



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALARINDA
SERUM MİKRO RNA DÜZEYLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet ÇELİKBİLEK

KAYSERİ-2012



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALARINDA
SERUM MİKRO RNA DÜZEYLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet ÇELİKBİLEK

**Danışman
Doç. Dr. Mevlüt BAŞKOL**

KAYSERİ – 2012

TEŞEKKÜR

Eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum Bilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Şebnem Gürsoy, Prof. Dr. Mehmet Yücesoy, Prof. Dr. Ömer Özbakır, Prof. Dr. Kadri Güven, Doç. Dr. Mevlüt Başkol, Yard. Doç. Dr. Alper Yurci, Yard. Doç. Dr. Dr. Edip Torun, Uzm. Dr. Ahmet Karaman ve tüm hocalarıma her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm ailem ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Mehmet Çelikkalek

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	iii
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. NAYKH	3
2.1.1. Patogenez	3
2.1.2. Tanı	6
2.1.3. Tedavi.....	7
2.2. mikroRNA.....	7
2.2.1. mikroRNA genleri ve yapısı	8
2.2.2. mikroRNA'nın işlenmesi	8
2.2.3. mikroRNAların Çalışma Prensipleri	9
2.2.4. mikroRNA tek nükleotit polimorfizmleri	10
2.2.5 miR'ların lipid metabolizmasındaki rolü	11
2.2.6 miR'ların karaciğer fibrozisindeki rolü.....	13
2.2.7. miRNA'lar ve hastalıkların tanısında yeni biyomarkır	13
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	<u>1516</u>
3.1. Çalışma grubu	<u>1516</u>
3.2. Yöntem	<u>1617</u>
3.3. miRNA Ekspresyonu	<u>1718</u>
3.4. İstatistik Değerlendirme	<u>1920</u>
4. BULGULAR	<u>2122</u>
5. TARTIŞMA	<u>2829</u>
7.KAYNAKLAR	<u>3738</u>

KISALTMALAR

ALT	Alanin amino transferaz
AST	Aspartat amino transferaz
DGAT1	Diaçilgliserol açıltransferaz 1
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FAS	Yağ asit sentetaz
HL	Hiperlipidemi
HMGCR	HMG CoA redüktaz
HT	Hipertansiyon
IL	İnterlökin
LD	Lipit damlacıkları
LXR	Karaciğer X reseptörü
miRNA	Mikro ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NAS	NAYKH aktivite skoru
NASH	Non-alkolik steatohepatit
NAYKH	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
PNPLA3	Patatin benzeri fosfolipaz domain-içeren 3
PPAR	Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör
PUFA	Poliansature yağ asitleri
RNA	Ribonükleik asit
SNPs	Tek nükleotit değişiklikleri
SREBP-1c	Sterol yanıt elementi bağlayıcı protein 1c
TG	Trigliserit
TNF	Tümör nekrotize edici faktör
UPR	Yayılmış protein yanıtına
VKİ	Vücut kitle indeksi

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1.	NAFLD ve kontrol gruplarında hastaların klinik ve demografik verileri24
Tablo 2.	t testi ile anlamlı çıkan daha sonra SAM testi ile doğrulanan ($q < 5\%$) farklı ekspresyon oranları gösteren miRNA'ların $\text{Log}_2(\text{Kat değişim})$ oranları ($p < 0.05$)27
Tablo 3.	NAYKH'da laboratuvar parametler ve miRNA'lar arasında korelasyon analizleri.....28
Tablo 4.	NAYKH olan 20 hastanın histopatolojik özellikleri.....28
Şekil 1.	miR'nin işlenmesi (Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? 2008. Nat Rev Genet.'den modifiye edilmiştir)9
Şekil 2.	miR ve mRNA'nın 3' UTR bölgesinin baz eşleşmesi 10
Şekil 3.	Sekiz miRNA'nın hasta ve kontrol grupları arasında ekspresyon değerleri Box plotlar ile gösterilmiştir. Orta hat median istatistiği, kutuların alt ve üstleri 25. ve 75. persantilleri, alttaki ve üstteki çizgiler aykırı değerler (daireler) çıkarıldıktan sonra minimum ve maksimum değerleri göstermektedir. p değerleri iki-yönlü bağımsız iki örneklem t testi ile elde edilmiştir ve FDR ile düzeltilmiştir.25
Şekil 4.	Farklı ekspresyona sahip miRNA'ların veri değerlerini aynı anda hiyeaşık bir veri yapısında görmek için heatmap grafikleri verildi. Parlak kırmızı: negatif yönde ekspresyonu, siyah: değişiklik yok, parlak yeşil: pozitif yönde ekspresyonu göstermektedir.26
Şekil 5.	NAYKH saptamada miR-197, mir-146b, mir-181d ve mir-99a'nın ROC eğrileri altında kalan alanların karşılaştırması. ROC eğrileri altında kalan alanların değerleri sırasıyla 0.77(0.60-0.88), 0.75(0.59-0.87), 0.86(0.72-0.95), 0.76(0.60-0.88) saptandı ve herhangi iki miRNA arasında istatistiksel bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).27

NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALARINDA SERUM MİKRO RNA DÜZEYLERİ

ÖZET

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) karaciğer hastalıkları arasında en sık karşılaşılanı ve batı ülkelerinde kronik karaciğer hastalığının en sık sebeplerindendir. NAYKH basit steatozdan son dönem karaciğer hastalığına ilerleyen steatohepatite kadar değişen durumların tümünü kapsamaktadır. NAYKH tanısında perkütan karaciğer biyopsisi kullanılmaktadır. Bu işleminde kendine ait kısıtlamaları mevcuttur. Bu kısıtlamalar arasında işleme bağlı komplikasyonlardan kanama ve ağrı oluşması, vakaların %25'ine kadar oluşabilen hatalı örnekleme sonucu eksik patolojik değerlendirme, biyopsilerin değerlendirilmesinde patologlar arası farklılıklar sayılabilmektedir. Tüm bu kısıtlamalar ve klinik pratikte karşılaşılan sorunlar nedeniyle karaciğer hastalıklarında non invaziv tanı yöntemleri gündeme gelmiştir. mikroRNA (miR) endojen, 19-25 nükleotit uzunluğunda hedef genleri regüle eden tek sarmallı RNA molekülüdür. miR'lar gen düzenlenmesinin bir boyutunu oluşturmaktadır. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara sebep olmaktadır. miR'lar hücre proliferasyonunda, apoptozisde, metabolizmada, immün fonksiyonlarda, inflamasyonda, doku gelişim ve diferansiyasyonunda önemli rol oynarlar. Değişik kanser tiplerinde ve tip 2 diabetli hastalarda sağlıklı insanlara göre artmış serum miR düzeyleri gösterilmiştir ve hastalıklara özgü serum miR'larının tanısız amaçlı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda NASH hastalarında serumda miR düzeylerini ve steatoz derecesinin, hepatosit balonlaşma derecesinin, inflamasyonun şiddetinin ve fibrozisin serum miR düzeyleri ile ilişkisini araştırdık. Yapılan değerlendirmede miR-197, miR-99a, miR-146b ve miR-181d sağlıklı gruba göre serumda anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p<0.05$). Balonlaşma, steatoz ve fibrozisle ilişki bulunamazken, karaciğer dokusunda inflamasyon derecesiyle hastaların serum miR-197 ve miR-10b düzeyleri negatif ilişkili bulunmuştur. Ayrıca serum miR-181d ve miR-99a düzeyleri hastaların GGT düzeyleriyle negatif ilişkili bulunmuştur. Çalışmamız miR'ların NAYKH'da serumda farklı düzeylerde olabileceğini ve tanı amacıyla gelecekte kullanılabileceğini göstermiştir. Kanaatimizce NAYKH'nın non-invaziv tanısında tek bir miR'dan ziyade birden fazla miR'nın değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, Non-alkolik steatohepatit, Mikro RNA

SERUM MIRNA LEVELS IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common type of liver disease and the most common cause of chronic liver disease in western countries. NAFLD covers all situations ranging from simple steatosis to steatohepatitis which can progress to end-stage liver disease. Percutaneous liver biopsy is the gold standard for diagnosis of NAFLD. This process has its own limitations. Bleeding and pain due to the biopsy, incorrect pathologic assessment as a result of insufficient sampling that can consist of up to 25% cases and the differences of the evaluation of biopsies between pathologists can be noted as limitations. Because of all these constraints and problems encountered in clinical practice, non-invasive diagnostic methods in liver diseases have emerged. microRNA (miR) is endogenous, 19-25 nucleotide-long and single-stranded RNA molecules that regulate target genes. miR's constitutes another dimension of gene regulation. Disruption of this regulation with various mechanisms can cause diseases. miR's play an important role in cell proliferation, apoptosis, metabolism, immune function, inflammation, tissue development and differentiation. Increased serum levels of miR's are shown in patients with different types of cancer and type 2 diabetes compared to healthy people. Disease specific serum miR's maybe used as potential biomarkers. In our study we research serum miR levels in NAFLD and also we investigate miR correlation with steatosis grade, inflammation, hepatocellular ballooning and fibrosis. Serum miR-197, miR-99a, miR-146b and miR-181d levels were low according to the healthy group in NAFLD. We found negative association between serum levels of miR-197 and miR-10b with inflammation degree in liver tissues but we did not find any association between ballooning, steatosis, fibrosis and serum miR levels. Also negative associations were found between serum levels of miR-181d and miR-99a with serum GGT levels. Our study showed that serum miR levels may help in understanding the pathophysiology and diagnosis of NAFLD. According to our opinion more than one miR should be evaluated rather than a single miR for noninvasive diagnosis of NAFLD. **Key words:** Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis, micro RNA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) karaciğer hastalıkları arasında en sık karşılaşılanı ve batı ülkelerinde kronik karaciğer hastalığının en sık sebeplerindendir. NAYKH 1960'ların başında alkol alımı olmadan karaciğerde temelde trigliserid (TG) birikimi olarak tanımlanmıştır (1). 1980'lerdeki çalışmalarda bu durum non alkolik steatohepatit (NASH) olarak tanımlanmıştır (2). Güncel tanımla NAYKH basit steatozdan son dönem karaciğer hastalığına ilerleyen steatohepatite kadar değişen durumların tümünü kapsamaktadır (3). Basit steatoz benign bir durum olarak görülse de son dönem çalışmalarda NASH gibi siroz evresine ilerleme potansiyeli olduğu belirtilmektedir (4). Etyopatogenezi tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen temelinde insülin rezistansı ve oksidatif stres rol almaktadır (5, 6). NAYKH obezite, insülin rezistansı, dislipidemi ve hipertansiyon ile güçlü ilişki göstermektedir ve metabolik sendromun karaciğer bulgusu olarak kabul edilmektedir (7).

NAYKH tanısında perkütan karaciğer biyopsisi kullanılmaktadır. Bu işleminde kendine ait kısıtlamaları mevcuttur. Bu kısıtlamalar arasında; 1-işleme bağlı kanama ve ağrı oluşması, 2-vakaların %25'inde hatalı örnekleme sonucu eksik patolojik değerlendirme, 3-biyopsilerin değerlendirilmesinde patologlar arası farklılıklar görülebilmektedir (8,9). Klinik yaklaşım açısından karaciğer biyopsisinin en büyük kısıtlılığı örneklem farklılığı ve bunun fibrozis üzerine etkisidir. Birçok araştırma karaciğer hastalıklarında örnekleme hatasını göstermiştir (10,11). Hatta aynı hastadan alınan sol ve sağ lob biyopsileri örnekleme hatasını azaltmamaktadır çünkü fibrozis evresinde farklılıklar gözlenmektedir (11). Örneklem hatasını en aza indirmek için ideal karaciğer biyopsi spesmeni 20mm uzunluğunda ve 11 portal alanı içermesi gerektiği kabul edilmektedir

(12) fakat klinik uygulamada alınan dokular bu standartları karşılayamamaktadır. Tüm bu kısıtlamalar ve klinik pratikte karşılaşılan sorunlar nedeniyle karaciğer hastalıklarında non invaziv tanı yöntemleri gündeme gelmiştir.

MikroRNA (miR) endojen, 19-25 nükleotit uzunluğunda hedef genleri regüle eden tek sarmallı RNA molekülüdür (13). miR'lar mRNA'nın 3'UTR bölgesinde hedef transkripti ile baz eşleşmesi yaparak, bu transkriptlerin translasyonunu değişik mekanizmalar ile baskılar (14). miR'lar bu şekilde görev yaparak gen düzenlenmesinin bir boyutunu oluşturmaktadır. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara sebep olmaktadır. miR'lar hücre proliferasyonunda, apoptozisde, metabolizmada, immün fonksiyonlarda, inflamasyonda, doku gelişim ve diferansiyasyonunda önemli rol oynarlar (13,15,16). Şimdiye kadar 873 insan miR'si izole edilmiştir ve bu sayı artmaktadır. miR'ların ekspresyonu organ spesifiktir (17). Bozulmuş lipid metabolizması, apoptozis aktivasyonu, inflamasyon ve hücrel rejeneratif yanıtlar gibi mekanizmalar NASH oluşumunda etkili olmaktadır (18). İlk olarak ratlarda yapılan bir araştırmada karaciğer dokusunda miR ekspresyon paterninin NASH grubunda değişiklik gösterdiği bazı miR'ların artarken bazılarının azaldığı saptanmıştır (19). NASH hastalarında miR düzeylerinin belirlenmesi için yapılan bir araştırmada metabolik sendromlu NASH hastalarında karaciğer dokusunda bazı miR düzeyleri yüksek bulunurken bazı miR düzeyleri düşük saptanmıştır (20).

