



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI

ANABİLİM DALI

**SİNBIYOTİKLERİN TAMAMLAYICI/DESTEKLEYİCİ TEDAVİ OLARAK NON-  
ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINA ETKİSİ**

Dr. Mehmet KATIRCIOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2017

T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**SİNBIYOTİKLERİN TAMAMLAYICI/DESTEKLEYİCİ TEDAVİ OLARAK NON-  
ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINA ETKİSİ**

**Dr. Mehmet KATIRCIOĞLU**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Hacer Fulya GÜLERMAN**

**KIRIKKALE**

**2017**

## TUTANAKTIR

Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan Araştırma Görevlisi Dr.Mehmet Katırcıoğlu'nun "Sinbiyotiklerin Tamamlayıcı/Destekleyici Tedavi Olarak Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Etkisi" konulu tezi Tıp Ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. Maddesinin 4. Fıkrası " Jüri en geç bir ay içerisinde uzmanlık öğrencisinin tez savunmasını da alarak tezi inceler ve sonucunu yazılı ve gerekçeli olarak uzmanlık öğrencisi ile program yöneticisine bildirir." hükmü gereğince Araştırma Görevlisi Dr.Mehmet Katırcıoğlu, uzmanlık eğitimi tezinde başarılı olmuştur.

**Tez Savunma Tarihi: 15.05.2017**

**ÜYE**

Prof. Dr. Hacer Fulya Gülerman  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.  
Jüri Başkanı

**ÜYE**

Prof.Dr. Didem ALİEFENDİOĞLU  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

**ÜYE**

Prof. Dr. Hasan ÖZEN  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresi içinde bilgi ve engin tecrübelerinden faydalandığım, yetişmemde önemli katkısı olan, öğretmekten yorulmayan, tezimin hazırlanmasında değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, çok sevdiğim ve saydığım hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Hacer Fulya Gülerman'a

Uzmanlık eğitimimde büyük emeği olan bizlerle bilgi ve deneyimlerini paylaşan, her zaman ve her konuda desteklerini esirgemeyen çok sevgili hocalarım Prof. Dr. Didem Aliefendioğlu, Prof. Dr. Selda Fatma Bülbül, Prof. Dr. Ayça Törel Ergür, Doç. Dr. Meryem Albayrak, Prof. Dr. Banu Çelikel Acar, Yrd. Doç. Dr. Cihat Şanlı'ya

Birlikte çalıştığımız süre boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Yrd. Doç. Nilüfer Güzoğlu, Uzm.Dr. Dilek Azkur, Yrd. Doç. Dr. Serkan Tursun ve Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Alpcan, Uzm. Dr. Burcu Güven, Uzm. Dr. Sevinç Odabaşı Güneş'e

Birlikte çok şeyi paylaştığımız ve çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum şimdi uzman olan eski kıdemli asistanlarım ve birlikte geçirdiğimiz güzel zamanlar için sevgili asistan arkadaşlarıma,

Ekip çalışmasının tadına vardığımız hemşire arkadaşlar, teknisyen ve tüm personele,

Beni yetiştirip büyüten her zaman ve her konuda karşılıksız destek ve fedakârlıklarıyla hep yanımda olan canım aileme,

Hayatıma girdiği ilk günden beri sonsuz sevgi ve desteği ile yanımda olan, varlığı yeten biricik eşim Dr. Sümeyra Katırcıoğlu'na ve mutluluk sebebim, yaşam kaynağım canım kızım Amine Azra ve canım oğlum Ahmet Recep'e

Tüm kalbimle teşekkür ederim...

Dr. Mehmet Katırcıoğlu

Mayıs 2017

## ÖZET

### Sinbiyotiklerin tamamlayıcı/destekleyici tedavi olarak non-alkolik yağlı karaciğer hastalığına etkisi

#### Giriş

Aşırı alkol alımı olmadan karaciğerde fazla yağ birikimi olması şeklinde tanımlanan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) kronik karaciğer hastalığının en sık nedenidir. Diyetle ilişkili faktörler ve bağırsak bakteriler sıklığı giderek artan obezite ve obeziteyle ilişkili olan karaciğer yağlanması ve insülin direnci gibi durumlarda önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada ratlarda, sinbiyotiklerin diyet kaynaklı NAYKH ve kilo artışı üzerindeki etkisini değerlendirdik.

#### Gereç ve yöntem

Erkek Wistar Albino cinsi ratlar 60 gün boyunca yüksek yağ ve şeker içerikli diyetle beslendi. 8 hafta sonra ratlar her grupta en az 6 tane olacak şekilde rastgele iki gruba ayrıldı: kontrol grubuna standart diyet verilirken sinbiyotik grubuna standart diyete ek olarak 15 gün boyunca sinbiyotik verildi. Verilen sinbiyotik *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis ssp lactis* B94 ( $1 \times 10^9$  CFU/gün) ve fruktooligosakkaridlerden oluşmaktaydı.

0, 60 ve 75.günlerde vücut ağırlıkları alanin amino transferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzim düzeyleri ölçüldü. 60.günde karaciğer ultrasonografisiyle hepatosteatoz varlığı doğrulandı. 75.günden sonra ratlar anestezi altında sakrifiye edildi, histopatolojik analizler için karaciğer dokuları çıkarıldı.

#### Bulgular

Başlangıçta ve 60.günde gruplar arasında vücut ağırlığı, ALT ve AST seviyeleri açısından farklılık yoktu. 75.günde sinbiyotik grubunda vücut ağırlığı ve ALT seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin düşüş görüldü, ancak AST seviyeleri açısından farklılık yoktu. Histopatolojik analizlerde hepatosteatozis şiddetinin 'sinbiyotik almayan' kontrol grubunda belirgin olduğu görüldü.

## **Sonuç**

Bulgularımız laktobasil ve bifidobakteri temelli sinbiyotik karışımının yüksek yağ ve şeker içerikli diyetle oluşturulan hepatosteatoz ve kilo alımını azaltmada etkin olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar sinbiyotiklerin NAYKH'ı tedavi etme/önlemede etkin olduğuna işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Sinbiyotik, hepatosteatoz, rat, vücut ağırlığı, yağlı karaciğer



## **ABSTRACT**

### **Effects of Synbiotics on non-alcoholic fatty liver disease as a complementary / supportive treatment**

#### **Introduction**

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), defined by excess fat accumulation in the liver without a history of excessive alcohol intake, is the most common causes of chronic liver disease. Dietary factors and intestinal bacteria play an important role in the rapidly increasing incidence of obesity and its associated conditions, such as steatosis and insulin resistance. In the current study, we evaluated the effect of synbiotics on diet-induced NAFLD and weight gain in rats.

#### **Material and methods**

Male Wistar Albino rats were fed a high sugar and high fat diet for 60 days. After 8 weeks, rats are randomly allocated in two groups (at least n=6) as follows: control group, receiving standart diet; and synbiotic groups, receiving standart diet and synbiotic for 15 days. Synbiotic consisted of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis ssp lactis* B94 and fructooligosaccharide ( $1 \times 10^9$  CFU/day).

Body weight, ALT and AST levels were measured on 0, 60 and 75 days. On day 60, the presence of hepatosteatosis was confirmed by liver ultrasonography. After 75 days, rats were sacrificed under anaesthesia, with liver tissue extracted for histopathological analyzes.

#### **Results**

At baseline and day 60, there was no significant difference in body weight, ALT and AST levels between groups, however in day 75, there was a significant decreases in ALT activity, and body weight in the synbiotic group compared to the control group but not in AST levels. Histopathological analyzes showed that the severity of hepatosteatosis was more pronounced in the non-synbiotic control group.

## **Conclusion**

Overall, our data indicate that the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* based synbiotic mixture is effective in reducing the hepatosteatosis and weight gain with high fat and sugar intake, suggesting its possible therapeutic/preventive utilization for NAFLD

**Key words:** Synbiotic, hepatosteatosis, rat, body weight, fatty liver





# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. KARACİĞER ANATOMİSİ .....	3
2.1.1. Genel anatomi .....	3
2.1.2. Lenfatik ve nöral bağlantılar .....	5
2.1.3. Vasküler yapılar .....	6
2.1.4. Biliyer sistem .....	6
2.2. NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI.....	6
2.2.1. Epidemiyoloji .....	7
2.2.2. Patogenez .....	8
2.2.2.1. İnsülin direnci .....	9
2.2.2.2. Lipotoksisite.....	9
2.2.2.3. Endoplazmik retikulum stresi .....	10
2.2.2.4. Adipoz hepatosit etkileşimleri .....	10
2.2.2.5. Adipositokinler .....	11
2.2.2.6. Genetik .....	11
2.2.2.7. Obstrüktif uyku apnesi .....	12
2.2.2.8. “Two-hit” modeli (Çift vuruş) .....	12
2.2.2.9. Bağırsak karaciğer aksı.....	13
2.2.3. Klinik-Laboratuar Özellikler ve Tanı .....	13
2.2.3.1. Biyokimyasal özellikler.....	14
2.2.4. Görüntüleme bulguları .....	16
2.2.5. Histolojik inceleme .....	17
2.2.6. Tedavi .....	19
2.2.6.1. Yaşam tarzı değişiklikleri .....	21

2.2.6.2. Obezite cerrahileri .....	21
2.2.6.3. Farmakolojik tedaviler .....	21
2.3. SİNBİYOTİKLER .....	23
2.3.1. Probiyotikler .....	23
2.3.2. Prebiyotikler .....	25
2.3.3. Sinbiyotikler .....	27
2.3.4. Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin sağlık üzerindeki etkileri .....	27
2.3.5. Bağırsak-karaciğer aksı .....	28
2.3.6. Bağırsak mikrobiyotası ve NAYKH .....	30
2.3.7. Yağlı karaciğer hastalığı ve prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotikler .....	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	33
3.1. Denekler .....	33
3.2. Deney Protokolü .....	33
3.3. Karaciğer fonksiyon testlerinin ölçümü .....	34
3.4. Vücut ağırlıklarının ölçümü .....	34
3.5. Karaciğer ultrasonografisi .....	35
3.6. Karaciğer histopatolojik incelemesi .....	35
3.7. İstatiksel değerlendirme .....	36
4. BULGULAR .....	37
4.1. Vücut ağırlıkları .....	37
4.2. ALT ve AST seviyeleri .....	37
4.3. Karaciğerin ultrasonografik incelemesi .....	39
4.4. Karaciğerin histopatolojik incelemesi .....	40
5. TARTIŞMA .....	44
6. SONUÇ .....	49
7. KAYNAKLAR .....	50

## TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1. Çocuklarda hepatosteatoza neden olan sebepler .....	15
Tablo 2. NAYKH ve NASH tedavisinde kullanılan yöntem ve farmakolojik ajanlar .....	20
Tablo 3. Sık tercih edilen probiyotik suşları.....	24
Tablo 4. Yeni prebiyotik ve probiyotikler .....	26
Tablo 5. Ratların tedavi sonrası histopatolojik steatoz analizleri .....	42
Şekil 1. Fonksiyonel anatomisi ışığında karaciğerin göre bölümleri.....	3
Şekil 2. Karaciğerin diğer organlarla komşulukları .....	5
Şekil 3. Mikroveziküler ve makroveziküler hepatosteatozis .....	18
Şekil 4. Kontrol ve sinbiyotik gruplarının vücut ağırlıkları .....	37
Şekil 5. Kontrol ve sinbiyotik grubunun AST (IU/L) değerleri .....	38
Şekil 6. Kontrol ve sinbiyotik grubunun ALT (IU/L) değerleri .....	39
Şekil 7. Kontrol ve sinbiyotik gruplarının steatoz yüzdesi .....	40
Şekil 8. Kontrol grubunda makroskopik hepatosteatoz .....	41
Şekil 9. Kontrol grubunda nekropsisi sırasında adipoz dokuda belirgin artış .....	41
Şekil 10. Sinbiyotik grubunda makroskopik olarak normal karaciğer dokusu.....	42
Şekil 11. Histopatolojik olarak steatohepatit bulguları .....	43

## **KISALTMALAR**

<b>NAYKH</b>	<b>:</b>	<b>Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı</b>
<b>NASH</b>	<b>:</b>	<b>Non-alkolik steatohepatit</b>
<b>DSÖ</b>	<b>:</b>	<b>Dünya Sağlık Örgütü</b>
<b>ALT</b>	<b>:</b>	<b>Alanin Aminotransferaz</b>
<b>AST</b>	<b>:</b>	<b>Aspartat aminotransferaz</b>
<b>HS</b>	<b>:</b>	<b>Hepatosteatoz</b>
<b>FDA</b>	<b>:</b>	<b>Food and Drug Administration</b>
<b>DM</b>	<b>:</b>	<b>Diyabet</b>
<b>FAO</b>	<b>:</b>	<b>Gıda ve Tarım Organizasyonu</b>
<b>NF-κB</b>	<b>:</b>	<b>Nükleer Faktör kappa B</b>
<b>CRP</b>	<b>:</b>	<b>C-reaktif protein</b>
<b>TLR</b>	<b>:</b>	<b>Toll Like Receptor</b>

## 1. GİRİŞ

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) dünya genelinde hem yetişkinlerde hem de çocuklarda en sık görülen karaciğer hastalığıdır. Metabolik sendromun karaciğer manifestasyonu olarak düşünülmektedir. Sıklıkla obezite, insülin direnci ve diyabetle ilişkilendirilen NAYKH, basit bir steatozdan inflamasyon, fibrozis ve karaciğer hasarının eşlik ettiği ve siroza ilerleyebilen steatohepatite kadar olan tabloyu kapsamaktadır [1].

Hepatosteatoz prevalansı genel populasyonda yaklaşık %20-30 bildirilmiştir. Bu oranlar obez bireylerde %70-100'e kadar ulaşmaktadır. Pediatrik populasyonda sıklığı daha az bildirilen NAYKH hastalığının yetişkinlere benzer şekilde çocuklarda da obeziteyle artış gösterdiği ve %13-15 arasında görüldüğü ifade edilmektedir. Bu oran obez çocuklarda %80'e ulaşmaktadır [2]. Dünya genelinde obezite sıklığındaki artışla paralel seyreden NAYKH sıklığındaki artış dikkate alındığında zamanımızın önemli bir epidemisi haline geleceği düşünülmektedir.

NAYKH ve obezite arasındaki ilişkinin aydınlatılması üzerine mevcut tedavi stratejileri kilo kaybı, yaşam tarzı değişiklikleri gibi metabolik risk faktörlerini elimine etmeye odaklanmıştır. Bunların haricinde NAYKH patogenezinde etkili faktörler ışığında farmakolojik tedavilerden yararlanılmaktadır. İnsülin duyarlaştırıcı, antioksidan ve sitoprotektif ajanların tercih edildiği farmakolojik tedaviler çocuklardaki güvenlik endişeleri nedeniyle arka planda yer almaktadır [3].

Batı tarzı diyet ve yaşam stillerinin yaygınlaşması ile hastalığın sıklığı pediatrik yaş grubunda önemli artışa sebep olmuştur. Bu nedenle, yeni tedavi stratejileri ihtiyacı doğmuş ve hastalığın patogenezinine odaklanılmıştır. Patogenezinin aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda bağırsak mikrobiyotası ile karaciğer arasında yakından bir ilişki olduğu görülmüştür. Bağırsak mikrobiyotasının düzenlenerek sadece karaciğer hastalıkları değil aynı zamanda obezitenin de tedavi edilebileceği düşünülmüştür [4]. Bu amaçla konağa faydalı olan cansız komponentten oluşan prebiyotik, canlı mikroorganizmalardan oluşan probiyotikler ve ikisinin birleşiminden oluşan sinbiyotikler NAYKH tedavisinde incelenmeye başlanmıştır.

Yoğurt ve fermente süt gibi doğal kaynaklardan zaten tüketilmekte olan probiyotik ve sinbiyotikler yeni formülasyonlarda üretilerek bir çok hastalıkta tedavi ajanı olarak

kazandırılmış ve diyare, alerji, diyabet, obezite, metabolik sendrom gibi hastalıklarda başarılı sonuçlar vermiştir. Probiyotik ve sinbiyotiklerin NAYKH tedavisinde kullanımlarını değerlendiren hem hayvan hem de insan çalışmalarının sonuçları ümit vericidir [4].

Çalışmamızda yüksek ketoasidojenik ve yağ içerikli diyetle beslenerek hepatosteatoz oluşturulan ratlarda sinbiyotik (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis ssp lactis* B94  $1 \times 10^9$  CFU, fruktooligosakkarid) tedavisi sonrasında karaciğer enzimleri (ALT-AST), karaciğer ultrasonografisi ve histolojisindeki değişimlerin incelenmesi ve kontrol grubuyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

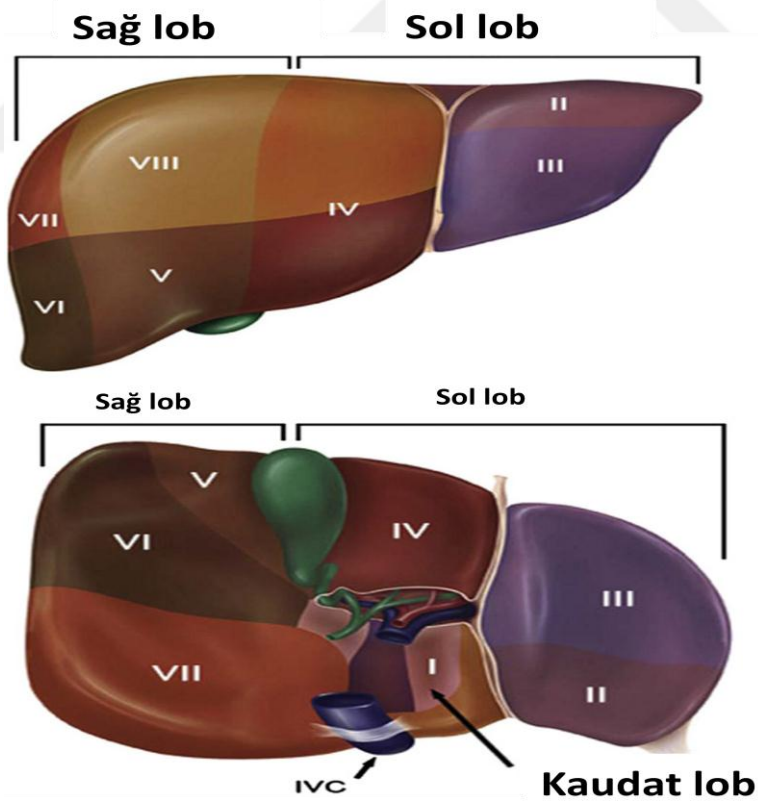


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KARACİĞER ANATOMİSİ

#### 2.1.1. Genel anatomi

Vücut ağırlığının yaklaşık %2-3'ünü oluşturan karaciğerin morfolojik veya fonksiyonel anatomiye göre tariflenen başlıca üç lobu (sağ, sol, kaudat) ve iki yüzü (anterior ve posterior) bulunmaktadır [5] (Şekil 1). Abdominal kavitenin sağ üst kadranında, sağ hemidiyaframın yanında konumlanmıştır. Ligamentöz bağlantıları sayesinde pozisyonunu korumaktadır ve kostalar tarafından çevrelenmiştir. Ligamentleri gerçek ligamanlar olmayıp avasküler yapıdadır ve Glisson kapsülü ile devamlılık içindedir [6].



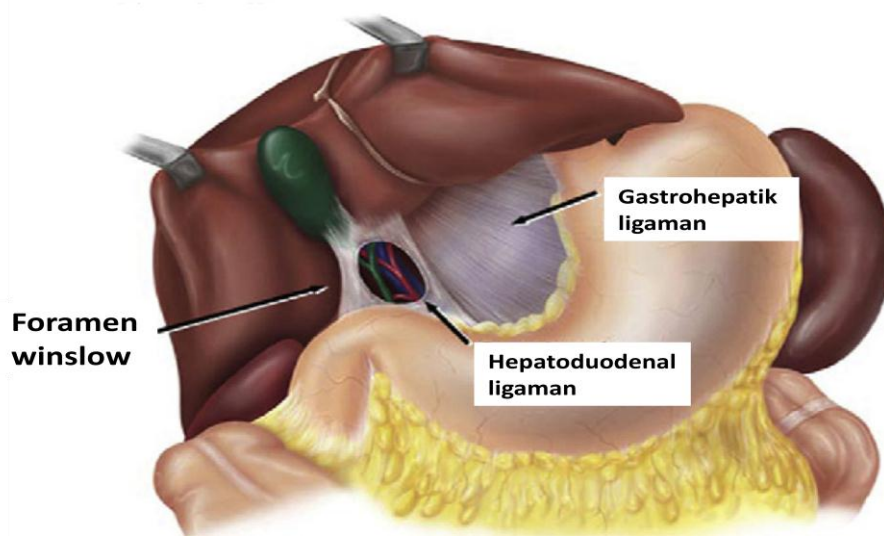
Şekil 1. Fonksiyonel anatomisi ışığında karaciğerin göre bölümleri

1989 yılında Cantlie tarafından ilk defa fonksiyonel karaciğer anatomisi kavramı ileri sürülmüştür. Sonrasında Couinaud ve Goldsmith ve Woodburne tarafından Cantlie'nin çalışmaları devam ettirilerek karaciğer üç ayrı loba ayrılmıştır: orta hepatic ven tarafından oluşturulan sağ ve sol loblar ile kaudat lob. Ayrıca sağ lob, sağ hepatic ven tarafından anterior ve posterior segmentlere ayrılırken, sol lob ise sol hepatic ven tarafından medial ve lateral segmentlere ayrılmıştır [7]. 1957'de Couinaud tarafından oluşturulan sınıflamada ilk defa karaciğerin kendi vasküler ve biliyer drenajına sahip bağımsız fonksiyonel segmentlerden oluştuğu öne sürülmüştür. Günümüzde Couinaud sınıflaması, tariflenen segmentlerin ayrı ayrı rezeke edilebiliyor olması nedeniyle önemini korumaktadır [7].

