

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

**RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT
ÜZERİNE İNFLİXİMAB, ADALİMUMAB VE
PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. MUSTAFA YALÇIN

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. MESUT AKARSU

GASTROENTEROLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2012

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

**RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT
ÜZERİNE İNFLİXİMAB, ADALİMUMAB VE
PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

GASTROENTEROLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. MUSTAFA YALÇIN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. MESUT AKARSU

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2011.KB.SAG.005
sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET	1
2.İNGİLİZCE ÖZET	2-3
3. GİRİŞ	4-5
4. AMAÇ	5
5. GENEL BİLGİLER	6
A. EPİDEMİYOLOJİ	6
B. ETYOLOJİ	6-8
C. PATOGENEZ	9-15
D. KLİNİK, LABORATUAR VE GÖRÜNTÜLEME	16-17
E. HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLER	18-20
F. TANI	20-24
a. Karaciğer biyopsisinin rolü	
b. NAYKH'da Fibrozisin Noninvaziv Belirteçleri	
G. DOĞAL SEYİR	24-26
H. TEDAVİ	26-30
a. Antioksidanlar	
b. İnsülin-Sensitize Ajanlar	
c. Demir Redüksiyonu	
d. Lipid düşürücü ve sitoprotektif Ajanlar	
e. Gelecek terapiler	
f. Karaciğer nakli	
6. MATERYAL VE METOD	31-39
7. SONUÇLAR	40-54
8. TARTIŞMA	55-59
9. KAYNAKLAR	60-71

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı nedenleri

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

Tablo 3: Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı histolojik özellikleri

Tablo 4: Steatohepatit için önerilen skarlama system

Tablo 5: İlerlemiş non-alkolik yağlı karaciğer için riskler faktörleri

Tablo 6: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı için potansiyel tedaviler

Tablo 7: Normal diyet kimyasal içeriğı

Tablo 8: Metionin ve Kolin defisit diyet kimyasal içeriğı

Tablo 9: Sitokin seviyeleri

Tablo 10: Sitokin seviyelerinin gruplar aras istatistiksel verileri

Tablo 11: Biyokimyasal parametreler

Tablo 12: Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası istatistikleri

Tablo 13: Histopatolojik skorlar

Tablo 14: Gruplar arası hepatosit balonlaşması istatistiksel verileri

Tablo 15: Ratlarda NASH modelleri ve Anti TNF'lerin etkileri

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Non- alkolik steatohepatit patogenezinde çift vuru teorisi

Şekil 2: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında TNF alfanın rolü

Şekil 3: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) önerilen patogenezi

Şekil 4:Şüpheli Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında tanısal yaklaşım

Şekil 5: Gruplar ve özellikleri

Şekil 6: Grupların haftalık ağırlık ortalamaları

Şekil 7: TNF alfa seviyeleri

Şekil 8: TGF beta seviyeleri

Şekil 9: IL 6 seviyeleri

Şekil 10: IL 8 seviyeleri

Şekil 11: AST, ALT ve ALP seviyeleri

Şekil 12: Albumin seviyeleri

Şekil 13: Total protein seviyeleri

Şekil 14: Total bilirubin seviyeleri

Şekil 15: NASH skorları

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Ratlar gruplara halinde kafeslere alındı

Resim 2: Ratlara intraperitoneal ilaç uygulaması

Resim 3: Ratların eter anestezisi sonrası örneklerin alımı için hazırlanması

Resim 4: V. Kava'dan kan örneği alınması

Resim 5: Karaciğerin çıkarılması

Resim 6: Normal diyet alan rat karaciğerinin makroskopik görünümü

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

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

KISALTMALAR

NAYKH: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı

NASH: Non-alkolik steatohepatit

MCD: Metionin ve kolin defisit

AST: Aspartat aminotransferaz

ALT: Alanin aminotransferaz

GGT: γ -glutamil transpeptidaz

ALP: Alkalen fosfataz

NF-kappa β : Nükleer faktör kapa β

UDKA: Ursodeoksikolik asit

VKİ: Vücut kitle indeksi

FFA: Serbest yağ asitleri

IRS-1: İnsülin reseptör substrat-1

VLDL: Very-low-density lipoprotein

apoB-100: Apolipoprotein B-100

PPAR- α : Peroxisomal proliferator-activated reseptör- α

LPS: Lipopolisakkarit

ROS: Reaktif oksijen radikallerinin

ANA: Antinükleer antikor

AMA: Antimitokondriyal antikor

HCV: Hepatit C virüsü

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

TZD: Tiazolidinedionlar

HMG-CoA: Hidroksi-3-metil-koenzim A

TNF α : Tümör nekrozis factor alfa

TGF β : Transforming growth faktör beta

IL 6: İnterlökin 6

IL 8: İnterlökin 8

TEŞEKKÜR

Gastroenteroloji uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimleriyle bana yardımcı olan, yetişmemde emeği geçen; Başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İlkey Şimşek olmak üzere Prof. Dr. Ömür Gönen, Prof. Dr. Hale Akpınar, Prof. Dr. Ömer Topalak ve Doç. Dr. Müjde Soytürk'e,

Tezimin her aşamasında ve eğitimim sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. Mesut Akarsu'ya,

Uzmanlık eğitimi süresi boyunca yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma, Gastroenteroloji Bilim Dalı ve Endoskopi Ünitesi çalışanlarına,

Ve de aileme, onların verdikleri destek ve sevgiye,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Saygılarımla;

Uzm. Dr. Mustafa Yalçın

1- ÖZET

RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT ÜZERİNE İNFLİXİMAB, ADALİMUMAB VE PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Amaç: Non-alkolik steatohepatitte (NASH) etkin kullanılan bir medikal tedavi olmaması ve özellikle NASH patogenezinde tümör nekrozis faktör alfanın (TNF- α) önemli bir yeri olması nedeniyle, TNF- α 'yı etkileyen tedavilerin NASH gelişimine etkisinin araştırılması planlanmıştır.

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

Bulgular: MCD diyet alan grupta başarılı şekilde NASH oluşturuldu. Anti TNF alan üç grupta TNF- α seviyeleri etkili bir şekilde baskılandı. TNF- α seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 21.57 ± 5.89 pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 32.37 ± 13.85 pg/ml, MCD+infliximab verilen grupta 22.86 ± 16.15 pg/ml, MCD+adalimumab alan grupta 11.49 ± 8.10 pg/ml ve MCD+pentoksifilin alan grupta 29.67 ± 5.65 pg/ml olarak tespit edildi. Histopatolojik NASH skorunda her üç ajanla istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı azalma saptandı. Gruplar arası toplam NASH skoruna bakıldığında en yüksek toplam skor $6,14 \pm 1,06$ ile sadece MCD alan grupta görüldü. En düşük skor ise $5,28 \pm 0,75$ ile MCD+adalimumab alan grupta olduğu tespit edildi. Yine AST, ALT ve ALP seviyelerinde anti TNF uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı iyileşme tespit edildi.

Sonuç: Bizim çalışmamızda anti TNF etki gösteren bu üç ajanın NASH patogenezinde rol oynayan TNF- α 'yı etkin bir biçimde baskılamasına rağmen NASH gelişimini engellemediği ancak NASH histopatoloji skorunu bir miktar geriletmediği, karaciğer fonksiyon testleri üzerine olumlu etkilerinin olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığını gösterdi.

Anahtar kelimeler: Non-Alkolik steatohepatitis, İnfliximab, Adalimumab, Pentoksifilin, Ratlar

2- SUMMARY

A COMPARISON OF THE EFFECTS OF INFLIXIMAB, ADALIMUMAB AND PENTOXIFYLLINE ON RATS WITH NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Aim: Due to the lack of effective medical treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), we aimed to evaluate new treatment options. Since tumor necrosis factor alpha (TNF- α) plays an important role in NASH, we aimed to investigate the treatment options affecting TNF- α during the development of NASH.

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

Results: NASH was successfully created in the MCD diet group. Levels of TNF- α were effectively suppressed in the three groups that received anti-TNF. The TNF- α levels were detected to be as follows: 21.57 ± 5.89 pg/ml in the group receiving a normal diet, 32.37 ± 13.85 pg/ml in the group receiving the MCD diet, 22.86 ± 16.15 pg/ml in the group treated with infliximab+MCD, 11.49 ± 8.10 pg/ml in the group treated with MCD + adalimumab, and 29.67 ± 5.65 pg/ml in the group treated with MCD + pentoxifylline. There were no statistically significant differences observed between the three agents in terms of the histological NASH score. When comparing the total NASH scores between groups, the highest total score was 6.14 ± 1.06 in the group receiving an MCD diet and no medication. The lowest total NASH score was 5.28 ± 0.75 in the MCD+adalimumab group. In addition, there were no significant differences between the groups treated with anti-TNF in terms of AST, ALT and ALP levels.

Conclusion: Our study showed that the anti-TNF agents infliximab, adalimumab and pentoxifylline effectively suppress TNF- α , which plays an important role in NASH pathogenesis. Although these drugs do not prevent the development of NASH, it was shown that they could

slightly reverse the NASH histopathology score and that they have positive effects on liver function tests.

Key words: Non-alcoholic steatohepatitis, infliximab, adalimumab, pentoxifylline, rats.



3-GİRİŞ

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

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

TNF- α antikoru olan infliximab inflamatuvar bağırsak hastalığı ve romatoid artrit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5,6). Bir kaç çalışmada İnfliximab'ın ratlarda NASH modelinde karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir (7,8).

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

Non-selektif fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin TNF- α gen transkripsiyonunu azaltmasının yanı sıra sitokin/kemokin yolunu multipl basamaklardan etkileyerek TNF- α 'yı direkt veya indirekt olarak inhibe eder. Yapılan rat modelleri ve insan çalışmalarında pentoksifilinin transaminaz ve karaciğer histopatolojisini iyileştirdiği gösterilmiştir (10).

Bu üç ilaçla ilgili sınırlı sayıda çalışma olup randomize kontrollü karşılaştırmalı çalışma bulunmamaktadır. NASH tedavisinde kullanılan etkin bir ilaç olmaması nedeniyle patogeneze

önemli rol oynayan sitokinlere karşı kullanılan ilaçların etkinliği araştırmak NASH için yeni tedavi seçenekleri ortaya çıkmasında yararlı olacaktır.

4- AMAÇ

Non-alkolik steatohepatitte etkin kullanılan bir medikal tedavi olmaması nedeniyle yeni tedavi seçeneklerini araştırılması planlanmıştır. Özellikle NASH patogenezinde TNF- α 'nın önemli bir yeri olması nedeniyle TNF- α 'yı etkileyen tedavilerin uygulanması ve NASH oluşumunun önlenmesi düşünülmüştür. Bu tedavi modaliteleri hem maliyet, hem de etkinliğini gösteren çalışmaların sınırlı olması, henüz rutin uygulamada yer almasa da gelecekteki yeni çalışmalar ve maliyetteki azalmalar ile birlikte NASH tedavisinde yerini alacağına inanmaktayız.

5-GENEL BİLGİLER

Non-alkolik steatohepatit (NASH) kavramı ilk kez 1980 yılında Ludwing ve arkadaşları tarafından alkolik hepatit histolojik ve biyokimyasal test bulgularına sahip olan ancak alkol kullanım öyküsü olmayan orta yaş grubu kişilerdeki bir karaciğer hastalığı olarak tanımlanmıştır (1). NASH'in bu ilk tanımından sonra oldukça fazla bilgi elde edilmiştir. NASH, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAYKH) bir parçasıdır. NAYKH; NASH, fibrozis ve sirozdan basit karaciğer yağlanması kadar karaciğer hasarının geniş bir spektrumunu kapsar.

A- EPİDEMİYOLOJİ

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

NAYKH genellikle dört ve altıncı dekatta görülmesine rağmen obez çocuklarda, adolesanlarda ve ileri yaş erişkinlerde sıklığı giderek artmaktadır. İlk çalışmalarda hastaların çoğunluğu kadındı ancak daha sonraki çalışmalarda NASH gibi daha riskli formların erkeklerde daha sık olduğu saptanmıştır. NAYKH prevalansında etnik farklılıklarda vardır. NAYKH ispaniklerde %45 gibi yüksek prevalansta olduğu saptanmıştır. Beyaz ırkta %33 iken afrikan amerikalılarda %24 prevalansta NAYKH tespit edildi. NAYKH'da etnik ve ırksal farklılığın nedeni bilinmemektedir. Ancak ırklar arası vücut yağ dağılımı farklılığı ve ispanikler arasındaki metabolik sendromun sıklığı buna etken olabilir (27,28,29). NAYKH'daki ailesel kümelenmeler çevresel ve genetik faktörlerinde etkili olduğunun bir göstergesi olabilir (30,31,32).

B- ETYOLOJİ

Birçok ajan ve durumun NAYKH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Nedenleri iki geniş kategoriye (1. ilaçlar ve toksinler 2. metabolik bozukluklar (edinilmiş veya doğuştan) olarak) ayrılabilir. NAYKH olası nedenleri Tablo 1 listelenmiştir. Obezite NAYKH ile sıklıkla birlikte görülen bir durumdur. 1980 yılından bu yana aşırı kilolu (vücut kitle indeksi (VKİ) $>25 \text{ kg/m}^2$) ya da obez ($\text{VKİ} > 30 \text{ kg/m}^2$) amerikalıların oranı giderek artmıştır. 2004 yılında erişkinlerin %66,2'si ve 12-19 yaş çocukların %17,4'ü aşırı kilolu veya obez olarak tespit edildi (33). Obezite

epidemik bir sağlık sorununu oluşturmaktadır. Bu nedenle de hem adultlarda hem de çocuklamada NAYKH buna paralel olarak sık görölmektedir. Morbid obez hastalarda (VKİ >35 kg/m²) NAYKH sıklığı %90'lara yükselmekte ve ilerlemiş hastalık (NASH gibi) %9-40 arasında görölmektedir (34-38). VKİ ile yağlanmanın derecesi ve karaciğer hasarı arasındaki ilişki birkaç çalışmada gösterilmiştir (39-41). Ancak karaciğer yağlanmasının gelişmesi için vücut yağ dağılımı total yağ kitlesinden daha önemlidir. Çalışmalar bel-kalça oranı ile metabolik sendrom ve karaciğer yağlanması arasındaki korelasyonu göstermiştir. Bu nedenle NAYKH göstergesi olarak intraabdominal ve visseral yağlanmanın önemi büyüktür (42-44).

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

NAYKH'lı kişilerde önemli oranda hiperlipidemi saptanmıştır. Dallas Heart Study çalışmasında miks hiperlipidemili hastaların %60'ında NAYKH tespit edildi (52). Kore'de yapılan bir çalışmada potansiyel karaciğer vericilerinde steatoz riski hiperlipidemisi olanlarda iki kat artmaktaydı (53). Birçok hasta tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve santral obezite gibi multipl risk faktörüne sahip olmasına rağmen bazı kişilerde bu tanımlanan risk faktörlerinden hiç birisi yoktur. NAYKH anormal yağ metabolizması ve mitokondriyal hasar veya disfonksiyona neden olan ilaçlar, toksinler, metabolik, cerrahi ve genetik durumlarla ilişkilidir (Tablo 1).