Sağlıklı insanlarda serum miR düzeylerinin farklılık göstermediği, sabit kaldığı görülmüştür (21, 22). Değişik kanser tiplerinde ve tip 2 diabetli hastalarda sağlıklı insanlara göre artmış serum miR düzeyleri gösterilmiştir ve hastalıklara özgü serum miR'larının potansiyel biyomarkır olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (21-23).

Bizim çalışmamızda birincil amaç olarak NASH hastalarında diğer miR çalışmalarından farklı olarak doku yerine serum miR düzeylerini araştırdık ve serum miR'larının NASH tanısında kullanılabilişliğini değerlendirdik. İkincil amaç olarak NASH hastalarında steatoz derecesinin, hepatosit balonlaşma derecesinin, inflamasyonun şiddetinin ve fibrozisin serum miR düzeyleri ile ilişkisini araştırdık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. NAYKH

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı erken evresinde hepatosit sitoplazmasında lipid damlacığı (LD) şeklinde TG depolanmasıyla karakterize kronik karaciğer bozukluğudur. Hepatositlerin %5'inden fazlasında TG damlacıklarının olmasına steatoz denmektedir. NAYKH basit makroveziküler steatozdan steatohepatit, fibroz ve siroza kadar olan geniş spektrumlu karaciğer hasarını içermektedir. Günümüzde steatohepatitin fibroz ve siroza ilerlediğine dair histolojik kanıt vardır (24). On yıl içerisinde NASH'li hastaların %10-29'u siroza ilerleyebilmektedir (25). Sirozda hepatositlerin yerini primer tip 1 kollojenden oluşan skar dokusu almaktadır. Siroz karaciğer kanserine ilerleyebilmektedir. NASH'a bağlı siroz gelişen hastaların %4-27'si hepatoselüler kanser geliştirebilmektedir (26). Giderek artan kanıyla gelişmiş ülkelerde NAYKH karaciğere bağlı morbidite ve mortaliteden sorumlu en sık sebep kabul edilmektedir (26).

2.1.1. Patogenezi

NAYKH'nın patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. İnsülin rezistansı, oksidatif stres, hepatik stallet hücre aktivasyonu, apoptozis, inflamasyon ve genetik çalışmalar NAYKH patogenezinde suçlanmıştır. İnsülin rezistansı ve anormal lipid metabolizması hastalığın ilerlemesinden sorumlu ana mekanizmalardır (27).

İnsülin rezistansı: Tüm vücutta, adipoz dokuda ve hepatik alandaki insülin rezistansı, hipertrigliseridemi ve artmış serbest yağ asitleri visceral adipozitenin artmasına yol açarlar. Bu da insülin rezistansını artırır. TNF- α ve IL-6 insülin reseptör substrat

aktivasyonunu inhibe ederek ve plazma serbest yağ asitlerini lipoliz yoluyla artırarak bu kısır döngünün içerisinde yer alırlar. Hepatik insülin rezistansı olan, insülin reseptör substrat genleri olmayan farelerde yapılan çalışmada respiratuvar zinciri bloke eden, mitokondriyal disfonksiyon ve insülin rezistansına yol açan birçok proteinin artışı saptanmıştır (27,28).

Steatosis: Hepatik yağlanma lipid sentez ve oksidasyonundaki dengenin bozulması ile oluşur. Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör alfa (PPAR- α) düzeyinin azalması ile serbest yağ asid oksidasyonun azalması, bozulmuş mitokondriyal β -oksidasyon, PPAR- γ ve sterol yanıt elementi bağlayıcı protein 1c (SREBP-1c) aracılığı ile de-novo lipogenezin artması bu dengeyi bozan potansiyel mekanizmalardır. Steatozda bozulmuş lipid metabolizması araştırmalarda en önemli odak olmayı sürdürmektedir. n-3 poliansature yağ asidlerinin (PUFA) azalmasının steatoz ile ilişkili olduğu görülmüştür. Acyl-CoA: diaçilgliserol açıltransferaz 1 (DGAT1) TG sentezinde ve eksojen yağ asidlerinin esterifikasyonunda rol alır. Bu enzimin inhibisyonu ile steatoz gelişimi engellenebilir (27).

İnflamasyon: Serbest yağ asidleri proinflamatuvar sitokinleri artırarak ve nükleer faktör- κ B yolağını aktive ederek inflamasyonu uyarır. NAYKH'da kompleman sisteminde aktive olduğu bilinmektedir. Sitokin üretimiyle inflamasyonu artıran natural killer T hücrelerinin artmış hepatik infiltrasyonu immün sistemin spesifik aktivasyonuna ait bir bulgudur. NAYKH'da agresif oksidan üreten bir nötrofil enzimi olan myeloperoksidaz plazmada yüksek bulunmuştur (27). NAYKH'da azalmış n-6 ve n-3 PUFA düzeyleri görülmüştür. Bozulmuş lipid profili inflamasyon ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda bozulmuş PUFA metabolizması ve nonenzimatik oksidasyonun NASH progresyonu ile ilişkili olduğu kesin olarak gösterilmiştir (27,29).

Hepatosit hasarı: Serbest yağ asitleri endoplazmik retikulum (ER) stres yanıtını indükleyerek ve hücre ölümünün mitokondriyal yolunu aktive ederek direkt hepatotoksik etki gösterirler. Serbest yağ asidi ile ilişkili lipotoksisitede mitokondriyal disfonksiyon, özellikle n-3 PUFA eksikliği olmak üzere lipid profilinin değişmesi, TNF- α 'ya bağlı sitotoksisite, c-jun-N-terminal kinaz aktivasyonu, hücre ölümünün lizozomal ve kaspaz yolları, ER stres aktivasyonu gibi birçok yolak yer almaktadır. Karaciğer hücre hasarı alanında yapılan çalışmalardan birinde hepatosit hücre kültürlerinde oleik asidin palmitik aside göre daha steatojenik fakat daha az apoptotik

olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma diyet şekillerine göre NAYKH'nın patogeneğinde önemli bilgiler sağlamıştır (27). Oksidatif stresi arttıran faktörlerden biri de hepatositlerde demir birikimidir. Serbest yağ asitlerinin peroksizomal β oksidasyonu ile hidrojen peroksid açığa çıkar. Eğer ortamda demir var ise hidrojen radikalleri oluşur. Aşırı reaktif oksijen bileşiklerinin açığa çıkması, hücre membranında lipid peroksidasyonunu tetikleyerek TNF α ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olur. Sitokinler aracılığıyla olan nötrofil kemotaksisini, hücre apoptozisi ve fibrozis izler (27,30).

Fibrozis: Proinflamatuvar sitokinler hepatik stallet hücreleri uyarırlar ve kollajenöz matriks üretimini arttırarak fibrozis oluşumuna yol açarlar. DGAT inhibisyonu hepatik stallet hücre aktivasyonunu ve hepatik fibrozisi azaltırlar. Bunu da hepatik stallet hücre aktivasyonu için gerekli retinil ester depolarını azaltarak yapar (27).

Genetik polimorfizmler: Genetik etyolojinin olabileceği iki aile çalışmasıyla düşünülmüştür (31,32). Hastalığa yakınlıkta etnik varyasyonların olması hastalığın genetik komponentinin olabileceğini düşündürmektedir (33). NAYKH yaklaşık olarak %39 oranında kalıtılmaktadır (34). Patatin benzeri fosfolipaz domain-içeren 3 (PNPLA3) genindeki mutasyon (Ile148-Met148) her zaman NAYKH ile ilişkilidir. Bu mutasyon etnik gruplardaki farklılığı kısmen açıklamaktadır. PNPLA3 yağ dokusunda ve karaciğerde eksprese olmaktadır. Bu ekspresyon karaciğer X reseptörü (LXR) ve SREBP-1c'yi içeren yolakla insülin tarafından düzenlenmektedir. Hepatositlerde bulunan bu genin %90'ı LD içerisinde bulunmaktadır. Fizyolojik olarak bu genin proteini TG hidrolaz ve trans açılaz aktivitesine sahiptir. Mutasyonla birlikte hepatik TG içeriği artmaktadır (34). Yapılan başka bir genom çalışmasında NAYKH ile ilişkili NCAN, PPP1R3B, GCKR ve LYPLAL1 gibi birçok genom alanı bulunmuştur (34). Bir çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında non alkolik yağlı karaciğer hastalığı grubunda HLA B65 (28.8% vs 0%, $p<0.001$) ve DQ5 (40.7% vs 16.1%, $p<0.05$) ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artma bulunmuştur. Bu çalışmada insan lökosit antijenlerinin non alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogeneğinde rol alabileceği belirtilmiştir (35).

NAYKH progresyonu: NAYKH'nın basit steatozdan steatohepatit, fibroz ve siroza kadar ilerleyen karaciğer hasarına neden olduğunu ve 10 yıl içerisinde NASH'li hastaların %10-29'unun siroza ilerleyebilme potansiyeli olduğunu belirtmiştik.

NAYKH'nın fibroz ve siroza progresyonuna sebep olan faktörler insanlarda tanımlanamamıştır. Hayvan çalışmaları insan NAYKH'nı tam yansıtmada bir çok önemli bilgi sağlamıştır. Elde edilen veriler NASH gelişiminde özellikle TNF- α ve IL-6 olmak üzere pro-inflamatuvar sitokinlerin ana rolü üstlendiğini göstermektedir. TNF- α ve IL-6 NASH hastalarının kan ve karaciğer dokularında artmıştır ve sıçanlarda bu sitokinlerin inhibisyonu NAYKH'nda düzelme sağlamıştır (34). İkinci önemli mekanizma ER stresidir. Bu mekanizma yayılmış protein yanıtına (UPR) neden olan ER içerisinde uygunsuz katlanmış protein birikimiyle oluşmaktadır. UPR nükleer faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), c-jun-N-terminal kinaz ve oksidatif stres yollarını aktifleştirerek steatozun NASH'a progresyonuna yol açarlar (34). Beslenme alışkanlıkları ve yaşam stili gibi ekstrahepatik faktörlerde NAYKH gelişimine ve progresyonuna sebep olabilirler. Yapılan çalışmalarda hepatositlerin artmış satüre yağ asitleriyle karşılaşmaları inflamasyonu tetiklemiş, mitokondriyal fonksiyonları inhibe etmiş ve ER stres yolağının indüklenmesine yol açmıştır (30).

2.1.2. Tanı

Birçok NAYK hastası asemptomatiktir. ALT yüksekliğinin karaciğer enzim yüksekliğine sebep olan hastalıklar dışlandıktan sonra en sık sebebi NAYKH'dır (36). Karaciğer biyopsisi histolojik bulguların şiddetini belirlemede ve tanıda altın standarttır. Biyopsi işlemine bağlı komplikasyonlardan kanama ve ağrı oluşması, vakaların %25'ine kadar oluşabilen hatalı örnekleme sonucu eksik patolojik değerlendirme, biyopsilerin değerlendirilmesinde patologlar arası farklılıklar ve klinik pratikte karşılaşılan sorunlar nedeniyle karaciğer hastalıklarında non invaziv tanı yöntemleri gündeme gelmiştir. FibroTest, SteatoTest ve NAYKH fibrozis skoru fibrozis ve steatozisi belirlemek için geliştirilmiştir fakat klinik kullanımları kısıtlıdır. Hepatik apoptozisin göstergesi olan sitokeratin-18 parçaları NASH ve basit steatozu birbirinden ayırmak için kullanılmıştır. Fakat belirtilen test ve belirleyicilerin rutin kullanılabilmesi için veriler yeterli değildir (27).

Yağlı karaciğer hastalığı ultrasonografide parlak karaciğer olarak saptanmaktadır. Karaciğer yağlanması tanısal yaklaşımında ultrasonografi sensitif, güvenilir bir araçtır. Ultrasonografi her ne kadar NAYKH ve NASH ayırımı yapamasa da, karaciğer yağ infiltrasyonunun şiddetini tanımlamada değerli, invaziv olmayan, kolay ulaşılabilir

bir araçtır. Transient elastografi fibrozisi belirlemede önemli bilgiler sağlamıştır fakat rutin klinik kullanımı yoktur (37).

Hepatik steatoz noninvaziv olarak saptanabilmesine rağmen hepatik inflamasyon ve fibrozis için biyopsi gerekmektedir. Günümüzde biyopsi genel olarak dolaşımda saptanan artmış karaciğer enzimleri nedeniyle yapılmaktadır. ALT'nin yüksek olması hastanın NASH olmasını desteklese, hepatik steatozu olup ALT'si normal olan bireylerin biyopsileri %59 NASH olarak gelmektedir (38). Bazı NAYKH'ları ilk başvurularında siroz olarak görülmektedir. Karaciğerdeki inflamasyon ve fibrozisi saptayacak noninvaziv metodların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Böylece hastalığın doğal seyrini anlamamız ve hastalığın progresyonunu durdurup belkide geriye dönüşünü sağlayacak terapotik yaklaşımlar geliştirmemiz mümkün olacaktır.

2.1.3. Tedavi

NAYKH'da etkin bir tedavi olmamakla beraber mevcut tedavi seçenekleri metabolik riskler ve insülin rezistansını hedef almaktadır. Diabetes mellitus, HT, HL gibi spesifik metabolik hastalıkları barındıranlarda bu hastalıklara ait tedavi yaklaşımları uygulanmalıdır. Yaşam tarzı değişiklikleri, cerrahi, farmakoterapi ve diyet gibi yaklaşımların etkinliğine dair geçmiş yıllara ait veriler mevcuttur. NAYKH'da bariatrik cerrahi veya yaşam tarzı değişiklikleriyle kilo verilmesi histolojik bulgularda düzelme sağlamıştır (39). Hastalarda diyet değişikliği, kilo verilmesi ve egzersizin uygulanması gerektiği birçok çalışmayla desteklenmiştir (40,41). Son dönemde yapılan bir çalışmada (PIVENS) diabeti olmayan NASH hastalarında vitamin E ve pioglitazonun steatozis ve inflamasyonu düzelttikleri, NASH'da histolojik bulguların kaybolmasında vitamin E'nin plaseboya göre anlamlı üstün olduğu gösterilmiştir (42).

