

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**NONALKOLİK STEATOHEPATİTLİ HASTALARDA, İNSÜLİN
DİRENCİ İLE OSTEOKALSİN VE OKSİDATİF STRES
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Kıymet DOLBUN SEÇKİN**

**Danışman
Prof. Dr. Gülden BAŞKOL**

Doktora Tezi

**Nisan 2013
KAYSERİ**

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

**NONALKOLİK STEATOHEPATİTLİ HASTALARDA,
İNSÜLİN DİRENCİ İLE OSTEOKALSİN VE OKSİDATİF
STRES ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Kıymet DOLBUN SEÇKİN

Danışman
Prof. Dr. Gülden BAŞKOL

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD-11-3708 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Nisan 2013
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Kıymet DOLBUN SEÇKİN

İmza :



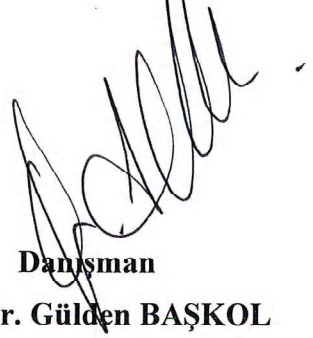
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Nonalkolik Steatohepatitli Hastalarda, İnsülin Direnci ile Osteokalsin ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkinin Araştırılması” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Kıymet DOLBUN SEÇKİN



Danışman
Prof. Dr. Gülden BAŞKOL



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU



Prof. Dr. Gül den BAŞKOL danışmanlığında **Kıymet DOLBUN SEÇKİN** tarafından hazırlanan “**Nonalkolik Steatohepatitli Hastalarda, İnsülin Direnci ile Osteokalsin ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyokimya** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

01. / 04 / 2013

JÜRİ

Danışman : Prof. Dr. Gül den BAŞKOL (Tıp Fak. Biyokimya AD)

Üye : Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU (Tıp Fak. Biyokimya AD)

Üye : Prof. Dr. Mehmet YÜCESOY (Tıp Fak. Gastroenteroloji AD)

Üye : Prof. Dr. Nurten DİKMEN (Çukurova Üni. Tıp Fak.)

Üye : Prof. Dr. Figen NARİN (Tıp Fak. Biyokimya AD)

imza

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, bilimsel tecrübe ve kişiliği ile bana örnek ve rehber olan, yanında çalışmış ve kendisini tanımış olmaktan büyük onur ve gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülden Başkol'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman hissettiğim emekli danışman hocam Prof. Dr. K. Muzaffer Üstdal'a; Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Sabahattin Muhtaroglu'na; tezime katkı ve desteklerinden dolayı Gastroenteroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Yücesoy ve Doç. Dr. Mevlüt Başkol'a; tezimin numune toplama aşamasındaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Demet Özel Coşkun'a; istatistik aşamasındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ferhan Elmalı'ya; laboratuvar çalışmasındaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Ayşen Caniklioğlu, Dr. Kenan Güçlü, Uzm. Kimyager Funda Akpınar'a ve bugüne kadar üzerimde emeği bulunan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

En iyi şekilde yetişmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora sürecinde de desteğini bütün kalbimle hissettiğim babam Süleyman Dolbun'a, annem Ayşe Dolbun'a, ablam Şule Yıldız'a ve en önemli moral desteğim sevgili eşim Dr. Musa Ünsal Seçkin'e teşekkür ederim.

NONALKOLİK STEATOHEPATİTLİ HASTALARDA, İNSÜLİN DİRENCİ İLE OSTEOKALSİN VE OKSİDATİF STRES ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Kıymet DOLBUN SEÇKİN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Mart 2013

Danışman: Prof. Dr. Gülden BAŞKOL

ÖZET

Bu çalışmada, nonalkolik steatohepatitli (NASH) hastalarda insülin direnci, osteokalsin ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık. Çalışma grubu, 28 NASH'lı hasta ve bunlarla yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 20 sağlıklı kontrol grubundan oluştu. Total osteokalsin, karboksillenmemiş osteokalsin (ucOC), 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), interlökin-10 (IL-10), interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) düzeyleri ELISA yöntemleri ile ölçüldü. Homeostasis Model Assessment-İnsülin direnci (HOMA-IR) değerleri açlık kan glukoz ve insülin düzeyleri kullanılarak hesaplandı.

Plazma total osteokalsin düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda düşük bulundu ($p<0.001$). TNF- α ve HOMA-IR seviyeleri, hasta grubunda kontrollere göre yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.009$, $p<0.001$). Vücut kitle indeksi (VKİ) düzeyleri, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek tespit edildi ($p<0.001$). ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1 β ve IL-6 düzeylerinde iki grup arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Total osteokalsin ile HOMA-IR düzeyleri arasında negatif korelasyon tespit edildi ($r=-0.592$, $p<0.001$). TNF- α ile HOMA-IR düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu ($r=0.290$, $p<0.045$).

Sonuçlarımız, NASH patogenezinde insülin direnci ve obezitenin önemli faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu proje, NASH'lı hastalarda total osteokalsin ve ucOC'un birlikte ölçüldüğü ilk çalışmadır. Bulgularımız, NASH konusuna osteokalsin ve insülin direnci ilişkisi açısından farklı bir bakış getirmektedir.

Anahtar kelimeler: Nonalkolik steatohepatit, insülin direnci, osteokalsin, oksidatif stres.

**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN INSULIN RESISTANCE,
OSTEOCALCIN AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC
STEATOHEPATITIS**

Kıymet DOLBUN SEÇKİN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Biochemistry

PhD Thesis, March 2013

Supervisor: Prof. Dr. Gül den BAŞKOL

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the relationship between insulin resistance, osteocalcin and oxidative stress in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The study group comprised 28 patients with NASH and 20 healthy controls who were matched for age and sex. Total osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin (ucOC), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels were determined by ELISA methods. Homeostatic model assessment-Insulin resistance (HOMA-IR) values were calculated using fasting blood glucose and insulin levels

Plasma total osteocalcin levels were found decreased in patients compared to controls ($p<0.001$). TNF- α and HOMA-IR levels were found increased in patients compared to controls ($p<0.009$, $p<0.001$ respectively). Body mass index (BMI) levels were found higher in patient groups compared to controls ($p<0.001$). ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1 β and IL-6 levels were not significantly different between two groups ($p>0.05$). Total osteocalcin were found to be negatively correlated with HOMA-IR levels ($r=-0.592$, $p<0.001$). TNF- α were found to be positively correlated with HOMA-IR levels ($r=0.290$, $p<0.045$).

Our results support the idea that insulin resistance and obesity are important factors in pathogenesis in NASH. This project is the first study both total osteocalcin and ucOC levels were measured in patients with NASH. Our results provides a different perspective about relationship between osteocalcin and insulin resistance from the NASH topic.

Key words: Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, osteocalcin, oxidative stress.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ	xii
KISALTMALAR	xiii
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.NONALKOLİK STEATOHEPATİT	3
2.2.İNSÜLİN DİRENCİ.....	12
2.3.OSTEOKALSİN	17
2.4.8-HİDROKSİDEOKSİGUANOZİN	22
2.5.SİTOKİNLER	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
4.BULGULAR	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
6.KAYNAKLAR	68
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. NASH'ta Brunt grade sistemi.....	9
Tablo 2.2. NASH'ta Brunt stage sistemi	10
Tablo 3.1. Hastaların histopatolojik bulguları.....	30
Tablo 3.2. Total Osteokalsin Çalışma Prosedürü	33
Tablo 3.3. ucOC Çalışma Prosedürü	35
Tablo 3.4. 8-OHdG Çalışma Prosedürü.....	37
Tablo 3.5. IL-10 Çalışma Prosedürü	39
Tablo 3.6. IL-1 β Çalışma Prosedürü	41
Tablo 3.7. TNF- α Çalışma Prosedürü.....	43
Tablo 3.8. IL-6 Çalışma Prosedürü	45
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet, yaş, kilo, boy ve VKİ bulgularının karşılaştırılması	47
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubuna ait rutin parametrelerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubuna ait ana biyokimyasal bulguların karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.4. İnsülin direnci bulunmayan ve insülin direnci bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun rutin parametrelerinin karşılaştırılması	50
Tablo 4.5. İnsülin direnci bulunmayan ve insülin direnci bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması	51
Tablo 4.6. Obez olmayan ve obez olan hasta grubu ile kontrol grubunun rutin parametrelerinin karşılaştırılması	52
Tablo 4.7. VKİ<30 kg/m ² ve VKİ $\geq$ 30 kg/m ² olan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması	53
Tablo 4.8. Fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun kilo, boy, VKİ ve rutin parametrelerinin karşılaştırılması	54
Tablo 4.9. Fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması	55
Tablo 4.10. Düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun kilo, VKİ, yaş ve rutin parametrelerinin karşılaştırılması	56
Tablo 4.11. Düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması	57
Tablo 4.12. Parametreler arasındaki korelasyonlar	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Mikroveziküler ve makroveziküler steatoz	8
Şekil 2.2.	Nonalkolik steatohepatitte karaciğer histolojisi.....	9
Şekil 2.3.	İnsülin sentezi.....	13
Şekil 2.4.	Osteokalsin sentezi	18
Şekil 2.5.	Vitamin K bağımlı karboksilasyon prosesi	19
Şekil 2.6.	Osteokalsin amino asit dizilimi	20
Şekil 2.7.	Osteokalsin ve genel metabolik etkileri	22
Şekil 2.8.	8-hidroksideoksiguanozin	25
Şekil 3.1.	Total osteokalsin standart grafiği.....	34
Şekil 3.2.	ucOC standart grafiği.....	36
Şekil 3.3.	8-OHdG standart grafiği	38
Şekil 3.4.	IL-10 standart grafiği	39
Şekil 3.5.	IL-1 β standart grafiği	41
Şekil 3.6.	TNF- α standart grafiği	43
Şekil 3.7.	IL-6 standart grafiği	45

KISALTMALAR

NASH	: Nonalkolik steatohepatit
HOMA	: Homeostasis Model Assessment
IR	: İnsülin direnci
ucOC	: Karboksillenmemiş osteokalsin
ROT	: Reaktif oksijen türleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
8-OHdG	: 8-hidroksideoksiguanozin
IL-1 β	: İnterlökin-1 beta
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
ATP	: Adenozin trifosfat
TCA	: Trikarboksilik asit
GLUT	: Glukoz taşıyıcı protein
JNK-1	: c-Jun N-terminal kinaz-1
NF-K β	: Nükleer faktör kappa B
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ALP	: Alkalen fosfataz
GGT	: Gama glutamil transferaz
GIP	: Gastrik inhibitör peptid
IRS	: İnsülin reseptör substrat
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
HECT	: Hiperinsülinemik Öglisemik Klemp Testi

CIGMA	: Glikozun Sürekli İnfüzyon Modeli
Gla	: Gama karboksi glutamik asit
VKI	: Vücut Kitle İndeksi
ICAM	: Hücre içi adezyon molekülü-1
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
ICE	: IL-1 converting enzim
IKK- β	: İnhibitör kappa kinaz β
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
TMB	: 3,3',5,5' Tetramethyl-benzidine
TC	: Total kolesterol
TG	: Trigliserid
HRP	: Horseradish Peroksidaz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Alkolik olmayan karaciğer yağlanması ile nekroinflamasyonun birlikteliği nonalkolik steatohepatit (NASH) olarak tanımlanır. Hastalığın klinik önemi; fibrozis, siroz, karaciğer yetmezliği ve karaciğer kanserine yol açabilme potansiyelinden ileri gelmektedir. NASH prevalansı çok iyi bilinmemektedir, bunun en önemli nedeni hastaların çoğunun asemptomatik olmasıdır (1, 2). Hastalığın sıklığı batı toplumlarında fazla olmakla birlikte, diyet alışkanlıklarının değişmesi, kalori alımında artış ve sedanter yaşama geçişle artık tüm dünyada artış göstermektedir (3). NASH olgusu patogenezinin, doğal seyri ve tedavisine kadar birçok alanda belirsizlikler sergilemektedir.

İnsülin direnci; insülinin sentezinden, salgılanması veya hedef hücrelerde etkilerini oluşturuncaya kadar olan aşamalarda ortaya çıkabilen, insülinin beklenen etkilerinin azalması durumudur (4). Homeostasis Model Assessment (HOMA); insülin direncini (IR) değerlendirebilen, özellikle geniş hasta popülasyonlarını pratik bir şekilde inceleme imkanı sağlayabilen bir testtir (5). NASH patofizyolojisindeki esas rolü insülin direncinin oynadığı düşünülmektedir. NASH'lı hastaların HOMA-IR değerlerinin normal bireylere göre yüksek bulunduğu bildirilmiştir (6, 7).

Sadece bir kemik yapım belirteci değil, aynı zamanda enerji metabolizması ile ilişkili bir molekül olduğunun keşfi ile osteokalsin, son yıllarda üzerinde çalışmaların arttığı bir molekül olmuştur. Osteokalsinin; β -hücre proliferasyonu, insülin duyarlılığı ve enerji metabolizması ile ilgili bir molekül olduğu üzerinde durulmaktadır (8, 9, 10).

Osteokalsin seviyeleri ve HOMA-IR arasında negatif korelasyonun bulunduğu ile ilgili literatürlere rastlanmaktadır (11, 12).

Antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı veya reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı miktarda üretildiği durumlarda, prooksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stresin NASH patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (13). Stabil bir molekül olan deoksiribonükleik asit (DNA), lipidler ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. NASH'lı hastalarda, oksidatif DNA hasarını değerlendirmek amacıyla yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (14, 15). Bu nedenle NASH'lı hastalarda, oksidatif DNA hasarını gösteren bir belirteç olarak kabul edilen 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) ölçümü klinik bakımdan önem taşıyacaktır.

Sitokinler; otokrin, parakrin ve endokrin etki gösterebilen ve çeşitli biyolojik etkilere sahip, protein yapıdaki moleküllerdir. Sitokinlerin pek çok hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Hepatositler, yüzeylerinde taşıdıkları çeşitli sitokin reseptörleri ile organizmanın hem sistemik hem de yerel savunma sistemi için çok önemli bir konumdadırlar (16). İnterlökin-1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinler, NASH patogenezi ile ilişkili görülmektedirler. (17, 18). Antiinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-10 (IL-10) steatoza karşı koruyucu rol oynamaktadır (19). Yağlı karaciğerin, steatohepatit, fibrozis ve siroza ilerlemesinde sitokinler ve oksidatif stres birlikteliği sorumlu tutulmaktadır (20).

NASH ve insülin direnci arasındaki ilişkiye dair literatürde pek çok çalışma bulunmasına karşın, NASH'ta insülin direnci ve osteokalsin arasındaki ilişkiye ait sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Biz bu çalışmada, son yıllarda çalışmaların arttığı insülin direnci-osteokalsin ilişkisinden yola çıkarak, NASH'ta osteokalsin seviyelerinin nasıl değiştiğini ve insülin direnci ile osteokalsin arasındaki ilişkiyi göstermeyi; NASH'ta oksidatif DNA hasarı belirteci olan 8-OHdG düzeylerini araştırarak, insülin direnci ile osteokalsin ve 8-OHdG arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedefledik.

Ayrıca, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar; IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin osteokalsin ile ilişkisini araştırmayı; tüm bu parametrelerin birbiriyle ilişkisini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NONALKOLİK STEATOHEPATİT

2.1.1. Tanım

Karaciğerin ağırlığının %5'inden fazla yağlanması steatoz (yağlı karaciğer); buna eşlik eden inflamasyon varsa steatohepatit olarak adlandırılır (21). NASH, ilk defa Ludwig ve ark. (22) tarafından 1980 yılında tanımlanmış olup, alkolik karaciğer yağlanmasına benzeyen fakat etiolojide alkol dışı nedenlerle meydana gelen bir dizi değişikliktir.

2.1.2. Tarihçe ve Epidemiyoloji

Yağlı karaciğer terimi, ilk olarak yaklaşık 160 sene önce patolog Rokitansky tarafından tanımlanmıştır. 1979 yılında Adler ve ark. (23), yağlı karaciğer hepatitini 29 obez hastada bildirmişlerdir. 1980 yılında Ludwig ve ark. (22), "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experience with a hitherto unnamed disease" isimli makaleleri ile NASH'ı ilk kez tanımlamışlardır.

Genel popülasyonda NASH prevalansı çok iyi bilinmemekle birlikte prevalansının %2-3 arasında olduğu düşünülmektedir (24). NASH prevalansı beyaz ve hispaniklerde, afroamerikanlara göre daha yüksektir (25). Karaciğer biyopsisi yapılan bireylerde, NASH görülme sıklığı %1.2-9 olarak saptanmıştır (26). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), genel popülasyonun %20-30'unda karaciğer yağlanması bulunduğu ve NASH sıklığının yaklaşık %3.5-5 arasında olduğu tahmin edilmektedir (1, 27). Obezite, NASH ile ilişkilendirilmiş en sık durum olup, yapılan çalışmalarda

NASH'lı hastaların %57-90'ının obez olduğu saptanmıştır (28). 105 obez hasta ile yapılan bir çalışmada, %25'inde NASH tespit edilmiş bunların %11'inde ise ilerlemiş fibrozis bulunduğu bildirilmiştir (29). NASH'ın daha çok 40-60 yaş arasında görüldüğü bilinmektedir, ayrıca 10 yaş ve üzeri çocuklarda da görüldüğü bildirilmiştir (22, 30).

2.1.3. Patogenez

Normalde karaciğerdeki lipidlerin miktarı karaciğer ağırlığının %5'ini geçmez. Bu lipidler; trigliseridler, fosfolipidler, kolesterol, kolesterol esterleri ve serbest yağ asitleridir. Karaciğerde lipidlerin alınması, üretimi, oksidasyonu ve kana verilmesi arasında bir denge vardır; eğer bu denge bozulursa karaciğerde aşırı lipid depolanması ortaya çıkar. Steatoz durumunda, hem lipidlerin miktarı hem de trigliseridlerin dağılımdaki oranı artar. Normalde trigliseridler karaciğerdeki lipidlerin %15 kadarını oluştururken, yağlanmış karaciğerde bu oran %60'lara kadar yükselir (31, 32).

NASH patogenezi henüz iyi bir şekilde açıklanamamaktadır, çünkü steatozu olan hastalarda NASH gelişimini etkileyen faktörler hakkında yeterli bilgi yoktur. Değişik mekanizmalar öne sürülmüştür ve bunlar arasında görüş ayrılıkları mevcuttur (33). Steatoz oluşumu, steatohepatite giden sürecin başlangıcını oluşturur. Steatoz oluşumundan sonraki evre ise inflamasyonun eklenmesidir (34). Steatozu steatohepatite yönlendiren faktörler çeşitli ve hala tartışmalıdır. Reaktif oksijen ürünleri, lipid peroksidasyon defektleri, sitokinler, endotoksinler, mitokondri fonksiyon bozuklukları, genetik yatkınlık ve hiperinsülinemi gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır (35, 36).

Çeşitli mekanizmalar karaciğerde steatoza yol açmaktadır (16, 31, 37):

1. Artmış yağ asidi kaynağı: Artmış visseral/subkutanöz adipoz lipolizi ile ya da artmış diyetel girdi.
2. Artmış *de novo* hepatik lipogenez.
3. Azalmış beta oksidasyon: Karnitin eksikliği, mitokondriyal disfonksiyon.
4. Karaciğerden çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) sekresyonunda azalma: Apolipoprotein sentezinde bozukluk, kolesterol esterifikasyon bozukluğu, protein malnütrisyonu.

Geçmiş yıllarda kabul edilen two hit hipotezi, son araştırma sonuçları ile tekrar şekillenmiştir. Two hit hipotezine göre; ilk darbeyi karaciğerde yağlanma oluşturur ve

bu durum, karaciğeri gelecek olan ikinci darbeye duyarlı hale getirir. İkinci darbe ise, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkması ve bunların fibrozis gelişimine kadar uzanan hasarı oluşturmaktadır. Günümüzde bu modelde öne sürülen, first hit olarak adlandırılan trigliserid birikiminin hepatositlere zarar vermediği, aksine serbest yağ asidi toksisitesinden hepatositleri koruduğu tespit edilmiştir (38, 39).

Mitokondriler, serbest yağ asidi oksidasyonunda ve adenosin trifosfat (ATP) üretiminde önemlidir. Orta ve kısa zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyonları ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü mitokondri matriksinde gerçekleşir. Artmış serbest yağ asidi içeriği hepatosit mitokondrilerinin şişmesine, fragilitelerinin ve membran geçirgenliklerinin artmasına neden olmaktadır. Serbest yağ asitlerinin yüksek olması β -oksidasyonu artırır ve bu durumda lipid peroksidasyonu, süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı artar. Artmış oksidatif stres, yağlı karaciğerin NASH'a dönüşümündeki mekanizmaların başlangıcındaki faktör olarak bilinmektedir (40, 41). Lipid peroksidasyon ürünleri ve sitokinler, hepatosit ölümüne, megamitokondri, mallory cisimciği oluşumuna, stellat hücre ve polimorfonükleer lökosit aktivasyonuna neden olurlar. Lipid peroksidasyonu, hepatosit nekrozuna ve kollajen sentezinde artışa neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon derecesi ile yağlanma derecesi arasında ilişki bulunmaktadır (42, 43).

İnflamasyona katkıda bulunan önemli bir faktör hiperinsülinemidir. İnsülin serbest yağ asitlerinin β -oksidasyonunu önleyerek karaciğerde toksik serbest yağ asidi miktarını artırır. İnsülin direnci, hormon duyarlı lipoprotein lipazı uyarır ve periferik lipoliz artırır. Periferik lipoliz artışı, karaciğere gelen yağ asidi miktarının artmasına neden olur. İnsülin direnci durumunda, karaciğerde yağ asitlerinin trigliseridlere esterleşmesi ve karaciğerden salınımı azalır. Ayrıca, insülinin yüksek seviyeleri VLDL'nin bir bileşeni olan apolipoprotein B100'ü inhibe eder ve bu durumda karaciğerden trigliseridlerin taşınması zorlaşır (24, 44). İnsülin direnci, transferrin reseptörlerinin aşırı ekspresyon olmasına ve serum ferritininin artmış konsantrasyonlarına neden olmaktadır. NASH'lı hastalarda artmış karaciğer demiri ve serum ferritin seviyeleri bildirilmiştir (45).

