



**T.C**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**NONALKOLİK STEATOHEPATİTLİ OLGULARIN PERİFERİK KAN  
LENFOSİTLERİNDE KROMOZOM KIRIK ANALİZİ VE MİKRONÜKLEUS  
YÖNTEMİ İLE GENOM İNSTABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Şener ARIKAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA - 2013**



**T.C**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**NONALKOLİK STEATOHEPATİTLİ OLGULARIN PERİFERİK KAN  
LENFOSİTLERİNDE KROMOZOM KIRIK ANALİZİ VE MİKRONÜKLEUS  
YÖNTEMİ İLE GENOM İNSTABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Şener ARIKAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuna GÜLTEN**

**BURSA – 2013**

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	iii
İngilizce Özet (Summary).....	v
Giriş.....	1
Nonalkolik Steatohepatit Gelişimi İçin Genetik Predispozisyon .....	2
Nonalkolik Steatohepatitte Semptomlar, Bulgular ve Tanı .....	3
Nonalkolik Steatohepatit Patofizyolojisi .....	4
Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Seyri ve Prognozu .....	12
Nonalkolik Steatohepatit ve Metabolik Sendrom .....	15
Genomik İstabilite.....	16
Kromozom Kırıkları ve Kromozom Kırık Testleri.....	19
Mikronükleuslar ve Mikronükleus Testleri.....	28
Kronik Karaciğer Hastalıklarında DNA Hasarı ve Genomik İstabilite.....	31
Gereç ve Yöntem.....	33
Etik Kurul İzni.....	33
Gönüllülerin Seçimi.....	33
Kromozom Kırık Analizi Yöntemi.....	34
Mikronükleus Analizi Yöntemi.....	35
Gönüllülere Ait Verilerin Değerlendirilmesi.....	37
İstatistiksel Hesaplamalar.....	39
Bulgular.....	40
Hasta ve Kontrol Grubunun Birbiriyle Karşılaştırılması.....	40
Hasta Grubu İçerisinde Yapılan Değerlendirmeler.....	41
Kontrol Grubu İçerisinde Yapılan Değerlendirmeler.....	48
Tüm Gönüllüler Üzerinde Yapılan Değerlendirmeler.....	51
Tartışma ve Sonuç.....	56
Kaynaklar.....	62
Teşekkür.....	69

Özgeçmiş..... 70

## ÖZET

Nonalkolik steatohepatit (NASH), karaciğerde yağ birikimi ile beraber çeşitli derecelerde enflamasyon, nekroz ve fibrozis ile karakterize bir hastalıktır. Kromozom kırık analizi ve mikronükleus testleri, genomik instabilitenin araştırılması amacıyla en yaygın kullanılan testler arasındadır. Bu çalışmada, NASH hastaları ve sağlıklı gönüllülerin periferik kan lenfositlerinde kendiliğinden meydana gelen mikronükleusları ve kromozomal aberasyonları karşılaştırarak genomik instabilitenin NASH varlığıyla ve gönüllülerin antropometrik ölçümleri ve laboratuvar bulgularıyla ilişkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Araştırmaya toplam 57 gönüllü (32 NASH hastası, beş NASH düzeyinde olmayan nonalkolik yağlı karaciğer hastası ve 20 sağlıklı birey) dahil edildi. Tüm gönüllülerin tam kan lenfosit kültürleri hazırlanarak, bunlarda gözlenen kromozom aberasyonları ve mikronükleuslar araştırıldı.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda elde edilen genomik instabilite parametreleri açısından NASH hastaları ile sağlıklı kişiler arasında anlamlı fark gözlenmedi. NASH hastaları içerisinde yapılan değerlendirmede bazı kromozom aberasyon parametrelerinin hastalıkla ilişkili olduğu bilinen bel çevresi, glikozile hemoglobin (HbA1c) değerleri ve metabolik sendrom kriter sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi. Her üç grupta (NASH hastaları, sağlıklı gönüllüler ve tüm gönüllüler içerisinde) yapılan değerlendirmelerde kilolu veya obez olan kişilerde bazı kromozomal aberasyon parametrelerinin daha yüksek olduğu gözlenerek genomik instabilitenin obezite ile ilişkili olduğu belirlendi. Serum alanin transaminaz değerinin, sağlıklı grupta kromozom tipi aberasyonlar, tüm gönüllüler içerisinde ise mikronükleuslu hücre sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi. Sonuç olarak, çalışmamızda genomik instabilitenin; obezite, bel çevresi, metabolik sendrom kriter sayısı, HbA1c ve alanin transaminaz düzeyi ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Nonalkolik steatohepatit, lenfosit kültürü, kromozom aberasyonları, mikronükleuslar

## **SUMMARY**

### **Investigation of Genomic Instability in Peripheral Blood Lymphocytes of Cases with Nonalcoholic Steatohepatitis Using Chromosome Breakage Analysis and Micronucleus Assays**

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a disease characterized by fat accumulation in liver; accompanied by various degrees of inflammation, necrosis, and fibrosis. Chromosome breakage analysis and micronucleus assays are among the most widely used assays to assess genomic instability. In this study, by comparing spontaneously occurred micronuclei and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of NASH patients with those of healthy individuals, we aimed to investigate whether genomic instability is associated with the presence of NASH and also with anthropometric measurements and laboratory findings of individuals.

A total of 57 volunteers (32 NASH patients, 5 nonalcoholic fatty liver disease patients who do not meet criteria for NASH, and 20 healthy individuals) were included in the study. Whole blood lymphocyte cultures were prepared for each individual and assessed for chromosomal aberrations and micronuclei.

There was no difference between evaluated genomic instability parameters of NASH patients and healthy individuals. In NASH patients, some chromosomal aberration parameters were positively correlated with factors related to the disease such as waist circumference, glycosylated hemoglobin (HbA1c), and number of the components of metabolic syndrome. Assessments in all of the three groups (NASH patients, healthy individuals, and all of the volunteers) revealed that some chromosomal aberration parameters are more frequent in overweight or obese individuals, which indicates that genomic instability is associated with obesity. Serum alanine transaminase levels were positively correlated with chromosome type aberrations in the group of healthy

individuals, and also with micronuclei in the group of all volunteers. In conclusion, our findings revealed that genomic instability is associated with obesity, waist circumference, number of the components of metabolic syndrome, HbA1c, and alanine transaminase levels.

**Key Words:** Nonalcoholic steatohepatitis, lymphocyte culture, chromosomal aberrations, micronuclei



## GİRİŞ

Nonalkolik steatohepatit (NASH), karaciğerde yağlanma ve buna eşlik eden enflamasyon ile seyreden; obezite, hiperlipidemi ve diyabet ile sıklıkla birliktelik gösteren bir hastalıktır. Steatozis olarak adlandırılan karaciğer yağlanması, karaciğer ağırlığının %5'ten fazlasının lipitlerden oluşması şeklinde tanımlanmaktadır (1). Alkol kullanmayan bir kişinin karaciğerinde steatozis tespit edilmesi nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) olarak adlandırılır. Çeşitli derecelerde hepatomegalisi olan veya serum aminotransferaz düzeyleri artmış asemptomatik bireylerde NAYKH bulunabilir. Bu durum nonenflamatuvar benign bir durum olabileceği gibi karaciğer enflamasyonu ile seyreden ve son dönem karaciğer hastalığına kadar ilerleyebilecek bir tablo olan NASH ile de karakterize olabilir (Tablo-1). NASH, belirgin bir alkol kullanımı olmadan karaciğerde steatozis, nekroenflamasyon ve çeşitli derecelerde fibrozis ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır. NAYKH'nin daha ilerlemiş formunu oluşturan NASH'in tanısı klinikopatolojik olarak konmaktadır ve karaciğer biyopsisi ile ilgili histopatolojik bulguların gösterilmesini gerektirmektedir (2, 3).

**Tablo-1:** Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının sınıflandırılması (4).

Aşaması	Gözlenen Bulgular
Evre 1	Sadece karaciğer yağlanması
Evre 2	Yağlanma + enflamasyon
Evre 3*	Yağlanma + ilerlemiş enflamasyon + balon dejenerasyonu
Evre 4*	Yağlanma + fibrozis (ve/veya Mallory cisimcikleri ve sirotik nodüller)

\*: evre 3 ve evre 4, NASH olarak kabul edilmektedir.

Hafif veya ileri derecede obezite, tip 2 diyabet veya dislipidemisi olan kişilerde sıklıkla NAYKH bulunmaktadır (5). NAYKH prevalansı; ultrason, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi tanı yöntemleriyle yapılan farklı

çalışmalarda %2.8 - %46 arasında bildirilmektedir (6-8). Karaciğer enzimleri değerlendirmeye alındığında prevalansı %2.8 - 9.3, histolojik çalışmalarda ise %17.9 - 38.5 arasındadır. Obezite ile paralel olarak son yıllarda NAYKH prevalansı da artış göstermiş ve birçok toplumda en sık gözlenen karaciğer hastalığı haline gelmiştir (6, 9).

### **Nonalkolik Steatohepatit Gelişimi İçin Genetik Predispozisyon**

NAYKH fenotipi yaygın görülmekte, hem ocuk hem erişkinde saptanabilmekte, çeşitli etnik popülasyonlarda gözlenebilmekte ve her iki cinsiyeti etkileyebilmektedir. NAYKH gelişimi ve NASH'e progresyonu çevresel faktörlerden açık olarak etkilenmekle beraber, benzer metabolik risk faktörlerine sahip kişiler arasındaki fenotip çeşitliliği [bazı olgularda benign nonseptomatik seyir gözlenirken bazılarında progresif seyretmesi, siroz veya hepatosellüler karsinoma (HCC) dönüşmesi] altta yatan genetik faktörlerin varlığını düşündürmektedir (10).

NAYKH / NASH prevalansı için etnik farklılıklar da tanımlanmıştır. ABD'de yapılan çalışmalarda prevalansın beyazlarda zencilere göre daha yüksek ve histolojik bulguların daha şiddetli olduğu, Hispanik kökenli Amerikalılarda ise prevalansın daha da yüksek olduğu tespit edilmiştir (1, 11). Amerikalı zencilerde insülin direnci Hispaniklerle benzer düzeylerde olmakla beraber, intraperitoneal yağ, karaciğer yağ oranı ve kan trigliserit düzeyleri daha düşüktür. Asya kökenli Amerikalılarda ise görece düşük vücut kütle indeksi (VKİ) değerlerine rağmen NAYKH prevalansı beyaz Amerikalılarla benzer değerdedir. Yağlı karaciğerin NASH ve siroza progresyonu da Hispanik Amerikalılarda diğer ırklara ve özellikle zencilere göre daha sık ortaya çıkmaktadır (10, 12).

Farklı ırklarda NAYKH prevalansının farklı olması, benzer risk faktörlerine sahip kişilerde hastalık şiddetinin büyük değişkenlikler göstermesi gibi gözlemler, NAYKH gelişiminde genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. Yağlı karaciğer fenotipinin meydana gelmesinde genetik faktörlerin etkisini

araştırmak amacıyla karaciğerde yağ birikimi açısından manyetik rezonans spektroskopisi ile değerlendirilen 2111 kişide, 9229 tek nükleotid polimorfizmi incelenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda PNPLA3 genindeki bir varyantın [rs738409 C>G (I148M)] hepatik trigliserit içeriğinde artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (13). Daha sonra yapılan başka çalışmalarda da bu ilişki doğrulanmiştir (14-16). Bu allel açısından homozigot olan kişilerde hepatik trigliserit içeriğinin normal olanlara göre iki kattan daha fazla artmış olduğu tespit edilmiştir (13).

PNPLA3-I148M alleli Hispanik Amerikalılarda, Afrikalı Amerikalılara göre daha sıktır ve etnik farklılıktan kaynaklanan etkilerin temel nedeni olabileceği dşünlmektedir. Transaminaz düzeyleri, steatohepatit varlığı, steatozis ve fibrozisin şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (13, 15). PNPLA3 geninin ürünü olan adiponutrin proteininin fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte lipojenik transasetilaz aktivitesi gösterdiği bilinmektedir (17).

Hintli erkekleri kapsayan bir çalışmada apolipoprotein C3' kodlayan APOC3 genindeki, hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğu bilinen iki polimorfizmin rs2854116 (T-455C) ve rs2854117 (C-482T), NAYKH ve insülin direnci ile de ilişkili oldukları gösterilmiştir (18).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda NCAN, GCKR ve LYPLAL1 genomik bölgeleri de NAYKH ile ilişkili bulunmuştur (16). Bu genlerin rolünün belirlenmesinin, toplumda yaygın görülen NAYKH formlarının gelişmesinde etkili mekanizmalarla ilgili bilgileri arttırabileceği dşnlmektedir (19).

### **Nonalkolik Steatohepatitte Septomlar, Bulgular ve Tanı**

NASH'li vakaların çoğu asemptomatiktir; ancak düşük oranda, özellikle çocuklarda karında şişkinlik, sağ st kadranda ağrı veya halsizlik, yorgunluk gibi semptomlar görülebilir. NASH'te laboratuvar bulguları tanı koydurucu değildir fakat anormal karaciğer fonksiyon testleri olan hastalarda diğer patolojiler elendikten sonra NASH akla gelmelidir. NASH'li vakalarda hakim olan

laboratuvar patolojisi orta derecede artmış transaminaz düzeyidir (genellikle 2-3 kat). Alkolik hepatitin tersine, NASH'te aspartat transaminazın (AST) alanin transaminaza (ALT) oranı birin altındadır. Bazı vakalarda transaminazlar normal de olabilir (2).

Ultrason, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi görüntüleme yöntemlerinin her birinin hepatic steatozisin mevcudiyetini düşündüren tipik bulguları vardır, fakat bu teknikler enflamasyon ve fibrozis derecesini saptamakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle karaciğer biyopsisi; hepatic nekrozu, enflamasyonu ve fibrozisi gerçekçi olarak saptayan ve bunların derecesini belirleyen tek diyagnostik testtir ve NASH tanısında "altın standardı" oluşturmaktadır (2, 3).

### **Nonalkolik Steatohepatit Patofizyolojisi**

NAYKH / NASH gelişiminin patofizyolojik mekanizması tam olarak bilinmese de meydana gelmesinde genetik ve çevresel birçok faktörün etkili olduğu düşünülmektedir (20). Hepatositler içerisinde lipit birikimi tüm hastalarda bulunan ortak özelliştir. Day ve James tarafından ortaya atılan iki vuruş (two hits) hipotezine göre (21) bu durum hastalığın ilk aşamasını meydana getirmektedir ve ikinci vuruş gelmediği müddetçe hastalık ilerlememektedir. Yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında ortaya çıkan hepatosellüler oksidatif stres artışının ikinci vuruş için tetiği çekerek hastalığın NASH ve siroza progresyonuna neden olduğu öne sürülmüştür (21).

Hastalığın patogenezinde yağ asitlerinin doğrudan hepatotoksik etkileri, lipit peroksidasyonu, proenflamatuar sitokinlerin ve adipokinlerin salınımı, endoplazmik retikulumda hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi, mitokondriyal disfonksiyon gibi etkilerle meydana gelen hepatosellüler hasarın da önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu etkilerin belli bir süre devam etmesinin hepatic stellat hücrelerin aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Karaciğerde kollajen üretiminden sorumlu temel hücreler olan stellat hücrelerinin

aktivasyonu, karaciğer fibrogenezisini başlatan esas etkidir ve hastalığın son dönem karaciğer hastalığına doğru progresyonuna neden olmaktadır (1, 22).

### **Karaciğerde Lipit Birikimi**

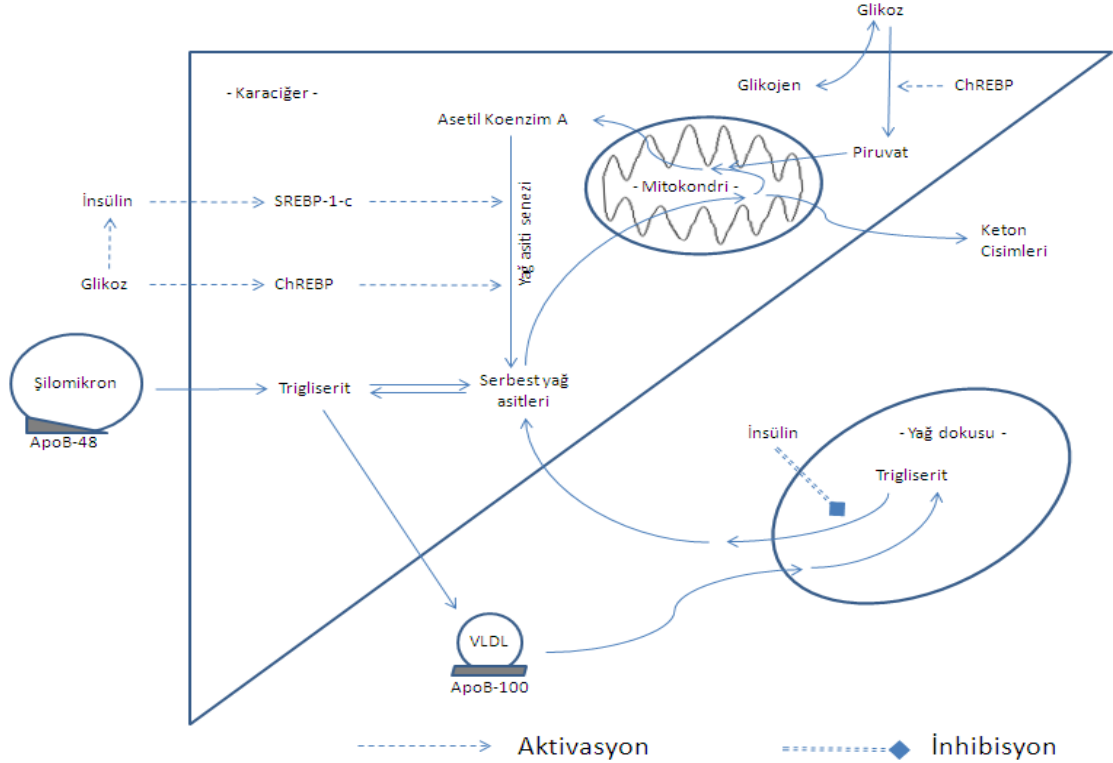
Karaciğer, karbonhidrat ve lipit homeostazisinde merkezi rol üstlenir. Beslenme sonrası glikoz düzeylerinin artması, insülin artışına ve glikozdan glikojen ve yağ asitleri sentezlenmesine neden olurken, endojen glikoz üretimini durdurur. Açlık sırasında ise kandaki insülin düzeyi düşerken glukagon ve epinefrin düzeyleri artar ve hormona duyarlı lipaz aktive olarak adipositlerdeki trigliserit hidrolizi stimüle olur. Yağ asitleri serbestleşerek kana geçer ve çoğunlukla albümine bağlanarak karaciğere taşınır. PPAR- $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha), mitokondriyal yağ asiti oksidasyonunda görev alarak yağ asiti katabolizmasında temel rol oynar (1).

Hepatik steatozis, karaciğere gelen ve uzaklaştırılan yağlar arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanır. Karaciğerde biriken yağın potansiyel kaynakları diyetle alınan yağ asitleri, karaciğerde de novo lipogenezis ile üretilen yağ asitleri ve yağ dokusundan gelen yağ asitleridir. Karaciğere gelen serbest yağ asitleri için üç seçenek söz konusudur. Mitokondride okside olarak enerji ve keton cisimleri üretiminde kullanılabilir, apolipoproteinlerle bir araya gelerek çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) olarak kana salgılanabilir veya yeniden esterleştirilerek trigliserit olarak depolanabilirler (Şekil-1).

Karaciğere gelen serbest yağ asitlerinde artış steatozis gelişiminde temel etkidir. Yapılan çalışmalarla, serumda serbest yağ asitlerinin, NAYKH'de sağlıklı kişilere göre artmış olduğu gösterilmiştir. Bu artış, özellikle yağ dokusunda lipoliz artışından kaynaklanmaktadır. Bu durum, VLDL sekresyonunda kompensatuar bir artışa neden olsa da hepatik trigliserit içeriğini normal düzeyde tutmak için yeterli olmamaktadır (23).

