albümin arasındaki yağ asidi alışverişinde meydana gelebilecek değişimler değerlendirildi. Bu amaçla kontrol ve hasta grubunda anlamlı farklılık gösteren bazı yağ asitlerinin % değerlerinin albumin/serum oranları belirlendi (Tablo 4.20). Stearik asit için A/G oranı kontrol grubunda 1.97 iken hasta grubunda 2.61'dir, stearik asit oranının hasta grubunda albümin lehine arttığı gözlemlendi. Oysa linoleik, oleik ve kaproik yağ asitlerinde A/G oranı hasta grubunda kontrole göre azaldığı gözlemlendi.

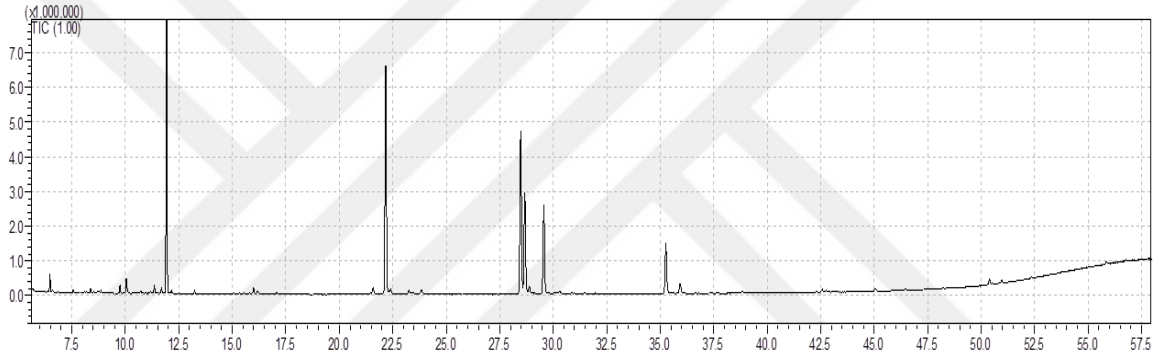




Şekil 4.15. GC-MS analizinde kullanılan standard yağ asitleri karışımına ait kromatogram



Şekil 4.16. Kontrol grubuna ait bir serum numunesinde gözlenen örnek GC-MS kromatogramı



Şekil 4.17. Hasta grubuna ait bir serum numunesinde gözlenen örnek GC-MS kromatogramı

Tablo 4.18. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum ve albümin yağ asiti % kompozisyonlarının karşılaştırılması

Değişkenler	Kontrol (Serum) (n=20)	Hasta (Serum) (n=20)	<i>p</i> *	Kontrol (Albumin) (n=20)	Hasta (Albumin) (n=20)	<i>p</i> *
Kaprik asit metil esteri	0.03±0.13 0 (0)	0±0 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Laurik asit metil esteri	0.98±4.37 0 (0)	0±0 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Miristoleik asit metil esteri	0.04±0.17 0 (0)	0±0 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Miristik asit metil esteri	0.5±0.55 0.65 (0.75)	0.48±0.38 0.55 (0.66)	0.82	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Palmitoleik asit metil esteri	0.51±0.57 0.5 (0.76)	0.75±0.6 0.82 (1.14)	0.183	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Gama linoleik asit metil esteri	29.4±2.54 29.17 (3.19)	29.25±3.61 29.22 (3.81)	0.968	46.55±3.64 46.26 (3.33)	34.04±17.43 44.43 (34.98)	0.052
Linoleik asit metil esteri	27.82±4.55 29.1 (6.34)	25.78±6.63 26.69 (5.54)	0.327	12.31±3.95 12.68 (3.62)	8.8±5.18 9.63 (9.24)	0.038
Oleik asit metil esteri	15.26±3.04 15.12 (3.09)	17.72±3.19 17.52 (4.34)	0.013	6.16±2.18 5.79 (2.97)	5.13±3.12 4.56 (4.66)	0.174
Stearik asit metil esteri	13.36±1.57 13.26 (1.61)	17.24±11.48 13.28 (3.76)	0.904	26.31±2.98 26.3 (4.57)	45.01±24.57 29.7 (49.3)	0.003
Eikosapentaenoik asit metil esteri	6.32±7.49 6.15 (10.35)	1.24±2.21 0 (1.04)	0.035	0.63±1.32 0 (0)	0.11±0.51 0 (0)	0.398
Homo gama linolenik asit	0.85±0.75 1.08 (1.52)	0.95±0.8 1.25 (1.49)	0.82	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Heneikosilik asit metil esteri	0.21±0.39 0 (0.27)	0.17±0.27 0 (0.42)	0.968	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Erusik asit metil esteri	0.03±0.13 0 (0)	0±0 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0.31±0.99 0 (0)	0.602
Palmitik asit metil esteri	0.8±0.75 0.72 (1.1)	0.02±0.09 0 (0)	<0.001	0.24±0.59 0 (0)	0±0 0 (0)	0.429
Vaksenik asit	0.19±0.48 0 (0)	0.27±0.54 0 (0.12)	0.62	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Nervonik asit metil esteri	0.14±0.36 0 (0)	0.11±0.25 0 (0)	0.883	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Kaproik asit metil esteri	1.88±3.68 1.48 (1.63)	1.81±1.36 1.42 (0.73)	0.738	6.69±1.46 6.17 (1.83)	5.69±1.51 5.33 (1.54)	0.007
Araşidonik asit metil esteri	1.5±2.75 0 (2.19)	3.9±3.68 4.17 (7.02)	0.04	1.13±1.47 0 (2.61)	1.02±1.45 0 (1.95)	0.841
Behenik asit metil esteri	0.07±0.18 0 (0)	0.1±0.17 0 (0.16)	0.698	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Alfa linolenik asit metil esteri	0.02±0.11 0 (0)	0.12±0.19 0 (0.31)	0.201	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Lignoserik asit	0.03±0.13 0 (0)	0.09±0.17 0 (0.16)	0.314	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1

Değişkenler art.ort ± std. sapma ve ortanca (çeyreklikler arası genişlik) istatistikleri ile özetlendi.

*: Mann-Whitney U testi, $p < 0.05$ olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

Tablo 4.19. Kontrol grubunda serum ve albümin; hasta grubunda serum ve albümin yağ asidi kompozisyonunun karşılaştırılması

Değişkenler	Albümin (Kontrol) (n=20)	Serum (Kontrol) (n=20)	<i>p</i> *	Albümin (Hasta) (n=20)	Serum (Hasta) (n=20)	<i>p</i> *
Kaprik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.03±0.13 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Laurik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.98±4.37 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Miristoleik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.04±0.17 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1
Miristik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.5±0.55 0.65 (0.75)	0.002	0±0 0 (0)	0.48±0.38 0.55 (0.66)	<0.001
Palmitoleik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.51±0.57 0.5 (0.76)	0.001	0±0 0 (0)	0.75±0.6 0.82 (1.14)	<0.001
Gama linoleik asit metil esteri	46.55±3.64 46.26 (3.33)	29.4±2.54 29.17 (3.19)	<0.001	34.04±17.43 44.43 (34.98)	29.25±3.61 29.22 (3.81)	0.108
Linoleik asit metil esteri	12.31±3.95 12.68 (3.62)	27.82±4.55 29.1 (6.34)	<0.001	8.8±5.18 9.63 (9.24)	25.78±6.63 26.69 (5.54)	<0.001
Oleik asit metil esteri	6.16±2.18 5.79 (2.97)	15.26±3.04 15.12 (3.09)	<0.001	5.13±3.12 4.56 (4.66)	17.72±3.19 17.52 (4.34)	<0.001
Stearik asit metil esteri	26.31±2.98 26.3 (4.57)	13.36±1.57 13.26 (1.61)	<0.001	45.01±24.57 29.7 (49.3)	17.24±11.48 13.28 (3.76)	<0.001
Eikosapentaenoik asit metil esteri	0.63±1.32 0 (0)	6.32±7.49 6.15 (10.35)	0.012	0.11±0.51 0 (0)	1.24±2.21 0 (1.04)	0.102
homo gama linolenik asit	0±0 0 (0)	0.85±0.75 1.08 (1.52)	0.001	0±0 0 (0)	0.95±0.8 1.25 (1.49)	<0.001
Heneikosilik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.21±0.39 0 (0.27)	0.183	0±0 0 (0)	0.17±0.27 0 (0.42)	0.108
Erusik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.03±0.13 0 (0)	0.799	0.31±0.99 0 (0)	0±0 0 (0)	0.602
Palmitik asit metil esteri	0.24±0.59 0 (0)	0.8±0.75 0.72 (1.1)	0.007	0±0 0 (0)	0.02±0.09 0 (0)	0.799
Vaksenik asit	0±0 0 (0)	0.19±0.48 0 (0)	0.429	0±0 0 (0)	0.27±0.54 0 (0.12)	0.183
Nervonik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.14±0.36 0 (0)	0.429	0±0 0 (0)	0.11±0.25 0 (0)	0.289
Kaproik asit metil esteri	6.69±1.46 6.17 (1.83)	1.88±3.68 1.48 (1.63)	<0.001	5.69±1.51 5.33 (1.54)	1.81±1.36 1.42 (0.73)	<0.001
Araşidonik asit metil esteri	1.13±1.47 0 (2.61)	1.5±2.75 0 (2.19)	0.799	1.02±1.45 0 (1.95)	3.9±3.68 4.17 (7.02)	0.023
Behenik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.07±0.18 0 (0)	0.429	0±0 0 (0)	0.1±0.17 0 (0.16)	0.183
Alfa limolenik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0.02±0.11 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0.12±0.19 0 (0.31)	0.108
Lignoserik asit	0±0 0 (0)	0.03±0.13 0 (0)	0.799	0±0 0 (0)	0.09±0.17 0 (0.16)	0.183

Değişkenler art.ort ± std. sapma ve ortanca (çeyreklikler arası genişlik) istatistikleri ile özetlendi.

*: Mann-Whitney U testi, $p < 0,05$ olan p değerleri koyu yazı karakteri ile belirtildi.

Tablo 4.20. Kontrol ve hasta grubunda anlamlı farklılık gösteren bazı yağ asitleri albümin/serum oranı

	Kontrol Albümin/ Serum oranı	Hasta Albümin/ Serum oranı	Kontrol ve hasta oranlarının yüzde değişimi
Linoleik asit	0.44	0.34	22,73
Oleik asit	0.40	0.29	27,5
Stearik asit	1.97	2.61	24,5
Kaproik asit	3.55	3.14	11,54

4.7. Yağ Asitlerinin Serum Albuminine Bağlanmasına Dair ANS-floresan Yer Değiştirme Sonuçları, Yağ Asitlerinin % Kompozisyonları ve İTK Sonuçlarının 1. Ve 2. derece Karaciğer Yağlanması ve Kontrol Grupları Arasında Karşılaştırılmaları

Bu bölümde NAFLD'nin farklı evrelerine ait değişimleri daha ayrıntılı biçimde ortaya koymak amacıyla ultrasonografi ile belirlenen 1. Derece yağlanma (Grade 1 (n=10)), 2. Derece yağlanma (Grade 2 (n=8)) ve kontrol grubundan (n=20) elde edilen floresan bağlanma verileri, yağ asidi yüzde kompozisyonları ve İTK bant profilleri bütüncül bir istatistiksel yaklaşımla analiz edildi. Her bir parametrenin hastalık progresyonu ile ilişkili varyasyon gösterip göstermediğini belirlemek için grup karşılaştırmaları yapıldı. Analizlerde, gruplar arası farklılıkların istatistiksel anlamlılığı uygun parametrik veya non-parametrik testler kullanılarak test edildi.