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

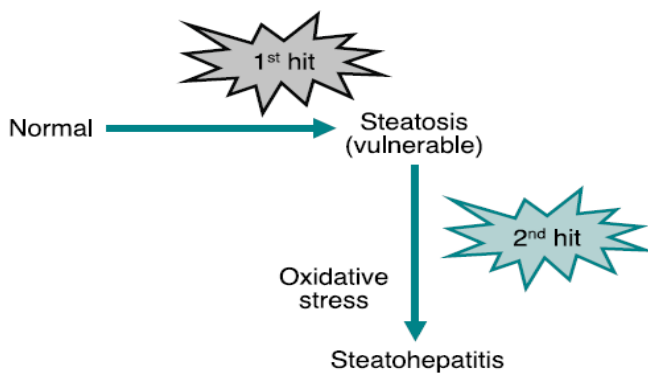
Tablo 1: Non-Alkolik yağlı karaciğer hastalığı nedenleri

Kazanılmış Metabolik Bozukluklar			Sitotoksik ve Sitostatik ilaçlar		
	Diabetes mellitus		LAsparaginase		
	Dislipidemi		Azacitidine		
	Kwashiorkor ve marasmus obezite		Azaserine		
	Starvasyon		Bleomycin		
			Methotrexate		
			Puromycin		
			Tetracycline*		
Diğer ilaç ve Toksinler			Metaller		
	Amiodarone		Antimony		
	4,4'-diethylaminoethoxyhexestrol		Barium salts		
	Dichlorethylene		Chromates		
	Ethionine		Phosphorus		
	Ethyl bromide		Rare earths of low atomic number		
	Estrogens		Thallium compounds		
	Glucocorticoids		Uranium compounds		
	Highly active antiretroviral therapy				
	Hydrazine				
	Hypoglycin				
	Orotate				
	Perhexilene maleate				
	Safrole				
	Tamoxifen				
Doğuştal metabolik bozukluklar			Cerrahi prosedürler		
	Galactosemia		Biliopancreatic diversion		
	Glycogen storage disease		Extensiv ince barsak rezeksiyonu		
	Hereditary fructose intolerance		Gastric bypass		
	Homocystinuria		Jejunoileal bypass		
	Systemic carnitine deficiency	Diğer ilaç ve Toksinler			
	Tyrosinemia	Amiodarone			
	Weber-Christian syndrome	4,4'-diethylaminoethoxyhexestrol			
	Wilson hastalığı	Dichlorethylene			
		Ethionine			

*Tetrasiklin mitokondriyal β -oksidasyonu inhibe ettiği için sitotoksikdir

C-PATOGENEZ

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



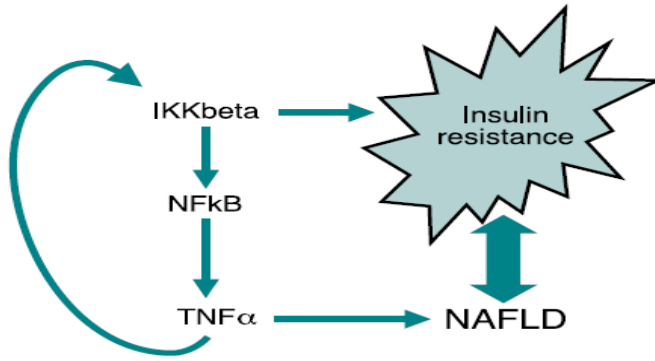
Şekil 1: Non- alkolik steatohepatit patogenezinde çift vuru teorisi

Güncel kanıtlar steatozdaki primer patolojik faktörün insülin rezistansı ve hiperinsülinemi olduğu odaklıdır. Klinik ve laboratuvar bulgular NAYKH'lı kişilerde glikoz intoleransı olmasa bile periferik insülin direnci ve hiperinsülinemi desteklemektedir (56-58). İnsülin rezistansına yol

açan moleküler mekanizma komplekstir ve tam olarak anlaşılamamıştır. Obezite ve hiperinsülinemide FFA içeren değişik birkaç molekül, TNF- α , membran glikoprotein PC-1 ve leptin insülin sinyal yoluna müdahale ederler. Diabetes mellitus ve obezite kısmen insülin rezistan adipoz doku tarafından anormal salınan FFA'larının neden olduğu artmış plazma FFA ile ilişkilidirler. Artmış FFA insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) sinyalini down-regüle ederek hepatik insülin rezistansına katkıda bulunur (59,60). Hiperinsülinemi ve insülin rezistansı bir dizi aberan FFA yıkım yoluyla steatoza neden olur. Karaciğerde insülin; yağ asidi sentezini sitümüle eder, mitokondriyal FFA β -oksidasyonunu down-regule eder, apolipoprotein B-100 (apoB-100) ve VLDL'nin intraselüler degradasyonunu artırarak hepatositlerden trigliserid sekresyonunu bloklar ve VLDL içeren veziküllerin eksositozunu bloklar (59,61-62). Ayrıca NASH'lı hastalarda apoB-100'ün bozulmuş hepatik sentezi de hepatik trigliserid birikimine katkıda bulunabilir (63).

NAYKH'da insülin direnci, TNF- α , leptin ve adiponektin dahil adipositler tarafından salgılanan bazı önemli peptid medyatörlerinin anormal düzey veya fonksiyonu tarafından artabilir.

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



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

Adiponektin: Adipositokinler visseral yağ dokusu tarafından üretilen peptidlerdir. Adiponektin VKİ ile ters orantılı olarak adipositler tarafından salgılanır ve TNF- α 'nın güçlü bir inhibitörüdür. Serum adiponektin düzeyleri obezite, insülin direnci, diyabet ve metabolik sendromda azalır (69). Yüksek yağlı gıda, alkol içeren diyet ve genetik olarak obez (ob/ob) farelerde rekombinant adiponektin verilmesi dramatik olarak hepatomegali, inflamasyon ve yükselmiş karaciğer testlerini iyileştirir (72). Adiponektinin bu terapötik etkileri hepatik yağ asidi β -oksidasyonunu artırması, hepatik trigliserid miktarını ve hepatik insülin direncini azaltmasının bir sonucudur. Ayrıca, adiponektin, TNF- α 'nın karaciğer ve plazma konsantrasyonlarını suprese eder. Çalışmalarda serum adiponektin düzeyleri ile steatoz derecesi ve NAYKH olan insanlarda hepatosit hasarı arasında ters bir ilişki rapor edilmiştir ve bu ilişki insülin direncinden bağımsızdır (70,73). TNF- α /adiponektin oranının steatoz gelişiminde birincil patojenik rolü veya doğrudan steatohepatitin steatozdan progresyonu ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

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

İnsülin direnci: İnsülin direnci ve hiperinsülinemi steatoz gelişimi için önemli olmasına rağmen

steatohepatit ve fibrozise progresyonda yeterli değillerdir. Alkolik karaciğer hastalığı ve NAYKH arasındaki histolojik özellikleri ve doğal seyrindeki benzerlikler ortak mekanizmaların bu hastalıkların patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Kronik oksidatif stresin alkole bağlı karaciğer hasarının patogenezinde merkezi rolü olduğuna inanılmaktadır. NAYKH'lı hastalarda stokrom P450 2E1 (CYP2E1)'in içinde olduğu mikrozomal enzimlerin aktivasyonu ve NAYKH'nın murin modellerinde reaktif oksijen radikallerinin (ROS) mitokondriyal üretiminin patogeneizde kronik oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun santral rol oynayabileceğini düşündürmektedir (79-84).

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

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

Giderek artan kanıtlar, vücut mitokondriyal değişiklikler ve bozulmuş karaciğer enerji homeostazının NAYKH patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmalar mitokondriyal ROS oluşumunda artış ile birlikte, yağlanmış karaciğerde mitokondriyal solunum zinciri komplekslerinin aktivitesinde bir azalma göstermiştir; bu değişiklikler serum TNF- α düzeyleri, insülin direnci ve VKİ ile koreledir (91,92). Ob/ob farelerin artmış uncoupling protein, UCP-2, iç mitokondriyal membran proteini aracılı proton sızıntısı ve uncoupled adenosin trifosfat (ATP) sentezi seviyeleri, ROS üretimini artırır ve yağlı hepatositleri metabolik strese karşı duyarlı hale getirebilir (84). Ancak, insanlardaki NAYKH'da UCP-2'nin rolü bilinmemektedir. Çalışmalar NAYKH olan farelerde ve insanlarda ATP tükenmesi sonrası ATP depolama kapasitenin azaldığını göstermiştir. Mitokondriyal yapısal kusurlar azalmış ATP depolanmasının nedenlerinden biri olabilir. Megamitokondri ve kristal mitokondriyal inklüzyonlar NAYKH olan hastalarda tespit edilmiştir ve bunlar oksidatif stres ya da sekonder hasarın bir uyum süreci temsil edebilir (58,93). NASH olan hastalardaki sınırlı veriler ROS temizleyici, glikoz metabolizması ve yağ asidi metabolizması dahil olmak üzere uygun mitokondriyal fonksiyon için birçok farklı gen olduğunu düşündürmektedir (94). Ayrıca, alkolik karaciğer hastalığı ve Wilson hastalığında bulunan benzer mitokondriyal DNA hasarı da NASH gelişimine katkı sağlayabilir. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon ve ATP tükenmesinin NAYKH nedeni veya sonucu olup olmadığını belirlemek için insan ve hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

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

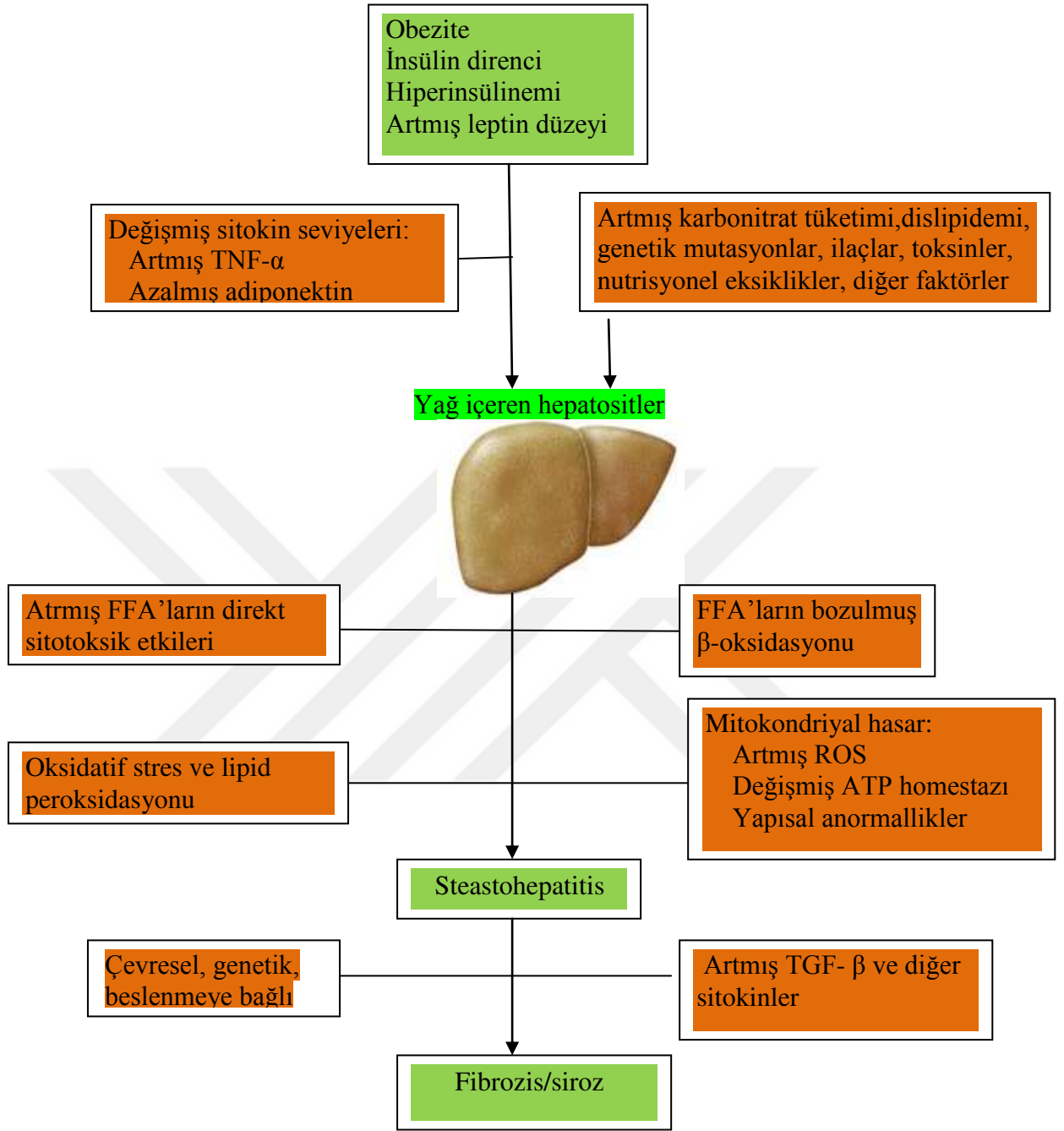
Transforming growth factor- β : NAYKH'de, lipid peroksidasyon ürünleri stellat hücreleri aktive eden transforming growth factor- β 'nın (TGF- β) hepatik üretimini artırabilir. Endotel hücreleri, lökosit ve Kupffer hücreleri muhtemelen trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), TGF- β ve diğer sitokinlerin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

NAYKH patogenezi ile ilgili araştırmalar artmakta olmasına rağmen tam olarak netlik yoktur (şekil

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

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

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



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

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

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease

D-KLİNİK, LABORATUAR VE GÖRÜNTÜLEME

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

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

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

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

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease

Yükselmiş karaciğer biyokimyasal testleri basit yağlanması olan hastaların %50'si kadarında, ileri NAYKH olan hastaların yaklaşık % 80'inde görülebilir. Serum aspartat aminotransferaz (AST) veya alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi veya her ikisinin hafif-orta derecede (1.5-4 kat kadar) yükselmesi olağandır ancak nadiren normalin 10 katına çıkabilir. Serum ALT seviyesi, genellikle

AST seviyesinden daha fazla artar bu AST seviyesinin ALT seviyesinden 2 kat fazla olduğu alkolik hepatitin tersi bir durumdur. Alkalen fosfataz ve gama glutamil transpeptidaz (GGT) düzeyleri yükselebilir, ancak serum bilirubin seviyesi, protrombin zamanı ve serum albümin düzeyi genellikle NAYKH ilişkili sirozlu hastalar hariç, normaldir. NAYKH'lı hastaların dörtte birinde düşük titrede (<1:320) antin kleer antikor (ANA) pozitifliği olabilir (98). Antimitokondriyal antikor (AMA) ve hepatit B yüzey antijeni tespit edilmez. Hepatit C virüsü (HCV) antikorunun, karaciğer biyokimyasal test seviyesi y ksekliliğinin tek nedeni olarak NAYKH düşünmek için negatif olduğunun gösterilmesi gerekir. Bununla birlikte, steatoz, obezite ve HCV enfeksiyonu birlikteliği sürecin daha agresif seyretmesine neden olur (99). Serum seruloplazmin ve α_1 Antitripsin düzeyleri normal sınırlar içindedir. Serum ve karaciğer demir düzeyleri NAYKH olan hastalarda yükselebilir. Özellikle, serum ferritin düzeyi NAYKH hastaların %20-%50'sinde yüksek saptanabilir bu ileri bir hastalığın işareti olabilir (48,100). Bununla birlikte, NAYKH olan hastalar arasında genetik hemokromatoz sıklığı yüksek değildir. Klinik ve laboratuvar bulgular NAYKH histolojik şiddeti ile korale değildir. Siroz da dahil olmak üzere NAYKH histolojik spektrumunda, normal veya normale yakın serum aminotransferaz düzeyleri görülebilir (50).