Sağlıklı kişilerde de novo lipogenezis karaciğer yağlarının % 5'ini oluşturmakta iken NAYKH'de aktive olarak %26'ya çıkmaktadır (24). De novo lipogenezisin düzenlenmesinde SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c) transkripsiyon faktörü önemli rol oynamaktadır. İnsüline duyarlı olan

dokularda, özellikle de karaciğerde SREBP-1c'nin artmış ekspresyonu, insülinle indüklenen genlerin, insüline ihtiyaç duyulmadan da stimülasyonuna ve yağ asiti sentezinin artmasıyla trigliserit sentezlenmesine neden olur (Şekil-1). Fizyolojik koşullar altında SREBP-1c geçici olarak aktive edilerek metabolizmanın işleyişi glikojen sentezinden lipit sentezine kaymaya neden olurken SREBP-1c'nin sürekli olarak yüksek kalması durumunda artmış yağ asiti sentezi karaciğerde yağ birikmesine neden olur (25). LXR (Liver X receptor), hepatik lipit regülasyonunda kilit rol oynamaktadır. LXR endojen lipit sentezini düzenleyen SREBP-1c ve ChREBP (Carbonhydrate response element binding protein) aktivasyonuna yol açar. Düzeyleri artan insülin ve glikozun hem LXR'yi hem de SREBP-1c ve ChREBP'yi aktive ederek hepatik lipogenezisin artmasına neden olduğu bilinmektedir (23). ChREBP'nin, lipojenik genlerin glikoz tarafından düzenlenmesinde görev alan temel transkripsiyon faktörü olduğu tespit edilmiştir (25, 26).



**Şekil-1:** Lipit homeostazisindeki temel yollar.

Kronik hiperinsülinemi, NAYKH'deki lipit metabolizması bozukluklarının temel etkenidir. İnsülin artışı, mitokondriyal beta oksidasyonu regüle eden karnitin palmitoiltransferaz enzimini inhibe ederek yağ asitlerinin mitokondri içerisine alınmasını azaltır ve beta oksidasyonda azalmayla karaciğerde trigliserit birikimine neden olur. Bunun yanı sıra, uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizleyen mitokondriyal trifonksiyonel protein (MTP)'deki bozukluğa bağlı olarak mitokondriyal beta oksidasyonun yapılamaması da NAYKH gelişimi ile ilişkili olabilir. MTP'deki bozukluklar resesif olarak kalıtılmaktadır ve çocuklarda genellikle mikroveziküler hepatik steatozise neden olmaktadır (25).

Trigliseritlerin karaciğerden uzaklaştırılmasında rol oynayan bir diğer protein, mikrozomal trigliserit transfer proteindir (MTTP). MTTP trigliseritlerin apo B'ye bağlanmasını ve VLDL'nin oluşturulmasını sağlar. Meydana gelen VLDL partikülleri ihtiyaç duyulan dokularda kullanılmak üzere kana salgılanır. MTTP aktivitesinin azalması veya apo B sentezinin ve sekresyonunun azalması, lipitlerin karaciğerden uzaklaştırılmasını bozarak trigliserit birikimine neden olabilir. MTTP gen mutasyonları, şiddetli hepatik steatozis ve önemli derecede azalmış plazma trigliserit düzeyleri ile ilişkilidir (1).

Tüketilen gıdanın içeriğinin de hepatik yağ birikimi ile ilişkili olduğunu gösteren bulgular mevcuttur. Musso ve ark. NASH hastalarının diyetinde doymuş yağ asitleri ve kolesterol içeriğinin yüksek, çoklu doymamış yağ asitleri, lif ve antioksidan içeriğinin düşük olduğunu; doymuş yağ asitleri tüketimi ile insülin direnci arasında da ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (27). Gıdanın karbonhidrat içeriği, özellikle de fruktoz içeriği önemli rol oynar. Glikozdan farklı olarak dolaşımdaki fruktozun neredeyse tamamı karaciğer tarafından alınır. Fruktoz 6. karbon değil de 1. karbonundan fosforile olduğu için glikojen sentezinde kullanılamamaktadır ve gliseraldehit-3-fosfata dönüştürülerek de novo lipogenezis için sübstrat oluşturmaktadır. Son yıllarda ortalama fruktoz tüketiminin artmış olması, muhtemelen NAYKH prevalansında gözlenen artışa katkıda bulunmaktadır (19).

## **İnsülin Direncinin Nonalkolik Steatohepatit Patogenezindeki Rolü**

İnsülin direnci, gereken etkiyi oluşturmak için normalden yüksek konsantrasyonda insüline ihtiyaç duyulması ya da normal insülin konsantrasyonlarının normal metabolik etkileri yaratamaması şeklinde tanımlanmaktadır ve yükselmiş plazma glikoz ve insülin düzeyleri ile karakterizedir (1). Normal bir kişide, insülin, karaciğerden kana glikoz salınmasında baskılanmaya neden olurken; insülin direnci durumunda bu etki yeterli düzeyde ortaya çıkamamaktadır. Hepatik insülin direnci olarak adlandırılan bu durum glikojenezde bozulmayla, glikojenoliz ve glikoneogenezde artış ile karakterizedir. İnsülin direnci, kas ve yağ hücreleri içerisine glikoz alımını da bozmaktadır (1, 23).

İnsülin direnci gelişiminde obezite birincil rol oynamakla birlikte genetik ve çevresel etmenlerin birlikte etkili oldukları söylenebilir. Her iki ebeveyninde veya bir ebeveyni ve birden fazla kardeşinde tip 2 diyabet bulunan kişilerde obezite bulunmasa bile şiddetli insülin direnci bulunduğu gösterilmiştir. Mevcut genetik yatkınlığa rağmen, adaptasyon gelişimi nedeniyle, NAYKH / NASH veya diyabet onyıllar boyunca gelişmeyebilir. Ancak obezite gelişmesi ile hastalık daha erken ortaya çıkabilmektedir (28).

İnsülin direnci, periferik lipolizin uygunsuz aktivasyonuna ve tokluk durumunda adipositlerden serbest yağ asitlerinin mobilizasyonuna neden olur. Dolaşımda yağ asitlerinin düzeylerinin artışı da karaciğerde ve kaslarda yağ birikmesi, insülin sinyalizasyonunun bozulması ve insülin direncinin daha da ağırlaşmasıyla sonuçlanır (1). Plazmada serbest yağ asitlerinin sadece 24 - 72 saatlik artışının bile insülin duyarlılığı tam olan kişide insülin direnci gelişmesine neden olabildiği bilinmektedir (28).

İnsülin direnci, sadece karaciğere gelen serbest yağ asitlerini arttırarak değil, hiperinsülinemi ile hepatik de novo lipogenezisi stimüle ederek de karaciğerde yağ birikmesine neden olmaktadır. Obezite ve insülin direnci proenflamatuar sitokinlerin artmış düzeyi ile karakterizedir. İnterlökin (IL)-6 ve tümör nekrozis faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler, hepatik SOCS (Suppressors of



cytokine signaling) proteinlerinin ekspresyonlarını arttırarak insülin direncini daha da arttırır (25). SOCS proteinlerinin de SREBP aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (23). Bunların yanında, insülin direncinin; basit steatozisin NASH'e progresyonunda da rol oynadığına dair bulgular mevcuttur. Yapılan çalışmalar NAYKH'de insülin direncinin fibrozisin şiddeti ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (29). Bu etkileri ile insülin direnci NAYKH patofizyolojisinde merkezi rol oynamaktadır (23).

### **Nonalkolik Steatohepatit Patofizyolojisinde Yağ Dokusu ve Lipotoksisitenin Rolü**

Adipositlerin normal fonksiyon yapması; adiposit sayısı ve büyüklüğü, yağ dokusunun yapısındaki diğer hücrelerle ilişkileri gibi birçok faktöre bağlıdır. Yağ hücreleri çok yönlü farklılaşma özelliğine sahip mezenşimal kök hücrelerinden köken alır. Farklılaşım olgunlaşmaları karmaşık bir sinyalizasyon sistemi ile gerçekleşmektedir. PPAR- $\gamma$  ile düzenleme, SREBP-1c gibi transkripsiyon faktörleri ile düzenlemelerle birlikte çalışarak adipositlere aşırı beslenme şartlarına adapte olarak esneklik kazanma imkanı sağlamaktadır. Bu şekliyle yağ dokusu, diğer doku ve organların serbest yağ asitlerinin toksisitesine maruz kalmasını önleyen koruyucu bir doku olarak görev yapmaktadır (30).

Lipotoksisite, serbest yağ asitlerinin zararlı etkileri ve yağın ektopik olarak birikmesiyle beraber, ilgili organda fonksiyon bozukluğu ve / veya hücre ölümüne neden olmaktadır. Yağ dokusu, enerjinin en konsantre şekilde depolandığı enerji deposu olarak görev yapar. Erişkinlerde aşırı beslenme durumunda sistemik lipotoksisiteyi engellemek amacıyla gelişen ilk adaptasyon hücre boyutunun artmasıdır (hipertrofi). Daha uzun dönemde etkili kompensatuar mekanizma ise çocukluk çağında temel mekanizma olan adiposit çoğalmasıdır (hiperplazi). Hipertrofik adipositler makrofajlarda görülene benzer bir gen ekspresyon paterni gösterir ve köpük hücreleri ya da yağ yüklü makrofajlar olarak bilinen ve arteriyel plaklarda gözlenen hücrelere benzer sitokinler salgırlar (30).

Hipertrofik yağ hücreleri belirgin bir metabolik stres altındadırlar. Normal şartlarda hücrelerin endoplazmik retikulumu uyum göstererek protein ve trigliserit sentezi ihtiyaçlarını karşılar. Ancak besin maddelerinin aşırı yüksekliği endoplazmik retikulumun uyum kapasitesini aşar ve “yanlış katlanmış protein yanıtı” aktive olarak c-jun N-terminal kinaz aktivasyonu, enflamasyon ve oksidatif stres yoluyla insülin direnci gelişimi için tetiği çeker. Obezite, tip 2 diyabet ve NAYKH gibi durumlarda yağ dokusunun fonksiyonlarının bu şekilde bozulması endokrin etki gösteren çok sayıda yağ kökenli sitokin salınmasına, serbest yağ asitleri ile indüklenen ektopik yağ birikimine ve lipotoksisiteye neden olur. Bu mekanizmalar ile hücrel enflamasyon yolları ve apoptozis tetiklenir, sistemik enflamasyon ve insülin direnci gelişimi ile glikoz ve lipid homeostazisi bozulur (28).

Obezite ve tip 2 diyabette olduğu gibi NAYKH’de de dolaşımda serbest yağ asitlerinin artış gösterdiği bilinmektedir. Kronik olarak artmış serbest yağ asiti düzeyleri, insülin sinyalizasyon yollarını etkileyerek insülin direnci gelişmesine neden olmaktadır (28). Serbest yağ asitleri, karaciğerdeki trigliserit havuzu için sübstrat teşkil etmenin yanında immün sistem aktivasyonuna neden olmaları, oksidatif stresi ve apoptozisi tetikleyebilmeleri nedeniyle de NAYKH patogeneğinde rol oynamaktadırlar (23)

Günümüzde adipositlerin, birçok enflamatuar sitokini (TNF- $\alpha$ , IL-6, resistin, v.b) salgıladıkları bilinmektedir. Adipokinler, insülin reseptör sübstratı-1 (IRS-1)’i inhibe ederek insülin direncinin gelişmesine aracılık eder ya da makrofajları aktive ederek dolaylı yolla yağ dokusu insülin direncinin gelişmesine, serbest yağ asitlerinin artışına ve lipotoksisiteye neden olurlar (30).

Adipositler tarafından üretilen önemli bir anti-enflamatuar ve antifibrinolitik sitokin olan adiponektinin düşük düzeyleri NAYKH'deki enflamasyona katkıda bulunabilmektedir (17). Adiposit fonksiyonlarının bozulması azalmış plazma adiponektin düzeyleri ile karakterizedir ve NAYKH, NASH, obezite ve tip 2 diyabette plazma adiponektin düzeyinin düştüğü bilinmektedir (28).

### **Oksidatif Stresin Nonalkolik Steatohepatit Patofizyolojisindeki Rolü**

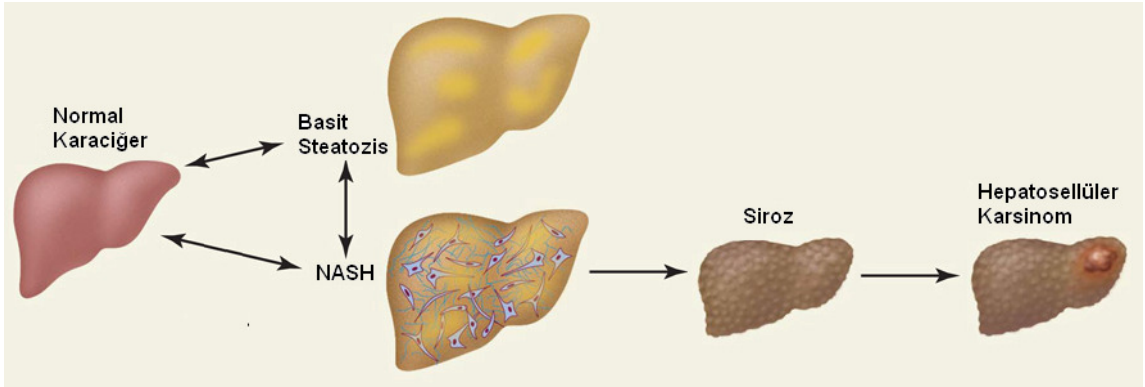
Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan maddelerin dengesizliğinden kaynaklanır. Meydana gelen prooksidanlar topluca reaktif oksijen radikalleri (ROR) olarak adlandırılırlar. NAYKH'de oksidatif stres, serbest yağ asitlerinin hücre içerisinde uğradığı oksidatif süreçlerden kaynaklanır. Birçok çalışma, NASH'in şiddeti ile oksidatif stresin düzeyinin ilişkili olduğunu göstermiştir (31-33). Artmış ROR; ATP ve NAD'nin tükenmesine, DNA hasarına ve protein stabilitesinin değişmesine, lipid peroksidasyonu ile membranların destrüksiyonu sonucu malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi ROR'dan daha uzun ömürlü olan sitotoksik aldehytlerin salınımına neden olur. Bunlar da hepatosit proteinlerine bağlanarak potansiyel olarak zararlı immün yanıt oluşumu, Mallory hyalini oluşumu, nötrofil kemotaksisi, hepatik stellat hücre aktivasyonu ve kollajen sentezine neden olurlar (23).

NAYKH'de mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyon artarak ROR'un temel kaynağını oluşturmaktadır. Ayrıca NASH'te mitokondrilerde kristaların kaybı ve parakristalin inklüzyonlar gibi mikroskopik değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir (34). Bu anomaliler neticesinde, hasarın hedefi ya da kaynağı olarak mitokondrilerin fonksiyonlarının bozulmasının hücresel ATP'nin tükenmesine yol açarak NAYKH ve NASH patofizyolojisinde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (1).

Mitokondri tarafından okside edilemeyen yağ asitleri başlıca bir sitokrom p450 (CYP) enzimi olan CYP2E1 tarafından okside edilirler. Bu yol da ROR üretiminin daha da artmasına neden olmaktadır. Daha az da olsa aktivite gösteren diğer enzimler CYP4A ailesine ait CYP4A10 ve CYP4A14 gibi CYP izoformlarıdır ve bunlar da oksidatif stres kaynağıdırlar. Artmış serbest yağ asitlerinin CYP2E1 ekspresyonunda artışa neden oldukları gösterilmiştir (35). Bu mekanizmalarla artan reaktif oksijen metabolitleri, glutatyon ve E vitamini gibi antioksidanların tüketilmesine yol açar. Bu durum oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Sonuç olarak hepatosit organelleri ve membranlarında hasar ve hepatosellüler nekroz meydana gelir (1).

## Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Seyri ve Prognuzu

NAYKH, sıklıkla basit steatozis olarak adlandırılan ve karaciğer enflamasyonu ya da hepatosellüler hasar gözlenmeyen formdan, NASH ve siroza kadar uzanan durumları kapsamaktadır ve bazen de HCC ile karşımıza çıkabilmektedir (Şekil-2). Biyopsi yapılan NAYK hastalarının üçte birine yakın kısmında NASH bulguları tespit edilmektedir. Bu bireylerin % 20-30'u 10 yıl içerisinde şiddetli fibrozise (evre 3 veya 4) ilerlemektedir. Daha sonra sıklıkla portal hipertansiyon ve komplikasyonları tabloya eklenerek hastalık progresyon göstermektedir (19).



**Şekil-2:** NAYKH'nin oluşma ve progresyon aşamaları (19).

Tanı sırasında şiddetli fibrozis, NASH hastalarının %5 - 10'unda gözlenmektedir ve hastalık progresyonu açısından önemli bir histolojik özelliktir. Enflamasyon, NASH için histolojik kriterleri karşılaması durumunda, şiddetli fibrozis gelişimi için prediktif değere sahiptir. Enflamasyon gözlenmeyen vakalar ise tanı anında fibrozis gözlenirse bile ilerlemiş fibrozis gelişimi için düşük riske sahiptir (30).

Obezite, siroz gelişimi için majör risk faktörüdür. NAYKH'li hastalarda yapılan metabolik çalışmalar, fibrozisin, yağ dokusu insülin direnci ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur ve obezite ile fibrozis arasındaki ilişkiyi desteklemiştir (36). Progresyon için etyolojik olarak incelenen birçok faktör

arasında, tanı sırasındaki histolojinin en güçlü prediktif değere sahip olduğu söylenebilir. Benign yağlı karaciğerin kişinin yaşamı boyu siroza ilerleme ihtimali çok düşük olmakla birlikte, kontrol biyopsisi incelemesini de kapsayan uzun süreli takip çalışmaları, NAYKH evre 2 grubundaki hastalarda steatozis ile birlikte herhangi bir düzeyde enflamasyon varlığının, ilerlemiş fibrozis gelişme ihtimalini 2.5 kat arttırdığını göstermiştir (37).

NASH'in siroza dönüşürken karakteristik histolojik görünümünü kaybedebileceği tespit edilmiştir. Bu bulguya ve bugüne kadar yapılan birçok epidemiyolojik ve histolojik çalışmaya dayanarak, altında yatan herhangi bir etyolojik faktör tespit edilmemesi nedeniyle kriptojenik siroz olarak kabul edilen siroz vakalarının 2/3 - 3/4'ünün altında NASH yattığı düşünülmektedir (6). NASH'teki etnik farklılıklar kriptojenik siroz için de gösterilmiştir ve ABD Ulusal Organ Paylaşım Ağı (United Network for Organ Sharing) verilerine göre NASH sirozu nedeniyle yapılan ortotopik karaciğer transplantasyonu oranı 1996'da %0.1 iken 2005 yılında %3.5'e yükselmiştir. Aynı dönemde kriptojenik siroz nedeniyle yapılan nakiller %9.6'dan %6.6'ya gerilemiştir (38). NASH'in siroza dönüşürken histolojik özelliklerinin değişmesinin mekanizması henüz bilinmemekle birlikte, portosistemik şant nedeniyle insülin etkisinin azalması, sirotik malnutrisyon ile ilişkili değişimler ya da mevcut karaciğer hücreleri yok olurken yerlerine fizyolojik olarak eşdeğer öncü hücrelerin gelmesi, açıklanması için düşünülebilecek nedenler arasındadır (6).

Karaciğerin en sık primer neoplazmı olan HCC, genellikle mevcut kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişmektedir (kronik viral hepatitler, alkolik karaciğer hastalığı gibi). Bugüne kadar NASH zemininde gelişen birçok HCC vakası bildirilmiştir. HCC genellikle büyük, çok sayıda, iyi diferansiye tümör şeklinde ortaya çıkar. Genellikle siroz zemininde gelişmekle birlikte ilginç olarak vakaların %33'ü siroz olmadan ortaya çıkmış gibi gözükmektedir. Obezite ve diyabet, NASH ve kriptojenik siroz gelişimi için risk faktörü olmanın yanında HCC ile de ilişkili bulunmaktadır. NASH ilişkili hepatokarsinogenezde artmış yağ asiti oksidasyonu neticesinde artan oksidatif stres temel etkindir. Bunun

sonucunda artan sitokin salınımı ile birlikte hücrel çöğalma tetiklenir ve apoptozis inhibe edilir. Tetikleyici etmen ile DNA'sı hasara uğrayan hücre serilerinin bu şartlar altında malign hücrelere dönüşüm sürecine girebildiği düşünölmektedir (39).

