

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONALKOLİK STEATOHEPATİTİS (NASH) HASTALIĞINDA ROL
OYNAYAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

Genetik ve Biyomühendis Eylül Ece İŞLEK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ 2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONALKOLİK STEATOHEPATİTİS (NASH) HASTALIĞINDA ROL
OYNAYAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

Genetik ve Biyomühendis Eylül Ece İŞLEK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji AD. Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Ali SAZCI

KOCAELİ 2014

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İşbu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Ali SAZCI

Üye Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ

Üye Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr. Tuncay ÇOLAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) Hatalığında Rol Oynayan Genlerin Araştırılması

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAYKH, NAFLD) en şiddetli ve progresif formu olan Non-alkolik steatohepatitis (NASH); dünya genelinde %1-3 arasında seyretmektedir. NASH'te normal steatozun (yağlanma) yanı sıra; inflamasyon, fibrozis, Mallory-Denk cisimcikleri ve hepatosellüler balonlaşma gözlemlenerek siroz ya da hepatosellüler karsinoma (HSK) progresyon görülebilir.

Bilinen pek çok patojenik mekanizmaların yanı sıra çevresel, epigenetik ve genetik faktörler de NASH'ın oluşum mekanizmaları arasında rol oynamaktadır. Bu çalışmada genetik faktörlerin rolünün araştırılması hedeflenmiş olup; biri 'doğrulatory' diğeri ise 'aday' formda olmak üzere iki gen seçilmiştir. Doğrulatory gen olan PNPLA3 genin rs738407, rs738409, rs2896019 polimorfizmlerinin NASH'ın etiyolojisi ile ilgili olup olmadıkları araştırılmıştır. PNPLA3 gen rs738407, rs738409, rs2896019 polimorfizmlerinin NASH ile ilişki gösterdiği tespit edilmiştir ($\chi^2=13.193$, $P=0.001$; $\chi^2=18.225$, $P=0.000$; $\chi^2=6.144$, $P=0.046$ sırasıyla). Cinsiyete göre yapılan analizlerde de bu ilgili polimorfizmlerle NASH arasında ilişki saptanmıştır. Bu polimorfizmlerden rs738409 varyantı bir nonsynonymous (I148M) değişiklik olup; 'loss of function' etkisi yaratmaktadır. Diğeri polimorfizmler rs738407 ve rs2896019 intronlarda bulunarak, gen ekspresyon regülasyonu üzerinde etkili olabilecekleri düşünülmektedir.

Diğeri çalışılan gen 'aday' nitelikte olan LCN-2 (Lipocalin-2) genidir. Bu genin çalışılma nedeni; hepatosellüler koruyucu ve anti-inflamatuar etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. LCN-2 geninin SNP veritabanında belirtilmiş on beş adet nonsynonymous SNP'si bulunmaktadır. Bunların arasından PCR-RFLP'ye uygun olan beş tanesi çalışılmıştır (rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243). Bunların içerisinde yalnız LCN-2 gen rs139418967, rs147787222 polimorfizmleri 'SNP' özelliğinde olup; rs139418967 anlamlı, rs147787222 ise anlamsız sonuç vermiştir. Diğeri SNP'lerin bizim popülasyonumuzda 'SNP' özelliğini kazanmadıkları anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, PNPLA3 gen rs738407, rs738409, rs2896019 polimorfizmlerinin NASH ile ilişkisi bizim popülasyonumuz açısından ilk defa ve bu polimorfizmlerin popülasyona bağlı olmaksızın NASH ile ilgileri gösterilmiştir. Ayrıca, LCN-2 geninde çalışılan beş polimorfizmlerinin yalnız iki tanesinin bizim popülasyonumuzda 'SNP' özelliği taşıdığı tespit edilmiştir. Bu polimorfizmler (rs139418967, rs147787222) dünyada ilk defa bizim tarafımızdan çalışılarak bilim literatürüne kazandırılmıştır. Bu çalışmada çalışılan tüm SNP'ler için PCR-RFLP yöntemi ilk defa bizim tarafımızdan geliştirilmiştir. Bu çalışmada çalışılan her iki genin NASH ile olan ilişkisi gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, Non-alkolik steatohepatitis, PNPLA3, LCN-2, Polimorfizm, Bağlantı

ABSTRACT

The Investigation of The Genes Involved in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)

Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) whose prevalence varies between 1-3% worldwide is the severe and progressive form of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). There are some distinct differences like inflammation, fibrosis, Mallory-Denk bodies and hepatocellular ballooning between NASH and simple steatosis. NASH can further progress to cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma (HSC).