Falsiform ligaman umblikus civarından başlayıp, karaciğerin anterior yüzüne kadar uzanan ve umblikal fissürle devamlılık gösteren bir periton uzantısıdır. Morfolojik olarak sağ ve sol lobu ayırmaktadır. Karaciğer boyunca hepatic venler falsiform ligamanın altında vena cava inferiora boşalmaktadır [8]. Falsiform ligamanın altında oblitere umblikal ven (duktus venosus) kalıntısı olan ligamentum teres (round ligaman) bulunmaktadır. Ligamentum teres umblikustan umblikal fissüre doğru uzanmaktadır, sol karaciğer lobunu medial ve lateral segmentlere ayırır ve ligamentum venozumla bağlantılıdır. Ligamentum venozum kaudat lob ve anterior lob arasında, karaciğerin inferior yüzündeki fissürde seyretmektedir. Karaciğerin kranyal tarafı konveks bir bölge olup ligamentöz veya periton bağlantısı içermemektedir. Karaciğerin bu çıplak alanı diyafragmaya fiböz dokularla bağlanmaktadır. Koroner ligaman bu alanın anterior ve posterior kısımlarında uzanmaktadır. Ligamentum koronarium hepatis (koroner ligaman) karaciğer arka kenarını diyafragmaya bağlayan periton plikasıdır. Karaciğer sol ucunda ön ve arka yaprakları birleşerek lig. triangulare sinistrum ve dextrum oluşturarak karaciğer diyafram bağlantısını güçlendirir. Karaciğerin mide ile arasında omentum minus adı verilen periton uzantısı bulunur. Omentum minusun duodenum ve porta hepatis arasındaki kısmına lig hepatoduodenale adı verilir [6]. İnför vena kava (İVC) karaciğerin kaudat lobu ve sağ hepatic lobu ile İVC ligamanları sayesinde yakın bir ilişki içerisindedir [9].

Gastrointestinal sistem karaciğerle iletişim içerisindedir. Mide omentum minus ve gastrohepatik ligamanla sol karaciğer lobu ile komşudur. Gastrohepatik ligaman içerisinde vagusun hepatic kısmı bulunmaktadır. Çıkan kolonun transvers kolona geçiş yeri olan hepatic kıvrım sağ hepatic lobla komşudur. Duodenum ve portal yapılar da hepatoduodenal ligaman ve porta hepatis aracılığıyla karaciğerle direkt ilişkilidir (Şekil 2).





**Şekil 2. Karaciğerin diğer organlarla komşulukları**

Portal sistem içerisinde ana safra kanalı, hepatik arter, portal ven sırasıyla lateral, medial ve posterior dizilimde yer alır. Vasküler yapılar Foramen Winslow içerisinde bulunduğu için bu nokta cerrahi açıdan önemlidir [10].

Safra kesesi segment IV ve V'in posterior yüzündeki fossada yer alır. Sistik kanal aracılığıyla koledok ile bağlantılıdır. Ayrıca sağ karaciğerin lobunun altında retroperiton içerisinde sağ adrenal bez bulunmaktadır.

### **2.1.2. Lenfatik ve nöral bağlantılar**

Karaciğer süperfisyal ve derin lenfatik ağı sahiptir [11]. Derin lenfatik ağ hepatik venler aracılığıyla lateral frenik nodlara, portal ven dalları aracılığıyla hiluma doğru lenfatik drenajdan sorumludur. Süperfisyal lenfatik ağ Glisson kapsülü içinde anterior ve posterior yüzde konumlanmıştır. Anterior yüz primer olarak karaciğerin çıplak alanında frenik lenf nodlarına drene olur. Posterior yüzdeki ağ ise hiler lenf nodlarına drene olmaktadır.

Karaciğerin nöral inervasyonu oldukça kompleks olup tam olarak bilinmemektedir. Ancak parasempatik ve sempatik nöral inervasyonu olmadığı bilinmektedir. Sinir lifleri çölyak plexus, alt torasik ganglion, sağ frenik sinir ve vagustan köken alır. Vagus torakstan abdomene geçişi sırasında anterior ve posterior dallara ayrılır. Anterior vagus omentum minus seviyesinden geçerken karaciğeri inerve eden sefalik ve hepatik dallara ayrılır [6].

### **2.1.3. Vasküler yapılar**

Total kardiyak outputun yaklaşık %25'ini alan karaciğer hepatik arter ve portal ven ile ikili kanlanmaya sahiptir. Hepatik arter karaciğere gelen kanın %25-30'unu sağlarken, portal ven %70-75'ini sağlamaktadır. Arteriyal ve portal kan hepatik venöz sistem aracılığıyla sistemik dolaşıma drene olmadan önce hepatik sinüzoidlerde karışmaktadır.

Arteria hepatica communis çölyak arterden köken almaktadır ve laterale doğru ilerlerken hepatik arter ve gastroduodenal arter dallarını vermektedir. Gastroduodenal arter kaudale ilerleyerek pilor ve duodenum proksimalini besler. Hepatik arter hepatoduodenal ligamanın medialinden geçerken sağ ve sol hepatik dallarına ayrılır.

Splenik ven ve süperior mezenterik venin birleşiminden oluşan portal ven karaciğerin asıl kan kaynağını sağlar. Kapaksız olan portal ven basıncı 3-5 mmHg arasında olan düşük basınçlı bir vendir. Karaciğer hilumunda hepatoduodenal ligaman komşuluğunda sağ ve sol portal venler ayrılır. Sol portal ven kaudat lobları drene ederken sağ portal ven karaciğer parankimi içinde veya çok yakınında seyrederek. Karaciğerin venöz drenajını intrahepatik venler sağlar. Bu venler birleşerek üç hepatik veni oluşturur ve İVC'ye drene olurlar. Kısa seyir gösteren sol ve orta hepatik venler ve daha uzun seyir gösteren sağ hepatik venler direkt olarak İVC'ye drene olurlar [6] .

### **2.1.4. Biliyer sistem**

İntrahepatik biliyer sistem safra oluşumu ve duodenuma transportundan sorumlu multipl kanallardan oluşmuştur. Sağ hepatik duktus ve sol hepatik duktus birleşerek ductus communis'i oluştururlar. Ductus communis safra kesesinden çıkan ductus cysticus katılarak ana safra kanalını oluşturur. Pankreatik duktus ana safra kanalına katıldıktan sonra duodenuma açılırlar [6].

## **2.2. NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI**

Karaciğer yağlanması anlamına gelen hepatosteatoz (HS) karaciğerin kendi ağırlığının en az %5'inden fazlası kadar yağ içermesi anlamına gelir [12]. Diğer bir tanımlama ise

hepatositlerin %5'den fazla trigliserid içermesidir [13, 14]. Hepatosteatozu alkolik hepatosteatoz (alkolik yağlı karaciğer hastalığı, AYKH) ve non-alkolik hepatosteatoz (non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, NAYKH) şeklinde ikiye ayırmak mümkündür. Ancak AYKH ve NAYKH biyopsi ile ayırlanamamaktadır [15]. Ayrımında klinik olarak etanol alım öyküsü kullanılmaktadır. NAYKH terimi; steatozdan inflamasyon ve hepatosit nekrozuna, siroza neden olabilen steatohepatite (Non-alkolik steatohepatit, NASH) kadar değişen geniş spektrumlu bir klinik tablonun tümünü kapsamaktadır [16]. Amerikan Gastroenteroloji Birliği tarafından ise bu tanım için karaciğer biyopsilerinde “steatohepatitin eşlik etmediği steatozis” kullanılmaktadır [17]. Non-alkolik steatohepatit kliniğinde ise hepatosteatoza inflamasyon eklenmektedir ve alkolik steatohepatitten histolojik olarak ayırlanamamaktadır [18].

### **2.2.1. Epidemiyoloji**

NAYKH tüm dünyada oldukça sık görülmektedir ve özellikle gelişmiş batı toplumlarında görülen en yaygın karaciğer hastalığıdır.

NAYKH tanısında referans yöntem karaciğer biyopsisidir. Biyopsi ile patolojik olarak hepatosteatoz hafif (%5-33), orta (%33-66) ve şiddetli (>%66) şeklinde ayrılmaktadır [13]. Her ne kadar referans yöntem olmasına rağmen örneklem hatası olması, invazif olması ve pratik olmayışı nedeniyle prevalansı çalışmalarında sık tercih edilmemektedir. Genel popülasyonda NAYKH prevalans çalışmalarında invazif olmayan ve pratik uygulanabilen ultrasonografik karaciğer değerlendirmesi en sık tercih edilen yöntemdir [19]. Karaciğer biyopsisine kıyasla karaciğer ultrason değerlendirmesinin sensitivitesi %84.8, spesifitesi %93.6 bildirilmiştir [20]. Ayrıca prevalans çalışmalarında Manyetik Rezonans Spektroskopisi de tercih edilmiştir, ancak pahalı bir yöntemdir [21]. Prevalans çalışmalarında ultrasondan sonra en sık kullanılan ölçüt Alanin aminotransferaz (ALT) yüksekliğidir. Ancak tanı doğruluğunun diğer yöntemlere kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir [22].

Birleşik Devletlerde prevalansı %10-46 arasında bildirilirken, biyopsi tabanlı çalışmalarda bu oran daha düşük ifade edilmiştir [23-25]. NAYKH prevalansının zaman içerisinde artış gösterdiği bildirilmiştir. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) çalışmasında 1988-1994 yılları arasında NAYKH prevalansı %5.5, 1999-2004 yılları arasında %9.8, 2005-2008 yılları arasında %11'dir. Ayrıca bu yıllar içerisinde NAYKH'nın tüm karaciğer hastalıklarının sırasıyla %47, %63 ve %75'ini oluşturduğu ifade edilmiştir [26]. 2006 yılında Dionysos Nutrition and Liver Survey İtalya'da yapılan genel popülasyon

çalışmasında da hepatosteatoz sıklığı %45 bulunmuş, NAYKH için <20g/gün etanol alımı eşik değeri kullanıldığında NAYKH sıklığı %25, AYKH sıklığı %20 bildirilmiştir [27, 28]. Dallas Heart çalışmasında ise NAYKH prevalansı %30 bildirilmiştir [29].

NAYKH sıklığı yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi (VKİ), yaşanan coğrafya ve kullanılan değerlendirme yöntemine göre değişkenlik göstermektedir. Batı ülkelerinde prevalans %20-30 civarında bildirilirken Asya ülkelerinde %15 bildirilmiştir. Suudi Arabistan'da Bilgisayarlı Tomografi (BT) ile bu oran %10 bulunmuştur [21, 27, 30-32]. Çocuklarda daha düşük prevalanslar bildirilmiştir [33]. Çocuklarda obeziteyle artış gösterdiği ve %13-15 arasında görüldüğü ifade edilmektedir. Bir diğer çalışmada çocukların %3'ünde NAYKH görülürken, bu oranın obez çocuklarda %80'e ulaştığı ifade edilmiştir [2]. 2-4 yaşlarında prevalans %0.7'ye 12-19 yaşları arasında %8 saptanmıştır [34]. Son çalışmalarda erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir [35].

2015 yılında Anderson ve ark'ı tarafından NAYKH prevalansı hakkında yapılan meta-analizde 1-19 yaş arası bireyler değerlendirilmiş, genel populasyon üzerinde yapılan çalışmalarda NAYKH prevalansı erkeklerde %9, kadınlarda %6.3, normal kilolularda %2.3, fazla kilolularda %12.5, obezlerde %36.1 bildirilmiştir [22].

Türkiye'de yapılan prevalans çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Yüksel ve ark'ı tarafından 2012 yılında yapılan otopsi çalışmasında çocuklarda ve adölesanlarda HS sıklığı %6 bulunmuş, obezlerde sıklığın yaklaşık iki katına çıktığı, cinsiyet açısından farklılığın olmadığı gösterilmiştir [36]. Yıldız ve ark'ı obez çocuklarda NAYKH sıklığını %57.4 değerlendirmiştir [37]. Sertoğlu ve ark'ı erişkinlerde NAYKH hastalarının %42'sinde NASH, %58'inde HS olduğunu bildirmiştir [38].

### **2.2.2. Patogenez**

NAYKH; klinikohistopatolojik bir tanımlamadır. Alkole bağlı karaciğer hasarını taklit eder, ancak çok az alkol alan veya almayan hastalarda görülür. Histolojik spektrumu içerisinde inflamasyonun eşlik etmediği hepatositlerde yağ birikimi, fibrozis, nekroinflamatuvar komponentin eşlik ettiği steatohepatit yer almaktadır. Non-alkolik steatohepatit tehlikeli bir durum olup, hastaların %20'sinde siroza ilerlemektedir ve kriptojenik sirozun en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir [39, 40].

NAYKH patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. En yaygın kabul gören teori insülin direncinin HS ve steatohepatitte anahtar mekanizma olduğudur. Bunun haricinde oksidatif stres, karaciğer demiri, leptin ve intestinal bakteriler sorumlu tutulmuştur.

HS'da karaciğerde aşırı trigliserid birikimi olmaktadır. Trigliserid birikimi nedenleri arasında adipoz dokudan serbest yağ asitlerinin aşırı transportu, serbest yağ asitlerinin karaciğerden atılmasında azalma ve serbest yağ asitlerinin beta-oksidasyonunda bozulma yer almaktadır [41].

### **2.2.2.1. İnsülin direnci**

HS lipit akışındaki dengesizlikten kaynaklanır. Hepatik yağ birikimini arttıran nedenler arasında adipoz doku lipolizisinin veya diyetle alınan yağ miktarının artması sonucu lipit kaynaklarının artması, lipit oksidasyonunun azalması, hepatic *de novo* lipit sentezinin artması, hepatic VLDL (very low density lipoprotein) sekresyonunun azalması vardır [42]. Periferik dokulardaki lipoliz insülin direnci durumunda artış gösterir. Sonuç olarak serbest yağ asitleri karaciğere daha fazla gelir ve trigliserid miktarı artar [43]. Hiperinsülinemi ve hiperglisemi çeşitli lipojenik transkripsiyon faktörlerini etkileyerek *de novo* hepatic lipojenezi uyarmaktadır [44].

Trans yağ asitleri ve fruktoz içeren modern diyet şekilleri de NAYKH patogenezinde katkıda bulunur. Trans yağ asitleri ve fruktozdan zengin beslenen farelerde NAYKH, hepatic nekro-inflamasyon ve insülin direnci geliştiği bildirilmiştir [45]. NAYKH olan insanlarda ise yüksek fruktoz diyeti insülin direncini ve NAYKH şiddetini arttırmaktadır [46].

### **2.2.2.2. Lipotoksisite**

Lipotoksisite terimi serbest yağ asitleri ve metabolitlerinin sebep olduğu hücre hasarı ve ölümünü tanımlamak için kullanılan bir terimdir [47]. NAYKH hastalarında farklı lipit türlerinin birikimi söz konusudur [48]. Birikim gösteren major lipit formunun trigliserid olmasına rağmen yakın zamanda yapılan çalışmalarda trigliserid birikiminin karaciğeri koruyucu olabileceğine değinilmektedir. Hepatic trigliserid sentezini katalizleyen diaçilgliseroaçiltransferaz 1 veya 2 enzimini fazla eksprese eden farelerde insülin direnci gelişmeden HS geliştiği bildirilmiştir [49]. Bu bulgular trigliserid sentezinin diyetle artmış yağ alımına karşı yararlı bir fizyolojik yanıt olduğunu destekler [50]. Trigliserid birikiminden çok serbest yağ asidi birikimi toksik etki göstermektedir. Yakın bir zamanda NAYKH'da

monounsatüre yağ asitlerinin (MSYA) satüre yağ asitlerine (SYA) oranının major belirleyici olduğu ifade edilmiştir [51]. Hayvan modellerinde, MSYA'nın HS'ye neden olduğu ancak, SYA birikiminin hapatoselüler apoptozis, karaciğer hasarı ve HS ile sonuçlandığı gösterilmiştir. SYA bu nedenle daha toksik kabul edilmektedir [52]. Bununla birlikte serbest yağ asitlerinin mitokondriyal membran permeabilitesini, reaktif oksijen ürünlerini ve c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinaz 1 bağımlı hepatosit lipoapoptozisini arttırdığı bildirilmiştir [53].

### **2.2.2.3. Endoplazmik retikulum stresi**

Karaciğer hücrelerinin serbest yağ asitlerine maruziyeti endoplazmik retikulum (ER) membranında hücre stresini tetikler ve ER'de katlı olmayan proteinlerin birikimine neden olur. Katlı olmayan proteinlere karşı bir adaptif yanıt oluşmaktadır. Oluşan bu yanıtın insanlarda, PERK, PKR-like ER kinaz ve transkripsiyon faktör 6 yolaklarını aktive ederek NAYKH'a neden olduğu gösterilmiştir. ER stresi tetiklendiğinde hücrenin kendini açlıktan koruması için geliştirdiği bir diğer mekanizma otofajidir. Hayvan modellerinde ER stresiyile ilişkili olan, aynı zamanda NAYKH ile ilişkilendirilen obezite ve insülin direncinde otofajinin azaldığı ifade edilmiştir. Bu nedenle otofajinin NAYKH'da lipit metabolizmasını düzenleyen önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir [54].

### **2.2.2.4. Adipoz hepatosit etkileşimleri**

Bir organ olarak kabul edilen adipoz dokunun önemli hemostatik, endokrin ve immünolojik özellikleri bulunmaktadır. Obezitede adipoz doku makrofajlar tarafından işgal edilmekte ve neoanjiyogenesis sayesinde vaskülaritesi artmaktadır [55]. Güncel kanıtlar adipoz doku ve makrofajlar arasındaki etkileşimin NAYKH hastalarında sıklıkla gözlenen düşük şiddetli bir inflamatuvar durum ve insülin direnci oluşturduğunu ifade etmektedir [56]. Hepatik lipit birikiminde insülin direnci önemli rol oynamaktadır, aynı zamanda NAYKH hastalarında fibrozis, inflamasyon ve hapatoselüler hasar da etkilidir [57, 58]. Diyabeti olan NAYKH hastalarında insülin direnci viseral adipoz dokuyla yakından ilişkili bulunmuştur [59]. Ek olarak, viseral adipoz doku subkütan adipoz dokuya kıyasla insüline daha dirençli, lipoliz oranları daha yüksektir [60]. Lipoliz oranları daha yüksek olduğu için viseral adipoz doku karaciğer hasarına yatkınlığı daha fazla artırır. Çünkü salınan serbest yağ asitleri karaciğere

daha fazla ulaşmakta ve hepatosit apoptozisine neden olmaktadır [61].Sonuç olarak serbest yağ asidi oksidasyonu lipid peroksidasyonu sonucunda serbest oksijen radikalleri oluşturarak sitokin üretimi ve mitokondriyal disfonksiyona neden olur [62].

Adipoz dokuda c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinaz 1 (JNK1) sinyal yolağının aktivasyonunun hem insülin direncinin, hem de NAYKH'nın patogeneğinde önemli rol oynar. Serum SYA, sitokinler ve ER stresi ile aktive olan JNK1 yüksek yağlı bir diyetle indüklenebilir [63, 64]. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin karaciğerinde JNK1 aktivasyonunun arttığı ve insülin direncinin olduğu bildirilmiştir [63]. Benzer şekilde HS'ye ve NF-KB indüksiyonuna neden olan obezite ve yüksek yağlı diyet TNF- $\alpha$ , IL-6 ve sitokin sinyal supresörleri gibi inflamatuvar sitokin kaskadını başlatır, bu moleküller ise insülini antogonize eder [65]. Bu şekilde NAYKH - insülin direnci – NAYKH kısır döngüsü oluşur.

#### **2.2.2.5. Adipositokinler**

TNF- $\alpha$ , Il-6, leptin ve adiponektin gibi adipositokinler visceral adipoz dokudan üretilen önemli inflamatuvar proteinlerdir. Portal ven aracılığıyla direkt olarak karaciğere taşınırlar ve NASH patogeneğinde etkili oldukları düşünülmektedir. Adipositlerden salınan TNF- $\alpha$ 'nın obezite ve NAYKH'da arttığı bilinmektedir. Ek olarak NAYKH hastalarında TNF- $\alpha$  seviyelerinin artması fibrozis artışıyla ilişkilendirilmiştir. İnsülin sensitizan ve anti-inflamatuvar bir protein olan adiponektin seviyeleri HS hastalarına kıyasla NASH hastalarında daha düşük bulunmuştur. Bunun muhtemel nedeni adiponektinin TNF- $\alpha$ 'nın inflamatuvar etkilerini inhibe etmesi ve karaciğeri koruyucu özellikte olmasıdır. Farelerde adiponektinin NASH ve insülin direncini iyileştirdiği, TNF- $\alpha$  seviyelerini azalttığı bildirilmiştir [54].