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

E-HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLER

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

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

Tablo 3: Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı histolojik özellikleri

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

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease

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

Tablo 4. Steatohepatit için önerilen skrlama sistem

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

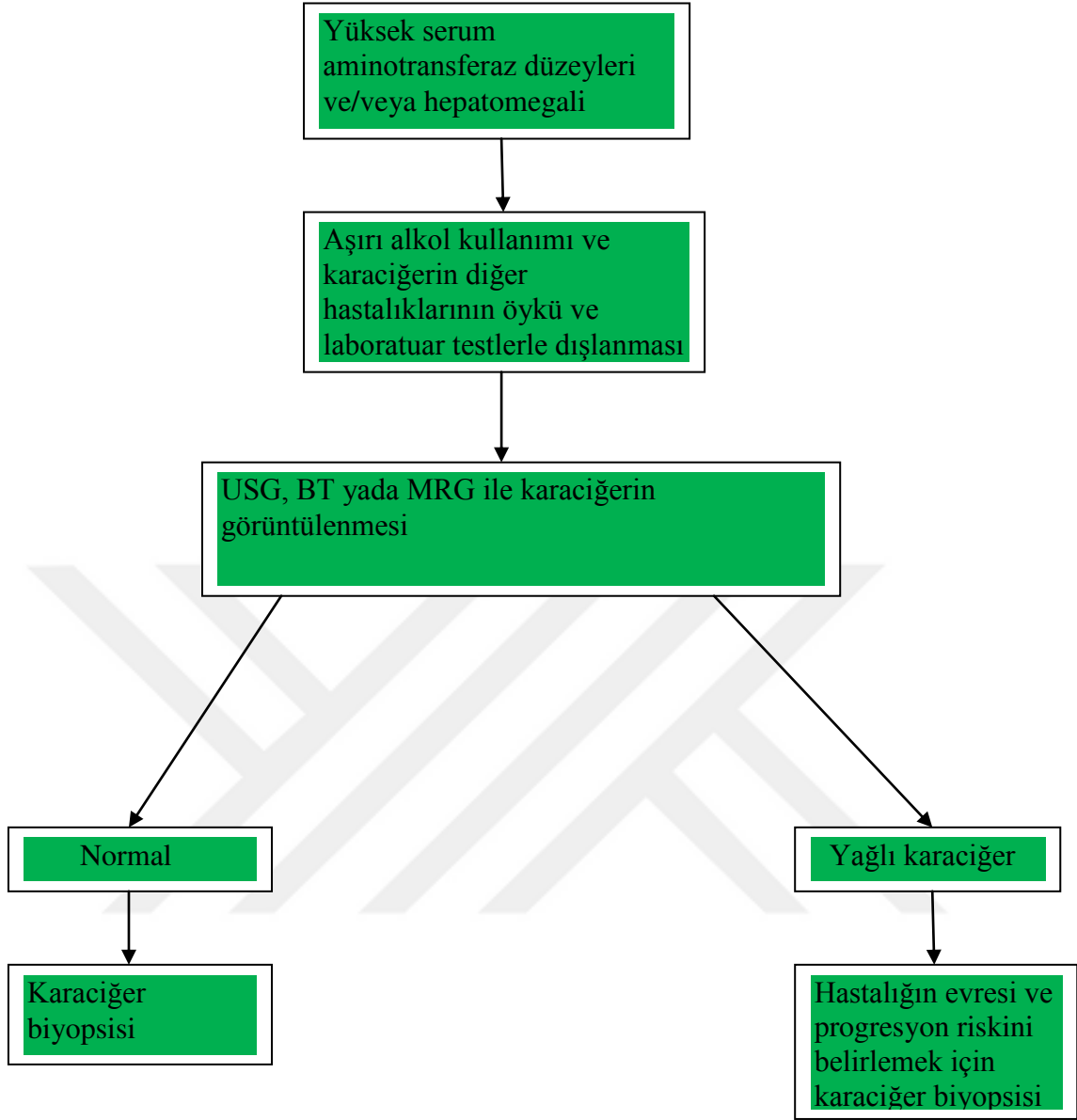
F-TANI

NAYKH kesin tanısı hem klinik hem histopatolojik verileri (Şekil 4) gerektirir. NAYKH olan hastaların çoğu hepatomegali olsun veya olmasın yüksek kronik karaciğer biyokimyasal test düzeyleri nedeniyle değerlendirilir. Hastanın öyküsü, fizik muayene, kan testi sonuçları ve radyolojik bulgularının kombinasyonu karaciğer hastalığının diğer nedenleri dışlamak için yararlıdır. Laboratuvar testleri, karaciğer biyokimyasal testleri, tam kan sayımı, protrombin zamanı, anti-HCV, hepatit B yüzey antijeni, demir endeksleri, α_1 -Antitripsin, 40 yaşından daha genç kişilerde seruloplazmin ve AMA içermelidir. Görüntüleme yöntemleri tanıyı destekler, ancak karakteristik bulguların yokluğunda NAYKH tanısı dışlanamaz. NAYKH tanısının konulması için alkolik karaciğer hastalığı ekarte edilmelidir. Klinik ve histolojik veriler ayaktan tetkik edilen

hastalarda alkolik karaciğer ile NAYKH'nı ayırt ettirmede güvenilir değillerdir. Bu nedenle, NAYKH tanısında önemli miktarda alkol kullanımının olmadığına gösterilmesi gerekmektedir, buda birçok klinik çalışmada en çok günde 20-40 g alkol tüketimi olarak ele alınmaktadır.

a-Karaciğer Biyopsisinin Rolü;

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



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

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

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease

Tablo 5. İlerlemiş non-alkolik yağlı karaciğer için risk faktörleri

Klinik	
İleri yaş (>50)	
Obezite	
Diabetes mellitus/insülin direnci	
Hipertansiyon	
Laboratuvar	
AST/ALT oranı > 1	
Serum ALT seviyesi > normalin iki katı	
Serum trigliserid seviyeleri > 155 mg/dL	
Histolojik	
şiddetli steatoz	
Nekroinflamatuvar aktivite (hepatosit balonlaşma, nekrozis)	
Boyanabilir demir	

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

Sliesinger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease

b-NAYKH'da Fibrozisin Non-invaziv Belirteçleri;

Perkütan karaciğer biyopsisi NAYKH tanısı için standart olmasına rağmen, pahalı, invaziv ve küçük de olsa komplikasyon riski vardır. Örnekleme değişkenliği yaygındır ve NAYKH olan kişilerin çok sayıda olması nedeniyle karaciğer biyopsisi yapmak gerekli insan gücünü aşmaktadır. Önemli bir ilerleme basit, non invaziv hepatik fibroz derecesini tahmin etmek için geliştirilen yöntem FibroTest yöntemidir. Bu non invaziv testlerin en iyisidir. Hepatik fibrozis tahmin etmek için kullanılan kan testleri paneli serum α_2 Makroglobulin, apolipoprotein A-1, haptoglobin, total bilirubin ve GGT düzeyleri ve nekroinflamatuvar

aktivite indeksi ve serum ALT düzeyini birleştirir. NAYKH olan 167 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, Fibrotestin köprü fibrozisi ve sirozu tespit için çok hassas olduğu görüldü (109) . Fibrotest cutoff değeri 0.70 olarak alındığında ileri fibrozis için pozitif prediktif değeri % 73 ve spesfitesi % 98 olarak tespit edildi. Fibrotest cutoff değeri 0.30 ilerlemiş fibrozis için % 90 negatif prediktif değere sahipti. Ne yazık ki, hastaların %33'ünde 0.30 ve 0.70 arasında bir fibrotest puanı vardı ve bu aralıkta test fibrozis evresi değerlendirmek için yetersizdir. Bu nedenle, bu aralıkta bir puan ile hastaların doğru evrelenmesi için karaciğer biyopsisi gerekir.

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

G-DOĞAL SEYİR

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

Olmsted, Minnesota'dan NAYKH olan 420 hastanın dahil edildiği geniş toplum tabanlı çalışmada; siroz 7.6 yıl takip sırasında hastaların %3'ünde gelişti (118). Bu kohortta

karaciğer hastalığı, kanser ve iskemik kalp hastalığı sonrası üçüncü sıradaki ölüm nedeniydi. Bu sınırlı veriler hastaların çoğunda NAYKH yavaş seyirli bir durum olduğunu göstermektedir. Ancak etkilenen kişilerin küçük bir kısmında kısa bir süre içinde, klinik olarak karaciğer hastalığı ciddi klinik tablolara ilerleyebilir. Bu sonuç, NAYKH olan 132 hastanın alındığı, 18 yıl takipli klasik bir çalışmanın verileri tarafından desteklenmektedir (119). Bu çalışmada karaciğer biyopsi örneğinin histolojik hasar derecesi ile klinik sonuçları karşılaştırıldı. Her biyopsi örneği kümülâtif steatoz oluşumu, inflamasyon, hepatosit nekrozu ve fibrozis tarafından belirlenen giderek şiddeti artan hastalığı temsil eden 1 ile 4 alt grup tiplerine ayrıldı. Tip 3-4 hastalarda (steatoz, inflamasyon ve nekroz, fibrozis olan veya olmayan) siroz ve karaciğer hastalığı ile ilişkili ölüm Tip1-2 hastalardan (nekrozsuz setatoz) daha sık (sırasıyla %25 ve %11) olmasına rağmen mortalite açısından iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu.

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

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

(48).

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

H-TEDAVİ

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

Hiçbir bilimsel veri NAYKH'lı tüm hastalar için uygun belli bir ticari veya tıbbi diyet planı ve doğru beslenme yaklaşımı için mevcut değildir (136). Ne yazık ki diyet, tıbbi yardımlar, egzersiz veya cerrahi ile sağlanan kilo kaybı ile sonlanım noktası histolojik iyileşme olan randomize, prospektif çalışma yoktur. Bu tür çalışmalarda NAYKH'lı aşırı kilolu hastalarda

orta derecede kilo kaybı sağlanır ancak kalıcı kilo kaybı nadir görülür. Hızlı kilo kaybı, özellikle obezite cerrahisi (137) sonrası, morbid obez hastalarda steatohepatit şiddetlenebilir, bu nedenle kilo kaybı ve karaciğer biyokimyasal testleri kilo verme rejimi uygulanan hastalarda dikkatle izlenmelidir. Yeni tedavi yöntemleri için NAYKH'in patogenezi anlamak gerekir (Tablo 6).

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

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

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

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease

a-Antioksidanlar

Oksidatif stresi en aza indiren ilaçlar yararlı olabilir. E vitamini, ucuz ama güçlü antioksidandır, Birkaç küçük pediatrik ve erişkin çalışmada NAYKH tedavisi için incelenmiştir, sonuçlar değişkendir (71,138,139). Tüm çalışmalarda, E vitamini iyi tolere edildi ve çoğu çalışmada serum aminotransferaz düzeylerinde, karaciğer ultrasonografik

görünüm ve seyrek olarak histolojik bulgulara iyileşmeler görüldü. NAYKH histolojik iyileşmeye sağlayıp sağlamadığını belirlemek için histolojik kriterleri sonlanım noktası olan randomize kontrollü E vitamini tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır. Kardiyovasküler hastalılarda potansiyel negatif etkileri göz önüne alınarak E vitamini NAYKH tedavisinde kullanırken dikkatli olunmalıdır (140).

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

b-İnsülin-Sensitize Ajanlar

Hiperinsülinemik insülin direncinin ve NAYKH arasındaki ilişki tedavi için mantıklı bir hedef sağlamaktadır. Metformin, hiperinsülinemiyi azaltan ve hepatik insülin duyarlılığını artıran bir biguaniddir ve ob/ob farelerde karaciğer yağlanması ve hepatomegaliyi azaltmıştır (144), ancak insan çalışmalarında daha az etkilidir (145,146). Tiazolidinedionlar (TZD), güçlü PPAR- α agonistleridir, ayrıca NAYKH tedavisi için araştırılmaktadır. PPAR- α yağ dokusu, kas ve karaciğerde eksprese olan bir nükleer reseptördür. Adipositte, PPAR- α hücre farklılaşması teşvik eder ve lipolizi ve FFA' nın serbest ekspresyonunu azaltır. TZD kas dokusunda glikoz yıkımını artırarak ve hepatik glikoz çıkışını azaltarak insülin duyarlılığı ve hiperinsülinemi iyileştirir. Troglitazon, birinci nesil TZD' dur ve NASH'li hastalarda histolojik ve biyokimyasal iyileşmeler sağladı, ancak troglitazon nadir görülen fakat ciddi hepatotoksisite yan etkisi nedeniyle piyasadan kaldırıldı. Rosiglitazon ve pioglitazon, hepatotoksisite oranları düşük olan TZD' dir. Histolojik olarak kanıtlanmış NASH olan hastalarda 48 haftalık tek kollu çalışmada incelenmiştir (147,148). Hem iyi tolere edilerek insülin duyarlılığını artırdığı, karaciğer biyokimyasında normalleşme ve çoğu hastada histolojik düzelme sağladığı tespit edilmiştir. Ancak her iki TZD'nun dezavantajı önemli ölçüde kilo alınması (%4.0-%7.3) ve artmış total vücut yağı olarak saptandı. Ayrıca, tedavinin tamamlanmasından sonra, biyokimyasal ve histolojik iyileştirmelerin devamlılığı incelenmedi. Bir takip çalışmasında ilaç kesildikten sonra pioglitazon yararlı etkileri de ortadan kalktı (149). Plasebo kontrollü bir Avrupa çalışmasında NAYKH olan 63 hastada

rosiglitazon tedavisiyle steatoz ve serum aminotransferaz seviyelerinde düzelme gösterildi ancak nekroinflamasyon veya fibroziste iyileşme görülmedi (150). Rosiglitazonla tedavi edilen hastalarda belirgin kilo artışı görüldü. TZD'un NAYKH olan hastalarda rutin kullanım için tavsiye edilebilmesi için büyük, plasebo-kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

c-Demir Redüksiyonu

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

d-Lipid düşürücü ve sitoprotektif Ajanlar

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

e-Gelecek tedaviler:

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

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

Adalimumab: TNF- α karşı tamamıyla insan IgG1 monoklonal antikordur. Romatoid artrit ve crohn hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Romatoid artrit nedeniyle kullanılan NASH'li bir hastada biyokimyasal parametrelerde kalıcı yanıt görülmüştür (9). Henüz NASH'te Adalimumab kullanımı ile ilgili bir çalışma yoktur.

Pentoksifilin: Non-selektif fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin TNF- α gen transkripsiyonunu azaltmasının yanı sıra sitokin/kemokin yolunu multipl basamaklardan etkileyerek TNF- α 'yı direkt veya indirekt olarak inhibe eder. Periferik arterlerin tıkayıcı hastalıkları ve arteriyosklerotik veya diyabetik nedenlerden meydana gelen arteriovenöz dolaşım bozuklukları (kesik topallama, istirahat ağrısı gibi), trofik bozukluklar (bacak ülseri ve gangren gibi), serebral dolaşım bozuklukları ve göze ait, dejeneratif vasküler süreç ile seyreden dolaşım bozukluklarında kullanılmaktadır. Yapılan rat modelleri ve insan çalışmalarında pentoksifilinin transaminaz ve karaciğer histopatolojisini iyileştirdiği gösterilmiştir (10).

f-Karaciğer Nakli

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

6-MATERYAL VE METOD

Hayvanlar:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanan 35 adet 242-351 (ortalama 298,7) gr. ağırlığında erkek Wistar Albino rat internasyonal hayvan deney ve bakım kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 saat gündüz/gece siklusu) kafeslere alındı (resim 1).

Diyet:

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



Resim 1. Ratlar gruplara halinde kafeslere alındı

Tablo 7: Normal diyet kimyasal içeriği

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

Tablo 8: Metionin ve kolin defisit diyet kimyasal içeriği

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

Çalışmanın tasarımı:

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

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

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

Grup 3 (n=7, MCD+infliximab): Bu gruptaki ratlara 4 mg/kg infliximab (İnfliximab dozu ratlar için ayarlandı.) intraperitoneal 0, 2. haftalarda verilerek 6 hafta boyunca MCD diyet ve su aldılar. İntraperitoneal uygulama resim 2'de gösterildi.