TNF- α , steatoz ve steatohepatit patogeneğinde merkezi bir role sahiptir. Çeşitli insan ve hayvan çalışmalarında, yükselmiş TNF- α düzeylerinin obezite ve insülin direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur (6, 46). TNF- α , adiposit ve hepatositlerde glukoz taşıyıcı protein-4 (GLUT-4) ekspresyonunu ve lipoprotein lipaz aktivitesini azaltarak insülin direncine yol açmaktadır. Ayrıca, karaciğerde c-Jun N-terminal kinaz-1 (JNK-1) ve

nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yolunu aktive ederek inflamasyonu indüklemektedir (47).

Adiponektin, adipositlerden salgılanan antiinflamatuvar özelliğe sahip bir adipositokindir. Vücut yağının azaltılmasında, hepatik ve periferik insülin duyarlılığının düzenlenmesinde etkilidir. Adiponektin karaciğerde β -oksidasyonu önler, ayrıca hepatik *de novo* lipogenezi azaltır (17, 48). NASH'ta karaciğer adiponektin reseptörleri (adip R II) mRNA ekspresyonunun, fibrozis derecesi ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (49). Ayrıca düşük adiponektin seviyeli hayvan modellerinde, hepatotoksinlere maruz kalındığında fibrozis gelişiminin daha yaygın olduğu tespit edilmiştir (50). Düşük adiponektin ve artmış TNF- α seviyelerinin birlikteliği, patogenezin oluşumunda önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (20, 51).

Leptin, yapısal olarak sitokinlere benzeyen, vücut kitlesinin düzenlenmesinde rolü olan ve obezite tarafından kontrol edilen bir hormondur. Obezite ve artmış kalori alımı, leptin sentezini uyarır. Kronik olarak yüksek insülin seviyeleri leptin konsantrasyonunu belirgin şekilde artırır (52). NASH'ta steatoz derecesi ile yüksek leptin seviyeleri arasında korelasyon bulunduğu, fakat inflamasyon ve fibrozis ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise yüksek leptin seviyeleri ile steatoz, inflamasyon ve fibrozis arasında ilişki bulunmadığı tespit edilmiştir (53).

IL-6, NASH patogenezinde rol oynadığı düşünülen diğer bir sitokindir. IL-6, adiponektin ve lipoprotein lipaz sentezini baskılamakta ve hepatik kupffer hücrelerini aktive ederek proinflamatuvar etki göstermektedir. Bunun yanı sıra IL-6 yüksekliğinin hepatoprotektif koruma sağladığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (20, 54, 55).

Resistin, adipoz doku ve makrofajlardan sentezlenen bir adipokindir. Esas hedef organı karaciğer olan resistinin, iskelet kası ve adipoz dokudaki etkileriyle birlikte hepatik insülin direncine neden olduğu bilinmektedir (56). NASH'ta resistin ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır fakat, genel metabolik etkisi NASH patogenezinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Fibrozis şiddeti ile resistin seviyelerinin ilişkili olduğu çalışmalar mevcuttur (57).

Apoptoz, kaspazlar tarafından düzenlenen hücre ölümü olarak tanımlanır. Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunurlar ve aktif maddelerinde sistein yer alır. Apoptozun başlangıcıyla epitel spesifik ara filament sitokeratin-18, 2 ayrı noktadan 3 parçaya ayrılır. Bu kırılma sonucu oluşan M30 antijeni, M30 monoklonal antikoru

tarafından tanınır. Hepatik apoptoz, NASH gelişiminde önemli bir özelliktir ve apoptoz-patogenez ilişkisini açıklamak için çalışmalar yapılmaktadır. Sitokeratin-18'in (M30 antijeni) NASH'lı hastalarda yüksek bulunduğu bildirilmiştir (58).

Japonyada yapılan bir çalışmada, obezite ve inflamasyona olan genetik yatkınlığın NASH açısından önemli olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan ve lipoliz yoluyla lipid mobilizasyonunu uyaran β -adrenerjik reseptörler, NASH'lı hastalarda araştırılmıştır. Hipertrigliseridemi, hiperinsülinemi ve obezite ile ilişkili olan β_3 -adrenerjik reseptörün 64. kodon varyantının NASH'lı hastalarda kontrollere kıyasla daha sıklıkla bulunduğu bildirilmiştir (59).

2.1.4. Klinik Bulgular

Hastaların %45-100'ünün asemptomatik olduğu bilinmektedir. Halsizlik, yorgunluk, sağ üst kadranda hassasiyet ve dolgunluk gibi semptomlar görülebilmektedir (60). Hastaların çoğunda saptanabilen tek muayene bulgusu hepatomegalidir. Hepatomegaliye hastaların yaklaşık %25'inde rastlanmaktadır (61).

2.1.5. Laboratuvar Bulguları

Laboratuvar sonuçlarına bakarak, direkt NASH tanısı koymak mümkün değildir. NASH'ta karaciğer fonksiyon testlerinde en sık karşılaşılan durum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) değerlerinde 2-3 kat artıştır. AST/ALT değeri <1'dir ve bu oran NASH'ı alkolik hepatitten ayırır. AST/ALT değeri >1 ise bu durum fibrozisi ve sirozu düşündürür (62). Asemptomatik transaminaz yüksekliğinin araştırıldığı bir çalışmada 81 hastadan 26'sında steatohepatit, 4'ünde fibrozis ve 2'sinde siroz gelişimi bulunmuştur (63). Serum alkalin fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferazın (GGT) anormal değerleri görülebilir. Ancak hiperbilirubinemiye, protrombin zamanının uzamasına ve hipoalbuminemiye bu hastalarda sık rastlanmaz. %20-80 arasında hastada hiperlipidemi olduğu bildirilmiştir (24). Serum ferritin seviyelerinin, hastaların %40-58'inde yüksek olduğu bildirilmiştir (45, 64).

2.1.6. NASH'ta Karaciğer Histopatolojisi

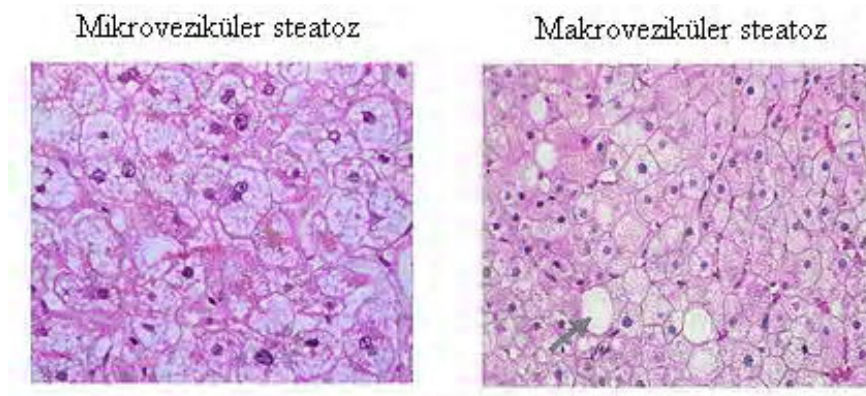
Steatoz, karaciğerde yaygın bir durumdur ve genellikle zon 3'ten başlar. Hepatositlerde iki tür steatoz vardır:

1.Mikroveziküler steatoz

2.Makroveziküler steatoz

Mikroveziküler steatozda, çok sayıda küçük yağ damlacıkları hepatosit sitoplazmasına dağılmış olarak bulunur. Hepatosit hidropik ve soluk görünümündedir. Hepatosit nukleusları merkezde bulunur. Klinikte, hepatosellüler yetmezliğe eşlik eden yağlanma bu türdür.

Makroveziküler steatozda, hepatosit sitoplazmasında büyük tek bir yağ damlacığı şeklinde görülür. Nukleus bir kenara itilmiştir. Bu tip yağlanma genellikle zararsız ve benignedir. NASH'de steatoz tipik olarak makrovezikülerdir (Şekil 2.1.) (65, 66).

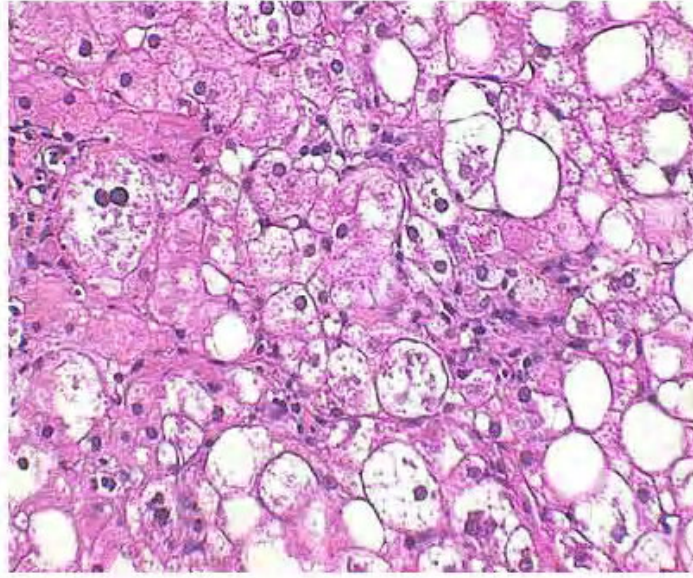


Şekil 2.1. Mikroveziküler ve makroveziküler steatoz (67)

Klinik bulgular ve mevcut laboratuvar bulguları ile NASH'a kesin tanı konulamadığı için histolojik bulgu gereklidir. NASH'ta tipik karaciğer biyopsi bulguları; makroveziküler steatoz, lobüler inflamasyon ve hepatosit balonlaşmasıdır (Şekil 2.2.). Lobülde lipogranulomlar, asidofil cisimcikler ve perisinüzoidal fibrozis tabloya eşlik edebilir. NASH tanısı için, fibrozis bulunması şart değildir (68).

Histopatolojik olarak NASH tanısı steatoz, inflamasyon ve fibrozis açısından evrelendirilerek değerlendirilir. Brunt ve ark. (69), ortak histolojik özellikler veren NASH için bir derecelendirme (grade) ve evrelendirme (stage) sistemi oluşturmuşlardır

(Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.). Bu sisteme göre nekroinflamatuvar derecelendirme esas olarak steatoz, balonlaşma ve lobüler inflamasyon derecesi göz önünde bulundurularak; hafif, orta ve şiddetli olarak üç derecede toplanmıştır.



Şekil 2.2. Nonalkolik steatohepatitte karaciğer histolojisi (67)

Tablo 2.1. NASH'ta Brunt grade sistemi (68)

Grade	Steatoz	Balonlaşma	İnflamasyon
Hafif (Grade 1)	1-2	Minimal	L: 1-2, P: 0-1
Orta (Grade 2)	2-3	Mevcut	L:1-2, P: 1-2
Şiddetli (Grade 3)	2-3	Belirgin	L: 3,P: 1-2

Steatoz: grade 1≤%33, grade 2=%33-%66, grade 3≥%66

Lobuler (L)= 0-3, 0: yok, 1: <2 odak (20 büyütme), 2: 2-4 odak (20 büyütme), 3: >4 odak (20 büyütme)

Portal (P)= 0-3, 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: belirgin

Tablo 2.2. NASH'ta Brunt stage sistemi (68)

Stage	Zon 3, perisinüzoidal fibrozis	Birleşme fibrozisi	Siroz
1	Fokal veya yaygın	0	0
2	Fokal veya yaygın	0	0
3	±	+	0
4	±	Yaygın	+

Stage 1: Fokal veya yaygın perivenüler alanda perisellüler fibrozis

Stage 2: Yaygın veya fokalden daha fazla periportal fibrozis

Stage 3: Fokal yada yaygın köprüleşme fibrozisi

Stage 4: Siroz

2.1.7. Klinik Seyir ve Prognoz

Hastalığın prognozu tam olarak bilinmemektedir, çünkü biyopsi ile izlenen uzun dönem çalışmalar az sayıdadır. Genellikle klinik olarak stabil seyreden NASH prognozunun, alkolik hepatitten belirgin olarak daha iyi olduğu düşünülür. Selim ve yavaş seyirli bir hastalık olarak kabul edilen NASH, fibrozise ve siroza ilerleme gösterebilmektedir (45)

103 hastanın dahil edildiği bir çalışmada hastalardan ortalama 3.2 yıllık aralarla seri biyopsi yapılmış ve bu hastaların %37'sinde fibrozis evresinin ilerlediği, %34'ünde değişmediği, %29'unda ise fibrozis evresinin gerilediği bildirilmiştir (70). 10 yıl süresince takip edilen NASH'lı hastaların %25'inde siroz geliştiği, %10-12'sinin ise karaciğer ile ilgili hastalıklar yüzünden yaşamını yitirdiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, karaciğer biyopsisinde fibrozisi olan hastalar 10 yıl izlenmiş ve bu hastaların %10'unda siroz geliştiği görülmüştür (71).

Roskams ve ark. (72) tarafından yapılan çalışmada, NASH oluşturulan hayvan modellerinin çoğunun siroz geliştirmeksizin hepatosellüler kanser geliştirdikleri görülmüştür. NASH, kriptojenik sirozun sebeplerinden biri gibi gözükmemektedir (73).

2.1.8. Tanı

Günümüzde, NASH tanısı için kullanılan en güvenilir yöntem karaciğer biyopsisidir (74). NASH tanısı konulmadan önce; viral hepatitler (Hepatit B, C, D), otoimmün hepatitler, Wilson hastalığı, herediter hemokromatoz, alfa-1 antitripsin eksikliği ile ilaç, toksin alımı ve alkol (kadınlarda>20 g/gün, erkeklerde>30 g/gün) kullanımının

dışlanması gerekir (67, 75). Noninvazif görüntüleme yöntemleri (ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve magnetik rezonans) hepatik steatoz tanısında kullanılabilir, fakat hiçbirisi NASH ve evresi hakkında güvenilir bilgi vermemektedir. Karaciğer biyopsisi, hastalığın tanısını koymak veya dışlamak için günümüzde tek geçerli yoldur. Biyopsi, hastalığın şiddetinin belirlenmesine ve prognostik bilgi sağlanmasına olanak sağlar (76, 77).

NASH tanı kriterleri (74, 78, 79):

1. Alkol alımının olmaması ya da ihmal edilebilir düzeyde (kadınlarda <20 g/gün, erkeklerde <30 g/gün) olması.
2. Kronik karaciğer hastalığının diğer nedenlerinin dışlanmış olması gerekir: Viral hepatitler, otoimmün hepatitler, Wilson hastalığı, hereditör hemokromatoz, alfa-1 antitripsin eksikliği, toksin alımı.
3. Karaciğer biyopsisinde inflamasyonla birlikte (lobuler veya portal) makroveziküler yağlanma görülmesi. Mallory cisimciği, fibrozis veya siroz eşlik edebilir fakat şart değildir.

2.1.9. Tedavi

NASH'ın tedavisinde, evrensel olarak kabul edilen bir tedavi modeli henüz bulunmamaktadır. Ne ülkemizde ne de dünyada bu hastalık için ruhsatlandırılmış bir ilaç yoktur. Son yıllarda, NASH'ın metabolik sendromun hepatik komponenti olduğu kabul edilmektedir ve tedavi için ilk basamağı insülin direnci, obezite, tip 2 diyabet, hiperlipidemi gibi risk faktörleri ile mücadele oluşturmaktadır. İlk seçilecek yaklaşım ise yaşam tarzı değişiklikleri olarak görülmektedir (80).

NASH'ta en sık kullanılan tedavi yaklaşımı kilo verme ve egzersizdir. Obez hastaların kilo vermesi önerilmektedir. Hızlı kilo kaybı, steatozu ve fibrozisi artırabilir. Kilo verme kademeli olarak (yavaş ve uzun süreli) yapılırsa, karaciğer histolojisinde iyileşme sağlamaktadır (81, 82).

NASH'ta insülin direncinin varlığından yola çıkarak, NASH tedavisinde insülin duyarlılığını etkilemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, metformin, rosiglitazon ve pioglitazon tedavileri denenmiş, fakat tam anlamıyla başarı sağlanamamıştır. Metformin, hepatik glukoneogenezi ve trigliserid üretimini azaltarak insülin duyarlılığında etkili bir biguaniddir. İnsülin duyarlılaştırıcı olan metformin

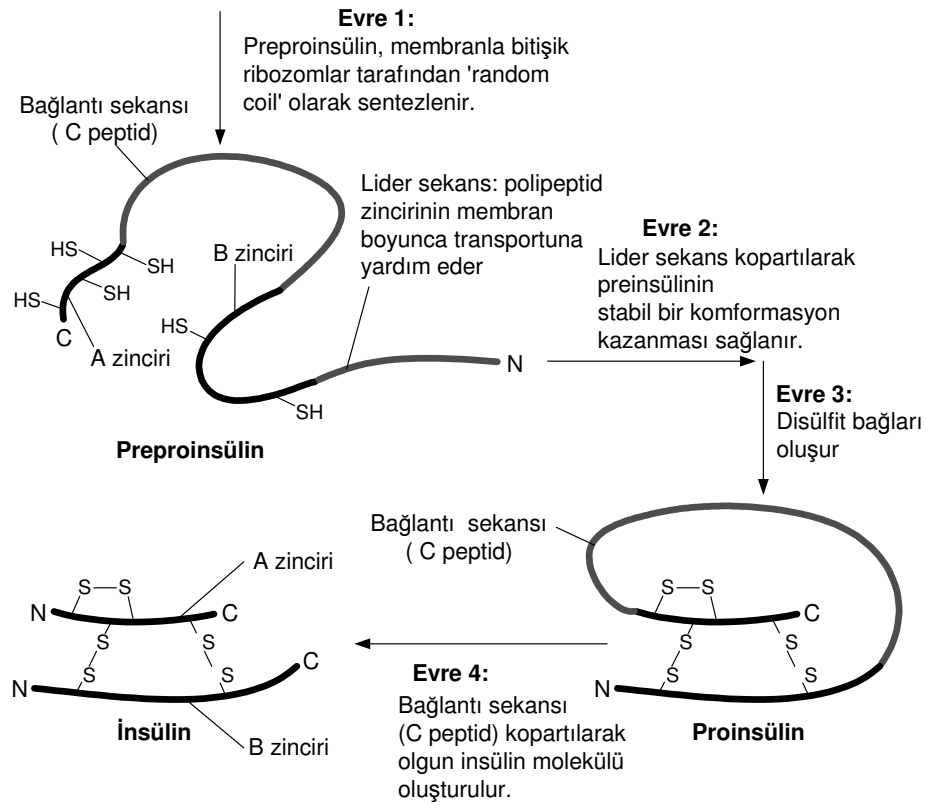
NASH tedavisi için sık kullanılan bir ilaçtır. 36 NASH'lı hastada 24 hafta boyunca 2x850 mg metformin ile yapılan bir çalışmada hastaların serum ALT ve AST seviyelerinde iyileşme görülmüş fakat nekroinflamatuvar aktivite ve fibrozis skorlarında gerileme görülmemiştir (83). Tedavide metformin kullanılan başka bir çalışmada, 15 hastaya bir yıl süresince metformin verilmiş 3 ayda aminotransferaz seviyelerinin düştüğü ve insülin duyarlılığında düzelme olduğu tespit edilmiştir, fakat tedavi kesildiğinde aminotransferaz seviyelerinin eski haline geri geldiği bildirilmiştir (84).

Günümüze kadar, NASH'ta tedavi olarak lipid düşürücü ajanlar olan klorofibrat, gemfibrozil ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri; hepatoprotektif ajanlar olan ursodeoksikolik asit, α -tokoferol, betain, β -karoten, selenyum, S-adenozil metiyonin, N-asetilsistein kullanılmış fakat henüz etkili tedavi yöntemi bulunamamıştır (85, 86).

2.2. İNSÜLİN DİRENCİ

2.2.1.İnsülin Molekülü ve Sekresyonu

İnsülin, 21 aminoasit içeren A ve 30 aminoasit içeren B peptid zincirlerinden oluşan bir hormondur. Pankreas β -hücrelerinin (Langerhans) ribozom membranları seviyesinde, preproinsülin olarak sentezlenir. Bu proteinin N-terminalindeki bir sekans, taşınmasına yardımcıdır. Membrandan ayrılınca, bu taşıyıcı sekans (leader sequence) koparak ayrılır ve disülfid bağları kurulur (proinsülin). Proinsülinin, insülinin biyolojik aktivitesinin %7-8'ine sahip olduğu bilinmektedir. Daha sonra, kan dolaşımına ulaşırken zincirin ortasındaki birleştirici veya bağlantı sekansı (Connecting sequence veya C-peptit) kopar ve bir dimer yapıya ulaşılır. Bu yapı, artık hormon etkisine sahiptir. Şekil 2.3.'te insülin sentezi görülmektedir.



Şekil 2.3. İnsülin sentezi (87)

Kan glukoz konsantrasyonunun yükselmesi, insülin sekresyonunun başlıca stimülanıdır. Bundan başka, bazı amino asitler (örn.: lösin), yağ asitleri ve keton yapılar da insülin sekresyonunu uyarırlar. Vagal stimülasyon da insülin serbestleşmesini indüklemektedir. İnsülin sekresyonu, katekolaminler ve somatostatin tarafından inhibe edilir.

Somatostatin, insülin ve glukagon sekresyonunu simltan biçimde inhibe etmektedir; somatostatinin bu ikili etkisi, net bir hipoglisemik sonuçtur ve gliseminin sürdürülmesinde glukagonun belirleyici rolünü ortaya koyar. Endojen insülinin dolaşımdaki yarı ömrü 3-5 dakikadır. Başlıca karaciğer, böbrek ve plasentada katabolize edilmektedir (87).