Leptin, enerji hemostazı ve immün fonksiyonlar üzerinde etkili olan geniş etkili bir maddedir. Obez bireylerde leptin direnci görülmekte, bu nedenle adipoz doku artışıyla leptin seviyeleri artış göstermektedir. Bu mekanizmanın NAYKH ve NASH gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir [54].

#### **2.2.2.6. Genetik**

NAYKH altında yatan patogenetik mekanizmalar karaciğerde lipid depolanmasıyla sonuçlanan enerji alımının enerji sarfiyatından fazla olduğu bir enerji dengesizliğine işaret etmektedir. Ancak bu basit açıklama ileri dönem karaciğer hastalığı ve sirozla ilişkili olan NAYKH'nın ailesel eğilimini açıklamamaktadır [66]. Ek olarak Hispanik (İspanyol) ve

Asya'lılarda etnik kökenin bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir [67-69]. NAYKH olanların karaciğer biyopsileri incelendiğinde Hispaniklerde karaciğer hasarının daha çok olduğu, Asya'lıların daha çok lobüler inflamasyon gösterdiği, Afrikalıların ise daha az lobüler inflamasyon ve fibrozis gösterdiği görülmüştür [67]. Bu bulgular NAYKH'na yatkınlık yaratan ailesel ve etnik kökenlerin olduğunu vurgulamaktadır.

Büyük genom çalışmasında adiputrin/patatin-like fosfolipaz-3'te (PNPLA-3) bir polimorfizm tanımlanmıştır, bu polimorfizmin hepatosteatozda ve serum ALT seviyelerinde belirleyici olduğu görülmüştür. NAYKH sıklığı yüksek olan Hispaniklerde bu allel daha fazla eksprese edilmektedir [70]. 253 İtalyan hastanın değerlendirildiği başka bir çalışmada ise PNPLA-3 polimorfizminin hem hepatosteatoz hem de fibrozisle ilişkili olduğu ifade edilmiştir [71]. Hayvan çalışmalarında PNPLA-3 polimorfizminin hepatositlerdeki trigliserid hidrolizini bozduğu gösterilmiştir [72]. Hindistan'da yapılan bir çalışmada APOC3 C-482T ve T-455C polimorfizmleri insülin direnci ve NAYKH ile ilişkilendirilmiştir [73].

#### **2.2.2.7. Obstrüktif uyku apnesi**

Uyku apnesi ile ilişkili hipoksinin inflamatuvar sitokin salınımını uyararak glukoz metabolizmasını değiştirdiği bildirilmiştir. Yapılan bir hayvan çalışmasında uzun dönem hipoksi-reoksijenizasyon maruziyetinin karaciğerde yağ infiltrasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Obezite varlığında bu durum önceden var olan hepatosteatozu hızlandırır [74]. Obezite olmadığında ise kronik intermitan hipoksi karaciğer enzimlerinde hafif yükselmeye neden olmaktadır.

#### **2.2.2.8. “Two-hit” modeli (Çift vuruş)**

Steatozis reversible bir süreçtir. Karaciğer hücrelerinde balonlaşma ve inflamasyon (steatohepatit) gelişmesi hastada irreversible karaciğer hasarı ve fibrozis gelişip gelişmeyeceğini belirlemektedir. Bu süreç çift vuruş teorisiyle açıklanır. İlk vuruş hepatositlerde insülin direnciyle sonuçlanan aşırı trigliserid birikimidir. İkinci vuruş ise karaciğerdeki inflamatuvar hasarı içermektedir. İkinci vuruş için en iyi etmenler oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve TNF-alfa gibi inflamatuvar sitokinlerdir. Çift vuruş teorisi karaciğer yağlanması patogenezinin bir kısmını aydınlatmaktadır. Bazı hepatosteatozların progresif bir süreç izlemesini açıklamaya çalışmaktadır [2].



Yakın bir zamanda ise Dowman ve ark'ı NAYKH patogeneğinde önemli bir rol oynayan üçüncü bir vuruş (third hit) olduğunu ifade etmiştir. Dowman tarafından tanımlanan üçüncü vuruşa oksidatif stres neden olmakta ve olgun hepatositlerin replikasyonu inhibe olmaktadır [75]. Oksidatif stresin NAYKH hastalığındaki öneminin anlaşılması üzerine tedavi stratejileri anti-oksidanlar üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır.

#### **2.2.2.9. Bağırsak karaciğer aksı**

Bağırsak ve karaciğer yakından ilişkilidir. Aralarındaki ilişki bağırsak-karaciğer aksını oluşturmaktadır. Bu aksın doğru işleyişi iki etmene bağlıdır: Bağırsak ve karaciğerin endojen ve ekzojen bileşenlerin metabolizması ve bu bileşenlere karşı gelişen immünolojik yanıtla baş edilmesi. İntestinal mukoza çoğu lipopolisakkarit yapısında olan endotoksin ve bakterilerin girişi ve sistemik yayılmasını önlemeye yardım eden bir defans bariyeri şeklinde görev yapmaktadır. Ancak belirli koşullar altında bu intestinal bariyer hasar gördüğünde bakteri ve endotoksinler gastrointestinal sisteme yayılarak sistemik organ ve dokulara ulaşmaktadır. Bu sürece bakteriyel translokasyon adı verilmektedir. Bağırsak kaynaklı endotoksinlerin küçük bir kısmının portal dolaşımında bulunduğu ve böylece lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünlerin ve bakterilerin karaciğere transportasyonu için ideal bir rota olduğuna dair kanıtlar vardır. Ancak normal şartlar altında bu endotoksemi karaciğerin retiküloendotelial sistem tarafından hızlıca temizlenmektedir.

#### **2.2.3. Klinik-Laboratuvar Özellikler ve Tanı**

NAYKH olan hastaların çoğunluğu asemptomatiktir ve sıklıkla karaciğer transaminazları ve abdominal görüntülemelerdeki rastlantısal bulunan patolojilerle tanınırlar. Bazı hastalar karaciğer kapsül gerginliği nedeniyle abdominal rahatsızlık veya dolgunluk bildirebilir, klinik muayenede hepatomegali tespit edilebilir [76]. Sıklıkla santral obezite ve abdominal strialar eşlik eder ve insülin direnci olan bireylerde akantozis nigrikans görülebilir. Çocuklarda akantozis nigrikans sıklığı %30-50 civarında bildirilmiştir [77]. NASH olan hastaların küçük bir kısmında portal hipertansiyon, asit, splenomegali ve spider nevüsler görülebilir, siroz eşlik edebilir. Çocuklarda bildirilen diğer klinik prezentasyonlar içerisinde huzursuzluk, konsantrasyon bozukluğu, bulantı, diyare, abdominal gerginlik, kas krampları ve baş ağrısı sayılabilir [78]. NAYKH olan çocuklarda bazen NAYKH açısından aile öyküsü, insülin direnci ve tip 2 diyabetes mellitus izlenmektedir [79]. NAYKH/NASH olan çocukların çoğu

aşırı kiloludur. Yaş ve cinsiyete göre vücut ağırlığı persentilleri 85-95 arasında veya daha yüksektir [80].

NAYKH metabolik sendromun karaciğerdeki yansımasıdır. Özellikle NASH hastalarına hiperlipidemi, hipertansiyon ve insülin direncinin görüldüğü diyabet eşlik etmektedir. NAYKH hastalarında yüksek kan basıncı, kolesterol, glukoz ve trigliserid yüksekliği gibi kardiyovasküler risk belirteçleri daha yüksek oranda görülmektedir [81]. Hem pediatrik, hem de yetişkin populasyon yapılan çalışmalarda insülin direncinin sık görüldüğü bildirilmiştir. Biyopsi ile gösterilen NASH hastalarında insülin direncinin %95'e ulaştığı ifade edilmiştir [82]. Pediatrik NAYKH hastalığında sıklıkla dislipidemi görülmektedir. "NASH Clinical Research Network" çalışmasında Patton ve ark'ı yağlı karaciğeri olan, yaşları 6-17 arasındaki 254 çocuğu incelemiş ve hastaların %26'sında metabolik sendromun olduğunu bildirmiştir [83]. Bu çalışmada metabolik sendrom santral obezite, dislipidemi, bozulmuş açlık glukozu ve kan basıncı artışından üçünün olması şeklinde tanımlanmıştır. Dislipidemi sıklığı ise %25 bulunmuştur. Aynı zamanda metabolik sendrom varlığı fibrosizle ilişkili değilken steatoz derecesiyle ilişkili bulunmuştur.

NAYKH hastalığında insülin direnci sık görülmektedir. Yetişkin tip 2 diyabet hastalarının %50-60'ında, tip 1 diyabet hastalarının ise %45'inde NAYKH olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca tip 2 diyabete eşlik ettiğinde daha progresif bir karaciğer hastalığına neden olduğu gösterilmiştir [84]. Benzer şekilde NASH tanısıyla takip edilen 57 çocuğun %10'unda 2 yıllık bir takip sürecinde diyabet geliştiği ifade edilmiştir [85].

Pardee ve ark hepatosteatozun kemik sağlığına etkisi olabileceğini düşünmüştür. NAYKH olan 38 çocuğu karaciğer hastalığı olmayan kontrollerle karşılaştırmış ve NAYKH hastalığı olan çocukların obez kontrollere kıyasla kemik mineral dansitesinin daha düşük olduğunu göstermiştir [86]. Benzer şekilde de NASH hastalarında basit steatoza kıyasla kemik mineral dansitesi daha düşük bulunmuştur.

### **2.2.3.1. Biyokimyasal özellikler**

#### **2.2.3.1.1. Karaciğer fonksiyon testleri**

NAYKH hastaları sıklıkla karaciğer fonksiyon testlerindeki anormalliklerden sonra tanı almaktadır. Tipik olarak alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) enzimi hafif yüksektir ancak, normalin üç katına çok nadiren çıkmaktadır [87]. Standart

laboratuvar eşik değerleri kullanıldığında (erkeklerde >40 U/L, kadınlarda 31 U/L), hastaların %78'inde transaminazlar normal seviyelerdedir. Bu nedenle tanı sensitivitesi düşüktür [88]. NAYKH için risk faktörü olmayan sağlıklı bireylerde ALT eşik değeri erkeklerde 31U/L, kadınlarda 19 U/L olması gerektiği bildirilmiştir [89]. Bu yeni ALT eşik değerleriyle NAYKH sensitivitesi %42'den %74'e çıkmıştır ancak, tanı spesifitesi %82'den %42'ye azalmıştır [90].

Karaciğer transaminaz seviyeleri nekroz ve inflamasyonun eşlik ettiği NASH hastalarında basit bir hepatosteatoza kıyasla daha yüksektir [91].

Alkalin fosfataz seviyelerinde yükselme görülebilir. Çoğu NAYKH hastası çocukta trigliserid seviyelerinde anormallik ve/veya HDL kolesterol düşüklüğü şeklinde dislipidemi bulguları görülmektedir. NAYKH tanısı için çocuklarda hepatosteatoza neden olan diğer sebepler araştırılmalı ve dışlanmalıdır [92]. Bunlar tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1. Çocuklarda hepatosteatoza neden olan sebepler**

<b>Nutrisyon</b>	Obezite	Gıda alım eksikliği
	Protein-kalori malnutrisyonu	Esansiyel yağ asidi eksikliği
	Kwashiorkor	Çinko eksikliği
<b>İntoksikasyon</b>	Karbon tetraklorid	Organik solventler
	Organik fosfat	Alkol
<b>İlaçlar</b>	Glukokortikoid	Tetrasiklin
	Östrojenler	Metotreksat
	Fosfor	Valproik asit
	Aspirin	Asetaminofen
	Vitamin A	Asparajinaz
<b>Metabolik hastalıklar</b>	Galaktozemi	Fuktoz intoleransı
	Glikojenezis	Tirozinemi
	Homosistinüri	Nieman-Pick
	Refsum	Kistik fibrozis
	Diyabetes mellitus	Weber Christian
<b>Diğer</b>	Reye sendromu	Hepatit C enfeksiyonu

### **2.2.3.1.2. Demir parametreleri**

Demir parametreleri NAYKH hastalarında nadiren anormaldir. Hastaların %20-50'sinde serum ferritin seviyeleri %5-10'unda transferin saturasyonu artabilir. Ancak ferritin seviyelerindeki yükselme karaciğer demirinin güvenilir bir göstergesi değildir. Hepatik parankimal demir depolanması genellikle hafiftir, ancak vakaların %11-23'ünde görülmektedir ve fibrozis artışıyla ilişkilidir [54].

### **2.2.3.1.3. Lipit profili**

NAYKH hastalarında hipertrigliseridemi ve HDL düşüklüğü sık görülmektedir. Vakaların %50'sinden fazlasında görülür. Obez hastalarda bu ilişki daha belirgindir ancak, obez ve diyabetik olmayan hastalarda da benzer ilişki gösterilmiştir. Lipit analizlerinde total serbest yağ asidi ve tekli doymamış yağ asitlerinin arttığı gösterilmiştir [54].

### **2.2.3.1.4. İnsülin direnci**

NAYKH olan çocuklarda insülin direnci sıklığının arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte özellikle de obez çocuklarda insülin direncinin göstergesi olan HOMA-IR indeksinin basit steatoza kıyasla NASH hastalarında daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Ultrasonografiyle gösterilen hepatosteatoz derecesi ile insülin sekresyonu ve insülin direncinin korelasyon gösterdiği bilinmektedir [2].

## **2.2.4. Görüntüleme bulguları**

Hepatosteatozun saptanmasında sıklıkla ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme kullanılmaktadır. Bu görüntüleme modalitelerinin en büyük kısıtlılığı histolojik alt tipler arasında ayırım yapamaması ve fibrozis evrelemesine olanak sağlamamasıdır. NAYKH tanısında ultrasonun spesifitesi %97, sensitivitesi %64 bildirilmiştir. Radyasyon içermemektedir ve kolay ulaşılabilir bir yöntemdir. Ancak hafif

steatozlar çıkarıldığında, orta ve şiddetli hepatosteatozda ultrasonun sensitivitesi %100'e yaklaşmaktadır. Ultrasonun tanı doğruluğu obezite varlığında azalmaktadır. Morbid obez hastalarda VKİ artış gösterdikçe sensitivite ve spesifite %50'lere kadar azalmaktadır. Bu nedenle morbid obezlerde ve hafif hepatosteatozda ultrason güvenilirliği azalmaktadır. Ultrasonun diğer bir kısıtlılığı kullanıcı bağımlı olmasıdır [93].

Ultrasonla aynı zamanda hepatosteatoz derecelendirmesi yapılabilmektedir. İncedayı ve ark'ı [93] tarafından tariflenen ultrasonografik sınıflandırmaya göre;

- Grade I; ekojenitenin diffüz artışı ancak vasküler duvarlar ve diyafram ekojenitesinin normal olması
- Grade II; intrahepatik ven/arter duvarları ve diyafram ekojenitesi diffüz artan parankim ekojenitesi tarafından baskılanmıştır.
- Grade III, diyafram duvar ekojenitesi görülmemektedir ve karaciğerin posterior segmentleri net görülmemektedir.

Bilgisayarlı tomografinin karaciğer:dalak atenüasyon oranı kullanıldığında sensitivitesi %73-100, spesifitesi %95-100 bildirilmiştir. Bilgisayarlı tomografinin en büyük kısıtlılığı iyonize radyasyon içermesi ve %30'dan fazla hepatosteatozda kullanılabilmesidir. İyonize radyasyon içermesi nedeniyle çocuklarda kullanımı kısıtlıdır [54].

Manyetik rezonans görüntülemenin tanı doğruluğu oldukça yüksektir, ancak demir depolanmasından etkilenmektedir. Hepatosteatozun ölçümünde altın standart görüntüleme yöntemi olarak manyetik rezonans spektroskopi kabul edilmektedir, ancak sadece klinik çalışmalarda tercih edilmektedir. %7,5 karaciğer yağlanması %100 doğrulukta saptayabilmektedir [54].

NAYKH tanısında yeni bir yöntem olan "fibroscan" ile elastografi kullanılarak invazif olmayan, hızlı, ağrısız ve tekrarlanabilir ölçümler yapılmaktadır. Hem yetişkinlerde hem de çocuklarda fibroscan'ın karaciğer histolojisiyle korele olduğu gösterilmiştir. Yaygın olmaması nedeniyle sık kullanılmamaktadır ve pediatrik popülasyonda yapılan çalışma sayısı sınırlıdır [94].

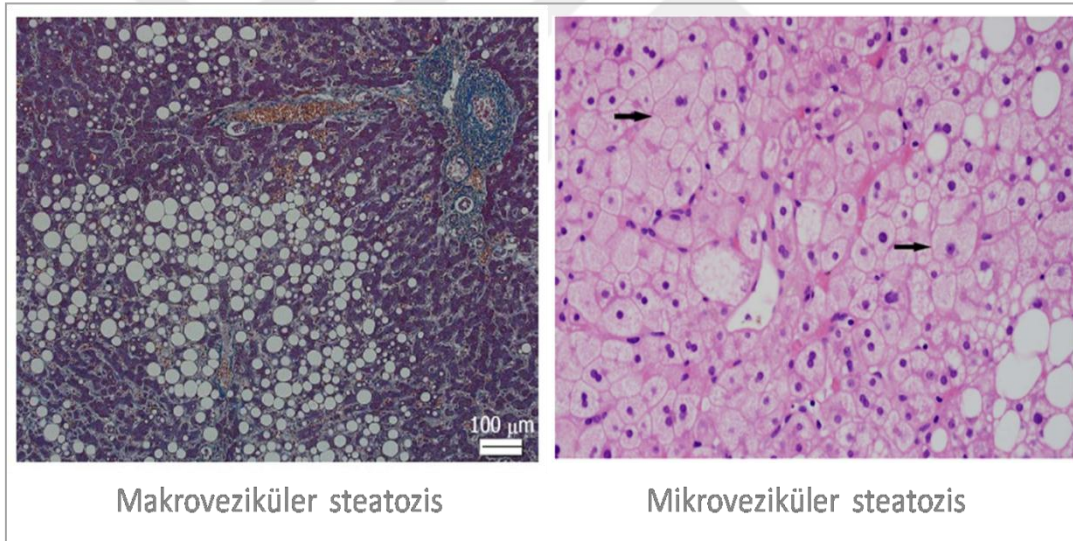
### **2.2.5. Histolojik inceleme**

Karaciğer biyopsisi NAYKH tanısında altın standart yöntemdir. Karaciğer biyopsisi pahalı ve invazif bir işlemdir, %0.06-0.35 morbidite, %0.01-0.1 mortalite riski taşımaktadır. Bu nedenle

tarama ve toplum tabanlı çalışmalar için uygun bir yöntem değildir. Diğer taraftan yağlı karaciğer hastalıklarının sadece küçük bir kısmında belirgin progresyon izlenmektedir [2]. Biyopsi bu nedenle 6 aydan uzun bir süredir transaminazlarında artış olan semptomatik hastalarda tercih edilmelidir.

Yetişkin hastalarda farklı histopatolojik NAYKH özellikleri tanımlanmıştır. Çocuklarda yetişkin hastalarda görülen çoğu özelliğin benzer olmasına rağmen pediatrik popülasyona ait farklı özellikler de görülmektedir. Yetişkin NASH hastalarının histopatolojik incelemelerinde makroveziküler steatozis, lobüler inflamasyon ve Mallory hyalin bulguları görülmektedir. Pediatrik NAYKH’da görülen histolojik bulgular şunlardır [95]:

- Hepatik steatoz (Vakaların %100’ünde); makro veya mikroveziküler tipte
  - Makroveziküler tip; en sık görülen tiptir, lipit dolu bir vakuol hepatosit nükleusunu ve sitoplazmasını periferine itmiştir.
  - Mikroveziküler tip; hepatosit sitoplazmasında çok sayıda vakuol izlenir.



**Şekil 3. Mikroveziküler ve makroveziküler hepatosteatozis**

- Lenfosit lezyonları; en sık portal alanlarda görülür.
- Hücre balonlaşması; steatohepatitin en karakteristik bulgusudur ve sıklıkla Mallory cisimleriyle ilişkilidir.
- Fibrozis
- Pigmente makrofajlar; nadir görülür.

Schwimmer ve ark’ı [96] tarafından yapılan çalışmada yaşları 2-18 arasındaki hepatosteatozu olan 100 çocuk değerlendirilmiş ve iki farklı histolojik tip tanımlanmıştır. Çocuk hastaların

%17'sinde yetişkin NASH hastalarına benzer histolojik özellikler bulunmuş, bu özellikler içerisinde portal tutulumun olmadığı perisinüzoidal fibrozis, balonlu dejenerasyon ve steatosiz yer almaktadır. Bu hastalar tip 1 NASH şeklinde sınıflandırılmıştır. Diğer taraftan hastaların %51'inde farklı bir hasar paterni izlenmiştir. Özellikle portal alanlarda belirgin steatoz ve inflamasyon izlenmiştir. Çocuk hastalarda aynı zamanda yetişkin hastalarda karakteristik olan balonlu dejenerasyon bulguları daha az olma eğilimindedir. Çocuk hastalarda görülen bu diğer hasar tipi; tip 2 NASH şeklinde sınıflandırılmıştır. 2 farklı histolojik NASH paterni arasında yaş, cinsiyet, ırk ve etnik kökenin farklı olduğu bildirilmiştir. Tip 2 NASH hastaları genellikle erkek, Asya, Amerika ve İspanyol kökenliken, tip 1 NASH hastaları daha küçüktür ve obezite şiddeti daha fazladır [96]. Kuzey Amerika ve Avustralya'da yapılan bir diğer çalışmada da benzer şekilde yetişkin ve çocuk hastaların histolojik incelemelerinde farklılık olduğu gösterilmiştir. Çocuklarda steatozun daha fazla, balonlaşma, lobüler inflamasyon ve PMN infiltrasyonunun daha az olduğu ve kronik portal inflamasyonun görülmediği ve eşlik eden bir perisinüzoidal fibrozis olmadan portal fibrozisin görüldüğü bildirilmiştir [34].