4.7.1. Grade 1, Grade 2 ve Kontrol Gruplarının Albümin Ekstraktlarına Ait Lipit Kromatogram Spotlarının Fotodansitometrik % Değerlerinin Karşılaştırılması

Grade 1, Grade 2 ve kontrol grubu albümin lipit ekstratlarının İTK ile seperasyonu ve fotodansitometrik analizleri sonucunda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve Tablo 4.21'da gösterildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Tablo 4.21. Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının albümin ekstraktlarına ait lipit kromatogram spotlarının fotodansitometrik % değerlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)	p
@1	39,47±4,26 39,18 (3,85)	39,55±4,72 39,18 (5,58)	41,36±4,44 42,32 (6,49)	0.448
@2	14,83±2,98 14,86 (4,32)	15,54±2,81 15,65 (3,79)	13,32±3,24 13,26 (2,87)	0.187
@3	14,62±3,38 14 (4,25)	14,37±3,69 13,6 (4,94)	15,43±4,31 15,41 (4,68)	0.771
@4	8,34±0,93 8,13 (1,66)	8,33±1,04 8,08 (1,95)	8,64±1,59 8,33 (1,76)	0.782
@5	6,1±1,09 5,77 (1,17)	5,85±0,89 5,57 (0,88)	5,92±1,03 5,69 (1,17)	0.861
@6	3,2±0,59 3,18 (0,89)	3,18±0,65 3,18 (1,11)	2,89±0,73 2,8 (1,15)	0.391
@7	13,45±2,48 13,24 (3,79)	13,17±1,79 13,24 (2,2)	12,44±5,11 11,06 (5,24)	0.792
Değişkenler art. ortalama ± std. sapma ve ortanca (çeyreklikler arası genişlik) istatistikleri ile özetlenmiştir.				

4.7.2. Grade 1, Grade 2 ve Kontrol Gruplarının ANS Yer Değiştirme Yöntemi ile Serum Albümin Yağ Asidi Bağlama Parametrelerinin İstatistiksel Karşılaştırılması

Grade 1, Grade 2 ve kontrol grubunun palmitik asit, miristik asit, stearik asit ve oleik asit için floresan yer değiştirme derecesinin karşılaştırması sırasıyla Tablo 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25’de gösterildi. Palmitik asit, stearik asit ve oleik asit için anlamlı farklılık gözlenmezken miristik asit için 105 µM yağ asidi kompozisyonunda anlamlı farklılık gözlemlendi.

Tablo 4.22. Palmitik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması

Değişken*	Grup			p	Test
	Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)		
x.35	89,1±5,98 91,35 (9,39)	87,94±8,42 89,81 (11,5)	89,42±6,06 88,22 (10,12)	0.86604	Tek-yönlü ANOVA
x.70	77,35±5,52 76,46 (7,81)	78,92±6,59 79,15 (8,05)	76,68±7,38 74,33 (10,65)	0.73558	Tek-yönlü ANOVA
x.105	69,72±6,57 68,25 (9,53)	72±6,07 72,75 (7,36)	69,41±5,8 69,55 (5,55)	0.58809	Tek-yönlü ANOVA
x.140	65,92±6,95 65,44 (14,31)	66,99±3,62 67,85 (6,04)	64,29±5,11 64,98 (5,85)	0.45423	Tek-yönlü ANOVA
x.175	62,23±6,35 61,05 (10,61)	63,9±3,82 64,3 (5,66)	61,1±5,45 61,41 (7,19)	0.46875	Tek-yönlü ANOVA
x.210	58,87±4,65 58,94 (6,41)	60,7±4,2 61,15 (5,75)	57,06±5,16 57,83 (5,16)	0.19746	Tek-yönlü ANOVA

*:Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' ve 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlenmiştir.

Tablo 4.23. Miristik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması

Değişken*	Grup**			p	Test
	Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)		
x.35	78,38±7,07 80,19 (12,23)	80,05±11,45 82,08 (12,25)	80,38±8,1 (11,6)	79,34 0.83293	Tek-yönlü ANOVA
x.70	63,04±3,9 62,92 (2,7)	68,55±10,55 70,5 (12,7)	62,15±6,95 63,63 (8,86)	0.11561	Tek-yönlü ANOVA
x.105	51,85 ^a ±5,32 51,04 (5,74)	58,49±6,6 (5,85)	58,8 52,89±5,64 52,87 (5,5)	0.0426	Tek-yönlü ANOVA
x.140	47,53±6,48 46,97 (7,35)	50,85±4,31 51,42 (5,1)	46,35±4,78 46,72 (4,45)	0.1318	Tek-yönlü ANOVA
x.175	43,3±4,76 43,29 (7,18)	44,79±3,63 45,95 (5,25)	43,4±4,51 (5,61)	43,57 0.72221	Tek-yönlü ANOVA
x.210	40,41±5,25 39,6 (8,48)	41,28±2,91 (3,43)	38,89±3,92 39,24 (4,45)	0.34358	Tek-yönlü ANOVA

*:Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' ve 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlenmiştir.**: a: Grade2 grubuna göre farklıdır, b: Kontrol grubuna göre farklıdır.

Tablo 4.24. Stearik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması

Değişken*	Grup			p	Test
	Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)		
x.35	85,49±3,81 86,37 (5,14)	85,73±10,54 87,15 (15,58)	85,64±9,13 85,65 (12,81)	0.99804	Tek-yönlü ANOVA
x.70	73,32±6,83 71,7 (2,27)	79,67±9,38 76,94 (11,66)	74,9±7,43 74,66 (12,61)	0.21095	Tek-yönlü ANOVA
x.105	68,47±6,01 68,69 (5,97)	73,02±7,07 74,22 (7,2)	68,81±6,72 68,51 (10,74)	0.27072	Tek-yönlü ANOVA
x.140	63,25±5,08 62,92 (9,47)	65,08±6,12 65,2 (5,07)	61,57±4,35 61,19 (4,01)	0.23444	Tek-yönlü ANOVA
x.175	59,02±4,96 58,54 (8,94)	60,01±3,53 61,7 (5,41)	58,26±4,62 58,51 (5,22)	0.55761	Kruskal-Wallis H test
x.210	55,32±5,08 55,69 (5,62)	58,27±3,32 59,34 (4,5)	55,02±4,55 54,63 (5,64)	0.22163	Tek-yönlü ANOVA

*:Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' ve 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlenmiştir.

Tablo 4.25. Oleik asit floresan yer değiştirme derecesinin Grade 1, Grade 2 ve Kontrol grubunda Karşılaştırılması

Değişken*	Grup			p	Test
	Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)		
x.35	90,37±8,03 93,01 (8,76)	90,57±10,84 95,05 (14,65)	92,72±6,78 94,17 (9,76)	0.70851	Kruskal-Wallis H test
x.70	77,45±9,1 74,96 (12,68)	82,39±13,59 85 (8,8)	77,99±6,98 79,13 (11,66)	0.1157	Kruskal-Wallis H test
x.105	64,73±9,66 64,02 (14,25)	72,98±13,94 75,9 (13,28)	66,09±11,98 67,75 (15,81)	0.29844	Tek-yönlü ANOVA
x.140	54,95±8,95 54,27 (8,52)	64,71±11,44 67,22 (10,65)	56,22±10,81 55,01 (10,77)	0.07753	Kruskal-Wallis H test
x.175	46,5±3,58 46,46 (6,2)	49,92±9,72 48,65 (14,37)	47,79±5,48 47,13 (7,23)	0.56241	Tek-yönlü ANOVA
x.210	43,31±3,22 41,97 (6,05)	44,86±7,26 43,65 (10,1)	43,44±4,85 44,91 (6,63)	0.77227	Tek-yönlü ANOVA

*:Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' ve 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlenmiştir.

4.7.3. Grade 1, Grade 2 ve Kontrol Gruplarının Serum ve Albümin Yağ Asidi % Kompozisyonlarının Karşılaştırılması

Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının serum yağ asidi yüzde kompozisyonları Tablo 4.26'ta gösterildi. Eikosapentaenoik asit (EPA) düzeyleri, Grade 2 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.04105$). Araşidonik asit düzeyi ise Grade 2 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p = 0.03525$). Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının albümin yağ asidi yüzde kompozisyonları Tablo 4.27'te gösterildi. Linoleik asit düzeyi Grade 2 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu. Stearik asit düzeyi ise Grade 2 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu.



Tablo 4.26. Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının serum yağ asidi yüzde kompozisyonları

Değişken*	Grup** Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)	p	Test
Kaprik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0,03±0,13 0 (0)	0.63763	Kruskal-Wallis H test
Laurik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0,98±4,37 0 (0)	0.63763	Kruskal-Wallis H test
Miristoleik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0,04±0,17 0 (0)	0.63763	Kruskal-Wallis H test
Miristik asit metil esteri	0,38±0,34 0,53 (0,59)	0,66±0,41 0,61 (0,66)	0,5±0,55 0,65 (0,75)	0.37644	Kruskal-Wallis H test
Palmitoleik asit metil esteri	0,55±0,53 0,57 (0,92)	1,06±0,61 0,95 (0,8)	0,51±0,57 0,5 (0,76)	0.08534	Kruskal-Wallis H test
Gamalinoleik asit metil esteri	29,16±4,45 29,22 (4,73)	28,98±2,76 29,5 (3,25)	29,4±2,54 29,17 (3,19)	0.94616	Tek-yönlü ANOVA
Linoleik asit metil esteri	26,07±6,45 26,69 (5,63)	24,74±7,82 26,46 (6)	27,82±4,55 29,1 (6,34)	0.46117	Kruskal-Wallis H test
Oleik asit metil esteri	17,71±4,07 18,33 (8,44)	18,09±2,3 17,52 (3,13)	15,26±3,04 15,12 (3,09)	0.05463	Tek-yönlü ANOVA
Stearik asit metil esteri	18,79±10,62 15,17 (2,03)	17,07±13,97 12,27 (1,38)	13,36±1,57 13,26 (1,61)	0.10308	Kruskal-Wallis H test
Eikosapentaenoik asit metil esteri	1,78±2,5 0,46 (4,58)	0,14±0,41 0 ^b (0)	6,32±7,49 6,15 (10,35)	0.04105	Kruskal-Wallis H test
Homogamalinolenik asit	0,71±0,8 0,42 (1,48)	1,31±0,72 1,35 (0,4)	0,85±0,75 1,08 (1,52)	0.38248	Kruskal-Wallis H test
Heneikosilik asit metil esteri	0,15±0,25 0 (0,41)	0,13±0,25 0 (0,23)	0,21±0,39 0 (0,27)	0.96904	Kruskal-Wallis H test
Erusik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0,03±0,13 0 (0)	0.63763	Kruskal-Wallis H test
Palmitik asit metil esteri	0,04±0,13 0 ^b (0)	0±0 0 ^b (0)	0,8±0,75 0,72 (1,1)	<0.001	Kruskal-Wallis H test
Vaksenik asit	0,1±0,31 0 (0)	0,41±0,69 0 (0,77)	0,19±0,48 0 (0)	0.2864	Kruskal-Wallis H test
Nervonik asit metil esteri	0,05±0,14 0 (0)	0,16±0,32 0 (0,23)	0,14±0,36 0 (0)	0.65093	Kruskal-Wallis H test
Kaproik asit metil esteri	1,44±0,42 1,42 (0,62)	1,83±1,56 1,09 (1,12)	1,88±3,68 1,48 (1,63)	0.95048	Kruskal-Wallis H test
Araşidonik asit metil esteri	2,8±3,35 1,25 (6,5)	4,98±3,39 5,57 ^b (5,73)	1,5±2,75 0 (2,19)	0.03525	Kruskal-Wallis H test
Behenik asit metil esteri	0,09±0,19 0 (0)	0,13±0,18 0 (0,33)	0,07±0,18 0 (0)	0.61294	Kruskal-Wallis H test
Alfalimolenik asit metil esteri	0,11±0,18 0 (0,31)	0,16±0,23 0 (0,36)	0,02±0,11 0 (0)	0.09411	Kruskal-Wallis H test
Lignoserik asit	0,08±0,18 0 (0)	0,13±0,18 0 (0,32)	0,03±0,13 0 (0)	0.12998	Kruskal-Wallis H test

Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' ve 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlenmiştir.