2.2.2. İnsülin Reseptörü ve Sinyal Mekanizması

İnsülin reseptörü, tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesidir ve disülfid bağları ile bağlı 2α ve 2β alt ünitesinden oluşan tetramerik bir glikoproteindir. α ünitesi tamamen ekstrasellülerdir ve insülin için bağlanma bölgesini içerir. β ünitesi ekstrasellüler,

transmembran ve intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip olan intrasellüler kısımlardan oluşmaktadır. İnsülinin α ünitelerine bağlanmasıyla, β ünitesinin sitoplazmik kısmındaki tirozin rezidülerinde otofosforilasyon başlar. Aktive olmuş β ünitesi, hücre içinde insülin reseptör substrat-1 (IRS-1), insülin reseptör substrat-2 (IRS-2) ve 9 adet hücre içi substrat ağında fosforilasyona neden olur (88, 89).

İnsülin reseptörlerinin sayısı ve duyarlılığı, insülin etkisinde önemlidir. İnsülin düzeyi kronik olarak yüksek ise, reseptör sayısı azalır. Çünkü, yüksek insülin düzeyleri reseptör yıkımını arttırmaktadır, böylece yüzey reseptörlerinin sayısı azaltılır (down regülasyon). Yüksek insülin düzeyi ve reseptöre azalmış bağlanma ile ilişkili durumlar; insülin direnci, obezite, aşırı karbohidrat alımı ve uzun süre yüksek dozda insülin kullanımıdır. (90)

2.2.3. İnsülinin Metabolik Etkileri

İnsülinin hedefindeki başlıca organlar; karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusudur. Bu organlar, insüline cevaplarında bazı farklılıklar sergiler. İnsülin vücutta iki farklı yolak ile etki gösterir; birincisi büyüme üzerindeki etkilerini ileten mitojenik, diğeri besin metabolizmasını düzenleyen metabolik yolaktır. Metabolik sinyal yolağında insülin; iskelet kası ve adipositlerde GLUT-4 içeren veziküllerin hücre membranına hareketine, glikojen ve lipid sentezinin artmasına ve diğere metabolik yolların uyarılmasına neden olur. İnsülinin genel metabolik etkileri şu şekilde sıralanabilir (88):

- 1.İnsülin karaciğerde, kaslarda ve adipositlerde cAMP konsantrasyonunu düşürür. cAMP'nin düşmüş konsantrasyonu, glikolizin anahtar-enzimlerinin defosforilasyonunu indükler.
- 2.Gliserol, alanin ve laktat gibi glukoneojenik prekürsörlerin üretimini azaltır.
- 3.Yağ dokusunda lipolizi engeller ve lipogenezi artırır. İnsülinin yağ dokudaki net etkisi, trigliserid depolanmasındaki artıştır.
- 4.Kasta, glukozun glikojen olarak depolanmasını indükler.
- 5.Ribozomal protein sentezini ve amino asit transportunu artırarak, kas dokuda protein sentezini artırır.
- 6.Hepatik ketojenezi azaltır.
- 7.Hepatik glikolizi uyarır.

8.VLDL sentezini artırır.

9.Karaciğerde trigliserid sentezini ve protein sentezini arttırır.

2.2.4. Direnç Mekanizmaları

Fizyolojik konsantrasyonlarda üretilen insüline karşı, normal biyolojik yanıtın bozulması durumuna insülin direnci denir. İnsülin direnci durumunda, insüline duyarlı dokularda insülinin metabolik etkileri bozulur. Pankreas daha fazla insülin salgılamaya yönelir ve hiperinsülinemi oluşur. Pankreasta bir bozukluk olmadığı sürece kompensatuar hiperinsülinemi ile normal karbohidrat metabolizması devam eder. β hücresinde bir defekt var ise, bir süre sonra β hücresi kompensatuar hiperinsülinemiyi sağlayamaz. Bu durumda, insülin direnci, bozulmuş glukoz toleransı veya tip 2 diyabet gelişebilir (91, 92).

İnsülin direncinin moleküler patogenezi, multifaktöriyeldir. İnsülin direnci, hücresel olarak preresptör, reseptör ve postreseptör olmak üzere üç düzeyde sınıflandırılmaktadır.

1.Preresptör Düzeyinde İnsülin Direnci: İnsülin sentezinde sorun vardır. İnsülin genindeki yapısal mutasyonlar, proinsülin-insülin dönüşüm bozukluğu insülin sentezini defektif hale getirir. Dolaşımdaki kortizol, büyüme hormonu, glukagon, katekolamin gibi hormonal insülin antagonistleri; serbest yağ asitleri, anti insülin antikorları ve insülin reseptör antikorları gibi hormonal olmayan insülin antagonistleridir. Ayrıca, iskelet kası kan akımı bozuklukları ve kapiller endotel hücreleri bozuklukları preresptör düzeyde insülin direnci nedenleridir (93).

2.Reseptör Düzeyinde İnsülin Direnci: İnsülinin bağlanmasında sorun vardır. Reseptör sayısının azalması ya da reseptör mutasyonları nedeniyle gelişebilir.

3.Postreseptör Düzeyinde İnsülin Direnci: Son yıllarda, insülin direncinin oluşmasında postreseptör düzeydeki defektlerin esas önemli faktör olduğu saptanmıştır. Postreseptör düzeydeki defektler: İnsülin reseptör tirozin kinaz aktivitesinin azalması; insülin reseptör sinyal iletim yolunda bozukluk; glukoz transportunda azalma; glukoz fosforilasyonunda azalma; glikojen sentetaz aktivitesinde bozulma; glikoliz/glukoz oksidasyonunda defektlerdir (94, 95).

Vücutta başlıca üç hedef dokuda insülin direnci gelişir, bunlar; karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusudur (89).

Karaciğerde İnsülin Direnci

Kan glukozunun düzenlenmesinde primer etkili organ karaciğerdir. Hepatositlerde, GLUT-2 taşıyıcıları olduğundan, karaciğer dokusu glukoz için çok geçirgendir. GLUT-2'nin glukozu afinitesi çok düşüktür ve bu yüzden sadece kan glukozunun yüksek olduğu durumlarda taşıyıcı protein olarak görev yapmaktadır (87).

İnsülin direnci durumunda, insülin lipoprotein lipaz enzimini yeteri kadar suprese edemediğinden, abdominal yağ hücrelerinden serbest yağ asidi salınımını da engelleyemez. Açığa çıkan serbest yağ asitleri, hem karaciğerde VLDL sentezinin ve sekresyonunun artmasına, hem de karaciğerde yağ birikimine neden olur. İnsülin direnci olan bireylerde düşük yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyleri, artmış serbest yağ asidi düzeyleri ve hipertrigliseridemi mevcuttur (96).

İskelet Kasında İnsülin Direnci

İnsülin, iskelet kasında GLUT-4 glukoz taşıyıcılarının plazma membranına yer değiştirmesini sağlayarak glukoz alımını uyarır. İnsülin direncinde, kasta GLUT-4 translokasyonunda sorun vardır. İnsülin direnci durumunda kasta glukoz kullanımı belirgin oranda bozulur ve glukozun glikojen olarak depolanması yaklaşık %50 oranında azalır (97, 98).

Yağ Dokusunda İnsülin Direnci

İnsülin, yağ dokusunda lipolizi engeller ve lipogenezi artırır; insülin direnci durumunda ise, insülinin antilipolitik etkisine karşı direnç gelişir. Plazma serbest yağ asitleri yükselir ve serbest yağ asidi oksidasyonu artar. Yağ dokusu insülin direncine sadece serbest yağ asitleri üreterek değil ayrıca, endokrin organ rolüyle de katkı sağlar. Çünkü, yağ dokudan insülin sinyalizasyonunu etkileyen adipokinler salgılanmaktadır. Yağ dokuda, insülin direncinin postreseptör seviyede olduğu bildirilmiştir (99).

2.2.5. İnsülin Direnci Ölçüm Yöntemleri

İnsülin direncini ölçmede kullanılan yöntemler şunlardır (100):

İndirekt yöntemler:

- Açlık insülin düzeyleri ölçümü
- İnsülin-glukoz-c peptid oranlarına göre insülin direnci ölçümü
- Oral Glukoz Tolerans Testi'nde (OGTT) 1. saat insülin düzeyi

Direkt yöntemler:

- Hiperinsülinemik Öglisemik Klemp Testi (HECT)
- Minimal Model (Sık Aralıklarla İntravenöz Glukoz Tolerans Testi)
- Glikozun Sürekli İnfüzyon Modeli (CIGMA)
- İnsülin Tolerans Testi
- HOMA

2.2.6. Homeostasis Model Assesment

Matthews ve ark. (101) tarafından 1985'te tanımlanan HOMA testi, geniş hasta popülasyonlarına uygulanabilen bir testtir. Hem insülin direncini, hem de β hücre fonksiyonunu ($\% \beta$) gösterebilen ve diğer yöntemlere göre daha kolay olan bu yöntemde, açlık glukoz ve insülin düzeyleri kullanılarak insülin direnci saptanır. Epidemiyolojik çalışmalarda, sağlıklı bireylerin ve değişik düzeyde glukoz toleransı olanların insülin direnç durumları HOMA-IR indeksi kullanılarak araştırılmıştır. HOMA-IR için, 2.7 ve üzerindeki değerler insülin direnci olarak kabul edilmektedir (102). HOMA-IR ve HOMA- $\% \beta$ değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplanır (103):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Açlık glukozu (mmol/L)} \times \text{Açlık insülini (}\mu\text{U/mL)}] / 22.5$$

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Açlık glukozu (mg/dL)} \times \text{Açlık insülini (}\mu\text{U/mL)}] / 405$$

$$\text{HOMA-}\% \beta = [20 \times \text{Açlık insülini (}\mu\text{U/mL)} / \text{Açlık glukozu (mmol/L)} - 3.5]$$

2.3. OSTEOKALSİN

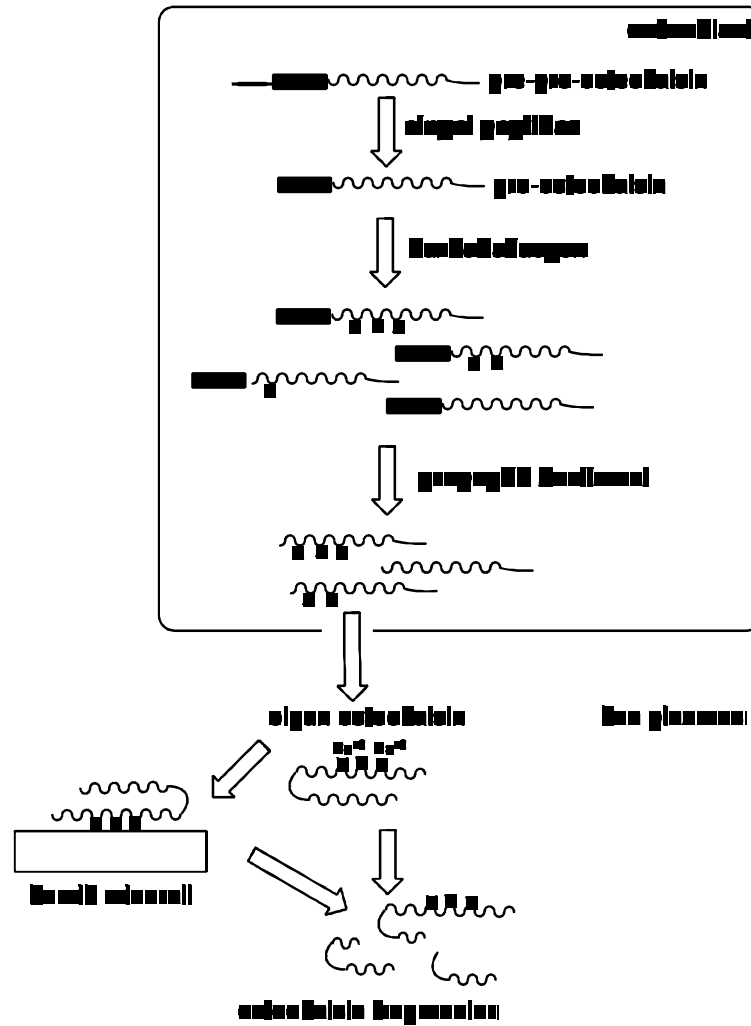
2.3.1. Osteokalsinin Yapısı ve Sentezi

Osteokalsin (kemik γ karboksi glutamik asit proteini veya BGP), osteoblastların spesifik ürünü olan ve 49 aminoasit rezidüsü içeren, 5800 Dalton ağırlığında, kollajen kaynaklı olmayan küçük bir proteindir (104). Daha çok olgun osteoblastlar tarafından sentezlenirken, osteosit, hipertrofik kondrosit, sementoblast ve odontoblastlar tarafından da sentezlenmektedir. Osteokalsin geni 1. kromozom (1q25-q31) üzerinde lokalizedir ve transkripsiyonu 1,25-dihidroksi D_3 tarafından düzenlenir (105, 106).

Şekil 2.4.'te osteokalsin sentezi görülmektedir. Osteokalsin önce preproosteokalsin (98 rezidü) olarak sentezlenir, endoplazmik retikulumda sinyal dizisi (23 rezidü) çıktıktan sonra, proosteokalsine dönüşür. Proosteokalsin (26 rezidü) karboksilasyon için tanıma dizisi) vitamin K bağımlı posttranslasyonel modifikasyona uğrar (105).

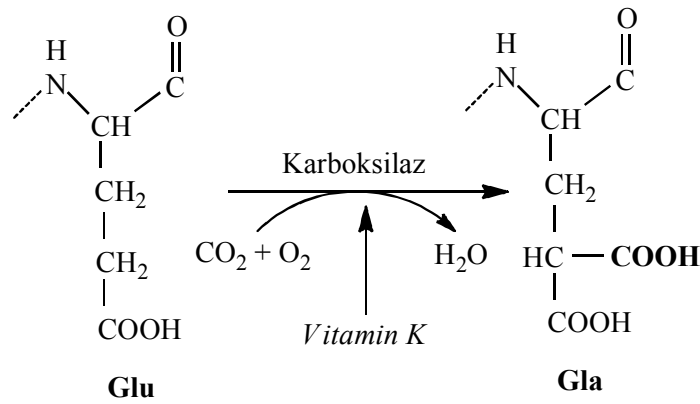
Vitamin K, γ -glutamil karboksilaz enzimi için bir kofaktördür (Şekil 2.5.). Posttranslasyonel modifikasyon sırasında 17, 21 ve 24. pozisyonda 3 adet glutamik asit kalıntısı karboksilasyon ile gama karboksi glutamik asiti (Gla) oluşturur (107). Bu üç glutamik asit rezidüsünün hepsi, ikisi ya da sadece biri karboksilasyona uğrayabilir.

Olgun osteokalsin (49 rezidü), genellikle üç γ -karboksi glutamik asit rezidüsü içerir ve bu rezidüler Ca^{+2} bağlamaya duyarlıdır. Osteokalsinde α -helikal yapılanma mevcuttur ve Cys₂₃-Cys₂₉ arasında disülfid bağı bulunur (Şekil 2.6). Bu konformasyon, Ca^{+2} 'nin ve diğer spesifik katyonların anyonik bir molekül olan osteokalsine bağlanması için gereklidir ve bu şekilde kemik mineralizasyonu gerçekleşir. Yeni sentezlenen osteokalsinin yaklaşık %20-30'u dolaşıma salınırken kalan kısım hidroksiapatit içine yerleşir (108, 109).



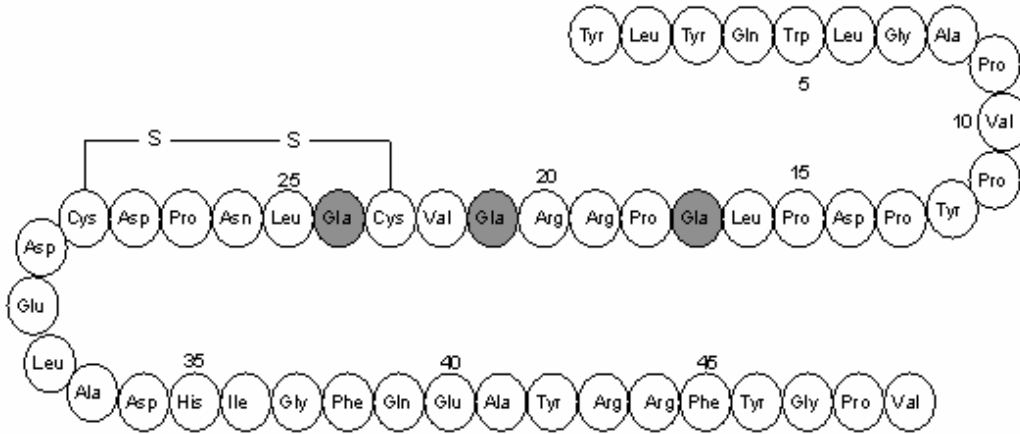
Şekil 2.4. Osteokalsin sentezi

Dolaşımdaki osteokalsinin heterojenitesi ilk olarak 1985 yılında bildirilmiştir (110). 49 amino asit rezidüsüne sahip, yeni sentezlenen ve dolaşıma katılan olgun osteokalsin, intakt osteokalsin olarak adlandırılır. Dolaşımda intakt osteokalsin 19-20 ve 43-44 bölgelerinden kesime uğrayabilir. C-terminal bölgesi (43-44) hızlıca kesilebilir, 19 ve 20. pozisyonlardaki arjininlerden dolayı, N-terminal bölgesi kesilmeye karşı daha dayanıklıdır (111). Osteokalsin fragmanları, kemik yıkımından veya molekülün böbrek ve karaciğer ile yıkımı öncesi kendi katabolizmasından kaynaklanmaktadır. Total osteokalsin, karboksillenmiş ve karboksillenmemiş osteokalsini (undercarboxylated osteocalcin, ucOC) içerir (105, 112).



Şekil 2.5. Vitamin K bağımlı karboksilasyon prosesi

İnsan osteokalsini bir molekülünde en fazla üç Gla residüsü içerebilir. ucOC, 3'ten daha az (hiç, 1 ya da 2) karboksillenmiş kalıntı içeren şekilleri tanımlar. Karboksilasyon, osteokalsini anyon haline getirir ve bu durum molekülün pozitif yüklü kalsiyuma yüksek ilgi göstermesini sağlar. Dekarboksilasyon, osteokalsinin hidroksiapatite olan ilgisini azaltmaktadır. Tamamen karboksillenmiş osteokalsinin daha fazla oranda kemik matriksinde, ucOC'in ise daha yüksek oranda dolaşımda bulunduğu bildirilmektedir (113, 114).



Şekil 2.6. Osteokalsin amino asit dizilimi

2.3.2. Osteokalsin Ölçümü

Osteokalsin, çeşitli metabolik kemik hastalıklarında, osteoblast işlevinin duyarlı ve spesifik bir göstergesidir. Osteokalsin eskiden sadece bir kemik yapım belirteci olarak kabul edilse de, kemik yıkımının arttığı durumlarda da serum seviyeleri yükseldiği için, günümüzde hem yapım hem de yıkım prosesleriyle ilişkili bir molekül olarak kabul edilmektedir (115, 116).

Osteokalsinin dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 5 dakikadır, yıkımı primer olarak böbrekler yoluyla olur. Kronik böbrek yetmezliğinde, serum osteokalsin düzeyleri yüksek bulunur. Serum düzeyleri, pubertede, hızlı iskelet gelişimi sırasında, hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, kırıklar, renal osteodistrofi, Paget hastalığı, akromegali gibi kemik döngüsünün arttığı durumlarda genellikle yüksektir. D vitamini kullanımı ve tiroid hormon tedavisi osteokalsin seviyelerini arttırıcı etki gösterir. Karaciğer sirozunda osteokalsin seviyeleri düşmektedir (114, 117).

Postmenapozal osteoporozda osteokalsin düzeyleri düşük, normal ve yüksek seviyelerde olabilmektedir. Östrojen kullanımı, kortikosteroid, bifosfonat ve kalsitonin tedavisi osteokalsin seviyelerini azaltır (118).

ucOC, K vitamini yetersizliğinin göstergesi olarak kabul edilir ve ucOC seviyeleri, kemik mineral yoğunluğu ile negatif korelasyon göstermektedir. K vitamini yetersizliğinde ucOC seviyeleri artar, ucOC seviyeleri arttıkça kırık riski artmaktadır

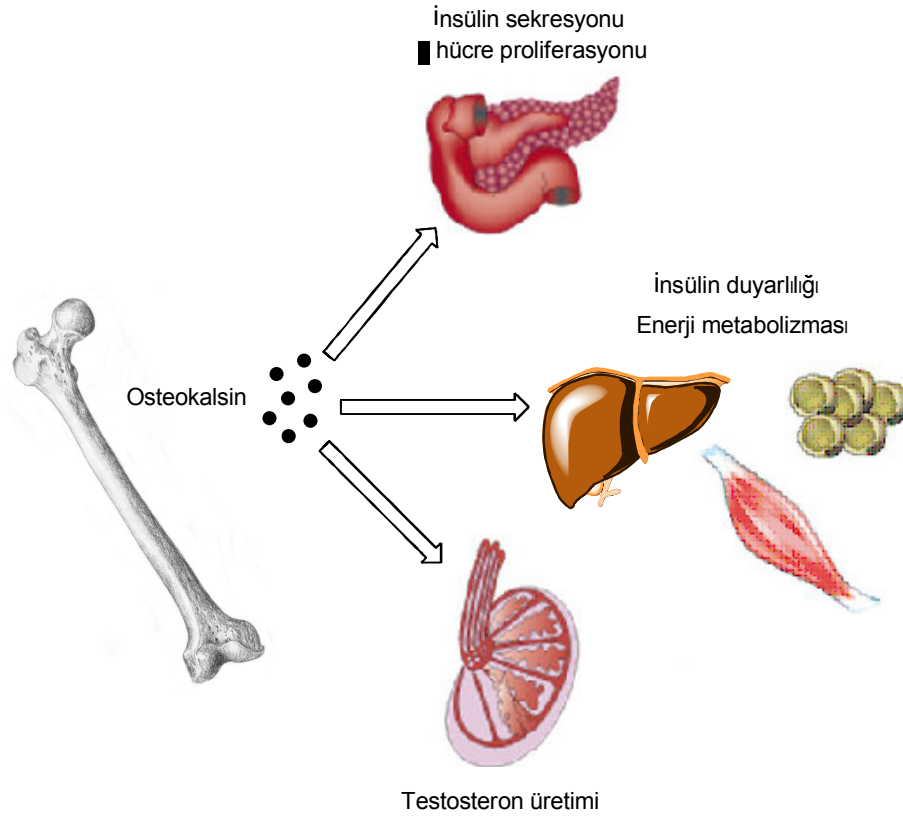
(119). Yaşlı Japon kadınlarında, vitamin K yetersizliğinde ucOC seviyelerinin arttığı ve omurga kırığı riskinin yükseldiği bildirilmiştir (120).