Pediyatrik NAYKH hastalarında karaciğer biyopsi zamanlaması hakkında açık bir rehber bulunmamaktadır. Yağlı karaciğer hastalığında histolojik doğrulama yapılmak istendiğinde işlemle ilişkili riskler göze alınmalıdır. İşlemin yapılması ile sağlanacak faydaların risklerden fazla olması gerekmektedir. Günümüzde siroz, fibrozis ve inflamasyonun gösterilmesi ve derecelendirilmesi için biyopsi hala altın standart yöntemdir. Biyopsi ile aynı zamanda ayırıcı tanı yapılabilir.

### **2.2.6. Tedavi**

NAYKH hastalığında özellikle de karaciğer enzimleri yükseldiğinde fibrozis gelişebilir, son dönem karaciğer hastalığına ilerleyebilir. Bu nedenle mümkün olduğunca erken tedavi edilmelidir. Tedavi stratejileri hastalığın patogenezini en iyi açıklayan "two-hit" teorisini temel almaktadır. Hem erişkin, hem de pediyatrik hastalarda uygulanan bu yaklaşımlar içerisinde diyabet ve hiperlipidemi gibi metabolik bozuklukların tanı ve tedavisi, kilo kaybı (yaşam stili değişiklikleri) veya farmakoterapiyle insülin direncinin tedavisi, oksidatif stres, inflamasyon, apoptozis ve hepatik fibrozisi uyaran sekonder süreçlerin antioksidan maddeler gibi karaciğeri koruyucu ajanların kullanımıyla kontrol altına alınmasını içermektedir. Ancak hepatosteatozun sekonder nedenlerinin dışlanması da önemlidir. Bu vakaların tedavisi farklılık göstermektedir ve altta yatan nedenin tedavisini içermektedir. NAYKH ve NASH

tedavisinde kullanılan yöntem ve farmakolojik ajanlar tablo 2’de özetlenmiştir. Bu tedaviler içerisinde metformin ve vitamin E hakkında yeterli kanıt olmasına rağmen antiobezite ilaçları (orlistat), anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ACE inhibitörü) ve statinler hakkında pediyatrik popülasyondaki güvenlik kaygıları nedeniyle yeterli kanıt bulunmamaktadır [2].

**Tablo 2. NAYKH ve NASH tedavisinde kullanılan yöntem ve farmakolojik ajanlar**

<b>Tedavi</b>	<b>Tanım</b>	<b>Mekanizma</b>
Kilo kaybı	Cerrahi Anti-obezite ilaçları	Kısıtlayıcı veya malabsorbtiif prosedürler nörotransmitter re-uptake inhibitörü şeklinde etki gösterir
İnsülin duyarlaştırıcı	Tiazolidinedion Metformin	Karaciğerde lipid depolanmasını azaltır, adiponektin seviyesini artırır AMPK (adenozin monofospat kinaz) aktivitesini artırır, lipojenizle ilişkili genleri suprese eder
	Anjiyotensin reseptör blokörü	Karaciğerde stellat hücreleri baskılar
	Egzedin 4	B hücre membranında voltaj kapılı kalsiyum kanallarını açarak insülin salınımını stimüle eder
	Aquaporinler	Hepatositlerdeki lipit trafiğini düzenler
Lipit düşürücü	Statinler	HMG-CoA redüktaz enzimini ve karaciğerde kolesterol sentezini inhibe eder
	Ursodeoksikolik asit	Safra akımını artırarak transaminazları düşürür
Antioksidanlar	Vitamin E Betain	Transaminazları, GGT ve adipositokinleri azaltır Transaminazları düşürür, iyi tolere edilen, güvenli ve ucuz bir ajandır
	Pentoksifilin	NASH’da insülin direnci ve transaminazları düşürür
Diğerleri	Probiyotikler	İntestinal mikroflora dengesini sağlar, inflamatuvar ürünleri azaltır
	Endokanabinoid	Profibrojenik ve antifibrojenik etkilerin ikisini birden uyarır



### **2.2.6.1. Yaşam tarzı değişiklikleri**

Obezite, insülin direnci ve NAYKH arasındaki güçlü ilişki göz önüne alındığında diyet değişikliği önerisiyle başarılan kilo kaybı ve fiziksel aktivitenin artırılması NAYKH olan çocuklarda ve adölesanlarda iyi bir tedavi ve önleme yaklaşımı olacaktır. Çocukluk çağı obezitesi gözden kaçırıldığında NAYKH için tarama şansı da kaçırılacaktır. Yaşam tarzı ve diyet değişiklikleri kilo kaybı sağlamasa dahi vücut yağ depolarını değiştirecek, karaciğer enzimlerini, sitokinleri ve NASH histolojisini normalize edecektir [3, 97]. Ketojenik, hipoenerjik, omega 3 poli-ansatüre yağ asitlerinden zengin veya kısa zincirli oligofruktozdan zengin diyetlerin başarılı olduğuna dair in vitro küçük çaplı çalışmalar mevcuttur [95, 98, 99].

Egzersiz sırasında görülen kas kasmaları glukoz transporter 4 translayon faktörlerini uyarır, miyositlerde yağ asidi ve trigliserid birikimini azaltır, insülin hassasiyetini artırır. Bu etkiler egzersizin süresi ve yoğunluğuyla ilişkilidir. İzole fiziksel egzersizin kilo kaybı sağlamada etkin olduğu gösterilememesine rağmen uygun yoğunluktaki fiziksel aktivite vücut bileşimlerini değiştirebilir, kilo idamesine katkı sağlayabilir [100]. Sonuç olarak fiziksel aktivite uzadıkça vücut ağırlığı üzerindeki etki artmaktadır. Randomize kontrollü bir çalışmada aşırı kilolu çocuklarda 155-180 dk/hafta aerobik egzersizin vücut yağ yüzdesini azalttığı bildirilmiştir [101].

### **2.2.6.2. Obezite cerrahileri**

Morbid obez bireylerde NAYKH tedavisi bariyatrik cerrahiyi içermektedir. Cerrahi yapılan adölesanlarda obeziteyle ilişkili komplikasyonların gerilediği bildirilmiştir [102]. Ancak çok nadiren hızlı kilo kaybının inflamasyon, fibrozis ve steatozu alevlendirebileceği de unutulmamalıdır [103]. Bariyatrik cerrahi yapılan hastaların kontrol biyopsilerinde major düzelmeler bildirilmiştir [104]. Bu amaçla uygulanan diğer bir yöntem olan Roux-en-Y gastrik bypass cerrahisi ile de kilo kaybı sağlanabilmektedir. Bypass sonrası kısa süre içerisinde patolojik NAYKH bulgularının gerilediği ifade edilmiştir [105].

### **2.2.6.3. Farmakolojik tedaviler**

NAYKH'nın terapötik alanı diyabet, obezite veya dislipidemi gibi metabolik sendrom özelliklerini hedeflemektedir. NAYKH ve NASH tedavisinde kullanılan farmakolojik

tedaviler insülin duyarlaştırıcı ve karaciğer koruyucu ajanlar şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. İnsülin duyarlaştırıcı ajanlar içerisinde metformin ve tiazolidinedionlar, karaciğer koruyucu ajanlar içerisinde antioksidanlar, pentoksifilin, ursodeoksikolik asit, betain ve L-karnitin incelenmiştir.

Metformin hakkında insülin direncini azalttığı, biyokimyasal ve histolojik NASH bulgularını geriletmediği ifade edilmiştir [106]. 2010 yılında tiazolidinedionlar hakkında yapılan iki randomize çalışmada NASH hastalarında steatozu iyileştirdiği, fibrozise ise etkisiz olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda rosiglitazonun kardiyovasküler riski dikkat çekmiştir. Bunun haricinde sıvı retansiyonu, kilo alımı ve osteoporoz gibi yan etkiler görülmüştür [107, 108].

Vitamin E oksidatif stresi azaltarak anti-oksidan etki göstermektedir. Oksidatif stres ise NASH patogeneğinde anahtar rol oynamaktadır. Obez çocukların yaklaşık yarısında vitamin E metaboliti olan alfa-karoten ve alfa-tokoferol seviyesinin düşük olduğu anlaşılmıştır. Bunun üzerine antioksidan özelliği olan vitamin E'nin çocukluk çağı NAYKH'ında kullanılabileceğine ilişkin pilot çalışmalar yapılmıştır [109]. 2-4 ay boyunca 400-1200 ünite/gün kullanıldığında obez çocuklarda serum ALT seviyelerini düşürdüğü belirtilmiştir [110]. 2012 yılında yapılan TONIC (Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children) çalışmasında ise pediatrik NAYKH hastalarında vitamin E veya metformin plaseboya karşı üstün bulunmamıştır [111]. Bununla birlikte uzun süreli yüksek doz vitamin E kullanımının (>400 IU/gün) mortaliteyi arttırabileceği belirtilmiştir [112]. Diğer bir ajan olan TNF- $\alpha$ 'yı inhibe ederek etki gösteren pentoksifilin küçük pilot çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiştir [54]. Safra tuzları aracılı mitokondriyal hasarı azaltarak sitoprotektif etki gösteren ursodiol ise çeşitli kolestatik karaciğer hastalıklarında yararlı olmasına rağmen NASH hastalığında etkisiz bulunmuştur [54].

Betain, metil donörü şeklinde görev yaparak karaciğeri lipid depolanmasından koruyucu etki göstermektedir. L-karnitin ise yağ asidi transportasyonu ve oksidasyonunu düzenlemektedir. Telmisartan ise anjiyotensin reseptör antagonistidir. Randomize kontrollü çalışmalarda betain, L-karnitin ve telmisartanın NAYKH'nda faydalı olduğu bildirilmiştir. Ancak sadece bu çalışmalarla kesin bir sonuca varılması erken olacaktır [54].

NAYKH mevcut tedavi stratejileri kilo kaybı, yaşam tarzı değişiklikleri gibi metabolik risk faktörlerini elimine etmeye odaklanmıştır. Bu çalışmaların çoğu pilot çalışmalarda etkin bulunmuştur ancak, karaciğer histolojisi ile karaciğer enzimleri arasında her zaman bir ilişki olmadığı için bu çalışmaların sonuçları dikkatli yorumlanmalıdır.

Son yıllarda NAYKH patogenezinde intestinal mikrobiyota değişimi gibi olası etiyolojik yollar üzerinde durulmuştur. Yağlı karaciğer hastalığı patogenezinde intestinal bakteriyel çoğalmanın etkisi göz önünde bulundurulduğunda, intestinal mikrobiyotanın değiştirilmesi ile steatohepatitin önlenebileceği düşünölmektedir. Bu amaçla kullanılan prebiyotik ve probiyotiklerin yağlı karaciğer hastalıklarında kullanımlarını değerlendiren ön çalışmaların sonuçları yüz güldürücüdür ve hızla devam etmektedir.

## **2.3. SİNBİYOTİKLER**

Hipokrat “Gıda senin tıbbın, tıp senin gıdan olsun” diyerek ilk defa gıdaların sağlık üzerindeki etkisine dikkat çekmiştir. Sonrasında Eli Metchnikoff tarafından ilk defa gastrointestinal sistemdeki bakterilerin yararlı etkileri gösterilmiş ve bu başarı 1908’de Nobel ödölüyüyle sonuçlanmıştır. Bu aşamadan sonra gıda ve besinlerin kronik hastalıkları önleme veya sağlık üzerindeki etkileri daha detaylı inceleme altına alınmıştır. Bu alandaki araştırmalar farklı yararları olan çok çeşitli gıda isimlendirmelerini beraberinde getirmiştir. Özellikle de üzerinde en çok durulan “fonksiyonel gıdalar” olmuştur. Fonksiyonel gıda terimi yaşam için elzem olmasının yanında aynı zamanda çeşitli hastalıklar için risk faktörlerini azaltan, çeşitli yaşamsal fonksiyonları destekleme yeteneği olan besinler için kullanılmaktadır. Araştırmaların derinleştirilmesiyle önce probiyotik, sonrasında prebiyotik ve sinbiyotikler tanımlanmıştır. Buna göre probiyotikler; yeterli miktarda alındığında konağın sağlığına yararlı etkileri olan canlı organizmalar; prebiyotikler, mikrobiyotanın modölasyonu aracılığıyla konağın sağlığına olumlu etki gösteren canlı olmayan gıda içeriği; sinbiyotikler ise probiyotiklerin canlılık süresini uzatmak için prebiyotiklerle birlikte kullanılmasını tanımlamaktadır [113].

### **2.3.1. Probiyotikler**

Probiyotik terimi Eski Yunanca’da “yaşam için” kelimesinden türetilmiştir ve konak üzerinde yararlı etkileri olan canlı patojenik olmayan organizmaları tanımlamak için kullanılmaktadır. Probiyotik terimi ilk defa Vergin tarafından antibiyotiklerin bağırsak mikroflorası üzerindeki etkisinin değerlendirdiği çalışmada kullanılmıştır. Vergin’in gözlemine göre “Probiyotika” bağırsak mikroflorasına olumlu etki göstermekteydi. Probiyotik terimi sonrasında Lilly ve

Stillwell tarafından “bir mikroorganizma tarafından üretilen ve başka bir organizmasının büyümesini uyaran ürün” şeklinde tanımlanmıştır. Sonrasında ise Fuller tarafından “Yendiğinde konağın sağlığı veya fizyolojisi üzerinde olumlu bir etkisi olan patojenik olmayan mikroorganizmalar” şeklinde revize edilmiştir. En son tanımlama ise Food and Drug Administration (FDA) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ortak kararı ile “yeterli miktarda alındığında konağın sağlığına yararlı etkileri olan canlı organizmalar” şeklindedir [113].

Sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar içerisinde *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, belirli enterokoklar, özellikle de *Enterococcus faecium* ve *Saccharomyces boulardii* yer almaktadır. Probiyotikler hakkındaki çalışmalar özellikle de *Lactobacilli*, son yıllarda büyük hız kazanmıştır. Bu probiyotikler gıdalara özellikle de fermente süt ürünlerine tek başına veya kombinasyonlar halinde eklenmektedir. Konu hakkındaki araştırmalar hızla devam etmekte, yeni suşlar ve yeni nesil probiyotikler üretilmektedir.

**Tablo 3. Sık tercih edilen probiyotik suşları [114]**

<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
<i>Lactobacillus plantarum PL02</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Bifidobacterium longum PL03</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Bacillus clausii</i>
<i>Escherichia coli</i>

Probiyotik, tek suş veya suşların karışımı şeklinde olabilmektedir. Örneğin VSL3 adlı probiyotikte 8 farklı probiyotik suşu yer almaktadır. Probiyotiklerin etkileri suşlara spesifik olup genellenebilir değildir. Tek çeşit suştan oluşan bir probiyotik bireysel veya kombinasyon şeklinde kullanıldığında farklı etkiler oluşturabilir. Aynı zamanda probiyotiklerin etkileri farklı hasta gruplarında da farklılık gösterir [115].

İdeal bir probiyotiğin bazı özelliklere sahip olması gerektiği hakkında uzlaşa sağlanmıştır. Bu özellikler içerisinde patojenik olmaması, laktik asit üretimi, genetik olarak stabil olması, anti-genotoksik özellikte olması, asit veya safra toleransı, bağırsağa etkili adezyon göstermesi ve kısa üretim süresidir. Önemin giderek artması nedeniyle Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) ve DSÖ probiyotiklerin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere tasarlanmış rehberler yayınlamıştır. Bu rehberlere göre probiyotiklerin tanımlanması ve değerlendirilmesinde şu maddeler takip edilmelidir:

1. Suşun tanımlanması
2. Güvenlik ve probiyotik özellikleri için suşların fonksiyonel şekilde tanımlanması
3. İnsan çalışmalarında olumlu sağlık etkilerinin doğrulanması
4. Tüm raf ömrü boyunca etkinlik iddiası ve içeriğin yanıtıcı olmadan doğru şekilde etiketlenmesi

Bununla birlikte probiyotiklerin canlılığını etkileyen bazı faktörler tanımlanmıştır. Bunlar içerisinde pH, organik asitler, oksijen, nem ve stres gibi faktörler yer almaktadır. Probiyotikleri bu faktörlerden korumak amacıyla prebiyotiklerle birlikte kullanımlarının daha faydalı olacağı üzerinde durulmaktadır.

### **2.3.2. Prebiyotikler**

Prebiyotikler kolondaki bazı mikroorganizmaların (özellikle de laktobacilius ve bifidobakteri) aktivitesini ve/veya büyümesini uyararak konağın sağlığına olumlu etki gösteren sindirilmeyen gıda içeriğinden oluşmaktadır. İdeal bir prebiyotik midedeki asit reaksiyonlarına dirençli olmalı, üst gastrointestinal sistemde absorsiyona uğramamalı ve intestinal mikroflora tarafından kolayca fermente edilmelidir [116].

FAO/DSÖ prebiyotikleri; “mikrobiyotanın modülasyonu aracılığıyla konağın sağlığına olumlu etki gösteren canlı olmayan gıda içeriği” şeklinde tanımlamaktadır. Prebiyotikler;

kaynakları, fermentasyon profilleri ve sağlık etkilerinin görülmesi için gereken dozajları tam olarak bilinmeyen çeşitli karbonhidrat içeriklerinden oluşur. Prebiyotik kaynakları içerisinde anne sütü, soya fasülyesi, inülin kaynakları (Kudüs enginarı, hindibaa kökü), ham yulaf, rafine edilmemiş buğday ve arpa, yacon, sindirilemeyen karbonhidratlar ve oligosakkaritler yer almaktadır. Ancak bu prebiyotikler içerisinde sadece bifidojenik, sindirilmeyen oligosakkaritler (özellikle de inülin ve hidrolize uğramış ürünleri olan oligofruktoz ve galakto-oligosakkaritler) prebiyotik sınıflandırmasındaki tüm kriterleri karşılamaktadır [117]. İnülin ve pektin gibi prebiyotiklerin diyare süresini ve sıklığını azaltma, inflamasyonu baskılama, bağırsak hastalıklarına bağlı semptomları azaltma ve kolon kanserinden koruma gibi çeşitli yararları gösterilmiştir. Aynı zamanda obezitenin önlenmesi, kilo kaybının sağlanması, kardiyovasküler risk faktörlerinin azaltılması, mineral alımı ve biyoyararlanımının artmasında görevlidir [113].

Son zamanlarda hem prebiyotik hem de probiyotik şeklinde etki gösteren çeşitli bitki ve bakteri kaynakları tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları Tablo 4'te özetlenmiştir [118]. Hakkındaki araştırmaların yoğunluğu dikkate alındığında bu listelerin uzayacağı düşünülmektedir.

**Tablo 4. Yeni prebiyotik ve probiyotikler**

Prebiyotik	Kaynak	Probiyotik
Düşük molekül ağırlıklı bir polisakkarit	Yosun agar ve alginat Gelidium CC2253	F. prausnitzii
Ulvan	Yeşil algler-Ulvarigida	
B-glukanlar	Pleurotus türü mantarlar	
İnülin tipi fruktanlar	Geleneksel Çin tıbbında kullanılan Morinda Officinalis veya Hint dut kökleri	L. plantarum
Oligosakkarit	Beyaz ve kırmızı etli pitayalar (dragon fruit)	
Oligosakkarit	Yacon kökü	

### **2.3.3. Sinbiyotikler**

Gibson tarafından prebiyotik kavramının ortaya atılmasından sonra prebiyotiklerin probiyotiklerle birlikte kullanıldığında daha etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu bileşime sinbiyotik adı verilmektedir. Sinbiyotik terimi sinbiyozise işaret etmesi nedeniyle bu terim prebiyotik ürünlerin probiyotik organizmalara olumlu etki yapmasında tercih edilmektedir [119]. Sinbiyotikler probiyotiklerin sağkalım açısından yaşadığı zorlukların üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Akılcı sinbiyotik kullanımı probiyotik bakterinin üst gastrointestinal sistem geçişi sırasındaki sağkalımını uzatmayı temel almaktadır. Kolona etkili bir implantasyon ve probiyotik çoğalmasını uyaran bir etkiyle intestinal hemostaz korunmaktadır.