NAYKH'de uzun dönem survi oldukça tartışmalıdır ancak genel olarak prognozun histolojik hasar (NASH) bulunup bulunmadığı ve metabolik sendromun diğler komponentleri ile ilişkili olduğu söylenebilir. Toplum çalışmaları ve klinik araştırmalardan elde edilen sonuçlar NAYKH hastalarında neredeyse iki kat mortalite artışı olduğunu göstermektedir (40). Karaciğler ile ilişkili mortalitenin de NASH'te, NASH bulunmayan NAYKH olgularına kıyasla artmış olduğu gösterilmiştir. NASH'li hastalarda 10 yıllık periyotta portal hipertansiyon gelişme riskinin %5 civarında olduğu, ilerlemiş hastalık gelişmiş olanlarda HCC gelişme riskinin ise %5-7 civarında olduğu söylenebilir. Tanı anında NASH ilişkili siroz tespit edilen hastalarda ise portal hipertansiyon gelişme riskinin 1, 3 ve 10 yıllık periyotlar için sırasıyla %17, %23 ve %52 olduğu gösterilmiştir (41). Bir çalışmada ortalama 7.6 yıllık takip ile 420 NAYKH'li hastanın 7'sinin karaciğler ile ilişkili nedenlerle öldüğü, karaciğler ilişkili mortalitenin karşılaştırma popölasyonunda 13. sırada iken ve bu kişilerde ölüm nedenleri içerisinde 3. sırada olduğu gösterilmiştir (42). Bu hastalarda karaciğler ilişkili ölümler artmış olsa da birinci ve ikinci sırada ölüm nedeni olarak kardiyovasköler hastalıklar ve nonhepatik maligniteler yer almaktadır. Mevcut veriler NASH'te tanıdan kabaca 15 yıl sonra mortalite oranlarının kardiyovasköler hastalıklardan %15, karaciğler hastalığı ile ilişkili komplikasyonlardan ise %7 olduğunu göstermektedir. Kontrol popölasyon ile kıyaslandığında da siroz ile ilişkili komplikasyonlardan ölümlerin on kat, kalp hastalıklarından ölümlerin ise iki kat arttığı, tanı sırasındaki histolojinin en güçlü prognostik faktör olduğu ortaya çıkmaktadır (6).

## Nonalkolik Steatohepatit ve Metabolik Sendrom

Metabolik sendrom; kişinin kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabet ve kronik böbrek hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma ihtimalini yüksek oranda arttıran risk faktörleri birlikteliğidir. İlk olarak; dislipidemi, hipertansiyon ve hipergliseminin sıklıkla aynı kişide birlikte gözlenmelerine dayanarak kalp damar hastalıkları açısından risk oluşturan “Sendrom X” konsepti ortaya atılmış ve altında insülin direncinin yattığı iddia edilmiştir (43). Daha sonra bu sendromun, metabolik sendrom, olarak adlandırılması benimsenmiş ve çeşitli kuruluşlar tarafından tanımlayıcı kriterler oluşturulması için girişimlerde bulunulmuştur (44). Günümüzde temel komponentleri arasında olan abdominal obezite, aterojenik dislipidemi ile ilişkili olan yükselmiş trigliserit ve azalmış HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) kolesterol düzeyi, hipertansiyon ve yükselmiş kan glikoz düzeyinin tespitine dayanan beş kriterde konsensusa varılmıştır. Bu kriterlerin üç veya daha fazlasının kişide bulunması metabolik sendrom olarak değerlendirilmektedir (Tablo-2) (44, 45).

**Tablo-2:** Modifiye ATP III Kriterleri.

No	Kriter*	Açıklaması
1	Abdominal obezite	Bel çevresinin erkeklerde 102, kadınlarda 88 cm üzerinde olması
2	Yükselmiş trigliserit düzeyleri	150 mg/dl üzerinde olması veya trigliserit yüksekliği nedeniyle tedavi alıyor olmak
3	Azalmış HDL kolesterol düzeyi	Erkeklerde 40, kadınlarda 50 mg/dl'nin altında olması veya HDL kolesterol değerinin düşük olması nedeniyle tedavi alıyor olmak
4	Hipertansiyon	Sistolik kan basıncının 130 mmHg ya da diyastolik kan basıncının 85 mmHg veya üzerinde olması ya da antihipertansif tedavi alıyor olmak
5	Yükselmiş açlık kan glikozu	Kan glikoz düzeyinin 100 mg/dl veya üzerinde olması ya da antidiyabetik tedavi alıyor olmak

\*: 2001 yılında Amerikan Ulusal Kolesterol Eğitim Programı'nın (NCEP) Erişkin Tedavi Paneli III (ATP III)'te geniş kabul gören, 2005 yılında Amerikan Kalp Cemiyeti (AHA) ve Amerikan Ulusal Kalp Akciğer ve Kan Enstitüsü tarafından modifiye edilen kriterler (45).

**HDL:** Yüksek dansiteli lipoprotein.

Metabolik sendrom gelişimi ile ilişkili mekanizmalar kesin olarak bilinmemekle birlikte insülin direnci ve hiperinsülineminin, metabolik sendrom gelişiminde temel rol oynadığı düşünülmektedir (44, 45). Kronik enflamasyon da sıklıkla metabolik sendrom ile ilişkilidir ve temel medyatörler adipokinler ve serbest yağ asitleridir. Metabolik sendrom ile alakalı proenflamatuar sitokinler (C-reaktif protein, TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi) daha fazla insülin direnci gelişmesine, yağ dokusundan lipoliz artışına ve karaciğerde artmış VLDL üretimine neden olurlar (45).

Metabolik sendromda olduğu gibi NAYKH olan kişilerde de endotelial fonksiyon bozukluğu olduğu bilinmektedir (46) ve artmış serbest yağ asitlerinin endotel fonksiyonlarında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (47, 48). NASH nedeniyle siroz gelişimi sonrası karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların yaklaşık olarak %80'inde hastalığın yeni karaciğerde tekrar ortaya çıktığı gözlenmiştir (49). Bu da tamamında değilse bile NASH'lerin çoğunda hastalığın asıl nedeninin karaciğerin dışında yattığını göstermektedir (25). NAYKH ve metabolik sendromun sıklıkla birlikte gözlenmesi ve meydana gelmelerindeki bu ortak patogenetik mekanizmalar, bazı araştırmacılar tarafından NAYKH'nin metabolik sendromun karaciğer komponenti olarak değerlendirilmesine neden olmuştur. Lipotoksik etkiler temelinde seyretmesi nedeniyle NASH'in lipotoksik karaciğer hastalığı olarak adlandırılmasının daha doğru olacağı da ileri sürülmüştür (50).

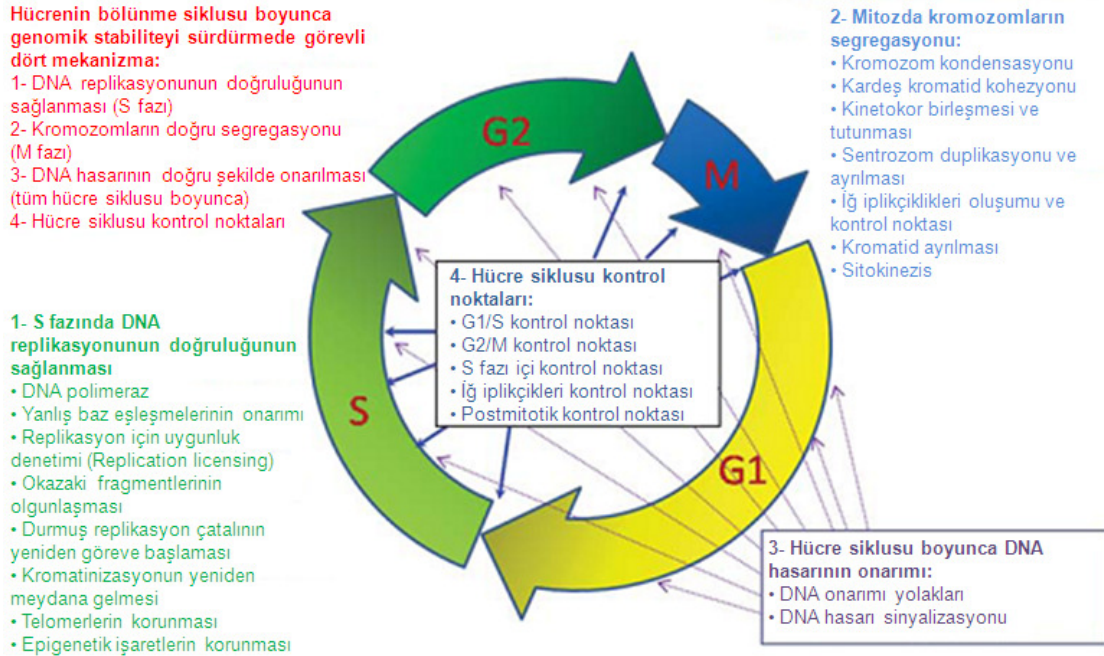
### **Genomik İstabilite**

Bir organizmadaki kalıtsal bilginin tümü anlamına gelen genom, o organizmanın yaşam süresince endojen (hücreyel) ya da ekzojen (çevresel) etkiler nedeniyle değişikliğe uğrayabilir. Bu durum, genom bütünlüğünde bozulmaya diğer bir deyişle "genomik instabiliteye" neden olur (51). Genomik instabilite olarak adlandırılan genetik değişiklikler, nokta mutasyonlardan kromozom yeniden düzenlemelerine kadar uzanan geniş bir spektrumda yer



alirlar ve genellikle patolojik bozukluklarla birlikte seyrederler (52). Bu mutasyon ve kromozom anomalilerini oluşturan başlica faktörler; DNA hasarı, anormal DNA replikasyonu ve düzensiz hücre bölünmesidir (51). Kromozom sayısındaki artma ya da azalmalara neden olan etkiler, anöjenik etki olarak adlandırılmaktadır ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların yavru hücrelere hatalı geçişiyle veya iğ iplikçikleri kontrol noktasındaki bozukluklarla ilişkilidirler. Tekrarlayıcı DNA ekspansiyonlarına yol açan mikro ve minisatellit instabilitesi ise replikasyon sırasında dizilerin kaymasından veya homolog rekombinasyon sırasındaki ya da mismatch repair (MMR) sırasındaki hatadan meydana gelir (52). Yine MMR hatalarının, baz eksizyon tamiri ve replikasyon hatalarının; nokta mutasyonlarına, mikroinsersiyon ve mikrodelesyonlara neden olduğu belirtilmiştir. İnversiyon, delesyon, duplikasyon, translokasyon gibi büyük yapısal kromozom anomalileri ise homolog rekombinasyondaki hatalara ya da kromozomda meydana gelen kırıklar sonucu non-homolog kromozomlar arasında parça değişimine bağlı olarak karşımıza çıkmaktadır (52).

Bölünme siklusu boyunca hücrenin genomik stabilitesini kontrol eden birçok mekanizma görev yapmaktadır (Şekil-3). Genomu tehdit eden durumlara mücadele edebilmek için hücresel yanıt sistemleri hücre siklusunun durmasına yol açarak, özelleşmiş protein gruplarının meydana gelen hasarı onarmasına zaman tanır. Onarılamayacak düzeyde hasar meydana gelmişse apoptozis indüklenir.



**Şekil-3:** Hücre siklusunu boyunca genomik stabilitenin sürdürülmesi (53).

Kromozomlarda hasar meydana getirerek genomik instabiliteye neden olan faktörlere klastojenik faktörler denir. Bu faktörler arasında radyasyon, oksidan maddeler, lipid peroksidasyon ürünleri, sitokinler gibi maddeler yer almaktadır. Klastojenik etkinin, oksidatif stresin eşlik ettiği patolojilerde de gözlemlendiği bilinmektedir (54, 55). Progresif sistemik sklerozis, Sjögren sendromu, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve Crohn hastalığı gibi kronik enflamasyonla seyreden hastalıklarda oksidatif stres aracılığıyla etki eden klastojenik plazma faktörlerinin bulunduğu gösterilmiştir (56).

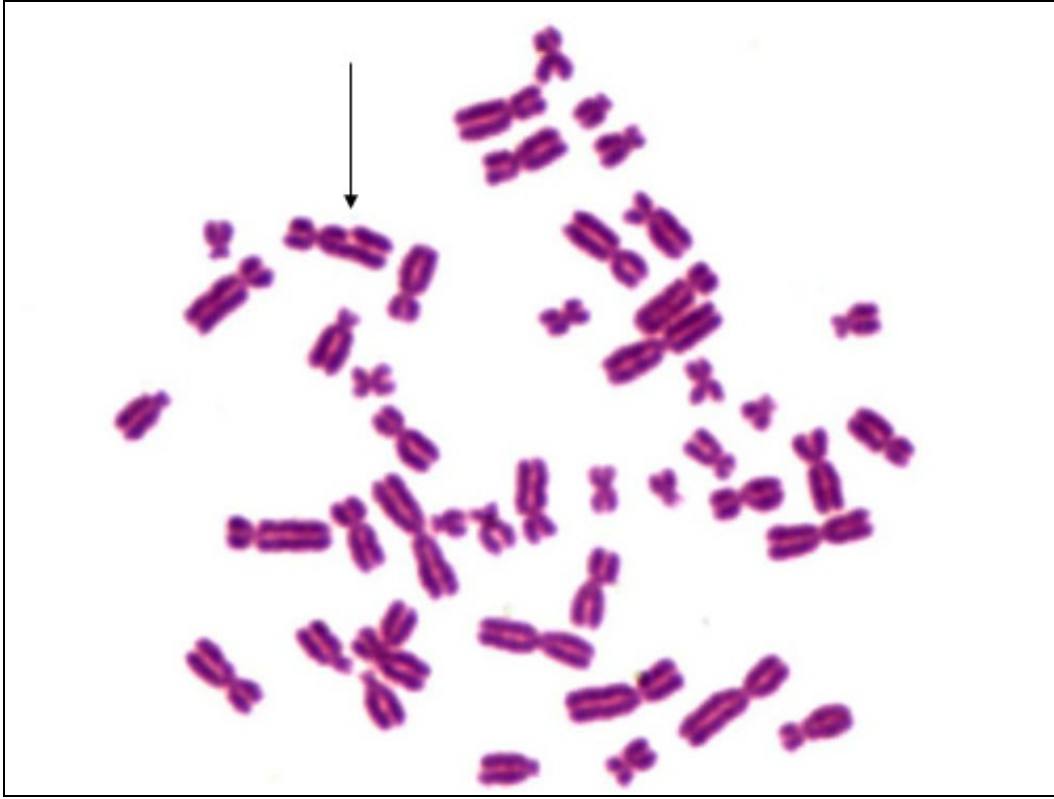
ROR, enflamasyon sürecinde üretildiği gibi, ROR'un kendisi de enflamasyon oluşumunu tetikleyebilmektedir. DNA ile etkileşime girerek promutajenik DNA kırıklarına, pürin ya da pirimidin bazının kaybına (abazik bölge oluşumu), DNA'ya kovalent bağ ile bağlı yapıların meydana gelmesine (DNA adducts) neden olabilmektedir. ROR'un lipidlerle reaksiyona girmesiyle meydana gelen 4-hidroksinonenal, malondialdehit, akrolein, arotanaldehit gibi reaktif aldehytlerin, doğrudan DNA bazları ile reaksiyona giren güçlü mutajenik prekürsörlerin oluşumuna yol açabildiği bilinmektedir (57).

Kronik hepatitler, ülseratif kolit, kronik cilt ülserleri gibi hastalıklarda artmış TNF- $\alpha$  düzeylerinin genomik instabilite artışı ve kanser gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (58). TNF- $\alpha$  ile muamele edilen kültür hücrelerinde artmış gen mutasyonları ve amplifikasyonları, artmış mikronükleus oluşumu ve kromozom aberasyonu artışı tespit edilerek, TNF- $\alpha$  tarafından meydana getirilen ROR'un iyonize edici radyasyonla karşılaştırılabilecek düzeyde DNA hasarına neden olabileceği gösterilmiştir. Bu değişimler, antioksidanlar ile anlamlı olarak azaltılabilmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın, in vivo fare dokularında da kromozom hasarına neden olduğu ve bu etkilerin de antioksidanlar ile geriletebileceği gösterilmiştir (58).

Bu veriler, oksidatif stresin ve kronik enflamasyonun insanlarda meydana gelen genom hasarlarının önemli bir nedeni olduğunu ve bu hasarların kronik hastalıkların gelişiminde ve bunlarla ilişkili karsinogenezde önemli bir etken olabileceğini göstermektedir (57).

### **Kromozom Kırıkları ve Kromozom Kırık Testleri**

Kromozom kırıkları, çoğunlukla sporadik olarak gözlenen, kromozomun boyanma sürekliliğinin kesildiği bölgelerdir. Bunlar çoğu kez klinik bir öneme sahip değilken, kromozom kırık sendromları adıyla anılan ve Mendelyen geçiş gösteren bir grup hastalıkta tanı koydurucu özellik gösterirler (59). Kromozomlarda kırık oluşumu, çeşitli ekzojen genotoksik ajanlar ya da endojen faktörlerle meydana gelebilmektedir. İyonize edici radyasyon gibi bazı ajanlar kromozomlarla temasın hemen sonrasında DNA çift zincir kırığına neden olmaktadır. Böyle bir hasar takip eden ilk metafazda ilgili bölgede kromozomun bütünlüğünü kaybetmesine yol açmaktadır (60) (Şekil-4 ve 5).



**Şekil-4:** Giemsa boyalı metafaz plağında kromatid bütünlüğünde ve hizalanmasında bozukluğa yol açan kromatid tipi kırık (ok ile gösterilmiştir).

Bir hücrede tek bir kromozom kırığının meydana gelmesi, basit kırık veya delesyon olarak adlandırılan yapısal değişimlere yol açarken; birden fazla kromozomun kırılarak parçaların yer değiştirmesiyle meydana gelen değişimler “exchange” olarak adlandırılmaktadır (60, 61). Bu şekilde kromozomlarda kırık oluşumundan kaynaklanan tüm yapısal değişimler kromozomal aberasyon olarak adlandırılmaktadır. Bir kromatid kalınlığını aşmayan ve kromatidin hizalanmasında bozukluğa yol açmayan boyanmamış bölgeler ise “gap” olarak adlandırılmakta ve ayrı olarak değerlendirilmektedir (60) (Şekil-6).

İki kırık oluşumuyla meydana gelen “exchange”ler hangi kromozom kolunun kırılması neticesinde meydana geldiklerine göre sınıflandırılırlar. Farklı iki kromozomun kırılıp birleşmesiyle meydana gelmişler ise “interchange” olarak, aynı kromozomda iki kırık oluşması sonucu meydana gelmişler ise “intrachange” olarak adlandırılırlar. Eğer değişim aynı kromozomun farklı kolları arasında

meydana gelmişse “kollar arası intrachange” (inter-arm intrachange), aynı kromozomun aynı kolu içerisinde meydana gelmişse “kol içi intrachange” (intra-arm intrachange) olarak adlandırılır (Şekil-7, 8, 9 ve 10) (61).

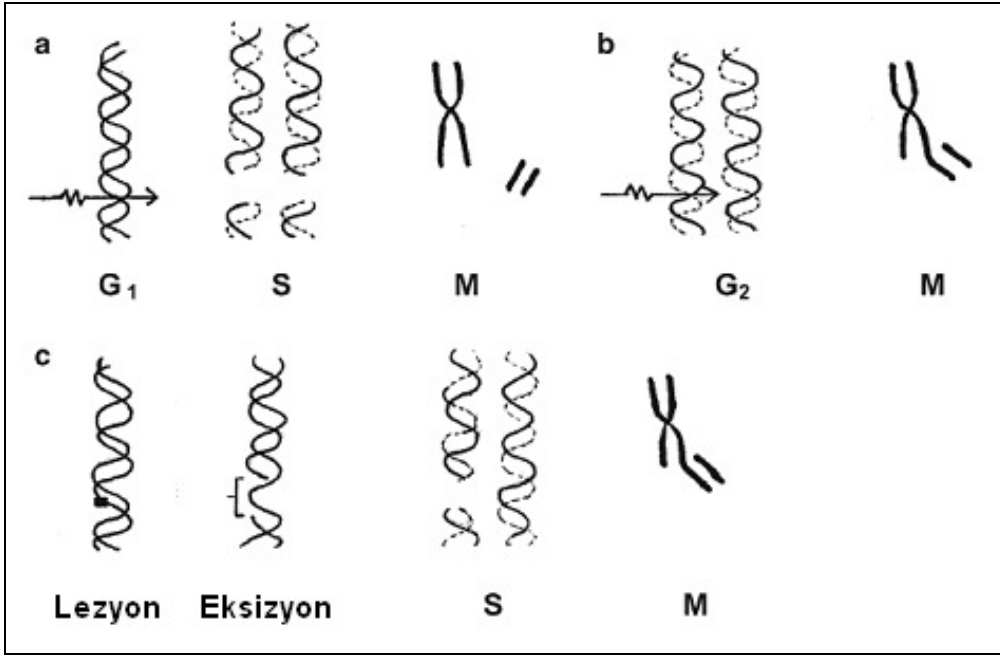
İki kırık neticesi meydana gelen dört açık uç, üç farklı şekilde birleşebilir:

1. Kendi devamı olan parça ile birleşerek hiçbir değişim oluşmadan normal kromozom yapısı korunabilir,
2. Parçalar simetrik olarak yer değiştirebilir (Şekil-8 ve 9),
3. Parçalar asimetric olarak yer değiştirerek “asentric fragman” oluşumuna neden olabilir (Şekil-8 ve 9). Bu asentric parça takip eden anafaz sırasında kutuplara çekilemediğinden kaybedilecektir. Meydana gelen iki sentromerli (disentric) (Şekil-8) ya da “ring” kromozomlar (Şekil-9) farklı kutuplara doğru çekilirken mekanik problemlere neden olabilir (61).