Serum, osteokalsin ölçümü için en yaygın numunedir, ayrıca heparinli plazma bazı metotlarda kullanılır (121). Osteokalsin aktivitesinin oda ısısında 6-24 saatte %50-%70, 4⁰C’de 2 hafta içinde %40-%80 azaldığı bildirilmiştir. Trasylol ve karışık proteaz inhibitörlerinin osteokalsin stabilitesini koruduğu bildirilmiştir (122). Osteokalsin düzeyleri yaş, cinsiyet ve diurnal varyasyon ile değişir. Osteokalsin düzeyleri, sabah 4’te en yüksek seviyelerde bulunurken, öğleden sonra en düşük seviyelere gelir. Bu nedenle, deney protokollerinde kan alma zamanı dikkatli planlanmalıdır. Gebelik, menstrual döngü ve böbrek fonksiyonları osteokalsin düzeylerini etkiler. En yüksek seviyeler çocuklarda gözlenir, hızlı büyüme döneminde çok yüksek osteokalsin seviyeleri görülmektedir (121).

2.3.3. Osteokalsin ve Enerji Metabolizması

2007 yılında Lee ve ark. (8) tarafından yayınlanan “Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton” isimli makale, kemik ve enerji hemostazının birbiriyle olan ilişkisini göstermek açısından önemlidir. Bu çalışma sonuçlarından yola çıkılarak, iskeletin enerji metabolizmasını regüle edebileceği ileri sürülmüştür. Lee ve ark. (8) yaptıkları çalışmada, osteokalsin -/- fareler üretilip bu fareleri incelemişlerdir. Osteokalsin -/- farelerde; azalmış β hücre proliferasyonu, insülin direncinde artış, karaciğer ve kas dokusunda insülin hedef genleri (*Foxa2*, *Mcad*, *Nfya* gibi) ifadesinde ve adipoz dokuda adiponektin gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Bu mutant farelerin anormal miktarda visseral yağ dokusuna sahip oldukları saptanmıştır.

Osteokalsinin, hem insülin üretimi hem de insülin duyarlılığı üzerine olumlu etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Hayvan modeli çalışmalarda, osteokalsinin β hücre fonksiyonları, insülin duyarlılığı, adiponektin üretimi, enerji harcaması ve yağ doku ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.7.) (123-125). Ferron ve ark. (9), rekombinant ucOC verilen farelerde insülin sekresyonunun arttığı, kan glukoz seviyelerinin azaldığı ve β hücre proliferasyonunda artış, ayrıca obezite gelişiminde azalma görüldüğünü bildirmişlerdir (9). İnsanlarda, dolaşımdaki total osteokalsin seviyeleri ile HOMA-IR ve vücut kitle indeksi (VKİ) değerleri arasında negatif korelasyon bulunduğu çeşitli çalışmalarla tespit edilmiştir (12, 126-128).



Şekil 2.7. Osteokalsin ve genel metabolik etkileri

Tip 2 diyabetli hastalarda, total osteokalsin seviyelerinin düşük olduğu ve glisemik kontrol ile osteokalsin seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (10). Metabolik sendrom ve osteokalsin üzerine çalışmalar giderek artmaktadır. 2010 yılında yapılan bir çalışmada; metabolik sendromlu bireylerde osteokalsin seviyelerinin VKİ, glukoz, trigliserid ve leptin düzeyleri ile negatif; adiponektin düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (129).

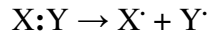
2.4. 8-HİDROKSİDEOKSİGUANOZİN

Bir bağın yapısına iki elektron girebilir ve bu iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi, aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri oldukça karardır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları, elektron çifti halinde bulunur. Bir bağ koptuğunda ise elektronlar ya birlikte kalır ya da ayrılırlar. Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar (130).

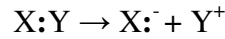
Organizmada normal şartlar altında sürekli oluşan ve yaşam için gerekli olan serbest radikaller; elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Serbest radikaller; ilaçlar, radyasyon, sigara dumanı, besinler ve hava kirliliği gibi çevresel faktörlere bağlı olarak da oluşabilirler (131).

Serbest radikal oluşumu, üç yolla meydana gelir (132):

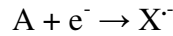
- Kovalent bağlı bir molekülün, homolitik bölünmesi:



- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:



- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:



Serbest radikaller denince, radikal olmaya çok uygun olduğu için oksijen (O₂), daha genel bir anlatımla ROT ifade edilmektedir. ROT'un yanı sıra; karbon, nitrojen ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır. Moleküler oksijen, elektron transferiyle suya kadar indirgenir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar; süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Bunlar ROT olarak adlandırılırlar. Oksijene bir elektronun aktarılmasıyla süperoksit, iki elektron aktarılmasıyla hidrojen peroksit, üç elektronun aktarılmasıyla hidroksil oluşur. Oksijen dört elektron alarak tümüyle indirgenirse su oluşur (133).



Kararsız yapıları nedeniyle kısa ömürlü ve çok reaktif olan radikaller; amino asitler, proteinler, serbest yağ asitleri, lipidler, karbohidratlar ve nükleotidler gibi tüm hücre bileşenleriyle etkileşebilirler. Serbest radikallerin en temel etkileri, lipid peroksidasyonu, proteinler arasında disülfid bağı oluşumu ve DNA hasarıdır (134).

Stabil bir molekül olan DNA, spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10³ kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür. ROT'un artması, antioksidan enzim düzeylerinin azalışı ve DNA

onarım mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda oksidatif DNA hasarlarının artmasına neden olmaktadır. Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olabilirler ve bu sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Oksidatif DNA hasarının mutajenez, karsinogenez, yaşlanma ve karaciğer hastalıklarının gelişiminde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir. Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (135, 136).

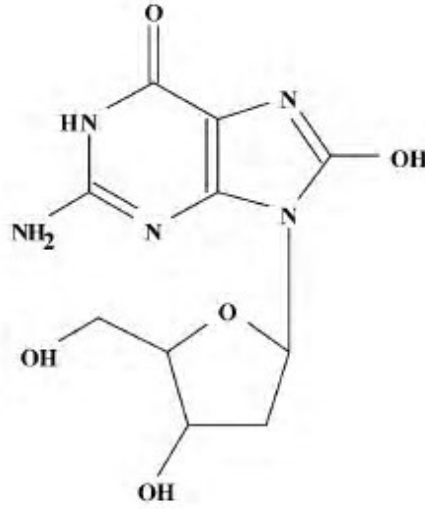
Farklı radikal metabolitlerin DNA hasarlarına neden oluş mekanizmaları da farklıdır. DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksit (NO) veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrik asit (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler (137).

Hidroksil radikalleri, en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır. DNA'nın pürin ve pirimidin bazlarıyla etkileşime girebilir. Organizmada hidroksil radikalleri birkaç yolla oluşabilir (138):

- Suyun hidroliziyle ya da parçalanmasıyla hidrojen radikalleri ve hidroksil radikalleri oluşturabilir.
- Hidrojen peroksit ve demirin birleşmesiyle oluşabilir (Fenton reaksiyonu).
- Demir gibi metal iyonlar varlığında süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin reaksiyona girmesiyle de oluşturulur (Haber-Weiss reaksiyonu).

DNA, hidroksil radikallerinin oluşturduğu hasarlara karşı oldukça hassastır. Hidroksil radikali; DNA'da zincir kırılması, abazik alanların oluşması, bazların hidroksilasyonu ve DNA-protein çapraz bağları gibi çok sayıda modifikasyona neden olabilir. Guanin, DNA bileşenleri içerisinde oksidasyona en yatkın olan bazdır. 8-OHdG, DNA'da guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalının bağlanması sonucu oluşur (Şekil 2.8.). DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır yani premutajenik etki gösterir. 8-OHdG hem hücre içi oksidatif DNA hasarı hem de onarım seviyesinin göstergesidir. Ekzonükleazların okside olmuş DNA'yı

onarımı sırasında, 8-OHdG diziden çıkarılır. Onarım sırasında 8-OHdG formunda atılan bu nükleotitler DNA'daki hasar miktarının belirlenmesinde kullanılır (139-141).



Şekil 2.8. 8-hidroksideoksiguanozin

2.5. SİTOKİNLER

Sitokinler, 10 ile 40 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip ve yapısal olmayan küçük proteinlerdir. Sitokinlerin birincil üretim yeri lökositlerdir. Endotel hücreleri, fibroblastlar, Schwann hücreleri ve ayrıca çeşitli dokuların epiteli tarafından da üretilirler. Etkilerini hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanarak gösterirler (16, 142).

Sitokinlerin çeşitli biyolojik etkileri vardır, bunlar; hücre proliferasyonunun stimülasyon veya inhibisyonu, sitotoksite/apoptoz, hücre büyümesi ve farklılaşması, antiviral aktivite, inflammatuar yanıt, antiinflammatuar aktivite, membran yüzey proteinlerinin ekspresyonunun upregülasyonu şeklinde sıralanabilir (143).

IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler, proinflammatuar sitokinler olarak bilinir. Proinflammatuar sitokinler, inflammatuar değişikliklerin oluşmasında, hızlı bağışıklık yanıtının oluşmasında rol alırlar. IL-4, IL-10, IL-13 gibi sitokinler, antiinflammatuar sitokinler olarak bilinir. Antiinflammatuar sitokinler, bağışıklık yanıtını ve bazı sitokinlerin sentezini baskılayabilirler. IL-8 gibi bazı sitokinler ise, hem proinflammatuar hem de antiinflammatuar etkinlik gösterebilirler (17, 144).

2.5.1. İnterlökin-10

IL-10 antiinflamatuvar ve immün baskılayıcı bir sitokindir. IL-10 geni 1. kromozom (1q31-q32) üzerinde lokalizedir. Fonksiyonel IL-10 molekülü, 37 kDa ağırlığında 160 amino asit içeren bir dimerdir. Çeşitli doku ve organlarda, farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda endojen modülatör olarak rol oynar. IL-10, antiinflamatuvar etkisini IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 ve interferon gama gibi inflamasyon medyatörlerini inhibe ederek gösterir (145).

Monositler, makrofajlar, T ve B lenfositler IL-10 üreten esas hücrelerdir, ayrıca bazı hücre tipleri ve organlar belirli koşullarda IL-10 üretmektedir. Karaciğerde; hepatositler, sinüzoidal endotelyal hücreler, Kupffer hücreleri, stellat hücreleri ve karaciğer infiltratif lenfositlerinde IL-10 tespit edilmiştir (146).

IL-10'un karaciğeri koruyucu rolü vardır. Steatoz oluşturulan farelerde IL-10 inhibisyonunun, inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun arttığı, insülin sinyal yolunda bozukluk olduğu ve glukoneojenik yolların uyarıldığı gösterilmiştir. Diyetle steatoz oluşturulan IL-10 knockout farelerde IL-10'un steatoz için koruyucu bir faktör olduğu tespit edilmiştir (19). Son yıllarda, IL-10 seviyelerinin insülinin karaciğer ve kastaki etkisi ile direkt ilişkili olduğu ve ekzojen IL-10'un insülin duyarlılığını iyileştirdiği bildirilmiştir (147). Düşük IL-10 seviyeleri metabolik sendrom ve Tip 2 DM ile ilişkilidir (148, 149).

2.5.2. İnterlökin-1 β

İnterlökin 1 sitokin ailesinin bir üyesi olan IL-1 β , 31 kDa ağırlığında prekürsör olarak sentezlenir ve daha sonra 17 kDa ağırlığındaki olgun formuna dönüşür. IL-1 converting enzim (ICE) ile aktif forma dönüştürülen IL-1 β , sistemik bir hormon gibi davranır. Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β 'in etkileri sadece inflamasyon ile sınırlı olmayıp, hematopoez, kemik metabolizması, leptin sekresyonu, T hücre aktivasyonu, B hücre proliferasyonu ve sitokin aktivasyonu gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (150). IL-1 vücut ısısının yükselmesine yol açtığı için "endojen pirojen" olarak da adlandırılan en güçlü inflamatuvar sitokindir (151).

Düşük dozlarda; lokal inflamasyon medyatörüdür. Enfeksiyon, travma, iskemi veya toksinler ile uyarıldığında, lokal inflamasyon bölgesinde üretilen IL-1 β hedef endotelde inflamatuvar medyatörlerin oluşumunu başlatır. Akut ve otoinflamatuvar pek çok hastalıkta IL-1 β 'nın bloke edilmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (152, 153).

2.5.3. TNF- α

TNF- α ilk önce 26 kDa'lık bir transmembran monomeri olarak sentezlenir. TNF- α dönüştürücü enzim aracılığı ile proteolitik bölünme sonucu 17 kDa'luk çözülebilir TNF- α molekülü üretilir (154).

Aktif makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri tarafından sentez edilebilen bir sitokin olan TNF- α 'nın primer sentez yeri, makrofajlar ve monositlerdir. İnflamatuvar hücrelerin damar adezyonunu, polimorfonükleer lökositlerin antikor bağımlı sitotoksitesini artırır. TNF- α , lökositleri hasar bölgesine çekerek kemotaktik rol oynar (155).

TNF- α , hedef dokunun insüline olan cevabını etkiler. Yüksek TNF- α düzeylerinin insülin direnci ve obezite ile ilişkili olduğu, hayvan ve insan çalışmaları ile gösterilmiştir. TNF- α , inhibitör kappa kinaz β (IKK- β)'yı artırarak adiposit ve hepatositlerde IRS-1 ve IRS-2'nin tirozin fosforilasyonunu azaltır. Bu şekilde insülin direncine katkıda bulunur. TNF- α promotor bölgesinde, 238 ve 308 pozisyonlardaki polimorfizm insülin direnci ile ilişkilidir. Obezlerde kilo kaybı ile TNF- α seviyeleri azalmaktadır (156, 157).

Karaciğer, doğrudan hepatositler ve Kupffer hücreleri ile ya da abdominal yağ aracılığı ile dolaylı yoldan TNF- α sentezleyebilmektedir. Hayvan ve insan çalışmaları TNF- α 'nın yağlı karaciğer ve NASH gelişiminde önemli bir faktör olduğunu göstermiştir (36). Anti TNF- α antikorları verilen NASH'lı rat modellerinde; inflamasyon, nekroz ve fibrozisin azaldığı tespit edilmiştir (17).

2.5.4. İnterlökin-6

IL-6, çeşitli dokulardan sentezlenebilen, 26 kD ağırlığında proinflamatuvar bir sitokindir. Fibroblastlar, endotel hücreler, lökositler, miyositler, hepatositler ve osteoklastlar gibi çok sayıda hücre IL-6 sentezleyebilmektedir. Adipositlerde, diğer hücrelere göre daha fazla miktarda IL-6 üretilir. Yağ dokuda IL-6, lipoprotein lipaz aktivitesini azaltır ve akut faz protein sentezini stimüle eder. Özellikle visseral yağ dokudan salgılanan IL-6,

portal yol ile karaciğere gelir. IL-6 ve TNF- α , inflamasyonda birlikte etki gösterirler (143, 151, 158).

IL-6'nın en iyi bilinen etkileri B lenfositler ve hepatositler üzerinedir ki; IL-6, akut faz yanıtına katkıda bulunan pek çok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olur. IL-6, karaciğer glukoz homeostazında ve yağ metabolizmasında rol oynamaktadır. IL-6 artışı, glikojen fosforilaz aktivitesini uyararak hepatik glukoz üretiminde artış yapar. Karaciğerde, trigliserid sentezini ve sekresyonunu, prokoagülan madde sentezini arttırır ve hipertrigliseridemiye neden olur (144).

IL-6'nın dolaşımdaki seviyeleri, alkolik ve nonalkolik steatohepatitte yükselmektedir. IL-6'nın kısa süreli hepatoprotektif etkileri olduğu bilinmektedir. Yüksek IL-6 seviyelerinin karaciğer hasarına katkıda bulunduğu veya antiinflamatuvar bir cevabı temsil edip etmediği henüz aydınlatılamamıştır (17, 36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan (Etik Kurul Onay No: 2011/243) ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje No: TSD-11-3708) bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ölçümlerde, ELISA okuyucu (Tecan SLT SPECTRA), ELISA yıkayıcı (Tecan), santrifüj (nüve NF 400 R), buzdolabı (Arçelik), -40⁰C derin dondurucu (REVCO ULT 1740-5-V40), manyetik karıştırıcı (Labor-Brand Model L-81), etüv, değişik ölçü ve markalarda otomatik pipetler, kronometre, cam pipetler, mezür, beherler, ependorf ve polistren tüpler kullanıldı.

Çalışmada kullanılan çözeltiler, deiyonize su ile hazırlandı. Çalışmada kullanılan tüm cam malzemeler deiyonize su ile yıkandıktan sonra, bir gün boyunca %20'lik HNO₃ içinde bekletildi ve sonrasında tekrar deiyonize su ile yıkandı ve sırasıyla Tip II ve Tip I saf su ile 3 kez yıkanarak demineralize edildi. Ölçümlerde kullanılan çözelti ve tamponlar, Tip I saf su ile hazırlanarak çalışma süresince soğuk odada saklandı. Dayanıklılığı kısa süreli olan çözeltiler ise çalışma sırasında hazırlanarak kullanıldı.

3.2. ÇALIŞMA GRUBU

Hasta Grubu

Bu çalışmaya Nisan 2011-Nisan 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve yeni nonalkolik steatohepatit tanısı alan 14'ü kadın, 14'ü erkek toplam 28 hasta dahil edildi. NASH ön tanısı alan hastaların karaciğer biyopsileri, lokal anestezi altında ultrason rehberliğinde yapılmıştır. Biyopsi materyallerinin hepsi, aynı uzman patoloğ tarafından değerlendirilmiştir. Hastaların hiçbirinde siroza rastlanmamıştır. Hastaların karaciğer biyopsi bulguları Tablo 3.1.'de görülmektedir.

Tablo 3.1. Hastaların histopatolojik bulguları

	NASH (n=28)
Steatoz derecesi	
1	18 (%64.28)
2	8 (%28.57)
3	2 (%7.14)
Nekroinflamasyon derecesi	
1	10 (%35.71)
2	14 (%50)
3	4 (%14.28)
Fibrozis evresi	
0	10 (%35.71)
1	12 (%42.85)
2	3 (%10.71)
3	3 (%10.71)
4	0

Hastaların hepsi, çalışmanın amacı ve yöntemi anlatılarak bilgilendirildi ve gönüllü olur formları alındı. Hasta grubunu oluşturan bireylerden tanı sonrası, herhangi bir tedaviye başlamadan, bir kez sabah açlık kanları alındı.

Kontrol Grubu

Rutin biyokimya sonuçları normal sınırlar içinde bulunan, sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, 18 yaş üstü, sağlıklı ve NASH'lı hastaların yaş ve cinsiyet dağılımına benzer şekilde seçilen 10'u bayan, 10'u erkek toplam 20 gönüllü, kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunu oluşturan bireylerden gönüllü olur formları alınarak, bir kez sabah açlık kanları alındı.

HOMA-IR=[Açlık glukozu (mg/dL) x Açlık insülini (μ U/mL)]/405 formülü kullanılarak hasta ve kontrol grubundaki bireylerde HOMA-IR değerleri hesaplandı. HOMA-IR $\geq$ 2,7 değeri insülin direnci olarak kabul edildi (102).

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin VKİ'leri (Ağırlık/Boy² kg/m²) hesaplandı. VKİ değerleri 18,5–24,9 kg/m² arası olanlar normal, 25–29,9 kg/m² arası olanlar fazla kilolu, $\geq$ 30 kg/m² olanlar obez olarak kabul edildi (159).

3.3. YÖNTEM

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden, yapılacak analizlere uygun şekilde, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere ve düz biyokimya tüplerine kan örnekleri alındı. Hasta ve kontrol gruplarından alınan venöz kan örnekleri, +4⁰C'de 10 dakika 3000 rpm' de santrifüj edildi. Serum örneklerinden bir kısmı ile rutin analizler yapıldı. Diğer serum ve plazma örnekleri ise alikotlara ayrılarak -40⁰C'de saklandı. Total osteokalsin ölçümü için kullanılacak olan plazmalara, proteaz inhibitörü olan aprotinin ilave edildi (1 mL örnek için 100 μ L) ve bu şekilde saklandı.

Çalışma gruplarına ait plazma ve serum örneklerinde yapılan analizler

- Rutin Biyokimya Analizleri
- Biyokimyasal Çalışma

olmak üzere iki başlık altında toplandı.

3.3.1. Rutin Biyokimya Analizleri

Hasta ve kontrol grubunun serum örneklerinde glukoz, insulin, total kolesterol (TC), trigliserid (TG), HDL, LDL, AST, ALT, GGT, total bilirubin, direkt bilirubin ölçümleri yapıldı.

Glukoz, TK, TG, HDL, LDL, GGT, AST, ALT, total bilirubin, direkt bilirubin ölçümü Olympus AU 640 otoanalizöründe uygun ticari kitler kullanılarak yapıldı. İnsülin ölçümleri, Siemens Advia Centour XP otoanalizöründe çalışıldı.