Sinbiyotik formülasyonları içerisinde kullanılan probiyotik suşları içerisinde Lactobacillus, Bifidobacteria türleri, S. Boulardii, B. Coagulans'lar yer almaktadır. Benzer şekilde sinbiyotiklerin içerisinde sık kullanılan prebiyotikler arasında fruktooligosakkarid (FOS), ksilooligosakkarid (XOS), galaktooligosakkarid (GOS), inülin ve doğal kaynaklardan elde edilen hindibaa ve yacon kökü yer almaktadır. Sinbiyotiklerin yararlı etkileri şu şekilde özetlenebilir [120];

1. Laktobasil ve bifidobakteri sayısında artış ve bağırsak mikroflorasının dengelenmesi
2. Siroz hastalarında karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi
3. İmmüniteyi düzenleyici etki
4. Cerrahi hastalarda bakteriyel translokasyonların önlenmesi ve nazokomiyal enfeksiyon sıklığının azalması

### **2.3.4. Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin sağlık üzerindeki etkileri**

Probiyotiklerin en önemli ve en çok gösterilen yararlı etkileri içerisinde safra tuzu konjugasyonunda değişim, diyare ve konstipasyonun önlenmesi, anti-bakteriyel aktivitenin desteklenmesi ve anti-inflamatuar etki yer almaktadır. Bunlara ek olarak aynı zamanda besinlerin sentezine katkıda bulunmakta ve biyoyararlanımını arttırmaktadır. Yakın bir zamanda alerji semptomlarının hafifletilmesi, AIDS, solunum ve idrar yolu enfeksiyonlarını azaltılmasında da etkin bulunmuştur. Daha küçük çaplı çalışmalarda yaşlanma, yorgunluk, otizm spektrum bozuklukları, osteoporoz, obezite ve tip 2 diyabette de etkin olduğu bildirilmiştir [113].

Probiyotiklerin sayılan bu yararlı etkilerine aracılık eden mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir:

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bakteriosin, organik asit vb gibi inhibitör maddelerin üretimi
- Patojenik bakterilerin adezyon bölgelerinin bloğu
- Patojenik bakterilerle besinler için yarışma
- Toksinlerin yıkımı ve toksin reseptörlerinin bloklanması
- İmmün yanıtların düzenlenmesi

### **2.3.5. Bağırsak-karaciğer aksı**

Bağırsak-karaciğer aksı terimi ilk defa Volta tarafından kullanılmıştır. Volta karaciğer sirozunda gıda antijenleri ve intestinal mikroorganizmalara karşı gelişen IgA antikorları üzerine bu tanımlamayı yapmıştır [121]. Sonrasında yapılan çalışmalarda hem sağlık hem de hastalık durumlarında bu iki organın yakın bağlantılı olduğuna çok sayıda atıf yapılmıştır. Bu ilişki içerisinde bağırsak mikrobiyotası, intestinal bariyer fonksiyonu, mukozal doğal immün yanıt, antijen trafiği, karaciğer hasarı ve metabolik bozuklukların etkili olduğu anlaşılmıştır.

Obezite ve NAYKH'nın bağırsak bariyer bütünlüğü, metabolik endotoksemi ve TLR-aracılı düşük grade inflamasyonla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir [122, 123]. Bağırsak bariyeri luminal bakterilerin translokasyonuna ve bakterilerin oluşturduğu ürün ve toksinlerin kana karışmasına karşı duran bir bariyerdir. Kompleks bir yapısı olan bağırsak bariyeri intestinal sıkı bağlantılarla bağlı olan epitelyal hücreler, mukus tabakası ve Paneth hücreleri tarafından üretilen çeşitli anti-bakteriyel peptidlerden oluşan antimikrobiyal defans sisteminden oluşmaktadır. Diyetle alınan yağ ve fruktoz içeriği gibi çeşitli faktörler bu kompleks yapıyı değiştirerek bağırsağın bakteri ve lipopolisakkarid yapısındaki bakteri ürünlerine (endotoksin) karşı geçirgenliğinde artışa neden olabilmektedir. Mevcut kanıtlar diyet kaynaklı bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak bariyerindeki değişimin kandaki lipopolisakkarid seviyesindeki artıştan sorumlu olduğuna işaret etmektedir [124, 125]. Zonula okludens-1 ve okludin gibi intestinal sıkı bağlantı proteinlerindeki değişim bağırsak permeabilitesine katkı sağlayan major moleküler mekanizmadır. Yüksek yağ içerikli diyet intestinal inflamasyonu uyurabilmekte [126], sonrasında sırasıyla sıkı bağlantı proteinlerini değiştirmekte ve intestinal permeabiliteyi arttırmaktadır [127]. Bunun haricinde yüksek yağlı diyetle obezitenin tekinlendiği farelerde endokanabinoid sistem aktivasyonu bağırsak permeabilitesindeki artışla



ilişkilendirilmiştir. Aslında bu durum bağırsak karaciğer aksından çok bağırsak-beyin-karaciğer aksı varlığını düşündürmektedir [128, 129].

Metabolik endotoksemi, obezite ve NAYKH patogenezinde diyetle ilişkili faktörlerin etkisi olduğu hakkındaki kanıtlar giderek artmaktadır. Cani ve ark'ı tarafından yapılan hayvan çalışmalarında yüksek yağlı diyetle beslenmiş obez ve NAYKH olan farelerde endotokseminin artış gösterdiği bildirilmiştir [122, 130]. Diğer bir hayvan çalışmasında yüksek sükröz ve yağ içeriğiyle beslenme lipopolisakkarid seviyeleri ve hepatik yağ birikiminde artış, intestinal sıkı bağlantı protein ekspresyonunda azalma ile sonuçlanmıştır [131]. Bu hayvanlarda sonrasında NAYKH gelişmiştir. Diyet kaynaklı endotoksemi sadece yüksek yağ içerikli diyetle olmamakta, aynı zamanda fruktoz ağırlıklı diyetle de görülebilmektedir [132, 133]. Bergheim ve ark'ı fruktoz kaynaklı deneysel NAYKH ve endotoksemi geliştiğini bildirmiştir. Fruktozla beslenen bu farelerde antibiyotik uygulaması ile endotoksemi ve hepatik lipit depolanmasının azaldığı görülmüştür. Bu bulgular fazla fruktoz tüketiminin sadece aşırı beslenme ile değil, aynı zamanda intestinal permeabilite ve bağırsak mikrobiyotasını değişime uğratarak NAYKH'a katkı sağladığına işaret etmektedir [132]. Diğer taraftan sinbiyotik uygulaması ile bağırsak mikrobiyotası düzenlenerek fruktoz kaynaklı hepatik steatozun azaltıldığı bildirilmiştir [134, 135].

Bu konuda yapılmış klinik çalışmaların sonuçları hayvan çalışmalarını doğrulamaktadır. Steatohepatiti olan çocuklarda intestinal permeabilitenin sadece steatozu olan çocuklara kıyasla arttığı bildirilmiştir [136]. Miele ve ark'ı NAYKH'ında intestinal permeabilite artışının nedeni olarak intestinal sıkı bağlantıların bozulmasını suçlamıştır [137]. Yakın bir zamanda yayımlanan başka bir çalışmada NAYKH olan adölesanlarda fruktoz içerikli içeceklerle beslenme sonrasında endotoksin seviyesinin arttığı gösterilerek diyet kaynaklı faktörlerin bağırsak bariyer bütünlüğünde önemli olduğu vurgulanmıştır [138].

Sağlıklı bireylerde diyetin metabolik endotoksemiye arttırması önemli bir mekanizmadır. Bir ay süresince yüksek yağ ve şeker içerikli besinlerle beslenme, düşük yağlı, meyve, sebze, tahıl, kümes hayvanları ve ürünleri ve balık içerikli beslenmeye kıyasla sağlıklı bireylerde endotoksemiye arttırmaktadır [139]. Bu duruma neden olan mekanizma için şilomikronlarla lipopolisakkaritlerin daha fazla absorbe olması sorumlu tutulmaktadır [140].

NAYKH hastalığı metabolik sendromun karaciğer bulgusu olup, hem çocuklarda hem de yetişkinlerde kronik karaciğer hastalıklarının önde gelen nedenidir. Basit bir steatozdan steatohepatite kadar uzanan bir tabloyu kapsayan NAYKH'ında bağırsak-karaciğer aksındaki

mekanizmanın tedavide kullanılabileceği düşünülmüştür. Obez ve aşırı kilolu çocuklarda Gram negatif suşlar ve enterobakterilerin NAYKH'nın bir göstergesi olan ALT seviyeleriyle ters ilişkili olması bu düşünceyi desteklemiştir [141].

### **2.3.6. Bağırsak mikrobiyotası ve NAYKH**

Bağırsak mikrobiyotası kompleks bir ekosistemdir. Yakın zamanda yapılan ve modern metagenomik teknolojileri kullanan çalışmalar filumda en çok yer kaplayan bakterilerin Bacteroidetes ve Firmicutes türleri olduğunu bildirmektedir [142]. Bağırsak mikrobiyotasında  $10^{13}$ - $10^{14}$  mikrobiyal hücre bulunmaktadır. Bu sayı insan genomundaki gen sayısından 100 kat daha fazladır [143]. Kapsamlı moleküler filogenetik çalışmalarla intestinal mikrobiyotanın sağlıklı bağırsak boyunca bölgesel dağılım gösterdiğini anlaşılmıştır [144]. Oldukça kompleks olan bu mikrobiyotanın organizmayla uyum içinde yaşamasında karaciğerin önemli fonksiyonları vardır. Karaciğer konak ve bağırsaktaki bakteriler arasında mutualistik bir yaşama aracılık eden güvenlik duvarı şeklinde görev yapmaktadır [145].

Son on yıl içerisinde hem hayvanlarda hem de insanlarda intestinal mikrobiyotanın obezite ve obezite ilişkili NAYKH patogenezinde kritik öneme sahip olduğu anlaşılmıştır [146, 147]. Bağırsak mikrobiyotası olmayan farelerin diyet kaynaklı obezite, steatoz ve insülin direncine dirençli olduğu görülmüştür [148, 149]. Benzer şekilde Turnbaugh ve ark'ı tarafından normal farelerin çekumundan toplanan bağırsak mikrobiyotasının başka bir farede kolonize edilmesiyle insülin direncinde artışın yanı sıra, vücut yağ içeriğinde %60, hepatik trigliserid içeriğinde iki kat artış görülmüştür. Diğer dikkat çekici bir bulgu ise donör farelerden transplante edilen bağırsak mikrobiyotası ile sadece obezite değil, aynı zamanda NAYKH'nın da geçiş göstermesidir [150, 151].

Bağırsaktaki bakteriler NAYKH'nın NASH'a progrese olmasını hızlandırabilmektedir. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada metiyonin-kolinden fakir diyetle beslenen farelerde parabacterides türleri artış göstermiş ve bağırsak homeostazı ve mikrobiyotada görevli olan inflamazom eksikliği nedeniyle NASH fenotipi geliştiği görülmüştür [152]. İnflamazom eksikliği nedeniyle hepatik portal dolaşım aracılığıyla karaciğere daha fazla lipopolisakkarit ve bakteriyel DNA geçişi olmaktadır. Bu bakteriyel ürünler TLR4 ve TLR9'u stimüle ederek hepatik TNF- $\alpha$  ekspresyonunu artırarak NASH progresyonuna neden olmaktadır.

NAYKH patogenezinde önemli olan bir diğer nokta bağırsak mikrobiyotasının değişimidir. Zhu ve ark'ı sağlıklı bireylerde, obez ve NASH hastalarında intestinal mikrobiyal çeşitliliğin

farklı olduğuna değinmiştir. Proteobacteria/Enterobacteriaceae/Escherichia sayı ve oranları NASH hastalarında obez ve sağlıklı bireylere kıyasla artış göstermektedir [153]. Escherichia (alkol üreten bir bakteri) sayısının artması aynı zamanda kan alkol seviyesindeki artışla paralel bulunmuştur. Bu sonuçlar NASH patogenezinde yeni mekanizmaları aydınlatılmasına yardım etmektedir. Alkol üreten bakterilerden zengin bir bağırsak mikrobiyotası sonucunda intestinal bağlantılar zarar görmekte, karaciğerin oksidatif stresi artarak karaciğer inflamasyonu tetiklenmektedir [1]. NASH’de vücut kitle endeksi ve diyetle alınan kalori içeriğinden bağımsız olarak Bacteroidetes sayısının azaldığı bildirilmiştir [154]. Bacteroidetes ve steatohepatit arasındaki bu ters ilişkide azalan Bacteroidetes türlerinin yerine diğer türlerin doldurması sorumlu tutulmaktadır. Fekal Bacteroidetes sayısında %20 azalmanın diyetle alınan enerjide yaklaşık 150 kcal artışa neden olduğunu gösteren bir diğer çalışmayla bu bulgular doğrulanmıştır [155].

### **2.3.7. Yağlı karaciğer hastalığı ve prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotikler**

Hem hayvan modellerinde hem de klinik çalışmalarda probiyotiklerin NAYKH progresyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir. Bir hayvan çalışmasında ob/ob farelerde 4 hafta boyunca VSL#3 karışımı kullanıldığında (Streptococcus, Bifidobacterium, Lactobacillus) karaciğerde total yağ asidi içeriği ve karaciğer inflamasyonun azaldığı, hepatik insülin direncinin gerilediği gösterilmiştir [156]. Diğer bir çalışmada probiyotik tedavisiyle Nükleer Faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) seviyelerinde azalmayla birlikte pro-inflamatuar sitokinlerin azaldığı bildirilmiştir [157]. Yüksek yağlı diyetle deneysel olarak NAYKH oluşturulduğu diğer bir çalışmada VSL#3 takviyesiyle kontrol grubuna kıyasla lipit peroksidasyon markerları, TNF- $\alpha$ , iNOS ve siklooksijenaz 2 ekspresyonunda azalma izlenmiştir [158]. Bunların yanında VSL#3 ile karaciğerde ve adipoz dokuda insülin direncinde azalma, NASH ve ateroskleroz gelişiminde yavaşlama izlenmiştir. Yakın bir zamanda yapılan diğer bir çalışmada yüksek yağlı diyetle oluşturulan NASH hayvan modelinde Bifidobacterium takviyesiyle karaciğerde yağ birikimi azaltılmıştır. Bifidobacterium grubunda histolojik olarak hepatik nodüllerin normal olduğu mikroveziküler steatoz izlenirken kontrol grubunda hepatik lobül yapısının bozulduğu ve mikro- makroveziküler steatoz izlenmiştir. Probiyotiklerin karaciğer fibrozisine etkisini değerlendiren bir çalışmada ise kolinden fakir diyetle oluşturulan NASH modelinde VSL#3’ün karaciğer fibrozisini yavaşlattığı gösterilmiştir [159].

Prebiyotiklerin NAYKH’daki etkileri de probiyotiklere benzer şekilde olumlu yöndedir. Bağırsak mikrobiyotası aktivite ve bileşiminin değiştirilmesi kilo kaybı ve doymayı

tetikleyerek NAYKH'nı geriletir. Farelerde prebiyotik liflerle bağırsakta Firmicutes ve Bacteroidetes türlerinde artış izlenmiştir. Bunun sonucunda karaciğerde kolesterol ve trigliserit depolanmasında azalma olmuştur. Laktobasil, Bifidobakteri ve Gram + bakteri büyümesine yardımcı olan laktulozun endotoksemiden koruyucu olduğu bildirilmiştir. Prebiyotikler hakkında kanıtlar Bifidobakteri seviyelerini arttırdığı, böylece lipopolisakkarit ve adipoz doku oluşumunu azalttığını destekler [160].

Klinik çalışmaların sonuçları hayvan çalışmalarıyla örtüşmektedir. 2-3 ay boyunca VSL#3 ile tedavi edilen hastalarda karaciğer enzimleri, TNF- $\alpha$  ve oksidatif stres belirteçlerinde azalma izlenmiştir [161]. Vajro ve ark'ı tarafından 22 obez çocuk üzerinde yapılan diğer bir randomize çalışmada da benzer şekilde *Lactobacillus rhamnosus* suşuyla 8 haftalık tedavi sonrasında kontrol grubuna kıyasla ALT seviyelerinde belirgin azalma izlenmiştir [162]. Bu çalışmaların sonuçları NAYKH tedavisinde probiyotiklerin önemine işaret etmektedir. Ancak Cochrane meta-analizinde daha büyük randomize çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir [163].

2014 yılında probiyotik ve sinbiyotiklerin NAYKH tedavisindeki yerini değerlendiren sistematik bir derlemede üç randomize çalışmaya ulaşılmıştır. Bu çalışmalardan birincisi olan, Malaquarnera ve ark'ı tarafından yapılan randomize kontrollü çalışmada, sinbiyotik tedavisiyle (Bifidobakteri + frukto-oligosakkarit) NASH hastaları, plasebo ve yaşam stili değişiklikleri ile tedavi edilen kontrol grubuyla karşılaştırılmış. Aller ve ark'ı tarafından yapılan çalışmada karaciğer biyopsisiyle tanı alan NAYKH tedavisinde laktobasilus bulgaris ve streptokokus termofilus kullanıldığında tedavi grubunda plasebo grubuna kıyasla TNF- $\alpha$ , CRP, serum ALT, HOMA-IR ve serum endotoksin seviyelerinde anlamlı azalma izlenmiştir [164]. Son olarak 2013 yılında Wong ve ark'ının yaptığı randomize kontrollü çalışmada ise *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Bifidobacterium bifidum* kullanılarak hazırlanan probiyotik tedavisi sonrasında biyopsiyle tanı alan NASH hastalarında proton manyetik rezonans spektroskopisi ile karaciğer trigliserid içeriği değerlendirilmiştir. 6 aylık tedavi sonrasında probiyotik grubunda trigliserid içeriğinde belirgin azalma izlenmiştir [165].

### **3.GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 10.12.2015 tarihinde (karar no: 15/66) onay alınarak Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Denekler**

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvar'ından temin edilen 200-300 gr ağırlığında 2-3 aylık, 18 (12 + 6) adet Wistar Albino türü erkek rat kullanıldı. Ratların bakımı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Araştırma ve Uygulama Merkezinin hayvan laboratuvarında yapıldı. Denekler  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  oda ısısında,  $\%55 \pm 10$  nemde, 12 saatlik sabit aydınlık ve karanlık siklusunda standart tel kafeslerde tutuldu.

#### **3.2. Deney Protokolü**

Ratlar her grupta 6 olacak şekilde iki gruba randomize edildi (6+3 kontrol grubu, 6+3 sinbiyotik grubu). Her iki gruba iki ay süresince yüksek ketoasidojenik, yüksek yağ içerikli diyet (Altromin® C1063 yağlı karaciğer diyeti, Exclusivet, Lage, Almanya) verilerek deneysel hepatostetoz oluşturuldu. Ratların yağlı karaciğer diyeti öncesinde ağırlıkları ölçüldü, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) enzim düzeyleri çalışıldı. Her iki gruba da 2 ay süresince eşit miktarda (izokalorik) yağlı karaciğer diyeti uygulandı. 2.ayda ratların ağırlıkları, ALT ve AST düzeyleri tekrar değerlendirildi. 2. ayda aynı zamanda karaciğer ultrasonografisiyle hepatostetoz varlığı doğrulandı ve hepatostetoz derecelendirildi. Yağlı karaciğer diyeti sonrasında kontrol grubuna tedavi verilmedi. Sinbiyotik grubuna 15 gün sinbiyotik uygulandı. Tedavi sonrasında her iki grubun tekrar ALT ve AST düzeyleri ölçüldü. Sonrasında hayvanlar usulüne uygun sakrifiye edildi. Karaciğerleri çıkarılarak aynı deneyimli patoloj tarafından histopatolojik analizleri yapıldı.

## Gruplar

**Kontrol grubu (6+3):** Çalışma başlangıcında ALT ve AST düzeyleri, vücut ağırlıkları ölçüldü. Yüksek ketoasidojenik, yüksek yağ içerikli diyet ile 2 ay beslenme sonrasında gelişen hepatosteatoz ultrasonografi ve karaciğer enzimleri (AST-ALT) ile saptandıktan sonra tekrar ALT ve AST düzeyleri, vücut ağırlıkları ölçüldü. 15 gün müdahalede bulunulmadı ve normal diyetle beslendi. 15.günde karaciğer enzimleri (AST-ALT) ve vücut ağırlığı tekrar değerlendirildi. Takiben ratlar tekniğine uygun sakrifiye edilerek karaciğer dokularının histopatolojik analizleri yapıldı.

**Sinbiyotik grubu (6+3):** Çalışma başlangıcında ALT ve AST düzeyleri, vücut ağırlıkları ölçüldü. Yüksek ketoasidojenik, yüksek yağ içerikli diyet ile 2 ay beslenme sonrasında gelişen hepatosteatoz ultrasonografi ve karaciğer enzimleri (AST-ALT) ile saptandıktan sonra tekrar ALT ve AST düzeyleri, vücut ağırlıkları ölçüldü. 15 gün süresince normal diyetle beslenen ratlara sinbiyotik (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis ssp lactis* B94, fruktooligosakkarid  $1 \times 10^9$  CFU/gün) tedavisi uygulandı. 15.günde karaciğer enzimleri (AST-ALT) ve vücut ağırlıkları tekrar değerlendirildi. Takiben ratlar tekniğine uygun sakrifiye edilerek karaciğer dokularının histopatolojik analizleri yapıldı.

### 3.3. Karaciğer fonksiyon testlerinin ölçümü

Her iki grupta karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST) 0, 60 ve 75.günde değerlendirildi. İşlem öncesinde ratları kuyrukları traş edildi, antiseptikle silindi, venlerin dilate olması ve daha iyi görünmesi için 5-8 dk  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik suda ısıtıldı. Kan örnekleri ratların lateral kuyruk veninden alındı. Ölçümler Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında fotometrik yöntem kullanılarak, kan serumu santrifüj edilerek aynı cihazla gerçekleştirildi.

### 3.4. Vücut ağırlıklarının ölçümü

Tüm ratlar 0, 60 ve 75. günde aynı tartı ile ölçülerek ağırlık değişimleri kaydedildi.