Metafazda gözlenen kromozomlar iki kardeş kromatidden meydana geldiği için gözlenen kromozomal aberasyonlar iki kategori altında değerlendirilir:

1. Kromozom tipi olarak adlandırılan, kırık ve yeniden birleşmelerin kromozomun herhangi bir bölgesindeki her iki kromatidi etkilediği değişimler,
2. Kromatid tipi olarak adlandırılan, kırık ve yeniden birleşmelerin kromozomun herhangi bir bölgesindeki sadece bir kromatidi etkilediği değişimler (61).

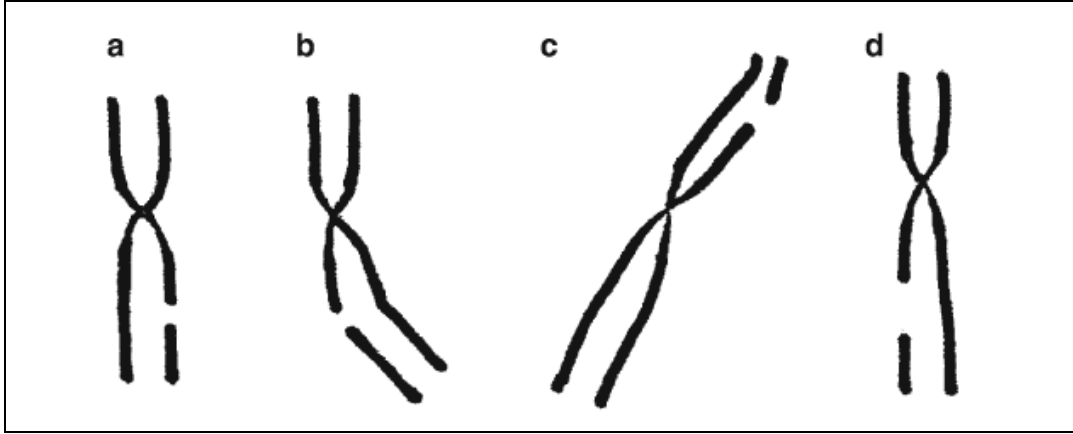
Eğer çift zincir kırığı DNA sentezinden önce meydana gelmişse DNA'nın kendini eşlemesi nedeniyle her iki kromatidi de ilgilendiren kromozom tipi aberasyona neden olurken (Şekil-5a), DNA sentezi sonrasında meydana gelmesi durumunda kromatid tipi aberasyona neden olacaktır (Şekil-5b) (60).



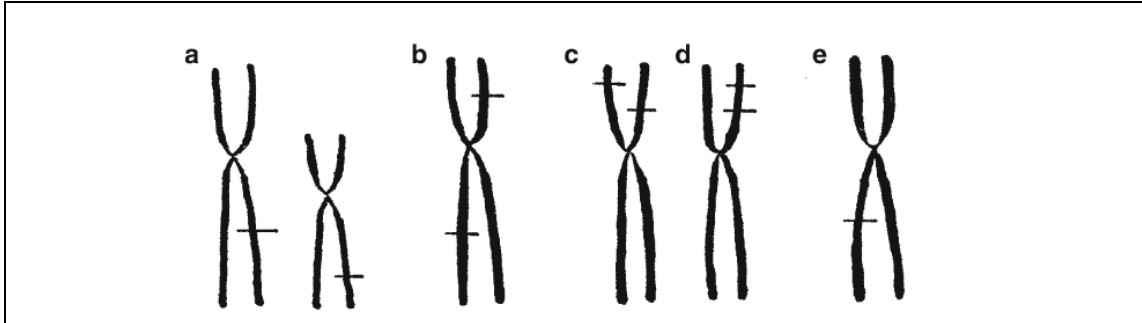
**Şekil-5:** Aberasyonların meydana gelmesi. İyonize edici radyasyon ve radyomimetik etkili kimyasal maddelerin etkisi (**a** ve **b**): **a:** Hücre siklusunun G<sub>1</sub> fazında muamele ile meydana gelen kromozom tipi "kırık", **b:** G<sub>2</sub> fazında muamele ile meydana gelen kromatid tipi "kırık". **c:** S fazına bağımlı kimyasal madde etkisi.

**G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M:** Sırasıyla hücre siklusunun gap1, sentez, gap2 ve metafaz evreleri (60).

Çift zincir DNA kırığından farklı olarak, kimyasal maddelerin önemli bir çoğunluğu tarafından kromozomal aberasyon oluşumuna aracılık eden başka bir mekanizma da DNA üzerinde bir lezyon meydana getirilmesidir. Onarım sırasında bu bölgenin çıkarılmasıyla lezyon tek zincir kırığına dönüştürülmektedir. Eğer DNA sentezi bu lezyonun onarımı tamamlanmadan önce meydana gelirse bu durum aberasyon oluşumuna neden olacaktır. Bu nedenle bu tür lezyonlarda kromozom aberasyonunun meydana gelmesi hücrenin S fazından geçmesini gerektirmektedir. Bu durumda lezyonun meydana gelmesinden sonraki ilk metafazda her zaman sadece kromatid tipi aberasyonlar ortaya çıkacaktır (Şekil-5c).

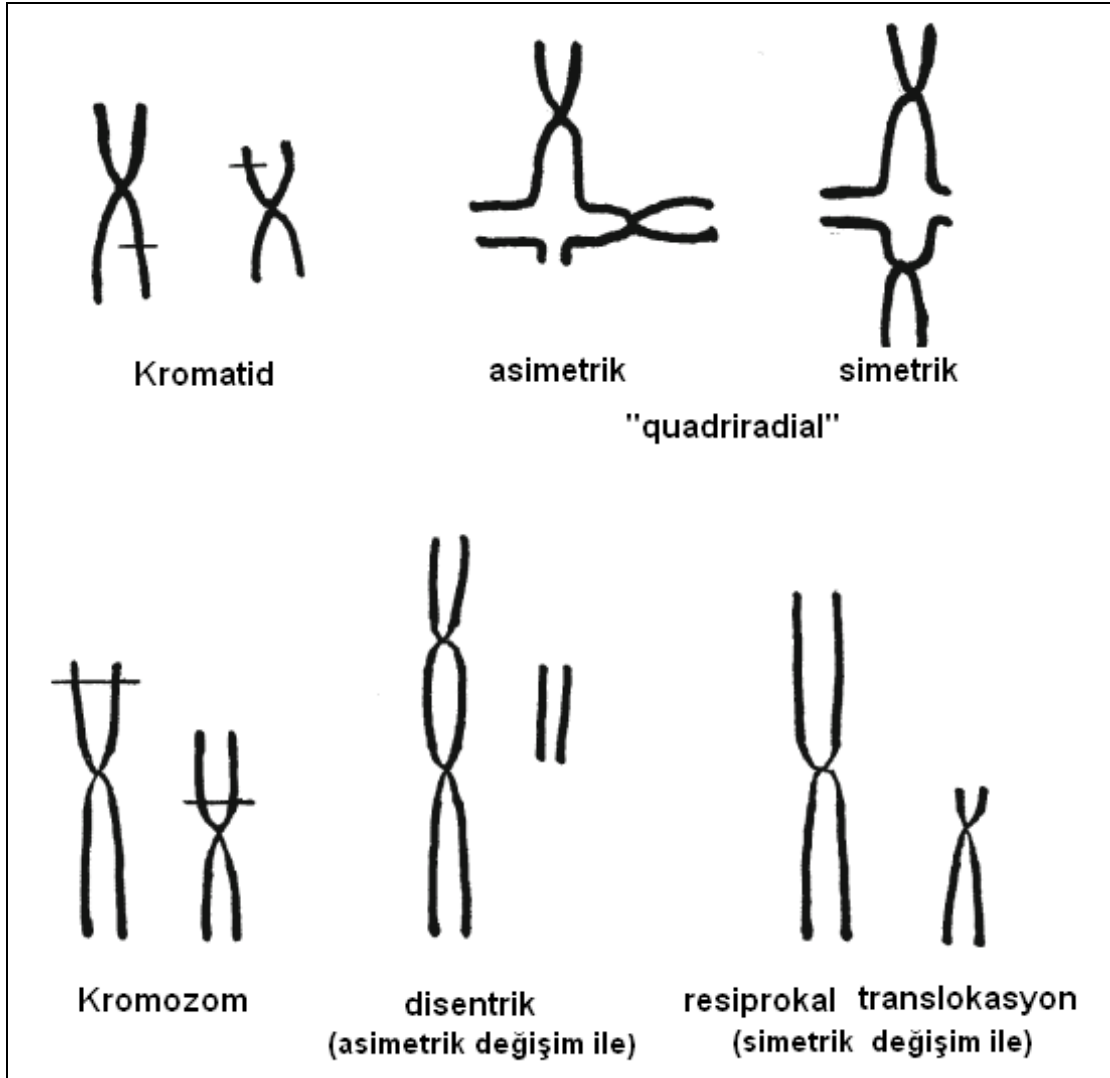


**Şekil-6:** Kromatid tipi "gap" ve "kırıkların" değerlendirilmesi. **a:** "Kromatid tipi gap", **b:** Dislokasyon gösteren fakat hizalanma bozukluğu gözlenmeyen kromatid tipi aberasyon ("gap" olarak değerlendirilir), **c:** Hizalanma bozukluğu da gösteren kromatid kalınlığını aşan kromatid bütünlük kaybı ("kırık" olarak değerlendirilir), **d:** Dislokasyon ya da hizalanma bozukluğu göstermeyen, kromatid kalınlığını belirgin olarak aşan kromatid bütünlük kaybı (inkomplet bir "kol içi intrachange" olabilir) (60).



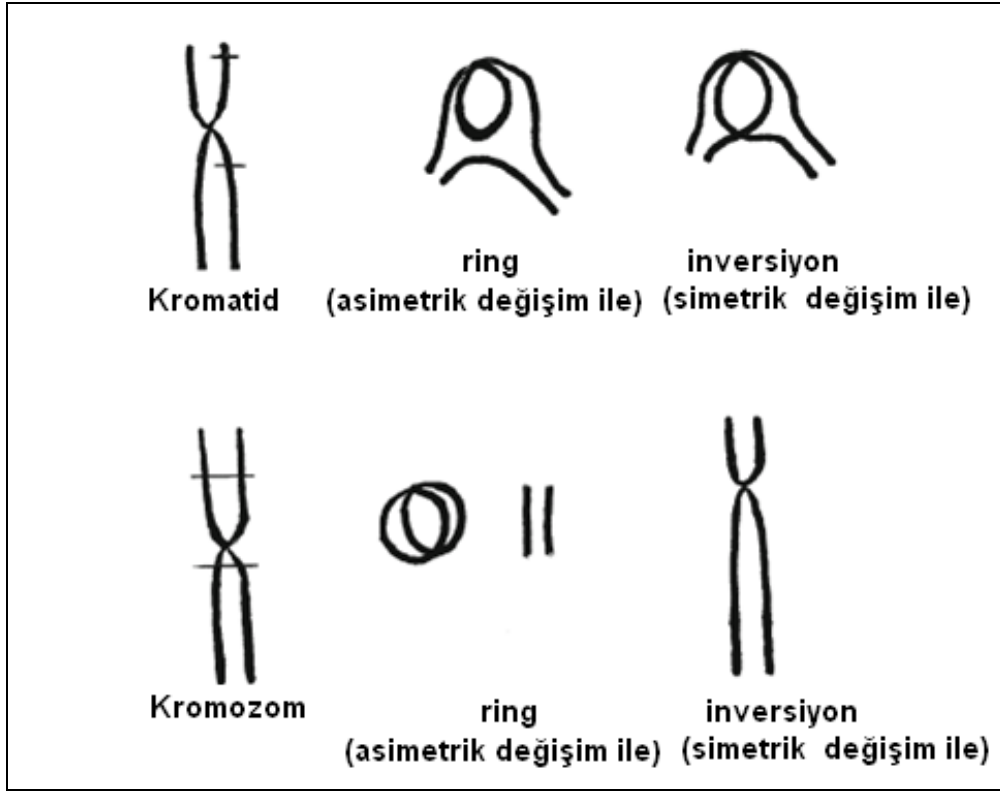
**Şekil-7:** Kırılma noktalarına göre kromatid tipi aberasyonların sınıflandırılması. **a:** "İnterchange", **b:** "Kollar arası intrachange", **c:** "Kromatidler arası - kol içi intrachange", **d:** "Kromatid içi - kol içi intrachange", **e:** "Tek kırık" (delesyon) (60).

Kardeş kromatidlerin anafaza kadar yan yana durmaya devam etmesi, özellikle kromatid tipi aberasyonların tespiti için kolaylık sağlayan önemli bir özelliktir (60).

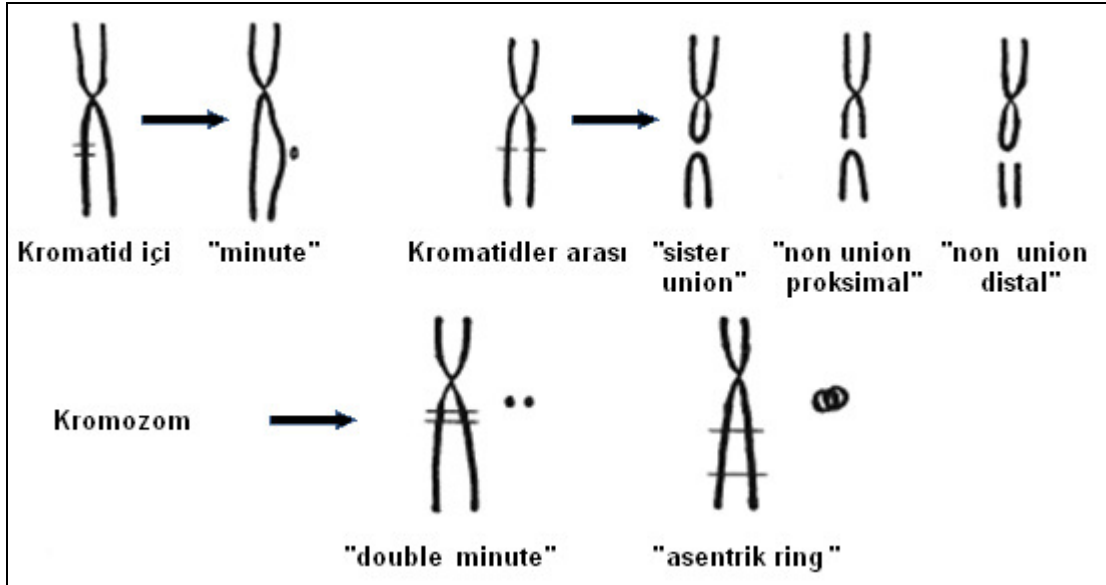


**Şekil-8:** İki kromozom arasında meydana gelen parça değişimleri (interchange).  
Üst sıra: "Kromatid tipi interchange".  
Alt sıra: "Kromozom tipi interchange" (60).



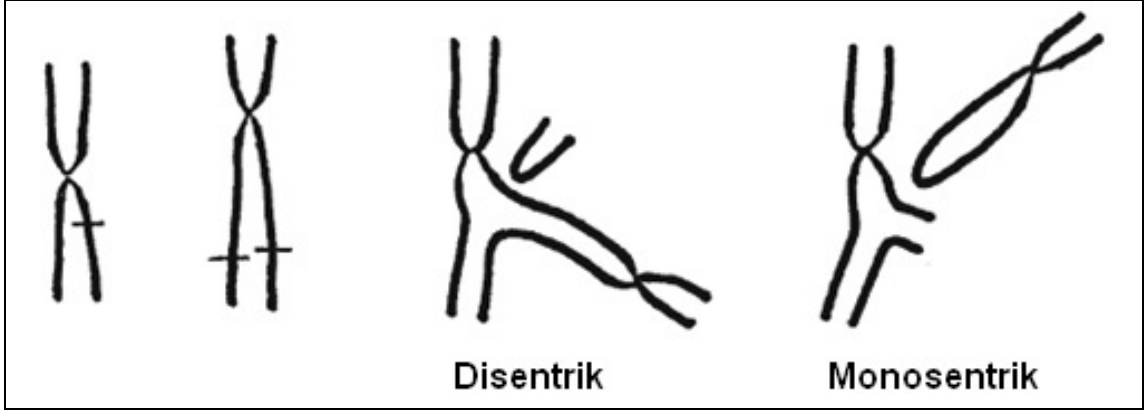


**Şekil-9:** Bir kromozomun iki kolunu ilgilendiren “kollar arası intrachange” oluşumu (60).



**Şekil-10:** Bir kromozomun aynı kolunu ilgilendiren “kol içi intrachange”lerin oluşumu (60).

Bir kromozomda iki kırık, başka bir kromozomda da bir kırık oluşumundan meydana gelen “exchange” figürleri ise “triradial exchange” olarak adlandırılır (Şekil-11).



**Şekil-11:** “Triradial exchange” şekilleri (60).

### **Kromozom Kırık Testleri**

Çeşitli hücrelerde meydana gelen kromozomal aberasyonların belirlenmesi, otuz yılı aşkın bir süredir birçok etkenin genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla test olarak kullanılmaktadır. Yapısal kromozomal aberasyonlar, en sık olarak bölünmesi metafazda durdurulmuş hücrelerin fikse edilip lam üzerine yayılarak giemsa ile boyanması ve mikroskopta incelenmesi yöntemi ile değerlendirilmektedir (Şekil-4). Kültüre edilmiş hücreler üzerinde yapılan testlerle in vitro olarak birçok ajanı test edebilmenin yanında in vivo olarak oluşan kromozomal hasarların araştırılması da mümkün olmaktadır. Potansiyel bir mutajene maruz kalan kişilerin lenfositlerinde kromozomal aberasyonların değerlendirilmesi en çok başvurulan yöntemlerdendir (62).

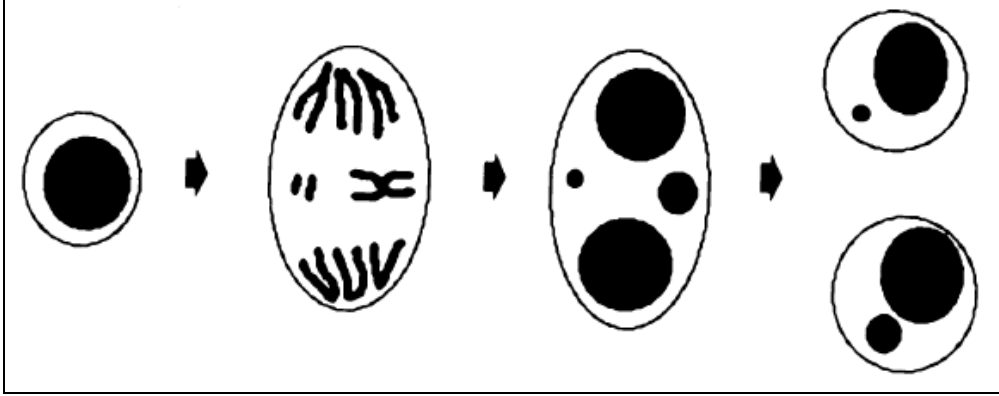
Kültüre edilmiş lenfositlerde kromozom tipi aberasyonların in vivo  $G_0 / G_1$  fazında meydana gelen çift zincir kırıklarının yansıtması beklenmektedir. Kromatid tipi aberasyonlar ise muhtemelen in vitro S ve  $G_2$  fazında ortaya çıkan çift zincir kırıklarından ya da S fazına bağımlı mekanizmalarla meydana gelen lezyonlardan kaynaklanmaktadır (63, 64).

Kromozomal değişimlerin, neoplastik hücrelerde gözlenen tipik bir bulgu olduğu bilinmektedir (65). Her ne kadar kanserlerde tespit edilen spesifik kromozomal değişimler karsinogenezis sırasında oluşmaktaysa da, sağlıklı kişilerin lenfositlerinde gözlenen kromozomal aberasyonların kansere yatkınlığın bir göstergesi olacağı hipotezi ile Kuzey Avrupa ülkelerinde, Orta Avrupa ülkelerinde ve İtalya'da kohort çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan bazılarının sonucunda kromozom tipi aberasyonların daha güçlü ilişki gösterdiğine dair bulgular elde edilmişse de hem kromozom tipi hem de kromatid tipi aberasyonların kanser gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (63, 66, 67).