2.2. mikroRNA

1990'lara kadar bilinen üç çeşit RNA molekülü mevcuttu: mRNA, tRNA ve rRNA. miR'lar 1993 yılında ilk olarak bir nematod olan C. Elegansta bulundu ve daha sonra insanda da bu miR'ların homologları ortaya kondu (16). İlk olarak dokuların gelişiminde görev aldıkları belirlenen miR'ların birçok hücresel olayda faaliyet gösterdikleri şu an bilinmektedir (13-16). Son on yılda bu nedenle miR'ların yapı ve işlevlerini belirlemek için yoğun çalışmaların yapıldığını görmekteyiz.

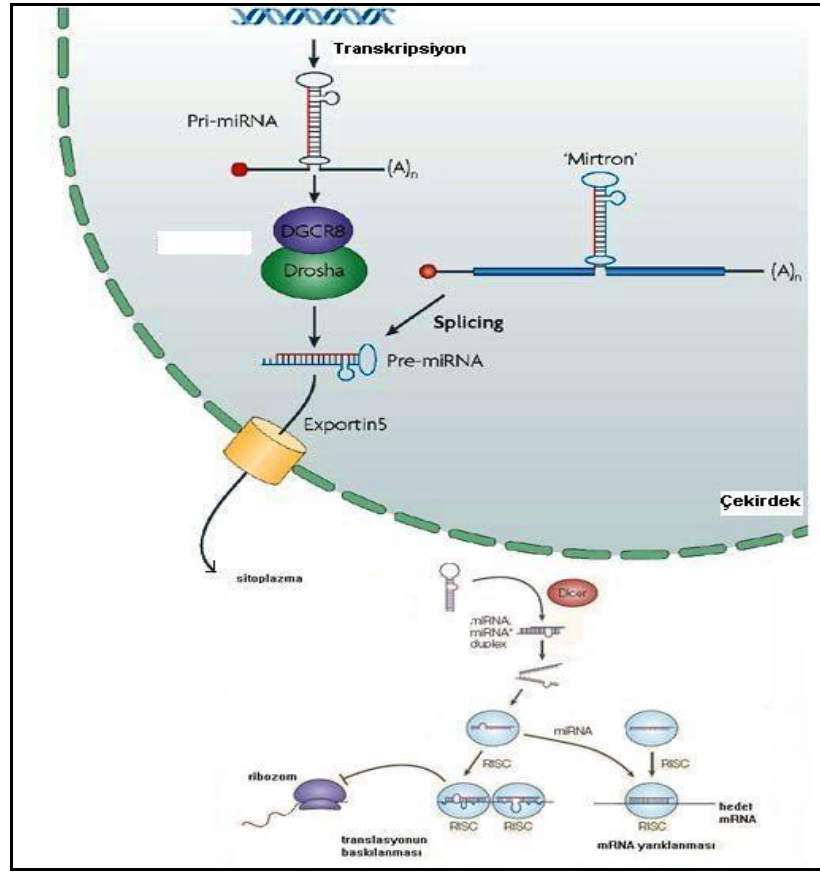
2.2.1. mikroRNA genleri ve yapısı

miR'lar diğerk genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen regülasyonunda görev alırlar. miR genleri Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda dağılmıştır (43).

2.2.2. mikroRNA'nın işlenmesi

miR genleri RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşturulan transkript “cap” ve poli(A) kuyruğuna sahiptir. Bu oluşan ilk transkript pri-miR olarak isimlendirilir. Bu pri-transkriptin olgun miR'ya dönüştürülmesi üç aşamada gerçekleşir (Şekil 1):

1. “Cropping”: pri-miR Drosha isimli enzim ile kesilerek pre-miR oluşturulur. 160 kD'luk bir nükleer Ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha yaklaşık 200 nükleotitlik pre-miR'nın yan kanat dizilerini keserek 70–80 nükleotitlik premiR'yı ortaya çıkarır.
2. Export (taşınma): Exportin -5 (exp5)/ranGTP ile pre-miR heterotrimerik yapı oluştururlar. Bu yapı pre-miR'nın yapısını stabilizeştirerek sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Zar deliklerinden geçip sitoplazmaya gelindiğinde RanGTP RanGDP'ye hidrolize olarak pre-miR'nın serbest kalması sağlanır.
3. Dicing: pre-miR RNaz III Dicer tarafından 18-22 nükleotitlik miR'ya dönüştürülür. (43).

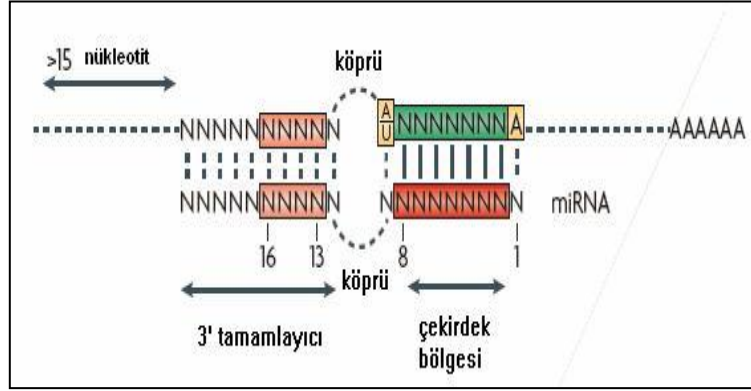


Şekil 1. miR'nın işlenmesi (Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? 2008. Nat Rev Genet.'den modifiye edilmiştir)

2.2.3. mikroRNAların Çalışma Prensipleri

miR'lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. mRNAların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak bu mRNAların degradasyonunu sağlar veya traslasyona uğramalarını engellerler (Şekil 1 ve 2).

Hücrede bilinen mRNAların yaklaşık %50'sinin bu miR'ların hedefi olduğu bilinmektedir (44). Bu bilgiye dayanarak miR'ların birçok hücresel olayda görevli olduğunu söyleyebiliriz. miR'lar ilk olarak gelişim ve farklılaşmadaki rolleriyle ortaya çıkarılmıştır. Şu an kanser dahil birçok hastalıkta rolleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (45).



Şekil 2. miR ve mRNA'nın 3' UTR bölgesinin baz eşleşmesi (43)

2.2.4. mikroRNA tek nükleotit polimorfizmleri

İnsan genomundaki tek nükleotit değişiklikleri (SNPs) ve kopya sayısı değişiklikleri (CNVs) çeşitliliğin temel sebepleridir. SNP'ler genomda dağılmışlardır ve miR genomik bölgelerinde de bulunmaları kaçınılmazdır. Bu fikir ile 2005 yılında miR'ların genomik dizilerindeki varyasyonların araştırılması amacıyla 173 miR'nın genomik dizisi dizilenmiştir. Pre-miR bölgelerine ait 10 polimorfizm bildirmişlerdir (46). miR genomik dizisindeki varyasyonlar bulundukları bölgeye göre, miR'nın işlenmesini veya hedef seçimini değiştirebilir (47). Duan ve ark. yaptıkları çalışma miR-125a genomik bölgesindeki bir polimorfizmin pri-miR işlenmesini engellediği için pre-miR miktarını azalttığını ortaya koymuştur (48). miR genomik dizilerinde bulunan polimorfizmler ile ilgili bağlantı çalışmaları da sınırlıdır. Arisawa ve ark. miR-27a genomik bölgesindeki bir polimorfizm ile erkeklerde gastrik mukozal atrofi arasında bağlantı kurmuşlardır (49). Hu ve ark. küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde miR-196-a2 genomik dizisindeki bir polimorfizmin hem olgun miR miktarını artırdığını hem de hedef transkriptine bağlanma kuvvetini değiştirdiğini, bu nedenle de hastalıkla anlamlı şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır (50). Yine Hu ve ark. miR-196-a2 ve miR-499'da bulunan polimorfizmlerin meme kanserinde artmış riske sebep olduğunu bildirmişler ve bu miR'ların hedef genlerinin de meme kanserinde önemli rol oynamaları ile mekanizmayı açıklamışlardır (51).

2.2.5 miR'ların lipid metabolizmasındaki rolü

Lipid damlacıkları hücre içerisinde lipid depolanması ve dağıtımından sorumlu organeller olarak görev görmektedir. LD fosfolipid bir tabaka ile sarılıdır ve ağırlıklı trigliserid ve sterol esterlerinden oluşan nötral lipid bir merkezden oluşur. Bu fosfolipid tabakada LD'nın içine ve dışına lipid hareketini düzenleyen ve LD ile hücre içi organeller arası bağlantıyı sağlayan proteinler yer almaktadır. LD'nın hücrede lipid birikimine yanıt olarak endoplazmik retikulumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. LD adiposit, myosit ve lökosit gibi hücrelerde doğal olarak bulunur. LD'nın hepatositlerde birikmesi (hepatik steatoz) metabolik sendrom, tip 2 diabetes, hepatitis C, alkolik karaciğer hastalığı ve NAFLD gibi hastalık durumlarıyla ilişkilidir. Karaciğer esas itibarıyla lipidlerin lipoprotein olarak paketlenmesi ve dağılımından sorumludur. Normalde hepatositler enerjiyi büyük lipid damlacıkları şeklinde değil de glikojen olarak depolarlar. Hepatositlerde patolojik lipid birikimi artmış serbest yağ asit alımı, de novo lipogenez, lipoprotein eksportunun azalması, serbest yağ asit oksidasyonunun azalması ile oluşmaktadır (52).

Hepatik steatoz gelişiminde iç içe geçmiş ve karmaşık mekanizmalar rol almaktadır. İnsülin direnci periferik yağ dokusunda dolaşımda serbest yağ asitlerinin artışına yol açarken, hepatositlerde insülin direnci birçok mekanizmanın değişmesiyle hepatik steatoza yol açmaktadır. Bu değişikliklerden biri peroksizomal ve mitokondrial β oksidasyonu inhibe eden PPAR- α düzeyinin azalmasıdır. Ters etki olarak hepatik steatoz PPAR γ düzeylerinde artışa yol açar. Bununla birlikte lipogenik proteinler ve de novo lipogenez artar. Obezite ilişkili hepatik steatozun gelişmesi sterol respons element bağlayıcı protein, karbohidrat respons element bağlayıcı protein ve karaciğer X reseptörü gibi lipogenezde görevli transkripsiyon faktörlerinde artış ile ilişkilidir (52).

miR'lar gen ekspresyonunda görevli küçük RNA'lardır. miR'lar gen ekspresyonunu translasyon aşamasında düzenlerler ve bir miR türü birçok genin regülasyonunda rol alabilir. Bu regülasyonu genlerin mRNA gibi transkript ürünlerini baskılayarak yaparlar. Farklı hastalıklarda saptanan değişmiş miR düzeyleri, hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde miR'ların etkin olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu gözlemler miR'ların hastalıkların tanı veya tedavisinde kullanılabileceğini veya tedavi hedefi olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir. Karaciğer hastalıklarında özellikle kanserlerinde potansiyel kullanımı konusunda birçok çalışma yapılmış ve

hastaların serum miR düzeyleri değiştirilerek hepatoselüler karsinom ile mücadele edilebileceği belirtilmiştir (53). Bu çalışmada hepatoselüler karsinom hücrelerinde miR-26a ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirtilmiştir. İn vitro olarak hepatoselüler kanserli hücrelere bu miR verildiğinde hücrelerin çoğalması durdurulmuştur. Fare modeline sistemik olarak verildiğinde toksik etki göstermeden kanser hücre proliferasyonunu azalttığı, tümör spesifik apoptozu indüklediği gözlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda NAYKH olan hayvan ve insanlardan alınan karaciğer örneklerinde yaklaşık 100 kadar miR'nin düzeyi farklı saptanmıştır. Fakat bu çalışmalar miR'ların NAYKH gelişiminde direkt rol aldığını göstermemiştir (19,20). İnsan hepatosit hücre dizinlerinde hücre içi lipid birikimini düzenleyen miR'ları saptamak için bir çalışma yapılmıştır (52). Bu çalışmada 11 miR'nin hücre lipid düzeylerine etkisi saptanmış ve en potent olarak miR-181 ailesinden miR-181d'nin kontrol düzeylerine göre hücre içi lipid damlacıklarını %60 oranında azalttığı saptanmıştır (Hücre kültürlerinde yapılmış bir çalışma, nafld de bu miR azalmış ve ortama eklenince bu etkileri oluşturmuş). Ayrıca miR-181d'ye yanıt olarak hepatositlerde hücre içi trigliserid ve kolesterol esterlerinin düzeylerinde sırasıyla %30 ve %75 oranında düşme gözlenmiştir. miR-181d'nin bu etkisi göz önüne alındığında yağlı karaciğer hastalığının tedavisinde önemli bir yer edinebileceği belirtilmiştir(52).

Yağlı karaciğer hastalığının merkezinde rol alan lipid ve kolesterol metabolizmasında görevli miR-122'nin NASH hastalarında karaciğer dokusunda ekspresyonu azalmaktadır (20). miR-122 yağ asit sentetaz (FAS), HMG CoA redüktaz (HMGCR), sterol yanıt elementi bağlayıcı protein 1c ve 2 (SREBP-1C, SREBP-2) gibi lipid ve kolesterol metabolizmasında görevli genlerin mRNA'larını hedef almaktadır (20). Farelerde yapılan bir çalışmada miR-122 inhibisyonu bir çok lipojenik geni azaltarak hepatik steatozda ve serum kolesterol düzeylerinde anlamlı düşüş sağlamıştır (54). İnsan hücre kültürlerinde miR-122 sentezinin artmasıyla FAS, HMGCR, SREBP-1C, SREBP-2 gibi genlerin protein düzeylerinin azalmasına yol açmaktadır. Bu da miR-122'nin bu proteinlerin mRNA'larının parçalanmasında rol aldığını düşündürmektedir. Sonuç olarak miR-122 ekspresyonunun azalması NASH patogenezinde lipid metabolizmasını etkileyerek rol almaktadır (20).