### 3.5. Karaciğer ultrasonografisi

Ratlar %2.0-2.5 isofluran ile hafif düzeyde sedatize edildi. Spontan solunumu olan ratlar supin pozisyonundayken abdomen bölgeleri traşlandı ve ultrason jeli sürüldükten sonra yüksek frekanslı bir ultrason sistemiyle (Visüel Sonics Vevo 770, Toronto, Kanada) karaciğer incelemesi yapıldı. Tüm görüntülemeler parlaklık modunda (B modu) gerçekleştirildi. Akustik odak karaciğerin tam ortasına konumlandırıldı. Karaciğer transvers ve longitudinal planda değerlendirildi. Steatoz evrelemesi şu şekilde gerçekleştirildi [166]:

- Grade 1; Homojen karaciğer parankimi, karaciğer yüzeyi düzenli, ekojenite orta seviyede
- Grade 2; parankim ekojenitesi diffüz artış göstermekte, karaciğer diyafram ve küçük periferik damarları daha az görülüyor, karaciğer yüzeyi düzenli
- Grade 3; parankim ekojenitesi heterojen, karaciğer yüzeyi hafif düzensiz
- Grade 4; parankim ekojenitesi heterojen, alttaki rejeneratif nodüllerin varlığını yansıtan düzensiz ve nodüler karaciğer yüzeyi

### 3.6. Karaciğer histopatolojik incelemesi

Hayvanlar 75.günde sakrifiye edildikten sonra karaciğer dokuları çıkarıldı. %10'luk formalin solüsyonunda -80 °C derecede analizler için bekletildi. Mikroskopik inceleme sırasında, karaciğer dokularından ince kesitler alındıktan sonra hematoksilin eozin ile boyandı. Her bir kesitte rastgele 10 adet 200X ışık mikroskobu alanı değerlendirildi. İnflamasyon ve steatoz derecesi için 10 alanın ortalaması alındı. Mikroskopik incelemeler çalışma bilgilerine kör bırakılan deneyimli bir patolog tarafından gerçekleştirildi, incelemelerde hepatosteatoz derecesi, portal alanlarda lobüler inflamasyon varlığı, lobüllerde balonlaşma, mallory cisimciği değerlendirildi. İnflamasyon ve steatoz derecelendirmesinde Sundaram ve ark'ının [167] kullandığı yöntem dikkate alındı. Buna göre steatoz evrelemesi:

- Grade 0; steatoz yok
- Grade 1; karaciğer parankiminin %25'inden az steatoz

- Grade 2; parankimin %26-50'sinde steatoz
- Grade 3; parankimin %51-75'inde steatoz
- Grade 4; parankimin >%76'sında steatoz

Steatoz derecesi aynı zamanda yüzde olarak da ifade edildi.

İnflamasyon evrelemesi:

- Grade 0; inflamatuvar odak yok
- Grade 1; bir alanda (hpf) 1 inflamatuvar odak
- Grade 2; bir alanda 2-3 inflamatuvar odak
- Grade 3; bir alanda >4 inflamatuvar odak

Fibrozis sınıflamasında Nardone ve ark'ının [168] kullandığı yöntem tercih edildi:

- Grade 0; fibrozis yok
- Grade 1; ince izole septalar
- Grade 2; periportal fibrozis
- Grade 3; periportal ve intralobüler fibrotik septalar

### 3.7. İstatiksel değerlendirme

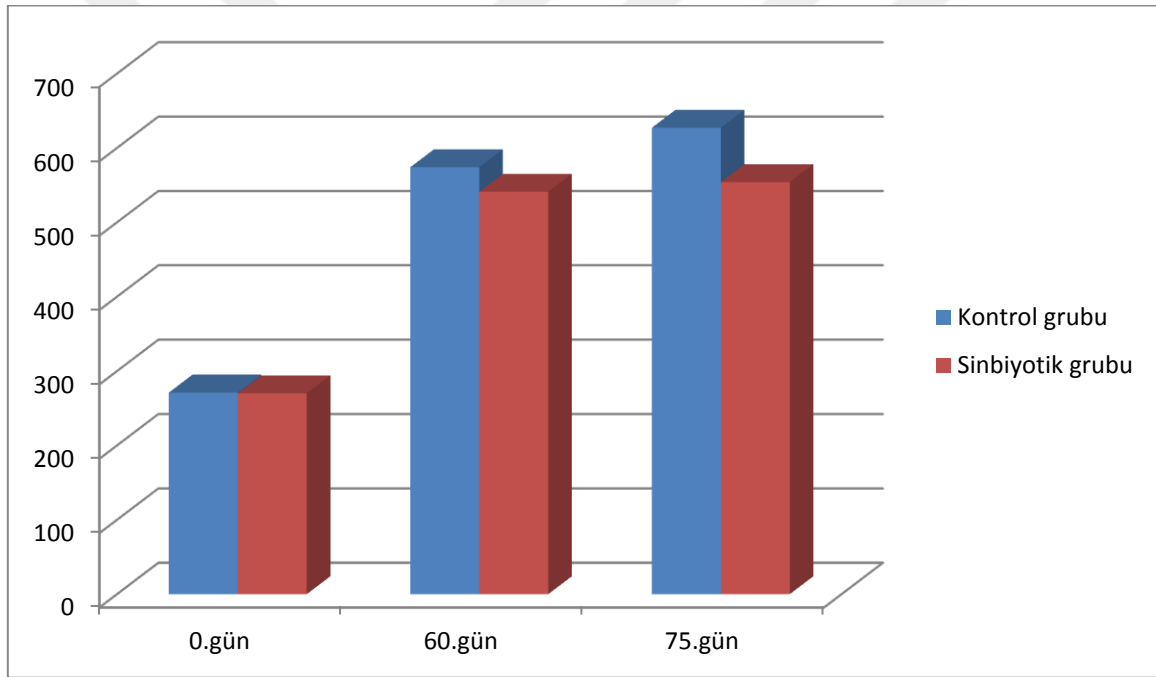
İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20.0 paket programı (IBM® Inc., Chicago, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma şeklinde özetlenmiştir. Değişkenlerin normal dağılımına uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Shapiro-Wilk testi) kullanılarak incelenmiştir. 0, 60 ve 75.gün ALT ve AST değerleri normal dağılım göstermekteydi. Normal dağılım gösterme durumuna göre belirlenen sayısal değişkenler iki grup arasında Bağımsız Gruplarda T testi kullanılarak, üç grup arasında One-Way ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Korelasyon analizlerinde Pearson ve Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenler iki grup arasında Mann Whitney U testi, üç ve daha fazla grup Kruskal Wallis Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki ordinal verinin karşılaştırmasında ise ki-kare analizi tercih edilmiştir. Çalışmadaki istatistiksel analizlerde p değeri 0.05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut ağırlıkları

Çalışma 12 ratla gerçekleştirildi. Ratların 0, 60 ve 75.gündeki ortalama ağırlıkları sırasıyla  $270 \pm 8.3$  gr,  $557 \pm 44.3$  gr,  $590 \pm 46.6$  gr'dı. Kontrol grubunda bu değerler sırasıyla  $271.1 \pm 9.4$  gr,  $574.1 \pm 17.1$  gr,  $627.1 \pm 19.0$  gr'dı. Sinbiyotik grubunda ise  $270 \pm 8.0$  gr,  $541.6 \pm 58.2$  gr,  $554.3 \pm 35.3$  gr'dı. Ratların vücut ağırlıkları 0. ve 60 .günde benzerken (sırasıyla  $p=0.872$ ,  $p=0.215$ ), 75.günde, sinbiyotik grubunun ortalama vücut ağırlığı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktü ( $p=0.001$ ).

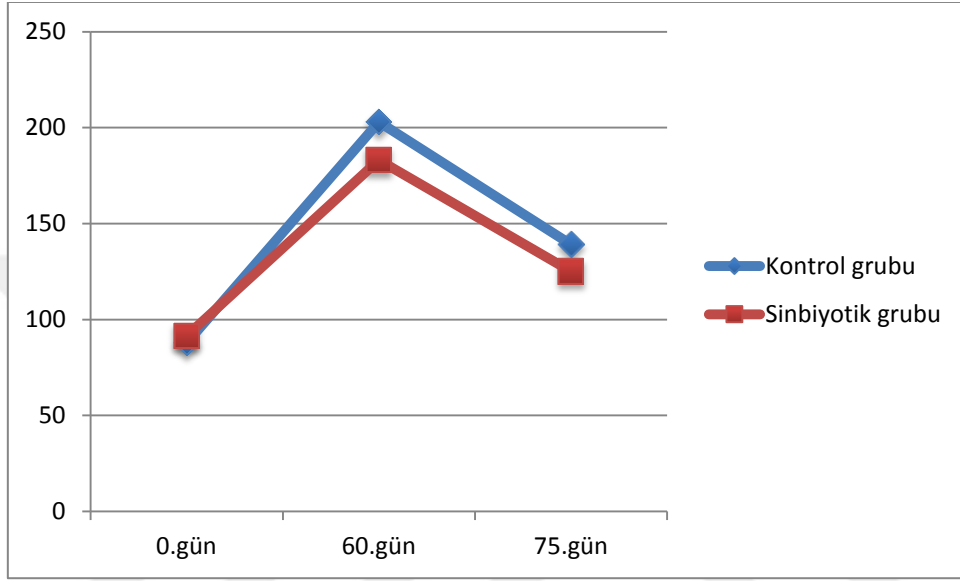


Şekil 4. Kontrol ve sinbiyotik gruplarının vücut ağırlıkları

### 4.2. ALT ve AST seviyeleri

Ratların yağlı diyet öncesi (0.gün) ortalama AST seviyesi,  $89.7 \pm 12.9$  IU/L, yağlı diyet sonrası (60.gün) AST değerleri  $193.2 \pm 29.7$  IU/L ve 75. gün AST seviyeleri  $132.1 \pm 25.3$  IU/L'ydi.

Kontrol grubunun 0.gün ortalama AST değerleri  $87.9 \pm 11.2$  IU/L, 60.gün ortalama AST değerleri  $203 \pm 28.1$  IU/L ve 75.gün ortalama AST değerleri  $139.0 \pm 32.0$  IU/L'ydı. Sinbiyotik grubunun 0.gün ortalama AST değerleri  $91.6 \pm 11.2$  IU/L, 60.gün ortalama AST değerleri  $183.1 \pm 30.1$  IU/L ve 75.gün ortalama AST değerleri  $125.1 \pm 16.5$  IU/L'ydı. Kontrol ve sinbiyotik gruplarında AST değerleri 60-75.günde anlamlı derecede düşüş göstermişti (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p = 0.008$ )

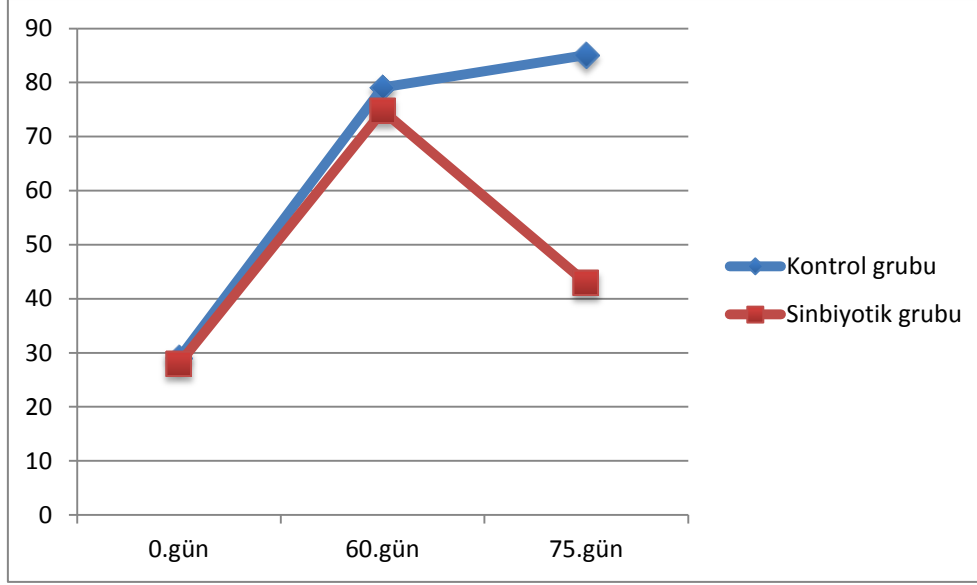


**Şekil 5. Kontrol ve sinbiyotik grubunun AST (IU/L) değerleri**

Kontrol grubu ve sinbiyotik grubunun 0.gün ve 60.gün AST seviyeleri birbirine benzerdi (sırasıyla  $p = 0.647$ ,  $p = 0.254$ ). Tedavi sonunda bakılan 75.gün AST seviyeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ( $p = 0.367$ ). Kontrol grubunun AST değerleri 60 -75 günler arasında  $64.4 \pm 13.9$  IU/L düşerken, sinbiyotik grubunda  $57.9 \pm 33.7$  IU/L düşüş göstermişti. AST seviyelerinde düşme her iki grupta da benzerdi ( $p = 0.673$ ).

Ratların yağlı diyet öncesi (0.gün) ortalama ALT seviyesi  $28.5 \pm 4.0$  IU/L, yağlı diyet sonrası (60.gün) ALT değerleri  $76.9 \pm 10.3$  IU/L ve 75. gün ALT seviyeleri  $64.0 \pm 26.1$  IU/L'ydı.

Kontrol grubunun 0.gün ortalama ALT değerleri  $29.0 \pm 3.9$  IU/L, 60.gün ortalama ALT değerleri  $79.1 \pm 11.9$  IU/L ve 75.gün ortalama ALT değerleri  $85.1 \pm 19.6$  IU/L'ydı. Sinbiyotik grubunun 0.gün ortalama ALT değerleri  $28.0 \pm 4.5$  IU/L, 60.gün ortalama ALT değerleri  $74.8 \pm 9.0$  IU/L ve 75.gün ortalama ALT değerleri  $42.9 \pm 6.4$  IU/L'ydı. Sinbiyotik grubunda ALT değerleri 60-75.günde anlamlı derecede düşüş gösterirken ( $p = 0.003$ ), kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ( $p = 0.122$ ).



**Şekil 6. Kontrol ve sinbiyotik grubunun ALT (IU/L) değerleri**

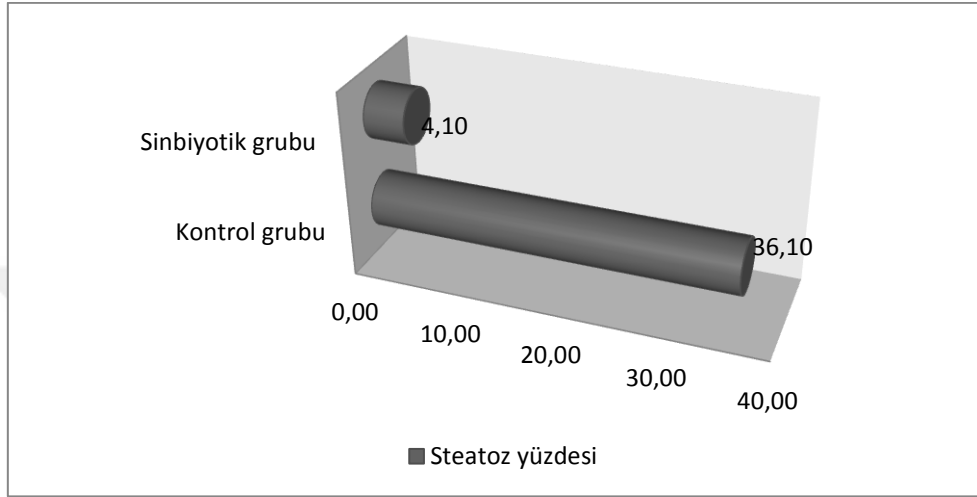
Kontrol grubu ve sinbiyotik grubunun 0.gün ve 60.gün ALT seviyeleri birbirine benzerdi (sırasıyla  $p=0.678$ ,  $p=0.498$ ). Tedavi sonunda bakılan 75.gün ALT seviyeleri sinbiyotik grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşüktü ( $p=0.001$ ). Kontrol grubunun ALT değerleri 60 -75 günler arasında  $6.0 \pm 7.9$  IU/L artarken, sinbiyotik grubunda  $31.9 \pm 14.2$  IU/L düşüş göstermişti. ALT seviyelerindeki değişim sinbiyotik grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazlaydı ( $p<0.001$ ).

#### 4.3. Karaciğerin ultrasonografik incelemesi

60 günlük yağlı karaciğer diyeti sonrasında yapılan ultrasonografik karaciğer değerlendirmesinde tüm ratlarda hepatosteatoz varlığı doğrulanmıştır (12/12). Her iki grupta da 4/6 ratın (%66.7) grade 2 steatozu varken, 2/6 ratın (%33.3) grade 3 steatozu vardı. Steatoz derecesi açısından gruplar aynıydı ( $p=1.000$ ).

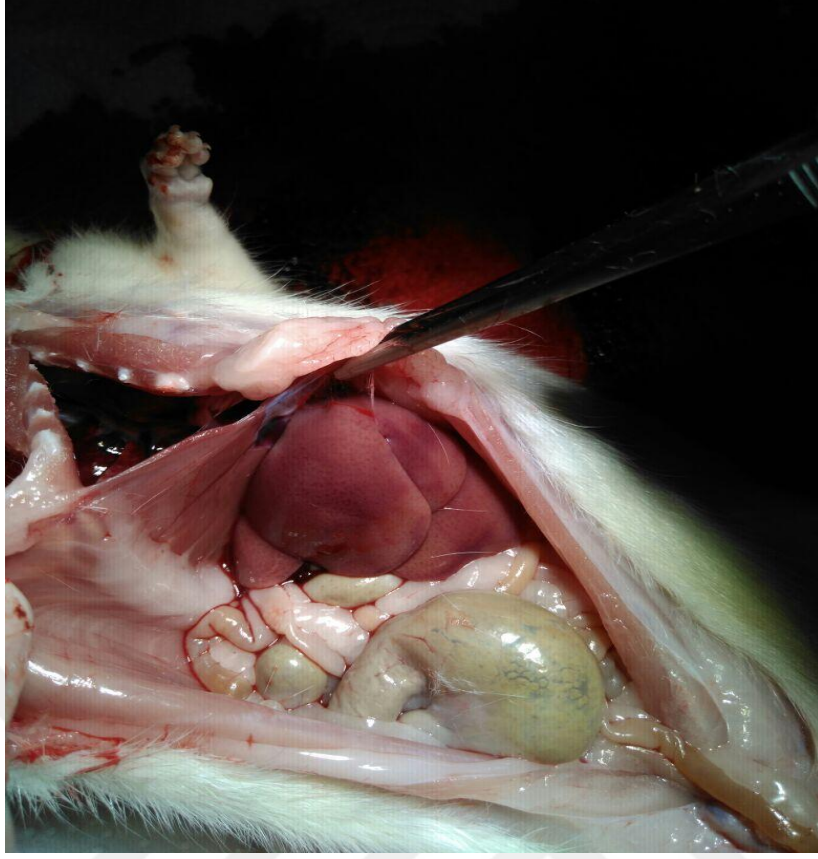
#### 4.4. Karaciğerin histopatolojik incelemesi

Tedavi sonrasında kontrol grubunda tüm ratlarda (%100) steatoz (grade 1-3) izlenirken, sinbiyotik grubunda sadece iki ratta (%33.3) grade 1 steatoz izlendi. Sinbiyotik grubunun ortalama steatoz grade'i 0.3'ken kontrol grubunun 2.0'ydi. Kontrol grubunda steatoz derecesi sinbiyotik grubundan daha yüksekti (p=0.003).

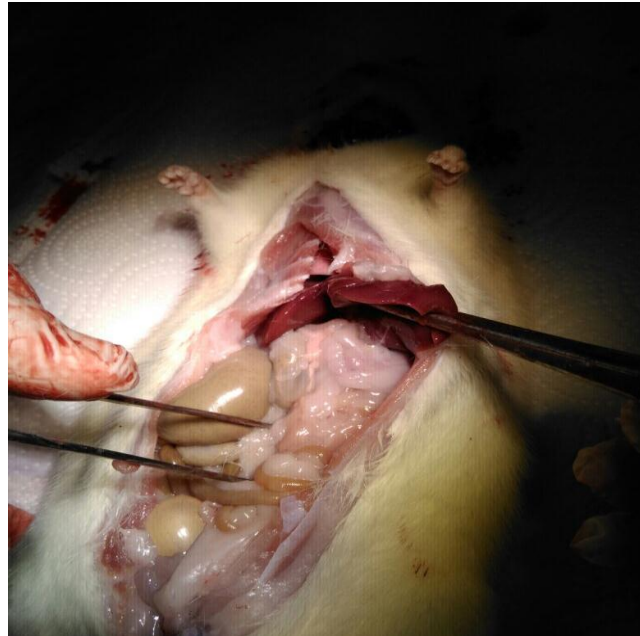


**Şekil 7. Kontrol ve sinbiyotik gruplarının steatoz yüzdesi**

Sinbiyotik grubunun ortalama steatoz yüzdesi  $4.1 \pm 8.0$ , kontrol grubunun ortalama steatoz yüzdesi  $36.1 \pm 17.6$ 'ydı. Kontrol grubunun ortalama steatoz yüzdesi sinbiyotik grubundan belirgin derecede daha yüksekti (p=0.002).