** : a: Grade2 grubuna göre farklıdır, b: Kontrol grubuna göre farklıdır.

Tablo 4.27. Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarının albümin yağ asidi yüzde kompozisyonları

Değişken*	Grup** Grade1 (n=10)	Grade2 (n=8)	Kontrol (n=20)	p	Test
Kaprik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Laurik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Miristoleik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Miristik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Palmitoleik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Gamalinoleik asit metil esteri	39,74±15,57 45,4 (4,7)	28,5±19,1 28,12 (35,12)	46,55±3,64 46,26 (3,34)	0.14407	Kruskal-Wallis H test
Linoleik asit metil esteri	10,3±4,7 11,24 (6,36)	6,88±4,98 6,2 ^b (8,87)	12,31±3,95 12,68 (3,62)	0.03726	Kruskal-Wallis H test
Oleik asit metil esteri	4,99±2,66 4,56 (3,41)	5,02±3,52 5,01 (5,06)	6,16±2,18 5,79 (2,96)	0.31429	Kruskal-Wallis H test
Stearik asit metil esteri	37,58±19,66 29,06 ^b (5,45)	52,84±27,83 52,03 ^b (50,45)	26,31±2,98 26,3 (4,57)	0.00915	Kruskal-Wallis H test
Eikosapentaenoik asit metil esteri	0,23±0,72 0 (0)	0±0 0 (0)	0,63±1,32 0 (0)	0.32591	Kruskal-Wallis H test
Homogamalinolenik asit	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Heneikosilikasit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Erusik asit metil esteri	0,62±1,37 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0.05638	Kruskal-Wallis H test
Palmitik asitmetil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0,24±0,59 0 (0)	0.24068	Kruskal-Wallis H test

Vaksenik asit	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Nervonik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Kaproik asit metil esteri	6,13±1,82 5,36 (1,43)	5,47±0,99 5,4 (1,46)	6,69±1,46 6,17 (1,83)	0.06037	Kruskal-Wallis H test
Araşidonik asit metil esteri	0,64±1,17 0 (1,24)	1,3±1,6 0,81 (2,23)	1,13±1,47 0 (2,61)	0.59667	Kruskal-Wallis H test
Behenik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Alfalimolenik asit metil esteri	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Lignoserik asit	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	0±0 0 (0)	1	Kruskal-Wallis H test
Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' şeklinde özetlenmiştir.					
**: a: Grade2 grubuna göre farklıdır, b: Kontrol grubuna göre farklıdır.					

4.8. Floresan Yer Değiştirme Göstergeleri ve Yağ Asidi Yüzde Kompozisyonları ile Biyokimyasal Parametrelerin Korelasyon Analizi (Spearman's rho)

Floresan bağlanma parametreleri ile serum yağ asidi yüzde kompozisyonlarının klinik biyokimyasal belirteçlerle olan ilişkisini değerlendirmek amacıyla Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarında Spearman's rho korelasyon analizi uygulandı. Bu kapsamda Tablo 4.4'de hasta ve kontrol grubunda anlamlı farklılık tespit edilen glikoz, insülin, HbA1c, karaciğer enzimleri (ALT, AST, GGT), lipit profili göstergeleri (TAG, HDL, VLDL) ve total bilirubin düzeyleri ile her yağ asidi için 140, 175, 210 μM konsantrasyonlarında ölçülen floresan yer değiştirme değerleri ile serum ve albümin yağ asidi yüzdeleri arasındaki ilişkiler test edildi. Analiz sonuçları değerlendirildi p değeri ve r değerlerine göre anlamlı olanlar düzenlenerek Tablo 4.28, 4.29 ve 4.30'da gösterildi. Grade 1 grubunda yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonucunda, glikoz düzeylerinin PA, MA ve SA floresan bağlanma parametreleri ile anlamlı ve güçlü düzeyde negatif korelasyon gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca HbA1c, ALT, AST ve GGT gibi biyokimyasal belirteçlerin belirli yağ asidi fraksiyonlarıyla anlamlı korelasyonlar sergilediği, TAG ve VLDL'nin ise bazı floresan göstergeleriyle ilişkili olduğu gözlemlendi.

Grade 2 grubunda yapılan Spearman's rho korelasyon analizinde, HbA1c düzeylerinin PA 140, PA 175 ve PA 210 floresan bağlanma parametreleri ile güçlü ve anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği saptandı ALT düzeylerinin serum kaproik asit ile anlamlı pozitif ilişkili olduğu belirlendi. Total bilirubin düzeyleri, OA 175 ve OA 210 değerleri ile anlamlı negatif korelasyon gösterdi. TAG ve VLDL düzeylerinin ise serum stearik asit fraksiyonu ile anlamlı negatif ilişkiler sergilediği görüldü. Kontrol grubunda ise HbA1c düzeylerinin serum kaproik asit ile anlamlı negatif korelasyon gösterdiği belirlendi. TAG ve VLDL düzeyleri serum oleik asit fraksiyonu ile anlamlı pozitif ilişkili bulunurken, HDL düzeylerinin albümine bağlı kaproik asit fraksiyonu ile anlamlı negatif korelasyon sergilediği tespit edildi.

Tablo 4.28. Grade 1 grubunda biyokimyasal parametrelerle floresan bağlanma göstergeleri ve yağ asidi yüzde kompozisyonları arasındaki Spearman's rho korelasyon analizi tablosu

Değişken 1	Değişken 2	R	P
Glikoz	PA 140	-,733*	0.016
Glikoz	PA 175	-,794**	0.006
Glikoz	PA 210	-,685*	0.029
Glikoz	MA 140	-,842**	0.002
Glikoz	MA 175	-,867**	0.001
Glikoz	MA 210	-,891**	0.001
Glikoz	SA 140	-,927**	0
Glikoz	SA 175	-,721*	0.019
Glikoz	SA 210	-,733*	0.016
HbA1c	linoleik asit (serum)	-,711*	0.021
HbA1c	oleik asit (albümin)	,748*	0.013
ALT	gama linoleik asit (serum)	,636*	0.048
ALT	kaproik asit (serum)	,745*	0.013
ALT	araşidonik asit (serum)	-,705*	0.023
ALT	kaproik asit (albümin)	-,818**	0.004
AST	kaproik asit (serum)	,782**	0.008
GGT	araşidonik asit (albümin)	,755*	0.012
total bilirubin	araşidonik asit (serum)	-,743*	0.014
total bilirubin	kaproik asit (albümin)	-,697*	0.025
tag	SA 140	,636*	0.048
tag	SA 175	,685*	0.029
tag	oleik asit (serum)	-,636*	0.048
VLDL	SA 140	,636*	0.048
VLDL	SA 175	,685*	0.029
VLDL	oleik asit (serum)	-,636*	0.048

Tablo 4.29. Grade 2 grubunda biyokimyasal parametrelerle floresan bağlanma göstergeleri ve yağ asidi yüzde kompozisyonları arasındaki Spearman's rho korelasyon analizi tablosu

Değişken 1	Değişken 2	R	P
HbA1c	PA 140	,910**	0.002
HbA1c	PA 175	,826*	0.011
HbA1c	PA 210	,910**	0.002
ALT	kaproik asit (serum)	,802*	0.017
total bilirubin	OA 175	-,778*	0.023
total bilirubin	OA 210	-,826*	0.011
TAG	stearik asit (serum)	-,738*	0.037
VLDL	stearik asit (serum)	-,738*	0.037

Tablo 4.30. Kontrol grubunda biyokimyasal parametrelerle floresan bağlanma göstergeleri ve yağ asidi yüzde kompozisyonları arasındaki Spearman's rho korelasyon analizi tablosu

Değişken 1	Değişken 2	R	P
HbA1c	kaproik asit (serum)	-,480*	0.032
Tag	Oleik asit (serum)	,678**	0.001
HDL	kaproik asit (albümin)	-,650**	0.002
VLDL	Oleik asit (serum)	,678**	0.001

4.9. NAFLD Biyobelirteçlerinde Diyabet Etkisinin Araştırılması İçin Yapılan Ek İstatistiksel Analizler

Hasta grubunda Tip 2 diyabet tanısı bulunan bireylerin (n=8) varlığı, glikoz, HbA1c ve diğer biyokimyasal parametrelerde gözlenen anlamlı farklılıkların yalnızca diyabetten mi kaynaklandığını, yoksa NAFLD'ye özgü metabolik süreçlerin de bu farklılıklarda etkisi olup olmadığını değerlendirmek amacıyla ek istatistiksel analizlere ihtiyaç duyuldu. Bu nedenle diyabeti olan ve olmayan hastalar ile kontrol grubu arasında glisemik göstergeler ve karaciğer fonksiyon parametreleri de dahil olmak üzere temel biyobelirteçlerdeki farklılıkları değerlendirmek amacıyla ek istatistiksel analizler yapıldı. Bu analizler, diyabetin olası karıştırıcı etkisini kontrol etmeyi ve NAFLD'ye özgü biyokimyasal farklılıkları daha net biçimde ortaya koymayı amaçlamaktadır. İstatistiksel sonuçlar Tablo 4.31'de gösterildi. Glikoz, insülin ve HOMA-IR açısından DM- grubu hem DM+ hem de kontrol grubundan anlamlı şekilde farklı bulunurken, HbA1c düzeyleri DM- grubunun DM+ grubundan ve DM+ grubunun kontrol grubundan anlamlı farklılık gösterdiği bulundu. Karaciğer enzimlerinden ALT düzeyi hem DM- hem DM+ grubunda kontrol grubundan anlamlı yüksek iken AST düzeyi DM- grubu DM+ grubundan anlamlı düşüktür, DM+ grubu ise kontrol grubundan anlamlı yüksektir. GGT düzeyi DM- grubunda DM+ grubuna göre anlamlı düşükken kontrol grubuna göre anlamlı yüksektir, DM+ grubu ise kontrol grubuna göre anlamlı düşüktür. Total bilirubin düzeyi DM- grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşüktür. HDL düzeyi DM- grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşüktür.

Tablo 4.31. DM–, DM+ ve Kontrol Gruplarında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması (ANOVA ve Kruskal–Wallis Analizleri)

Değişken*	Grup**			p	Test
	DM –	DM +	K		
glikoz	95.5a (22.25)	113.5b (39.25)	89.5 (13.5)	0.00177	Kruskal-Wallis H test
insülin	9.635ab (7.242)	21.1b (15.095)	5.45 (3.835)	<0.001	Kruskal-Wallis H test
HbA1c	5.383a ± 0.465	6.5b ± 0.769	5.1 ± 0.281	<0.001	Tek-yönlü ANOVA
homa1r	2.265ab (2.77)	6.24b (6.597)	1.135 (0.883)	<0.001	Kruskal-Wallis H test
alt	30b (20.75)	47b (34.75)	13.5 (12.75)	0.00159	Kruskal-Wallis H test
ast	23.5a (10.75)	31.5b (17.25)	19.5 (10.5)	0.00201	Kruskal-Wallis H test
ggt	26.5ab (11.5)	102b (156.75)	15 (12.25)	<0.001	Kruskal-Wallis H test
Total bilirubin	0.505b (0.338)	0.545 (0.39)	0.765 (0.622)	0.03345	Kruskal-Wallis H test
hdl	44.583b ± 9.7	46.75 ± 8.664	57.1 ± 15.556	0.03169	Tek-yönlü ANOVA

*: Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik)' ve 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlenmiştir. **: a: DM + grubuna göre farklıdır, b: K grubuna göre farklıdır.

5. TARTIŞMA

NAFLD ve NASH, insülin direnci, obezite ve metabolik sendrom ile ilişkili, küresel prevalansı %25 düzeyinde olan ve gittikçe artan bir hastalıktır (20). Türkiye’de bu oranın %30’un üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (24,25). Karaciğerde anormal derecede yağ birikimi ile karakterize olup aynı zamanda steatohepatit, siroz ve hepatosellüler kansere kadar ilerleyen geniş bir spektruma sahiptir (50). Hastalığın patogenezisinde, gerek çiftli vuruş gerekse çoklu vuruş hipotezlerinde, ana etken insülin direnci olup, buna bağlı olarak adipoz dokuda hormon duyarlı lipazın inhibisyonunun engellenmesi sonucu plazma serbest yağ asiti düzeyinin yükselmesi ve neticede karaciğere ulaşan aşırı yağ asitleri nedeniyle triaçilgliserol ve VLDL sentezinin artmasıdır (5). Serumdaki yağ asitlerinin çoğu albümine bağlı olarak taşınır ancak bununla beraber küçük bir kısmı albümine bağlı değildir. Albumine bağlı olmayan bu fraksiyon fizyolojik olarak aktiftir çünkü diğer moleküller ile reaksiyona girmektedirler. Bu fraksiyon total serum yağ asiti ile koreledir ve ölçümü fizyolojik durumun değerlendirilmesinde değerlidir. Albumine bağlı olmayan yağ asiti fraksiyonu total serum yağ asiti konsantrasyonunun serum albümin konsantrasyonuna oranı tarafından regüle edilir. Albumine bağlı olmayan yağ asiti profili, yağ asiti albümin etkileşimine, albüminin ilaçlar ve diğer metabolitler ile etkileşimine ve albüminin metabolik etkileşimine ve muhtemelen albümin polimorfizmine bağlı olabileceği bildirilmiştir (106,107).