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

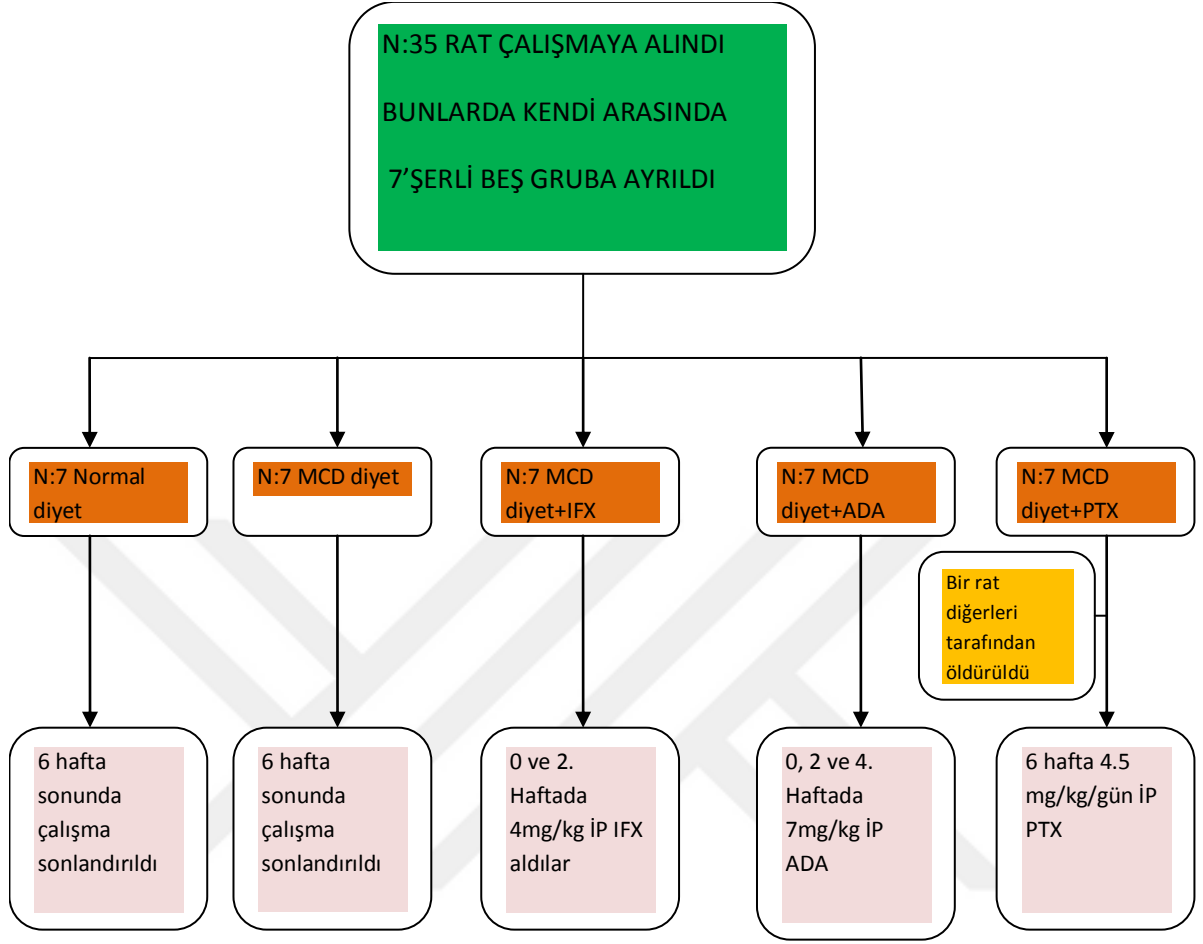
Grup 5 (n=7, MCD+pentoksifilin): Bu gruptaki ratlara 4,5 mg/kg/gün pentoksifilin verildi ve 6 hafta MCD diyet ve su aldılar. Bu gruptaki ratlardan bir tanesi diğer ratlar tarafından çalışmanın 4. haftasında darp edilerek öldüğü için 6 rat ile çalışma tamamlandı. Çalışma boyunca ratlar yakından gözlemlendi. Ratların ağırlıkları haftalık takip edildi.



Resim 2. Ratlara intraperitoneal ilaç uygulaması

Deneyin sonlandırılması ve örneklerin toplanması

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



Şekil 5: Gruplar ve özellikleri

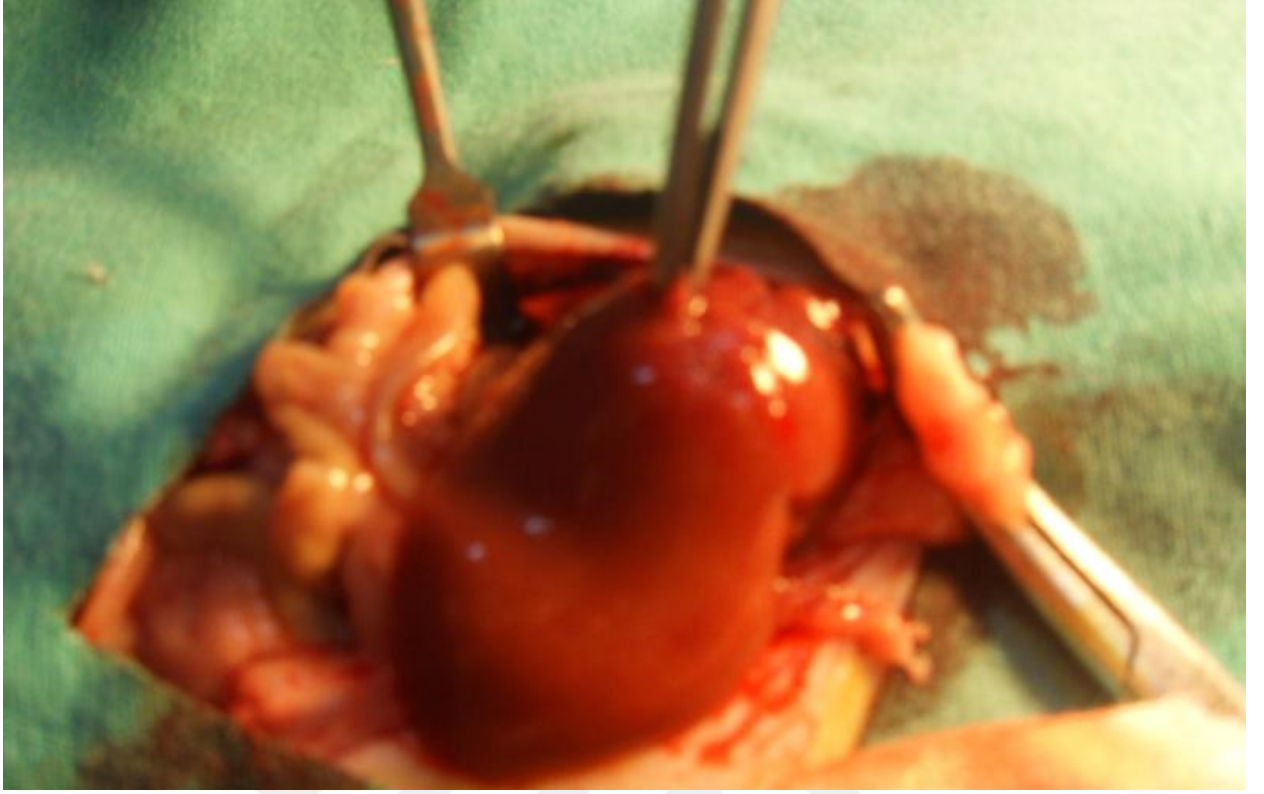
MCD: Metionin ve kolin defisit, **İFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin, **İP:** İntraperitoneal



Resim 3. Ratların eter anestezisi sonrası örneklerin alımı için hazırlanması



Resim 4. V. Kava'dan kan örneği alınması



Resim 5. Karaciğerin çıkarılması



Resim 6: Normal diyet alan rat karaciğerinin makroskopik görünümü



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

Sitokin seviyeri

TNF- α , TGF β , IL-6 (eBioscience Int, San Diego, CA, USA) ve IL-8 (Cusabio Int, Wuhan, Hubei, P.R.C) seviyeleri ELİSA yöntemi kullanılarak yapıldı.

Biyokimyasal analizler

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

Histopatolojik inceleme

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

Yağlanma, balon dejenerasyon, lobüler inflamasyon, fibrozis varlığı veya yokluğu tespit edilerek

Brunt NASH skorlaması yapıldı.

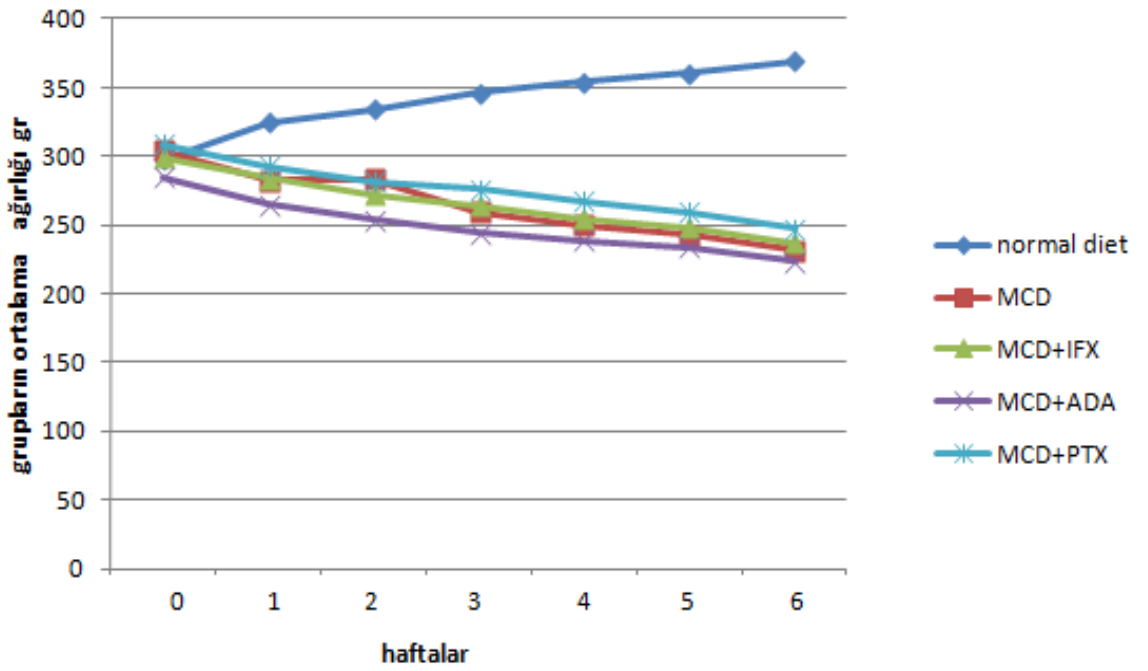
İstatistik

SPSS 15.0 bilgisayar programı (SPSS Inc., Sostware Chicago, IL, USA) istatistiksel analiz için kullanıldı. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis test ve Mann-Whitney U test ile belirlenerek. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



7-SONUÇLAR

Ratlar 5 grup halinde ilk günden itibaren her hafta tartıldı. Normal diyet rat yemi verilen grupta belirgin kilo artışı meydana geldi. MCD diyet alan dört grupta ise kilo kaybı mevcuttu. Kilo kaybı ilk üç haftada daha belirgindi. Son üç haftada kilo kaybı azaldı. Grupların ağırlık ortalamaları haftalara göre şekil 6’da verildi. Çalışma süresince ratlarda herhangi bir yan etki görülmedi. MCD diyet ve pentoksifilin alan grupta bir rat diğerlerince öldürüldüğü için bu grupta çalışma 6 rat ile tamamlandı.



Şekil 6: Grupların haftalık ağırlık ortalamaları

MCD: Metionin ve kolin defisit, İFX: İnfliximab, ADA: Adalimumab, PTX: Pentoksifilin

İmmünolojik parametreler:

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

Tablo 9. Sitokin seviyeleri

İmmünolojik Parametreler	Tüm Ratlar (n=34)	Normal Diyet (n=7)	MCD (n=7)	MCD+IFX (n=7)	MCD+ADA (n=7)	MCD+PTX (n=6)	p*
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
TNF alfa (pg/ml)	21,65(12,35)	21,57(5,89)	32,37(13,85)	22,86(16,15)	11,49(8,10)	19,67(5,65)	0,005
TGF beta (pg/ml)	47,58(17,08)	54,56(11,92)	69,48(11,47)	47,53(10,36)	34,99(6,77)	28,67(4,90)	<0,001
IL6 (pg/ml)	173,67(64,92)	202,45(28,72)	181,39(8,44)	133,83(34,54)	96,51(41,13)	267,58(29,95)	<0,001
IL8 (pg/ml)	2,05(1,18)	1,65(0,93)	2,81(1,87)	1,28(0,35)	2,10(0,98)	2,49(0,71)	0,014

*Kruskal-Wallis Testi

MCD: Metionin kolin defisit**IFX:** İnfliximab**ADA:** Adalimumab**PTX:** Pentoksifilin**Tablo 10.** Sitokin seviyelerinin gruplar arası istatistiksel verileri

Gruplar	TNF alfa		TGF beta		IL6		IL8	
	Z	p*	Z	p*	Z	p*	Z	p*
Normal Diyet vs MCD	-2,236	,025	-1,981	,048	-,958	,338	-1,853	,064
MCD vs MCD+IFX	-1,981	,048	-2,747	,006	-2,492	,013	-2,619	,009
MCD vs MCD+ADA	-2,619	,009	-3,130	,002	-3,130	,002	-,958	,338
MCD vs MCD+PTX	-2,286	,022	-3,000	,003	-3,000	,003	-,143	,886
MCD+IFX vs MCD+ADA	-2,236	,025	-2,108	,035	-1,469	,142	-2,047	,041
MCD+IFX vs MCD+PTX	-,286	,775	-3,000	,003	-3,000	,003	-2,857	,004
MCD+ADA vs MCD+PTX	-2,286	,022	-1,714	,086	-3,000	,003	-1,216	,224

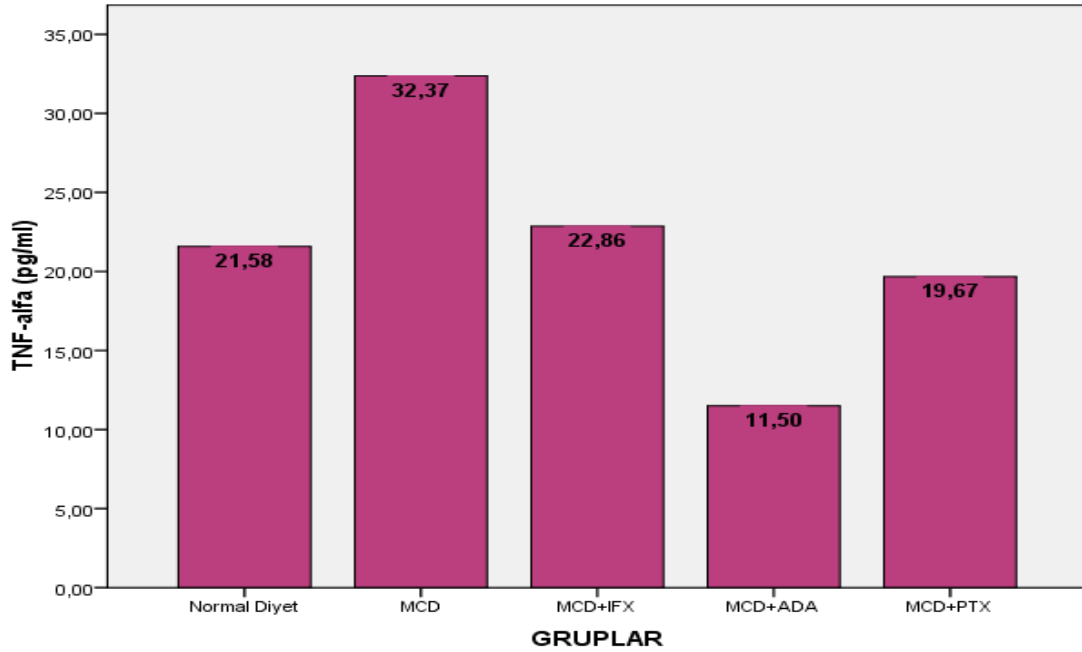
* Mann-Whitney U Testi

MCD: Metionin kolin defisit**IFX:** İnfliximab**ADA:** Adalimumab**PTX:** Pentoksifilin**TNF-α seviyeleri:**

TNF-α seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 21.57 ± 5.89 pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 32.37 ± 13.85 pg/ml, MCD+infliximab verilen grupta 22.86 ± 16.15 pg/ml, MCD+adalimumab alan grupta 11.49 ± 8.10 pg/ml ve MCD+pentoksifilin alan grupta 29.67 ± 5.65 pg/ml olarak tespit edildi. TNF-α en yüksek grup 2’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 4’de olduğu görüldü .