Yüksek serbest yağ asidi ile kültüre edilen insan hepatosit hücrelerinde miR profilleri araştırılmış ve miR-10b'nin hücrelerdeki lipid birikimini ve trigliserid seviyelerini

düzenlediği saptanmıştır. Artmış miR-10b düzeyleri hücre içerisinde lipid ve trigliserit birikimini artırmıştır. Bu düzenlemeyi NAYKH patogenezinde rol oynayan PPAR- α protein ekspresyonunu azaltarak yaptığı anlaşılmıştır. Yeni saptanan miRNA-10b-PPAR- α yolağı NAYKH patogenezinde yeni bir ipucu sağlamıştır ve bu mekanizmanın gelecekte NAYKH tedavisinde ilaç hedefi olabileceği belirtilmiştir (55).

NAYKH patogenezinde miR-34a ve miR-146b hakkında geniş bir bilginiz olmamasına rağmen Cheung O ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada NAYKH olan insan karaciğer dokusunda normal popülasyona göre bu miR'lar anlamlı yüksek saptanmıştır (20). Farelerle yapılan bir çalışmada miR-34a'nın lipid ve glukoz metabolizmasında yer aldığına dair bulgular elde edilmiştir (56).

2.2.6 miR'ların karaciğer fibrozisindeki rolü

NAYKH patogenezinde visceral beyaz yağ dokusundan kaynaklanan adipokin ve sitokinler önemli rol almaktadır. NASH hastalarının beyaz yağ dokusunda kontrollere göre miR-197 ve miR-99 düzeylerinde anlamlı azalma saptanmıştır. Bu miR'lar NASH hastalarında periselüler fibrozis ile ilişkili bulunmuştur (57).

Fare ve insanlarda yapılan bir çalışmada miR-29 ailesinin karaciğer fibrozisi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Farklı hastalıklara ait karaciğer eksplantları kullanılarak yapılan bu çalışmada düşük serum miR-29a düzeyleri ileri evre siroz ile ilişkili bulunmuştur (58). Başka bir çalışmada miR-29'un fibrozisde görevli kollojen, fibrillin ve elastin gibi proteinlerin mRNA'larını hedef aldığı belirtilmiştir. Miyokart enfarktüsü olan kardiyak alanlarda miR-29'un azaldığı görülmüş ve miR-29'un fibroblastlar üzerinden kollejen sentezini azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca miR-29'un genel olarak dokularda fibrozis için potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabileceği iddia edilmiştir (59).

2.2.7. miRNA'lar ve hastalıkların tanısında yeni biyomarkır

Serum ve plazma birçok doku ve organdan kaynaklanan stabil miR'lar içermektedir. Ayrıca idrar, gözyaşı, asit sıvısı ve amniyotik sıvı gibi birçok vücut sıvısında miRNA'lar bulunmaktadır. Serumdaki küçük nükleotid türlerinin büyük oranını miR'lar oluşturmaktadır. Bu miR'ların ekspresyon profilleri birçok hastalıkta yeni non-invaziv tanı aracı sunmaktadır. Serumdaki miR'lar RNAaz'ın parçalayıcı etkisine dayanıklıdır. Kaynatma, yüksek ve düşük pH, dondurma-erime döngüleri gibi koşullarda serum miR düzeyleri stabil kalmaktadır. Serum miR ekspresyon düzeyleri

aynı türün bireyleri arasında stabil ve aynı düzeyde kalmaktadır. Erkek ve kadın sağlıklı bireylerde serum miR profilleri arasında farklılık saptansada miR ekspresyon düzeyleri aynı kalmaktadır (45). miR'ların ekstraselüler ortamda yapılarını sürdürebilmelerinin yani RNAaz'ın parçalayıcı etkisinden kurtulabilmelerinin sebebi nanovezikül olarak adlandırılan bir çeşit koruyucu kılıfla intraselüler alandan ekstraselüler alana atılmaları olarak düşünülmüştür. Bu hücre dışına sekrete edilen miR'ların hücreler arası iletişimde rol alabildiği gibi dolaşıma geçerek dokular arası iletişimde de rol alabileceği belirtilmiştir (60).

Yapılan bir çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, kolon kanserinde ve diabetes mellitusda normal insanlardan farklı artmış serum miR profili saptanmıştır (45). Bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve kolon kanserli hastaların serumlarında birbirine benzer çok sayıda miR görülmüştür. Buradan yola çıkarak tümörögenizde rol alan ortak miR'ların olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada miR'ların serumdan elde edilebileceği ve hastalık tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca serum miR'larının sadece kan hücrelerinden kaynaklanmadığı ve süregelen hastalığın etkilediği diğer dokulara ait miR'larında serumda olabileceği gösterilmiştir (45). Başka bir çalışmada diffüz büyük B hücreli lenfomada miR-21'in potansiyel diagnostik biyomarkır olduğu ve artmış miR-21 düzeylerinin relapsız sağkalım ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (61). Mitchell ve arkadaşları artmış serum miR-141 düzeylerinin prostat kanserini sağlıklı insanlardan ayırt edebildiğini gösterdiler (62). Tüm bu çalışmalar miR'nin serumda stabil kaldığını ve hastalıkların tanısında kullanılabileceğini göstermektedir. Günümüzde karaciğer kanserlerinde AFP, inflamasyonda ve diabetes mellitusda CRP gibi serum kaynaklı bir veya birkaç biyomarkır kullanılmaktadır. Fakat bu testlerin sensitivite, spesifitelerinin yeterli olmaması tek başlarına kullanılmalarını kısıtlamaktadır. Bundan dolayı araştırmacılar gelecekte hastalıklara ait miR profillerinin (sadece bir veya birkaç adet miR değil) kişiye has tedavinin yönlendirilmesinde ve tanıda kullanılabileceğini belirtmektedirler (45).

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Çalışma grubu

Çalışmaya polikliniğimize başvuran, karaciğer testlerinde bozukluk nedeniyle değerlendirilen ve yapılan karaciğer biyopsileri ile son altı ay içerisinde NASH tanısı konan 18-70 yaş arası hastalar dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

1-Hastaların AST, ALT, AP veya GGT enzimlerinden bir veya birkaçı yüksektir.

2-Yapılan en az bir görüntüleme yönteminde (Batın ultrasonografisi, batın tomografisi, batın MR) yağlı karaciğer bulgusu mevcuttur.

3-Hastalarda yapılan viral hepatit ve otoimmün hepatit testleri negatiftir.

4-Çalışmaya alınacak gönüllü hasta grubunun alkol kullanım hikayesi sorgulanmıştır ve erkeklerde 30gr/gün, bayanlarda 20gr/gün'den az alkol kullananlar veya alkol kullanmayanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmada dışlama kriterleri:

1-Hepatotoksik ilaç kullanan hastalar.

2-Karaciğer enzimlerinde yükseklik yapabilecek metabolik karaciğer hastalıkları, α 1 antitripsin eksikliği, wilson hastalığı ve hemokromatozis gibi hastalıklar ayırıcı tanıda değerlendirilmiş ve dışlanmıştır.

3-Malignitesi, hipertansiyonu, diabetes mellitusu, renal fonksiyon bozukluğu ve proteinürisi olanlar

Kontrol grubunu karaciğer görüntülenme yöntemlerinde steatoz saptanmayan, karaciğer enzimleri normal olan sağlıklı gönüllüler oluşturmuştur. Çalışmaya yazılı onamı alınan NASH saptanan 20 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü alınmıştır.

3.2. Yöntem

Her iki grupta vücut kitle indeksi (VKİ), bel çevresi, kan basıncı ölçülmüştür. Hastaların kilo ve boy ölçümleri aralıklı kalibre edilen tartılarda ölçüldü ve kan basıncı ölçümleri standart civalı sfingomanometreler ile 5 dakika oturarak istirahatten sonra yapılmıştır. VKİ kg/m^2 şeklinde hesaplanmıştır. Hastalardan sabahleyin en az 12 saat açlık sonrası ön koldan venöz kan alınmıştır. Alınan kan örneğinden karaciğer enzimleri, lipit profili, tam kan sayımı, kan şekeri, insülin düzeyi ve miRNA düzeyleri çalışılmıştır. Hastaların insülin rezistansları HOMA-IR modeline göre şu formülle hesaplanmıştır: $\text{insülin düzeyi (mIU/L)} \times \text{açlık glikozu (mmol/L)} / 22.5$

Hastaların karaciğer biyopsileri aynı patoloji uzmanı tarafından NAYKH skorum sistemi olan NAS (NAYKH aktivite skoru) ile değerlendirilmiştir (63). Skorum sisteminde yağlanma oranı (0-3), hücre balonlaşma (0-2) ve inflamasyonun şiddeti (0-3) kullanılmıştır. Fibrozis (0-4) masson trikrom boyaması ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, karaciğer yağlanmasında etkisi olduğu saptanan ve karaciğer fibrozisi ile ilişkili yukarıda belirtilen miR'lerden miR-181d, miR-10b, miR-122, miR-34a, miR-146b, miR-197, miR-99a ve miR-29a'nın serum düzeyleri araştırılmıştır. Bu miR düzeyleriyle histopatolojik bulguların ve laboratuvar parametrelerinin ilişkisi değerlendirilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede steatozis evresi bir olanlar hafif, iki olanlar ise orta derece yağlanma olarak değerlendirilmiştir. İnflamasyonu bir olanlar hafif, iki ve üç olanlar ise orta-ileri derece olarak kabul edilmiştir. Balonlaşma derecesi bir-hafif, iki orta ve ileri olarak kabul edilmiştir. Fibrozis evresi 0-1 olanlar hafif, 2-3-4 olanlar ise belirgin fibrozis olarak kabul edilmiştir. Ayrıca NAS skorum sisitemine göre NAS skoru 3-4 olanlar sınırda NASH, NAS skoru 5-6-7 olanlar NASH kabul edilerek iki grup oluşturulmuştur. NAYKH'da bu oluşturulan gruplara göre istatistiki değerlendirmeler yapılmıştır.

Hastalardan alınan kan örnekleri dakikada 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra -70°C 'de saklanmıştır. Laboratuara götürülen örneklerden miR düzeyleri real time PCR yöntemi ile bakılmıştır.

3.3. miRNA Ekspresyonu

miRNeasy Mini Kit Kullanılarak Serum ya da Plazmadan miRNA'ları içeren Total RNA İzolasyonu (Kat. No: 217004):

1- Daha önceden alınmış ve dondurulmuş Serum/plazma örnekleri -80 °C'den +4 °C 'ye alınıp erimesi beklendi.

2- 200 µl plazma 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı. Üzerine 1000 µl QIAzol eklendi ve pipetaj yapılarak 5 dk beklendi.

QIAzol = Guanidine Thiocyanate + Phenol Solusyonu

3- Üzerine 200 µl kloroform eklenip 15 sn vortekslendi ve 2-3 dk oda sıcaklığında (15-25 oC)beklendi.

4- 15 dk 12000 g'de ve +4 °C 'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra örnek 3 faza ayrılır. Üstteki renksiz faza aköz faz (RNA'yı içerir), ortadaki beyaz faza interfaz ve en alttaki kırmızı faza organik faz denir.

5- Aköz faz dikkatle yeni bir ependorf tüpe taşındı. Özellikle interfazdan materyal alınmamaya dikkat edildi. Üzerine 900 µl %100'lük etanol pipetaj yapılarak eklendi.

6- RNA+Etanol'den oluşan solusyondan 700 µl 2 ml'lik kolonlu tüpe alındı. En az 10000 rpm'de (8000 g) 15 sn oda sıcaklığında (15-25 °C) santrifüj edildi.

7- Kalan RNA+Etanol solusyonu aynı kolonlu tüpe alınıp en az 10000 rpm'de (8000 g) 15 sn oda sıcaklığında (15-25 °C) santrifüj edildi.

8- Toplama tüpü atılıp yeni 2 ml'lik toplama tüpü takıldı. 700 µl RWT Wash Buffer eklenip en az 10000 rpm'de (8000 g) 15 sn santrifüj edildi.

9- Toplama tüpü atılıp yeni 2 ml'lik toplama tüpü takıldı. 500 µl RPE Wash Buffer eklenip en az 10000 rpm'de (8000 g) 15 sn santrifüj edildi. Bu evre iki kez tekrarlandı.

10- Kolonlar örnek isiminin yazılı olduğu 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı. 40 µl RNase free water eklenip en az 10000 rpm'de (8000 g) 1 dk santrifüj edildi.

cDNA Sentezi

1– 0,5 ml’lik bir tüpe gerekli solusyonlar aşağıdaki miktarlarda ve soğuk blok üzerinde eklendi;

miScript RT Buffer 5X	4 µl
RNase free water	5 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
RNA	10 µl

Son hacim 20 µl’ye tamamlandı.

2- 60 dk 37 °C

5dk 95 °C ’de inkübe edildi.(95 °C ’de miScript Reverse Transcriptase Mix inaktive edilmiş olur).

miRNA Ekspresyonu

miRNA ekspresyonlarını belirleyebilmek için SYBR gren floresan boyası ile Real Time PCR metodu yapılmıştır. Housekeeping gen olarak RUN1A1 geni kullanılmıştır.

1- cDNA’lar 1/3 oranında seyreltildi. Seyreltmek için izole edilen 20 µl cDNA üzerine 40 µl distile su eklenip vortekslenildi.

2- Reaksiyona eklenen cDNA hacmi toplam reaksiyon hacminin %10’unu geçmemelidir. 1-3 ng cDNA olmalıdır.