Dolayısıyla yağ asiti-albümin etkileşimi ve bu etkileşim ile ilgili faktörler NAFLD teşhisinde, takibinde ve tedavisinde önemli olabilir. Bu amaçla plazma albüminin metal iyon bağlama kapasitesinin (IMA) hepatitis, siroz ve karaciğer yetmezliğini kapsayan karaciğer hastalıkları ile bağlantılı olduğu, siroz, hepatitis ve NAFLD’de yağ asiti bağlama kapasitesinin azaldığı belirtilmiştir (14). Ancak bu çalışmalarda serumda bulunan albüminin bağlama özellikleri incelenmiştir. Serumdan izole edilen albüminin yağ asiti bağlama kabiliyetine ait bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu amaçla bu çalışmada farklı yağ asitlerinin serumdan izole edilen albüminine bağlanma dinamiği NAFLD hastalarında ve sağlıklı kontrollerde bir boya olan 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate (ANS) albümine bağlandığında meydana gelen floresan değişim kullanılarak belirlendi ve karşılaştırıldı (11,12).

Serumdan albümin seperasyonu için albümin AS2, AS4 ve CBAK yöntemleriyle ayrıldı; elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ve dansitometrik analizle süre, maliyet,

verim ve saflık ölçütleri açısından karşılaştırıldı. AS2 ve CBAK yaklaşık 35 dakikada tamamlanırken AS4 ~9 saat 30 dakika sürdü; maliyetler sırasıyla AS2 için 11,6 TL, AS4 için 5,1 TL ve CBAK için 708 TL olarak hesaplandı. Saflık bakımından en yüksek değer (%95,56) ve en yüksek A/G oranı AS4 yönteminin %70'lik fraksiyonunda saptandı; ancak çok kademeli fraksiyonlama, alt fraksiyonlarda belirgin protein kaybına yol açarak toplam albümin verimini düşürdü. 4,1 M stok amonyum sülfat çözeltisinin sabit hacimlerle kullanıldığı AS2 yöntemi daha yüksek standardizasyon sağladı; albümin yüzdesi %90,36 ve A/G oranı 9,4 olup globulinlerin önemli bir bölümü ilk aşamada uzaklaştırıldı. CBAK kısa ve pratik olmasına karşın yüksek maliyeti, düşük numune kapasitesi ve pratikte spesifik olmayan bağlanma (globulin bantlarının varlığı) nedeniyle saflık/verim açısından dezavantajlı bulundu. Jel görüntülerinde, %99 saflıkta ticari HSA'da dahi dimer/agregat kaynaklı bantların izlenmesi, bu yaklaşımlarla %100 saflığa ulaşmanın güç olduğuna işaret etmektedir. Sonuç olarak, globulin kontaminasyonunun en düşük olduğu fraksiyonlar AS2'nin albümin kısmı ile AS4'ün %70'lik fraksiyonu olmakla birlikte; zaman, standardizasyon ve uygulanabilirlik bakımından AS2 yöntemi daha avantajlı görünmektedir. Bu nedenle çalışmada serumdan albümin seperasyonu için AS2 yönteminin kullanılmasına karar verildi. Daha yüksek saflıkta albümin seperasyonu için presipitasyon yöntemlerinin kromatografik yöntemlerle kombine edildiği yöntemlerin geliştirilmesine ve daha ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (90).

Albuminin bağlama kabiliyetine ilişkin literatürde iki ayrı yöntem ile karşılaşılmaktadır. Bunlardan birincisi, natif serum ortamında insan serum albümininin yağ asiti bağlama özelliğinin karakterizasyonu ve normal fonksiyondan ayrıldığı durumların tespitinde kullanılan, spin işaretli yağ asitleri (16-doxylostearic acid) yardımıyla gerçekleştirilen elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi yöntemidir. Bu yöntemde doğrudan serum numunesi kullanılmakta, albümin izole edilmemektedir. İzole edilen insan serum albümininin yağ asiti bağlama kapasitesi, doğrudan serumdan yapılan ölçümler ile karşılaştırıldığında, yağ asitlerinin serumdaki albümine daha kuvvetli bir şekilde bağlandıkları belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak serumdaki albümin üzerinde nonspesifik bağlanma bölgelerinin bulunması ve serumda yağ asitlerinin bağlanabileceği diğer proteinlerin bulunma olasılıkları ileri sürülmüştür (108). Bu konudaki bir diğer yaklaşım ise albümin kobalt bağlama kapasitesinin ölçümüdür. Albuminin metal iyonuna bağlanma kapasitesi, iskemik kalp dokuları ile temasta değişmektedir. Bu nedenle miyokardial iskemisinin tespitinde kullanılan bir biyokimyasal belirteçtir. Bu amaçla belirli

bir miktar kobalt (II) numuneye eklenerek bağlanmamış kobalt (II) , DTT (dithiothreitol) kullanılarak kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Albuminin kobalt bağlaması ile renk yoğunluğu arasında ters bir bağlantı vardır. Bu analiz için de numune olarak serum kullanılmakta, albümin separasyonu yapılmamaktadır (109,110).

Mevcut çalışmada dört farklı yağ asitinin (palmitik asit, stearik asit, miristik asit ve oleik asit) serum albüminine bağlanma affinitesi, yağ asitlerinin albümin bağlı ANS floresansını azaltma oranlarından hareketle tespit edildi (11,12). Yağ asitlerinin hem standart albümin hem de kontrol ve hasta serumlarından izole edilen albüminlere bağlanmasına ilişkin K_{dapp} değerleri karşılaştırıldığında, yağ asitlerinin en güçlüden en zayıfa doğru bağlanma sırasının palmitik asit>stearik asit>miristik asit>oleik asit şeklinde olduğu görülmektedir. Kantitatif bağlanma çalışmaları bir molekülün alkil zincirinin uzunluğu arttığında albümine bağlanma gücünün arttığını göstermektedir (12). Stearik asitin 18 karbonlu olduğu dikkate alınırsa test edilen yağ asitleri içerisinde en güçlü bağlanmaya sahip olması beklenirdi. Standart albümin, kontrol ve hasta albüminleri karşılaştırıldığında bu sıralamanın değişmediği görülmektedir. Ancak hem K_{dapp} hem ΔF (%) değerleri karşılaştırıldığında standart insan serum albümininin yağ asitlerini bağlama affinitesi hem kontrol hem hasta grubuna göre yüksek bulundu. Bu fark özellikle stearik ve oleik asitler için daha belirgindi. Bu durum hasta ve kontrol serumlarından izole edilen albüminde hâlihazırda bağlı bulunan yağ asitleri ile veya albümine bağlandığı bilinen diğer bileşiklerin (bilirubin, tiroksin bazı steroid hormonlar veya ilaçlar) varlığı ile açıklanabilir. 18C' lu yağ asitleri olan stearik ve oleik asitlerde standart ve kontrol/hasta grupları arasındaki K_{dapp} değerleri arasındaki fark sırasıyla 5.36, 6.78 ve 11.16, 10.48 olarak tespit edildi. Kontrol/hasta serumundan izole edilen albüminlerin hali hazırda özellikle stearik asit ve oleik asitten belirli ölçüde daha sature oldukları düşünülebilir. Ayrıca, insan serumunda bulunan yağ asitlerinin % kompozisyonu dikkate alındığında stearik asit (%10) ve oleik asitin (%38) en çok bulunan yağ asitleri arasında olduğu görülmektedir (106). Ancak serumda yüksek oranda bulunan bir diğer yağ asidi olan palmitik asidin (%25) K_d değerinde neden büyük bir fark olmadığı belirlenemedi. Richieri ve Kleinfeld, çalışmalarında palmitik, oleik ve stearik asitleri de içeren yağ asiti karışımında ortalama K_d değerini 0.44 olarak tespit etmelerine karşın mevcut çalışmada dört farklı yağ asitine ait ortalama K_d değeri 26.25 olarak tespit edildi. Mevcut farklılığın söz konusu araştırmada albümin yerine bir floresan prob olan ADIFAB (Acrylodan Intestinal Fatty Acid Binding Protein) kullanılmış olmasından, yöntem farklılıklarından kaynaklanmış olması muhtemeldir. Diğer bir kaynakta K_d değerinin

serbest yağ asitine bağlı olarak 5 ile 50 nM arasında değiştiği bildirilmiştir. HSA için bu ölçümler 22°C de bağlanma izotermi ile gerçekleştirilmiştir ki muhtemelen yöntem farklılıkları nedeniyle mevcut sonuçlardan farklı olduğu görülmektedir (107).

Test edilen tüm yağ asitlerinin artan konsantrasyonlarına karşın ANS/albumin floresan değerindeki (%) istatistiksel olarak anlamlı azalma, ANS/floresan yer değiştirme yönteminin sağlıklı çalıştığını göstermektedir. Yağ asitleri, konsantrasyonlarına bağlı olarak albumine bağlı ANS'yi yerinden ayırmakta, bu da başlangıçtaki floresan düzeyinin azalması ile sonuçlanmaktadır. Hasta ve kontrol grubunda artan yağ asiti konsantrasyonlarına karşın floresan yer değiştirme dereceleri (%) in karşılaştırılması, iki grup arasında anlamlı bir fark ortaya koymadı. Ancak yağ asitinin konsantrasyonu yükseldikçe oleik asit hariç tüm yağ asitleri için p değerlerinin anlamlılık sınırına yaklaştığı görülmektedir. Daha yüksek yağ asiti konsantrasyonlarına çıkılması durumunda iki grup arasında farkların ortaya çıkması muhtemel olabilir.

Kontrol ve hasta grubu serum albuminlerinin yağ asiti bağlama affiniteleri test edilen dört farklı yağ asiti için birbirine benzer olarak tespit edildi. Bunun yanında palmitik, miristik ve stearik asit için yapılan karşılaştırmalarda özellikle yüksek yağ asiti konsantrasyonlarında (140 ve 210 μM) p değerlerinin 0.091-0.174 arasında değişmesi, diğer konsantrasyonlara göre çok daha düşük olması, örneklem büyüklüğü artırıldığında ve 210 μM dan daha yüksek konsantrasyonlarda yağ asiti mevcudiyetinde albumin bağlama affinitesi ölçüldüğünde kontrol ve hasta grupları arasında muhtemel bir farkın görülebileceğine işaret sayılabilir. Ancak bu konuda yapılacak daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

Dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin büyük kısmını taşıyan serum albumininde yağ asitlerine yedi bağlanma bölgesi bulunduğu bilinmektedir. Bu bölgeler, albuminin üç boyutlu yapısı içinde farklı konumlarda yer almaktadır. Yağ asitleri zincir uzunluğu ve doymunluk derecesine bağlı olarak bu bölgelere farklı afinitelerle bağlanmaktadır. Yağ asitlerinin zincir uzunluğu ve doymunluk derecesi, bu bölgelere olan bağlanma tercihlerini ve bağlanma konformasyonlarını belirleyen önemli faktörlerdir. Genel olarak uzun zincirli yağ asitleri yüksek veya orta afiniteye sahip bağlanma ceplerinde yer alırken, daha esnek veya doymamış yağ asitleri albumin üzerinde farklı bağlanma bölgelerine farklı konformasyonlarda bağlanabilmektedir. Buna ek olarak, bazı çalışmalarda koşula bağlı tamamlayıcı bağlanma bölgelerinin de tanımlandığı bildirilmektedir (79).

Albuminin yağ asidi bağlama affinitesi ve kapasitesini plazmada albumine bağlı bulunan diğer moleküller de etkileyebilir. Bilirubin, tiroksin, steroid hormonlar,

diazepam ve warfarin gibi birçok endojen ve ekzojen bileşik yağ asidi ile aynı bölgeleri paylaşarak rekabet oluşturabilir veya bağlanma bölgelerinin konformasyonunu dolaylı olarak değiştirebilir. Bununla birlikte yağ asitleri kendi aralarında da allosterik etkileşim gösterebilir; bir yağ asidinin bağlanması diğer bölgelerdeki afiniteleri artırabilir veya azaltabilir (79).