Normal diyet alan birinci grup ile MCD alan ikinci grup arasında serum TNF-α seviyeleri, ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0.025$). Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta TNF-α seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi. Grup 2 ile 3 arasında

serum TNF- α seviyelerine bakıldığında grup 3’de infliximab tedavisine bağlı olarak TNF- α ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.048$). Grup 2 ile 4 arasında serum TNF- α seviyelerinde ise grup 4’de adalimumab tedavisine bağlı olarak TNF- α ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.009$). Grup 2 ile 5 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında grup 5’de pentoksifilin tedavisine bağlı olarak TNF- α ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.022$). Grup 3 ile 4 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında adalimumab tedavisi alan grup 4’de TNF- α ’nın infliximab tedavisi alan grup 3’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.025$). Grup 3 ile 5 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında pentoksifilin tedavisi alan grup 5’de TNF- α ’nın infliximab tedavisi alan grup 3’e göre daha fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.775$). Grup 4 ile 5 arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında adalimumab tedavisi alan grup 4’de TNF- α ’nın pentoksifilin tedavisi alan grup 5’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.022$).



Şekil 7: TNF- α seviyeleri

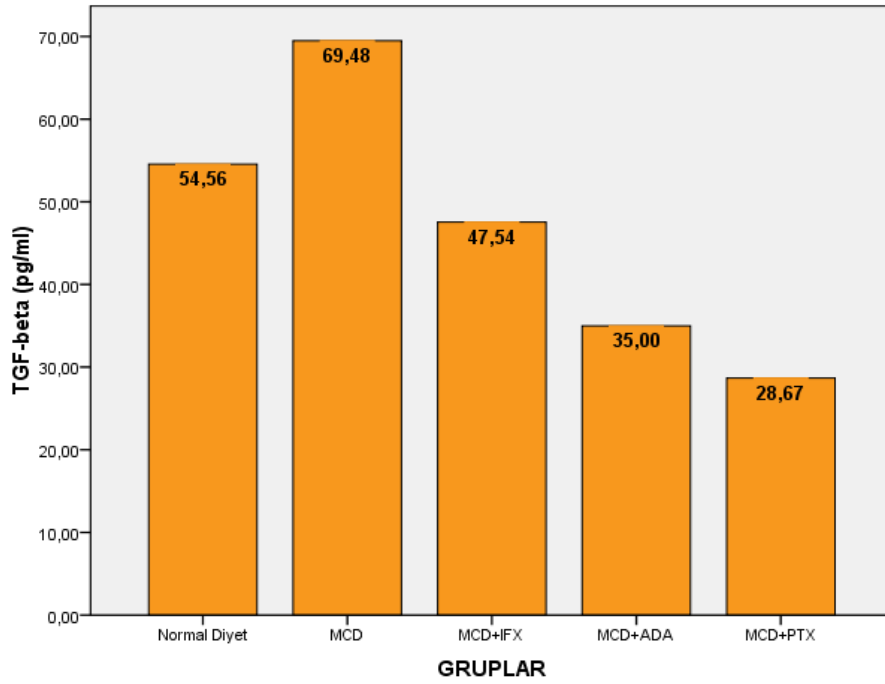
MCD: Metionin kolin defisit, **IFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

TGF β seviyeleri:

TGF β seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 54.56 ± 11.92 pg/ml, sadece MCD diyet alan grupta 69.48 ± 11.47 pg/ml, MCD+infliximab verilen grupta 47.53 ± 1.360 pg/ml,

MCD+adalimumab alan grupta 34.99 ± 6.77 pg/ml ve MCD+ pentoksifilin alan grupta 28.67 ± 4.9 pg/ml olarak tespit edildi. TGF β en yüksek grup 2’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 5’de olduğu görüldü.

Normal diyet alan birinci grup ile her hangi bir tedavi almayan sadece MCD alan ikinci grup arasında serum TGF β seviyeleri arasında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0.048$). Bu NASH modeli oluşturduğumuz grupta TGF β seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi. Grup 2 ile 3 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında grup 3’de infliximaba bağlı TGF β ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.006$). Grup 2 ile 4 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında grup 4’de adalimumaba bağlı TGF β ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.002$). Grup 2 ile 5 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında grup 5’de pentoksifilin bağlı TGF β ’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.003$). Grup 3 ile 4 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında adalimumab alan grup 4’de TGF β ’nın infliximab alan grup 3’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.035$). Grup 3 ile 5 arasında serum TGF β seviyelerine bakıldığında pentoksifilin alan grup 5’de TGF β ’nın infliximab alan grup 3’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.003$). Grup 4 ile 5 arasında TGF β seviyelerine bakıldığında adalimumab alan grup 4’de TGF β ’nın pentoksifilin alan grup 5’e göre daha fazla baskılandığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.086$).



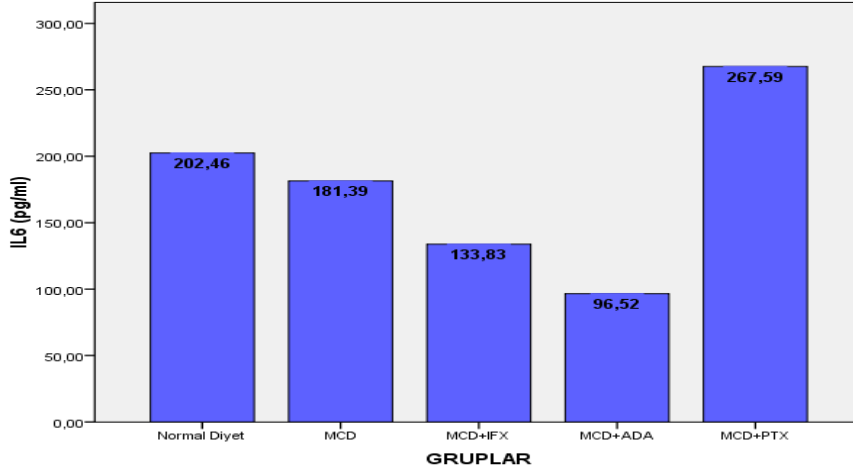
Şekil 8: TGF β seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **IFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

IL6 seviyeleri:

Serum IL6 seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta (grup 1) 202.45 ± 28.72 pg/ml, sadece MCD diyet alan grup 2’de 181.39 ± 8.44 pg/ml, MCD ile birlikte infliximab verilen grup 3’de 133.83 ± 34.54 pg/ml, MCD ile birlikte adalimumab alan grup 4’de 96.51 ± 41 pg/ml ve MCD ile birlikte pentoksifilin alan grup 5’de 267.58 ± 29.95 pg/ml olarak tespit edildi. IL 6 en yüksek grup 5’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 4’de olduğu görüldü. Normal diyet alan birinci grup ile MCD alan ikinci grup arasında serum IL 6 seviyeleri normal diyet alan grupta daha yüksekti, ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0.338$). Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta IL 6’nın beklenin aksine yükselmediğini göstermekteydi. Grup 2 ile 3 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında grup 3’de infliximaba bağlı IL 6’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.013$). Grup 2 ile 4 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında grup 4’de adalimumaba bağlı IL 6’nın istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.002$). Grup 2 ile 5 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında grup 5’de pentoksifiline rağmen IL 6’nın grup 2’de istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi ($p=0.003$). Grup 3 ile 4 arasında serum IL 6 seviyelerine bakıldığında adalimumab alan grupta IL 6’nın infliximab alan gruba göre daha fazla baskılandığı, ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı görüldü ($p=0.142$). Grup 3 ile 5 arasında IL 6 seviyelerine bakıldığında IL 6’nın infliximab alan grupta pentoksifilin alan gruba göre

istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.003$). Grup 4 ile 5 arasında IL 6 seviyelerine bakıldığında adalimumab tedavisi alan grup 4’de IL 6’nın pentoksifilin alan grup 5’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı görüldü ($p=0.003$).



Şekil 9: IL 6 seviyeleri

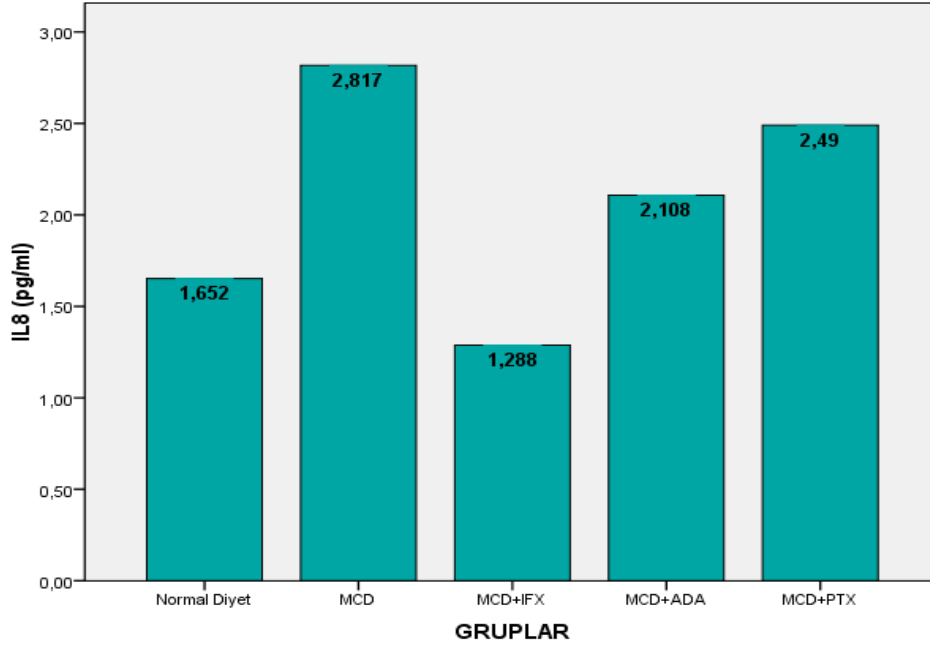
MCD: Metionin kolin defisit, **İFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

IL8 seviyeleri:

IL8 seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta $1,65\pm0.93$ pg/ml, MCD alan grupta $2,81\pm1.87$ pg/ml, MCD+infliximab verilen grupta $1,28\pm0.35$ pg/ml, MCD+adalimumab alan grupta 10 ± 0.98 pg/ml ve MCD+pentoksifilin alan grupta $2,49\pm0.71$ pg/ml olarak tespit edildi. IL8 en yüksek grup 2’de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 3’de olduğu görüldü. Normal diyet alan birinci grup ile MCD alan ikinci grup arasında IL8 seviyelerinin ikinci grupta daha yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0.064$).

Grup 2 ile 3 arasında IL8 seviyelerine bakıldığında grup 3’de infliximaba bağlı IL8’in istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi ($p=0.009$). Grup 2 ile 4 arasında IL8 seviyelerine bakıldığında grup 4’de adalimumaba bağlı baskılandığı tespit edildi, ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu ($p=0.338$). Grup 2 ile 5 arasında ise 5. Grupta IL8’in baskılandığı tespit edildi, ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu ($p=0.886$). Grup 3 ile 4 arasında; grup 3’de IL8 seviyelerinin adalimumab alan grup 4’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı tespit edildi ($p=0.041$). Grup 3 ile 5 arasında IL8 seviyelerine bakıldığında infliximab alan grup 3’de IL8’in pentoksifilin alan grup 5’e göre daha istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandığı görüldü ($p=0.004$). Grup 4 ile 5 arasında serum IL8 seviyelerine

bakıldığında adalimumab alan grup 4’de IL8’in pentoksifilin alan grup 5’e göre daha fazla baskılandığı ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı tespit edildi (p=0.224).



Şekil 10: IL 8 seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **İFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

Biyokimyasal parametreler:

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

Tablo 11. Biyokimyasal parametreler

Biyokimyasal Parametreler	Tüm Ratlar (n=34)	Normal Diyet (n=7)	MCD (n=7)	MCD+IFX (n=7)	MCD+ADA (n=7)	MCD+PTX (n=6)	p*
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama(SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
AST (U/L)	194,05(53,80)	205,57(11,73)	228,57(67,37)	210,71(65,68)	166,85(35,03)	152,66(38,90)	0,043
ALT (U/L)	141,35(76,86)	45,00(7,28)	177,71(77,25)	168,14(71,66)	146,42(53,86)	174,16(70,28)	0,002
ALP (U/L)	190,50(59,85)	164,14(49,34)	214,71(72,46)	210,71(54,15)	190,42(71,43)	169,50(43,44)	0,473
Bilirubin (mg/dl)	0,19(0,07)	0,11(0,01)	0,19(0,06)	0,23(0,06)	0,20(0,10)	0,23(0,06)	0,008
Tprotein (gr/dl)	6,47(1,19)	7,10(0,54)	6,15(0,35)	6,58(0,81)	6,54(2,39)	5,88(0,21)	0,002
albümin (gr/dl)	3,08(0,37)	3,25(0,05)	3,14(0,28)	3,02(0,35)	3,02(0,66)	2,96(0,23)	0,073

* Kruskal-Wallis Testi

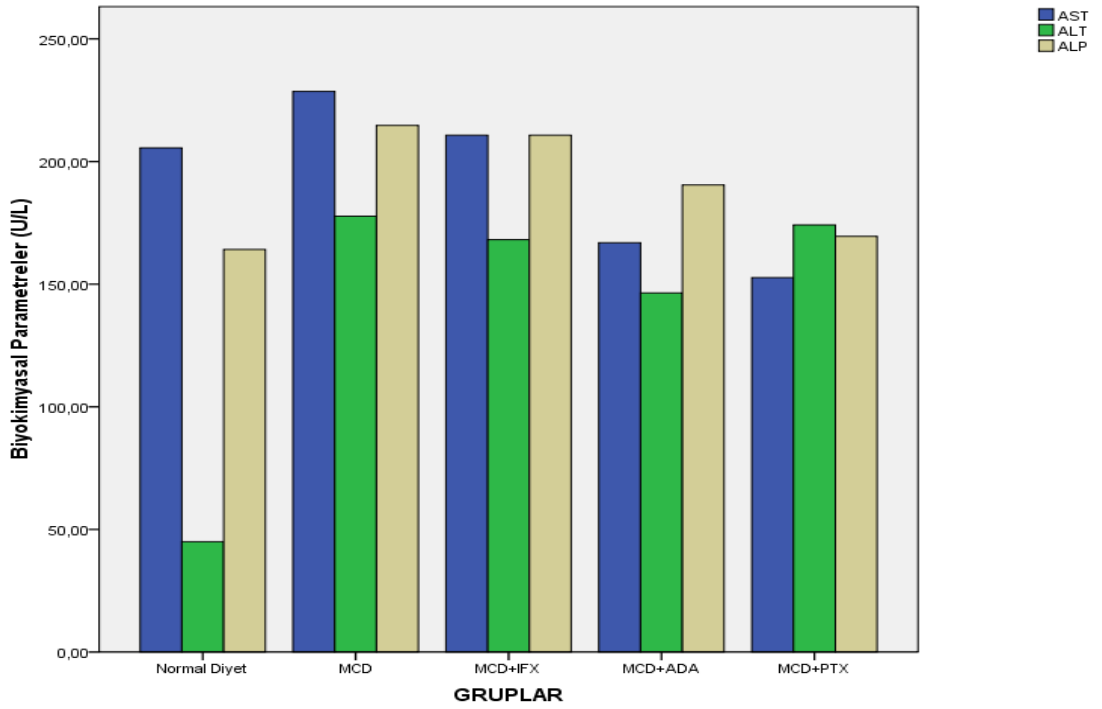
MCD: Metionin kolin defisit**IFX:** İnfliximab**ADA:** Adalimumab**PTX:** Pentoksifilin**Tablo 12.** Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası istatistikleri

Gruplar	AST		ALT		Bilirubin		Tprotein	
	Z	p*	Z	p*	Z	p*	Z	p*
Normal Diyet vs MCD	-,448	,654	-3,130	,002	-2,975	,003	-2,823	,005
MCD vs MCD+IFX	-,448	,654	-,064	,949	-1,351	,177	-,904	,366
MCD vs MCD+ADA	-1,597	,110	-,703	,482	-,192	,848	-1,412	,158
MCD vs MCD+PTX	-1,857	,063	-,143	,886	-1,079	,281	-1,440	,150
MCD+IFX vs MCD+ADA	-1,471	,141	-,447	,655	-,575	,565	-2,058	,040
MCD+IFX vs MCD+PTX	-1,860	,063	-,143	,886	-,072	,943	-2,665	,008
MCD+ADA vs MCD+PTX	-,571	,568	-1,001	,317	-,716	,474	-,432	,666

* Mann-Whitney U Testi

MCD: Metionin kolin defisit**IFX:** İnfliximab**ADA:** Adalimumab**PTX:** Pentoksifilin

Serum AST seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta (grup 1) 205.57 ± 11.73 U/L, sadece MCD diyet alan grup 2'de 228.57 ± 67.37 U/L, MCD ile birlikte infliximab verilen grup 3'de 210.71 ± 65.68 U/L, MCD ile birlikte adalimumab alan grup 4'de 166.85 ± 35.03 U/L ve MCD ile birlikte pentoksifilin alan grup 5'de 152.66 ± 39 U/L olarak tespit edildi. AST en yüksek grup 2'de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 5'de olduğu görüldü. Gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.