Belirli bir hastalığı olan kişiler ile sağlıklı kişilerdeki kromozomal aberasyonlarının karşılaştırılması da çeşitli klinik durumların genomik instabilite oluşumuna etkisinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla, tip 1 diyabet (68), çölyak hast ve Crohn hastalığı (69), hepatit B (70) gibi hastalıklarda kromozom kırık testi ile kromozomal aberasyonlar değerlendirilmiştir. Kronik enflamasyonla seyreden hastalıklar olan çölyak hastalığı ve Crohn hastalığında kromozomal aberasyonların artmış olduğu gösterilmiştir (69). Özkal ve ark. tarafından yapılan çalışmada hem kronik hepatit B hastalarında, hem de hepatit B taşıyıcılarında kromozom kırıklarının artış gösterdiği tespit edilmiştir (70).

## Mikronükleuslar ve Mikronükleus Testleri

Mikronükleuslar (Şekil-12, 13), mitozun metafaz-anafaz geçişi sırasında kutuplara doğru çekilmede gecikmiş bir kromozom ya da kromozomdan ayrılmış asentrik bir kromozom parçasından oluşmaktadır (Şekil-12).



**Şekil-12:** Bölünmekte olan hücrede asentrik bir kromozom parçasından ve kutuplara çekilemeyen bütün bir kromozomdan mikronükleus oluşumu (71).

Kültüre edilmiş lenfositlerde gözlenen spontan mikronükleus değerleri dolaşımdaki lenfositlerin ömrü boyunca biriken genetik hasarları yansıtmaktadır. T lenfositlerinin yarılanma ömrünün 3 yıl, ortalama yaşam süresinin 4 yıl olduğu tahmin edilmektedir. Gözlenen genomik instabilite, olgun lenfositleri oluşturan kök hücrelerde birikmiş olan mutasyonları da yansıtabilir.

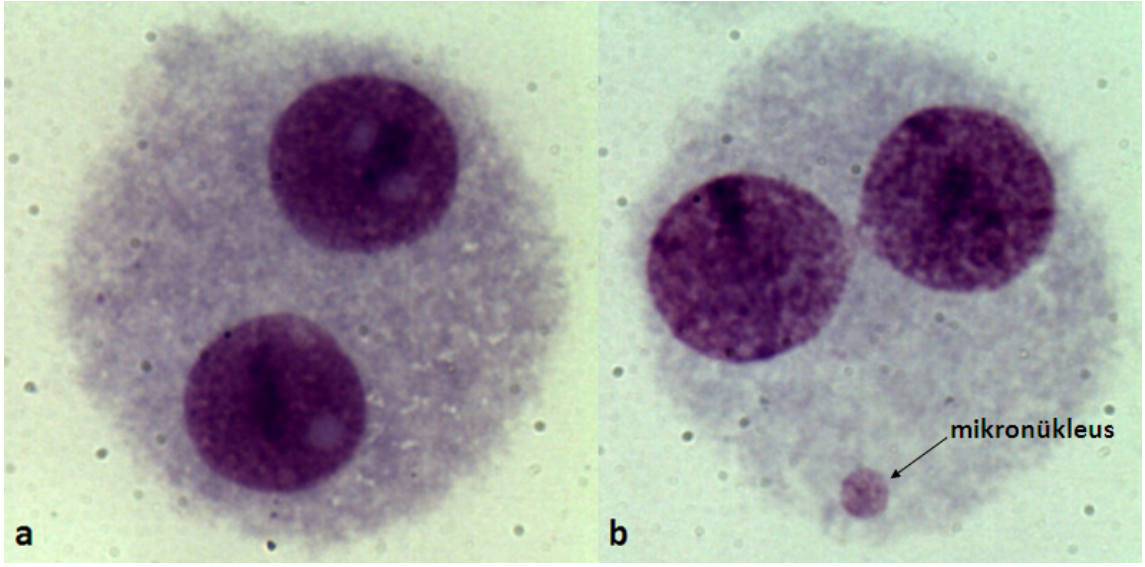
Spontan mikronükleus oluşumuna neden olabilecek mutasyon tipleri:

1. Kinetokor proteinlerinde, sentromerlerde ve iğ iplikçiklerinin düzenlenme mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar anafazda kromozomların eşit olmayan dağılımına ya da tüm bir kromozomun kaybına neden olabilir.
2. Çevresel mutajenler ya da endojen nedenlerle meydana gelen onarılmamış DNA kırıkları asentrik kromozom parçaları oluşumuna neden olabilirler.

Kinetokor antikorları kullanılarak yapılan araştırmalarda spontan olarak meydana gelen mikronükleusların yaklaşık olarak %50'sinin tüm bir kromozomun kaybından, geri kalanların da muhtemelen asentrik kromozom parçalarından meydana geldiğini göstermektedir (71). Bu nedenle mikronükleus değerleri hem anöjenik (kromozom kayıp veya kazanımlarından kaynaklanan) etkileri, hem de DNA hasarına yol açan (klastojenik) etkileri yansıtmaktadır (72).

### **Mikronükleus Testleri**

Kültüre edilmiş hücrelerde mikronükleus testinin ilk kullanımını Countryman ve Heddle tarafından insan lenfositleri ile yapılmıştır. Test daha sonra M. Fenech ve ark. tarafından geliştirilmiş ve günümüzde genotoksisite incelemelerinde, spontan veya çevresel etkenlerle indüklenen DNA hasarlarının gösterilemesinde en yaygın kullanılan testlerden biri haline gelmiştir (sitokinezis blok mikronükleus testi) (73). Bu test, aktin mikrofilamentlerinin oluşumunun bir inhibitörü olan sitokalazin-B'nin kültür ortamına ilave edilmesiyle yapılmaktadır. Aktinler, hücre şekli ve hareketi ile ilgili olduğundan sitokalazin-B eklenmesi sitoplazma bölünmesinin (sitokinezis) engellenmesine ve nükleusları bölünmüş ancak sitoplazması bölünmemiş iki nükleuslu hücreler oluşmasına yol açmaktadır (Şekil-13). Bu hücrelerin tekrar mitoz geçirmesiyle ise çok nükleuslu hücreler meydana gelir. Kültür sonunda elde edilen hücrelerin incelenmesiyle iki nükleuslu (binükleer) hücrelerin sitokalazin-B ilavesinden sonra bölünmelerini tamamlamış olduğu ve sadece bir kez mitoz geçirdiği söylenebilir. Değerlendirmede bu binükleer hücrelerde gözlenen mikronükleusların kullanılması kültür ortamında bölünme hızından kaynaklanan farklılıkları ortadan kaldırarak teste standardizasyon sağlamaktadır (71).



**Şekil-13:** Sitokinezis blok mikronükleus testinde binükleer (a) ve mikronükleus içeren binükleer (b) hücreler.

Çeşitli kanser tiplerinde periferik kan lenfositlerdeki mikronükleus sayılarının artış gösterdiği bulunmuş ve bu alandaki veriler meta-analiz çalışmasıyla değerlendirilerek tedavi edilmemiş kanser hastalarındaki mikronükleus değerlerinin anlamlı olarak yüksek olduğu ifade edilmiştir (74). Yapılan kohort çalışmalarından elde edilen veriler sağlıklı kişilerin lenfositlerindeki mikronükleus değerlerinin de kanser gelişme riski için bir ölçü olduğunu göstermiştir (72).

Periferik kan lenfositlerinde mikronükleus sayılarının belirlenmesi, çeşitli klinik durumların genom üzerindeki etkisinin araştırılması için de kullanılmış ve polikistik over sendromu, tip 2 diyabet ve koroner arter hastalıkları gibi durumlarda spontan mikronükleus değerlerinin arttığı gösterilmiştir (75-78).

## **Kronik Karaciğer Hastalıklarında DNA Hasarı ve Genomik İnstabilite**

Kronik karaciğer hastalıklarında karaciğerde devam eden kronik enflamatuvar sürecin, oksidatif DNA hasarına yol açarak genomik değişimlerin meydana gelme riskini arttırması beklenebilir. Yapılan bir araştırmada, kronik hepatitlerde oksijen radikalleri tarafından meydana getirilen promutajenik bir DNA lezyonu olan 8-hidroksideoksiguanozinin (8-OHdG) karaciğerde arttığı gösterilmiştir (79). Ayrıca kronik karaciğer hastalıklarında hepatik doku ve dolaşımdaki lökositlerin DNA oksidasyon düzeyleri (8-OHdG ölçümü) arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (80). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada hepatit B virüsünün periferik kan lenfositlerinde genotoksik etkilere neden olduğu kromozom aberasyonu yöntemiyle gösterilmiş olmasına rağmen mikronükleus yöntemiyle gösterilememiş, kronik hepatit B hastaları ve taşıyıcıları arasında ise fark bulunmamıştır (70). Alkalın comet testi ile yapılan çalışmalarda hepatit B ve hepatit C'ye bağlı siroz olgularında lenfositlerde DNA hasarının arttığı gösterilmiştir (81, 82). Emerit ve ark. tarafından ise Hepatit C hastalarında klastojenik plazma faktörlerinin varlığı gösterilmiştir ve nekroenflamatuvar aktiviteyle korele olduğu tespit edilmiştir (55). Cai ve ark. tarafından kronik aktif hepatit B, karaciğer sirozu ve HCC'de periferik kan lenfositlerindeki mikronükleus frekanslarının arttığı gösterilmiştir (83).

Oksidatif stresin NASH patogenezinde de rol aldığı bilinmektedir (84, 85). Seki ve ark. tarafından yapılan çalışmada, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan 4-hidroksinonenal ve oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-OHdG'nin hepatik ekspresyonlarının nekroenflamasyonun şiddeti ve fibrozis ile korele olduğu gösterilmiştir (31). Nakajima ve ark. tarafından 44 NAYKH hastası üzerinde yapılan çalışmada kantitatif fluoresan in situ hibridizasyon ile hepatositlerin telomer uzunluğu değerlendirilmiştir. Telomer kısalması gözlenen hastalarda VKİ, HOMA-IR, steatozisin histolojik derecesi ve 8-OHdG immün boyanma yoğunluğunun anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, daha yüksek insülin direncinin daha şiddetli hepatik steatozise neden

olarak, daha fazla ROR oluşumu ve hızlanmış telomer kaybıyla sonuçlanabileceğini göstermiştir (86).

Genom instabilitesine yol açtıkları bilinen oksidatif stres ve kronik enflamasyonun NASH patogenezi ile ilişkili olması, NASH hastalarında da genom instabilitesi meydana gelebileceğini düşündürmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar ışığında, kronik hepatitlerde ve bunlarla ilişkili sirozlarda genomik instabilite artışı ile ilgili bulgular mevcutsa da, NASH hastalarında bu açıdan fazla veri bulunmamaktadır. Bu nedenle planladığımız çalışma ile NASH tanısı almış hastalarda mikronükleus ve kromozom kırık testleri ile genom instabilitesini değerlendirmeyi ve sağlıklı kişilerle farklılık gösterip göstermediğini belirlemeyi amaçladık. Bunun yanı sıra hasta verilerinin (histopatolojik değerlendirme skorları, transaminaz düzeyleri, VKİ, bel ve kalça çevresi) ve obezite, insülin direnci, diyabet ve metabolik sendrom varlığı gibi NASH ile ilişkili faktörlerin genomik instabilite düzeyleri ile ilişkisini değerlendirmeyi planladık.



## GEREÇ VE YÖNTEM

### Etik Kurul İzni

Araştırma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulunun 28 Mayıs 2009 tarih, 2009-10/13 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

### Gönüllülerin Seçimi

Araştırmanın çalışma grubuna, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji polikliniğinde Ağustos 2009 - Haziran 2011 tarihleri arasında takip edilen, alkol kullanımı 20g/günü aşmayan, akut veya kronik viral hepatit tanısı dışlanmış, hepatosteatoz nedeniyle karaciğer biyopsisi yapılan, karaciğer sirozu veya malignitesi olmayan, testin yapıldığı dönemde herhangi bir genotoksik ilaç kullanmayan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 37 hasta dahil edildi.

Araştırmanın sağlıklı kontrol grubuna ise, ortalama alkol kullanımı 20g/gün sınırını aşmayan, ultrason incelemesinde karaciğerde yağlanma gözlenmeyen, karaciğer fonksiyon testleri normal olan, herhangi bir genotoksik ilaç kullanmayan, organik bir hastalık tespit edilmemiş 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hasta ve sağlıklı tüm katılımcıların aydınlatılmış gönüllü onam formu ile yazılı onamları alındı.

Hem hasta, hem de sağlıklı kontrol grubundaki tüm gönüllülerin; boy, ağırlık, bel çevresi ve kalça çevresi ölçümleri yapıldı; heparinle yıkanmış enjektör içerisine 2-3 ml periferik venöz kanları alınarak tam kan lenfosit kültürleri hazırlandı. Bu kültürlerde, herhangi bir ajanla indükleme yapılmaksızın meydana gelen kromozom aberasyonları ve mikronükleuslar değerlendirildi.

## **Kromozom Kırık Analizi Yöntemi**

- 0.5 ml heparinize kan; RPMI 1640 (L-glutaminli, Biological Industries, 01-106-1B), %16.7 fetal bovine serum (PAA, A11-151), %1 fitohemaglütinin M (Biological Industries, 12-006-1H) ve %1 penisilin - streptomisin (CAT: 450-201-TL) içeren kültür tüpü içerisindeki 4.5 ml besiyerine ekilerek 37<sup>0</sup>C'deki etüvde inkübe edildi.
- Kültürün 71. saatinde ortama 1 µg colcemid (Biological Industries, 12-004-1D) eklenip 1 saat daha etüvde inkübe edildi.
- Dakikada 2000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet vorteks üzerinde homojenize edildi.
- 37<sup>0</sup>C sıcaklıktaki 0.075 M KCl solusyonundan 5 ml ilave edilip 37<sup>0</sup>C'deki etüvde 20 dakika boyunca inkübe edildi.
- Dakikada 2000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve pellet vorteks üzerinde homojenize edildi.
- 4<sup>0</sup>C'deki taze hazırlanmış, 3:1 oranındaki metanol-asetik asit karışımından 5 ml, vorteks üzerinde yavaş yavaş damlatılarak ilave edildi; dakikada 2000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi; süpernatant atıldı ve pellet vorteks üzerinde homojenize edildi.
- Yukarıdaki işlem beyaz renkli pellet elde edilene kadar 3-4 kez tekrarlandı.
- Elde edilen beyaz renkli pellet pipetle homojenize edildi ve lamlara yayıldı.
- Lamlar kurduktan sonra %5'lik Giemsa ile 10 dakika boyandı.
- Preparatlar ışık mikroskopunda X1000 büyütmede incelendi.

### **Kromozomal Aberasyonların Değerlendirilmesi:**

- 46 ± 2 sentromer içeren metafaz plakları skorlamaya dahil edildi.
- Her vaka için 100 metafaz plağı değerlendirilerek gözlenen aberasyonlar kaydedildi.

- Kromatid kalınlığını aşmayan ve hizalanmada bozukluğa yol açmayan boyanmamış bölgeler “gap” olarak sınıflandırıldı ve diğer aberasyonlardan ayrı olarak değerlendirildi.
- Her vaka için aberasyon gözlenen hücre sayısı ve bazı hücrelerde birden fazla aberasyon bulunabildiği için gözlenen toplam aberasyon sayısı hesaplandı.
- Kromozom tipi ve kromatid tipi aberasyonlar ayrı olarak kaydedildi.
- Her vaka için kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı ve kromozom tipi aberasyon sayıları, kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı ve kromatid tipi aberasyon sayıları değerlendirmeye alındı.
- Toplam aberasyon parametreleri hem “gap”ler dahil edilerek hem de dahil edilmeyerek ayrı olarak değerlendirildi.

### **Mikronükleus Analizi Yöntemi**

- 0.5 ml heparinize kan; RPMI 1640 (L-glutaminli, Biological Industries, 01-106-1B), %16.7 fetal bovine serum (PAA, A11-151), %1 fitohemaglutinin M (Biological Industries, 12-006-1H) ve %1 penisilin – streptomisin (CAT: 450-201-TL) içeren kültür tüpü içerisindeki 4 ml besiyerine ekildi ve 37<sup>0</sup>C'deki etüvde inkübe edildi.
- 44. saatte ortama 30µg sitokalsin-B (Serva, 18015.01, CASRN: 14930-96-2) eklendi (6 µg/ml son konsantrasyon) [Sitokalazin-B, steril DMSO solüsyonu içerisinde çözülerek 1.2 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyon hazırlandı ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri içerisinde 25 µl'lik kısımlar halinde bölündü (30µg) ve -20<sup>0</sup>C'de saklandı. Kullanılacağı zaman eritilip üzerine 475 µl besiyeri eklenerek elde edilen karışım besiyerine ilave edildi (toplam 5ml solüsyon içinde 30 µg sitokalsin-B)].
- 72 saatlik kültürün sonunda 2000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant atıldı ve pellet vorteks üzerinde homojenize edildi.
- 37°C sıcaklıktaki 0.075 M KCl solusyonundan 5 ml ilave edilerek 37°C'deki etüvde 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- Dakikada 2000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve pellet vorteks üzerinde homojenize edildi.
- 4°C'deki taze hazırlanmış, 7:1 oranındaki metanol-asetik asit karışımından 5 ml, vorteks üzerinde yavaş yavaş damlatılarak ilave edildi; dakikada 2000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi; süpernatant atılıp pellet vorteks üzerinde homojenize edildi.
- Yukarıdaki işlem 3 kez tekrarlandı.
- Elde edilen pellet, pipetle homojenize edilip lamlara yayıldı.
- Lamlar kurduktan sonra %5'lik Giemsa ile 10 dakika boyandı.
- Işık mikroskopunda incelendi.

#### **Mikronükleus Skorlaması**

Aşağıdaki özelliklere sahip binükleer hücreler değerlendirmeye alındı:

- Sitoplazması korunmuş olan ve yaklaşık olarak aynı büyüklükte ve aynı kondensasyon aşamasında iki yuvarlak veya oval nükleusa sahip hücreler,
- Nükleusları üst üste binmiş veya birbirine dokunuyor ise sınırları net olarak seçilebilen hücreler.

Aşağıdaki özelliklere sahip mikronükleuslar değerlendirmeye alındı:

- Çapı ana nükleusun çapının 1/3'ü ile 1/16'sı arasında olan mikronükleuslar,
- Ana nükleustan ayrı olan veya üst üste biniyor ise ana nükleus ile aralarındaki sınır net olarak seçilebilen mikronükleuslar,
- Ana nükleus ile benzer boyanma özelliklerine sahip olan mikronükleuslar.

Her vaka için 1000 binükleer hücre değerlendirilerek mikronükleus içeren hücre sayısı ve bunların içerisindeki toplam mikronükleus sayısı tespit edildi.

## Gönüllülere Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm gönüllülerin VKİ [ $VKİ = \text{ağırlık (kg)} / \text{boy (m)}^2$ ], bel çevresi / kalça çevresi oranı hesaplandı; AST, ALT değerleri ve sigara içme alışkanlıkları kaydedildi.

Hasta grubunda diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi varlığı ve metabolik sendrom varlığı değerlendirildi. Metabolik sendrom varlığı açısından değerlendirme modifiye ATP III kriterlerine göre yapılarak (Tablo-2), kişide üç ve daha fazla pozitif kriterin bulunması metabolik sendrom olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizlerde metabolik sendrom açısından pozitif kriter sayısı da değerlendirmeye alındı.

Karaciğerin histolojik incelenmesindeki steatozis, enflamasyon, balonlaşma dejenerasyonu skorları, Nonalkolik Steatohepatit Aktivite Skoru (NAS) ve fibrozis skoru değerlendirmeye alındı (Tablo-3 ve 4).

Hastaların tanısal değerlendirmeleri sırasındaki laboratuvar verilerinden açlık kan şekeri, glikozile hemoglobin (HbA1c), total kolesterol, LDL (düşük dansiteli lipoprotein) kolesterol, HDL kolesterol, trigliserit, AST ve ALT değerleri, AST/ALT oranı, test yapılan hastalar için oral glikoz tolerans testi (OGTT) sıfırıncı ve ikinci saat glikoz değerleri ve bunlar arasındaki yüzdelik değişim değerlendirmeye alındı. İnsülin direncini belirlemek için beşer dakikalık aralıklarla ölçülen üç insülin ve glikoz değerinin ortalaması kullanılarak aşağıdaki formüle göre homeostazis değerlendirme modeli insülin direnci (HOMA-IR) değerleri hesaplandı:

$$\text{HOMA-IR} = \text{İnsülin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glikoz (mg/dl)} / 405$$

**Tablo-3:** Nonalkolik steatohepatit aktivite skorlaması (87).

<b>NAS Komponentleri</b>	<b>Gözlenen bulguların özelliği</b>	<b>Skor</b>
Steatozis	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Lobüler enflamasyon	Odak yok	0
	<2 odak/200x	1
	2-4 odak/200x	2
	>4 odak/200x	3
Hepatosit balonlaşması	Yok	0
	Az sayıda hücrede	1
	Çok sayıda hücrede/belirgin balonlaşma	2

**NAS:** Nonalkolik Steatohepatit Aktivite Skoru

(NAS = Steatozis skoru + Enflamasyon skoru + Balonlaşma skoru).