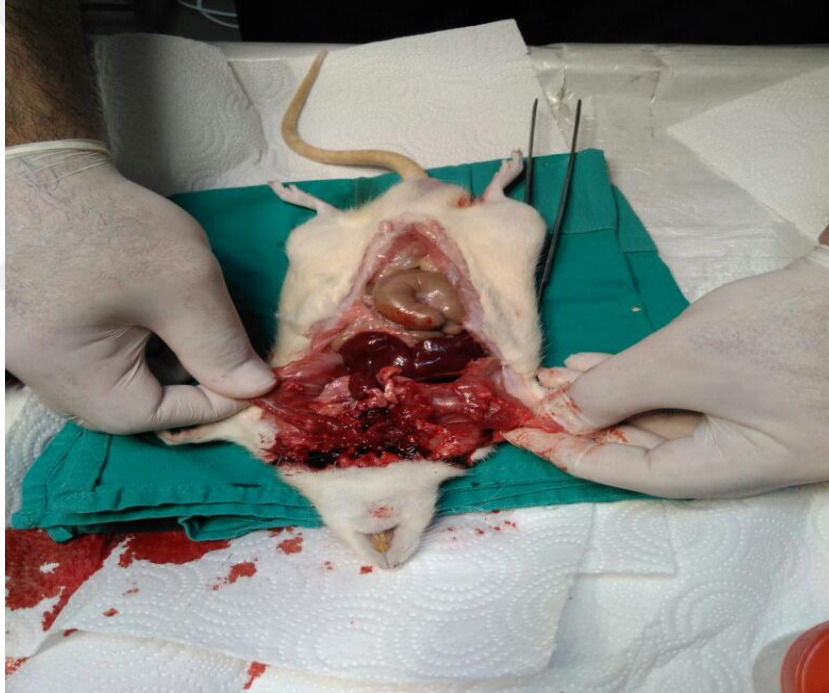
**Şekil 8. Kontrol grubunda makroskopik hepatosteatoz**



**Şekil 9. Kontrol grubunda nekropsi sırasında adipoz dokuda belirgin artış**

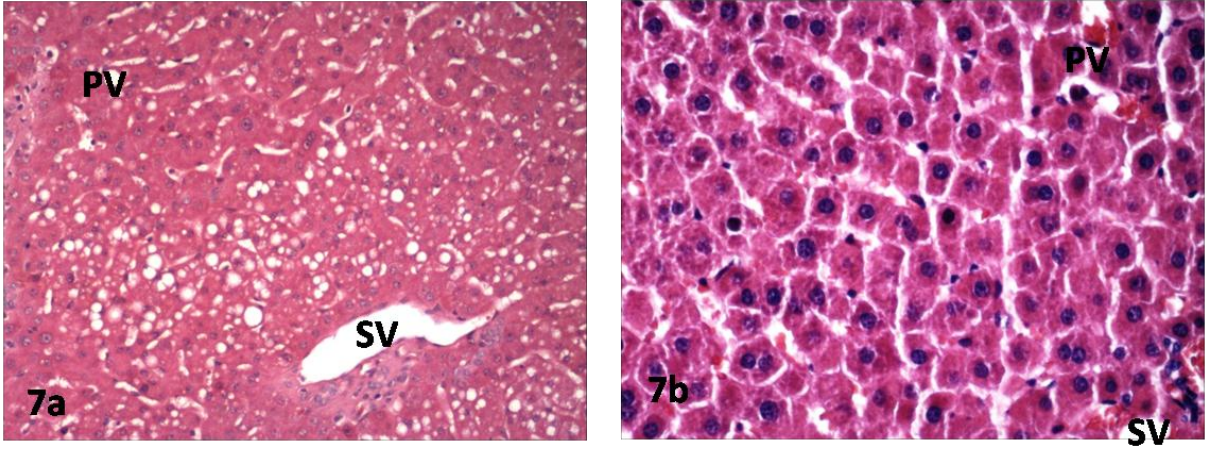
**Tablo 5. Ratların tedavi sonrası histopatolojik steatoz analizleri**

	Steatoz yüzdesi	Steatoz grade		Steatoz yüzdesi	Steatoz grade
<b>Kontrol grubu</b>			<b>Sinbiyotik grubu</b>		
Rat 1	%15	1	Rat 1	%0	0
Rat 2	%32	2	Rat 2	%5	1
Rat 3	%55	3	Rat 3	%0	0
Rat 4	%60	3	Rat 4	%0	0
Rat 5	%25	1	Rat 5	%0	0
Rat 6	%30	2	Rat 6	%20	1



**Şekil 10. Sinbiyotik grubunda makroskopik olarak normal karaciğer dokusu**

Tedavi sonrasında kontrol grubunda 2/6 (%33.3) ratta grade 1 inflamasyon varken, sinbiyotik grubunda inflamasyon izlenmedi. Fibrozis ise her iki grupta da görülmedi.



Şekil 11. PV; Portal ven, SV; Santral ven. Sol tarafta kontrol grubunda mikroskopik olarak hepatosteatoz şiddetliken, sağ tarafta simbiyotik grubunda minimal steatoz bulguları mevcut

## 5.TARTIŞMA

Obezite sıklığının artmasına paralel olarak NAYKH giderek büyüyen bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Basit bir steatozdan NASH'a kadar olan klinik tabloyu içeren NAYKH, metabolik sendromun karaciğer yansısidır. Tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu bu durumda mevcut tedaviler diyet ve yaşam stili değişikliklerine odaklanmıştır [169]. Ancak bu tedavilere rağmen istenen başarı sağlanamamaktadır.

Bağırsak-karaciğer aksının doğru fonksiyon göstermemesinin (bakteriyel aşırı çoğalma) NAYKH gelişimi ve progresyonunda önemli bir faktör olduğu hakkındaki kanıtlar giderek artmaktadır [170-172]. Çalışmamızın ilk dikkat çeken bulgusu, iki haftalık sinbiyotik tedavisi sonrasında histopatolojik analizler ve ALT-AST yüksekliğiyle gösterilen hepatosteatoz düzeyinde/yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla azalma olmasıydı. Gastrointestinal sistem ile karaciğerin anatomik ve fonksiyonel ilişkisini sağlayan bağırsak-karaciğer aksındaki değişimler sonucunda intestinal geçirgenlik ve intestinal mikrobiyotada da değişimler görülür. [173]. Buna bağlı olarak obezite ve diyet ilişkili intestinal bariyer hasarı sonucunda da bu aksın fonksiyonu bozulmakta ve hepatotoksik bakteriyel ürünler sistemik dolaşıma katılmaktadır. Sinbiyotikler ise intestinal mikrobiyota bileşimini olumlu yönde etkileyerek bağırsağın karaciğer ve immün sistemle ilişkisini düzenlemektedir [174]. Ayrıca intestinal bariyer fonksiyonlarının bu etkileşimle geliştiği veya modüle edildiği bildirilmiştir [175]. Bağırsak fonksiyonlarının modüle edilmesiyle birlikte obezite, metabolik sendrom ve hepatosteatozda olumlu yönde gelişme gözlenmektedir. Probiyotiklerin diğer etki mekanizmaları içerisinde hasarlı intestinal bariyerin düzeltilmesi, oksidan-antioksidan dengenin kurulması ve bakteriyel translokasyonun önlenmesi yer almaktadır [174]. Bu faktörler aynı zamanda NAYKH patogenezinden sorumludur. Çalışmamızın sonuçları alt başlıklar halinde şu şekilde tartışılabilir:

### ALT-AST

Çalışmamızda yüksek yağ içerikli diyetle tetiklenen ALT yüksekliği 2 haftalık probiyotik tedavisiyle aşağıya çekilmiştir. Sonuçlarımıza benzer şekilde, Raso ve ark'ı [176] yüksek yağlı diyetle oluşturdukları NAYKH hayvan modelinde çalışmamıza kıyasla daha uzun bir



süre olan 6 haftalık *Lactobacillus paracasei B21060*, arabinogalaktan ve oligosakkaridlerden oluşan sinbiyotik tedavisinin etkisini değerlendirmiştir. Tedavi sonrasında sinbiyotik grubunda steatoz şiddetinde 1 grade azalma, AST ve ALT enzimlerinde düşme olduğu görülmüştür. Al-muzafar ve ark'ının [177] çalışmasında da yüksek yağ ve şekerli diyetle beslenen farelerde probiyotik tedavisiyle yükselen ALT seviyeleri aşağıya çekilmiştir. Hayvan çalışmalarının yanında klinik çalışmalar da sonuçlarımızı desteklemektedir. Vajro ve ark'ı [162] tarafından yapılan çalışmada karaciğer fonksiyon enzimleri bozuk olan 20 obez çocukta 8 hafta boyunca *L. rhamnosus* (12 milyon CFU/gün) tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında ALT seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin azalma izlenmiştir. Aller ve ark'ı [164] tarafından yapılan çalışmada biyopsiyle NAYKH doğrulanmış hastalar 3 ay süresince 500 milyon ünite *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* ile tedavi edilmiş ve sonrasında kontrol grubuna kıyasla aminotransferazların düzeldiği görülmüştür. Çalışmamızda AST seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla azalma izlenmemesi, ALT enziminin karaciğer dokusuna daha spesifik olmasıyla açıklanabilir, ancak yakın bir zamanda yapılan diğer bir klinik çalışmada 20 NASH hastasının laktobasil ve bifidobakteri türlerinden oluşan probiyotik tedavisi sonrasında karaciğer yağ miktarında ve AST seviyelerinde azalma bildirilmiştir [165]. Eslamparast ve ark'ı [178] ise 52 NAYKH hastasında 28 hafta boyunca sinbiyotik veya plasebo tedavisi uygulamış, her iki gruba da fiziksel aktivite ve yaşam stili değişiklikleri önerilmiştir. Tedavi sonrasında ALT seviyeleri her iki grupta azalırken, sinbiyotik grubunda daha belirgin azalma görülmüştür.

## **Histopatoloji**

Hepatosteatozun probiyotik/sinbiyotiklerle önlenilebileceği ya da gerileyebileceği hem hayvan hem de klinik çalışmalarda histopatolojik analizlerle gösterilmiştir. Ma ve ark'ının yaptığı [157] hayvan çalışmasında VSL#3 probiyotiği sonrasında yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelerde hepatosteatozun histopatolojik açıdan gerilediği bildirilmiştir. Nardone ve ark'ı [168] oksidatif ve metabolik karaciğer hasarı oluşturdukları hayvan modelinde *Lactobacillus paracasei F19* probiyotiği ile karaciğerde inflamasyon, fibrozis ve steatozun gerilediğini bildirmiştir. Hepatosteatoz metabolik sendromun karaciğer formunu oluşturmaktadır. Probiyotiklerin karaciğerde gösterdiği etkinin sistemik bir etki olacağı öngörülebilir. Bu doğrultuda Wang ve ark'ı [179] tarafından yapılan çalışmada geleneksel bir Çin yemeği olan Tibet kefirinden izole edilen *Lactobacillus plantarum MA2*'nin yüksek kolesterol içeriğiyle beslenen farelerde karaciğerdeki total kolesterol ve trigliserid seviyesini düşürdüğü, aynı düşüşü serum kolesterolü ve trigliseridi üzerinde de gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Velayudham ve ark'ı [159] metionin ve kolinden fakir diyetle oluşturdıkları hepatosteatozun VSL#3 probiyotiği ile müdahale sonrasında karaciğerde inflamasyon ve steatozun azalmazken fibrozisin gerilediğini bildirmiştir. 2016 yılında Asgharian ve ark'ı [180] tarafından yapılan çalışmada 80 NAYKH hastası 8 hafta boyunca 8 probiyotik bakteri türü ve fruktooligosakkarid bileşimi veya plaseboyla tedavi edilmiştir. Sekiz hafta sonunda sinbiyotik grubunda hepatosteatoz şiddetinin kontrol grubundan daha belirgin azalma gösterdiği görülmüştür. Al-muzafar ve ark'ı [177] tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada yüksek yağ ve sükroz içerikli diyetle ratlarda NAYKH oluşturulmuştur. Sonrasında verilen 4 haftalık probiyotik tedavisinin (laktobasil, bifidobakteri ve basillus türleri) bozulan lipid profilini düzenlediği görülmüştür. Aynı zamanda hepatosteatozun azaldığı histopatolojik incelemelerle de doğrulanmıştır. Benzer bir çalışma Amin ve ark'ı [181] tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada yüksek yağ veya sükroz içerikli diyetle beslenen ratlarda gıda alımı, vücut ağırlığında artışın yanında mezenterik adipoz doku miktarında da artma izlenmiştir. Ek olarak verilen diyet sonrası oksidatif stres seviyesinin artması sonucunda böbrek fonksiyonlarında da bozulma izlenmiştir. Yüksek yağ veya sükroz içerikli diyetin oluşturduğu hasarlar doğal probiyotik olan *Garcinia* ile azaltılmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kontrol grubunda prebiyotik grubuna kıyasla nekropsisi sırasında makroskopik olarak adipoz dokuda belirgin artış izlenmiştir.

Probiyotiklerin NAYKH ve NASH haricinde sirozda da etkinlikleri değerlendirilmiştir. Dhiman ve ark'ı [182] tarafından yakın bir zamanda yapılan randomize, kontrollü klinik çalışmada 130 dekompanse siroz hastası 6 ay boyunca VSL#3 veya plaseboyla tedavi edilmiştir. Probiyotik grubunda hepatik ensefalopati sıklığının azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda bu hastalar siroz komplikasyonları nedeniyle daha az hospitalize edilmiştir.

Bazı diyet içeriklerinin (doymuş yağlar) hem hayvan çalışmalarında hem de klinik çalışmalarda obezite ve insülin direncini tetiklediği gösterilmiştir [183, 184]. Obezite ve obezite ilişkili metabolik bozuklukların primer tedavisini yaşam stili değişiklikleri oluşturur. Ancak hem yetişkin, hem de çocuk hastalarda mevcut tedavi yaklaşımları sınırlı kalır. Obeziteyi sağaltmayı hedefleyen yeni tedavi seçenekleri intestinal mikrobiyotayı hedeflemektedir. İntestinal bakterilerin obezite ve insülin direncinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Germ-free (içinde mikroorganizma yaşamayan) farelerde konvansiyonel barsak bakterilerinin kolonizasyonu ile vücut yağı ve obezitede artış görüldüğü bildirilmiştir [185]. Germ-free fareler aynı zamanda yüksek yağlı diyetle tetiklenen obezite ve obezite ilişkili metabolik değişimlere dirençlidir [148].

## Ağırlık

Obez ve normal vücut ağırlığındaki bireylerin intestinal mikrobiyotası farklılık göstermektedir. Obezlerde firmikütlerin oranı fazla olduğu için kalori ve enerji alımı daha fazladır [186]. Probiyotikler bağırsak mikroorganizmalarının bozulan dengesini düzenleyerek obezite ve insülin direncini geriletmektedir. Çalışmamızda sinbiyotik tedavisi alan grupta vücut ağırlıklarının daha az olması bunu desteklemekteydi. Ma ve ark'ının [157] çalışmasında da benzer şekilde probiyotiklerin vücut ağırlığını azalttığı bildirilmiştir. Probiyotiklerin vücut ağırlığını azalttığı 2011 yılında An ve ark [187], 2012 yılında Chen ve ark [188], 2013 yılında Yoo ve ark [189], Park ve ark'ı [190], 2015 yılında Wang ve ark'ı [191] tarafından yapılan hayvan çalışmalarında doğrulanmıştır. Bu hayvan çalışmaların ışığında Kadooka ve ark'ı [192] tarafından yapılan randomize, plasebo kontrollü klinik çalışmada 12 hafta süresince *Lactobacillus gasseri* SBT 2055 içeren fermente süt ile abdominal ve subkütan yağ dokunun sırasıyla %4,6 ve 3,3 azaldığı bildirilmiştir. Vücut ağırlığında ise %1,5 azalma başarılmıştır ( $p<0.001$ ). Çalışmamızda da 2 haftalık sinbiyotik tedavisi sonrasında ratların vücut ağırlığında kontrol grubuna kıyasla belirgin azalma izlenmişti (627 vs 554 gr,  $p=0.001$ ).

## Yöntem

Çalışmamızda hepatosteatoz için 8 haftalık yüksek yağ içerikli diyet tercih edilmiş, sonrasında sinbiyotik tedavisi için 2 haftalık bir süre tercih edilmişti. Tercih edilen tedavi süreleri çalışmalar arasında farklılık göstermekteydi. Probiyotik ve/veya sinbiyotik tedavisi Karahan ve ark'ının [193] çalışmasında 2 hafta, Li ve ark'ının (13) çalışmasında 4 hafta, Wang ve ark'ının [179] çalışmasında 5 hafta, Lee ve ark'ının [194] çalışmasında 8 hafta, Fazeli ve ark'ının [195] çalışmasında 14 hafta tercih edilmiştir. Eslamparast ve ark'ı [178] tarafından yapılan klinik çalışmada ise 28 haftalık bir tedavi tercih edilmiştir. Sürelerin farklı olmasında çalışmalarda değerlendirilen obezite, insülin direnci gibi diğer yöntemlerin etkisi olduğu söylenebilir. Bunun yanında klinik çalışmalarda daha uzun tedavi süreleri tercih edilmiştir. Literatür verileri ışığında çalışmamızda en kısa etkin süre olan 2 hafta seçildi. Bunu sonucunda da öngörülen etkinlik saptandı.

## Hepatosteatoz nasıl oluşturuldu

Çalışmamızda ratlarda hepatosteatoz yüksek ketoasidojenik ve yüksek yağ içerikli diyetle oluşturulmuştur. Buna ek olarak literatürde hepatosteatoz modeli oluşturmak için metionin-kolinden fakir diyet, kolinden fakir aminoasid diyeti, yüksek yağ ve sükröz içerikli diyet de

kullanılmıştır [174]. Tüm yöntemlerle başarılı bir şekilde hepatosteatoz modeli oluşturulabileceği gösterilmiştir. Barsak mikroflorasını değiştirmek için kullanılan diğer bir yöntem ise antibiyotik uygulamasıdır. Cani ve ark'ı [196] antibiyotik uygulayarak ratlarda metabolik endotoksemi oluşturmuş, böylece obezite ve tip 2 diyabeti tetiklemiştir.

### **Hangi probiyotik kullanıldı**

Çalışmamızda probiyotik/sinbiyotik türü olarak *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* B94, fruktooligosakkarid kullanılmıştır. Sonuçları probiyotiklerin hepatoprotektif olduğu yönünde olan çalışmaların çoğunda çalışmamıza benzer şekilde laktobasil ve bifidobakteri türleri tercih edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda VSL#3 (laktobasil, bifidobakteri, streptokok) tercih edilirken [156-159], Endo ve ark'ı [197] bütirat üreten *Clostridium Butiricum* MIYARI 588, Paik ve ark'ı [198] *Basillus Polifermentikus* SCD, Amin ve ark'ı [181] *Garcinia Cambogia*, Karahan ve ark'ı [193] ise Pro 1 ve Pro 2 (laktobasil ve enterokok türleri) karışımını kullanmıştır. Çoğu çalışmada probiyotiklerin başarılı olduğu bildirilmiştir. Ancak probiyotiğin cinsi, uygulama süresi, uygulama miktarı ve uygulama yöntemleri hakkında fikir birliği sağlanamamıştır.

### **Kısıtlılıklar**

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları da vardır. Çalışmamızda sinbiyotik tedavisi 2 hafta uygulandı. Daha kısa sürelerde probiyotiklerin etki gösterdiği bildirilse de daha uzun süre uygulanması daha belirgin sonuçlar elde edilmesini sağlayabilirdi. Serum ALT seviyelerinde azalma izlenirken AST seviyelerinde izlenmemiştir. AST seviyelerinde azalma bildiren çalışmalar olmasına rağmen karaciğer fonksiyonlarını ALT'nin daha iyi gösterdiği, AST'yi etkileyen karaciğer dışı faktörlerin olduğu söylenebilir. Sinbiyotik tedavisinin kısmen kısa süre uygulanması da buna yol açmış olabilir.

## 6. SONUÇ

Obezite, metabolik sendrom ve NAYKH özellikle çocuk yaş grubunda tedavi seçenekleri sınırlı olan, ancak buna rağmen oldukça sık karşılaşılan sağlık sorunlarıdır. Mevcut tedavilere ise hastaların uyumu ve katılımı istenen düzeyde olmamaktadır. Embriyolojik kökeni aynı olan bağırsak ve karaciğer organları arasındaki yakın ilişkiyi düzenleyen probiyotik/sinbiyotikler sınırlı olan tedavi seçeneklerini genişletmiş ve aynı zamanda tedavi rehberlerinde yer edinmeye başlamıştır.

Çalışmamızda yüksek yağ içerikli diyetle oluşturulan NAYKH hayvan modelinde 2 hafta süresince verilen sinbiyotik tedavisinin kontrol grubuna kıyasla serum ALT seviyelerinde azalma sağlamanın yanında hepatosteatoz şiddetinde düşme sağladığı da gösterilmiştir. Aynı zamanda vücut ağırlığında da belirgin kayıp olduğu izlenmiştir.