Şekil 11. AST, ALT ve ALP seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **İFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

ALT:

Serum ALT seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 45 ± 7.28 U/L, MCD diyet alan grupta 177.71 ± 77.25 U/L, MCD+infliximab verilen grup 3'de 168.14 ± 71.43 U/L, MCD+adalimumab alan grup 4'de 146.42 ± 53.86 U/L ve MCD+pentoksifilin alan grup 5'de 174.16 ± 70.28 U/L olarak tespit edildi. ALT en yüksek grup 2'de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 4'de olduğu görüldü. Normal diyet alan birinci grup ile MCD alan ikinci grup arasında serum ALT seviyeleri arasında ikinci grup lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0.002$). Diğer gruplara arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı.

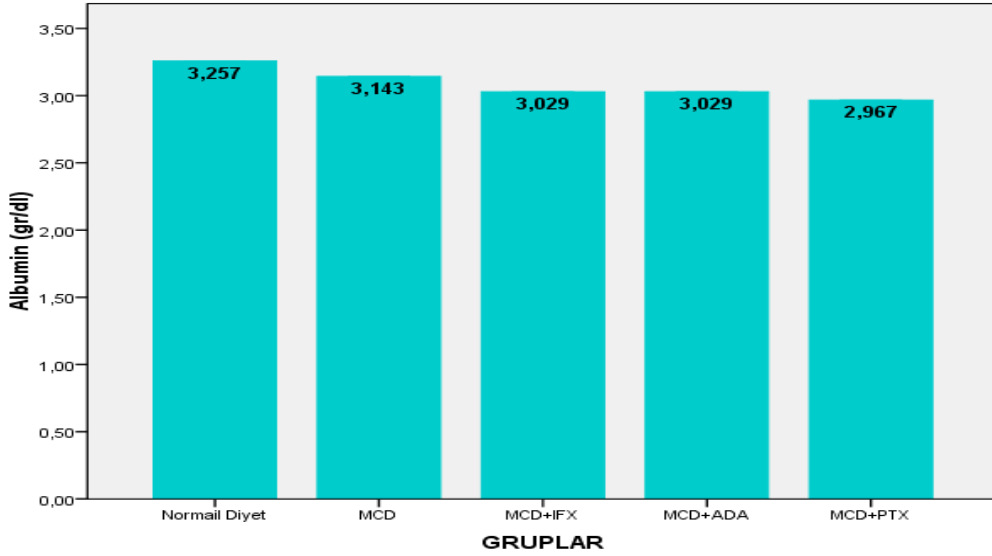
ALP:

Serum ALP seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 164.14 ± 49.34 U/L, sadece MCD diyet alan grupta 214.71 ± 72.46 U/L, MCD+infliximab verilen grupta 210.71 ± 54.15 U/L, MCD+adalimumab alan grupta 190.42 ± 71.43 U/L ve MCD+pentoksifilin alan grup 5'de 169.50 ± 43.44 U/L olarak tespit edildi. ALP en yüksek grup 2'de tespit edildi. En düşük seviyesinin ise grup 5'de olduğu görüldü. Ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu ($p: 0,473$).

Albümin:

Serum albümin seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 3.25 ± 0.05 g/dl, sadece MCD

diyet alan grupta 3.148 ± 0.28 g/dl, MCD+infiximab verilen grupta 3.02 ± 0.35 g/dl, MCD+adalimumab alan grupta 3.02 ± 0.66 g/dl ve MCD+pentoksifilin alan grup 5’de 2.96 ± 0.23 g/dl olarak tespit edildi. Gruplar arasında albümin değerleri benzerdi.

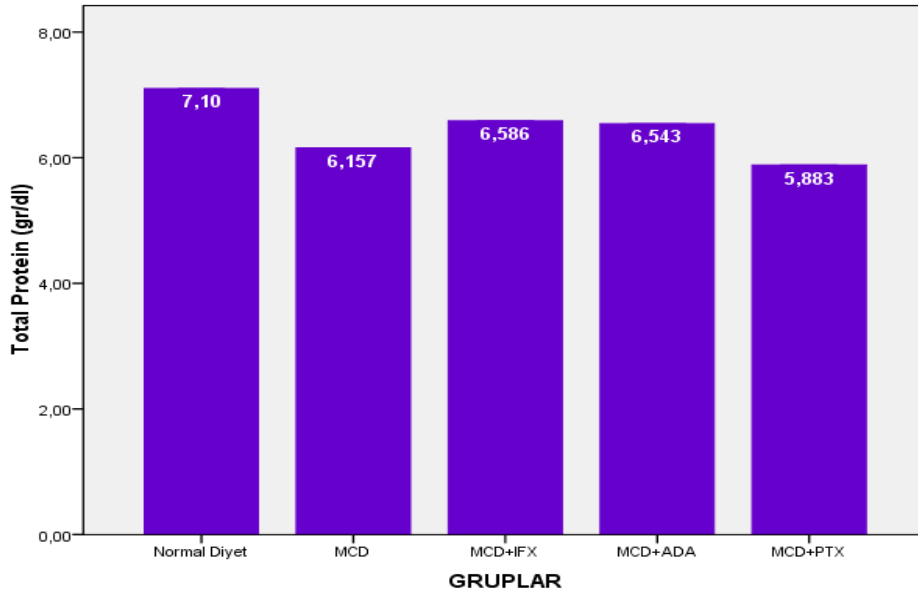


Şekil 12: albümin seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, IFX: İnfiximab, ADA: Adalimumab, PTX: Pentoksifilin

Total protein

Serum total protein seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 7.1 ± 0.54 g/dl, sadece MCD diyet alan grupta 6.15 ± 0.35 g/dl, MCD+infiximab verilen grupta 6.58 ± 0.85 g/dl, MCD+adalimumab alan grupta 6.54 ± 2.39 g/dl ve MCD+pentoksifilin alan grupta 5.88 ± 0.21 g/dl olarak tespit edildi. Normal diyet alan grupta total protein seviyesi, MCD diyet alan gruptan yüksek (p:0.005). İnfiximab alan grup ile adalimumab alan grup arasında total protein düzeyinde infiximab grubu lehine istatistiksel anlamlı yükseklik mevcuttu (p:0.040). Yine aynı şekilde pentoksifilin grubuna göre infiximab alan grupta total protein düzeyleri yüksek (p:0.008) (şekil 13).



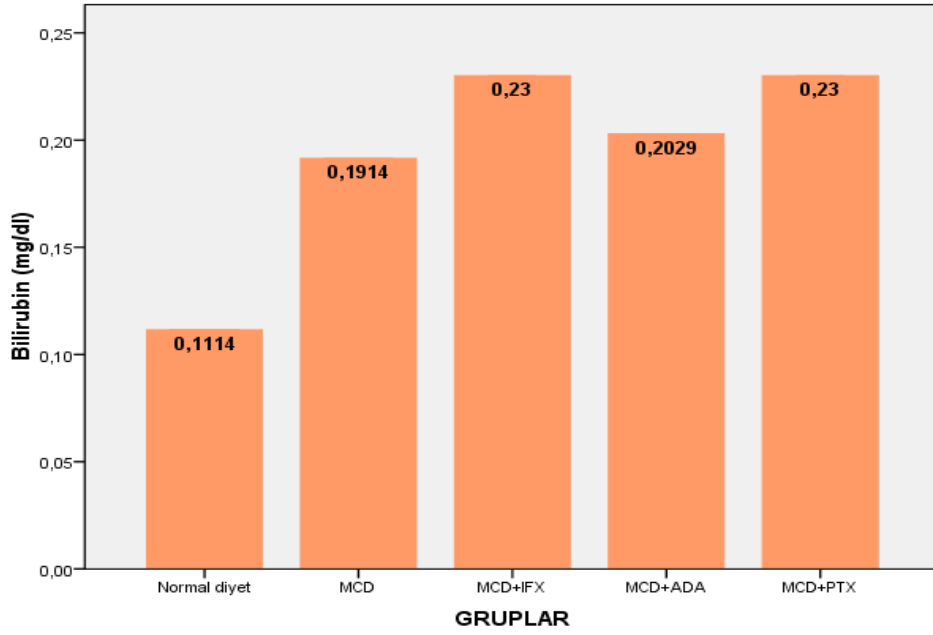
Şekil 13: Total protein seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **IFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

Total bilirubin:

Serum total bilirubin seviyelerine bakıldığında normal diyet alan grupta 0.11 ± 0.01 mg/dl, MCD diyet alan grupta 0.19 ± 0.06 mg/dl, MCD+infliximab verilen grupta 0.23 ± 0.06 mg/dl, MCD+adalimumab alan grupta 0.20 ± 0.10 mg/dl ve MCD+pentoksifilin alan grupta 0.23 ± 0.06 mg/dl olarak tespit edildi (şekil 14).

Normal diyet alan grup ile MCD alan grup arasında serum total bilirubin seviyeleri bakıldığında 2. grupta istatistiksel olarak anlamlı yükseklik mevcuttu ($p=0.003$). Bu bize NASH modeli oluşturduğumuz grupta total bilirubin seviyelerinin yükseldiğini göstermekteydi. Diğer gruplara arasında istatistiksel farklılık saptanmadı.



Şekil 14: Total bilirubin seviyeleri

MCD: Metionin kolin defisit, **İFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin

Histopatoloji:

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

Tablo 13. Histopatolojik skorlar

Histopatolojik Skorlar	Tüm Ratlar (n=34)	Normal Diyet (n=7)	MCD (n=7)	MCD+IFX (n=7)	MCD+ADA (n=7)	MCD+PTX (n=6)	p**
	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	Ortalama (SS)	
Steatoz	2,38(1,23)	0(0)	3,00(0)	3,00(0)	3,00(0)	3,00(0)	1,000
Lobüler İnflamasyon	1,50(0,99)	0(0)	2,14(0,89)	2,00(0,81)	1,71(0,48)	1,66(0,51)	0,605
Hepatosit Balonlaşması	0,73(0,61)	0(0)	1,42(0,53)	0,85(0,37)	0,57(0,53)	0,83(0,40)	0,032
Fibrozis	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1,000
Toplam NAS Skoru	4,52(2,47)	0(0)	6,14(1,06)	5,85(1,06)	5,28(0,75)	5,50(0,54)	0,357

* Kruskal-Wallis Testi

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

MCD: Metionin kolin defisit

IFX: İnfliximab

ADA: Adalimumab

PTX: Pentoksifilin

Tablo 14. Gruplar arası hepatosit balonlaşması istatistiksel verileri

Gruplar	Hepatosit Balonlaşması	
	Z	p*
MCD vs MCD+IFX	-2,015	,044
MCD vs MCD+ADA	-2,360	,018
MCD vs MCD+PTX	-1,935	,053
MCD+IFX vs MCD+ADA	-1,140	,254
MCD+IFX vs MCD+PTX	-,114	,909
MCD+ADA vs MCD+PTX	-,980	,327