3- Gerekli olan solusyonlar aşağıdaki miktarlarda ve soğuk blok üzerinde 0,5 ml’lik tüplere eklendi;

2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Kat. No: 218075)	25 µl
*10X miScript Universal Primer (R)	5 µl
*10X miScript Primer Assay (F)	5 µl
RNase free water	10 µl
cDNA	5 µl

4- Son hacim 50 µl 'ye tamamlandı.

*10X miScript Universal Primer (R) ve 10X miScript Primer Assay (F) hazırlanırken 550 µl TE'de (Tris-EDTA) pH= 8 'de çözüldü.

miScript PCR Kontrol (Kat. No: 218380) hazırlanırken 275 µl TE'de (Tris-EDTA) pH= 8 'de çözüldü.

5- 5 µl cDNA 0,5 ml'lik tüplere eklendikten sonra Rotorgene Real-Time PCR cihazına yerleştirdi.

5dk 95°C

15sn 95°C

30 sn 55°C

30 sn 70°C

40 döngü sürer.

• Bu projede her bir örneğin için 8 farklı miRNA ekspresyonu çalışıldı. Ayrıca miScript PCR Kontrol kullanılarak her bir örneğin kontrol çalışması yapıldı. Eğer miRNA ekspresyon çalışması yapılıyorsa;

2X Quantitect SYBR Green Mix	25 µl
10X miScript Universal Primer (R)	5 µl
**10X miScript Primer Assay (F)	5 µl
RNase free water	10 µl
cDNA	5 µl

Housekeeping gen olarak RUN1A1 geni kullanıldı. Her bir örnek housekeeping kontrol ile birlikte çift çalışıldı.

Elde edilen CT değerlerine $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu uygulandı.

3.4. İstatistik Değerlendirme

Klinik verilerin istatistiksel analizi için, Shapiro-Wilk testi ve histogram, q-q grafikleri ile verilerin normal dağılıma uygunlukları incelendi. Buna göre nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmasında iki-yönlü bağımsız iki örneklem t testi veya Mann-Whitney U testi, nitel değişkenlerde Ki-kare analizleri kullanıldı. Verilerin gösteriminde

frekans ve yüzde, ortalama±standart sapma veya medyan ve 25.-75. persantiller kullanıldı. Bu kullanım verilerin normallik durumuna ve değişken tiplerine göre belirlendi.

miRNA ekspresyon verilerinin analizi 2^{ΔΔ} CT metoduna göre değerlendirildi (bakınız miRNA değerlendirmesi bölümü). Verilerin ön istatistiksel analizlerine ek olarak logaritmik dönüşüm uygulandı, daha sonra genler izleyen şekilde standartlaştırıldı: [değer-ortalama(gen)/standart sapma(gen)]. NAFLD ve kontrol grupları arasında ekspresyonu farklı olan miRNA'ları bulmak için t testi kullanıldı. Ayrıca Significant analysis of Microarrays analizi 100 kez tekrarlanarak farklı ekspresyonların tesadüfi olup olmadığı test edildi. Farklı ekspresyona sahip miRNA'lara ortalama bağlantı birleştirme yöntemi ve Pearson korelasyon analizi kullanılarak birleştirici hiyerşik kümeleme yöntemi uygulandı ve birimler ile farklı ekspresyona sahip miRNA'ların veri değerlerini aynı anda hiyerşik bir veri yapısında görmek için heatmap grafikleri çizildi. Yine farklı ekspresyona sahip miRNA'lar için ROC eğrileri çizildi, eğri altında kalan alanları %95 güven düzeyinde hesaplandı ve birbirleri ile karşılaştırıldı. Ayrıca NAFLD hastalarında laboratuvar parametreler ile miRNA'lar arasındaki ilişkinin araştırılmasında Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

Klinik veriler ve miRNA ekspresyon verilerinden elde edilen tüm p değerleri çoklu test problemini kontrol etmek için False Discovery Rate (FDR) ile düzeltildi. Tüm yapılan analizler için R 2.14.0 programının çeşitli paketlerinden yararlanıldı.

4. BULGULAR

Hastaların ve kontrol grubunun demografik ve laboratuvar bulguları tablo 1’de verilmiştir. Çalışmaya sistemik hastalığı olmayan 40 gönüllü dahil edilmiştir. Yirmi gönüllüden oluşan hasta grubunun yaş ortalaması 42.75 (minimum 30- maksimum 61) olarak bulunurken, sağlıklı gönüllülerin oluşturduğu kontrol grubunun yaş ortalaması 44.5 (minimum 32-maksimum 60) olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarında 9 erkek ve 11 kadın gönüllü mevcuttur. Her iki grup arasında yaş ve cinsiyet açısından bir farklılık görülmemiştir. Yapılan değerlendirmede NAYKH olan hasta grubunda kontrol grubuna göre bel çevresi ve VKİ anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0.05$). Her iki grup arasında sistolik ve diastolik kan basınçları açısından bir farklılık görülmemiştir. Çalışmamıza diabetik hastalar alınmamış olsa da NAYKH grubunda kan glukoz düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Her iki grupta lipit profilleri arasında bir farklılık görülmemiştir. Hasta grubunda insülin direnci anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). NAYKH olanlarda sağlıklı gruba göre AST, ALT ve GGT düzeyleri daha yüksekti ($p<0.05$).

NAYKH olanların oluşturduğu hasta grubu ve sağlıklı gönüllüler tarafından oluşturulan kontrol grubu arasında serum miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. NAYKH’da patolojik bulgularıyla ilişkilendirilen 8 miRNA türünden 4 tanesinin serum ekspresyonları farklı saptanmıştır. Yapılan değerlendirmede miR-197, miR-99a, miR-146b ve miR181d sağlıklı gruba göre serumda anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p<0.05$). Serumdaki miR düzeylerinin hasta ve kontrol grupları arasındaki değişimi şekil 3’de verilmiştir. Farklı ekspresyona sahip miRNA’lara heatmap grafikleri çizildi (şekil 4). Yine farklı ekspresyona sahip miRNA’lar için ROC eğrileri çizildi, eğri

altında kalan alanları %95 güven düzeyinde hesaplandı ve birbirleri ile karşılaştırıldı (şekil 5). Ayrıca yapılan hesaplamalarda hastalarda kontrollere göre miR-197'nin 1.61 kat, miR-146b'nin 1.52 kat, miR-181d'nin 2.49 kat ve miR-99a'nın 1.92 kat azaldığı saptanmıştır. Bu veriler tablo 2 de verilmiştir.

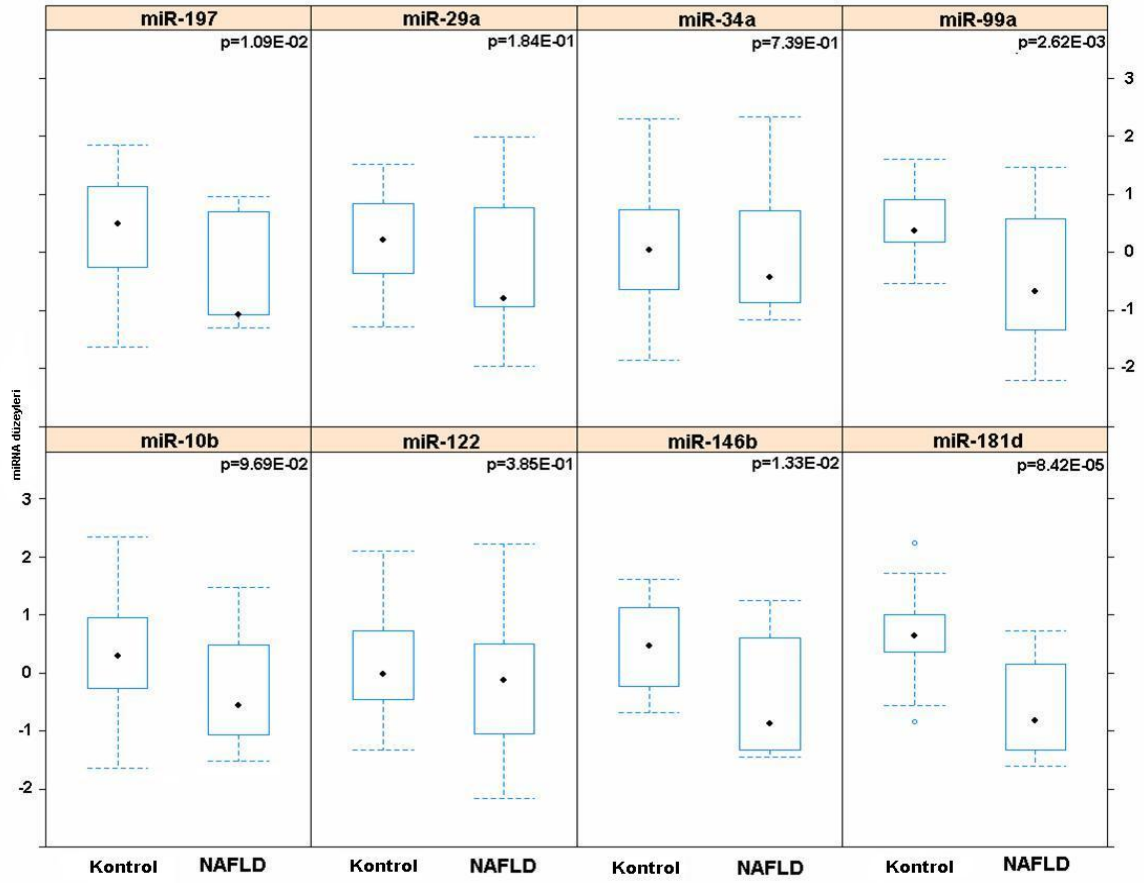
Hastaların laboratuvar ve miR düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı incelendi. Yapılan korelasyon analizlerinde serum miR181d ve miR99a ekspresyon düzeyleri hastaların GGT düzeyleriyle negatif korele bulundu. Korelasyon analizleri tablo 3'de verilmiştir.

Hastalar yapılan histopatolojik değerlendirmelerinde yukarıda yöntem kısmında belirtilen açıklamalara göre gruplara ayrılmıştır. Hafif dereceli steatoz 12 (%60) hastada varken, orta dereceli steatoz 8 (%40) hastada görülmüştür. İnflamasyon 6 (%30) hastada hafif derecedeyken, 14 (%70) hastada orta ve ileri derece olarak görülmüştür. Balonlaşma 15 (%75) hastada hafifken, 5 (%25) hastada orta ve ileri dereceliydi. Hastalardan 12 (%60) tanesi NAS skorumlama sistemine göre sınırda NASH kabul edilirken geri kalan 8 (%40)'ı NASH olarak kabul edilmiştir. Fibrozis 12 (%60) hastada hafif olarak bulunurken , 8 (%40) hastada belirgin olarak bulunmuştur (Tablo 4). Hasta grubunda steatozis evresi, inflamasyon derecesi, balonlaşma düzeyleri, NAS skorları ve fibrozis evreleriyle serum miR ekspresyon düzeylerinin ilişkisi değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmede miR-197 ve miR-10b inflamasyon derecesi ile anlamlı ilişkili bulunmuştur ($p<0.05$). İnflamasyonun derecesi hafifden orta ve ileri dereceye ilerledikçe miR-197 ve miR10b'nin ekspresyon düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Hastaların balonlaşma, steatozis, fibrozis, NAS skorları ve serum miR düzeyleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

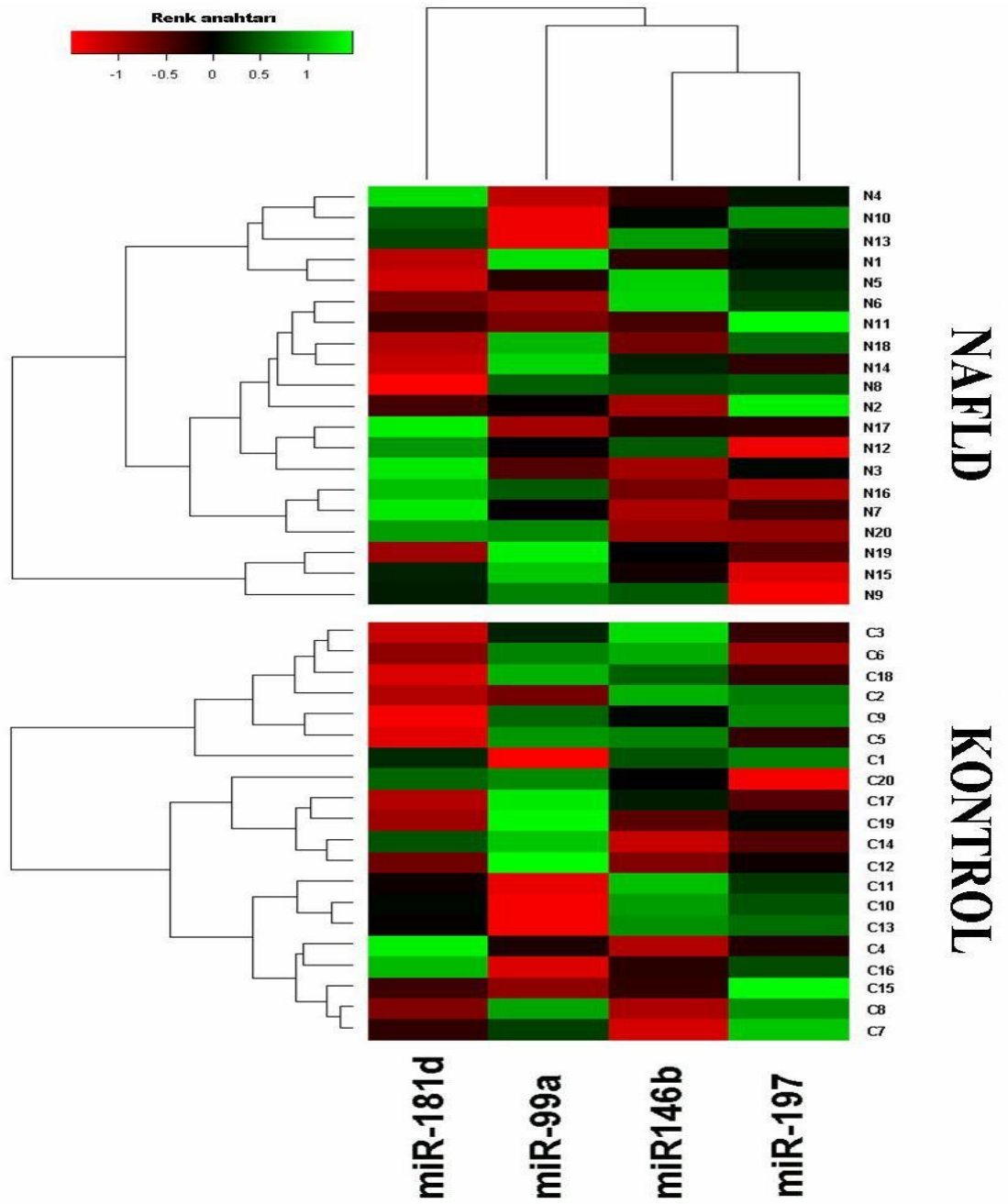
Tablo 1. NAFLD ve kontrol gruplarında hastaların klinik ve demografik verileri