Hem klinik hem de hayvan çalışmalarında etkinliği bir çok defa gösterilmiş olmasına rağmen uygulama süresi, dozu ve uygulanan probiyotiğin cinsi ile çocuklardaki güvenliği konusunda fikir birliği henüz mevcut değildir. Diğer taraftan bağırsak-karaciğer arasındaki ilişkinin aydınlatılmayan yönleri de mevcuttur. Yapılacak olan çalışmalarla bu ilişki aydınlatılabilir, optimal probiyotik türleri, tedavi süresi ve algoritmaları belirlenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kirpich, I.A., et al., The Type of Dietary Fat Modulates Intestinal Tight Junction Integrity, Gut Permeability, and Hepatic Toll-Like Receptor Expression in a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2012. 36(5): p. 835-846.
2. Widhalm, K. and E. Ghods, Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge for pediatricians. *Int J Obes (Lond)*, 2010. 34(10): p. 1451-67.
3. Nobili, V., et al., NAFLD in children: a prospective clinical-pathological study and effect of lifestyle advice. *Hepatology*, 2006. 44(2): p. 458-65.
4. Sáez-Lara, M.J., et al., Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17(6): p. 928.
5. Bismuth, H., Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J Surg*, 1982. 6(1): p. 3-9.
6. Abdel-Misih, S.R.Z. and M. Bloomston, Liver Anatomy. *The Surgical clinics of North America*, 2010. 90(4): p. 643-653.
7. Couinaud, C., *Le foie. Etudes anatomiques et chirurgicales*. Paris: Masson. 1957.
8. Jamieson, G., *The anatomy of general surgical operations*. 2nd edition. 2006: Edinburgh (NY): Churchill Livingstone/Elsevier. p. 8–23.
9. Kogure, K., et al., Close relation between the inferior vena cava ligament and the caudate lobe in the human liver. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 2007. 14(3): p. 297-301.
10. Pringle, J.H., V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Annals of Surgery*, 1908. 48(4): p. 541-549.
11. Skandalakis, J.E., et al., Hepatic surgical anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 2004. 84(2): p. 413-435.
12. Riley, T.R., 3rd and A.M. Bhatti, Preventive strategies in chronic liver disease: part I. Alcohol, vaccines, toxic medications and supplements, diet and exercise. *Am Fam Physician*, 2001. 64(9): p. 1555-60.

13. Brunt, E.M., Nonalcoholic Fatty Liver Disease: What the Pathologist Can Tell the Clinician. *Digestive Diseases*, 2012. 30(suppl 1)(Suppl. 1): p. 61-68.
14. Kleiner, D.E., et al., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005. 41(6): p. 1313-1321.
15. Völzke, H., Multicausality in fatty liver disease: Is there a rationale to distinguish between alcoholic and non-alcoholic origin? *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2012. 18(27): p. 3492-3501.
16. Bayard, M., J. Holt, and E. Borroughs, Nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician*, 2006. 73(11): p. 1961-8.
17. Chalasani, N., et al., The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 2012. 55(6): p. 2005-2023.
18. Sheth, S.G., F.D. Gordon, and S. Chopra, Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med*, 1997. 126(2): p. 137-45.
19. Bedogni, G., V. Nobili, and C. Tiribelli, Epidemiology of fatty liver: An update. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2014. 20(27): p. 9050-9054.
20. Hernaez, R., et al., Diagnostic Accuracy and Reliability of Ultrasonography for the Detection of Fatty Liver: A Meta-Analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2011. 54(3): p. 1082-1090.
21. Browning, J.D., et al., Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1387-1395.
22. Anderson, E.L., et al., The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 2015. 10(10): p. e0140908.
23. Williams, C.D., et al., Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 140(1): p. 124-131.
24. Vernon, G., A. Baranova, and Z.M. Younossi, Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2011. 34(3): p. 274-285.

25. Lazo, M., et al., Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*, 2013. 178(1): p. 38-45.
26. Younossi, Z.M., et al., Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 9(6): p. 524-530.e1.
27. Bedogni, G., et al., Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*, 2005. 42(1): p. 44-52.
28. Bedogni, G., et al., The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology*, 2006. 6: p. 33-33.
29. Browning, J.D., Statins and hepatic steatosis: Perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology*, 2006. 44(2): p. 466-471.
30. FAtty liver among persons in a community in northern italy. *Annals of Internal Medicine*, 2000. 132(2): p. 112-112.
31. Bellentani, S., et al., The epidemiology of fatty liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004. 16(11): p. 1087-93.
32. Bellentani, S., et al., Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*, 2010. 28(1): p. 155-61.
33. Rashid, M. and E.A. Roberts, Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000. 30(1): p. 48-53.
34. Manco, M., et al., Nonalcoholic fatty liver disease in children. *J Am Coll Nutr*, 2008. 27(6): p. 667-76.
35. Sanyal, A.J., AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 123(5): p. 1705-1725.
36. Yuksel, F., et al., Fatty liver disease in an autopsy series of children and adolescents. *Hippokratia*, 2012. 16(1): p. 61-5.
37. Yildiz, I., et al., Role of vitamin D in children with hepatosteatois. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2014. 59(1): p. 106-11.
38. Sertoglu, E., et al., The relationship of serum uric acid with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem*, 2014. 47(6): p. 383-8.
39. Caldwell, S.H., et al., Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology*, 1999. 29(3): p. 664-669.
40. Matteoni, C.A., et al., Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999. 116(6): p. 1413-9.



41. Donnelly, K.L., et al., Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. 115(5): p. 1343-1351.
42. Tilg, H. and A.R. Moschen, Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 2010. 52(5): p. 1836-46.
43. Adams, L.A., P. Angulo, and K.D. Lindor, Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 2005. 172(7): p. 899-905.
44. Browning, J.D. and J.D. Horton, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. 114(2): p. 147-152.
45. Tetri, L.H., et al., Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008. 295(5): p. G987-G995.
46. Abdelmalek, M.F., et al., Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2010. 51(6): p. 1961-1971.
47. Neuschwander-Tetri, B.A., Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*, 2010. 52(2): p. 774-788.
48. Alkhoury, N., L.J. Dixon, and A.E. Feldstein, Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are Created Equal. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 2009. 3(4): p. 445-451.
49. Koliwad, S.K., et al., DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010. 120(3): p. 756-767.
50. Unger, R.H. and P.E. Scherer, Gluttony, Sloth and the Metabolic Syndrome: A Roadmap to Lipotoxicity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2010. 21(6): p. 345-352.
51. Li, Z.Z., et al., Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: ROLE OF STEAROYL-CoA DESATURASE. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(9): p. 5637-5644.
52. Malhi, H., et al., Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut*, 2007. 56(8): p. 1124-1131.
53. Feldstein, A.E., et al., Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 2004. 40(1): p. 185-194.

54. Smith, B.W. and L.A. Adams, Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2011. 48(3): p. 97-113.
55. Weisberg, S.P., et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1796-808.
56. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 2005. 115(5): p. 1111-9.
57. Marchesini, G., et al., Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*, 1999. 107(5): p. 450-5.
58. Marchesini, G., et al., Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 2003. 37(4): p. 917-23.
59. van der Poorten, D., et al., Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology*, 2008. 48(2): p. 449-57.
60. Ibrahim, M.M., Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, 2010. 11(1): p. 11-8.
61. Feldstein, A.E., et al., Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 2004. 40(1): p. 185-94.
62. Haque, M. and A.J. Sanyal, The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002. 16(5): p. 709-31.
63. Hotamisligil, G.S., Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 860-7.
64. Jaeschke, A. and R.J. Davis, Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Mol Cell*, 2007. 27(3): p. 498-508.
65. Wieckowska, A., et al., Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(6): p. 1372-9.
66. Struben, V.M., E.E. Hespeneide, and S.H. Caldwell, Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med*, 2000. 108(1): p. 9-13.
67. Mohanty, S.R., et al., Influence of ethnicity on histological differences in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2009. 50(4): p. 797-804.
68. Riquelme, A., et al., Non-alcoholic fatty liver disease and its association with obesity, insulin resistance and increased serum levels of C-reactive protein in Hispanics. *Liver Int*, 2009. 29(1): p. 82-8.
69. Weston, S.R., et al., Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology*, 2005. 41(2): p. 372-9.

70. Romeo, S., et al., Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, 2008. 40(12): p. 1461-5.
71. Valenti, L., 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(4): p. 1209-17.
72. He, S., et al., A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, 2010. 285(9): p. 6706-15.
73. Petersen, K.F., et al., Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 2010. 362(12): p. 1082-9.
74. Li, J., et al., Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol* (1985), 2005. 99(5): p. 1643-8.
75. Dowman, J.K., J.W. Tomlinson, and P.N. Newsome, Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*, 2010. 103(2): p. 71-83.
76. Angulo, P., Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 2002. 346(16): p. 1221-31.
77. Brunt, E.M., Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 2004. 24(1): p. 3-20.
78. Kistler, K.D., et al., Symptoms and quality of life in obese children and adolescents with nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2010. 31(3): p. 396-406.
79. De Bruyne, R.M.L., E. Fitzpatrick, and A. Dhawan, Fatty liver disease in children: eat now pay later. *Hepatology International*, 2010. 4(1): p. 375-385.
80. Nanda, K., Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Pediatr Transplant*, 2004. 8(6): p. 613-8.
81. Schwimmer, J.B., et al., Cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Circulation*, 2008. 118(3): p. 277-83.
82. Schwimmer, J.B., et al., Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr*, 2003. 143(4): p. 500-5.
83. Patton, H.M., et al., Association Between Metabolic Syndrome and Liver Histology Among Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The American journal of gastroenterology*, 2010. 105(9): p. 2093-2102.
84. Smith, B.W. and L.A. Adams, Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*, 2011. 7(8): p. 456-65.

85. Bozic, M.A., G. Subbarao, and J.P. Molleston, Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 2013. 28(4): p. 448-458.
86. Pardee, P.E., W. Dunn, and J.B. Schwimmer, Nonalcoholic Fatty Liver Disease is Associated with Low Bone Mineral Density in Obese Children. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2012. 35(2): p. 248-254.
87. Harrison, S.A. and B.A. Neuschwander-Tetri, Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*, 2004. 8(4): p. 861-79, ix.
88. Torres, D.M. and S.A. Harrison, Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2008. 134(6): p. 1682-98.
89. Prati, D., et al., Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med*, 2002. 137(1): p. 1-10.
90. Kunde, S.S., et al., Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology*, 2005. 42(3): p. 650-6.
91. Milner, K.L., et al., Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2009. 49(6): p. 1926-34.
92. Singer, C., et al., Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Current Health Sciences Journal*, 2014. 40(3): p. 170-176.
93. Okur, G. and Z. Karacaer, The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in healthy young persons. *Northern Clinics of Istanbul*, 2016. 3(2): p. 111-117.
94. Vajro, P., et al., Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. 54(5): p. 700-13.
95. Nobili, V., et al., Leptin, free leptin index, insulin resistance and liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol*, 2006. 155(5): p. 735-43.
96. Schwimmer, J.B., et al., Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005. 42(3): p. 641-649.
97. Nobili, V., et al., Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Hepatology*, 2008. 48(1): p. 119-28.
98. Daubioul, C.A., et al., Effects of oligofructose on glucose and lipid metabolism in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Eur J Clin Nutr*, 2005. 59(5): p. 723-6.

99. Zivkovic, A.M., J.B. German, and A.J. Sanyal, Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*, 2007. 86(2): p. 285-300.
100. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*, 2000. 49(5): p. 677-83.
101. Houmard, J.A., et al., Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. *J Appl Physiol* (1985), 2004. 96(1): p. 101-6.
102. Sugerman, H.J., et al., Bariatric surgery for severely obese adolescents. *J Gastrointest Surg*, 2003. 7(1): p. 102-7; discussion 107-8.
103. Liew, P.L., et al., Hepatic histopathology of morbid obesity: concurrence of other forms of chronic liver disease. *Obes Surg*, 2006. 16(12): p. 1584-93.
104. Clark, J.M., et al., Roux-en-Y gastric bypass improves liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Res*, 2005. 13(7): p. 1180-6.
105. Liu, X., et al., Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis after Gastric Bypass Surgery. *Obesity Surgery*, 2007. 17(4): p. 486.
106. Selvin, E., et al., Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Arch Intern Med*, 2008. 168(19): p. 2070-80.
107. Musso, G., et al., A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2010. 52(1): p. 79-104.
108. Sanyal, A.J., et al., Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, 2010. 362(18): p. 1675-85.
109. Vajro, P., et al., Vitamin E treatment in pediatric obesity-related liver disease: a randomized study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2004. 38(1): p. 48-55.
110. Lavine, J.E., Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr*, 2000. 136(6): p. 734-8.
111. Alkhouri, N. and A.E. Feldstein, The TONIC Trial: A Step Forward in Treating Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 2012. 55(4): p. 1292-1295.
112. Miller, E.R., et al., Meta-analysis: High-dosage vitamin e supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*, 2005. 142(1): p. 37-46.
113. Pandey, K.R., S.R. Naik, and B.V. Vakil, Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2015. 52(12): p. 7577-7587.
114. Szajewska, H., et al., Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016. 62(3): p. 495-506.

115. Chapman, C.M., G.R. Gibson, and I. Rowland, Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr*, 2011. 50(1): p. 1-17.
116. Kuo, S.-M., The Interplay Between Fiber and the Intestinal Microbiome in the Inflammatory Response. *Advances in Nutrition*, 2013. 4(1): p. 16-28.
117. Pokusaeva, K., G.F. Fitzgerald, and D. van Sinderen, Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 2011. 6(3): p. 285-306.
118. Saulnier, D.M., et al., Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr Opin Biotechnol*, 2009. 20(2): p. 135-41.
119. Cencic, A. and W. Chingwaru, The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2010. 2(6): p. 611-25.
120. Zhang, M.-M., et al., Use of pre-, pro- and synbiotics in patients with acute pancreatitis: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2010. 16(31): p. 3970-3978.
121. Volta, U., et al., IgA antibodies to dietary antigens in liver cirrhosis. *Ric Clin Lab*, 1987. 17(3): p. 235-42.
122. Cani, P.D., et al., Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007. 56(7): p. 1761-72.
123. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. 9(6): p. 737-43.
124. Cani, P.D., et al., Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 2007. 50(11): p. 2374-83.
125. Carvalho, B.M., et al., Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*, 2012. 55(10): p. 2823-34.
126. Ding, S., et al., High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*, 2010. 5(8): p. e12191.
127. Ye, D., I. Ma, and T.Y. Ma, Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 290(3): p. G496-504.
128. Muccioli, G.G., et al., The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol*, 2010. 6: p. 392.

129. Cani, P.D., Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clin Microbiol Infect*, 2012. 18 Suppl 4: p. 50-3.
130. Cani, P.D., et al., Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008. 57(6): p. 1470-81.
131. Zhou, X., et al., A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS One*, 2014. 9(12): p. e115148.
132. Bergheim, I., et al., Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol*, 2008. 48(6): p. 983-92.
133. Kavanagh, K., et al., Dietary fructose induces endotoxemia and hepatic injury in calorically controlled primates. *Am J Clin Nutr*, 2013. 98(2): p. 349-57.
134. Wagnerberger, S., et al., *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. *J Nutr Biochem*, 2013. 24(3): p. 531-8.
135. Ritze, Y., et al., *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e80169.
136. Giorgio, V., et al., Intestinal permeability is increased in children with non-alcoholic fatty liver disease, and correlates with liver disease severity. *Dig Liver Dis*, 2014. 46(6): p. 556-60.
137. Miele, L., et al., Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2009. 49(6): p. 1877-87.
138. Jin, R., et al., Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol*, 2014. 2014: p. 560620.
139. Pendyala, S., J.M. Walker, and P.R. Holt, A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology*, 2012. 142(5): p. 1100-1101.e2.
140. Ghanim, H., et al., Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care*, 2009. 32(12): p. 2281-7.
141. Karlsson, C.L., et al., The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. 20(11): p. 2257-61.

142. Ley, R.E., et al., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006. 444(7122): p. 1022-3.
143. Qin, J., et al., A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010. 464(7285): p. 59-65.
144. Frank, D.N., et al., Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(34): p. 13780-5.
145. Balmer, M.L., et al., The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med*, 2014. 6(237): p. 237ra66.
146. Moschen, A.R., S. Kaser, and H. Tilg, Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab*, 2013. 24(11): p. 537-45.
147. Tremaroli, V. and F. Backhed, Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012. 489(7415): p. 242-9.
148. Bäckhed, F., et al., Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(3): p. 979-984.
149. Rabot, S., et al., Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J*, 2010. 24(12): p. 4948-59.
150. Turnbaugh, P.J., et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006. 444(7122): p. 1027-31.
151. Le Roy, T., et al., Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*, 2013. 62(12): p. 1787-94.
152. Henao-Mejia, J., et al., Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 2012. 482(7384): p. 179-185.
153. Zhu, L., et al., Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, 2013. 57(2): p. 601-9.
154. Mouzaki, M., et al., Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2013. 58(1): p. 120-7.
155. Jumpertz, R., et al., Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011. 94(1): p. 58-65.



156. Li, Z., et al., Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2003. 37(2): p. 343-50.
157. Ma, X., J. Hua, and Z. Li, Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol*, 2008. 49(5): p. 821-30.
158. Esposito, E., et al., Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr*, 2009. 139(5): p. 905-11.
159. Velayudham, A., et al., VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced NASH model in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2009. 49(3): p. 989-997.
160. Vajro, P., G. Paoella, and A. Fasano, MICROBIOTA AND GUT-LIVER AXIS: A MINI-REVIEW ON THEIR INFLUENCES ON OBESITY AND OBESITY RELATED LIVER DISEASE. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2013. 56(5): p. 461-468.
161. Loguercio, C., et al., Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol*, 2005. 39(6): p. 540-3.
162. Vajro, P., et al., Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2011. 52(6): p. 740-3.
163. Lirussi, F., et al., Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(1): p. CD005165.
164. Aller, R., et al., Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011. 15(9): p. 1090-5.
165. Wong, V.W., et al., Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol*, 2013. 12(2): p. 256-62.
166. Lessa, A.S., et al., Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats. *BMC Veterinary Research*, 2010. 6: p. 6-6.
167. Sundaram, S.S., P.F. Whittington, and R.M. Green, Steatohepatitis develops rapidly in transgenic mice overexpressing *Abcb11* and fed a methionine-choline-deficient diet. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2005. 288(6): p. G1321-G1327.
168. Nardone, G., et al., Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010. 299(3): p. G669-G676.

169. Williams, C.D., et al., Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 2011. 140(1): p. 124-31.
170. Vajro, P., G. Paolella, and A. Fasano, Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013. 56(5): p. 461-8.
171. Compare, D., et al., Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012. 22(6): p. 471-6.
172. Miele, L., et al., Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(29): p. 5314-24.
173. Mehal, W.Z., The gut-liver axis: a busy two-way street. *Hepatology*, 2012. 55(6): p. 1647-9.
174. Paolella, G., et al., Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(42): p. 15518-31.
175. Resta-Lenert, S. and K.E. Barrett, Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 2003. 52(7): p. 988-97.
176. Raso, G.M., et al., Effects of a *Lactobacillus paracasei* B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem*, 2014. 25(1): p. 81-90.
177. Al-Muzafar, H.M. and K.A. Amin, Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. *BMC Complement Altern Med*, 2017. 17(1): p. 43.
178. Eslamparast, T., et al., Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr*, 2014. 99(3): p. 535-42.
179. Wang, Y., et al., Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009. 84(2): p. 341-7.
180. Asgharian, A., et al., The Effect of Symbiotic Supplementation on Liver Enzymes, C-reactive Protein and Ultrasound Findings in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Trial. *Int J Prev Med*, 2016. 7: p. 59.

181. Amin, K.A., H.H. Kamel, and M.A. Abd Eltawab, Protective effect of *Garcinia* against renal oxidative stress and biomarkers induced by high fat and sucrose diet. *Lipids Health Dis*, 2011. 10: p. 6.
182. Dhiman, R.K., et al., Probiotic VSL#3 reduces liver disease severity and hospitalization in patients with cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Gastroenterology*, 2014. 147(6): p. 1327-37 e3.
183. Harte, R.A., et al., Initiation of hyperinsulinemia and hyperleptinemia is diet dependent in C57BL/6 mice. *Horm Metab Res*, 1999. 31(10): p. 570-5.
184. Vessby, B., et al., Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia*, 2001. 44(3): p. 312-9.
185. Bäckhed, F., et al., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(44): p. 15718-15723.
186. Sabate, J.M., et al., High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis. *Obes Surg*, 2008. 18(4): p. 371-7.
187. An, H.M., et al., Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis*, 2011. 10: p. 116.
188. Chen, J., et al., *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*, 2012. 107(10): p. 1429-34.
189. Yoo, S.R., et al., Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. 21(12): p. 2571-8.
190. Park, D.Y., et al., Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e59470.
191. Wang, J., et al., Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J*, 2015. 9(1): p. 1-15.
192. Kadooka, Y., et al., Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 2010. 64(6): p. 636-43.

193. Karahan, N., et al., Effects of probiotics on methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in rats. *Turk J Gastroenterol*, 2012. 23(2): p. 110-21.
194. Lee, H.Y., et al., Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1761(7): p. 736-44.
195. H, F., et al., Reduction in serum lipid parameters by incorporation of a native strain of *Lactobacillus Plantarum* A7 in Mice. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 2010.
196. Cani, P.D., et al., Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, 2008. 57(6): p. 1470-1481.
197. Endo, H., et al., Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e63388.
198. Paik, H.D., J.S. Park, and E. Park, Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Biol Pharm Bull*, 2005. 28(7): p. 1270-4.