* Mann-Whitney U Testi

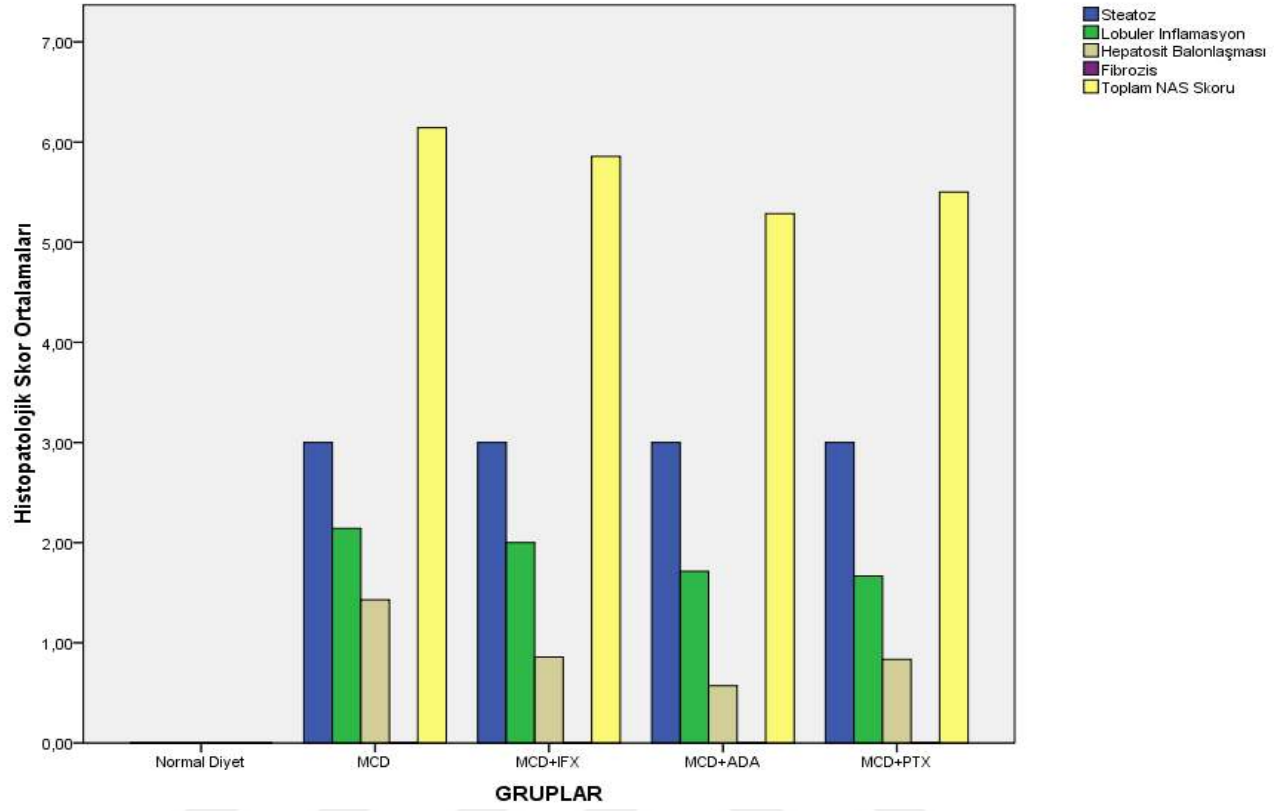
MCD: Metionin kolin defisit

IFX: İnfliximab

ADA: Adalimumab

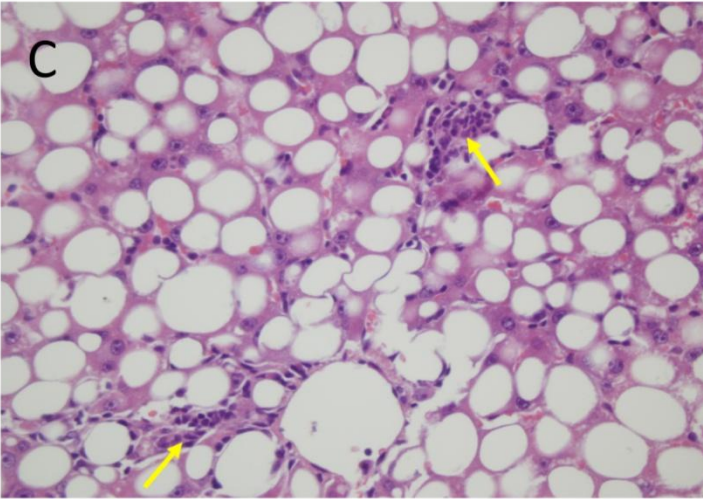
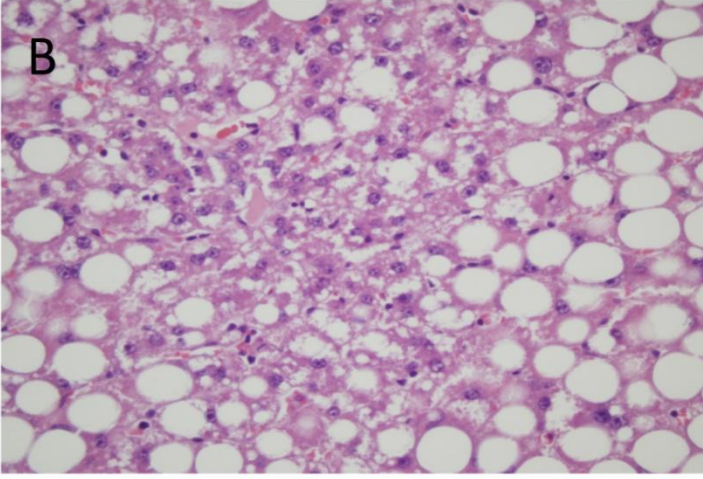
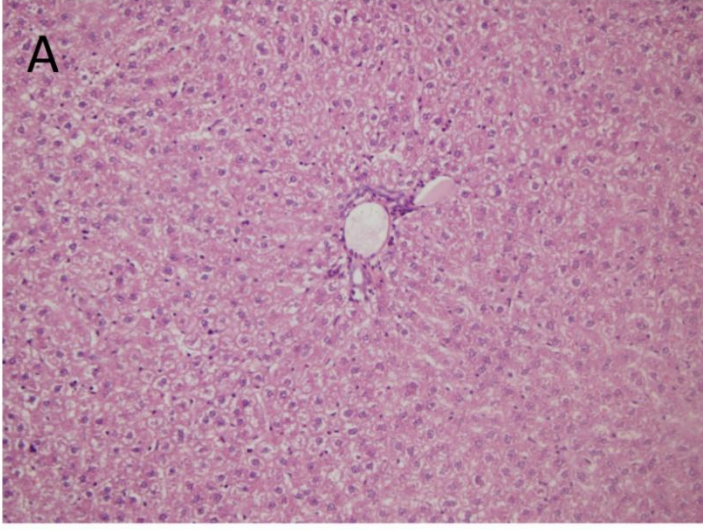
PTX: Pentoksifilin

Gruplar arası toplam NASH skoruna bakıldığında en yüksek toplam skor $6,14 \pm 1,06$ ile sadece MCD alan grupta görüldü. En düşük skor ise $5,28 \pm 0,75$ ile MCD+ADA alan grupta olduğu tespit edildi. Ancak istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farklılık yoktu. Sadece istatistiksel anlamlı farklılık hepatosit balonlaşmasında saptandı. MCD ve MCD+infliximab alan grup arasında hepatosit balonlaşma skorları yönünden istatistiksel anlamlı farklılık bulundu ($p:0.044$). Yine MCD ve MCD+adalimumab alan grup arasında hepatosit balonlaşma skorları yönünden istatistiksel anlamlı farklılık bulundu ($p: 0.018$). Tedavi alan diğer bir kol olan pentoksifilin+MCD ile MCD alan grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Ancak istatistiksel anlamlılığa yakın değer mevcuttu ($p:0.053$). Histopatolojik bulgular resim 8’de gösterildi.



Şekil 15. NASH skorları

MCD: Metionin kolin defisit, **IFX:** İnfliximab, **ADA:** Adalimumab, **PTX:** Pentoksifilin



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

MCD: Metionin kolin defisit

8-TARTIŞMA

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

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

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

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

IL 6 seviyesi ise MCD diyet alan NASH modeli oluşturduğumuz grupta yükselmedi. IL 8 seviyeleri ise MCD diyet alan grupta bir miktar yükseldi ancak iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu.

Biyokimyasal parametrelere baktığımızda normal diyet alan gruba göre MCD diyet alan grupta AST, ALT ve ALP düzeylerinde yükseklikler saptandı. Ancak ALT düzeyinde yalnız MCD diyet alan ratlarda istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı. Yine MCD grubunda total bilirubin seviyesi de istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti.

Histopatolojik incelemede normal diyet alan grupta total NASH skoru sıfır olarak bulundu. MCD grubunda histopatolojik olarak NASH oluşumu gösterildi. NASH grubunda fibrozis oluşumu görülmedi. NASH modeli için kullandığımız MCD diyetin daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi NASH oluşumunda patogeneze sorumlu tutulan proinflamatuvar sitokinleri artırdığı (IL6 dışında) ve NASH oluşumunu başarıyla sağladığını göstermiş olduk.

Barbuio ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yüksek yağlı diyet vererek oluşturdukları rat NASH modellerinde infliximabın yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda proinflamatuvar markerlerin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, insülin sinyal iletimi düzelterek, fibrozis ve yağ birikimini gerilettiği görülmüştür (21).

Koca ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da MCD diyetle indüklenmiş NASH’de infliximab’ın plaseboya göre AST, ALT, TNF- α , TGF β 1 düzeylerini azalttığı ve ayrıca steatoz, inflamasyon ve fibrozisi gerilettiği saptanmıştır (22).

Bizim çalışmamızda MCD diyet alan grup ile MCD+infliximab alan grup arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında infliximab alan grupta TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi. İnfliximab alan kolda TNF- α seviyesi normal diyet alan NASH olmayan grupla benzer olarak tespit edildi. Bu bize TNF- α ’yı baskılamada infliximabın etkili olduğunu göstermekteydi.

İnfliximab kolunda yine IL6, IL8 ve TGF β seviyelerinde de istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanma tespit edildi.

İnfliximab alan grupta steatozda herhangi bir değişiklik olmadı, her iki grupta da steatoz skoru 3 olarak saptandı. Lobüler inflamasyon skoru MCD ve MCD ile birlikte infliximab alan grupta benzer bulundu. Hepatosit balonlaşması ise infliximab kolunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı. Total NASH skorları ise MCD grubunda ve MCD+İFX grubunda arasında bakıldığında, infliximab kolunda total NASH skoru bir miktar azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

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

Bizim çalışmamızdaki infliximab ile Barbuio ve Koca'nın yaptığı çalışmaların aksine biyokimyasal ve histopatolojik istatistiksel anlamlı farklılığı olan iyileşme saptanmadı. Sadece Koca ve arkadaşların yaptığı çalışmada hepatosit balonlaşmasında gerileme olmamış ancak bizim çalışmamızda hepatosit balonlaşmada istatistiksel anlamlı iyileşme saptanmıştır (21,22).

Tablo 15: Ratlarda NASH modelleri ve Anti TNF'lerin etkileri

	Model (süre)	İlaç	TNF alfa	AST	ALT	Steatoz	Balon dejenarasyon	Lobüler inflamasyon	Fibrozis
Yalnız ve ark.	YYD (4hafta)	PTX (4.5mg/kg)	Baskılanmış	Normalleşme (p<0.01)	Normalleşme (p<0.05)	Gerilemiş (p<0.01)	Gerileme (p<0.01)	Gerileme (p<0.01)	Yok
Barbuio ve ark.	YYD (5hafta)	İFX (400µg)	Baskılanmış	Bakılmamış	Bakılmamış	Gerilemiş (p<0.05)	Bakılmamış	Bakılmamış	Gerileme (p<0.05)
Koca ve ark.	MCD (8hafta)	İFX (4mg/kg)	Baskılanmış	Normalleşme (p<0.05)	Normalleşme (p<0.05)	Gerilemiş (p<0.05)	Değişiklik yok	Gerileme (p<0.05)	Gerileme (p<0.05)

YYD: Yüksek yağlı diyet, **MCD:** Metionin ve kolin defisit diyet, **PTX:** Pentoksiflin, **İFX:** Infliximab, **NASH:** Non-alkolik steatohepatit, **AST:** Aspartat aminotransferaz, **ALT:** Alanin aminotransferaz

Adalimumab ile NASH modellerde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak Schramm ve arkadaşlarının vaka bildiriminde romatoid artrit nedeniyle adalimumab kullanılan NASH'li bir hastada AST, ALT ve GGT düzeylerinin normal seviyelere gerilediği görülmüştür (16). Bu makalede histopatolojik değerlendirme yapılmamıştır.

Bizim çalışmamızda MCD diyet alan grup ile adalimumab alan grup arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında adalimumab kolunda TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi. Adalimumab kolunda TNF- α seviyesi normal diyet alan NASH olmayan gruptan bile daha düşük seviyelerde olduğu tespit edildi. Bu bize TNF- α 'yı baskılamada adalimumabın oldukça etkili olduğunu göstermekteydi. Adalimumab grubunda infliximab ve pentoksifilin grubuna göre TNF- α istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla baskılandı.

Adalimumabın IL6 ve TGF β seviyelerinde de istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanma yaptığı tespit edildi. IL 8 ise baskılanmıştı ancak MCD alan grupla aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Adalimumab alan grupta steatozda herhangi bir değişiklik olmadı, her iki grupta da steatoz skoru 3 olarak saptandı. Hepatosit balonlaşması ise adalimumab kolunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı. Adalimumab kolunda total NASH skoru bir miktar azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

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

Satapathy ve arkadaşlarının NASH'li 9 hasta üzerinde yaptığı bir çalışmada 12 aylık pentoksifilin tedavisi sonrası AST, ALT düzeylerinde önemli azalmalar saptandı. Yine 5 hastada fibrozis evresinde gerileme görülmüştür (18).

Lee ve arkadaşlarının yaptığı randomize kontrollü çalışmada, NASH'li 20 hasta pentoksifilin ve plasebo gruplarına ayrılmış. Pentoksifilin 400 mg günde üç kez ve kadınlara 1200 kkal/gün, erkeklere 1500 kkal/gün diyet ile birlikte egzersiz uygulamışlar. Üç aylık tedavi sonrası AST düzeylerinde pentoksifilin kolunda istatistiksel anlamlılık gösteren azalmalar izlendi. ALT düzeyinde ise plasebo koluna göre azalma saptanmıştır, ancak istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. TNF- α ve IL-6 seviyelerinde pentoksifilin kolunda azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamışlar (19). Bu çalışmada histopatolojik değerlendirme tedavi sonrası yapılmamıştır.

Yalnız ve arkadaşlarının 4 hafta verdikleri yüksek yağlı diyetle oluşturdukları NASH modellerine 2 hafta pentoksifilin 4.5 mg/kg/gün intraperitoneal pentoksifilin verildikten sonra plasebo grubuna göre pentoksifilin grubunda AST, ALT seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde geriledi. Histopatolojik olarak steatoz, inflamatuvar hücre sayısı/mm³ ve balon dejenerasyon pentoksifilin kolunda anlamlı derecede azdı (20).

Bizim çalışmamızda MCD diyet alan grup ile MCD+pentoksifilin alan grup arasında serum TNF- α seviyelerine bakıldığında pentoksifilin kolunda TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığı tespit edildi. Pentoksifilin kolunda TNF- α seviyesi normal diyet alan NASH olmayan grupla benzer olarak tespit edildi. Bu bize TNF- α baskılamada pentoksifilinin etkili olduğunu göstermekteydi.

Pentoksifilin IL6, 8 ve TGF β seviyelerinde de istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılanma yaptığı tespit edildi.

Pentoksifilin alan grupta steatozda herhangi bir değişiklik olmadı, her iki grupta da steatoz skoru 3 olarak saptandı. Pentoksifilin lobüler inflamasyonu baskılamıştı ancak aralarında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu. Hepatosit balonlaşması ise pentoksifilin kolunda azalmıştı ancak aralarında istatistiksel farklılık bulunmadı. Pentoksifilin kolunda total NASH skoru bir miktar azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

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

Bizim çalışmamızda anti TNF etki gösteren bu üç ajanın TNF- α seviyelerini baskıladığı ve

NASH patogenezinde rol oynayan TNF- α etkin bir biçimde baskılanmasına rağmen NASH gelişimini engellemediği ancak NASH histopatoloji skorunu bir miktar geriletmediği yine karaciğer fonksiyon testleri üzerine olumlu etkilerinin istatistiksel anlamlı bir farklılık yaratmadığını gösterdi. Bu üç ajanın birbirleri arasında karşılaştırıldığında hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak istatistiksel anlamlı farklılıklarının olmadığı görüldü. Bütün bu verilerin NASH patogenezinde rol oynayan bir sitokin olan TNF- α 'nın baskılanmasının NASH oluşumunu engellemediği ve tedavide de etkisinin belirgin olmadığını gösterdi. Buda NASH patogenezinin multi faktöriyel olduğu ve NASH tedavisinde TNF- α blokajının sınırlı yararları olduğunu gösterdi.

Bizim çalışmamız Anti TNF etki gösteren bu üç ajanın NASH patogenezinde rol oynayan TNF- α 'yı etkin bir biçimde baskılamasına rağmen NASH gelişimini engellemediği ancak NASH histopatolojik skorunu bir miktar geriletmediği yine karaciğer fonksiyon testleri üzerine olumlu etkilerinin olduğu ancak bunun istatistiksel farklılık yaratmadığını göstermiştir.