Albumin-yağ asiti etkileşimine etki edebilecek faktörler arasında, yağ asiti-albumin bağlanma sabitleri, bağlı yağ asitleri arasındaki etkileşimler, serbest yağ asitlerinin albümine bağlanmasını etkileyen çeşitli ilaçlar ve metabolitler, albuminin yapısında meydana gelen metabolik değişimler ve muhtemelen albümin polimorfizmi sayılabilir (107). Albumin iki ana bağlanma bölgesi içermektedir. Başlıca heterosiklik kompleksleri ve dikarboksilik asitleri (örneğin arahidik asit, warfarin ve bilirubin) bağlayan birinci bölge ile diazepam, triptofan ve guanidin gibi aromatik asitleri bağlayan ikinci bölgeden oluşur (111). Albuminin önemi sadece konsantrasyonuna değil aynı zamanda onun çeşitli fizyolojik fonksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Bunlar arasında değişik endojen ve ekzojen bileşiklerin transportu önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli karaciğer hastalıklarında albümin fonksiyonunda hastalığın şiddetine ve prognozuna bağlı olarak bozulmalar bildirilmiştir. Albuminin post-translasyonel modifikasyonuna yol açan ekzojen ve endojen faktörler, albuminin üç boyutlu yapısını bozarak neticede biyolojik aktivitesini değiştirmektedir. İnsan serum albuminin amino asit kalıntılarının çeşitli nedenlerle kovalent modifikasyonu, onun konformasyonunu, fizikokimyasal özelliklerini, aktivitesini ve stabilitesini modifiye ederek fonksiyonunu değiştirebilmektedir. Bu post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) sonuçta çoklu HSA izoformlarının oluşumuna yol açmaktadır. Bilinen yüzlerce PTM bulunmaktadır ki bunlar içerisinde ubikinyasyon, asetilasyon ve glikozilasyonlar sayılabilir. Bu PTM lerin HSA'nın bağlanma ve antioksidan fonksiyonları üzerinde zararlı etkileri mevcuttur. Örneğin sirozlu hastalarda HSA'nın yedi izoformu bildirilmiştir. Sirozda albümin sentezi ile birlikte albuminin yağ asiti bağlama kapasitesi ve metal iyonu bağlama kapasitesinde önemli azalmalar olduğu bildirilmiştir. Yine NAFLD hastalarında albümin konformasyonunun değiştiği, metal ve yağ asiti bağlama kapasitelerinin azaldığı bulunmuştur. Aynı şekilde karaciğer yetmezliği veya hepatit B veya C bulunan hastalarda da metal ve yağ asiti bağlama kabiliyetlerinde azalmalar bildirilmiştir. Hepatit hastalarında bu değişimlerin NAFLD hastalarındakinden daha şiddetli olduğu da belirlenmiştir. Bu nedenle albuminin bağlama fonksiyonunun karaciğer hasarlarının erken bir indikatörü olarak kullanılabileceği değerlendirilmektedir (14).

Takikawa ve Kaplowitz (1986) saflaştırdıkları rat ve insan hepatik Z proteinin oleik asite bağlanma affinitesini ANS floresan inhibisyon tekniği ile ölçmüştür. Belirli konsantrasyonda Z proteine bağlı ANS floresansının organik asitler (yağ asiti, safra asiti) tarafından kompetitif olarak inhibisyonuna dayanan bu yöntemde oleik asit için ayrışma sabiti değerini 0.04 μM olarak bildirmişlerdir. Sonuçlar Scatchered plot olarak ifade edilmiş olup ANS bağlanmasına ait ayrışma sabitleri nonlinear least squares yöntemiyle elde edilmiştir (112). Glikozile insan serum albuminin yağ asiti bağlama kinetiği, ANS ile yerdeğiştirme tekniği (ANS metod) vasıtasıyla araştırılmıştır. Glikozile HSA'nın yağ asiti bağlama affinitesinde bir değişim gözlenmemiştir. $[\text{Oleik asit}]/\Delta F(\%)$, $[\text{oleik asit}]$ e karşı grafiği çizildiğinde lineer çizginin X eksenini kestiği nokta görünen ayrışma sabiti (K_{dapp}) olarak belirlenmiştir. Buna göre oleik asit için K_{dapp} , glikasyon süresine bağlı olarak 0.9-2.7 μM arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Albuminin yağ asiti bağlanma bölgesindeki lizin artığının bağlanmada önemli olabileceği, bağlanma bölgesindeki pozitif yüklü amino asit artıklarının yağ asitinin anyonik karboksilatı ve lizinin ϵ -amino grubu ile statik etkileşime katkıda bulunabileceği yorumlanmıştır. Albumin glikozilasyonunun oleik asite bağlanma affinitesini değiştirmediği tespit edilmiştir (11).

Belirli konsantrasyondaki floresan ANS bağlı albümin kompleksinin eklenen gittikçe artan konsantrasyonlardaki yağ asitleri tarafından kompetitif inhibisyonları vasıtasıyla (ANS metodu) kontrol ve hasta albüminlerinin yağ asiti bağlama affinitesi, başlangıçta ANS bağlı albümin floresansı 100 kabul edilerek, artan konsantrasyonlarda eklenen yağ asitleri ANS'yi albüminden ayırdıkça floresan düzeyinde meydana gelen % azalma ($\Delta F(\%)$) grafiğinde gösterilmiştir (11). Buna göre yağ asiti içermeyen albumin standardı-ANS kompleksine eklenen en yüksek 210 μM konsantrasyondaki yağ asitlerinin % floresan değerlerinde meydana gelen azalma kontrol ve hasta serum albüminleri ile karşılaştırıldığında palmitik ve miristik asitler için benzer % değerler görülürken stearik ve oleik asitler için kontrol ve hasta albüminlerinde yaklaşık %13-19 daha yüksek $\Delta F(\%)$ değerleri (daha düşük yağ asiti bağlama affinitesi) belirlendi. Bu durum izole edilen kontrol ve hasta serum albüminlerine öncesinde bağlı bulunan yağ asitlerinden kaynaklanmış olabilir. Dört farklı yağ asitinin kontrol ve hasta serum albüminlerine bağlanma affiniteleri arasında önemli bir fark bulunamadı. $\Delta F(\%)$ değerlerindeki azalma dikkate alındığında yağ asitlerinin albumine bağlanma affinitesi yüksekten düşüğe doğru miristik asit >oleik asit>stearik asit>palmitik asit şeklinde genel olarak sıralanabilir. Yağ asitlerinin albumine bağlanma affinitesinin değerlendirilmesinde ANS bağlanmasına ait ayrışma sabitlerinin belirlenmesinde Michaelis-Menten denklemi

kullanılarak en küçük kareler (least square fitting) yöntemi ile hesaplanmıştır (112). Bu yöntemin modifiye bir şekli, mevcut çalışmamızda referans aldığımız Yamazaki ve ark. (2005) yöntemidir (11). Buna göre $[yağ\ asiti]/\Delta F$ değerlerine karşı $[yağ\ asiti]$ (μM) ile çizilen doğrusal grafikte X eksen kesişme noktası, belirli konsantrasyondaki ANS için görünen ayrışma sabiti (K_{dapp}) olarak belirtilmiştir. Mevcut çalışmada hem standart albümin hem de kontrol ve hasta serum albüminlerinden elde edilen veri kümeleri için en iyi uyum doğrusu bulunarak (least square fitting), bu doğru denkleminde X eksenini kesiş noktası bulunarak K_{dapp} değerleri tespit edildi. K_{dapp} değeri ne kadar küçük bir değer ise bağlanma affinitesi o kadar yüksek olduğu kabul edilmektedir. Buna göre test edilen dört yağ asitinin albumine bağlanmasına dair K_{dapp} değerleri karşılaştırıldığında bağlanma affinitesi yüksek düşüğe doğru palmitik>stearik>miristik>oleik asit şeklinde olduğu görülmektedir. Bu sıralama ΔF (%) değerlerine karşı çizilen $[yağ\ asiti]$ grafiği sonuçları ile karşılaştırıldığında diğerine göre ters bir sıralama olduğu söylenebilir. $[yağ\ asiti]/\Delta F$ değerlerine karşı çizilen $[yağ\ asiti]$ grafiğinden elde ettiğimiz doğruların, mevcut deneysel şartlarda, lineer olmadığı görülmektedir. İlgili veri kümeleri için en ideal eğriyi bulmak için uyguladığımız en küçük kareler yöntemi kullanılarak elde edilen doğru denkleminde X kesişme noktası doğru olarak tespit edilememiş olabilir. Ayrıca bağlanma analizlerinde hesaplanan dissosiasyon sabitlerinin, özellikle birden fazla ve farklı afiniteli bağlanma bölgesi içeren sistemlerde, “gerçek” K_d yerine yalnızca deneysel koşulların etkisiyle oluşan bir “görünür K_d (K_{dapp})” niteliği taşıyabileceği literatürde belirtilmiştir. Hulme ve Trevethick (2010), ligand–protein etkileşimlerinde ölçülen K_d değerlerinin bağlanma bölgesi heterojenliği, ligand rekabeti, kooperatif bağlanma, protein konformasyonundaki değişiklikler ve uygulanan deneysel protokollere bağlı olarak “görünür bağlanma afinitesi” şeklinde davranabileceğini vurgulamaktadır. Bu nedenle albümin üzerinde farklı afinitelere sahip çoklu yağ asidi bağlanma bölgelerinin varlığı, endojen ligandlarla (bilirubin, hormonlar, ilaçlar) olası kompetisyon ve bağlanma sırasında ortaya çıkan konformasyonel değişimler, K_{dapp} değerlerinin gerçek mikroskobik afiniteden sapmasına neden olabilir. Çalışmamızda gözlenen doğrusal olmayan grafik davranışı ve K_{dapp} varyasyonları da bu etkenlerle uyumlu bir şekilde açıklanabilir (113).

Liyofilize HSA’nın oleik asite bağlanma afinitesine ilişkin yapılan çalışmada ayrışma sabiti $0.9\ \mu M$ olarak tespit edilmiştir. Laurik, kaproik ve linoleik asitler için bu değerler 0.07 ile $3.5\ \mu M$ arasında değiştiği bildirilmiştir (11). Başka benzer bir çalışmada ise insan Z proteini için oleik asitin ayrışma sabiti $0.04\ \mu M$ olarak ifade edilmiştir (112).

Protein farklılıkları, kullanılan ANS ve albümin konsantrasyon farklılıkları ve deneysel şartlardaki diğer değişiklikler mevcut K_{dapp} değerleri ile diğer araştırmacıların bulduğu değerler arasındaki farklılıkları açıklayabilir.

Yağ asitlerinin farklı doku yağ asiti bağlayan proteinlerine (FABP) bağlanma affinitelerine ilişkin olarak floresan prob ADIFAB ile yapılan bir başka araştırmada yağ asitlerine ait K_d değerlerinin izole edildikleri doku ve yağ asiti farklılıklarına bağlı olarak 2 ile 1000 nm arasında değiştiği bildirilmiştir (114). Suda çözünürlükleri en az olan doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin FABP'e olan affinitelerinin çoklu doymamış yağ asitlerinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu nedenle suda çözünürlüğün yağ asitlerinin bağlanma affinitelerinde önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bu K_d değerleri mevcut araştırmadaki K_{dapp} değerlerinin çok uzağında olmadığı görülebilir (18-43 µM). Bu farkın bir kısmı K_d ile K_{dapp} arasındaki farktan kaynaklanmış olabilir. Araştırılan proteinlerin farklı olması (HSA ve FABP) bir diğer etken olabilir.

Kontrol ve hasta yağ asitleri % kompozisyonlarının albümin/serum oranları karşılaştırıldığında, bu oranlarda bazı yağ asitleri için bir azalma görülürken sadece stearik asitin % albümin/serum oranlarında artış görülmektedir. Kontrolde 1.97 olan bu oran hasta serum albümini için 2.61'e yükselmektedir. Bu yükseliş stearik asitin özellikle serum albüminindeki yüzdesinin artışından kaynaklandığı açıktır. Serumda da sınırlı da olsa bir artış (%13.36'dan %17.24'e) görülmektedir. Hasta albümininde kontrole göre % oleik asit sınırlı da olsa azalırken serumda artış gösterdi. Tüm yukarıdaki veriler birlikte değerlendirildiğinde 16 C palmitik asitten elongasyon sonucu 18 C stearik asit sentezinde ve stearik asitin desaturasyonu sonucu 18:1 oleik asit sentezinde kullanılmasının hasta grubunda kontrole göre artışa sebep olduğu düşünülebilir. Palmitik asit yüzdesinin hasta grubunda kontrole göre hem serum hem de albüminde düşük bulunuşu bunu desteklemektedir. Ayrıca, insülin direnci olan hiperlipidemik hastalarda postprandial serum yağ asiti kompozisyonları incelendiğinde serum stearik asit konsantrasyonunda dramatik bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış SREBP-1c yolağının aktivasyonu neticesinde (insülin/SREBP-1c/ACC(Asetil KoA Karboksilaz/FAS(Yağ Asiti Sentaz)/ELOVL6 (Elongation of Long Chain Fatty Acid family number 6)) palmitik asitin ELOVL6 katalizasyonunda elongasyonu sonucu meydana gelebileceği ileri sürülmüştür. Bu sonuçlar mevcut bulgularımızı desteklemektedir (115).