3.3.2. Biyokimyasal Çalışma

Çalışma gününe kadar dondurularak saklanan serum ve plazma örneklerinde total osteokalsin, ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 düzeyleri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemleri kullanılarak ölçüldü.

3.3.2.1. Total Osteokalsin Ölçümü

Total osteokalsin düzeyi, INVITROGEN marka (Katalog No: KAQ1381) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Metot sandviç prensibine dayalı katı faz ELISA'dır. Plate kuyucukları osteokalsine spesifik monoklonal antikorlar (Mabs) ile kaplanmıştır. Plate kuyucuklarına numuneler, standartlar ve konjugat tamponu eklenir; numune ve standartlar plate üzerindeki monoklonal antikorlar (Mab 1) tarafından ve Horseradish Peroksidaz (HRP) işaretli monoklonal antikorlar (Mab 2) tarafından yakalanırlar. İnkübasyondan sonra, sandviç kompleksi (Mab 1-osteokalsin-Mab 2-HRP) içeren plate kuyucukları yıkanarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Kromojen solüsyonu eklenir ve inkübasyona bırakılır. Stop solüsyonun ilavesiyle reaksiyon durdurulur ve oluşan rengin şiddeti 450 nm'de okunur. Tablo 3.2.'de total osteokalsin çalışma prosedürü açıklanmıştır.

Reaktifler

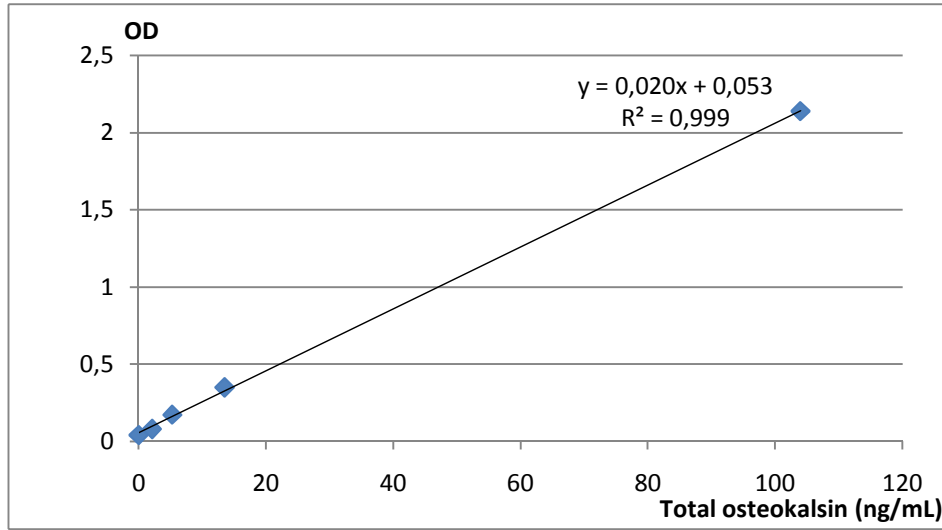
- Yıkama tamponu
- Osteoklasin Standardı: Liyofilize haldeki standartlar, 1 mL distile su ile dilue edilerek 0, 2.1, 5.3, 13.5, 43.8, 104 ng/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.

- Kontrol: Liyofilize haldeki kontroller 1 mL distile su ile dilüe edilerek hazırlandı.
- Konjugat tamponu (Anti-OST-HRP Konjugatı)
- Kromojen solüsyonu: 3,3',5,5' Tetramethyl-benzidine (TMB)
- Stop solüsyonu

Tablo 3.2. Total Osteokalsin Çalışma Prosedürü

	Kontrol	Numune	Standart
Kontrol	25 µL	-	-
Numune	-	25 µL	-
Standart	-		25 µL
Konjugat tamponu	100 µL	100 µL	100 µL
Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. 3 kere yıkandı.			
Kromojen solüsyonu	100 µL	100 µL	100 µL
Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.			
Stop solüsyonu	100 µL	100 µL	100 µL
1 saat içerisinde 450 nm' de okundu.			

Hesaplama: Total osteokalsin standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanların konsantrasyonu bilgisayarda hesaplandı. Total osteokalsin seviyeleri, ng/mL olarak verildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Total osteokalsin standart grafiği

3.3.2.2. ucOC Ölçümü

ucOC düzeyi CUSABIO marka (Katalog No: CSB-E13132h) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Plate kuyucukları ucOC'a spesifik antikor ile kaplanmıştır. Plate kuyucuklarında bulunan antikor üzerine, numuneler eklenir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara biyotin işaretli antikor eklenir ve tekrar inkübasyona bırakılır. HRP-avidin ilave edilip inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası reaksiyon ortamına eklenen TMB, antikor-işaretli antijen kompleksine bağlanır. Stop solüsyon ilave edilerek reaksiyon sonlandırılır ve oluşan rengin şiddeti 450 nm'de okunur. Tablo 3.3.'de ucOC çalışma prosedürü açıklanmıştır.

Reaktifler

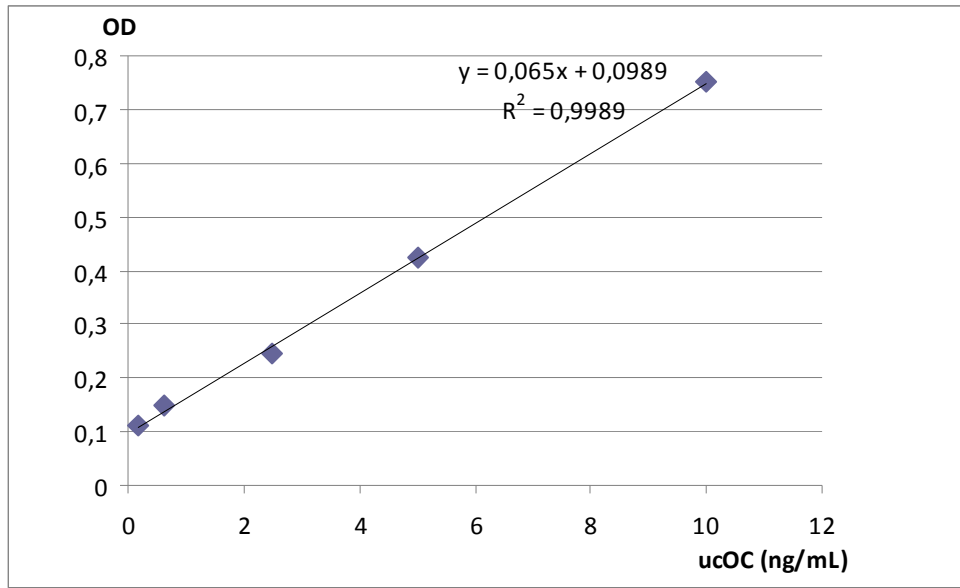
- Yıkama tamponu
- Standartlar: Dilusyon tamponu ile dilue edilerek 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 ng/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Biyotin işaretli antikor: Çalışma öncesinde biyotin antikor dilüenti ile 1:100 oranında dilue edilerek hazırlandı.
- Streptavidin-HRP konjugatı: Çalışma öncesinde HRP-avidin dilüenti ile 1:100 oranında dilue edilerek hazırlandı.

- Substrat solüsyonu: TMB
- Stop solüsyonu

Tablo 3.3. ucOC Çalışma Prosedürü

	Kontrol	Numune	Kör
Kontrol	100 µL	-	-
Numune	-	100 µL	-
Kör	-		100 µL
37 ⁰ C’de 2 saat inkübe edildi.			
Biyotin işaretli antikor	100 µL	100 µL	100 µL
37 ⁰ C’de 1 saat inkübe edildi ve sonra 3 kez yıkandı.			
Streptavidin-HRP	100 µL	100 µL	100 µL
37 ⁰ C’de 1 saat inkübe edildi ve sonra 5 kez yıkandı.			
Substrat solüsyonu	90 µL	90 µL	90 µL
37 ⁰ C’de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve sonra 5 kez yıkandı.			
Stop solüsyonu	50 µL	50 µL	50 µL
30 dakika içerisinde 450 nm’ de okundu.			

Hesaplama: ucOC standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanların konsantrasyonu bilgisayarda hesaplandı. ucOC seviyeleri, ng/mL olarak verildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. ucOC standart grafiği

3.3.2.3. 8-OHdG Ölçümü

8-OHdG NORTHWEST marka (Katalog No: NWK-8OHDG02) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Metot kompetitif ELISA yöntemidir. Kompetitif immuno ölçümde; ölçülmek istenen antijenle, işaretli antijen sınırlı sayıdaki antikora birleşmek üzere aynı anda ortama konularak antikora karşı yarışmaları sağlanır. Bağlanamayan antijenler uzaklaştırılır. Daha sonra ortama enzim işaretli sekonder antikor, monoklonal antikora bağlanması için ortama eklenir ve inkübasyona bırakılır. Bağlanmayan enzim işaretli sekonder antibadiler yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır. Bir sonraki aşamada kromojen substrat ortama eklenir inkübasyona bırakılır ve reaksiyon stop solüsyonu ile durdurulur. Stop solüsyonunun ilavesiyle oluşan rengin şiddeti 450 nm’de okunur. Tablo 3.4.’da 8-OHdG çalışma prosedürü açıklanmıştır.

Reaktifler

- Yıkama tamponu
- Standartlar: 10, 4, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ng/mL konsantrasyonlarında kullanıma hazır standart seri kullanıldı.
- Primer antikor (8-OHdG ye özgü monoklonal antikor), sekonder antikor
- Kromojen solüsyonu (TMB)
- Stop solüsyonu (1M Fosforik asit)

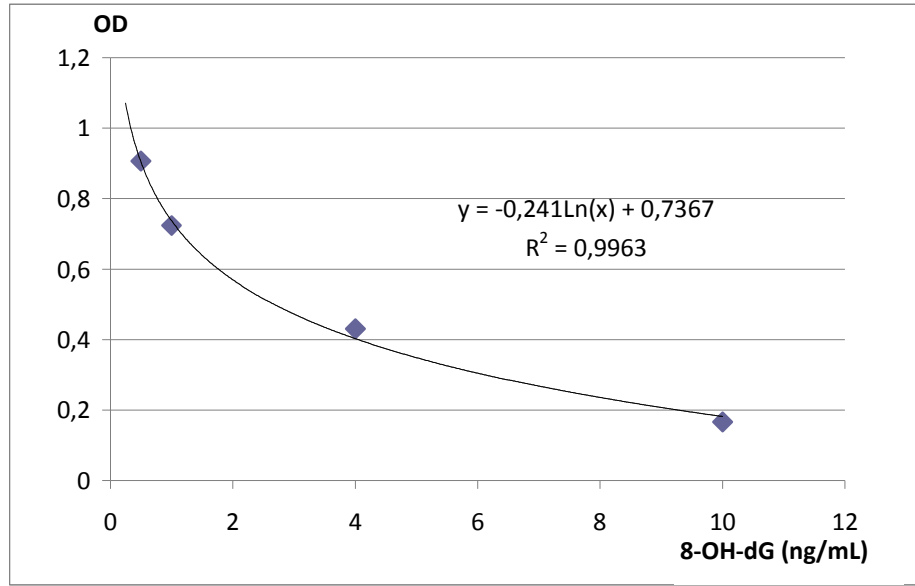
Örnek Hazırlığı

Serum örneklerine çalışma öncesi, sartorius minisart marka (0,2 µm) filtrelerle ultrafiltrasyon işlemi yapıldı.

Tablo 3.4. 8-OHdG Çalışma Prosedürü

	Numune	Standart
Numune	50 µL	-
Standart	-	50 µL
PBS	50µL	50 µL
Primer antikor	50µL	50 µL
Plate üzeri kapatılarak 4°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı		
Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.		
Sekonder antikor	100 µL	100 µL
Plate üzeri kapatılarak, oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.		
Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.		
Kromojen solüsyonu	100 µL	100 µL
Oda ısında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.		
Stop Solüsyonu	100 µL	100 µL
450 nm’de numune ve standartların absorbanları okundu.		

Hesaplama: Şekil 3.3.’te gösterilen 8-OHdG standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanların konsantrasyonu hesaplandı. 8-OHdG seviyeleri ng/mL olarak verildi.



Şekil 3.3. 8-OHdG standart grafiği

3.3.2.4. IL-10 Ölçümü

IL-10 düzeyi, AVIBION marka (Katalog No: IL10001) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Metodun prensibi, enzim-bağlı immünokimyasal ölçüm esasına dayanır. Plate kuyucuklarında bulunan IL-10'a spesifik antikorların üzerine, önce işaretli antijen (numuneler ve standartlar), daha sonra biyotin işaretli antikor ardışık olarak eklenir. İnkübasyondan sonra bağlanmamış antikorlar yıkanarak uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP konjugatı eklenir, inkübasyona bırakılır ve sonra yıkanır. Daha sonra tüm kuyucuklara kromojen solüsyonu ilave edilir ve kromojen solüsyonu renk değişikliğine yol açar. Stop solüsyonunun ilavesiyle renk maviden sarıya döner ve oluşan rengin şiddeti 450 nm'de okunur. Tablo 3.5.'de IL-10 çalışma prosedürü açıklanmıştır.

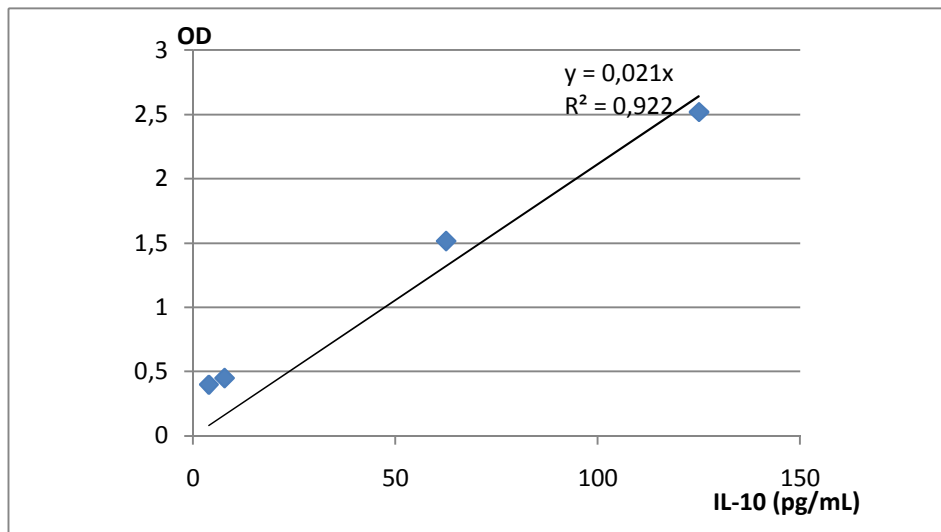
Reaktifler

- Yıkama tamponu
- Standartlar: Liyofilize haldeki standartlar, numune dilüenti ile dilüe edilerek 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.5, 62.5, 125 pg/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Biyotin işaretli antikor
- Streptavidin-HRP konjugat
- Kromojen solüsyonu TMB)
- Stop solüsyonu (0.9 N H₂SO₄)

Tablo 3.5. IL-10 Çalışma Prosedürü

	Standart	Numune
Standart	50 µL	-
Numune	-	50 µL
Biyotin işaretli antikor	50 µL	50 µL
Oda sıcaklığında 1 saat 30 dakika inkübe edildi, sonra her bir kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.		
Streptavidin-HRP konjugat	50 µL	50 µL
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, sonra her bir kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.		
Kromojen solüsyonu	100 µL	100 µL
Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.		
Stop solüsyonu	25 µL	25 µL
450 nm dalga boyunda okundu.		

Hesaplama: Şekil 3.4.'te gösterilen IL-10 standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanların konsantrasyonu hesaplandı. IL-10 seviyeleri pg/mL olarak verildi.

**Şekil 3.4.** IL-10 standart grafiği

3.3.2.5. IL-1 β Ölçümü

IL-1 β düzeyi, AVIBION marka (Katalog No: IL01b02) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Metodun prensibi, enzim-bağlı immünokimyasal ölçüm esasına dayanır. Plate kuyucukları IL-1 β 'ya spesifik antikor ile kaplanmıştır. Plate kuyucuklarında bulunan antikor üzerine, numuneler ve standartlar eklenir, inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra, örnekte bulunan bağlanmamış diğer komponentler yıkanarak uzaklaştırılır. Biotin işaretli antikor eklenir ve inkübasyona bırakılır. Eğer varsa, IL-1 β 'lar antikor bağlı kuyucuklarda biyotin konjugat ile sandviç yapı oluştururlar. Yıkama yapılarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP konjugatı eklenir, inkübasyona bırakılır ve sonra yıkanır. Daha sonra tüm kuyucuklara TMB substrat solüsyonu ilave edilir. Stop solüsyonunun ilavesiyle renk maviden sarıya döner ve oluşan rengin şiddeti 450 nm'de okunur. Tablo 3.6.'da IL-1 β çalışma prosedürü açıklanmıştır.

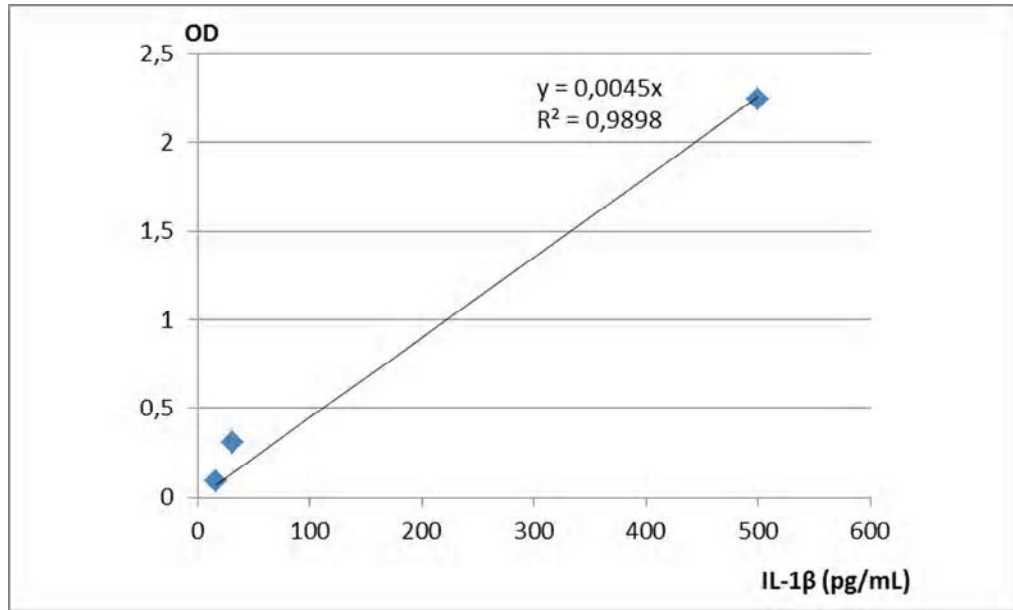
Reaktifler

- Yıkama tamponu
- Standartlar: Dilusyon tamponu ile dilue edilerek 0, 15.6, 31.5, 62.5, 125, 250, 500 pg/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Biotin işaretli antikor
- Streptavidin-HRP konjugat
- Kromojen solüsyonu (TMB)
- Stop solüsyonu (0.9 N H₂SO₄)

Tablo 3.6. IL-1 β Çalışma Prosedürü

	Standart	Numune
Standart	50 μ L	-
Numune	-	50 μ L
Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi, sonra her bir kuyucuk 300 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.		
Biyotin işaretli antikor	50 μ L	50 μ L
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, sonra her bir kuyucuk 300 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.		
Streptavidin-HRP konjugat	50 μ L	50 μ L
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, sonra her bir kuyucuk 300 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.		
Kromojen solüsyonu	50 μ L	50 μ L
Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.		
Stop solüsyonu	25 μ L	25 μ L
450 nm dalga boyunda okundu.		

Hesaplama: Şekil 3.5.'te gösterilen IL-1 β standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanların konsantrasyonu hesaplandı. IL-1 β seviyeleri pg/mL olarak verildi.

**Şekil 3.5.** IL-1 β standart grafiği

3.3.2.6. TNF- α Ölçümü

TNF- α düzeyi, AVIBION marka (Katalog No: TNFa021) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Metodun prensibi, enzim-bağlı immünokimyasal ölçüm esasına dayanır. Plate kuyucuklarında bulunan TNF- α 'ya spesifik antikor üzerine işaretli antijen (numune) eklenir. Daha sonra işaretli antijen eklenerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra bağlanmış antikorlar yıkanarak uzaklaştırılır. İnkübasyon sonrası reaksiyon ortamına eklenen enzim, antikor-işaretli antijen kompleksine bağlanır. Enzim substratının da ilavesiyle oluşan rengin şiddeti 450 nm'de okunur. Tablo 3.7.'de çalışma prosedürü açıklanmıştır.