**Tablo-4:** Nonalkolik steatohepatit fibrozis skorlaması (87).

<b>Fibrozisin şiddeti ve/veya özelliği</b>	<b>Skor</b>
Yok	0
Perisinuzoidal veya periportal	1
Hafif , zone 3, perisinuzoidal, hafif ve dağınık fibrozis	1A
Orta düzeyde, zone 3, perisinuzoidal, daha yoğun fibrozis	1B
Portal/periportal, perisellüler/perisinüzoidal fibrozis bulunmadan	1C
Perisinüzoidal ve portal/periportal	2
Köprüleşme fibrozisi	3
Siroz	4

## **İstatistiksel Hesaplamalar**

Betimleyici değerler, sürekli değişkenler için ortalama  $\pm$  st. sapma veya medyan (minimum - maksimum) değerleriyle, kesikli değer alan değişkenler için ise medyan (minimum - maksimum) değerleriyle ifade edildi. Kategorik değişkenler ise sayı ve ilgili yüzde değerleriyle birlikte verildi. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelendi ve gruplar arası karşılaştırmalarında bağımsız çift örneklem için t testi ya da Mann Whitney U testi kullanıldı. Kesikli değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları yine Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında ki-kare testi kullanıldı. Genomik instabilite parametrelerinin diğer değişkenlerle ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla korelasyon analizi yapılarak Spearman korelasyon katsayıları hesaplandı. Çalışmada  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler SPSS 13.0 (Chicago, IL.) programında yapıldı.

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 37 hastanın 32'si NASH tanısını alırken; beş hastada bulgular, NASH düzeyinde olmayan nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısı ile uyumluydu ve bunlar NASH grubundan ayrı olarak değerlendirmeye alındı. Bu nedenle çalışmamızın hasta grubu, 32 NASH hastasından oluştu.

### **Hasta ve Kontrol Grubunun Birbiriyle Karşılaştırılması**

#### **Genel Verilerinin Karşılaştırılması**

NASH grubunun yaş ortalaması  $44.59 \pm 9.65$ , kontrol grubunun yaş ortalaması  $45.20 \pm 11.92$  idi ve iki grup arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0.841$ ). NASH grubunun %40.6'sı kadın ( $n=13$ ), %59.4'ü erkekti ( $n=19$ ). Kontrol grubunun ise %45'i kadın ( $n=9$ ), %55'i erkekti ( $n=11$ ). Cinsiyet dağılımları açısından da iki grup arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0.982$ ). Hasta grubun %28.1'i ( $n=9$ ), kontrol grubunun ise %45'i ( $n=9$ ) sigara kullanmaktaydı ve sigara içme alışkanlığı açısından da gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.345$ ).

VKİ değerlendirildiğinde, NASH grubunda  $31.47 \text{ kg/m}^2$  ( $23.01 - 48.80 \text{ kg/m}^2$ ); kontrol grubunda  $26.20 \text{ kg/m}^2$  ( $16.80 - 32.11 \text{ kg/m}^2$ ) olduğu ve gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu tespit edildi ( $p<0.001$ ). Bel çevresi, hasta grubunda  $108.47 \pm 9.06 \text{ cm}$  iken; kontrol grubunda  $90.65 \pm 12.07 \text{ cm}$ 'ydi ve gruplar arasında anlamlı fark vardı ( $p<0.001$ ). Kalça çevresi değerleri hasta grubunda  $109 \text{ cm}$  ( $97 - 149 \text{ cm}$ ), kontrol grubunda  $103 \text{ cm}$  ( $86 - 122 \text{ cm}$ ) olarak belirlendi ve hasta grubunda kalça çevresinin yüksek olduğu gözlemlendi ( $p=0.001$ ).

#### **Genomik İnstabilite Parametrelerinin Karşılaştırılması**

Hasta ve kontrol grubunun, yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen mikronükleus ve kromozomal aberasyon parametrelerinin medyan (minimum-maksimum) değerleri ve hasta ile kontrol grubunun bu parametreler açısından



karşılaştırılmasının anlamlılık değerleri Tablo-5'te gösterilmiştir. Karşılaştırma sonucunda NASH ve sağlıklı kontrol grubu arasında hiçbir genomik instabilite parametresi açısından anlamlı fark tespit edilmedi ( $p>0.05$ ).

**Tablo-5:** Genomik instabilite parametrelerinin hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırılması.

		NASH Grubu Değerleri (n=32)	Kontrol Grubu Değerleri (n=20)	p
Mikronükleus Parametreleri	Mikronükleuslu hücre sayısı	11(3-26)	8(1-18)	0,067
	Mikronükleus sayısı	12(3-29)	10(1-19)	0,101
Kromozomal Aberasyon Parametreleri	Aberasyon gözlenen hücre sayısı*	1(0-5)	1(0-2)	0,969
	Aberasyon sayısı*	1(0-10)	1(0-5)	0,946
	Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	0(0-3)	1(0-2)	0,123
	Kromozom tipi aberasyon sayısı*	0(0-10)	1(0-5)	0,150
	Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	0,5(0-5)	0(0-2)	0,195
	Kromatid tipi aberasyon sayısı*	0,5(0-5)	0(0-2)	0,191
	"Gap" gözlenen hücre sayısı	1(0-9)	1(0-3)	0,922
	"Gap" sayısı	1(0-9)	1(0-3)	0,712
	Kromozom tipi "gap" gözlenen hücre sayısı	0(0-2)	0(0-2)	0,940
	Kromozom tipi "gap" sayısı	0(0-2)	0(0-2)	0,940
	Kromatid tipi "gap" gözlenen hücre sayısı	1(0-7)	1(0-3)	0,768
	Kromatid tipi "gap" sayısı	1(0-7)	1(0-3)	0,651
	"Gap"ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı	2,5(0-12)	2(1-5)	0,908
	"Gap"ler dahil aberasyon sayısı	3(0-12)	2(1-8)	0,667
	"Gap"ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre	0(0-4)	1(0-3)	0,067
	"Gap"ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı	0(0-11)	1(0-6)	0,105
	"Gap"ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre	1(0-8)	1(0-5)	0,304
"Gap"ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı	1(0-8)	1(0-5)	0,225	

NASH: Nonalkolik steatohepatit.

\*: "Gap"ler hariç yapılan değerlendirme.

## Hasta Grubu İçerisinde Yapılan Değerlendirmeler

### Grup Karşılaştırmaları

Cinsiyet grupları karşılaştırıldığında, kadınlarda mikronükleus parametreleri anlamlı olarak yüksek gözlendi (Tablo-6).

**Tablo-6:** Nonalkolik steatohepatit hastaları içerisinde kadın ve erkekler arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		Kadınların Değerleri (n=13)	Erkeklerin Değerleri (n=19)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	17(6-26)	10(3-25)	<b>0,037</b>
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	17(6-27)	11(3-29)	<b>0,030</b>
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	1(0-5)	1(0-3)	0,223
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	1(0-10)	1(0-6)	0,223
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-3)	0(0-2)	0,448
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-10)	0(0-5)	0,472
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	1(0-5)	0(0-2)	0,850
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	1(0-5)	0(0-3)	0,880
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-9)	1(0-5)	0,383
	<b>“Gap” sayısı</b>	1(0-9)	1(0-6)	0,270
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-2)	0(0-2)	0,570
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-2)	0(0-2)	0,570
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-7)	1(0-5)	0,305
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	1(0-7)	1(0-6)	0,305
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	3(1-12)	2(0-5)	0,170
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	3(1-12)	3(0-6)	0,158
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	0(0-4)	0(0-4)	0,323
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	0(0-11)	0(0-5)	0,343
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	2(0-8)	1(0-5)	0,223	
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	3(0-8)	1(0-6)	0,238	

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

Sigara içen ve içmeyen NASH hastaları arasında yapılan karşılaştırmada toplam aberasyon sayılarının sigara içenlerde anlamlı olarak fazla olduğu gözlemlendi (Tablo-7). Hastalar, obezitesi olanlar ( $VKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) ve olmayanlar ( $VKİ < 30 \text{ kg/m}^2$ ) olarak ayrılarak yapılan değerlendirmede “gap”ler dahil toplam aberasyon parametreleri obezitesi olanlarda olmayanlara göre anlamlı olarak fazla gözlemlendi (Tablo-8). Diyabeti, metabolik sendromu, hipertansiyonu, hiperlipidemisi, şiddetli fibrozisi olanlar ve olmayanlar arasında yapılan karşılaştırmalarda hiçbir genomik instabilite parametresi açısından anlamlı fark bulunmadı.

**Tablo-7:** Nonalkolik steatohepatit hastaları içerisinde sigara içen ve içmeyenler arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		Sigara içmeyenlerin Değerleri (n=23)	Sigara içenlerin Değerleri (n=9)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	11(5-26)	8(3-25)	0,321
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	12(5-27)	10(3-29)	0,386
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	1(0-5)	2((0-3)	0,058
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	1(0-5)	3(0-10)	<b>0,047</b>
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-3)	0,094
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-10)	0,078
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-5)	1(0-2)	0,386
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-5)	1(0-2)	0,409
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-5)	1(0-9)	0,592
	<b>“Gap” sayısı</b>	1(0-6)	1(0-9)	0,773
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-1)	0(0-2)	0,263
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-1)	0(0-2)	0,263
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-5)	0(0-7)	0,363
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	1(0-6)	0(0-7)	0,386
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	2(0-6)	3(0-12)	0,742
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	3(0-8)	5(0-12)	0,229
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	0(0-2)	1(0-4)	0,122
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	0(0-2)	1(0-11)	0,086
	<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	2(0-6)	1(0-8)	0,711
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	2(0-6)	1(0-8)	0,742	

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

**Tablo-8:** Nonalkolik steatohepatit hastaları içerisinde obezitesi olan ve olmayanlar arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		Obez Olmayanların Değerleri (n=8)	Obez Olanların Değerleri (n=24)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	11,5(5-25)	11(3-27)	0,749
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	13,5(5-27)	12(3-29)	0,848
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0,5(0-2)	1(0-5)	0,124
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	0,5(0-2)	1,5(0-10)	0,094
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-3)	0,273
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-10)	0,254
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,454
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,454
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0,5(0-3)	1(0-9)	0,220
	<b>“Gap” sayısı</b>	0,5(0-4)	1,5(0-9)	0,188
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-0)	0(0-2)	0,404
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-0)	0(0-2)	0,404
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0,5(0-3)	1(0-7)	0,404
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	0,5(0-4)	1(0-7)	0,404
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-4)	3(0-12)	<b>0,037</b>
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	1(0-6)	3(0-12)	<b>0,029</b>
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	0(0-1)	0(0-4)	0,188
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	0(0-1)	0(0-11)	0,174
	<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-4)	2(0-8)	0,104
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-6)	2(0-8)	0,113	

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

### Korelasyonlar

Hasta verilerinin genomik instabilite parametreleri ile korelasyonları değerlendirildiğinde, yaş ile mikronükleus parametreleri arasında pozitif korelasyon (mikronükleuslu hücre sayısı için  $r=0.47$ ,  $p=0.007$ ; mikronükleus sayısı için  $r=0.45$ ,  $p=0.009$ ), “gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon parametreleri ile ise negatif korelasyon gözlemlendi (aberasyonlu hücre sayısı için  $r=-0,39$ ,  $p=0,028$ ; aberasyon sayısı için  $r=-0.39$ ,  $p=0.028$ ) (Tablo-9). Bel çevresiyle toplam aberasyon parametreleri, kromozom tipi “gap” parametreleri, “gap”ler dahil toplam aberasyon parametreleri ve “gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon parametreleri arasında pozitif korelasyon tespit edildi (toplam aberasyonlu hücre sayısı için  $r=0.47$ ,  $p=0.006$  ve aberasyon sayısı için  $r=0.49$ ,  $p=0.004$ ; kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı için  $r=0.38$ ,  $p=0.031$  ve

“gap” sayısı için  $r=0.38$ ,  $p=0.031$ ; “gap”ler dahil toplam aberasyonlu hücre sayısı için  $r=0.41$ ,  $p=0.019$  ve aberasyon sayısı için  $r=0.41$ ,  $p=0.020$ ; “gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre sayısı için  $r=0.44$ ,  $p=0.013$  ve aberasyon sayısı için  $r=0.44$ ,  $p=0.013$ ) (Tablo-9).

Metabolik sendrom skoru, kromatid tipi aberasyon parametreleri ile (hücre sayısı için  $r=0.36$ ,  $p=0.044$ ; aberasyon sayısı için  $r=0.36$ ,  $p=0.041$ ) ve toplam aberasyon parametreleri ile (hücre sayısı için  $r=0.40$ ,  $p=0.025$ ; aberasyon sayısı için  $r=0.35$ ,  $p=0.048$ ) pozitif korelasyon gösterdi (Tablo-9). Steatozis skoru mikronükleus parametreleri ile negatif korelasyon gösterirken (mikronükleuslu hücre sayısı için  $r=-0.38$ ,  $p=0.031$ ; mikronükleus sayısı için  $r=-0.37$ ,  $p=0.037$ ), kromozom tipi “gap” parametreleri ile ise pozitif korelasyon gösterdi (hücre sayısı için  $r=0.42$ ,  $p=0.016$ ; “gap” sayısı için  $r=0.42$ ,  $p=0.016$ ) (Tablo-9). NAS skoru, enflamasyon, balonlaşma dejenerasyonu ve fibrozis skorları incelenen parametrelerin hiçbirisi ile anlamlı korelasyon göstermedi ( $p>0.05$ ) (Tablo-9).

HbA1c değerleri ile kromatid tipi aberasyon parametreleri arasında pozitif korelasyon gözlemlendi (hücre sayısı için  $r=0.44$ ,  $p=0.019$ ; aberasyon sayısı için  $r=0.43$ ,  $p=0.022$ ) (Tablo-10). Açlık kan şekeri, OGTT, HOMA-IR, trigliserit, total kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol, AST, ALT değerleri ve AST/ALT oranı açısından yapılan değerlendirmelerde herhangi bir genomik instabilite parametresi ile anlamlı korelasyon gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo-10).

**Tablo-9:** Hasta grubunda yaş, antropometrik ölçümler, metabolik sendrom skoru ve histopatolojik skorlamaların genomik instabilite parametreleriyle korelasyonları.

		Yaş	VKİ	Bel ve Kalça Çevresi Ölçümleri			MS skoru	Histopatolojik Değerlendirme Skorları					
				Bel	Kalça	Bel/Kalça		Steatozis	Enflamasyon	Balonlaşma	NAS	Fibrozis	
Mikronükleus Parametreleri	Mikronükleuslu hücre sayısı	r	<b>0,47</b>										
		p	<b>0,007</b>	0,617	0,455	0,848	0,209	0,544	<b>-0,38</b>				
	Mikronükleus sayısı	r	<b>0,45</b>										
		p	<b>0,009</b>	0,554	0,417	0,793	0,206	0,510	<b>0,037</b>	0,805	0,700	0,190	0,905
Kromozomal Aberasyon Parametreleri	Aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r			<b>0,47</b>		<b>0,40</b>						
		p	0,151	0,080	<b>0,006</b>	0,090	0,506	<b>0,025</b>	0,746	0,482	0,443	0,856	0,677
	Aberasyon sayısı*	r			<b>0,49</b>		<b>0,35</b>						
		p	0,156	0,070	<b>0,004</b>	0,072	0,451	<b>0,048</b>	0,615	0,346	0,419	0,905	0,938
	Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r											
		p	0,070	0,134	0,060	0,371	0,214	0,473	0,292	0,794	0,894	0,462	0,443
	Kromozom tipi aberasyon sayısı*	r											
		p	0,073	0,137	0,050	0,345	0,184	0,597	0,237	0,968	0,929	0,488	0,344
	Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r											
		p	0,792	0,639	0,120	0,387	0,633	<b>0,044</b>	0,506	0,134	0,216	0,627	0,494
	Kromatid tipi aberasyon sayısı*	r											
		p	0,781	0,638	0,115	0,373	0,643	<b>0,041</b>	0,516	0,120	0,216	0,607	0,519
	“Gap” gözlenen hücre sayısı	r											
		p	0,312	0,933	0,421	0,586	0,716	0,356	0,572	0,878	0,587	0,454	0,701
	“Gap” sayısı	r											
		p	0,378	0,761	0,443	0,529	0,764	0,423	0,716	0,852	0,641	0,652	0,659
	Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı	r											
		p	0,060	0,198	<b>0,031</b>	0,159	0,563	0,997	<b>0,016</b>	0,432	0,349	0,142	0,431
	Kromozom tipi “gap” sayısı	r											
		p	0,060	0,198	<b>0,031</b>	0,159	0,563	0,997	<b>0,016</b>	0,432	0,349	0,142	0,431
Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı	r												
	p	0,126	0,993	0,896	0,792	0,949	0,372	0,362	0,904	0,707	0,314	0,858	
Kromatid tipi “gap” sayısı	r												
	p	0,145	0,977	0,888	0,766	0,987	0,375	0,368	0,945	0,680	0,323	0,837	
“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı	r												
	p	0,734	0,169	<b>0,019</b>	0,133	0,570	0,051	0,919	0,558	0,988	0,803	0,828	
“Gap”ler dahil aberasyon sayısı	r												
	p	0,456	0,146	<b>0,020</b>	0,144	0,406	0,193	0,452	0,547	0,743	0,833	0,551	
“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre	r												
	p	<b>-0,39</b>	0,056	<b>0,013</b>	0,162	0,339	0,287	0,116	0,830	0,544	0,401	0,489	
“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı	r												
	p	<b>-0,39</b>	0,058	<b>0,013</b>	0,165	0,291	0,427	0,081	0,969	0,647	0,379	0,370	
“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre	r												
	p	0,594	0,341	0,108	0,242	0,862	0,068	0,644	0,507	0,943	0,535	0,932	
“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı	r												
	p	0,550	0,387	0,135	0,276	0,776	0,076	0,578	0,506	0,929	0,492	0,908	
Değerlendirilen kişi sayısı (n)			32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	

**VKİ:** Vücut kütle indeksi; **Bel:** Bel çevresi; **Kalça:** Kalça çevresi; **MS:** Metabolik sendrom; **NAS:** Nonalkolik steatohepatit aktivite skoru; **r:** Korelasyon katsayısı; **p:** Anlamlılık düzeyi.

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

**Tablo-10:** Hasta grubunda biyokimyasal laboratuvar verileri ile genomik instabilite parametreleri arasındaki korelasyonlar.

		r	AKŞ	HOMA-IR	Oral Glikoz Tolerans Testi			HbA1c	Trigliserit	Total kolesterol	LDL kolesterol	HDL kolesterol	AST	ALT	AST/ALT	
					Başlangıç glikoz	2. saat glikoz	Yüzdelik değişim									
Mikronükleus Parametreleri	Mikronükleuslu hücre sayısı	r														
		p	0,222	0,217	0,264	0,119	0,123	0,346	0,778	0,356	0,330	0,301	0,261	0,457	0,073	
	Mikronükleus sayısı	r														
		p	0,206	0,144	0,220	0,070	0,073	0,402	0,862	0,460	0,477	0,357	0,251	0,458	0,066	
Kromozomal Aberasyon Parametreleri	Aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r														
		p	0,289	0,581	0,859	0,559	0,671	0,251	0,105	0,468	0,863	0,170	0,831	0,976	0,676	
	Aberasyon sayısı*	r														
		p	0,430	0,387	0,920	0,348	0,443	0,555	0,172	0,716	0,929	0,185	0,588	0,706	0,711	
	Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r														
		p	0,905	0,714	0,437	0,414	0,325	0,251	0,523	0,986	0,911	0,841	0,970	0,822	0,493	
	Kromozom tipi aberasyon sayısı*	r														
		p	0,765	0,857	0,403	0,547	0,444	0,163	0,539	0,938	0,963	0,755	0,813	0,726	0,590	
	Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r						<b>0,44</b>								
		p	0,406	0,496	0,621	0,111	0,111	<b>0,019</b>	0,077	0,361	0,768	0,053	0,566	0,842	0,099	
	Kromatid tipi aberasyon sayısı*	r						<b>0,43</b>								
		p	0,404	0,496	0,621	0,111	0,111	<b>0,022</b>	0,087	0,403	0,809	0,055	0,524	0,912	0,099	
	"Gap" gözlenen hücre sayısı	r														
		p	0,546	0,882	0,475	0,198	0,177	0,940	0,570	0,997	0,600	0,497	0,396	0,178	0,661	
	"Gap" sayısı	r														
		p	0,517	0,897	0,652	0,164	0,131	0,946	0,663	0,860	0,452	0,651	0,447	0,120	0,426	
	Kromozom tipi "gap" gözlenen hücre sayısı	r														
		p	0,692	0,515	0,700	0,169	0,126	0,689	0,471	0,722	0,763	0,212	0,236	0,521	0,184	
	Kromozom tipi "gap" sayısı	r														
		p	0,692	0,515	0,700	0,169	0,126	0,689	0,471	0,722	0,763	0,212	0,236	0,521	0,184	
	Kromatid tipi "gap" gözlenen hücre sayısı	r														
		p	0,579	0,484	0,774	0,728	0,674	0,962	0,916	0,868	0,573	0,799	0,807	0,313	0,297	
	Kromatid tipi "gap" sayısı	r														
		p	0,576	0,607	0,844	0,614	0,564	0,962	0,960	0,883	0,553	0,779	0,797	0,276	0,267	
	"Gap"ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı	r														
		p	0,485	0,891	0,424	0,346	0,291	0,667	0,221	0,682	0,991	0,203	0,694	0,603	0,856	
	"Gap"ler dahil aberasyon sayısı	r														
		p	0,644	0,747	0,481	0,553	0,435	0,869	0,375	0,973	0,662	0,254	0,531	0,369	0,819	
"Gap"ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre	r															
	p	0,783	0,556	0,328	0,321	0,253	0,456	0,279	0,769	0,753	0,517	0,897	0,926	0,812		
"Gap"ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı	r															
	p	0,962	0,830	0,403	0,547	0,444	0,292	0,331	0,910	0,861	0,482	0,777	0,828	0,877		
"Gap"ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre	r															
	p	0,476	0,678	0,810	0,957	0,908	0,241	0,422	0,812	0,786	0,400	0,724	0,563	0,962		
"Gap"ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı	r															
	p	0,458	0,766	0,770	0,884	0,835	0,273	0,424	0,805	0,745	0,462	0,638	0,394	0,833		
Değerlendirilen kişi sayısı (n)			30	17	14	14	14	28	32	32	30	32	32	32	32	

**AKŞ:** Açlık kan şekeri; **HOMA-IR:** Homeostazis modeli insülin direnci; **HbA1c:** Glikozile hemoglobin; **LDL:** Düşük dansiteli lipoprotein; **HDL:** Yüksek dansiteli lipoprotein; **AST:** Aspartat transaminaz; **ALT:** Alanin transaminaz; **r:** Korelasyon katsayısı; **p:** Anlamlılık düzeyi.