Hasta albuminindeki yüzdesi kontrole göre en yüksek oranda azalan yağ asiti gamma linoleik asittir (%46.58 → %34.04). Bunun yanında linoleik asit yüzdesi özellikle hasta albümininde kontrole göre düşük bulunurken hasta serum araşidonik düzeyi

kontrole göre önemli bir artış gösterdi. ω -6 yağ asiti familyasının sentez yolağına bakıldığında, linoleik asitten (18:2) gamma linolenik asit (18:3) desaturasyon, sonra elongasyon ile dihomogamma linoleik asit (20:3) ve sonra da desaturasyon ile araşidonik asit sentezlenmektedir. Albumin linoleik asit ile gamma linolenik asit düzeyleri azalırken serum araşidonik asit düzeylerinin NAFLD hastalarında artış göstermesi, yine elongaz ve desaturaz aktivitelerindeki artışa işaret edebilir (116). Bu üç yağ asiti diyetlerde nispeten az bulunur. Dolayısıyla bu değişimlerin daha çok sentez düzeyi ile ilgili oldukları söylenebilir. Batı tipi beslenen insanlarda omega-6 çoklu doymamış yağ asiti olan araşidonik asit, inflamasyon ile ilgili hücrelerin membran fosfolipidlerinde mevcuttur. Prostaglandinler ve lökotrienler gibi güçlü proinflamatuvarların prekürsörleridir. PLA2 birçok inflamasyon uyarısıyla aktive edilir ve membran fosfolipidleri arasında sn-2 pozisyonundaki araşidonik asiti ayırır. Salınan araşidonik asit, siklooksigenaz, lipoksigenaz ve sitokrom P450 enzimlerinin substratı olarak rol alırlar ve eikozanoid mediatörlerini meydana getirirler. Bunlar prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienlerdir. Spesifik reseptörler aracılığı ile inflamasyon süreçlerini regüle ederler. Omega-3 ve omega-6 çoklu doymamış yağ asitleri ve türevlerinin inflamasyon süreci ile etkileşimleri oldukça komplekstir ve henüz tam aydınlatılamamıştır (116). Bir etken olarak inflamasyonun NAFLD ve NASH patogenezisindeki rollerine ilişkin pek çok araştırma yayınlanmıştır. Mevcut çalışmada hasta(NAFLD) grubu serumunda araşidonik asit düzeyinin artışı anlamlıdır ve NAFLD patogenezi ile uyumludur. Ancak araşidonik asit prekürsörleri olan linoleik ve gamma linolenik asitlerin albüminde azalırken serumda artması sentezin arttığını gösterirken, albümindeki yüzdesinin değişim göstermemesi albumine bağlanma afinitesinin diğer yağ asitlerinden muhtemelen daha düşük olması (büyük Kd değeri) ile açıklanabilir.

Hasta serumunda kontrole göre EPA (18:3) yüzdesinin daha düşük olduğu görülmektedir. EPA, omega-3 familyası üyesi olan α -linolenik asitten karaciğerde desaturasyon/elongasyon süreçleri sonucunda sentezlenmektedir. α -linolenik asit insan diyetinde esansiyeldir, kronik tüketimi ile EPA'ya dönüşümü artmaktadır. Beslenme şekillerinden etkilenmektedir. Dolayısıyla, NAFLD hasta serumunda EPA düzeyindeki değişim besinsel farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi, desaturasyon/elongasyon aktivitelerindeki değişim ile ilgili olabilir. Bu süreçlerin NAFLD patogenezisindeki rolüne ait çok az çalışma mevcuttur. Ayrıca beslenmeye bağlı EPA düzeyindeki artışın, DHA'ya dönüşüm düzeyindeki yetersizlik nedeniyle bu yağ asitinin konsantrasyonunda bir artışa sebep olmadığı bildirilmiştir. Dolayısıyla, EPA ve DHA düzeylerinde besinsel

kökenli değişimler birbirinden fazla etkilenmediği söylenebilir. Mevcut çalışmada da DHA düzeyinde bir değişim gözlenmemiştir (117).

Hasta grubunda bulunan 20 bireyden 10'u 1. Derece yağlanma, 8'i 2. Derece yağlanma 2'si ise 3. Derece yağlanma göstermektedir. Yağlanma derecesindeki farklılığın deneysel sonuçlara etkisini değerlendirmek için kontrol, Grade 1 ve Grade 2 grupları arasında istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Floresan ölçüm değerlerinde çoğu parametre için gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilemedi. Bu durum örneklem sayısının azlığından kaynaklanıyor olabilir. Bunun için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Serum yağ asidi % kompozisyonları karşılaştırıldığında araşidonik asit yüzdesinin grade 2 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunduğu görülmektedir. Yağlanma derecesindeki artış NAFLD patogenezisinin sonucu olarak inflamasyon derecesini de artırmaktadır. Araşidonik asit yüksekliği beklenen bir durumdur ve literatürde gözlenen bulgularla uyumludur (118,119). Albümin yağ asidi % kompozisyonları karşılaştırıldığında albümin stearik asit yüzdesinin grade 2 grubunda hem kontrol grubuna göre hem grade 1 grubuna göre anlamlı yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, NAFLD'de lipogenez ve yağ asidi metabolizmasında meydana gelen yeniden düzenlenme ile ilişkili olabilir. NAFLD'de 16 C palmitik asitten elongasyon sonucu 18 C stearik asit sentezinde artış olduğunu gösterdiği düşünülebilir.

Floresan bağlanma parametreleri ile serum yağ asidi yüzde kompozisyonlarının klinik biyokimyasal belirteçlerle olan ilişkisini değerlendirmek amacıyla Grade 1, Grade 2 ve kontrol gruplarında Spearman's rho korelasyon analizi uygulandı. Grade 1 grubunda serum glikoz konsantrasyonu ile palmitik, miristik ve stearik yağ asitlerine ait floresan yer değiştirme % oranlarında, özellikle 140, 175 ve 210 mikromolar konsantrasyonlarda negatif bir korelasyon görülmektedir. Diğer bir deyişle serum glikoz konsantrasyonu arttıkça söz konusu yağ asitlerinin albümine bağlanma kabiliyeti artmaktadır. Bu durum albüminde daha fazla sayıda boş bağlanma bölgesinin mevcut olduğuna işaret edebilir. Bu da yüksek glikoz →yüksek insülin sekresyonu → adipoz doku lipolizisinin inhibisyonu → adipoz dokudan seruma serbest yağ asiti salınımının azalması → serum serbest yağ asiti konsantrasyonunun düşmesi → albümindeki bağlı yağ asiti sayısının azalması, boş bağlanma bölge sayısının artması → albuminin eklenen yağ asitlerini bağlama kabiliyetinin artması, ANS-floresan yer değiştirme % sinin artışı yoluyla olabilir. Grade 2 grubunda grade 1 grubundan farklı olarak palmitik asitin 140, 175 ve 210 mikromolarlık konsantrasyonlarındaki % floresan yer değiştirme düzeyleri HbA1c düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmesi HbA1c yüksekliği, kronik

hipergliseminin bir indikatörü olarak ele alındığında, , muhtemelen ortaya çıkmış olan insülin direncine bağlanabilir. Bu durumda, lipolizisin inhibe edilememesi sonucu yüksek serum yağ asiti konsantrasyonu nedeniyle albuminin yağ asiti bağlama kabiliyetinin azaldığı diğer bir deyişle albümindeki bağlanma bölgelerinin grade 1 deki duruma göre daha dolu olduğu sonucuna varılabilir. Genel olarak, Grade 1 grubunda glikoz ile PA, SA ve MA'nın 140–210 μ M düzeylerinde güçlü negatif korelasyon gözlenirken; Grade 2 grubunda HbA1c ile PA'nın aynı konsantrasyonlarda güçlü pozitif korelasyonu saptanmıştır. Bu durum karaciğerde yağlanma seviyesi henüz önemli ölçüde artmamışken glikoz seviyesindeki ani değişimlerin floresan yer değiştirme derecelerinde etkisinin az olduğunu ve albüminin ANS floresan bileşiğinden ayrılıp yağ asidi bağlama affinitesinde ciddi değişikliklere yol açmadığını göstermektedir. Bununla birlikte yağlanma derecesindeki artış ve glikoz seviyesindeki yüksekliğin kronikleşmesi durumunda glikasyon ve farklı patolojik sebeplerle en azından yalnızca palmitik asitte dahi olsa albüminin yağ asidi bağlama affinitesinde azalmalara yol açtığı söylenebilir.

Grade 1 grubunda serum kaproik asit ile ALT ve AST arasında pozitif korelasyon görülürken aynı zamanda grade 2 grubunda da serum kaproik asit ile AST arasında pozitif korelasyon görülmektedir. ALT, AST değerleri karaciğer harabiyetini işaret eden belirteçler olduğundan bu durum serum kaproik asit düzeyi ile bu parametreler arasındaki ilişkiyi güçlendirmektedir. Serum kaproik asit düzeyi sadece diyet kaynaklı değildir. Bağırsak bakterileri tarafından sentezlenebilir aynı zamanda uzun zincirli yağ asitleri peroksizomlarda oksidasyona uğramadan önce kısaltılır ve bu durumda yan ürün olarak kaproik asit oluşabilir (120,121).

NAFLD'de de mitokondriyal β -oksidasyon kapasitesinin azalması, peroksizomal yağ asidi kısaltılmasının artması ve bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulması nedeniyle kaproik asidin daha fazla dolaşıma geçtiği düşünülebilir. Aynı zamanda kaproik asit ketojenik özellikte yağ asidi olarak mitokondriyal oksidasyona uğrayabilir (122). NAFLD'de mitokondriyal oksidasyonun bozulması dolaşıma geçen kaproik asit miktarını artırabilir. Ayrıca literatürde kaproik asitin proinflamatuvar özellik gösterdiği belirtilmiştir ve bu etki çalışmamızda gözlenen kaproik asit–ALT/AST korelasyonunun biyolojik olarak anlamlı olabileceğini düşündürmektedir (123). Mevcut literatürde NAFLD'de de ALT, AST düzeyleri ve kaproik asit düzeyi arasındaki ilişkiyi destekleyen çalışmalara rastlanılamadı fakat çalışmada elde ettiğimiz bu veri gelecek çalışmalara ışık tutabilir. NAFLD'de kaproik asit düzeyi, karaciğer hasarı ve bağırsak ilişkisini araştıran daha çok çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hasta ve kontrollerden alınan kan numunelerinden çalışılan biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırmaları yapıldı. Kontrol ve NAFLD grupları arasında değerlendirilen biyokimyasal değişkenler, hastalığın metabolik ve hepatik düzeyde oluşturduğu disfonksiyonları göstermektedir. NAFLD grubunda glukoz, insülin, HbA1c ve HOMA-IR düzeylerinin anlamlı derecede yüksek bulunması, hepatik insülin sinyalizasyonundaki bozulmanın karakteristik bir göstergesidir (124,125). Bulgularımız, insülin direncinin NAFLD gelişimindeki merkezi rolünü vurgulayan geniş literatür ile uyumludur ancak hasta grubunda 8 diyabetlinin olması bu yüksekliklerde ana sebebin Tip 2 diyabetten kaynaklandığını düşündürdüğü için DM+ ve DM- olan gruplar arasında ek istatistiksel değerlendirme yapıldı. Diyabet durumuna göre yapılan alt grup analizlerinde, glisemik parametrelerin, karaciğer enzimlerinin ve lipit profilinin diyabetik NAFLD hastalarında daha belirgin bozulma gösterdiği görüldü. Ancak DM- hastaların da bu parametrelerin anlamlı düzeyde olmasa da kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgu, diyabetin NAFLD progresyonunu hızlandığı, inflamasyon-üretim baskısını artırdığı ve fibrotik dönüşüm riskini yükselttiğine ilişkin literatür verileriyle uyumludur (126–128).

Hepatoselüler hasar belirteçleri olan ALT, AST ve GGT düzeylerinin hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek bulunması, yağ birikiminin oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar yanıt eşliğinde seyrettiğine işaret edebilir.