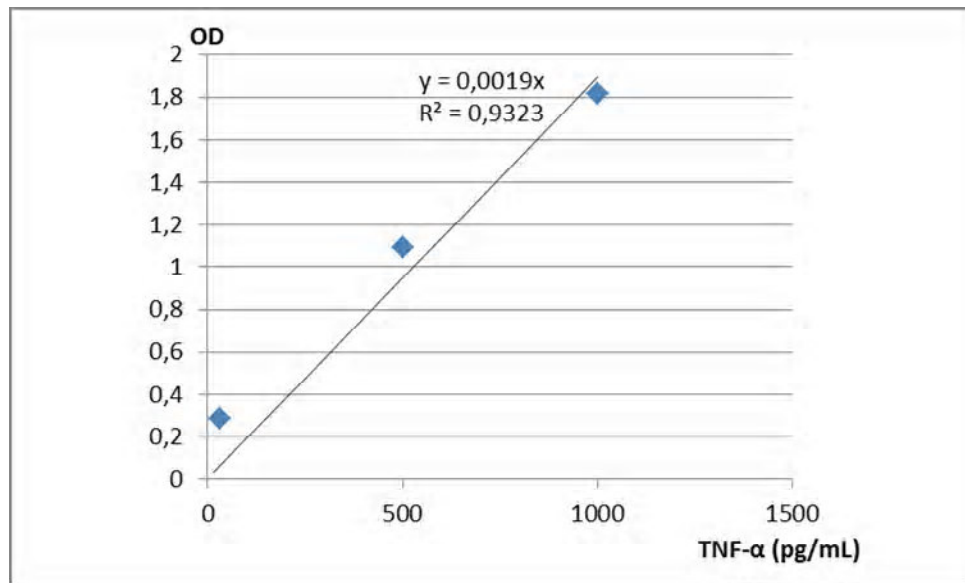
Reaktifler

- Yıkama tamponu
- Standartlar: Dilusyon tamponu ile dilue edilerek 0, 15.6, 31.5, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Biotin işaretli antikor
- Streptavidin-HRP konjugat
- Kromojen solüsyonu (TMB)
- Stop solüsyonu

Tablo 3.7. TNF- α Çalışma Prosedürü

	Standart	Numune
Standart	50 μ L	-
Numune	-	50 μ L
Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi, sonra 5 kez yıkandı.		
Biyotin işaretli antikor	50 μ L	50 μ L
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, 5 kez yıkandı.		
Streptavidin-HRP konjugat	50 μ L	50 μ L
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, sonra 5 kez yıkandı.		
Kromojen solüsyonu	50 μ L	50 μ L
Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.		
Stop solüsyonu	25 μ L	25 μ L
450 nm dalga boyunda okundu.		

Hesaplama: Şekil 3.6.'da gösterilen TNF- α standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbansların konsantrasyonu hesaplandı. TNF- α seviyeleri pg/mL olarak verildi.

**Şekil 3.6.** TNF- α standart grafiği

3.3.2.7. IL-6 Ölçümü

IL-6 düzeyi, AVIBION marka (Katalog No: IL06001) ELISA kiti ile ölçüldü.

Prensip

Metodun prensibi, enzim-bağlı immünokimyasal ölçüm esasına dayanır. Plate kuyucuklarında bulunan IL-6'ya spesifik antikorların üzerine, önce işaretli antijen (numuneler ve standartlar), daha sonra biyotin işaretli antikor ardışık olarak eklenir. İnkübasyondan sonra bağlanmamış antikorlar yıkanarak uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP konjugatı eklenir, inkübasyona bırakılır ve sonra yıkanır. Daha sonra tüm kuyucuklara kromojen solüsyonu ilave edilir ve kromojen solüsyonu renk değişikliğine yol açar. Stop solüsyonunun ilavesiyle renk maviden sarıya döner ve oluşan rengin şiddeti 450 nm'de okunur. Tablo 3.8.'de IL-6 çalışma prosedürü açıklanmıştır.

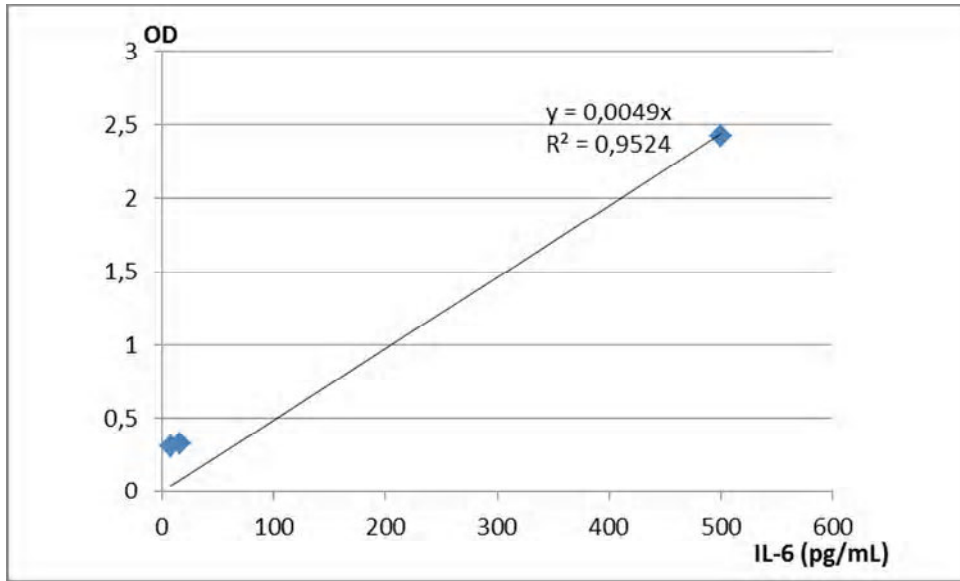
Reaktifler

- Yıkama tamponu
- Standartlar: Dilusyon tamponu ile dilue edilerek 0, 15.6, 31.5, 62.5, 125, 250, 500 pg/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Biyotin işaretli antikor
- Streptavidin-HRP konjugat
- Kromojen solüsyonu (TMB)
- Stop solüsyonu

Tablo 3.8. IL-6 Çalışma Prosedürü

	Standart	Numune
Standart	50 µL	-
Numune	-	50 µL
Biyotin işaretli antikor	50 µL	50 µL
Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi, sonra 5 kez yıkandı.		
Streptavidin-HRP konjugat	50 µL	50 µL
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, sonra 5 kez yıkandı.		
Kromojen solüsyonu	50 µL	50 µL
Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.		
Stop solüsyonu	25 µL	25 µL
450 nm dalga boyunda okundu.		

Hesaplama: Şekil 3.7.'de gösterilen IL-6 standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbansların konsantrasyonu hesaplandı. IL-6 seviyeleri pg/mL olarak verildi.

**Şekil 3.7.** IL-6 standart grafiği

3.4.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Veriler, IBM SPSS Statistics 20 ve SigmaStat 3.5 istatistik programlarında değerlendirildi. Sayısal değişkenlerin normal dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin özet istatistikleri ortalama $\pm$ standart sapma; normal dağılmayan değişkenlerin özet istatistikleri medyan (25. ve 75. persentil) olarak verildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup karşılaştırmaları Student t testi ile; normal dağılmayanlar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

İkiden fazla grubun bulunduğu karşılaştırmalarda, normal dağılım gösteren değişkenlerde Tek Yönlü Varyans Analizi, çoklu karşılaştırma testi olarak Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. Normal dağılmayan değişkenlerde gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis Analizi ile; çoklu karşılaştırmalar ise Dunn testi ile yapıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Pearson Korelasyon Analizi ve Spearman Korelasyon Analizi ile değerlendirildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki-kare testinin exact yöntemi ile değerlendirildi. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Hasta ve kontrol grubu arasında cinsiyet, yaş ve boy açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Hasta grubu kilo değerleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.001$). Gruplar VKİ açısından karşılaştırıldığında; hasta grubu VKİ değerleri kontrol grubu VKİ değerlerine göre, anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet, yaş, kilo, boy ve VKİ bulgularının karşılaştırılması

Parametreler	Hasta Grubu (n=28)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Cinsiyet			
Kadın	14 (%50)	10 (%50)	0.615
Erkek	14 (%50)	10 (%50)	
Yaş (yıl)	43.3 ± 12.7	44.8 ± 10.4	0.661
Kilo (kg)	87.3 ± 14.3	69.1 ± 12.2	<0.001
Boy (cm)	165.3 ± 8.1	169 ± 7.7	0.083
VKİ (kg/m ²)	32.2 ± 6.2	23.9 ± 2.8	<0.001

Hasta ve kontrol grubuna ait rutin biyokimya parametreleri karşılaştırıldığında; insülin ($p<0.001$), HOMA-IR ($p<0.001$), TC ($p<0.007$), TG ($p<0.005$), LDL ($p<0.014$), AST ($p<0.001$), ALT ($p<0.001$) ve GGT ($p<0.001$) değerleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4.2). Diğer rutin değerlerinde ise, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubuna ait rutin parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Hasta Grubu (n=28)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Glukoz (mg/dL)	90.9 $\pm$ 10.5	88.3 $\pm$ 6.3	0.294
İnsülin (μ U/mL)	14.8 (9.3-21.5)	2.3 (2.0-5.6)	<0.001
HOMA-IR	3.6 (1.9-5.3)	0.6 (0.4-1.3)	<0.001
TC (mg/dL)	198.9 $\pm$ 39.5	171.5 $\pm$ 22.4	0.007
TG (mg/dL)	131.5 (98.8-191.2)	96.0 (74.2-106.2)	0.005
HDL (mg/dL)	44.2 $\pm$ 11.1	46.4 $\pm$ 10.7	0.496
LDL (mg/dL)	123.8 $\pm$ 35.0	103.8 $\pm$ 18.1	0.014
AST (U/L)	44.5 (35.0-56.0)	15.5 (15.0-19.5)	<0.001
ALT (U/L)	65 (44.5-91.2)	17.5 (10.2-2.0)	<0.001
GGT (U/L)	50 (31.2-107.0)	16 (11.2-18.0)	<0.001
Total Bil. (mg/dL)	0.69 $\pm$ 0.28	0.58 $\pm$ 0.23	0.128
Direkt Bil. (mg/dL)	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.2-0.3)	0.767

Hasta ve kontrol grubu ana biyokimyasal bulguları Tablo 4.3.'te gösterildi. Total osteokalsin değerleri, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). TNF- α değerleri, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.009$).

Diğer çalışma parametrelerimiz olan ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1 β ve IL-6 değerlerinde ise, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubuna ait ana biyokimyasal bulguların karşılaştırılması

Parametreler	Hasta Grubu (n=28)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Total osteokalsin (ng/mL)	9.9 (5.4-14.4)	18.2 (14.7-28.2)	<0.001
ucOC (ng/mL)	2.1 (1.2-4.2)	1.8 (1.2-2.7)	0.497
8-OHdG (ng/mL)	1.31 (1.1-1.9)	1.15 (0.9-2.0)	0.517
IL-10 (pg/mL)	5.5 (4.7-7.7)	5.0 (4.5-6.2)	0.296
IL-1 β (pg/mL)	56.3 (34.2-78.7)	49.3 (29.8-76.0)	0.558
TNF- α (pg/mL)	218.2 (145.3-297.7)	138.9 (117.0-209.0)	0.009
IL-6 (pg/mL)	15.4 (11.7-28.2)	13.2 (10.4-19.3)	0.331

Hasta grubu kendi içerisinde; insülin direnci bulunmayan (HOMA-IR<2,7) ve insülin direnci bulunan (HOMA-IR $\geq$ 2,7) hastalar, obez olmayan (VKİ<30 kg/m²) ve obez olan (VKİ $\geq$ 30 kg/m²) hastalar, karaciğer biyopsi sonuçlarına göre fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hastalar, düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hastalar şeklinde ayrılarak bu gruplar kontrollerle kıyaslandı.

Hasta grubunun HOMA-IR düzeyleri değerlendirildiğinde, 28 hastanın 16'sında (%57.14) insülin direnci tespit edildi. İnsülin direnci bulunmayan ve insülin direnci bulunan hasta grupları ile kontrol grubu arasında kilo, VKİ ve rutin biyokimya bulgularının karşılaştırması Tablo 4.4.'te gösterildi.

İnsülin direnci bulunmayan grup ile insülin direnci bulunan grup arasında; glukoz (p<0.001) ve insülin (p<0.001) değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu (Tablo 4.4.).

İnsülin direnci bulunmayan grup ile kontrol grubu arasında; kilo (p<0.001), VKİ (p<0.001), AST (p<0.001), ALT (p<0.001) ve GGT (p<0.001) değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu (Tablo 4.4.).

İnsülin direnci bulunan grup ile kontrol grubu arasında; kilo (p<0.001), VKİ (p<0.001), glukoz (p<0.001), insülin (p<0.001), TC (p<0.002), TG (p<0.011), LDL (p<0.025), AST (p<0.001), ALT (p<0.001) ve GGT (p<0.001) değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. İnsülin direnci bulunmayan ve insülin direnci bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun rutin parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	HOMA-IR<2,7 (n=12)	HOMA-IR≥2,7 (n=16)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Kilo (kg)	81.5 (75.5-92.5) ^b	86.2 (83.5-97.5) ^b	67.5 (61.5-73.5) ^a	<0,001
VKİ (kg/m ²)	29.4 (25.6-35.0) ^b	33.8 (29.6-37.4) ^b	23.8 (21.7-23.3) ^a	<0,001
Glukoz (mg/dL)	82 (76.5-88.5) ^a	98 (94.5-102.5) ^b	86.5 (85-93) ^a	<0,001
İnsülin (μU/mL)	8.74 (7.4-10.3) ^a	19.8 (17.8-24.3) ^b	2.35 (2.0-5.3) ^a	<0,001
TC (mg/dL)	183 (155.0-241.5) ^{ab}	202 (191-214.5) ^a	180.0 (152.0-188.0) ^b	0.002
TG (mg/dL)	121.0 (90.5-158.5) ^{ab}	137.5 (109.0-197.0) ^a	96.0 (76.5-105.5) ^b	0.011
LDL (mg/dL)	108.6 (85.5-161.7) ^{ab}	127 (113.9-138.3) ^a	107.7 (91.1-118.2) ^b	0.025
AST (U/L)	45.5 (38-53.5) ^b	44.5 (34.5-64.5) ^b	15.5 (15.0-19.0) ^a	<0,001
ALT (U/L)	55.0 (45.0-67.5) ^b	76.5 (52.0-119.5) ^b	17.5 (10.5-20.0) ^a	<0,001
GGT (U/L)	45.0 (36.0-101.0) ^b	64.0 (30.5-106.0) ^b	16.0 (11.5-18.0) ^a	<0,001

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

İnsülin direnci bulunmayan grup ile kontrol grubu arasında; total osteokalsin ($p<0.001$) ve TNF- α ($p<0.032$) değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu (Tablo 4.5.).

İnsülin direnci bulunan grup ile kontrol grubu arasında; total osteokalsin ($p<0.001$) değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5.'te belirtildiği gibi, insülin direnci bulunmayan grup ile insülin direnci bulunan grup arasında; total osteokalsin ve TNF- α değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Diğer çalışma parametrelerimiz olan ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1 β ve IL-6 değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.5. İnsülin direnci bulunmayan ve insülin direnci bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması

Parametreler	HOMA-IR<2,7 (n=12)	HOMA-IR≥2,7 (n=16)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Total osteokalsin (ng/mL)	14.4 (9.2-15.2) ^b	7.87 (5.2-10.6) ^b	18.2 (14.8-25.2) ^a	<0,001
TNF-α (pg/mL)	219.2 (141.8-303.7) ^a	215.2 (151.5-288.9) ^{ab}	138.9 (118.7-200.8) ^b	0.032

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Hasta grubunun VKİ değerleri değerlendirildiğinde 28 hastanın 18'inin (%64.28) obez olduğu tespit edildi. Obez olmayan ve obez olan hasta grubu arasında, yaş değerlerinde anlamlı fark bulundu ($p<0.003$) (Tablo 4.6.).

Obez olmayan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; insülin ($p<0.001$), HOMA-IR ($p<0.001$), AST ($p<0.001$), ALT ($p<0.001$) ve GGT ($p<0.001$) değerlerinde anlamlı fark bulundu (Tablo 4.6.).

Obez olan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; yaş ($p<0.003$), insülin ($p<0.001$), HOMA-IR ($p<0.001$), TC ($p<0.001$), TG ($p<0.020$), LDL ($p<0.009$), AST ($p<0.001$), ALT ($p<0.001$) ve GGT ($p<0.001$) değerlerinde anlamlı fark bulundu. Diğer rutin parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Obez olmayan ve obez olan hasta grubu ile kontrol grubunun rutin parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	VKİ<30 kg/m ² (n=10)	VKİ≥30 kg/m ² (n=18)	Kontrol grubu (n=20)	<i>p</i>
Yaş (yıl)	35.2 ± 11.8 ^b	50.2 ± 9.8 ^a	43.3 ± 10.3 ^b	0.003
İnsülin (μU/mL)	9.3 (8.1-17.8) ^b	17.9 (10.7-23.5) ^b	2.35 (2.0-5.3) ^a	<0,001
HOMA-IR	2.0 (1.4-3.7) ^b	3.9 (2.2-5.4) ^b	0.6 (0.4-1.2) ^a	<0,001
TC (mg/dL)	186.5 (174.0-192.0) ^{ab}	211.0 (196.0-220.0) ^a	180.0 (152.0-188.0) ^b	<0,001
TG (mg/dL)	151.5 (94.0-196.0) ^{ab}	130.0 (105.0-164.0) ^a	96 (76.5-105.5) ^b	0.020
LDL (mg/dL)	111.0 (88.0-121.0) ^{ab}	134.7 (101.0-143.0) ^a	107.7 (91.1-118.2) ^b	0.009
AST (U/L)	46.5 (43.0-57.0) ^b	43.5 (34.0-53.0) ^b	15.5 (15.0-19.0) ^a	<0,001
ALT (U/L)	71.0 (47.0-93.0) ^b	62.5 (40.0-86.0) ^b	17.5 (10.5-20.0) ^a	<0,001
GGT (U/L)	78.0 (46.0-98.0) ^b	42.5 (30.0-114.0) ^b	16.0 (11.5-18.0) ^a	<0,001

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Obez olmayan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; total osteokalsin değerlerinde anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4.7.).

Obez olan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; total osteokalsin değerlerinde anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4.7.).

Obez olmayan ve obez olan hasta grubu arasında; total osteokalsin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo 4.7.).

Diğer çalışma parametrelerimiz olan ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1β, TNF-α ve IL-6 değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.7. VKİ<30 kg/m² ve VKİ≥30 kg/m² olan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması

Parametreler	VKİ<30 kg/m ² (n=10)	VKİ≥30 kg/m ² (n=18)	Kontrol grubu (n=20)	<i>p</i>
Total osteokalsin (ng/mL)	12.2 (7.3-15.1) ^b	8.9 (5.2-12.3) ^b	18.2 (14.8-25.2) ^a	<0.001

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Karaciğer biyopsisi sonuçlarına göre, 28 hastanın 18'inde (%64.28) fibrozis bulunduğu tespit edildi. NASH tanısı konan hastaların hiçbirinde siroza rastlanmadı. Tablo 4.8'de görüldüğü üzere fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu arasında, boy değerlerinde anlamlı fark bulundu ($p<0.01$).

Fibrozis bulunmayan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; kilo ($p<0.001$), boy ($p<0.01$), VKİ ($p<0.001$), insülin ($p<0.001$), HOMA-IR ($p<0.001$), TC ($p<0.025$), TG ($p<0.013$), AST ($p<0.001$), ALT ($p<0.001$) ve GGT ($p<0.001$) değerlerinde anlamlı fark bulundu (Tablo 4.8.).

Fibrozis bulunan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; kilo ($p<0.001$), VKİ ($p<0.001$) insülin ($p<0.001$), HOMA-IR ($p<0.001$), TC ($p<0.025$), AST ($p<0.001$), ALT ($p<0.001$) ve GGT ($p<0.001$) değerlerinde anlamlı fark bulundu (Tablo 4.8.).

Fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu arasında, rutin parametre değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo 4.8.). Diğer rutin parametrelerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.8. Fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun kilo, boy, VKİ ve rutin parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Fibrozis Yok (n=10)	Fibrozis Var (n=18)	Kontrol Grubu (n=20)	p
Kilo (kg)	85.2 (78.0-95.0) ^b	85.5 (75.0-95.0) ^b	67.5 (61.5-73.5) ^a	<0.001
Boy (cm)	162.6 ± 7.4 ^a	170.3 ± 7.1 ^b	169.5 ± 7.7 ^b	0.01
VKİ (kg/m ²)	33.8 (29.1-37.1) ^b	29.6 (25.6-34.7) ^b	23.8 (21.7-23.3) ^a	<0.001
İnsülin (μU/mL)	10.3 (8.3-18.1) ^b	17.8 (10.8-24.1) ^b	2.35 (2.0-5.3) ^a	<0.001
HOMA-IR	2.1 (1.4-3.8) ^b	3.9 (2.1-5.4) ^b	0.6 (0.4-1.2) ^a	<0.001
TC (mg/dL)	203.9 ± 39.7 ^b	196.2 ± 40.2 ^b	171.5 ± 22.4 ^a	0.025
TG (mg/dL)	155.5 (109.0-211.0) ^b	128.5 (94.0-164.0) ^{ab}	96 (76.5-105.5) ^a	0.013
AST (U/L)	42.0 (34.0-48.0) ^b	47.0 (42.0-76.0) ^b	15.5 (15.0-19.0) ^a	<0.001
ALT (U/L)	59.0 (44.0-75.0) ^b	68.5 (46.0-93.0) ^b	17.5 (10.5-20) ^a	<0.001
GGT (U/L)	60.0 (44.0-130.0) ^b	45.0 (30.0-98.0) ^b	16.0 (11.5-18.0) ^a	<0.001

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Fibrozis bulunmayan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; total osteokalsin değerlerinde anlamlı fark bulundu (p<0.001) (Tablo 4.9.).

Fibrozis bulunan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; total osteokalsin değerlerinde anlamlı fark bulundu (p<0.001) (Tablo 4.9.).

Fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu arasında, total osteokalsin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p>0.05) (Tablo 4.9.).

Diğer çalışma parametrelerimiz olan ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1β, TNF-α ve IL-6 değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p>0.05).

Tablo 4.9. Fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması

Parametreler	Fibrozis Yok (n=10)	Fibrozis Var (n=18)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Total osteokalsin (ng/mL)	12.2 (5.3-15.3) ^b	8.9 (6.0-12.4) ^b	18.2 (14.8-25.2) ^a	<0.001

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Karaciğer biyopsisi sonuçlarına göre, steatoz $\leq$ %33 düşük derece; steatoz = %33-%66, ve steatoz $\geq$ %66 yüksek derece steatoz olarak kabul edildi. 28 hastanın 18'inde (%64.28) düşük derece steatoz bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10.'da görüldüğü üzere düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu arasında yaş ($p < 0.005$) ve total bilirubin ($p < 0.023$) değerlerinde anlamlı fark bulundu.