Değişkenler	NAFLD (n=20)	Kontrol (n=20)	p
Yaş (yıl)	42.75±8.17	44.50±9.31	0.761
Cinsiyet (erkek/bayan)	9(45.0)/11(55.0)	9(45.0)/11(55.0)	0.761
BMI (kg/m ²)	31.86±4.76	27.26±3.07	0.006
Bel çevresi (cm)	103.25±13.65	90.75±11.02	0.014
Sistolik kan basıncı (mmHg)	120.25±8.66	120.25±7.69	0.999
Diastolik kan basıncı (mmHg)	76.50±6.09	77.50±8.96	0.761
Açlık glukozu (mg/dl)	97.85±13.88	86.80±11.92	0.034
Trigliserit (mg/dl)	151.10±65.06	167.70±51.46	0.645
HDL-kolesterol (mg/dl)	43.00(36.50-48.50)	45.00(38.45-49.95)	0.761
LDL-Kolesterol (mg/dl)	125.50(100.00-139.00)	108.00(89.25-121.25)	0.511
İnsulin (mIU/ml)	14.81(11.88-22.75)	11.76(8.61-15.70)	0.229
HOMA-IR	4.05(2.71-5.51)	2.21(1.77-3.12)	0.034
Total bilirubin (mg/dl)	0.65(0.50-0.80)	0.60(0.55-0.80)	0.761
Direct bilirubin (mg/dl)	0.20(0.12-0.25)	0.20(0.10-0.20)	0.761
AST (ıu/l)	45.00(34.50-59.00)	21.00(18.00-27.00)	<0.001
ALT (ıu/l)	68.50(52.50-85.50)	18.50(14.00-29.00)	<0.001
AP (ıu/l)	76.00(55.50-96.00)	69.00(57.00-78.50)	0.761
GGT (ıu/l)	48.00(33.00-73.00)	20.00(14.50-33.00)	<0.001
Kreatinin (mg/dl)	0.87±0.15	0.80±0.18	0.401
Lökosit (μl)	6709.50±1709.47	6618.00±1425.37	0.892
Trombosit (10 ³ / μl)	252.10±64.85	275.90±69.82	0.511
Hematokrit	43.37±3.53	44.25±4.19	0.761

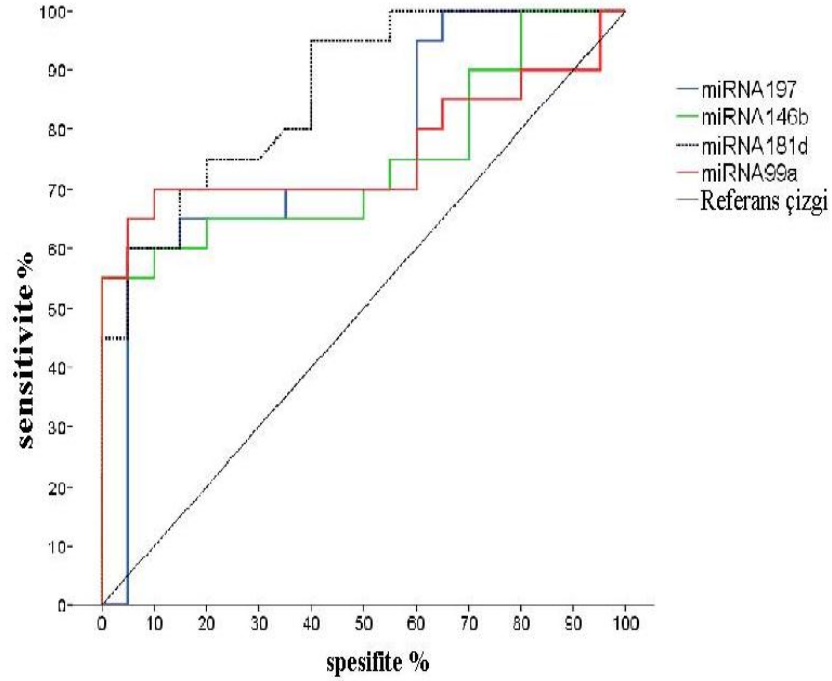
Verilerin gösteriminde frekans ve yüzde, ortalama±standart sapma veya medyan ve 25.-75. persantiller kullanıldı. p değerleri çoklu test problemini kontrol etmek için FDR ile düzeltildi.



Şekil 3 . Sekiz miRNA'nın hasta ve kontrol grupları arasında ekspresyon değerleri Box plotlar ile gösterilmiştir. Orta hat median istatistiği, kutuların alt ve üstleri 25. ve 75. persantilleri, alttaki ve üstteki çizgiler aykırı değerler (daireler) çıkarıldıktan sonra minimum ve maksimum değerleri göstermektedir. p değerleri iki-yönlü bağımsız iki örneklem t testi ile elde edilmiştir ve FDR ile düzeltilmiştir.



Şekil 4. Farklı ekspresyona sahip miRNA'ların veri değerlerini aynı anda hiyerarşik bir veri yapısında görmek için heatmap grafikleri verildi. Parlak kırmızı: negatif yönde ekspresyonu, siyah: değişiklik yok, parlak yeşil: pozitif yönde ekspresyonu göstermektedir.



Şekil 5. NAYKH saptamada miR-197, mir-146b, mir-181d ve mir-99a'nın ROC eğrileri altında kalan alanların karşılaştırması. ROC eğrileri altında kalan alanların değerleri sırasıyla 0.77(0.60-0.88), 0.75(0.59-0.87), 0.86(0.72-0.95), 0.76(0.60-0.88) saptandı ve herhangi iki miRNA arasında istatistiksel bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 2. t testi ile anlamlı çıkan daha sonra SAM testi ile doğrulanan ($q< 5\%$) farklı ekspresyon oranları gösteren miRNA'ların $\log_2$ (Kat değişim) oranları ($p< 0.05$)

miRNA'lar	$\log_2$ (Kat değişim)		q value (%)
	Ortalama	S.H.	
Pozitif yönde eksprese			
-	-	-	-
Negatif yönde eksprese			
miR-197	-1.61	0.54	0
miR-146b	-1.52	0.55	0
miR-181d	-2.49	0.50	0
miR-99a	-1.92	0.53	0

SAM analizi sonucunda elde edilen q değerlerinin %5den küçük olması t testinde $p<0.05$ 'e tekabül etmektedir. S.H.: Standart hata

Tablo 3. NAYKH’da laboratuvar parametler ve miRNA’lar arasında korelasyon analizleri

	miR-197	miR-146b	miR-10b	miR-181d	miR-34a	miR-122	miR-99a	miR-29a
AST	-.257	-.331	-.225	-.252	-.084	-.225	-.138	-.322
ALT	-.131	-.147	-.080	-.215	.122	.103	.077	-.143
GGT	-.327	-.225	-.303	-.464(*)	-.290	-.231	-.479(*)	-.221
TG	.008	-.039	.009	-.035	-.075	.087	-.239	-.058
HDL	.027	.051	-.031	.042	.052	.111	.160	.034
LDL	.078	.042	.067	.015	.139	.102	.213	.155
HOMAIR	-.055	.117	.011	-.015	.195	.205	.221	.177

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü).

Tablo 4. NAYKH olan 20 hastanın histopatolojik özellikleri

Özellikler	Non-alkoholik steatohepatit, n (%)
NAS skoru	
3-4	12 (%60)
5-8	8 (%40)
Steatoz derecesi	
% 5-33 (steatosis grade 1)	12 (%60)
> % 33 (steatosis grade 2-3)	8 (%40)
Hepatoselüler balonlaşma	
hafif (grade 1 balonlaşma)	15 (%75)
Orta-ileri (grade 2 balonlaşma)	5 (%25)
Lobüler inflamasyon	
hafif (grade 1 lobüler inflamasyon)	6 (%30)
Orta-ileri (grade 2-3 lobüler inflamasyon)	14 (%70)
Fibrozis	
0-1	12 (%60)
2-4	8 (%40)

5. TARTIŞMA

NAYKH alkol, steatoza yol açan ilaçlar ve hereditör hastalıklar olmadan karaciğerde yağlanma görülmesidir. Basit steatoz genelde benign kabul edilsede, steatohepatit siroz ve karaciğer kanserine ilerleyebilmektedir. Günümüzde birçok kriptojenik sirozda etyolojinin NAYKH olduğu düşünülmektedir. Hastalığın sıklığı giderek artmaktadır ve ciddi sağlık problemidir. Optimal tedavi henüz diet ve egzersiz dışında yoktur. Erken tanı ve tedavi giderek yaygınlaşan bu hastalıkta önem arzetmektedir.

NAYKH tanısında altın standart perkütan karaciğer biyopsisidir. Karaciğer biyopsisinde, işleme bağlı komplikasyonlardan kanama ve ağrı, hatalı örnekleme sonucu eksik patolojik değerlendirme, biyopsilerin değerlendirilmesinde patoloğlar arası farklılıklar oluşabilmektedir (8,9). Tüm bunlardan daha önemlisi hastalar perkütan karaciğer biyopsisini kabul etmekte zorlanmaktadır. Karaciğer biyopsisinin uygun hastalara yapılmaya çalışılmasında bazı hastalarda tanı gecikmelerine yol açmaktadır. Serum aminotransferaz düzeyleri, ultrasonografi, BT ve MR gibi görüntüleme yöntemleri NAYKH'da steatohepatit ve fibrozisi değerlendirmede güvenilir değildir. Tüm bu kısıtlamalar ve klinik pratikte karşılaşılan sorunlar nedeniyle karaciğer hastalıklarında non-invaziv tanı yöntemleri gündeme gelmiştir.

Hepatik fibrozis için geliştirilen non-invaziv tanı testi olarak kullanılan FibroTest total bilirubin, haptoglobulin, gama glutamil transpeptidaz, alfa2-makroglobulin ve apolipoprotein A'dan oluşan bir paneldir. Hemoliz, Gilbert sendromu, sistemik inflamasyon gibi durumlardan etkilenmektedir. Sadece F4 evresindeki (siroz) hepatit C hastalarında mükemmel sonuçlar alınmıştır. Ara evre fibrozisde başarılı bulunmamıştır. Bu test için diğer karaciğer hastalıklarında ek çalışmalara gerek vardır (64). Bir diğer

test NAYKH fibrozis skorudur. Bu testte yaş, BMI, hiperglisemi, platelet sayısı, albumin ve AST/ALT oranı kullanılmaktadır. Ayrıca geliştirilmiş karaciğer fibrozis (ELF) panelide mevcuttur. Bu testte matriks proteinlerinden hıyalüronik asid, TIMP-1 ve PIIINP gibi proteinler kullanılmaktadır. Tüm bu testler ilerlemiş fibrozis evresinde faydalı olmaktadırlar, erken evre fibrozis ve NASH hastaların belirlenmesinde sensitivite ve spesifiteleri düşüktür (65). Serumda sitokeratin 18 parçalarının NAYKH'da steatohepatit ayırıcı tanısında %78 sensitivite ve %87 spesifitede kullanılabileceği belirtilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda farklı üst limitler kullanılmıştır ve steatohepatit için belirlenmiş bir limit değeri yoktur. Transient elastografi ileri evre fibrozislerde faydalı olabilir fakat obezlerde yanlışma payı yüksektir. MR elastografinin de ileri evre fibrozisde kullanılabileceği belirtilmiştir fakat bu konuyla ilgili çalışmalar sınırlıdır (65).

miR'lar non-invaziv tanı testi olarak kullanılabilir. Serum ve plazma birçok doku ve organdan kaynaklanan stabil miR'lar içermektedir. Bu miR'ların ekspresyon profilleri birçok hastalıkta yeni non-invaziv tanı aracı sunmaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, kolon kanserinde ve diabetes mellitusda normal insanlardan farklı serum miR profilleri saptanmıştır (45).

Hepatokarsinogeneizde karaciğerde miR değişiklikleriyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. miR 148a'nın hepatit B'ye bağlı hepatoselüler karsinomda (HCC) rol aldığı, terapötik hedef olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (68). miR-222, miR-224, miR-10b ve miR-21'in HCC'de arttığı, miR-223 ve miR-203'ün HCC'de azaldığı gösterilmiştir. HCC metastazında ve prognozunda bazı miR'ların rol aldığı belirtilmiştir (69). Hepatit C'ye bağlı HCC'de miR-122, miR-100 ve miR-10a fazla eksprese edilirken, miR-198 ve miR-145 normal karaciğer dokusuna göre 5 kat daha az eksprese edilmektedirler. Bu miR'ların tümör süpresör veya onkogenik düzenleyici olarak rol aldıkları düşünülmüştür (70).