\*: "Gap"ler hariç yapılan değerlendirme.

## **Kontrol Grubu İçerisinde Yapılan Değerlendirmeler**

### **Grup Karşılaştırmaları**

Sadece kontrol grubu kendi içinde değerlendirildiğinde cinsiyet grupları arasında ve sigara içenlerle içmeyenler arasında hiçbir genomik instabilite parametresi açısından anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). VKİ  $30 \text{ kg/m}^2$  ve üzerinde olan kişilerin ayrı grup oluşturmak için yeterli olmaması nedeniyle ( $n=4$ ), obezitesi olan ( $\text{VKİ} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) ve olmayanlar ( $\text{VKİ} < 30 \text{ kg/m}^2$ ) arasında değerlendirme yapılamadı. Hafif artmış kilolu veya obez olanlarla ( $\text{VKİ} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), kilolu olmayanlar ( $\text{VKİ} < 25 \text{ kg/m}^2$ ) arasında yapılan karşılaştırmada toplam aberasyonlu hücre sayısının kilolu olan grupta anlamlı olarak fazla gözlendiği tespit edildi (Tablo-11).



**Tablo-11:** Sağlıklı gönüllüler içerisinde hafif artmış kilolu veya obez olanlar ile kilolu olmayanlar arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		VKI<25 Olanların Değerleri (n=8)	VKI≥25 Olanların Değerleri (n=12)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	7(1-15)	8,5(4-18)	0,384
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	8,5(1-16)	10(4-19)	0,734
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0,5(0-2)	2(0-2)	<b>0,039</b>
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	0,5(0-3)	2(0-5)	0,057
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-1)	1(0-2)	0,135
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,208
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-2)	0,521
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-2)	0,521
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(1-3)	0,5(0-3)	0,343
	<b>“Gap” sayısı</b>	1(1-3)	0,5(0-3)	0,343
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-2)	0(0-1)	0,521
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-2)	0(0-1)	0,521
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-3)	0,5(1-3)	0,734
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	1(0-3)	0,5(1-3)	0,734
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	2(1-3)	2(1-5)	0,473
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	2(1-5)	2(1-8)	0,473
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-3)	1(0-3)	0,624
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-4)	1(0-6)	0,624
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	1(1-3)	1(0-5)	0,851	
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	1(1-3)	1(0-5)	0,851	

VKI: Vücut kütle indeksi.

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

### Korelasyonlar

Kontrol grubu içerisinde yapılan korelasyon analizlerinde yaşla kromatid tipi “gap” parametreleri arasında pozitif korelasyon gözlemlendi (hücre sayısı için  $r=0.49$ ,  $p=0.027$ ; “gap” sayısı için  $r=0.49$ ,  $p=0.027$ ) (Tablo-12). VKI’nin toplam aberasyon parametreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi (aberasyonlu hücre için  $r=0.56$ ,  $p=0.010$ , aberasyon sayısı için  $r=0.53$   $p=0.016$ ) (Tablo-12). ALT değerleri ile kromozom tipi aberasyon parametreleri arasında (aberasyonlu hücre için  $r=0.62$ ,  $p=0.003$ , aberasyon sayısı için  $r=0.54$   $p=0.014$ ) ve “gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon parametreleri arasında (aberasyonlu hücre için  $r=0.44$ ,  $p=0.050$ , aberasyon sayısı için  $r=0.45$   $p=0.048$ ) pozitif korelasyon gözlemlendi (Tablo-12).

**Tablo-12:** Kontrol grubunda genel veriler ile genomik instabilite parametreleri arasındaki korelasyonlar.

			Yaş	VKİ	Bel	Kalça	Bel/Kalça	AST	ALT
Mikronükleus Parametreleri	Mikronükleuslu hücre sayısı	r							
		p	0,215	0,854	0,285	0,547	0,476	0,403	0,652
Mikronükleus Parametreleri	Mikronükleus sayısı	r							
		p	0,568	0,924	0,589	0,553	0,992	0,140	0,767
Kromozomal Aberasyon Parametreleri	Aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r		<b>0,56</b>					
		p	0,784	<b>0,010</b>	0,188	0,074	0,753	0,630	0,101
	Aberasyon sayısı*	r		<b>0,53</b>					
		p	0,899	<b>0,016</b>	0,286	0,067	0,888	0,607	0,146
	Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r							<b>0,62</b>
		p	0,923	0,148	0,326	0,108	0,922	0,719	<b>0,003</b>
	Kromozom tipi aberasyon sayısı*	r							<b>0,54</b>
		p	0,873	0,166	0,438	0,114	0,822	0,910	<b>0,014</b>
	Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*	r							
		p	0,592	0,276	0,956	0,849	0,928	0,222	0,389
	Kromatid tipi aberasyon sayısı*	r							
		p	0,592	0,276	0,956	0,849	0,928	0,222	0,389
	“Gap” gözlenen hücre sayısı	r							
		p	0,085	0,955	0,682	0,821	0,304	0,891	0,202
	“Gap” sayısı	r							
		p	0,085	0,955	0,682	0,821	0,304	0,891	0,202
	Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı	r							
		p	0,710	0,625	0,264	0,707	0,122	0,698	0,485
	Kromozom tipi “gap” sayısı	r							
		p	0,710	0,625	0,264	0,707	0,122	0,698	0,485
	Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı	r	<b>0,49</b>						
		p	<b>0,027</b>	0,671	0,314	0,942	0,067	0,527	0,506
	Kromatid tipi “gap” sayısı	r	<b>0,49</b>						
		p	<b>0,027</b>	0,671	0,314	0,942	0,067	0,527	0,506
	“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı	r							
		p	0,133	0,140	0,182	0,340	0,235	0,693	0,995
	“Gap”ler dahil aberasyon sayısı	r							
		p	0,143	0,111	0,226	0,217	0,529	0,566	0,979
	“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre	r							<b>0,44</b>
		p	0,977	0,487	0,610	0,303	0,751	0,874	<b>0,050</b>
“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı	r							<b>0,45</b>	
	p	0,932	0,454	0,605	0,275	0,704	0,849	<b>0,048</b>	
“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre	r								
	p	0,080	0,539	0,480	0,881	0,157	0,952	0,249	
“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı	r								
	p	0,080	0,539	0,480	0,881	0,157	0,952	0,249	
<b>n</b>			20	20	20	20	20	20	20

VKİ: Vücut kütle indeksi; Bel: Bel çevresi; Kalça: Kalça çevresi; AST: Aspartat transaminaz; ALT: Alanin transaminaz; r: Korelasyon katsayısı; p: Anlamlılık düzeyi.

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

## Tüm Gönüllüler Üzerinde Yapılan Değerlendirmeler

### Grup Karşılaştırmaları

Hasta ve kontrol grubunda gözlenen genomik instabilitenin aynı mekanizmalarla meydana geldiği varsayımıyla hasta ve kontrol grubunda yer alan tüm gönüllüler tek bir grup olarak birleştirilip (NASH düzeyinde olmayan NAYKH vakaları dahil) değerlendirmeye alınarak yapılan karşılaştırmalarda cinsiyet grupları arasında ve sigara içenlerle içmeyenler arasında hiçbir genomik instabilite parametresi açısından anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Obezite açısından değerlendirildiğinde, obez olanlarda ( $VKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) “gap”ler dahil toplam aberasyon parametrelerinin ve “gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon parametrelerinin obez olmayanlara göre ( $VKİ < 30 \text{ kg/m}^2$ ) anlamlı olarak fazla gözlendiği tespit edildi (Tablo-13). Ayrıca hafif artmış kilolu veya obez olanlar ( $VKİ \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) ile  $VKİ < 25 \text{ kg/m}^2$  olanlar arasında yapılan karşılaştırmada aberasyonlu hücre sayısının, hafif artmış kilolu veya obez olan grupta anlamlı olarak fazla olduğu gözlendi (Tablo-14). Obez olanlarla ( $VKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), hafif artmış kilolu olanlar ( $VKİ 25-29.9 \text{ kg/m}^2$  arasında olanlar) arasında yapılan karşılaştırmada da “gap”ler ve “gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon parametrelerinin obez olanlarda fazla olduğu tespit edildi (Tablo-15).

**Tablo-13:** Tüm gönüllülerde obezitesi olan ve olmayanlar arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		Obez Olmayanların Değerleri (n=25)	Obez Olanların Değerleri (n=32)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	9(1-25)	10,5(3-26)	0,617
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	11(1-27)	10,5(3-29)	0,821
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	1(0-2)	1(0-5)	0,161
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	1(0-3)	1,5(0-10)	0,124
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-2)	0(0-4)	0,887
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-3)	0(0-10)	1,000
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,116
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,114
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-3)	1(0-9)	0,072
	<b>“Gap” sayısı</b>	1(0-4)	1,5(0-9)	0,053
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-2)	0(0-2)	0,163
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-2)	0(0-2)	0,163
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-3)	1(0-4)	0,116
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	1(0-4)	1(0-7)	0,107
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	2(0-4)	3(0-12)	<b>0,034</b>
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	2(0-6)	3(0-12)	<b>0,022</b>
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-3)	0(0-6)	0,749
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-4)	0(0-11)	0,930
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-4)	1,5(0-8)	<b>0,022</b>	
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-6)	1,5(0-8)	<b>0,020</b>	

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

**Tablo-14:** Tüm gönüllüler içerisinde hafif artmış kilolu veya obez olanlar ile kilolu olmayanlar arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		VKI<25 Olanların Değerleri (n=10)	VKI≥25 Olanların Değerleri (n=47)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	7(1-19)	10(3-26)	0,135
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	8,5(1-21)	11(3-29)	0,288
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0,5(0-2)	1(0-5)	<b>0,041</b>
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	0,5(0-3)	1(0-10)	0,054
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-4)	0,304
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-2)	0(0-10)	0,360
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-5)	0,197
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-1)	0(0-5)	0,197
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-3)	1(0-9)	0,991
	<b>“Gap” sayısı</b>	1(0-3)	1(0-9)	0,871
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-2)	0(0-2)	0,679
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-2)	0(0-2)	0,679
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	1(0-3)	1(0-7)	0,620
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	1(0-3)	1(0-7)	0,582
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	1,5(0-3)	2(0-12)	0,137
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	1,5(0-5)	3(0-12)	0,120
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	0,5(0-3)	0(0-6)	0,982
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	0,5(0-4)	0(0-11)	0,890
	<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-3)	1(0-8)	0,346
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-3)	1(0-8)	0,324	

VKI: Vücut kütle indeksi.

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

**Tablo-15:** Tüm gönüllüler içerisinde hafif artmış kilolu olanlarla obez olanlar arasında genomik instabilite parametrelerinin karşılaştırılması.

		Hafif Artmış Kiloluların Değerleri <sup>a</sup> (n=15)	Obez Olanların Değerleri <sup>b</sup> (n=32)	p
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	9(6-25)	10,5(3-26)	0,740
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	11(6-27)	10,5(3-29)	0,697
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	1(0-2)	1(0-5)	0,643
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	1(0-3)	1,5(0-10)	0,481
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	1(0-2)	0(0-4)	0,458
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	1(0-3)	0(0-10)	0,610
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,297
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	0(0-2)	1(0-5)	0,292
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-3)	1(0-9)	<b>0,043</b>
	<b>“Gap” sayısı</b>	0(0-4)	1,5(0-9)	<b>0,039</b>
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-0)	0(0-2)	0,053
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	0(0-0)	0(0-2)	0,053
	<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	0(0-3)	1(0-7)	0,133
	<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	0(0-4)	1(0-7)	0,130
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	2(0-4)	3(0-12)	0,107
	<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	2(0-6)	3(0-12)	0,075
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-2)	0(0-6)	0,714
	<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-3)	0(0-11)	0,870
	<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	1(0-4)	1,5(0-8)	<b>0,044</b>
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	1(0-6)	1,5(0-8)	<b>0,044</b>	

<sup>a</sup>:Vücut kütle indeksi 25-29.9 kg/m<sup>2</sup> olanlar.

<sup>b</sup> Vücut kütle indeksi ≥30 kg/m<sup>2</sup> olanlar.

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

### Korelasyonlar

Tüm gönüllüler grubunda yapılan korelasyon değerlendirmelerinde yaşla mikronükleus parametrelerinin (mikronükleuslu hücre sayısı için r=0.36, p=0.007; mikronükleus sayısı için r=0.31, p=0.017) ve kromatid tipi “gap” parametrelerinin (hücre sayısı için r=0.31, p=0.017; “gap” sayısı için r=0.30, p=0.021) pozitif korelasyon gösterdiği gözlemlendi (Tablo-16). Kalça çevresi toplam aberasyon sayısı ile pozitif korelasyon gösterirken (r=0.27, p=0.046), ALT değerinin ise mikronükleuslu hücre sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi (r=0.28, p=0.035) (Tablo-16).

**Tablo-16:** Tüm gönüllüler grubunda genel veriler ile genomik instabilite parametreleri arasındaki korelasyonlar.

			Yaş	VKİ	Bel	Kalça	Bel/Kalça	AST	ALT
<b>Mikronükleus Parametreleri</b>	<b>Mikronükleuslu hücre sayısı</b>	r	<b>0,36</b>						<b>0,28</b>
		p	<b>0,007</b>	0,499	0,333	0,174	0,716	0,099	<b>0,035</b>
	<b>Mikronükleus sayısı</b>	r	<b>0,31</b>						
		p	<b>0,017</b>	0,717	0,568	0,255	0,974	0,145	0,070
<b>Kromozomal Aberasyon Parametreleri</b>	<b>Aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	r							
		p	0,191	0,075	0,071	0,079	0,406	0,731	0,501
	<b>Aberasyon sayısı*</b>	r				<b>0,27</b>			
		p	0,246	0,062	0,079	<b>0,046</b>	0,555	0,548	0,700
	<b>Kromozom tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	r							
		p	0,307	0,804	0,873	0,530	0,941	0,163	0,618
	<b>Kromozom tipi aberasyon sayısı*</b>	r							
		p	0,281	0,741	0,820	0,471	0,959	0,135	0,570
	<b>Kromatid tipi aberasyon gözlenen hücre sayısı*</b>	r							
		p	0,497	0,163	0,060	0,516	0,129	0,465	0,302
	<b>Kromatid tipi aberasyon sayısı*</b>	r							
		p	0,493	0,164	0,059	0,509	0,130	0,475	0,313
	<b>“Gap” gözlenen hücre sayısı</b>	r							
		p	0,091	0,637	0,588	0,728	0,760	0,540	0,511
	<b>“Gap” sayısı</b>	r							
		p	0,112	0,482	0,512	0,625	0,708	0,723	0,577
	<b>Kromozom tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	r							
		p	0,142	0,300	0,462	0,225	0,539	0,319	0,990
	<b>Kromozom tipi “gap” sayısı</b>	r							
		p	0,142	0,300	0,462	0,225	0,539	0,319	0,990
<b>Kromatid tipi “gap” gözlenen hücre sayısı</b>	r	<b>0,31</b>							
	p	<b>0,017</b>	0,600	0,608	0,813	0,552	0,902	0,694	
<b>Kromatid tipi “gap” sayısı</b>	r	<b>0,30</b>							
	p	<b>0,021</b>	0,558	0,580	0,767	0,529	0,819	0,741	
<b>“Gap”ler dahil aberasyon gözlenen hücre sayısı</b>	r								
	p	0,616	0,111	0,098	0,177	0,394	0,699	0,925	
<b>“Gap”ler dahil aberasyon sayısı</b>	r								
	p	0,944	0,081	0,086	0,103	0,412	0,712	0,893	
<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyonlu hücre</b>	r								
	p	0,227	0,989	0,924	0,669	0,734	0,078	0,391	
<b>“Gap”ler dahil kromozom tipi aberasyon sayısı</b>	r								
	p	0,230	0,850	0,774	0,544	0,834	0,089	0,433	
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyonlu hücre</b>	r								
	p	0,165	0,167	0,073	0,504	0,182	0,564	0,746	
<b>“Gap”ler dahil kromatid tipi aberasyon sayısı</b>	r								
	p	0,169	0,156	0,069	0,466	0,169	0,504	0,733	
<b>n</b>			57	57	57	57	57	57	57

**VKİ:** Vücut kütle indeksi; **Bel:** Bel çevresi; **Kalça:** Kalça çevresi; **AST:** Aspartat transaminaz;

**ALT:** Alanin transaminaz; **r:** Korelasyon katsayısı; **p:** Anlamlılık düzeyi.

\*: “Gap”ler hariç yapılan değerlendirme.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada, periferik kan lenfositlerinde gözlenen genomik instabilitenin, NASH hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı fark göstermediği, ancak fazla kiloya sahip gruplarda bazı kromozomal aberasyon parametrelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma, NASH hastalarında genomik instabiliteyi kromozom kırık analizi ve mikronükleus testleri ile araştıran ilk çalışmadır. Bugüne kadar, bu hasta grubunu kapsayan tek bir genomik instabilite araştırması yayınlanmıştır. Nakajima ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, NAYKH hastalarında hepatositlerin telomer uzunluğu değerlendirilerek telomer kısalması olanlar ile olmayanlar karşılaştırılmıştır. Çalışmada; VKİ, HOMA-IR, steatozisin histolojik derecesi ve 8-OHdG immün boyanma yoğunluğunun telomer kısalması olan grupta anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular telomer kısalması olan grupta daha yüksek insülin direncinin daha şiddetli hepatik steatozise neden olarak daha fazla ROR oluşumu ve hızlanmış telomer kaybına yol açabileceğini göstermiştir (86). Çalışmamız ise biyopsi ile doğrulanmış NASH hastalarının periferik kan lenfositlerinde genomik instabiliteyi araştıran ve aynı değerlendirmeyi sağlıklı kontrol vakalarında da yaparak hem iki grubun karşılaştırılmasını hem de hastalıkla ilişkili olan faktörlerle genomik instabilite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesini içeren bir çalışmadır.

Çalışmamızda iki farklı testin aynı anda kullanılması, bulguları farklı açıdan değerlendirebilme imkanı sağlamaktadır. Metafaz üzerinde solid giemsa boyama ile kromozomal aberasyonların incelenmesinde kromozom tipi ve kromatid tipi lezyon ayrımı, lezyonun meydana gelme zamanı ve mekanizması ile ilgili ipuçları sağlayabilmektedir. Buna ek olarak mikronükleuslar, ana nükleustan ayrılmış genomik materyal tarafından oluşturulduklarından hem anöjenik etkileri (tüm kromozom kayıplarını) hem de klastojenik etkileri



yansıtmaktadırlar (60, 62, 72). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, periferik kan lenfositlerindeki genomik instabilitenin, araştırılan dokunun genomik instabilitesini yansıttığını göstermiştir (66, 67, 72). Ayrıca kronik karaciğer hastalıklarında periferik kan lenfositlerindeki oksidasyon düzeylerinin hepatositlerdeki oksidasyon düzeyleri ile korele olduğu tespit edilmiştir (80).