Düşük derece steatoz bulunan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; kilo ($p < 0.001$), VKİ ($p < 0.001$), insülin ($p < 0.001$), HOMA-IR ($p < 0.001$), TC ($p < 0.007$), TG ($p < 0.025$), AST ($p < 0.001$), ALT ($p < 0.001$), GGT ($p < 0.001$) ve total bilirubin ($p < 0.023$) değerlerinde anlamlı fark bulundu (Tablo 4.10.).

Yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; kilo ($p < 0.001$), VKİ ($p < 0.001$) insülin ($p < 0.001$), HOMA-IR ($p < 0.001$), TG ($p < 0.025$), AST ($p < 0.001$), ALT ($p < 0.001$) ve GGT ($p < 0.001$) değerlerinde anlamlı fark bulundu (Tablo 4.10.). Diğer rutin parametrelerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$).

Tablo 4.10. Düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun kilo, VKİ, yaş ve rutin parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Düşük Derece Steatoz (n=18)	Yüksek Derece Steatoz (n=10)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Kilo (kg)	88.5 (83.0-95.0) ^b	84.5 (75.0-89.0) ^b	67.5 (61.5-73.5) ^a	<0,001
VKİ (kg/m ²)	33.0 ± 5.1 ^b	30.7 ± 7.7 ^b	23.9 ± 2.8 ^a	<0,001
Yaş (yıl)	49.9 ± 11.7 ^b	35.6 ± 8.5 ^a	43.3 ± 10.3 ^{ab}	0.005
İnsülin (μU/mL)	14.5 ± 6.8 ^a	16.6 ± 7.4 ^a	4.0 ± 2.9 ^b	<0,001
HOMA-IR	3.2 ± 1.7 ^b	4.0 ± 2.1 ^b	0.9 ± 0.6 ^a	<0,001
TC (mg/dL)	198.5 (176.0-220.0) ^a	191.0 (184.0-212.0) ^{ab}	180.0 (152.0-188.0) ^b	0,007
TG (mg/dL)	140.1 ± 60.8 ^a	154.7 ± 81.6 ^a	99.2 ± 34.9 ^b	0.025
AST (U/L)	44.5 (43.0-57.0) ^b	44.5 (35.0-53.0) ^b	15.5 (15.0-19.0) ^a	<0,001
ALT (U/L)	59.0 (42.0-71.0) ^b	83.5 (71.0-128.0) ^b	17.5 (10.5-20.0) ^a	<0,001
GGT (U/L)	47.5 (32.0-110.0) ^b	68.0 (30.0-98.0) ^b	16.0 (11.5-18.0) ^a	<0,001
Total Bil. (mg/dL)	0.77 (0.27-0.06) ^a	0.55 (0.20-0.06) ^b	0.58 (0.23-0.05) ^b	0.023

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Düşük derece steatoz bulunan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; total osteokalsin değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4.11.).

Yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu ve kontrol grubu arasında; total osteokalsin ($p<0.001$) ve TNF- α ($p<0.019$) değerlerinde anlamlı düzeyde fark bulundu (Tablo 4.11.).

Düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu arasında; total osteokalsin ve TNF- α değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo 4.11.).

Diğer çalışma parametrelerimiz olan ucOC, 8-OHdG, IL-10, IL-1 β ve IL-6 değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.11. Düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hasta grubu ile kontrol grubunun ana biyokimyasal bulgularının karşılaştırılması

Parametreler	Düşük Derece Steatoz (n=18)	Yüksek Derece Steatoz (n=10)	Kontrol Grubu (n=20)	<i>p</i>
Total osteokalsin (ng/mL)	11.2 (8.5-14.5) ^b	6.7 (4.3-7.9) ^b	18.2 (14.8-25.2) ^a	<0,001
TNF- α (pg/mL)	195.2 (138.9-298.4) ^{ab}	245.2 (212.1-282.1) ^a	138.9 (118.7-200.8) ^b	0.019

^{a, b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Tablo 4.12.'de parametreler arasındaki korelasyonlar görülmektedir.

Tablo 4.12. Parametreler arasındaki korelasyonlar

Parametreler	<i>r</i>	<i>p</i>
HOMA-IR-VKİ	0.696	<0.001
Total osteokalsin-Kilo	-0.452	<0.001
Total osteokalsin-VKİ	-0.591	<0.001
Total osteokalsin-HOMA-IR	-0.592	<0.001
Total osteokalsin-TG	-0.383	0.007
Total osteokalsin-TC	-0.379	0.008
Total osteokalsin-AST	-0.531	<0.001
Total osteokalsin-ALT	-0.572	<0.001
Total osteokalsin-İnsülin	-0.626	<0.001
TNF- α -HOMA-IR	0.290	0.045
TNF- α -IL-6	0.452	<0.001
TNF- α -IL-1 β	0.285	0.050
8-OHdG-IL-1 β	0.462	<0.001
8-OHdG-IL-6	0.288	0.047

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda; HOMA-IR ile VKİ ve HOMA-IR ile TNF- α arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Total osteokalsin ile HOMA-IR arasında anlamlı düzeyde negatif korelasyon tespit edilmiştir. Total osteokalsinin; kilo, VKİ, TG, TC, AST, ALT, insülin ile anlamlı düzeyde negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. TNF- α ile IL-6 ve TNF- α ile IL-1 β arasında, anlamlı düzeyde pozitif korelasyon bulunmuştur. Ayrıca, 8-OHdG ile IL-1 β ve 8-OHdG ile IL-6 arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 4.12.).

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının ilerlemiş formu olan NASH, prevalansı dünya genelinde giderek artan bir hastalık haline gelmektedir. Hastaların çoğunun asemptomatik olması ve tanı için biyopsi gerekmesi NASH'ı tanısı zor bir hastalık haline getirmektedir (24).

NASH patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber, patogenezinde rol oynadığı ileri sürülen bazı faktörler vardır. İnsülin direnci, oksidatif stres, obezite, sitokinler, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet NASH gelişiminde önemli risk faktörleri olarak görülmektedir. Son çalışmalar, metabolik sendrom ile NASH ilişkisi üzerinde durmaktadır ve NASH'ın metabolik sendromun hepatik tutulumu olduğu ileri sürülmektedir (34, 160).

NASH patogenezinde, ilk aşamada karaciğerde makroveziküler steatoz oluşumu vardır. Steatoz oluşumuna insülin direnci eklenirse, direnç durumunda hepatik lipid metabolizması etkilendiği için kısır döngüler başlatılmış olur. İkinci aşamayı; çevresel toksinler, sitokinler, endotoksinler, sitokrom P450 enzimleri ve mitokondriyal ROT'u içeren oksidatif stres oluşturmaktadır. Diğer önemli faktör ise, visseral obezite ile ilişkili olarak yağ dokudan salgılanan adipositokinlerdir. Yağ dokudan adiponektin, leptin, resistin, visfatin, TNF- α , IL-6 ve anjiotensinojen gibi adipokin ve sitokinler salgılanmaktadır. Bu adipositokinler NASH patogenezinde katkıda bulunmaktadır (6, 20, 161).

NASH'lı vakaların çoğu benign seyir gösterip düşük fibrozis evresinde kalırken, bazı vakalar siroza ilerleyebilmektedir. Bizim hasta grubumuzda %35.71 olguda hiç fibrozis bulunmazken, vakaların %42.85'inde evre 1, %10.71'inde evre 2, %10.71'inde evre 3 fibrozis saptanmış olup, hiçbir vakamızda evre 4 fibrozise ve siroza rastlanmamıştır.

Literatürde, NASH'lı olguların daha çok 4. ve 5. dekattan sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir (22, 162). Çalışmamızda tüm hastaların yaş ortalaması 43.3 ± 12.7 bulunmuştur. Sonuçlarımız literatür ile uyumludur.

İnsülinin genel metabolik etkilerinin azalması ile karakterize olan insülin direnci, prediyabet, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık riskini artıran bir durumdur. İnsülin direnci durumunda yağ dokuda lipoliz, hepatik glukoz miktarı, dolaşımda serbest yağ asidi ve glukoz seviyeleri artar. İnsülin direnci, hepatik lipid üretimini artırarak steatoza ve lipotoksisiteye neden olmaktadır. Artmış kalori alımı, fiziksel aktivite azlığı ve obezite, insülin direnci için önemli çevresel risk faktörlerdir. Özellikle, visseral obezite insülin direnci oluşumunda önemli risk faktörü olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra, diyabetik olmayan ve metabolik sendrom kriterleri bulunmayan zayıf insanlarda da insülin direnci görülebilmektedir (4, 46, 163).

Yapılan birçok çalışmada, NASH ve insülin direnci ilişkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda, NASH'lı bireylerde insülin düzeyleri ve HOMA-IR değerleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek saptanmış olup, sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur. Hasta grubumuzun glukoz düzeyleri ile kontrol grubu glukoz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Çalışma bulgularımızda insülin ve HOMA-IR değerlerinin yüksek olması, NASH patogenezinde insülin direncinin rol aldığını desteklemektedir.

Organizmanın metabolik homeostazı; beslenme, enerji harcamaları ve hormonal sinyaller tarafından dengede tutulur. Son dönemlerde yapılan çalışmalar, kemik dokusu ile glukoz ve yağ metabolizması arasında ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Çeşitli çalışmalarda tip 2 diyabet, metabolik sendrom, obezite, kardiyovasküler hastalıklar ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında serum osteokalsin seviyeleri ile insülin sekresyonu arasında negatif ilişki bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, serum osteokalsin düzeyleri obezite ve glukoz düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (9-12, 126).

Çalışmamızda hasta grubu total osteokalsin seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Total osteokalsin ve HOMA-IR arasında, literatürle uyumlu olarak negatif korelasyon tespit edilmiştir.

Hwang ve ark. (11), yüksek total osteokalsin düzeyleri bulunan tip 2 diyabetli bireylerde HOMA- β ve HOMA-IR değerlerinin düşük olduğunu, total osteokalsinin β hücre fonksiyonu ve insülin duyarlılığı ile ilgili bir molekül olduğunu tespit etmişlerdir. Bao ve ark. (164), tip 2 diyabetli hastalarla yaptıkları çalışmada, 8 hafta süresince glukoz düşürücü tedavi alan hastalarda, glisemik kontrolün sağlanması ile osteokalsin seviyelerinin yükseldiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grubu arasında ucOC seviyeleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Osteokalsin knockdown fare modellerine ucOC verildiğinde; β hücre proliferasyonunda ve insülin duyarlılığında iyileşme, adiponektin gen ekspresyonunda ise artış tespit edilmiştir (8). Hayvan çalışmaları ve *in vitro* çalışmalarda, ucOC'un glukoz homeostazını ve enerji metabolizmasını düzenlediği gösterilse de, yapılan insan çalışma sonuçları bununla bağdaşmamıştır. Pek çok çalışmada, ucOC ile HOMA-IR arasında ilişki bulunamamıştır (11, 126, 165-167). Son çalışmalar; ucOC'un insülin sekresyonu ile, total osteokalsinin ise insülin direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (10, 11).

Yapılan bir çalışmada, vitamin K takviyesi almayan yaşlı kadın ve erkeklerde 3 yıl süresince ucOC, karboksile osteokalsin ve total osteokalsin seviyelerinin HOMA-IR ile ilişkisi araştırılmıştır. Total osteokalsin ve karboksile osteokalsinin HOMA-IR ile negatif korelasyon gösterdiği, ucOC ile HOMA-IR arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (166).

Kanazawa ve ark (12), hipergliseminin düşük kemik turnoverı ve osteoblast disfonksiyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Tip 2 diyabetli 50 hasta ile yaptıkları çalışmada, glisemik kontrol sonrasında serum osteokalsin seviyelerinin yükseldiğini, ucOC seviyelerinin değişmediğini göstermişlerdir.

Yapılan bir çalışmada alkolik sirozlu hastalarda osteokalsin seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre düştüğü bildirilmiştir (168). Düşük osteokalsin düzeylerinin, karaciğer fibrozisi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (117).

NASH'ta osteokalsin ile ilgili literatürler sınırlı sayıdadır. Szalay ve ark. (169), nonalkolik karaciğer yağlanması osteokalsin seviyelerini düşük bildirmişlerdir. Yılmaz ve ark. (170), nonalkolik yağlı karaciğerli hastalarda osteokalsin ile HOMA-IR arasında negatif korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir. NASH'lı hastalarla yapılan bir çalışmada; osteokalsinin HOMA değerleri, glukoz seviyeleri ve karaciğer fibrozisi ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (171).

Diğer çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda hem total osteokalsin hem de ucOC ölçümü yapılmıştır. İnsülin direnci bulunmayan hastalar ve insülin direnci bulunan hastalar karşılaştırıldığında; insülin direnci bulunan grubun total osteokalsin seviyeleri, direnç bulunmayan gruba göre düşük fakat anlamsızdı. İnsülin direnci bulunmayan grup ile kontrol grubu ve insülin direnci bulunan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; total osteokalsin seviyeleri, her iki hasta grubunda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktü. Düşük total osteokalsin seviyeleri, insülin direncinden ya da karaciğer fibrozisinden kaynaklanmış olabilir. Fakat hastaların hepsinde insülin direnci ve fibrozis bulunmadığı dikkate alınırsa mekanizmayı açıklamak için daha geniş kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

Yılmaz ve ark. (170), nonalkolik yağlı karaciğerli hastalarda serum osteokalsin ile AST ve ALT arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda total osteokalsin ile ALT ve AST seviyeleri arasında negatif korelasyon tespit edildi, sonuçlarımız literatür ile uyumludur. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, total osteokalsin ile TG ve TC arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (126, 172).

Osteokalsin ve karaciğer fibrozisi arasında bir ilişkinin olup olmadığını değerlendirmek amacıyla; hasta grubunu fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan grup olarak ayırıp, sağlıklı kontrollerle birlikte bu üç grubu karşılaştırdık. Total osteokalsin seviyeleri fibrozis bulunan grupta en düşüktü fakat, fibrozis bulunmayan grup ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Aller ve ark. (171), 69 NASH'lı hasta ile yaptıkları çalışmada; fibrozis bulunmayan ve fibrozis bulunan hastalarda osteokalsin, insülin, glukoz ve HOMA-IR'ı değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, glukoz değerlerinin iki grup arasında değişmediği, osteokalsin düzeylerinin fibrozis bulunan grupta daha düşük olduğu bulunmuştur. İnsülin ve HOMA-IR değerleri ise fibrozis bulunan grupta fibrozis bulunmayan gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir. Biz bu çalışmanın aksine, fibrozis

bulunmayan ve fibrozis bulunan grupta total osteokalsin, insülin ve HOMA-IR değerleri arasında anlamlı fark bulmadık. Bu çalışmaya kıyasla fibrozis evrelerinin ve fibrozisli hasta sayısının düşüklüğü nedeniyle bulgularımız farklılık göstermiş olabilir.

Steatoz derecesine göre NASH'lı hastaları düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz olarak ikiye ayıran Aller ve ark. (171), iki grup arasında osteokalsin, insülin, glukoz ve HOMA-IR'ı değerlendirmişlerdir. Osteokalsin ve glukoz düzeyleri iki grup arasında farksız bulunurken, insülin ve HOMA-IR değerleri yüksek derece steatozlu hastalarda anlamlı olarak yüksek bildirilmiştir. Çalışmamızda düşük derece steatoz ve yüksek derece steatoz bulunan hastaları karşılaştırdığımızda, yaş ve total bilirubin dışında hiçbir parametreyi farklı bulmadık. Yüksek derece steatoz bulunan hastalarda total osteokalsin seviyeleri, düşük derece steatozu bulunan hastalara göre düşük fakat anlamsızdı. HOMA-IR ve TNF- α seviyeleri; yüksek steatoz bulunan grupta, düşük steatoz bulunan gruba kıyasla yüksek fakat anlamsızdı. Bu konuda, başka literatür bulunmaması nedeniyle, örnek büyüklüğü fazla olan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Değişen yaşam koşulları ve modern hayat, insanların hareketlerini kısıtlamalarına yol açmaktadır. Yüksek kalori girdisi yanında azalmış fiziksel aktivite, pek çok sağlık sorununu beraberinde getirmektedir. Günümüz toplumlarında son on yılda obezite, önemli bir sağlık sorunu olmaya başlamıştır. Gelişmiş ülkelerde, obezite prevalansı %25 ile %35 arasına ulaşmıştır. Tüm toplumlarda giderek artan bir epidemi halini alan obezitede, 10 yılda %10-30 arasında bir artış olduğu bildirilmiştir (159, 173).

Obezite, NASH için en önemli risk faktörlerinden biridir. Dünya genelinde obezite prevalansının her geçen gün arttığı düşünülürse, NASH, yakın gelecekte dünya için önemli bir sağlık sorunu haline gelecektir. Dünyada, NASH için kabul edilen bir ilaç bulunmamaktadır ve NASH tedavisinde diyet ve egzersiz gibi yaşam tarzı değişiklikleri önerilmektedir. Kilo kaybının patofizyolojik temeli, yağ dokunun azalması ve insülin direncinde iyileşmeye neden olmasıdır (174). Egzersiz, iskelet kasında GLUT-4 membran lokalizasyonunu artırarak insülin direncinin kırılmasını sağlamaktadır (175).

Çalışmamızda, hasta grubu VKİ değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. 28 hastanın 18'i (%64.28) obezdi. 7 hasta aşırı kilolu (25–29,9 kg/m²), 3 hasta ise normal kilolu (18,5–24,9 kg/m²) idi. Gücin ve ark. (176), 27 NASH'lı hasta ile yaptıkları çalışmada vakaların tamamında, VKİ değerlerinin 25'in üstünde olduğunu, 15

hastanın ise obez olduğunu bildirmişlerdir. Benzer çalışmalarda da NASH'ta obezite sıklığı %57-90 arasında bildirilmiş olup, sonuçlarımız literatür ile uyumlu idi.

VKİ ile HOMA-IR arasında pozitif korelasyon tespit ettik. Pittas ve ark. (177), obez hastalarla yaptıkları çalışmada, osteokalsin düzeylerinin glukoz, HOMA-IR ve VKİ ile negatif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, VKİ ile total osteokalsin arasında da negatif korelasyon tespit edilmiştir. Literatürde total osteokalsin seviyelerinin VKİ ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (172). Nonalkolik yağlı karaciğerli obez hastalarla yapılan bir çalışmada, kilo kaybı ile osteokalsin seviyelerinin arttığı; HOMA-IR, AST ve ALT seviyelerinin ise düştüğü tespit edilmiştir (10). Sonuçlarımız literatür ile uyumlu idi.

Hasta grubunu VKİ değerlerine göre obez olmayan ($VKİ < 30 \text{ kg/m}^2$) ve obez olan ($VKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$) grup olarak ikiye ayırdık ve sağlıklı kontroller ile kıyasladık. HOMA-IR düzeyleri obez grupta yüksekti fakat, obez olmayan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Total osteokalsin düzeyleri obez grupta düşük bulundu fakat, obez olmayan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. NASH'ta bu konu ile ilgili benzer çalışma olmaması nedeniyle, sonuçlarımızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Proinflamatuvar sitokinler ile başlayan inflamasyon, akut faz reaksiyonunun oluşmasını sağlar. Hepatositler yüzeylerinde taşıdıkları çeşitli sitokin reseptörleri ile organizmanın hem sistemik hem de yerel savunma sistemi için çok önemli bir hedeftir. Stellat hücreleri ve Kupffer hücrelerinin, hem proinflamatuvar sitokinler için reseptörleri hem de sitokinleri üretme kapasiteleri vardır (178).

IL-1 β , TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler karaciğere portal venden kan yolu ile gelirler ve sitokinler hepatosite ulaşırken eş zamanlı olarak Stellat ve Kupffer hücreleri tarafından da yanıt oluşturulur. Proinflamatuvar sitokinlerin tip 2 diyabet, insülin direnci ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (143, 144).

TNF- α seviyelerini kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda yüksek tespit ettik. NASH'lı hastalarda TNF- α seviyelerinin yüksek olduğu bilinmektedir. Basit yağlanmanın steatohepatite ilerlemesinde, TNF- α 'nın önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Yüksek TNF- α seviyelerinin, hayvan modelleri ve insanlarda obezite ve insülin direnci ile ilişkili olduğu ile ilgili literatürde çeşitli yayınlar mevcuttur. TNF- α , stellat hücre

aktivasyonunda rol oynar (156, 157). Hücre apoptozunu da tetikleyebilmektedir. TNF- α , osteoklast farklılaşmasını uyarır ve kemik yıkımı artar. Pluripotent projenitör hücrelerde, TNF- α 'nın osteoblastların farklılaşmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (155). Çalışmamızda osteokalsin seviyelerindeki azalma, TNF- α artışından kaynaklanmış olabilir.

TNF- α ile HOMA-IR arasında pozitif korelasyon tespit ettik. 1993 yılında Hotamisligil ve ark. (179), obez rodentlerde TNF- α ve insülin direnci ilişkisini göstermelerinden sonra bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. TNF- α 'nın, NASH'ta insülin direnci ile ilişkili olarak hastalık patogenezinde rolü olduğu ileri sürülmektedir. İnsülin direnci bulunmayan grupta TNF- α seviyeleri en yüksekti fakat, insülin direnci bulunan hasta grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

Çalışmamızda IL-10, IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin hasta ve kontrol grubu arasında değişmediği tespit edilmiştir. Literatür taramamıza göre, IL-1 β ile ilgili NASH'ta az sayıda çalışma mevcuttur. IL-6 seviyelerinde de, hasta grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu. Bizim bulgularımıza benzer şekilde IL-6 seviyelerinin NASH'ta değişmediğini gösteren literatürler mevcuttur (180, 181).