Daha önceki çalışmalarda NAYKH'da rol alan adiposit diferansiyasyonu, lipid metabolizması ve glikoz bağımlı insülin sekresyonu gibi temel metabolik yollarda miR'ların etkin olduğu görülmüştür (54,71,72). Bu çalışmalardan yola çıkılarak NAYKH ile miRNA ilişkisini gösteren ilk çalışma sıçanlarda yapılmış ve 2009 yılında yayınlanmıştır (19). Bu çalışmada normal doku, basit steatoz ve steatohepatitli sıçan karaciğer dokularında miR paterni incelenmiştir. Hastalığın progresyonuna bağlı olarak

miR29c ve miR122 nin arttığı görülmüştür. Alınan karaciğer dokularında steatozun steatohepatitten miR profili ile ayrılabilceğı ama doku örneğı alındıktan sonra daha ucuz ve altın standart olan patolojik incelemenin daha mantıklı olacağı belirtilmiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarla serum miR'ları kullanılarak non-invaziv tanı yöntemleri geliştirilmesinin mümkün olabileceğı belirtilmiştir. Ayrıca hastalıkların patogeneğinde sorumlu olabileceğı düşünölen miR'lara karşı anti-miR'lar geliştirilerek kanser ve diğör hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğı belirtilmiştir. Bu aşamada karşımıza çıkan en önemli sorunun hastaya verilen anti-miR'ların plazmada parçalanması ve uygun hedef bölgesine gidememe riskidir. Bu riskinde viral vektörlerle aşılabilceğı belirtilmiştir.

İnsanlarda NAYKH'da miR ile ilgili yapılan ilk çalışmada karaciğer dokusunda değörlendirilen 474 miR'dan 46 tanesinde farklı ekspresyon paterni saptanmıştır (20). Bunlardan 23 tanesi fazla eksprese edilirken, 23 tanesinde kontrol grubuna göre ekspresyon miktarında anlamlı azalma görölmüştür. Bu çalışmada miR-34a ve 146b fazla ekprese edilirken, yağlı karaciğör hastalığının merkezinde yer alan lipid ve kolesterol metabolizmasında rol alan miR122'nin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Bu miR'ların ekspresyon düzeyleri histolojik hasar ile korele bulunmamıştır. Farklı ekspresyon paterni gösteren miR'ların muhtemel hedef genleri daha önceki bilgi bankaları kullanılarak belirlenmiştir ve bu hedef genler arasında apoptozis, hücre sel büyüme ve diferansiyasyon, inflamasyon ve metabolizmada rol alan proteinler olduğı saptanmıştır. Tüm bu belirlenen hedefler NAYKH gelişim ve patogeneğinde rol almaktadır. Bazı miR'ların 40'ın üzerinde hedef proteini olduğı belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca miR-122'nin hedefinde yer alan mRNA ve anahtar lipogenik protein ürünleri (FAS, HMGCR, SREBP-1c, SREBP-2) insan hepatosit kültürlerinde çalışılmış ve SREBP-1c, FAS ve HMGCR gibi proteinlerin mRNA düzeylerinin NAYKH'da arttığı görölmüştür. İnsan hepatosit kültürlerinde miR122 azaltıldığında bu proteinlerin düzeylerinin arttığı görölmüş ve miR122 ekspresyonu arttığında bu proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada sonuç olarak NAYKH'da hepatik miR profilinde değışme olduğı saptanmış. İnvitro olarak miR-122'nin ekspresyonunun azaltılması NAYKH olan hastalardakine benzer lipogenik bir mRNA ve protein ekspresyonuna yol açtığı belirtilmiştir.

NAYKH'da miR'ların serumda araştırılması ve düzeylerinin hastalığın histolojik şiddetiyle ilişkisini değerlendiren çalışmalar sınırlıdır. Yapılan tek çalışmada seçilen bazı miR'ların serum düzeylerinin NAYKH'da değişimini ve histolojinin şiddetinin belirlenmesinde non-invaziv tanı aracı olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir (73). Bu çalışmada 4 adet miR'nın serum ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Bizim çalışmada ise 8 adet miR'nın serum ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma ve bizim tezimizde miR-122 ve miR34a ortak miR'ları oluşturmuştur. Kolesterol biyosentezinde rol alan miR-122, tümör süpresör olarak değerlendirilen miR-16, kanserlerde arttığı görülen miR-21 ve p53 fonksiyonuyla ilişkili olan miR34a bu çalışmada değerlendirilmiştir. miR122, miR-34a ve miR-16 düzeylerinin serumda NAYKH'da arttığı görülmüştür. Kontrol, basit steatoz ve NASH hastaları karşılaştırıldığında hastalığın şiddeti arttıkça miR-122 ve miR-34a düzeylerinin arttığı görülmüş, miR16'nın kontrol grubuna göre artmakla birlikte basit steatoz ve NASH arasında farklılık olmadığı saptanmıştır. Serum ALT ve AST düzeyleriyle miR-122 serum düzeyleri arasında güçlü ilişki bulunmuştur. Aynı ilişki miR-122 ve 34a ile fibrozis evresi ve inflamatuvar aktivite arasında da gözlenmiştir. Ayrıca miR-122 ile serum total ve LDL kolesterol düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bir önceki çalışmada karaciğer dokusunda miR-122 ekspresyonu NAYKH'da azalmış olarak bulunurken, bu çalışmada serumda ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. miR-122 ve 34a'nın ileri evre fibrozis tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamız miR ve NAYKH ilişkisini araştıran bir çalışmadır. miR yeni bir araştırma alanı olmasına rağmen bu konuda bilgilerimiz giderek artmaktadır. Fakat miR ve NAYKH ilişkisi daha yeni bir konudur ve bu konuyla ilgili çalışmalar çok sınırlıdır. Biz NAYKH ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bazı miR'ların serum düzeylerini araştırdık. İkinci olarak bu miR düzeyleriyle histolojik bulguların korelasyonunu değerlendirdik.

miR-122: Yağlı karaciğer hastalığının merkezinde rol alan lipid ve kolesterol metabolizmasında görevli miR-122'nin NASH hastalarında karaciğer dokusunda ekspresyonu azalmaktadır. miR-122 FAS, HMGCR, SREBP-1C, SREBP-2 gibi lipid ve kolesterol metabolizmasında görevli genlerin mRNA'larını hedef almaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada miR-122 inhibisyonu birçok lipojenik geni azaltarak hepatik steatozda ve serum kolesterol düzeylerinde anlamlı düşüş sağlamıştır. İnsan hücre

kültürlerinde miR-122 sentezinin artması FAS, HMGCR, SREBP-1C, SREBP-2 gibi genlerin protein düzeylerinin azalmasına yol açmaktadır. Bu da miR-122'nin bu proteinlerin mRNA'larının parçalanmasında rol aldığını düşündürmektedir. Sonuç olarak miR-122 ekspresyonunun azalması NASH patogeneğinde lipid metabolizmasını etkileyerek rol almaktadır. Son dönemde yapılan bir çalışmada NAYKH'da serum miR-122 düzeylerinin serum ALT, AST, fibrozis evresi, inflamatuvar aktivite, total ve LDL kolesterol düzeyleriyle pozitif korelasyonu bulunmuştur (73). Bizim çalışmamızda NAYKH'da kontrol grubuna göre serum miR-122 düzeyi açısından bir farklılık bulunamamıştır. Bu bulgu bahsedilen (73) tek çalışmadaki verilerle çelişiyor gözükmemektedir. Yukarıda ayrıntılı açıklamaları verilen çalışmadan farklı olarak bizim çalışma grubumuz non-hipertansif ve non-diabetik hastalardan oluşmaktadır. Hipertansif ve diabetik hastalarda da serum miR paterninde değişiklikler olabilmektedir (74, 75). Bu konuda yapılan çalışmalar yeni olduğu için bahsedilen çalışmada anlamlı çıkan miR-122 ve 34a'nın diabet ve hipertansiyonda nasıl bir rol aldığı bilinmemektedir. Ayrıca toplumlar arası genetik varyasyonları da akılda tutmak gerekmektedir. Bu bir etken olabileceği gibi hasta grubumuzun azlığı da istatistiksel sonuçları etkilemiş olabilir. Bahsedilen çalışmada (73) toplam 34 NAYKH dahil edilmiştir. Bu farklılığı oluşturabilecek fibrozis, steatoz, inflamasyon ve balonlaşma oranları açısından tezimiz ve bahsedilen çalışma karşılaştırıldı. Bizim hasta grubumuzda orta-ileri inflamasyon derecesi biraz daha fazla oranda hastanın olduğu görüldü.

miR181d: Bu miR'nin hücre içi lipid birikimini düzenleyen etkileri insan hepatosit hücre kültürlerinde gösterilmiştir. miR-181d'nin kontrol grubuna göre hücre içi LD'nı %60 oranında azalttığı saptanmıştır. Ayrıca miR-181d'ye yanıt olarak hepatositlerde hücre içi trigliserid ve kolesterol esterlerinin düzeylerinde sırasıyla %30 ve %75 oranında düşme gözlenmiştir (52). Obstrüktif uyku apnesi ve intermittan hipoksinin NAYKH ile yakın ilişkisinden bahsedilmektedir. Enteresan olarak yapılan bir çalışmada hipoksi ile indüklenen miR'ların arasında miR-181d'de yer almaktadır (76). Biz de literatürde ilk defa miR181-d'nin NAYKH'da serumda sağlıklı gruba göre nasıl değiştiğini araştırdık. Elde ettiğimiz verilerde miR181-d NAYKH'da serumda anlamlı düşük saptanmıştır. Bu sonuç bize bu miR'nin bu hastalıkta patogeneşte rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca NAYKH'nın sağlıklı insanlardan ayrılmasında kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Daha önceki çalışmalarda NAYKH'da hücre

içerisinde LD'nin arttığı belirtilmiştir. miR-181d'nin hücre içerisinde bu LD'nı azalttığı bilinmektedir (52).

miR-10b: Yüksek serbest yağ asidi ile kültüre edilen insan hepatosit hücrelerinde miR profilleri araştırılmış ve hücrelerde artmış miR-10b ekspresyonunun hücrelerdeki lipid birikimini ve trigliserid seviyelerini artırdığı saptanmıştır. PPAR- α düzeyinin azalması ile serbest yağ asid oksidasyonun azalması ve hücrede lipid birikimi geliştiği bilinmektedir. Hücre kültüründe miR-10b ekspresyonu arttırıldığı zaman PPAR- α protein düzeyinin azaldığı, miR-10b'nin inhibe edildiği zaman PPAR- α 'nın arttığı gözlenmiştir. PPAR- α 'nın mRNA molekülünün miR-10b'nin nükleotid dizimiyle eşleştiği ve miR-10b'nin hedef proteini olduğu saptanmıştır (55). miR-10b'nin PPAR- α üzerinden hücre lipid metabolizmasında etkili olduğu ve bu yolağın tedavi hedefi olabileceği belirtilmiştir. Bizde hücre içi lipid metabolizmasında etkili bu miR'nin serumdaki düzeylerini araştırdık. Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında miR-10b'nin serum düzeyleri arasında bir fark bulunamamıştır. Yapılan değerlendirmede steatohepatit hastalarında inflamasyonun şiddeti arttıkça miR-10b düzeylerinin serumda azaldığı görülmüştür. Kontrol ve hasta grupları arasında farkı olmayan miR-10b'nin hasta grubunun kendi içerisinde değerlendirilmesinde inflamasyonla negatif korele olması bize bu miR'nin NAYKH'da rol alabileceğini belkide hasta sayısı arttırıldığında kontrol ve hasta grupları arasında fark oluşabileceğini düşündürmüştür.