Çalışmamızda hem NASH grubu içerisinde hem de NASH ve kontrol grubunu kapsayan tüm gönüllüler grubunda yapılan değerlendirmelerde mikronükleus parametrelerinin, kontrol grubunda ve tüm gönüllülerde de kromatid tipi "gap" parametrelerinin yaşla pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Bu bulgular hem kromozomal aberasyonların hem de mikronükleusların yaşla artış gösterdiğini bildiren önceki çalışmaları desteklemektedir (88, 62, 89). Sentromerik DNA ve kinetokor proteinlerinin mikronükleuslar içerisinde gösterilmesiyle yapılan çalışmalar, yaşla ilişkili olarak mikronükleusların artışının büyük oranda bütün bir kromozomdan kaynaklandığını göstermektedir (62). Russell ve ark. tarafından her yaştan kadınlar üzerinde fitohemaglütinin ile indüklenen lenfosit kültürleri ile yapılan sitogenetik analizlerde X kromozomu kaybının sıklığının 16 yaş altında %0.07 iken 65 yaş üzerinde %7.3'e ulaştığı tespit edilmiştir. Bu nedenle anöjenik etkileri duyarlı olarak değerlendirebilen mikronükleus testinde yaşla ilişkili artış ortaya çıkmaktadır (89).

Cinsiyet gruplarının karşılaştırılmasında, NASH hastaları içerisinde kadınların mikronükleus değerlerinin erkeklere göre anlamlı olarak fazla olduğu tespit edilmiştir. Cinsiyete bağlı bu farkın, X kromozomu ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (90, 91). Yapılan çalışmalarda kadınların lenfositlerinde X kromozomunun, otozomlara göre çok daha sık olarak mikronükleuslar içerisinde yer aldığı ve sitokinezisi engellenmiş lenfosit kültürlerinde X kromozomunun segregasyon bozukluklarının otozomlara göre daha sık gözlendiği gösterilmiştir (90, 91). Bizim çalışmamızda da cinsiyete bağlı olarak gözlenen farklılık önceki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Bugüne kadar, sigara içmenin, kromozomal aberasyonlara etkisini araştıran çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bazı çalışmalarda sigara içenlerde kromozomal aberasyonların içmeyenlere göre daha fazla gözleendiği ve %10 - 20 gibi oranlarda artış gösterdiği bulunurken bazı çalışmalarda sigara içmenin kromozomal aberasyonları arttırmadığı tespit edilmiştir (62). Çalışmamızda da kontrol grubunda ve tüm gönüllüler grubunda sigara içenler ve içmeyenler arasında genomik instabilite açısından fark gözlenmezken, NASH grubu içerisinde sigara içenlerde toplam aberasyon sayısının anlamlı olarak fazla gözleendiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda NASH patogenezi ile ilişkili olduğu bilinen obezite varlığı açısından yapılan değerlendirmede, obez olan NASH hastalarında “gap”ler dahil toplam aberasyonların anlamlı olarak fazla gözleendiği tespit edilmiştir. Bu grupta bel çevresinin de kromozom tipi aberasyon parametreleri ve toplam aberasyon parametreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarla NASH hastalarında VKİ ve santral visseral adipozitenin, karşılaştırılan kontrol vakalarına göre fazla olduğu gösterilmiştir (92, 93). Bizim çalışmamızda da NASH hastalarında, VKİ, bel çevresi ve kalça çevresi sağlıklı kontrol grubundan daha yüksekti. Hafif artmış kilolu veya obez olmanın NAYKH ile ilişkili olduğu ve obezite derecesinin artmasıyla NASH gelişme olasılığının da arttığı bilinmektedir (23). Kilo vermeye yağlı karaciğerin gerileyebileceği de gösterilmiştir (94, 95). Van der Poorten ve ark. tarafından yapılan çalışmada visseral yağ miktarının insülin direncinden bağımsız olarak NAYKH'nin şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (96). Visseral yağın portal vene çok miktarda serbest yağ asiti ve adipokin salgılayarak karaciğeri yüksek miktarda yağ asiti konsantrasyonuna maruz bıraktığı bilinmektedir (97). Lipit peroksidasyonunun ve 8-OHdG düzeylerinin değerlendirilmesi gibi yöntemlerle yapılan araştırmalarda, obezitenin her yaştaki kişilerde oksidatif stresi arttırdığı tespit edilmiştir (98, 99). Oksidatif stresin de lipit peroksidasyonu ile 4-hidroksinonenal, malondialdehit, akrolein, krotonaldehit gibi DNA ile reaksiyona girebilen reaktif aldehit oluşumu ile birçok genomik değişime yol açabildiği bilinmektedir (100).

Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda periferik kan lenfositlerinde gözlediğimiz genomik instabilitenin oluşmasında lipotoksik etkilerin önemli bir etken olması muhtemeldir.

Lipit peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarının göstergeleri olan 4-hidroksinonenal ve 8-OHdG'nin hepatik ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesiyle, NAYKH'de oksidatif hücresel hasarın sık olarak gözleendiği tespit edilmiş ve histopatolojik bulguların şiddetiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (31, 33). Bu ilişkiler nedeniyle karaciğerdeki patofizyolojik değişimlerin çalışmamızda NASH hastalarındaki genomik instabiliteye katkıda bulunmuş olması muhtemeldir. Ancak çalışmamızda, histopatolojik değerlendirme neticesindeki hepatik steatozis skorunun genomik instabilite düzeyleri ile ilişkisi açısından çelişkili bulgular elde edilirken (mikronükleus parametreleri ile negatif korelasyon gösterirken, kromozom tipi "gap" parametreleri ile ise pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir); NAS skoru, enflamasyon, balonlaşma dejenerasyonu ve fibrozis skorları ile genomik instabilite arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Bu bulgular da gözleendiğimiz genomik instabilitenin oluşumunda sistemik lipotoksik etkilerin karaciğerdeki patolojik süreçlere kıyasla daha baskın olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızın sağlıklı kontrol grubu, NASH grubuna göre daha zayıf kişilerden oluşmasına rağmen, bu grupta da  $VKİ \geq 25 \text{ kg/m}^2$  olanlarda toplam aberasyonlu hücre sayısının anlamlı olarak fazla olduğu ve toplam aberasyon parametrelerinin VKİ ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Obezite ile genomik instabilite arasında, hem NASH hem de sağlıklı kontrol grubu içerisinde ilişki gözlenmesi de sistemik lipotoksitenin etkisini düşündürmektedir.

Kromozom tipi aberasyon parametreleri ile serum ALT değerleri arasında pozitif korelasyon gözlenmesi, çalışmamızda periferik kan lenfositlerinde gözlenen genomik instabilite düzeylerinin hepatotoksik etkiler ile ilişkili olduğunu düşündüren bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak söz konusu ilişki sadece sağlıklı kontrol grubunda anlamlı düzeyde gözlenmiştir. Çalışmamızın

sağlıklı kontrol gönüllülerinde ALT düzeylerinin normal seviyelerde olmasına rağmen genomik instabilite ile korelasyon gösterirken NASH grubunda anlamlı korelasyon olmaması ilginçtir. Çalışmamızın bulgularından bunun nedeninin izah edilmesi mümkün olmamakla birlikte, NASH hastalarında, ilişkinin yoğun sitotoksik etkiler nedeniyle maskelenmiş olabileceği akla gelmektedir. Yani NASH hastalarında karaciğerde meydana gelen sitotoksik etkiler nedeniyle ALT düzeylerinde belirgin artış gözlenirken bu etkilerin incelediğimiz periferik kan lenfositlerinde aynı oranda genomik instabiliteye yol açmadığı, sağlıklı kişilerde ise nispeten daha saf koşullar nedeniyle mevcut olan ilişkinin daha net olarak ortaya çıkmış olduğu düşünülebilir. Ayrıca mikronükleus parametrelerinin, NASH hastalarında da, sağlıklı kontrol grubunda da ALT ile anlamlı korelasyon göstermemesine rağmen tüm gönüllüler birleştirilerek yapılan değerlendirmede ALT ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular, periferik kan lenfositlerindeki genomik instabilitenin karaciğer hasarı ile ilişkili olabileceğini düşündürmekle birlikte, bu ilişkinin mekanizmasının aydınlatılması ve NASH patogeneziindeki rolünün değerlendirilmesi daha ayrıntılı çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda polikistik over sendromlu hastalarda genomik instabilite artışı gösterilmiştir (75, 76). Polikistik over sendromu, insülin direnci artışı ve tip 2 diyabet risk artışı ve obezite ile seyreden bir sendromdur ve yapılan çalışmalarda mikronükleusların insülin direncinin düzeyi ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir (76). Federici ve ark. da mikronükleusların koroner arter hastalarında komplikasyonlarla ve mortaliteyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir (78). Aynı çalışmada yüksek mikronükleus değerleri ile diyabet varlığı arasında ilişki bulunmuştur. Çalışmamızda NASH hastaları içerisinde diyabeti olan ve olmayanlar arasında genomik instabilite açısından anlamlı fark gözlenmemekle birlikte HbA1c değerleri ile kromatid tipi aberasyon parametreleri arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Al-Aubaidy ve Jelinek tarafından yapılan, obezite ve tip 2 diyabette oksidatif DNA hasarını araştıran çalışmada, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, diyabetiklerde ve bozulmuş

açlık kan şekeri değerleri olanlarda 8-OHdG düzeylerinin anlamlı olarak artmış olduğu gösterilmiştir (101). Ayrıca 8-OHdG düzeylerinin, VKİ ve HbA1c ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Hipergliseminin, hücre kültürlerinde de NADPH oksidaz aktivasyonu ile ROR oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (102). Önceki çalışmalardan elde edilen bu bulgular, çalışmamızda HbA1c düzeyleri ile gözlenen ilişkinin oluşmasında oksidatif stres düzeyi artışının etken olabileceğini düşündürmektedir.

Metabolik sendromu olanlar üzerinde yapılan çalışmada metabolik sendrom kriterlerinin sayısının artmasıyla DNA hasar düzeyinin de arttığı tespit edilmiştir (103). Bizim bu araştırmamızda da metabolik sendrom kriter sayısının kromatid tipi ve toplam aberasyon parametreleriyle anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiş ve bu ilişki desteklenmiştir.

Genomik instabilitenin oluşmasında birçok faktör, birçok farklı mekanizma ile etkili olabilir. Bu çalışmamız neticesinde, NASH ile ilişkili faktörler içerisinde obezitenin genomik instabiliteyle ilişkisi dikkat çekmiştir. Sonuç olarak, patogenezi tam olarak bilinmeyen bir hastalık olan NASH tanısı almış olgular ve sağlıklı kontrollerde yaptığımız bu çalışmada, genomik instabilitenin, NASH ile alakalı olduğu bilinen faktörlerden obezite, bel çevresi, metabolik sendrom kriter sayısı, ALT ve HbA1c düzeyleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Basaranoglu M, Neuschwander-Tetri BA. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. New York: Nova Science Publishers; 2009.
2. Beyler AR, Aytaç Ş. Non alkolik steatohepatitis: Gastroenteroloji. 1.Baskı 2002. Bölüm 19:593-600.
3. Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:162-8.
4. Salt WB. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a comprehensive review. *J Insur Med* 2004;36:27-41.
5. Jansen PLM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Neth J Med* 2004;62(7/8):217-24.
6. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:511-31.
7. Hijona E, Hijona L, Arenas JI, Bujanda L. Inflammatory mediators of hepatic steatosis. *Mediators Inflamm* 2010;2010:837419.
8. 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.
9. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Sistematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimen Pharmacol Ther* 2011;34:274-85.
10. Merriman RB, Aouizerat BE, Bass NM. Genetic influences in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:30-33.
11. Solga SF, Clark JM, Alkhuraishi AR, et al. Race and comorbid factors predict nonalcoholic fatty liver disease histopathology in severely obese patients. *Surg Obes Relat Dis* 2005;1:6-11.
12. Browning J.D, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele, DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:292-8.
13. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40(12):1461-5.
14. Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, et al. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology* 2010;52:1281-90.
15. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1209-17.

16. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *Plos Genetics* 2011;7(3):1-14.
17. Day CP. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:255-60.
18. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010;362(12):1082-9.
19. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332(6037):1519-23.
20. Sinatra FR. Nonalcoholic fatty liver disease in pediatric patients. *JPEN-Parenter Enter* 2012;36(1):43-48.
21. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5
22. Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetic modifiers of non-alcoholic fatty liver disease progression. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:1557-66.
23. Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Digest Liver Dis* 2009;41:615-25.
24. Donnelly KL, Coleman IS, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acid stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-51.
25. Sanal MG. The blind men 'see' the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(6):831-44.
26. Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J, Postic C. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 2006;136:1145-9.
27. Musso G, Gambino R, Michieli FD, et al. Dietary Habits and Their Relations to Insulin Resistance and Postprandial Lipemia in Nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:909-16.
28. Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:545-63.
29. Bugianesi E, Marchesini G, Gentilcore E, et al. Fibrosis in genotype 3 chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease: Role of insulin resistance and hepatic steatosis. *Hepatology* 2006;44(6):1648-55.
30. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012;142:711-25.
31. Seki S, Kitada T, Yamada T, et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative damage in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2002;37:56-62.
32. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastr Fenterol* 2005;100:850-5.

33. Nobili V, Parola M, Alisi A, et al. Oxidative stress parameters in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2010;26:471-476.
34. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, et al. Mitochondrial abnormalities in nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*;31:430-4.
35. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-50.
36. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:1398-97.
37. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi MS, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:371-9.
38. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:523-34.
39. Page JM, Harrison SA. NASH and HCC. *Clin Liver Dis* 2009;13:631-47.
40. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-73.
41. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:420-7.
42. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113-21.
43. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-8
44. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* 2011;9:48
45. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009;13(1):9-19.
46. Perseghin G. The role of non-alcoholic fatty liver disease in cardiovascular disease. *Dig Dis* 2010;28:210-3.
47. Kashyap SR, Belfort RB, Cersosimo E, Lee S, Cusi K. Chronic low-dose lipid infusion in healthy patients induces markers of endothelial activation independent of its metabolic effects. *J Cardiometab Syndr*. 2008;3:141-6.
48. Mathew M, Tay E, Cusi K. Elevated plasma free fatty acids increase cardiovascular risk by inducing plasma biomarkers of endothelial activation, myeloperoxidase and PAI-1 in healthy subjects. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:9.



49. Contos MJ, Cales W, Sterling RK, et al. Development of nonalcoholic fatty liver disease after orthotopic liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Liver Transpl* 2001;7:363-73.
50. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52(2):774-88.
51. Papamichos-Chronakis M, Peterson CL. Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet* 2013;14:62-75.
52. Aguilera A, Gomez-Gonzalez B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 2008;9:204-17.
53. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *Journal of Molecular Cell Biology* 2011;3:1-3.
54. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis AG, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011;711:193-201.
55. Emerit I, Serejo F, Filipe P, et al. Clastogenic factors as biomarkers of oxidative stress in chronic hepatitis C. *Digestion* 2000;62:200-7.
56. Lindholm C, Acheva A, Salomaa S. Clastogenic plasma factors: a short overview. *Radiat Environ Biophys* 2010;49:133-8.
57. Ferguson LR. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res* 2009;690:3-11.
58. Yan B, Wang H, Rabbani ZN, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 2006;66(24):11565-70.
59. Taylor AMR. Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14(3):631-44.
60. Danford N. The Interpretation and Analysis of Cytogenetic Data. In: Parry JM, Parry EM (eds). *Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology*, vol. 817:93-120.
61. Savage JR. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 1976;13:103-22.
62. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006;88:1515-31.
63. Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res* 2004;64:2258-63.
64. Mateuca RA, Decodier I, Kirsch-Volders M. Cytogenetic methods in human biomonitoring. In: Parry JM, Parry EM (eds). *Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology*, vol. 817:305-34.
65. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983;221(4607):227-36.
66. Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, et al. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* 2007;165:36-43.

67. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 2006;600:37-45.
68. Cinkilic N, Kiyici S, Celikler S, et al. Evaluation of chromosome aberrations, sister chromatid exchange and micronuclei in patients with type-1 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2009;676:1-4.
69. Hojsak I, Gagro A, Petkovic I, Misak Z, Kolacek S. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes in patients with newly diagnosed celiac and Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:22-7.
70. Özkal P, Ilgın-Ruhi H, Akdoğan M, et al. The genotoxic effects of hepatitis B virus to host DNA. *Mutagenesis* 2005;20:147-50.
71. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and Its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 1993;101(3):101-7.
72. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28(3):625-31.
73. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*;2007;2(5):1084-104.
74. Larmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutat Res* 2008;659: 274-83.
75. Yesilada E, Sahin I, Ozcan H, et al. Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2006;154:563-68.
76. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Fenech MF. Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance. *Mutat Res* 2008;639:55-63.
77. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis* 2011;26(1):77-83.
78. Federici C, Botto N, Manfredi S, et al. Relation of Increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2008;102:1296-300.
79. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-Hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994;54:3171-2.
80. Farinati F, Cardin R, Degan P, et al. Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1284-91.
81. Bolukbas C, Bolukbas FF, Kocygıt A, Asian M, Selek S, Bitiren M, Ulukanligil M. Relationship between levels of DNA damage in lymphocytes and histopathological severity of chronic hepatitis C and various forms of hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:610-6.

82. Grossi S, Sumberaz A, Gosmar M, et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:22-5.
83. Cai HF, Cai F, Fan ZP. Determination of the rate of micronucleus formation in lymphocytes in liver diseases and its clinical significance. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1991; 30(5):289-90.
84. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012;52:59-69.
85. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011;412:1297-305.
86. Nakajima T, Moriguchi M, Katagishi T, et al. Premature telomere shortening and impaired regenerative response in hepatocytes of individuals with NAFLD. *Liver Int* 2006;26:23-31.
87. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
88. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:249-56.
89. Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res* 2007;116:181-5.
90. Catalan J, Autio K, E. Kuosma E, Norppa H. Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *Am J Hum Genet* 1998;63:1464-72.
91. Carere A, Antoccia A, Cimini D, et al. Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis* 1999;14(5):491-6.
92. Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006;44:1167-74.
93. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, et al. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2771-6.
94. Tendler D, Lin S, Yancy Jr. WSY, et al. The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2007;52:589-93.
95. Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, et al. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 1997;27:103-7.
96. Van der Poorten D, Milner KL, Hui J, et al. Visceral fat: A key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008;48:449-57.
97. Nielsen S, Guo ZK, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004;113:1582-8.

98. Bukhari SA, Rajoka MI, Nagra SA, Rehman ZU. Plasma homocysteine and DNA damage profiles in normal and obese subjects in the Pakistani population. *Mol Biol Rep* 2010;37:289-95.
99. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:813-39.
100. Nair U, Bartsch H, Nair J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Bio Med* 2007;43:1109-20.
101. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2011;164:899-904.
102. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49:1939-45.
103. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, et al. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *Int J Clin Pract* 2006;60(10):1187-93.

## TEŞEKKÜR

Eğitim sürecim boyunca, en sıkıntılı zamanlarımda bile, anlayışlı ve destekleyici davranan, bana bilimsel çalışmayı öğreten, bu araştırmanın planlayıcısı ve ortaya çıkmasını sağlayan kişi olan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Tuna GÜLTEN'e; uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden beri bana yol gösteren ve her alanda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tahsin YAKUT'a; her zaman yanımda yer alan Tıbbi Genetik Anabilim Dalının tüm çalışanlarına; çalışmaya dahil edilecek gönüllülerinin seçilmesi aşamasında verdikleri emek ve yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Talat AYYILDIZ, Prof. Dr. Macit GÜLTEN ve Gastroenteroloji Bilim Dalının hemşireleri başta olmak üzere tüm personeline; araştırmanın istatistiksel değerlendirmelerini yapan Dr. Gökhan OCAKOğLU'na ve bana her zaman destek veren aileme teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Bulgaristan'da doğdum. Eğitim hayatımın ilk 6 yılını orada tamamladım. 1989 yılında ailemle birlikte göç ederek Türkiye'ye geldim. Ortaokulu Bilecik Ertuğrul Gazi Lisesinde, liseyi Mersin Fen Lisesinde tamamladım. 1994 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde eğitime başladım ve 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde, Tıbbi Genetik Uzmanlığı eğitimime başladım. 2007-2008 yılları arasında Bitlis Tatvan'da askerlik görevimi tamamladım. 2009 yılından beri Uludağ Üniveristesesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında tez araştırmamı yapmaktayım.