Lipit profiline ilişkin parametrelerde, NAFLD grubunda trigliserit ve VLDL düzeylerindeki artış ile HDL'deki azalma, metabolik sendrom ile ilişkili aterosklerotik dislipidemi örüntüsünü yansıtmaktadır. İnsülin direnci sonucu artan periferik lipoliz ve hepatik serbest yağ asidi akışı, VLDL üretimini artırarak trigliserit birikimini ve HDL düşüklüğünü tetikler. Çalışmamızdaki bulgular, NAFLD'nin sistemik lipit metabolizmasını bozarak kardiyometabolik risk profilini olumsuz yönde etkileyebileceği yönündeki mevcut bilgilerle uyumludur (129).

Albümin ve bilirubin parametrelerinde anlamlı bir fark saptanmamış olması, çalışmaya dahil edilen hastaların karaciğer sentetik fonksiyonlarının büyük ölçüde korunduğunu gösterebilir.

Tüm biyokimyasal parametreler birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızdaki NAFLD grubunda insülin direnci, hepatoselüler hasar, aterosklerotik dislipidemi ve metabolik-inflamatuvar aktivitenin belirgin şekilde arttığı gözlenmektedir. Bu bileşenler

NAFLD'nin multifaktöriyel patogeneziyle örtüşmekte ve hastalığın hem hepatik hem sistemik düzeyde klinik önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda albümin ekstrakt lipitlerinin İTK ile seperasyonu ve fotodansitometrik analizleri sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında hiçbir lipit spotuna ait istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Bu durum, özellikle düşük konsantrasyona sahip lipit fraksiyonlarının ya da albümine zayıf bağlanan lipit bileşenlerinin veya ilaçların İTK yönteminin düşük duyarlılık düzeyi ile tespit edilememesine bağlı olabilir. Her numune için albümine bağlanmış olan bileşiklerin (farklı metabolitler, ilaçlar) ayrıntılı ve hassas analizlerine (ör. LC-MS/MS yöntemi ile) ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, NAFLD patogeneğinde serum ve albümine bağılı yağ asidi dağılımı, albüminin yağ asidi bağlama kabiliyeti ve klinik biyokimyasal parametrelerle ilişkiler değeriendirildi.

Kontrol ve hasta serumu ile kontrol ve hasta albümini % yağ asidi kompozisyonları arasında bir paralellik gözlenmedi. Ancak kontrol serum ve albümin ile hasta serum ve albümin arasındaki % yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklarda paralellik gözlendi. Bu dinamiklere uymayanlar kontrol grubunda gama linoleik asit ve palmitik asit hasta grubunda da araşidonik asittir. Hasta albumininde gamma linoleik asit ve linoleik asit yüzdelerinin kontrole göre önemli azalışı, buna karşın serum araşidonik asit yüzdesinin artışı ile birlikte dikkate alındığında ω -6 sentez yolağıyla bağlantılı olarak linoleik asitten (18:2) desaturasyon ve elongasyon yoluyla araşidonik asit (20:4) sentezine işaret ettiğı sonucuna varılabilir. Hasta serumunda araşidonik yüzdesinin artışı özellikle inflamasyon ortamı ile bağlantılı olabilir.

Stearik asit hem kontrol hem hasta grubunda albüminde anlamlı olarak yüksek bulundu. Hasta grubunda stearik asit % değeriinin özellikle albuminde ama aynı zamanda sınırlı da olsa serumda da artışı, hasta serumunda % palmitik asit düzeyinin azalması ve % oleik asit düzeyinin anlamlı artışı ile birlikte değeriendirildiğinde, stearik (18C) ve oleik asitlerin (18:1) palmitik asitten (16C) elongasyon ve desaturasyon işlemleri ile sentez yolağının aktifleştigi düşünölebilir. İnsülin direnci olan hiperlipidemik hastalarda SREBP-1c yolağının aktivasyonuna işaret eden çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir.

Yağ asitlerinin albümine bağlanmasına dair ANS-floresan yer değıştirme yönteminin sağlıklı çalıştığı gözlendi. ANS-floresan yer değıştirme yöntemi ile kontrol ve NAFLD gruplarının serum albuminlerinin yağ asidi bağlama kabiliyetleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilemedi. Ancak yağ asitleri konsantrasyonları yükseldikçe, oleik asit hariç, test edilen tüm yağ asitleri için p değeriilerinin anlamlılık sınırına yaklaştığı belirlendi. 210 μ M dan daha yüksek konsantrasyonlarda iki grup arasında anlamlı bir fark beklenebilir. Çalışmamızda gönüllü olan hasta grubu katılımcıları genel olarak grade 1-2 evresindedir. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan ANS-floresan yer değıştirme yönteminin, albümin üzerindeki tüm yağ asidi bağlanma bölgelerini kapsayıcı olmaması ve hasta grubundaki bireylerin klinik evre farklılıkları,

gözlenen istatistiksel benzerliğin başlıca nedenleri arasında olabilir. Farklı bağlanma bölgesi spesifikliği gösteren prob moleküllerinin kullanılması ve çalışmaya ağırlıklı olarak grade 3-4 katılımcıları eklenerek bağlanma kabiliyetindeki farklar daha belirgin hale getirilebilir.

Çalışmada kontrol ve hasta serumlarındaki yağ asidi kompozisyonlarını tek başına değerlendirmek yerine, serum ve albümin örneklerinde gözlenen yağ asidi yüzdesi değişimlerine odaklanmak NAFLD patogenezinin ilişkin daha belirgin bulgular sunmaktadır.

NAFLD grubu ultrasonografi bulgularına göre grade 1 ve grade 2 olarak sınıflandırıldı. Dört yağ asidinin farklı konsantrasyonlardaki % floresan yer değiştirme verileri, serum-albumin % yağ asidi kompozisyonları ve biyokimyasal parametreler arasında korelasyon analizi yapıldığında, grade 1 grubunda serum glukoz düzeyi ile albüminin palmitik, miristik ve stearik asitleri 140, 175 ve 210 μM 'de bağlama kapasitesi arasında negatif ilişki saptandı. Grade 2 grubunda ise yalnızca palmitik asidin aynı konsantrasyon aralıklarındaki bağlanma kapasitesi HbA1c düzeyi ile pozitif korelasyon gösterdi. Serum glukoz ve HbA1C düzeyleri serum albumininin yağ asitlerini bağlama kabiliyetlerini etkileyen bir faktör olabilir. Albumin glikasyon derecesinin albumin-yag asiti etkileşiminde rol alabileceği öngörülebilir.

Serum kaproik asit düzeyleri, grade 1 grubunda ALT ve AST ile; grade 2 grubunda ise AST ile pozitif korelasyon göstermiştir. AST/ALT artışı karaciğer hasarının bir göstergesi olduğundan, bu ilişki kaproik asidin hepatoselüler hasarla bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Uzun zincirli yağ asitlerinin peroksizomal kısaltılmasıyla oluşan kaproik asit, mitokondriyal β -oksidasyon kapasitesinin bozulduğu durumlarda dolaşıma artmış miktarda geçebilir. NAFLD'de görülen mitokondriyal stres ve oksidatif disfonksiyon bu artışı açıklarken, kaproik asidin literatürde bildirilen proinflamatuvar etkileri, bu yağ asidinin NAFLD patogenezinde önemine işaret etmektedir.

Çalışmamızda albümin ekstrakt lipidlerinin İTK ile seperasyonu ve fotodansitometrik analizleri sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Serum albuminine bağlı yağ asidi dışındaki diğer bileşiklerin (ilaç veya metabolit) analizleri hassas analitik yöntemlerle gerçekleştirilmelidir (Ör. LC-MS/MS, NMR).

Hasta ve kontrol grubu demografik özellikleri ve serum biyokimyasal parametreleri bulguları beklenildiği gibidir ve NAFLD patogenezisini destekler niteliktedir.



KAYNAKLAR

1. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)–pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev.* 2017;49(2):197-211.
2. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.
3. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):47-64.
4. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980 ;55(7):434-8.
5. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016;65(8):1038-48.
6. Harris R, Harman DJ, Card TR, Aithal GP, Guha IN. Prevalence of clinically significant liver disease within the general population, as defined by non-invasive markers of liver fibrosis: a systematic review. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017 ;2(4):288-297.
7. Guerra-Ruiz AR, Casals G, Iruzubieta P, Lalana M, Leis A, López RM, et al. Biochemical assessment of metabolic associated fatty liver disease. *Adv Lab Med.* 2021;2(2):199-219.
8. Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, Trimble G, AlQahtani S, Younossi I, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(3):580-589.
9. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology.* 2010;51(2):679-89.
10. Sun L, Wang Q, Liu M, Xu G, Yin H, Wang D, et al. Albumin binding function is a novel biomarker for early liver damage and disease progression in non-alcoholic fatty liver disease. *Endocrine.* 2020;69(2):294-302.
11. Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O, Inoue T. Kinetics of fatty acid binding ability of glycated human serum albumin. *J Biosci.* 2005;30(4):475–81.

12. Santos EC, Spector AA. Effect of Fatty Acids on the Binding of 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate to Bovine Serum Albumin. *Biochemistry*. 1972;11(12):2299–302.
13. Ge P, Yang H, Lu J, Liao W, Du S, Xu Y, et al. Albumin Binding Function: The Potential Earliest Indicator for Liver Function Damage. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016.
14. Sun L, Yin H, Liu M, Xu G, Zhou X, Ge P, et al. Impaired albumin function: a novel potential indicator for liver function damage? *Ann Med*. 2019;51(7-8):333-344.
15. Kleiner DE, Makhlouf HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):293-312.
16. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908-922.
17. Loomba R, Wong VWS. Implications of the new nomenclature of steatotic liver disease and definition of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2024;59(2):150-156.
18. Bae JC. No More NAFLD: The Term Is Now MASLD. *Endocrinology and Metabolism*. 2024;39(1):92-94.
19. Rinella ME, Sookoian S. From NAFLD to MASLD: updated naming and diagnosis criteria for fatty liver disease. *J Lipid Res*. 2024;65(1):100485.
20. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
21. Zhou J, Zhou F, Wang W, Zhang XJ, Ji YX, Zhang P, et al. Epidemiological Features of NAFLD From 1999 to 2018 in China. *Hepatology*. 2020;71(5):1851-1864.
22. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-95.
23. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*. 2016;64(5):1577-1586.
24. Kaya E, Yılmaz Y. Non-alcoholic fatty liver disease: A growing public health

- problem in Turkey. *Turk J Gastroenterol*. 2019;30(10):865-871.
25. Değertekin B, Tözün N, Demir F, Söylemez G, Parkan Ş, Gürtay E, et al. The changing prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Turkey in the last decade. *Turkish J Gastroenterol*. 2021;32(3):302-312.
 26. Wei S, Wang L, Evans PC, Xu S. NAFLD and NASH: etiology, targets and emerging therapies. *Drug Discov Today*. 2024;29(3):103910.
 27. Rada P, González-Rodríguez Á, García-Monzón C, Valverde ÁM. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis*. 2020 25;11(9):802.
 28. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese R V., Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(6):3077-82.
 29. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-88.
 30. Branković M, Jovanović I, Dukić M, Radonjić T, Oprić S, Klašnja S, et al. Lipotoxicity as the Leading Cause of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):5146.
 31. Song C, Long X, He J, Huang Y. Recent evaluation about inflammatory mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Front Pharmacol*. 2023;14:1081334.
 32. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(6):349-364.
 33. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression from NAFLD to NASH. *Transplantation*. 2019;103(1):e1-e13.
 34. Swamikkannu DM, Dasarapu S, Siva RPV, Nallam J, Pabba S. The gut-liver nexus: exploring gut microbiota dysbiosis in non-alcoholic fatty liver disease and its therapeutic implications. Vol. 14, *Egyptian Liver Journal*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024.
 35. Li L, Cai F, Guo C, Liu Z, Qin J, Huang J. Gut microbiome and NAFLD: impact and therapeutic potential. *Front Microbiol*. 2024;15:1500453.
 36. Pasta A, Formisano E, Calabrese F, Marabotto E, Furnari M, Bodini G, et al. From Dysbiosis to Hepatic Inflammation: A Narrative Review on the Diet-Microbiota-