IL-10, sitokin sentez inhibitörü olan major antiinflamatuvar sitokindir. IL-10'un viral, otoimmün, alkole bağlı gelişen karaciğer hasarında koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. Deneysel çalışmalarla, IL-10'un insülinin etkisi ile direkt ilişkili olduğu, eksojen IL-10'un iskelet kası ve karaciğerde insülin duyarlılığını geliştirdiği gösterilmiştir (146, 148).

Cintra ve ark. (147), deneysel olarak diyetle karaciğer yağlanması oluşturulan farelerde, IL-10 inhibisyonu sonucunda inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun arttığını ve insülin sinyalinde bozukluk oluştuğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise, yağlı diyetle beslenen IL-10 knockout fareler insülin direnci ve steatoz açısından değerlendirilmiş, IL-10'un sadece steatoz için koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (182). Mager ve ark. (183), nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı bulunan obez çocuklarda IL-10 seviyelerini düşük bulmuşlardır. NASH'ta az sayıda literatürün bulunduğu bu konuda, örnek büyüklüğü daha geniş yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hidrojen peroksit, hücrede pek çok bölgeyi hedef alarak ve bu bölgelere saldırmak suretiyle hidroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla

kolayca reaksiyona girebilmektedir. Hidroksil radikali, guaninin 4., 5. ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girebilir.

Hidroksil radikalının, DNA'da yaptığı en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen baz hasar ürünü 8-OHdG'dir. 8-OHdG ölçümü DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilir (130). Çalışmamızda, NASH'lı hasta grubu ile kontrol grubu serum 8-OHdG düzeyi bakımından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Steatozun steatohepatite, steatohepatitin fibrozis ve siroza ilerlemesinde oksidatif stres önemli rol oynamaktadır. Mitokondri ROT'un ana hücresel kaynağıdır. Lipid peroksidasyonu, ROT oluşumu, sitokin salınımı ve antioksidanların azalmasının neden olduğu oksidatif stres, hücre hasarına yol açmaktadır. Oksidatif hücre hasarı, nekroz ya da apoptoz ile sonuçlanabilmektedir.

Mitokondri disfonksiyonu iki farklı nedenle NASH'ta önemli rol oynamaktadır. Birincisi orta ve kısa zincirli serbest yağ asitlerinin oksidasyon merkezi mitokondri olduğu için, disfonksiyon durumunda yağ birikimi oluşacaktır. İkinci neden ise oksidatif streştir (40, 47).

ROT; hücre ölümü, Mallory cismi yapımı, kollajen sentezi ve doku inflamasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Hepatik stellat hücreler, disse aralığında hepatositler ile endotel arasında yerleşmiş sitokin ve büyüme faktörü sentez ve sekresyonu yapabilen hücrelerdir. Aktive olduklarında, karaciğer fibrozisinden sorumlu ekstrasellüler matriks proteinlerini ve kollajen sentezlerler. Oksidatif stres, hepatik stellat hücrelerini aktive eder. NASH'ta hepatik stellat hücre aktivasyonu vardır ve bu durumun fibroz derecesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (41, 43).

Seki ve ark. (184), 17 NASH'lı hasta ile yaptıkları çalışmada, 11 hastada 8-OHdG ekspresyonunu karaciğerde inflamasyon alanlarında tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, Machado ve ark. (185) 8-OHdG düzeylerinin NASH'ta kontrol grubuna kıyasla farksız olduğunu bildirmişlerdir. Literatür taramamıza göre, NASH'ta oksidatif DNA hasarı üzerine yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması nedeniyle, bulgularımızın literatüre katkı sağlayacağı kanısındayız.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular NASH patogenezinde insülin direnci ve obezitenin önemli faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmamız, NASH'ta hem total

osteokalsin hemde ucOC'un insülin direnci ile birlikte değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasında, insülin direnci ve osteokalsin ilişkisine NASH penceresinden farklı bir bakış kazandırdığımızı düşünmekteyiz. Örnek büyüklüğü daha geniş olan yeni çalışmalar ile bu ilişkinin daha iyi açıklanacağı kanısındayız. Hastalığın patogenezinin açıklanması ve tedavi protokollerine faydalı olması açısından, bulgularımızın literatüre önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 2-12.
2. Bogdanova K, Poczatkova H, Uherkova L, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) a novel common aspect of the metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006; 150: 101-4.
3. Nobili V, Carter-Kent C, Feldstein AE. The role of lifestyle changes in the management of chronic liver disease. *BMC Med* 2011; 9: 70-77.
4. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab* 2011; 14: 575-85.
5. Wallace JM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modelling. *Diabetes Care* 2007; 27: 1487-1495.
6. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54.
7. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-9.
8. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456-469.

9. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *PNAS* 2008; 105: 5266-70.
10. Fernández-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 237-45.
11. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. Circulating osteocalcin level is associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and sensitivity independent of the plasma adiponectin level. *Osteoporos Int* 2012; 23: 1337-42.
12. Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, et al. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. *Bone* 2011; 48: 720-5.
13. Feldstein AE, Bailey SM. Emerging role of redox dysregulation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 421-4.
14. Nomoto K, Tsuneyama K, Takahashi H, Murai Y, Takano Y. Cytoplasmic fine granular expression of 8-hydroxydeoxyguanosine reflects early mitochondrial oxidative DNA damage in nonalcoholic fatty liver disease. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16: 71-5.
15. Dasarathy S, Yang Y, McCullough AJ, et al. Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 382-8.
16. Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 661-8.
17. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 1-8.
18. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38: 413-9.
19. Miller AM, Wang H, Bertola A, et al. Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. *Hepatology* 2011; 54: 846-56.
20. Diehl MA, Li PZ, Lin ZH, et al. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 303-306.

21. Riley TR, Bhatti A M. Preventive Strategies in Chronic Liver Disease: Part I. Alcohol, Vaccines, Toxic Medications and Supplements, Diet and Exercise Am FamPhysician 2001; 64: 1555-1561.
22. Ludwig J, Viggiano TR, Mc Gill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic Proc 1980; 55: 434-38.
23. Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. Am J Med 1979; 67: 811-6.
24. Pérez Aguilar F, Benlloch S, Berenguer M, et al. Non-alcoholic statohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications. Rev Esp Enferm Dig 2004; 96: 628-39.
25. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 2004; 40: 1387-95.
26. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. Ann Intern Med 1997; 126: 137-145
27. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 2004; 40: 1387-95.
28. Stengel JZ, Harrison SA. Nonalcoholic Steatohepatitis: Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment. Gastroenterology & Hepatology 2006; 2: 440-9
29. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. Gastroenterology 2001; 121: 91-100.
30. Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. J Pediatr 1995; 127: 700-4.
31. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 2005; 115: 1343-51.
32. Çolak Y, Tuncer İ. Nonalkolik karaciğer yağlanması ve steatohepatit. İst Tıp Fak Derg 2010; 73: 85-91.
33. Anty R, Lemoine M. Liver fibrogenesis and metabolic factors. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2011; 35: 10-20.
34. Edmison J, McCullough AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. Clin Liver Dis 2007; 11: 75-104.

35. Medina J, Fernández-Salazar LI, García-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2004; 27: 2057-66.
36. Coulon S, Francque S, Colle I, et al. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 2012; 59: 442-9.
37. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 829-38.
38. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-5.
39. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45: 1366-74.
40. Sakaida I, Okita K. The role of oxidative stress in NASH and fatty liver model. *Hepatology Research* 2005; 33: 128-131.
41. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1297-305.
42. Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 360-9.
43. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012; 142: 711-725.
44. Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 997-1001.
45. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-9.
46. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18: 139-43.
47. Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update *Obes Rev* 2010; 11: 430-45.
48. Anania FA. Adiponectin and alcoholic fatty liver: Is it, after all, about what you eat? *Hepatology* 2005; 42: 530-2.

49. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117-21.
50. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125: 1796-807.
51. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9: 299-314.
52. D'Adamo M, Buongiorno A, Maroccia E, et al. Increased OB gene expression leads to elevated plasma leptin concentrations in patients with chronic primary hyperinsulinemia. *Diabetes* 1998; 47: 1625-9.
53. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, et al. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3584-9.
54. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, et al. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003; 38: 674-82.
55. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, et al. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* 2006; 43: 474-84.
56. Pravenec M, Kazdová L, Landa V, et al. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 2003; 278: 45209-15.
57. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, et al. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 1128-36.
58. Yılmaz Y. Nonalkolik Steatohepatit ve Kronik Hepatit C Enfeksiyonu Olan Hastalarda Serum Kaspaz Kırılmış Sitokeratin-18 (CK18-Asp396) Düzeyleri, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bursa 2007; 51.
59. Nozaki Y, Saibara T, Nemoto Y, et al. Polymorphisms of interleukin-1 beta and beta 3-adrenergic receptor in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 106-110.
60. Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 1996; 80: 1147-66.
61. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 17-26.

62. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2002; 34: 255-62.
63. Daniel S, Ben-Menachem T, Vasudevan G, Ma CK, Blumenkehl M. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3010-4.
64. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62.
65. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5286-96.
66. Contos MJ, Choudhury J, Mills AS, et al. The histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 481-500.
67. MEDSCAPE web site, Figures for: Nonalcoholic Fatty Liver Disease http://www.medscape.com/content/2003/00/44/93/449315/449315_fig.html (13.02.2013).
68. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 643-50
69. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
70. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42: 132-8
71. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-9.
72. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; 163: 1301-11.
73. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA* 2003; 289: 3000-4.
74. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 1-12.
75. Lomonaco R, Chen J, Cusi K. An Endocrine Perspective of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Ther Adv Endocrinol Metab* 2011; 2: 211-25.

76. Das K, Kar P. Non-alcoholic steatohepatitis. *J Assoc Physicians India* 2005; 53: 195-9.
77. Lomonaco R, Sunny NE, Bril F, et al. Nonalcoholic Fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. *Drugs* 2013; 73: 1-14.
78. Aly FZ, Kleiner DE. Update on fatty liver disease and steatohepatitis. *Adv Anat Pathol* 2011; 18: 294-300.
79. Khedmat H, Taheri S. Non-alcoholic steatohepatitis: An update in pathophysiology, diagnosis and therapy. *Hepat Mon* 2011; 11: 74-85.
80. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26: 98-106.
81. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 285-300.
82. Finelli C, Tarantino G. Have guidelines addressing physical activity been established in nonalcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6790-800.
83. Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 537-44.
84. Shargorodsky M, Omelchenko E, Matas Z, Boaz M, Gavish D. Relation between augmentation index and adiponectin during one-year metformin treatment for nonalcoholic steatohepatosis: effects beyond glucose lowering? *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 61-69.
85. Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1667-72.
86. Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1682-98.
87. Üstüdal KM, Vuillaume R, Donma O, Dolbun K. Genel ve Klinik Biyokimya II, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2011: 134-135.
88. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR., Biyokimya (3. Baskı), Doç. Dr. Engin Ulukaya (Edt), Nobel Tıp Kitabevi, 2007: 305-312.
89. Pansuria M, Xi H, Li L, Yang XF, Wang H. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 916-31.

90. Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol* 2012; 3: 181.
91. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. *Diabetes Care* 1990; 13: 610-30.
92. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 2011; 60: 2441-9
93. Caro JF. Clinical review 26: Insulin resistance in obese and nonobese man. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 691-5.
94. Pedersen O, Bak JF, Andersen PH, et al. Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes* 1990; 39: 865-70.
95. Tunçel T. Primer Açık Açılı Glokomlularda Göz İçi Basıncı İle İnsülin Direnci (HOMA-IR, HOMA2-IR Quicks İndeks), hs-CRP, Serum Adiponektin, Visfatin Düzeyleri Arasındaki İlişki, Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul 2008; 73.
96. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 353-63.
97. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 665-79.
98. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis* 2012; 30; 2-11.
99. Işıldak M, Güven GS, Gürlek A. Metabolik sendrom ve insülin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 96-99.
100. Singh B, Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes* 2010; 1: 36-47.
101. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
102. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, et al. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes* 1998; 47: 1643-9.
103. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-95.

104. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996; 17: 333-68.
105. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 432-46.
106. Price PA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1980; 255: 11660-3.
107. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69: 990-1047.
108. Smith JK. The postprandial excursion of total and undercarboxylated osteocalcin concentration following low versus high complex carbohydrate meals in healthy weight adult, Master Thesis, School of Medicine Oregon Health & Science University, 2009; 121.
109. Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 1982; 21: 2538-47.
110. Gundberg CM, Wilson PS, Gallop PM, Parfitt AM. Determination of osteocalcin in human serum: results with two kits compared with those by a well-characterized assay. *Clin Chem* 1985; 31: 1720-3.
111. Diaz DE, Guerrero R, de la Piedra C. Six osteocalcin assays compared. *Clin Chem* 1994; 40: 2071-7.
112. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 255-64.
113. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 1999; 93: 1798-808.
114. Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012; 32: 105-12.
115. Vesper HW. Analytical and preanalytical Issues in Measurement of Biochemical Bone Markers. *Labmedicine* 2005; 36: 424-429.
116. Fusaro M, Crepaldi G, Maggi S, et al. Vitamin K, bone fractures, and vascular calcifications in chronic kidney disease: an important but poorly studied relationship. *J Endocrinol Invest* 2011; 34: 317-23.
117. Capra F, Casaril M, Gabrielli GB, et al. Plasma osteocalcin levels in liver cirrhosis. *Ital J Gastroenterol* 1991; 23: 124-7.

118. Jagtap VR, Ganu JV, Nagane NS. BMD and Serum Intact Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis Women. *Indian J Clin Biochem* 2011; 26: 70-3.
119. Kim M, Kim H, Sohn C. Relationship between vitamin K status, bone mineral density, and hs-CRP in young Korean women. *Nutr Res Pract* 2010; 4: 507-14.
120. Kuwabara A, Fujii M, Kawai N, et al. Bone is more susceptible to vitamin K deficiency than liver in the institutionalized elderly. *Asia Pac J Clin Nutr* 2011; 20: 50-5.
121. Jagtap VR, Ganu JV. Serum osteocalcin: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis *IJPBS* 2011; 1: 510-517.
122. Banfi G, Daverio R. In vitro stability of osteocalcin. *Clin Chem* 1994; 40: 833-4.
123. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 2010; 142: 309-19.
124. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010; 142: 296-308.
125. Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008; 8: 351.
126. Yeap BB, Chubb SA, Flicker L, et al. Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur J Endocrinol* 2010; 163: 265-72.
127. Chen L, Li Q, Yang Z, et al. Osteocalcin, glucose metabolism, lipid profile and chronic low-grade inflammation in middle-aged and elderly Chinese. *Diabet Med* 2013; 30: 309-31.
128. Zhou M, Ma X, Li H, et al. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals. *Eur J Endocrinol* 2009; 161: 723-9.
129. Saleem U, Mosley TH, Kullo IJ. Serum Osteocalcin Is Associated With Measures of Insulin Resistance, Adipokine Levels, and the Presence of Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1-5.
130. Word RJ, Peters TJ. Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. *Clinical chemistry*. 3th Ed. Mosby Year Book, Inc. 1996; 765-777
131. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 1990; 49: 577-587.
132. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, et al. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004; 134: 3143-3163.

133. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Costello RB. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
134. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: 1-14.
135. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
136. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 1-14.
137. Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 2012; 37: 503-17.
138. Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 1-9.
139. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006; 5: 14.
140. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009; 27: 120-39.
141. Wua LL, Chioud CC, Change PY, Wua JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 2004; 339: 1-9
142. O'Shea JJ. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity* 1997; 7: 1-11.
143. Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol* 2007; 37: 34-45.
144. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 92-100.
145. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 241-69.
146. Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1681-5.
147. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology* 2008; 48: 628-637.

148. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1055-8.
149. Yaghini N, Mahmoodi M, Asadikaram GR, et al. Serum levels of interleukin 10 (IL-10) in patients with type 2 diabetes. *Iran Red Crescent Med J* 2011; 13: 752.
150. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; 117: 3720-32.
151. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999; 179: 294-304.
152. Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13590
153. Dinarello CA. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *J Intern Med* 2011; 269: 16-28.
154. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett* 2008; 582: 117-31.
155. Wong M, Ziring D, Korin Y, et al. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol* 2008; 126: 121-36.
156. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 274-80.
157. Nadir I, Oğuz D. Adipokinler. *Güncel Gastroenteroloji* 2009; 13; 107-109.
158. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg* 2011; 54: 819-31.
159. Weisell RC. Body mass index as an indicator of obesity. *Asia Pacific J Clin Nutr* 2002; 11: 681-684.
160. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-23.
161. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 99-112.
162. Duman DG, Tözün N. Nonalkolik Yağlı Karaciğer: Karaciğerin En Sık Görülen Hastalığı. *Türk Aile Hek Derg* 2004; 8: 9-13.
163. Haffner SM. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 61: 9-18.

164. Bao YQ, Zhou M, Zhou J, et al. Relationship between serum osteocalcin and glycaemic variability in Type 2 diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38: 50-4.
165. Polgreen LE, Jacobs DR Jr, Nathan BM, et al. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity* 2012; 20: 2194-201.
166. Shea MK, Gundberg CM, Meigs JB, et al. Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 1230-5.
167. Prats-Puig A, Mas-Parareda M, Riera-Pérez E, et al. Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care* 2010; 33: 661-3.
168. Crouzet J, Bochet-Cadiou A, Denis J, Brossard C. Osteocalcin in chronic alcoholism. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1991; 58: 781-5.
169. Szalay F, Lakatos P, Németh J, et al. Decreased serum osteocalcin level in non-alcoholic and alcoholic chronic liver diseases. *Orv Hetil.* 1991; 132: 1301-5.
170. Yilmaz Y, Kurt R, Eren F, et al. Serum osteocalcin levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with ballooning degeneration. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71: 631-6.
171. Aller R, Castrillon JL, de Luis DA, et al. Relation of osteocalcin with insulin resistance and histopathological changes of non alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2011; 10: 50-5.
172. Hwang YC, Jee JH, Jeong IK, et al. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study. *Diabetes Care* 2012; 35: 1919-24.
173. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010; 303: 235-41.
174. Bhat G, Baba CS, Pandey A, Kumari N, Choudhuri G. Life style modification improves insulin resistance and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2012; 4: 209-17.
175. Thorell A, Hirshman MF, Nygren J, et al. Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 277: 733-41.
176. Gücin Z, Geçer MÖ. Nonalkolik steatohepatitler (27 olguda histolojik özellikler, grade ve stage değerlendirilmesi). *İstanbul Tıp Dergisi* 2004; 4: 5-9.

177. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 827-32.
178. Hijona E, Hijona L, Arenas JI, Bujanda L. Inflammatory mediators of hepatic steatosis. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 837419.
179. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
180. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007; 42: 573-82.
181. Işık MD, Nonalkolik steatohepatitte kemik mineral dansitesinin klinik ve laboratuvar parametreleriyle ilişkisi, Tıpta uzmanlık tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Diyarbakır 2011; 59.
182. den Boer MA, Voshol PJ, Schröder-van der Elst JP, et al. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 2006; 147: 4553-8.
183. Mager DR, Yap J, Rodriguez-Dimitrescu C, et al. Anthropometric measures of visceral and subcutaneous fat are important in the determination of metabolic dysregulation in boys and girls at risk for nonalcoholic Fatty liver disease. *Nutr Clin Pract* 2013; 28: 101-11.
184. Seki S, Kitada T, Yamada T, et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62.
185. Machado MV, Ravasco P, Jesus L, et al. Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 95-102.

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nonalkolik Steatohepatitli Hastalarda İnsülin Direnci ile Osteokalsin ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkinin Araştırılması		
ARIŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
EUDRACT NUMARASI			
SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. K. Muzaffer Üstüdal		
SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya		
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI			
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı		
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı		
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu		
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZM. TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	DR. TEZİ ☒ Y.LİSANS TEZİ ☐
ARAŞTIRMA FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
	FAZ 2	☐	
	FAZ 3	☐	
	FAZ 4	☐	
	BE/BY	☐	
	DİĞER	☐ Diğer ise belirtiniz	
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	☐ Belirtiniz	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☐ ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	DİLİ		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI	Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
SİGORTA	☐
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐
ILAN	☐
YILLIK BİLDİRİM	☐
SONUÇ RAPORU	☐
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐
DİĞER	☐

ASLI GİBİDİR



KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2011/243	Karar Tarihi : 05.04.2011
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. K. Muzaffer Üstdal'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Erciyes Üniversitesi Senatosunun 08.12.2010 tarih ve 16 nolu toplantı kararı
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Kader Köse</i>
Prof. Dr. Halit MADENOĞLU	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Halit Madenoğlu</i>
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Olgun Kontaş</i>
Prof.Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Duran Arslan</i>
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>İrfan Özyazgan</i>
Doç.Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Polat Durukan</i>
Doç.Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Hasan Basri Ulusoy</i>
Doç.Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Fatih Tanriverdi</i>
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Leyla Hasdiraz</i>
Doç.Dr. Mehmet Güngör KAYA	Kardiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Mehmet Güngör Kaya</i>
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Ertuğrul Mavili</i>
Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Ferhan Elmalı</i>
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Rektörlük	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Zübeyde Çelebi</i>
Ecz. Nuran YOZGAT	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Nuran Yozgat</i>
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	E.Ü. Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Yusuf Oğuz Altuntaş</i>

ASLI GİBİDİR



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Kıymet DOLBUN SEÇKİN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 18 Temmuz 1987, Antalya

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0544 6206662

email: mykymet@hotmail.com

Yazışma Adresi: Cumhuriyet Mah. İlayda Sok. Güneş Apt. no: 39 İldem

Melikgazi/Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Bünyan Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Erciyes Üniversitesi	2008

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1.Başkol G, Dolbun Seçkin K, Bayram F, Tanrıverdi F. Investigation of serum paraoxonase 1 activity and lipid levels in patients with hyperthyroidism. Turk J Med Sci 2012; 42 (Sup.1): 1166-1171.

2.Üstdal M, Vuillaume R, Donma O, Dolbun K. Genel ve Klinik Biyokimya II, İstanbul Tıp Kitabevi 2012