miR-34a ve miR-146b: NAYKH olan insanların karaciğer dokusundan alınan biyopsi örneklerinde normal popülasyona göre miR-34a ve miR-146b anlamlı yüksek saptanmıştır (20). Farelerle yapılan bir çalışmada miR-34a'nın lipid ve glukoz metabolizmasında yer aldığına dair bulgular elde edilmiştir (56). Tip 2 DM olan insanlarda kontrollere göre miR34a'nın serumda daha fazla olduğu görülmüştür (77). miR-34a'nın hepatik lipid hemostazisi üzerinde anahtar düzenleyici olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda miR34a'nın karaciğer yağlanması ve insülin rezistansı üzerine etkili olduğu ve bu miR'nin inhibisyonunun NAYKH ve obezite ilişkili hastalıklarda yeni terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir (78). Yukarıda da bahsettiğimiz gibi NAYKH'da serumda miR-34a tek çalışmada bakılmıştır (73). Bu çalışmada serumda yüksek ekspresyon oranları saptanmıştır. Bu çalışmadan farklı olarak bizim hasta sayımız azdır. Histopatolojik bulgular genel olarak oranlar açısından

aynıdır. miR-146b ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Obez farelerin yağ dokularında yapılan bir çalışmada miR-146b'nin ekspresyonunun arttığı görülmüştür (79). Bu veriler ışığında bu iki miR hasta ve kontrol gruplarının serumlarında çalışılmıştır. Yaptığımız çalışmada miR-34a açısından hasta ve kontrol grupları arasında fark bulunamamıştır. İlginç olarak bizim çalışmamızda miR-146b'nin hastalarda kontrol grubuna göre serum ekspresyonu anlamlı biçimde azalmıştır. Bu miR'nin NAYKH tanısında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

miR-197 ve miR-99a: NAYKH patogeneğinde visceral beyaz yağ dokusundan kaynaklanan adipokin ve sitokinler önemli rol almaktadır. Periselüler fibrozisli NASH hastalarının beyaz yağ dokusunda kontrollere göre miR-197 ve miR-99 düzeylerinin azalarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu miR'lar NASH hastalarında periselüler fibrozisle negatif ilişkili bulunmuştur (57). Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında bu iki miR açısından serum düzeylerini karşılaştırdık ayrıca NAYKH'da serum miR-197 ve miR-99 düzeylerinin fibrozis ile ilişkisini değerlendirdik. Her iki miR'nin hastaların serumlarında anlamlı olarak düşük çıktığı görülmüştür. Yağ dokusundaki düzeyleri periselüler fibrozis ile negatif ilişkili bulunan bu miR'ların bizim çalışmamızda serum düzeyleriyle hastaların fibrozis evreleri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Fakat miR-197 düzeylerinin hafif inflamasyona göre orta ve ileri inflamasyonlu NAYKH'da azaldığı saptanmıştır. Bu iki miR'nin NAYKH tanısında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

miR-29a: Fare ve insanlarda yapılan bir çalışmada miR-29 (miR-29a, b, c) ailesinin karaciğer fibrozisinin düzenlenmesinde etkili olduğu saptanmıştır. Karbon tetraklorür verilerek farelerde hepatik fibrojenesis indüklenmiş ve bu farelerin karaciğer dokularında kontrollere göre miR-29 ailesinin hepsinin azaldığı saptanmıştır. Bu azalma ileri evre fibrozisli hastaların karaciğer dokularındaki miR29 azalmasıyla da korele bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada ileri evre sirozda erken evre fibrozis ve normal kontrol hastalarına göre daha düşük serum miR-29a düzeyleri bulunmuştur. Farelerin karaciğer dokularından elde edilen hepatik yıldız hücrelerde transforming growth factor beta (TGF- β), lipopolisakkarit (LPS) ve NF- κ B aracılığı ile miR-29 düzeyleri azalmıştır. Ayrıca hepatik yıldız hücreler de TGF- β ile azalan miR29 düzeyleri sonucu ekstraselüler matriks proteinlerinden kollajenin gen ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (58). Başka bir çalışmada farelerde ve insanlarda myokard enfarktüsü sonrası kalp

dokusunda miR-29 ailesinin azaldığı saptanmıştır (59). miR-29'un fibrozisde görevli kollojen, fibrillin ve elastin gibi proteinlerin mRNA'larını hedef aldığı ve baskıladığı belirtilmiştir (59). İn vitro ve in vivo çalışmalarda miR-29'un inhibe edilmesiyle kollejen sentezi artmış, miR29'un ekspresyonunun arttırılmasıyla kollejen sentezi azaltılmıştır (59). Miyokart enfarktüsü olan kardiyak alanlarda miR-29'un azaldığı görülmüştür ve buna bağlı olarak baskılanan ekstraselüler matriks proteinlerin mRNA'larının arttığı düşünülmektedir. (59). Ayrıca miR-29'un genel olarak dokularda fibrozis için potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bizde fibrozisde etkin rol aldığı saptanan ve ileri evre siroz vakalarında serumda da azaldığı görülen miR-29'un NAYKH'da literatürde ilk defa serum düzeylerini değerlendirdik. Hastalarımızın karaciğer fibrozis dereceleri ile miR-29a'nın ilişkisini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlarda miR-29a'nın hasta ve kontrol serumlarında değişmediği, hastaların fibrozis evresiyle ilişkili olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda miR'ların NAYKH'da serumda kontrol grubuna göre farklı ekspresyon paterni gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca serumdaki bazı miR'ların karaciğer dokusundaki patolojik değişiklikler ile ilişkili olabileceği saptanmıştır. Bizim çalışmamız bir ön çalışma niteliğindedir. Fazla sayıda miR türü ile yapılacak çalışmalarda tanısal amaçlı daha net bilgilere ulaşılabileceği kanaatindeyiz.

miR çalışmalarında dikkat edilmesi gereken birkaç nokta olduğu kanaatindeyiz. Birincisi hayvanlarda yapılan çalışmalarda deneysel oluşturulan modellerden elde edilen sonuçların insanlarla birebir eşleştirme yapılamayacağı, insanlardaki NAYKH'nın doğal seyriyle hayvan modelleriyle aynı olmayabileceği akılda tutulmalıdır. İkincisi bir miR'nin birden fazla mRNA'ya bağlanabileceği veya inhibe edebileceği ayrıca birden fazla miR'nin bir mRNA'yı etkileyebileceği bilinmelidir (20). Bunların dışında miR'ların hücre proliferasyonunda, apoptozisde, metabolizmada, immün fonksiyonlarda, inflamasyonda, doku gelişim ve diferansiyasyonunda önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Bu yolların bir veya birden fazlası hastalıkların patogeneğinde rol almaktadır. Buradan yola çıkarak farklı hastalıklarda patogeneşte etkili bir veya birden fazla ortak miR'ların olması kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu da miR'ların hastalıkların tanısında kullanımını karmaşık hale getirmektedir. Buna örnek olarak miR10b hücre içi lipid metabolizmasını düzenlediği gibi, meme kanserinde tümör metastazında ve invazyonundada etkili olduğu bilinmektedir (80). Hastalıkların

tanısında miR'ların düzeylerinin farklılığı veya kombine-birden çok miR'nın kullanımının daha mantıklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Hastalıklarda ekspresyonları değişen miR'lara yapılabilecek müdahaleler ile tedavide kullanılabileceği mevcut çalışmalarda belirtilmektedir. miR'lar konusunda bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Son yıllarda bu konuda çalışmalar artmakta ve miR'ları daha iyi anlamaktayız. Yalnız bu konudada dikkat etmemiz gereken birkaç nokta mevcuttur. miR'ların birden fazla hüresel aktivitede rol alan proteinleri etkilediği bilinmektedir. Bu da tedavilerle ekspresyonu bozulan miR'nın ne kadar düzeyde arttırılacağı ya da azaltılacağı ve yapılacak müdahale ile normal işleyen farklı hüresel fonksiyonların nasıl etkileneceği merak konusudur.

Bizim çalışmamızda maddi imkanlar ölçüsünde bazı miR'ların serum düzeyleri değerlendirilmiştir. Kanaatimizce NAYKH'nın non-invaziv tanısında tek bir miR'dan ziyade birden fazla miR'nın değerlendirilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Grant LM, Lisker-Melman M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2004;3:93-99.
2. 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.
3. Saadeh S, Younossi ZM. The spectrum of nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis. *Cleve Clin J Med* 2000;67:96-97, 101-104.
4. Ahishali E, Demir K, Ahishali B, Akyuz F, Pinarbasi B, Poturoglu S, Ibrisim D, Gulluoglu M, Ozdil S, Besisik F, Kaymakoglu S, Boztas G, Cakaloglu Y, Mungan Z, Canberk Y, Okten A. Electron microscopic findings in non-alcoholic fatty liver disease: is there a difference between hepatosteatosis and steatohepatitis? *J Gastroenterol Hepatol* 2010 Mar;25(3):619-26.
5. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, Kusano Y. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995;40(9): 2002–2009.
6. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;114(4): 842–845.
7. de Alwis NMW, Day CP: Non-alcoholic fatty liver disease: The mist gradually clears. *Journal of Hepatology* 2008;48:104–112.
8. Talwalkar JA, Yin M, Fidler JL, Sanderson SO, Kamath PS, Ehman RL. Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis: emerging clinical applications. *Hepatology* 2008;47:332-342.
9. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 2006;55:569-578.
10. Garrido MC, Hubscher SG. Accuracy of staging in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 1996;49:556-559.

11. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2614-2618.
12. Bedossa P, Darge`re D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:1449-1457.
13. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-355.
14. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology* 2007;17:118-126 .
15. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006;11: 441-450.
16. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-233.
17. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissuespecific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002;12:735-739.
18. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:852-858.
19. Jin X, Ye YF, Chen SH, Yu CH, Liu J, Li YM. MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2009;41:289-297.
20. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, Kellum JM, Min H, Luketic VA, Sanyal AJ. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008;48:1810-1820.
21. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of

- biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006.
22. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10513-10518.
 23. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672-675.
 24. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP: The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995;22(6):1714-1719
 25. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009;13(4):511-31.
 26. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection *Hepatology* 2010;51(5):1820-32.
 27. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 May;26(3):202-8.
 28. Cheng Z, Guo S, Copps K, Dong X, Kollipara R, Rodgers JT, Depinho RA, Puigserver P, White MF. Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nat Med* 2009; 15:1307-1311.
 29. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009; 50:1827-1838.
 30. Ibrahim SH, Kohli R, Gores GJ. Mechanisms of lipotoxicity in NAFLD and clinical implications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011 Aug;53(2):131-40.
 31. Struben VM, Hespeneheide EE, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000;108:9-13

32. Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2957-2961
33. Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:292-298
34. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011 Jun 24;332(6037):1519-23.
35. Çelikkilek M, Selçuk H, Yılmaz U. A new risk factor for the development of non-alcoholic fatty liver disease: HLA complex genes. *Turk J Gastroenterol* 2011;22(4): 395-399
36. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM: The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98(5):960-967
37. Nahon P, Kettaneh A, Tengher-Barna I, Ziol M, de Lédinghen V, Douvin C, Marcellin P, Ganne-Carrié N, Trinchet JC, Beaugrand M. Assessment of liver fibrosis using transient elastography in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2008;49:1062–1068.
38. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, Bertelli C, Fatta E, Bignamini D, Marchesini G, Fargion S. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*. 2008 Sep;48(3):792-8.
39. Patel AA, Torres DM, Harrison SA. Effect of weight loss on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43:970–974.
40. Kim HK, Park JY, Lee KU, Lee GE, Jeon SH, Kim JH, Kim CH. Effect of body weight and lifestyle changes on long-term course of nonalcoholic fatty liver disease in Koreans. *Am J Med Sci* 2009; 337:98–102.
41. St George A, Bauman A, Johnston A, Farrell G, Chey T, George J. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;50:68–76.

42. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010 May 6;362(18):1675-85.
43. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-14.
44. Kundu P, Fabian MR, Sonenberg N, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. *Nucleic Acids Res*. 2012 Feb 23. (Baskıda) PMID: 22362743
45. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011 Nov 18;12(12):861-74.
46. Iwai N, Naraba H. Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;331:1439-1444 .
47. Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA mediated gen regulation:contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development* 2007;17:166 -176 .
48. Duan R, Pak C and Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Human Molecular Genetics* 2007;16:1124-1131 .
49. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Hasegawa S, Takagi T, Wang F, Hirata I, Nakano H. A polymorphism of microRNA 27a genome region is associated with the development of gastric mucosal atrophy in Japanese male subjects. *Dig Dis Sci* 2007;52:1691-1697.
50. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, Zeng Y, Miao R, Jin G, Ma H, Chen Y, Shen H. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2600-8.

51. Hu Z, Liang J, Wang Z, Tian T, Zhou X, Chen J, Miao R, Wang Y, Wang X, Shen H. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat* 2009;30(1):79-84.
52. Whittaker R, Loy PA, Sisman E, Suyama E, Aza-Blanc P, Ingemannson RS, Price JH, McDonough PM. Identification of MicroRNAs that control lipid droplet formation and growth in hepatocytes via high-content screening. *J Biomol Screen*. 2010;15(7):798-805.
53. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009;137:1005-1017.
54. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;3(2):87-98.
55. Zheng L, Lv GC, Sheng J, Yang YD. Effect of miRNA-10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR-alpha expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(1):156-63.
56. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, Zen K, Li Y, Zhang CY. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* 2009;50(9):1756-65.
57. Estep M, Armistead D, Hossain N, Elarainy H, Goodman Z, Baranova A, Chandhoke V, Younossi ZM. Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(3):487-97.
58. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 2011;53(1):209-18.

59. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(35):13027-32.
60. Kogure T, Lin WL, Yan IK, Braconi C, Patel T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*. 2011 Oct;54(4):1237-48.
61. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672-675.
62. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10513-10518.
63. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21.
64. Nguyen D, Talwalkar JA. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology*. 2011 Jun;53(6):2107-10.
65. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the american association for the study of liver diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012 Apr 6. doi: 10.1002/hep.25762.
66. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, Kim RY, Saria MG, Pastorino S, Kesari S, Krichevsky AM. MicroRNAs in

cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro Oncol.* 2012 Apr 4.

67. Yu S, Liu Y, Wang J, Guo Z, Zhang Q, Yu F, Zhang Y, Huang K, Li Y, Song E, Zheng XL, Xiao H. Circulating MicroRNA Profiles as Potential Biomarkers for Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr 3.
68. Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IO, Feitelson MA. Role of miR-148a in Hepatitis B Associated Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(4):e35331. Epub 2012 Apr 9.
69. Ji J, Wang XW. New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Therap* 2009;8:1686–1693.
70. Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008 Apr;47(4):1223-32.
71. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004;279:52361–5.
72. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226–30.
73. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2011;6(8):e23937. Epub 2011 Aug 23.
74. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012 Feb 3;110(3):483-95. (Abstrakt)
75. Ciesla M, Skrzypek K, Kozakowska M, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Oct;401(7):2051-61. Epub 2011 May 6.

76. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1859-67.
77. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol*. 2011 Mar;48(1):61-9. Epub 2010 Sep 21.
78. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):239-50.
79. Chartoumpekis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Habeos IG. Differential Expression of MicroRNAs in Adipose Tissue after Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e34872.
80. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and metastasis initiated by micro-RNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449: 682–8.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Mehmet ÇELİKBİLEK'e ait **“NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALARINDA SERUM MİKRO RNA DÜZEYLERİ”** adlı çalışma, jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:/....../2012

İmza

Başkan :.....

Üye :

Üye: :.....

Üye :.....

Üye :.....