- Liver Axis in Steatotic Liver Disease. *Microorganisms*. 2025;13(2):241.
37. Li X, He M, Yi X, Lu X, Zhu M, Xue M, et al. Short-chain fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease: New prospects for short-chain fatty acids as therapeutic targets. *Heliyon*. 2024;10(5):e26991.
 38. Castillo V, Figueroa F, González-Pizarro K, Jopia P, Ibacache-Quiroga C. Probiotics and prebiotics as a strategy for non-alcoholic fatty liver disease, a narrative review. *Foods*. 2021;10(8):1719.
 39. Lu J, Shataer D, Yan H, Dong X, Zhang M, Qin Y, et al. Probiotics and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Unveiling the Mechanisms of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in Modulating Lipid Metabolism, Inflammation, and Intestinal Barrier Integrity. *Foods*. 2024;13(18):2992.
 40. Pan Y, Yang Y, Wu J, Zhou H, Yang C. Efficacy of probiotics, prebiotics, and synbiotics on liver enzymes, lipid profiles, and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Gastroenterol*. 2024;24(1):283.
 41. Saran AR, Dave S, Zarrinpar A. Circadian Rhythms in the Pathogenesis and Treatment of Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1948-1966.
 42. Singh A, Anjum B, Naz Q, Raza S, Sinha RA, Ahmad MK, et al. Night shift-induced circadian disruption: links to initiation of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and risk of hepatic cancer. *Hepatoma Res*. 2024;10:2394-5079.
 43. Leone V, Gibbons SM, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM, et al. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):681-9.
 44. Kim K, Lee YJ, Kwon SC, Min YS, Lee HK, Baek G, et al. Correlation between shift work and non-alcoholic fatty liver disease among male workers in the steel manufacturing company of Korea: a cross-sectional study. *Ann Occup Environ Med*. 2022;34(1).
 45. DiStefano JK, Gerhard GS. NAFLD in normal weight individuals. *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):45.
 46. Polyzos SA, Perakakis N, Mantzoros CS. Fatty liver in lipodystrophy: A review with a focus on therapeutic perspectives of adiponectin and/or leptin replacement. *Metabolism*. 2019;96:66-82.
 47. Mitrovic B, Gluvic ZM, Obradovic M, Radunovic M, Rizzo M, Banach M, et al.

- Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: where do we stand today? *Arch Med Sci.* 2023;19(4):884-894..
48. Pecani M, Andreozzi P, Cangemi R, Corica B, Miglione M, Romiti GF, et al. Metabolic Syndrome and Liver Disease: Re-Appraisal of Screening, Diagnosis, and Treatment Through the Paradigm Shift from NAFLD to MASLD. *J Clin Med.* 2025;14(8):2750.
 49. Matherly SC, Puri P. Mechanisms of simple hepatic steatosis: Not so simple after all. *Clin Liver Dis.* 2012;16(3):505-24.
 50. Guo X, Yin X, Liu Z, Wang J. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15489.
 51. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009;13(4):511-31.
 52. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med.* 2011;43(8):617-49.
 53. Somnay K, Wadgaonkar P, Sridhar N, Roshni P, Rao N, Wadgaonkar R. Liver Fibrosis Leading to Cirrhosis: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. *Biomedicines.* 2024;12(10):2229.
 54. Tacke F, Puengel T, Loomba R, Friedman SL. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *J Hepatol.* 2023;79(2):552-566.
 55. Stickel F, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for hepatocellular carcinoma: Mechanisms and implications. *Gut.* 2010;59(10):1303-7.
 56. Li L, Liu DW, Yan HY, Wang ZY, Zhao SH, Wang B. Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies. *Obes Rev.* 2016;17(6):510-9.
 57. Ghouri N, Preiss D, Sattar N. Liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: A narrative review and clinical perspective of prospective data. *Hepatology.* 2010;52(3):1156-61.
 58. Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology.* 2012;56(3):943-51.

59. Pushpanathan P, Mathew G, Selvarajan S, Seshadri K, Srikanth P. Gut microbiota and its mysteries. *Indian J Med Microbiol.* 2019;37(2):268-277.
60. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017;67(4):829-846.
61. Bruschi FV, Claudel T, Tardelli M, Caligiuri A, Stulnig TM, Marra F, et al. The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2017;65(6):1875-1890.
62. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology.* 2017;66(4):1111-1124.
63. Stender S, Kozlitina J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nat Genet.* 2017;49(6):842-847.
64. Kneeman JM, Misdraji J, Corey KE. Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol.* 2012;5(3):199-207.
65. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007;30(5):1212-8.
66. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology.* 2003;37(6):1286-92.
67. Cho JH, Namgung JS, Lee J, Moon DH, Lee HK. Analysis of biochemical markers related to fatty liver patients. *J Phys Ther Sci.* 2014;26(12):1865-8.
68. Pouwels S, Sakran N, Graham Y, Leal A, Pintar T, Yang W, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocr Disord.* 2022;22(1):63.
69. Wang J, Qin T, Sun J, Li S, Cao L, Lu X. Non-invasive methods to evaluate liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Front Physiol.* 2022;13:1046497.
70. Patel K, Sebastiani G. Limitations of non-invasive tests for assessment of liver fibrosis. *JHEP Rep.* 2020;2(2):100067.
71. Günenc AN, Graf B, Stark H, Chari A. Fatty Acid Synthase: Structure, Function, and Regulation. In: *Subcellular Biochemistry.* 2022;99:1-33.

72. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2015;39(1 Suppl):18-32.
73. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2007;46(4):1081-90.
74. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, et al. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2015;35(2):582-90.
75. Tavares De Almeida I, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr.* 2002;21(3):219-23.
76. Zhou Y, Orešič M, Leivonen M, Gopalacharyulu P, Hyysalo J, Arola J, et al. Noninvasive Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Clinical Markers and Circulating Levels of Lipids and Metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(10):463-1472.
77. Feng R, Luo C, Li C, Du S, Okekunle AP, Li Y, et al. Free fatty acids profile among lean, overweight and obese non-alcoholic fatty liver disease patients: A case - Control study. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):165.
78. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2009;50(6):1827-38.
79. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012;33(3):209-90
80. Mishra V, Heath RJ. Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8411
81. Ashraf S, Qaiser H, Tariq S, Khalid A, Makeen HA, Alhazmi HA, et al. Unraveling the versatility of human serum albumin – A comprehensive review of its biological significance and therapeutic potential. *Curr Res Struct Biol.* 2023;6:100114.
82. Pavićević ID, Jovanović VB, Takić MM, Aćimović JM, Penezić AZ, Mandić LM. Quantification of total content of non-esterified fatty acids bound to human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;129:43–9.
83. Odunuga OO, Shazhko A. Ammonium sulfate precipitation combined with liquid chromatography is sufficient for purification of bovine serum albumin that is suitable for most routine laboratory applications. *Biochem Compd.* 2013;1(1).

84. Raoufinia R, Mota A, Keyhanvar N, Safari F, Shamekhi S, Abdolalizadeh J. Overview of albumin and its purification methods. *Adv Pharm Bull.* 2016;6(4):495-507.
85. Scopes RK. *Protein purification: principles and practice.* 3rd ed. New York: Springer; 1994.
86. England S, Seifter S. Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 1990;182:285-300.
87. Green, A.A., Hughes, W.L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology.* 1955; 1:67-90.
88. Wingfield P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Curr Protoc Protein Sci.* 1998;13(1)
89. Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(4):262-70.
90. Çiğ E, Güldür T. Comparison of Serum Albumin Separation by Ammonium Sulfate Precipitation and Cibacron Blue Affinity Chromatography. *Anatolian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2025;4(2):63–75.
91. Jovanović VB, Penezić-Romanjuk AZ, Pavićević ID, Aćimović JM, Mandić LM. Improving the reliability of human serum albumin-thiol group determination. *Anal Biochem.* 2013;439(1):17–22.
92. Travis J, Pannell R. Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clin Chim Acta.* 1973;49(1):49-52.
93. Gianazza E, Arnaud P. A general method for fractionation of plasma proteins. Dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron Blue F3-GA. *Biochem J.* 1982;201(1):129-36..
94. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
95. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
96. Walker JM, editor. *The protein protocols handbook.* 2nd ed. Totowa (NJ): Humana Press; 2002.
97. *Current protocols essential laboratory techniques.* 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2008.

98. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry* 7th. WH Free Co. 2017;2.
99. Poole CF. *The essence of chromatography*. Amsterdam: Elsevier; 2003.
100. Touchstone JC. *Practice of thin layer chromatography*. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 1992.
101. Santiago M, Strobel S. Thin layer chromatography. *Methods Enzymol*. 2013;533:303-24.
102. Matulis D, Baumann CG, Bloomfield VA, Lovrien RE. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers*. 1999;49(6):451–8.
103. Sparkman OD, Penton Z, Kitson FG. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2011.
104. Honour JW. Gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2006;324:53-74.
105. Masood A, Stark KD, Salem N. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J Lipid Res*. 2005;46(10):2299-305..
106. Richieri G V., Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res*. 1995;36(2):229-40..
107. Huber AH, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid profiles in human plasma & the unexpected absence of unbound palmitoleate. *J Lipid Res*. 2017;58(3):578-585.
108. Haeri HH, Schunk B, Tomaszewski J, Schimm H, Gelos MJ, Hinderberger D. Fatty Acid Binding to Human Serum Albumin in Blood Serum Characterized by EPR Spectroscopy. *ChemistryOpen*. 2019;8(5):650-656.
109. Immanuel S, Sanjaya AI. Albumin cobalt binding (ACB) test: its role as a novel marker of acute coronary syndrome. *Acta Med Indones*. 2006;38(2):92-6.
110. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of "Ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J*. 2004;21(1):29-34.
111. Lee P, Wu X. Review: Modifications of Human Serum Albumin and their Binding Effect. *Curr Pharm Des*. 2015;21(14):1862-5..
112. Takikawa H, Kaplowitz N. Binding of bile acids, oleic acid, and organic anions by rat and human hepatic Z protein. *Arch Biochem Biophys*. 1986;251(1):385-92.
113. Hulme EC, Trevethick MA. Ligand binding assays at equilibrium: Validation and

- interpretation. Vol. 161, British Journal of Pharmacology. 2010:1219-37.
114. Richieri G V, Ogata RT, Kleinfeld AM. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J Biol Chem.* 1994;269(39):23918–30.
 115. Chu X, Liu L, Na L, Lu H, Li S, Li Y, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1c mediates increase of postprandial stearic acid, a potential target for improving insulin resistance, in hyperlipidemia. *Diabetes.* 2013;62(2):561-71.
 116. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. Vol. 132, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2018;132:41-48.
 117. Burdge GC. Metabolism of α -linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2006;75(3):161-8.
 118. Sztolsztener K, Chabowski A, Harasim-Symbor E, Bielawiec P, Konstantynowicz-Nowicka K. Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development. *Biomolecules.* 2020;10(8):1133.
 119. Li J, Su WW, Wang ZL, Ji XF, Wang JW, Wang K. Identification and verification of biomarkers associated with arachidonic acid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2025;15(1):8521.
 120. Gao Y, Chen H, Li J, Ren S, Yang Z, Zhou Y, et al. Alterations of gut microbiota-derived metabolites in gestational diabetes mellitus and clinical significance. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(4).
 121. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *J Lipid Res.* 2016 Jun;57(6):943-54.
 122. Lin TY, Liu HW, Hung TM. The Ketogenic Effect of Medium-Chain Triacylglycerides. *Front Nutr.* 2021;8:747284.
 123. Saresella M, Marventano I, Barone M, La Rosa F, Piancone F, Mendozzi L, et al. Alterations in Circulating Fatty Acid Are Associated With Gut Microbiota Dysbiosis and Inflammation in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2020;11:1390.
 124. Mehta M, Shah J, Joshi U. Understanding Insulin Resistance in NAFLD: A Systematic Review and Meta-Analysis Focused on HOMA-IR in South Asians. *Cureus* 2024;16(10):e70768.
 125. Zeng P, Cai X, Yu X, Huang L, Chen X. HOMA-IR is an effective biomarker of non-alcoholic fatty liver disease in non-diabetic population. *J Int Med Res.* 2023;51(10).

126. Chhabra S, Singh SP, Singh A, Mehta V, Kaur A, Bansal N, et al. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Significant Hepatic Fibrosis in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol*. 2022;12(2):409-416.
127. Jung I, Koo DJ, Lee WY. Insulin Resistance, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical and Experimental Perspective. *Diabetes Metab J*. 2024;48(3):327-339.
128. Cernea S. NAFLD Fibrosis Progression and Type 2 Diabetes: The Hepatic–Metabolic Interplay. *Life*. 2024;14(2):272.
129. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2013;33(4):380-8.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2 Etik Kurul Onayı