9-KAYNAKLAR

- 1.Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 1980, 55:434-438.
- 2.Ayman Koteish, Anna Mae Diehl. Animal models of steatohepatitis. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, vol.16, no. 5, 679-690, 2002.
- 3.Metha K, VanThiel DH. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. Nutr Rev 2002;/60:/289-293.
- 4.Ionel Copaci, Laurentiu Micu, Mihai Voiculescu, The Role of Cytokines in Non-Alcoholic Steatohepatitis. A Systematic Review, J Gastrointestin Liver Dis December 2006 Vol.15 No4, 363-373.
- 5.Atzeni, F., P. Sarzi-Puttini, A. Doria L. Iaccarino, and F. Capsoni. Potential off-label use of infliximab in autoimmune and nonautoimmune diseases: a review. Autoimmun. Rev. 2005, 4:144–152.
- 6.Markham, A., and H. M. Lamb. Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. Drugs 2000, 59:1341–1359.
- 7.Imuro, Y., R. M. Gallucci, M. I. Luster, H. Kono, and R. G. Thurman. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. J. Hepatol. 1997, 26:1530–153
- 8.Tilg, H., R. Jalan, A. Kaser, N. A. Davies, F. A. Offner, S. J. Hodges, O. Ludwiczek, D. Shawcross, H. Zoller, A. Alisa, R. P. Mookerjee, I. Graziadei, C. Datz, M. Trauner, D. Schuppan, P.Obrist, W. Vogel, and R. Williams. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. J. Hepatol. 2003, 38:419–425.
- 9.C. Schramm, A. Schneider, A. Marx, A.W. Lohse Adalimumab Could Suppress the Activity of Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH). Z Gastroenterol 2008; 46:1369-1371.
- 10.Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. Immunobiology. 1993 187:447–463.
- 11.Amiya K. Ghoshal, Miriam Ahluwalia, Emmanuel Farber. The Rapid Induction of Liver Cell Death in Rats Fed a Choline-Deficient Methionine-Low Diet. Am J Pathol 1983; 113:309-314.
- 12.Hensley K, Koteke Y, Sang H. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H2O2 genetaion in liver mitochondria. Carsinogenesis 2000; vol. 21, 983-989.
- 13.Anna Mae Diehl. Cytokine regulation of liver injury and repair. Immunogical review. 2002
- 14.Craig J. McClain, Sri Prakash L. Mokshagundam, Shirish S. Barve, Zhenyuan Song, Daniell B.

Hill, Theresa Chen, Ion Deaciuc. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 34 (2004) 67-79.

15.Mary E. Rinella, Marc S. Elias, Robin R. Smolak, Tao Fu, Jayme Borennssztajn, and Richard M. Gren. Mechanism of hepatic steatosis in mice a lipogenic methionine choline–deficient diet. *Journal of Lipid Research*, volume 49, 2008.

16.Mary E. Rinella, Richard M. Gren, The methionine-choline defiiient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insülin resistance, *Journal of Hepatology* 40 (2004) 47-51.

17.Raquel Barbuio, Marciane Milanski, Manoel B Bertolo, Ma´rio J Saad and Lı´cio A Velloso, Infliximab reverses steatosis and improves insülin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet, *Journal of Endocrinology* (2007) 194, 539–550.

18.Suleyman Serdar Koca, Ibrahim Halil Bahcecioglu, Orhan Kursat Poyrazoglu, Ibrahim Hanifi Ozercan, Kazim Sahin, and Bilal Ustundag. The Treatment with Antibody of TNF- α Reduces the Inflammation, Necrosis and fibrozis in the Non-alcoholic Steatohepatitis Induced by Methionineand Choline-deficient Diet. *Inflammation*, Vol. 31, No. 2, April 2008.

19.Sanjaya K Satapathy, Puja Sakhuja, Veena Malhotra, Barjesh C Sharma and Shiv K SarinBeneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrozis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (2007) 634–638.

20.Yin-Mei Lee, Dede S. Sutedja, Chun-Tao Wai, Yock-Young Dan,Myat-Oo Aung, Lei Zhou, Chee-Leong Cheng, Aileen Wee,Seng-Gee Lim. A randomized controlled pilot study of Pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol Int* (2008) 2:196–201.

21.Mehmet Yalniz, I. Halil Bahcecioglu, Nalan Kuzu, Selman Celebi, Huseyin Ataseven, Bilal Ustundag, Ibrahim H. Ozercan, Kazim Sahi. Amelioration of Steatohepatitis with Pentoxifylline in a Novel Nonalcoholic Steatohepatitis Model Induced by High-Fat Diet. *Dig Dis Sci* (2007) 52:2380–2386.

22.Elizabeth M. Brunt, MD. Nonalcoholic steatohepatitis: Pathologic features and differantial diagnosis. *Semminar in diagnostic pathology*, 2005; 22: 330-338.

23.Szczepaniak L, Nurenberg P, Leonard D, et al: Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: Prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E462-8.

24.Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, et al: Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease:

- Population based study. *Ann Hepatol* 2007; 6:161-3.
25. Ekstedt M, Franzén L, Mathiesen U, et al: Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44:865-73.
26. Park S, Jeon W, Kim S, et al: Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:138-43.
27. Perry A, Applegate E, Jackson M, et al: Racial differences in visceral adipose tissue but not anthropometric markers of health-related variables. *J Appl Physiol* 2000; 89:636-43.
28. Flores Y, Yee HJ, Leng M, et al: Risk factors for chronic liver disease in blacks, Mexican Americans, and whites in the United States: Results from NHANES IV, 1999-2004. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:2231-8.
29. Schwimmer J, Deutsch R, Rauch JB, et al: Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003; 143:500-5.
30. Abdelmalek M, Liu C, Shuster J, et al: Familial aggregation of insulin resistance in first-degree relatives of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:1162-9.
31. Willner I, Waters B, Patil S, et al: Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: Insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2957-61.
32. Merriman R, Aouizerat B, Bass N: Genetic influences in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:S30-S3.
33. Ogden C, Yanovski S, Carroll M, Flegal K: The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; 132:2087-102.
34. Dixon J, Bhathal P, O'Brien P: Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121:91-100.
35. Hsiao T, Chen J, Wang J: Insulin resistance and ferritin as major determinants of nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:167-72.
36. Boza C, Riquelme A, Ibaez L, et al: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg* 2005; 15:1148-53.
37. Luyckx F, Sheen A, Desai C, et al: Effects of gastroplasty on body weight and related biological abnormalities in morbid obesity. *Diab Metab* 1998; 24:355-61.
38. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, et al: Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese

subjects. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:399-408.

39.Park J-W, Jeong G, Kim S, et al: Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: Comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:491-7.

40.Moretto M, Kupski C, Mottin C, et al: Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. *Obes Surg* 2003; 13:622-4.

41.Hsiao PJ, Kuo KK, Shin SJ, et al: Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:2118-23.

42.Stranges S, Dorn J, Muti P, et al: Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: A population-based study. *Hepatology* 2004; 39:754-63.

43.Church T, Kuk J, Ross R, et al: Association of cardiorespiratory fitness, body mass index, and waist circumference to nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006; 130:2023-30.

44.Cheung O, Kapoor A, Puri P, et al: The impact of fat distribution on the severity of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hepatology* 2007; 46:1091-100.

45.Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:1212-18.

46.Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al: Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:2119-21.

47.Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al: Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917-23.

48.Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD: Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30:1356-62.

49.El-Serag H, Tran T, Everhart J: Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126:460-8.

50.Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al: Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37:1286-92.

51.Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, et al: Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: A population based case control study. *Gut* 2005; 54:533-9.

52.Browning JD: Statins and hepatic steatosis: Perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology* 2006; 44:466-71.

53. Lee JY, Kim KM, Lee SG, et al: Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007; 47:239-44.
54. Oh SY, Cho YK, Kang MS, et al: The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2006; 55:1604-9.
55. Day C, James O: Steatohepatitis: A tale of two "hits"? (editorial). *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
56. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell G, et al: NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35:373-9.
57. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al: Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: Further evidence of an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-72.
58. Sanyal A, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al: Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120:1183-92.
59. Angulo P, Lindor K: Insulin resistance and mitochondrial abnormalities in NASH: A cool look into a burning issue. *Gastroenterology* 2001; 120:1281-5.
60. Boden G: Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 2006; 6:177-81.
61. Boden G: Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:545-9.
62. Neuschwander-Tetri B: A resistance movement in NASH. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2813-14.
63. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, et al: Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002; 35:898-904.
64. Neuschwander-Tetri B, Caldwell S: Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-19.
65. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al: Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11:183-90.
66. Farrell GC, Larter CZ: Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:S99-S112.
67. Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE: Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: Implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1036-42.

- 68.Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al: Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p53 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-63
- 69.Czaja M: Liver injury in the setting of steatosis: Crosstalk between adipokine and cytokine. *Hepatology* 2004; 40:19-22.
- 70.Hui J, Hodge A, Farrell G, et al: Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. *Hepatology* 2004; 40:46-54.
71. Kugelmas M, Hill D, Vivian B, et al: Cytokines and NASH: A pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38:413-19.
- 72.Xu A, Wang Y, Keshaw H, et al: The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:91-100.
- 73.Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al: Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54:117-21.
- 74.Harrison S, Di Bisceglie A: Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003; 63:2379-94.
- 75.Canbakan B, Tahan V, Balci H, et al: Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2008; 7:249-54.
- 76.Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, et al: Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2771-6.
- 77.Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al: Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36:403-9.
- 78.Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, et al: Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:3584-9.
- 79.Kessova I, Cederbaum AI: CYP2E1: Biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3:509-18.
- 80.Hoek JB, Pastorino JG: Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver injury. *Alcohol* 2002; 27:63-8.
- 81.Chalasani N, Gorski C, Asghar M, et al: Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37:544-50.
- 82.Weltman M, Farrell G, Hall P, et al: Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27:128-33.
83. Laurent A, Nicco C, Van Nhieu J, et al: Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:1277-85.

84. Yang S, Zhu H, Li Y, et al: Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; 378:259-68.
85. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al: Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40:185-94.
86. Leclercq I, Farrell G, Field J, et al: CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105:1067-75.
87. Yang S, Lin H, Diehl AM: Fatty liver vulnerability to endotoxin-induced damage despite NF κ B induction and inhibited caspase 3 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G382-92.
88. Diehl A: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol* 2002; 282:G1-G5.
89. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, et al: Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- α gene expression in obese patients: Evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007; 17:1374-80.
90. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, et al: Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* 2008; 138:1452-5.
91. Fromenty B, Robin M, Igoudjil A, et al: The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004; 30:121-38.
92. Perez-Carreras M, Hoyo P, Martin M, et al: Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:999-1007.
93. Le T, Caldwell S, Redick J, et al: The zonal distribution of megamitochondria with crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:1423-9.
94. Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M: Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:244-51.
95. Pinzani M, Rombouts K: Liver fibrosis: From the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36:231-42.
96. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, et al: High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: A potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34:738-44.
97. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, et al: Leptin in hepatic fibrosis: Evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35:762-

71.

98.Adams L, Lindor K, Angulo P: The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1316-20.

99.Lonardo A, Adinolfi L, Loria P, et al: Steatosis and hepatitis C virus: Mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology* 2004; 126:586-97.

100.Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, et al: Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2004; 39:179-87.

101.Saadeh S, Younossi Z, Remer E, et al: The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123:745-50.

102.Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo M, De Moura M: Nonalcoholic steatohepatitis—a long-term follow-up study: Comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 2003; 48:1909-13.

103.Zafrani E: Non-alcoholic fatty liver disease: An emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004; 444:3-12.

104. Gramlich T, Kleiner D, McCullough A, et al: Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2004; 35:196-9.

105.Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al: Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118:1117-23.

106.Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-21.

107.Mendler MH, Kanel G, Govindarajan S: Proposal for a histological scoring and grading system for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25:294-304.

108.Scheuer P: Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13:372-4.

109.Ratziu V, Massard J, Charlotte F, et al: Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology* 2006; 6:6-19.

110.Yoneda M, Yoneda M, Mawatari H, et al: Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Liver Dis* 2008; 40:371-8.

111.Charlton M, Angulo P, Chalasani N, et al: Low circulating levels of dehydroepiandrosterone in

- histologically advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008; 47:484-92.
- 112.Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al: Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25:779-86.
- 113.Teli M, James O, Burt A, et al: The natural history of nonalcoholic fatty liver: A follow-up study. *Hepatology* 1995; 22:1714-19.
- 114.Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P: The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: A longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42:132-8.
- 115.Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, et al: Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: A longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004; 40:820-6.
- 116.Harrison S, Torgerson S, Hayashi P: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2042-7.
- 117.Ratziu V, Bugianesi E, Dixon J, et al: Histological progression of non-alcoholic fatty liver disease: A critical reassessment based on liver sampling variability. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26:821-30.
- 118.Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129:113-21.
- 119.Matteoni C, Younossi Z, Gramlich T, et al: Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116:1413-19.
- 120.Poonawala A, Nair S, Thuluvath P: Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: A case-control study. *Hepatology* 2000; 32:689-92.
121. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al: Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123:134-40.
- 122.Caldwell S, Oelsner D, Iezzoni J, et al: Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29:664-9.
- 123.Marrero J, Fontana R, Su G, et al: NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002; 36:1349-54.
- 124.Hui J, Kench J, Chitturi S, et al: Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:420-7.
- 125.Hickman I, Jonsson J, Prins J, et al: Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase,

fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004; 53:413-19.

126.Knobler H, Schattner A, Zhornicki T, et al: Fatty liver—an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *QJM* 1999; 92:87-96.

127.Nobili V, Manco M, Devito R, et al: Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial. *Hepatology* 2008; 48:119-28.

128.Huang MA, Greenson JK, Chao C, et al: One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1072-81.

129.Harrison SA, Ramrakhiani S, Brunt EM, et al: Orlistat in the treatment of NASH: A case series. *Am J. Gastroenterology* 2003; 98:926-30.

130.Zelber-Sagi S, Kessler A, Brazowsky E, et al: A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:639-44.

131.Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC, et al: Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006; 130:1564-72.

132.Liu X, Lazenby AJ, Clements RH, et al: Resolution of nonalcoholic steatohepatitis after gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2007; 17:486-92.

133.Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE: Weight loss and non-alcoholic fatty liver disease: Falls in gamma-glutamyl transferase concentrations are associated with histologic improvement. *Obes Surg* 2006; 16:1278-86.

134.Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE: Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004; 39:1647-54.

135.Clark JM: Weight loss as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(Suppl 1):S39-S43.

136.Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ: Comparative review of diets for the metabolic syndrome: Implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:285-300.

137.Luyckx F, Lefebvre P, Scheen A: Nonalcoholic steatohepatitis: Association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26:98-106.

138.Harrison S, Torgerson S, Hayashi P, et al: Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2485-90.

- 139.Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, et al: Plasma transforming growth factor- β 1 and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1667-72.
- 140.Arke MW, Burnett JR, Croft KD: Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45:417-50.
- 141.Abdelmalek M, Angulo P, Jorgensen R, et al: Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2711-17.
- 142.Gulbahar O, Karasu Z, Ersoz G, et al: Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with N-acetylcysteine [abstract]. *Gastroenterology* 2000; 118:A1444.
- 143.Ip E, Farrell G, Hall P, et al: Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39:1286-96.
- 144.Lin H, Yang S, Chuckaree C, et al: Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nature Med* 2000; 6:998-1003.
145. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358:893-4.
- 146.Nair S, Diehl AM, Wiseman M, et al: Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: A pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20:23-8.
- 147.Neuschwander-Tetri B, Brunt E, Wehmeier K, et al: Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- α ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38:1008-17.
- 148.Promrat K, Lutchman G, Uwaifo G, et al: A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:188-96.
- 149.Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, et al: The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 46:424-9.
- 150.Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, et al: Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: One-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 2008; 135:100-10.
- 151.Facchini F, Hua N, Stoohs R: Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122:931-9.
- 152.Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al: Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: Evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1251-8.
- 153.Fernandez-Real J, Lopez-Bermejo A, Ricart W: Cross-talk between iron metabolism and

diabetes. *Diabetes* 2002; 51:2348-54.

154.Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A: A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis [correspondence]. *J Hepatol* 1999; 31:384.

155.Kiyici M, Gulten M, Gurel S, et al: Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2003; 17:713-18.

156.Lindor K, Kowdley K, Heathcote E, et al: Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Results of a randomized trial. *Hepatology* 2004; 39:770-8.

157.Contos MJ, Cales W, Sterling RK, et al: Development of nonalcoholic fatty liver disease after orthotopic liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Liver Transpl* 2001; 7:363-73.

158.Burke A, Lucey MR: Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4:686-93.

159.Kirsch, R., V. Clarkson, E. G. Shephard, D. A. Marais, M. A. Jaffer, V. E. Woodburne, R. E. Kirsch, and P. L. Hall. 2003. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18:1272–1282.

160.Chawla, R. K., W. H. Watson, C. E. Eastin, E. Y. Lee, J. Schmidt, and C. J. McClain. 1998. S-adenosylmethionine deficiency and TNF- α in lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *Am. J. Physiol.* 275:G125–129.