Besides the well-known pathogenic mechanisms, environmental, epigenetic and genetic factors also influence the pathogenesis of NASH. The purpose of this study is to find out what role the genetic factors may play in the NASH pathogenesis. For that purpose, two genes were selected to study. First, PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) gene was designated as a confirmatory and then, PNPLA3 gene rs738407, rs738409 and rs2896019 polymorphisms were examined whether they were associated with NASH. The PNPLA3 gene rs738407, rs738409 and rs2896019 polymorphisms showed differential associations with NASH ($\chi^2=13.193$, $P=0.001$; $\chi^2=18.225$, $P=0.000$; $\chi^2=6.144$, $P=0.046$, respectively) in overall NASH patients, controls and genders. The PNPLA3 gene rs738409 polymorphism, I148M, is a nonsynonymous substitution which leads to 'loss of function'. Conversely, PNPLA3 gene rs738407 and rs2896019 polymorphisms are located in the intron and may control the regulation of PNPLA3 gene expression.

Second, LCN-2 (Lipocalin-2) gene, which seems to be a candidate gene in this study, has a hepatocellular protective and anti-inflammatory properties. It can be said that there are fifteen nonsynonymous SNPs of LCN-2 gene according to the SNP database and only five of them (rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 and rs141366243) were selected to study by the PCR-RFLP methods developed in this study. Among the LCN-2 selected gene variants, only the rs139418967 and rs147787222 polymorphisms showed 'SNP' feature while others did not.

In conclusion, we report for the first time differential association of PNPLA3 and LCN-2 selected gene variants with risk for NASH in overall subjects as well as genders on the genotype and allelic levels in the Turkish population. The LCN-2 gene rs139418967 and rs147787222 variants were studied for the first in Turkish population and worldwide. So was the PCR-RFLP methodology. The data obtained using three SNPs for the PNPLA3 gene were accepted for publication in Genetic Testing and Molecular Biomarkers.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Non-alcoholic steatohepatitis, PNPLA3, LCN-2, Polymorphism, Association

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli bilgileri, ilgisi ve desteği ile yanımda olan çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Ali SAZCI'ya,

Katkı ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ, Doç. Dr. Emel ERGÜL ve Doç. Dr. Murat Kasap'a,

Çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Mavi Deniz ÖZEL ve Arş. Gör. Nihal ÜREN'e,

Tez çalışmam süresince beni hiç yalnız bırakmayan ve her koşulda yanımda olduğunu bildiğim sevgili ailem ve dostlarıma teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XIII
1.GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	14
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	45
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	46
3.1. Gereçler	46
3.1.1. Enzimler ve Primerler.....	46
3.1.2. Kimyasallar	47
3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	47
3.1.3.1. DNA İzolasyon Çözeltileri.....	47
3.1.3.2. Elektrophorez Çözeltileri.....	48
3.1.3.3. Gümüş Boyama Çözeltileri	49
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	49
3.1.5. Etik Kurul Onayı.....	49
3.1.6. Hasta Grubu.....	49
3.1.7. Kontrol Grubu	50
3.2. YÖNTEMLER.....	50
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	50
3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü	51
3.2.3. GENOTİPLEME	51
3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	51
3.2.3.1.1. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrophorezinde Kontrolü	52
3.2.3.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP).....	52
3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrophorezi.....	53

3.2.3.2.2. Gümüş Boyama.....	54
3.2.4 İstatiksel Analiz:	55
4.BULGULAR.....	56
4.1. PNPLA3 gen rs738407 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları.....	56
4.2. PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları.....	56
4.3. PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları.....	57
4.4. LCN-2 gen rs139418967 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları	57
4.5. LCN-2 Gen rs147787222 Polimorfizminin Genotip ve Allel Sıklıkları	58
TARTIŞMA.....	69
SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ADIPOQ : Adiponektin (Adiponectin)
- ADRB : Beta Adrenerjik Reseptör (Beta-Adrenergic Receptor)
- AKH : Alkolik Karaciğer Hastalığı (Alcoholic Liver Disease, ALD)
- ALT : Alanin Aminotransferaz
- APOC3 : Apolipoprotein C3 (Apolipoprotein C-III)
- APOE : Apolipoprotein E
- AST : Aspartat Aminotransferaz
- bç : Baz Çifti
- CD14 : CD14 Molecule
- CTGF : Bağ Doku Büyüme Faktör (Connective Tissue Growth Factor)
- Df: Degrees of freedom (serbestlik derecesi)
- ER : Endoplazmik Retikulum
- F : Forward Primer
- FATP5 : Yağ Asidi Transport Proteini (Fatty Acid Transport Protein)
- GCKR : Glukokinaz regulator, (Glucokinase (Hexokinase 4) Regulator)
- GWAS : Genom boyu bağlantı analizi çalışmaları (Genome wide association studies)
- HBV : Hepatit B Virüsü
- HCV : Hepatit C Virüsü
- HDL : High-Density Lipoprotein
- HFE : Hemokromatozis (Hemochromatosis)
- HSK : Hepatosellüler Karsinom
- İD : İnsülin Direnci
- IL-1 β : İnterlökin 1 beta (IL1B, Interleukin 1, Beta)
- IL-6 : İnterlökin-6
- LCN-2 : Lipokalin-2 (Lipocalin-2)
- LEPR : Leptin Reseptörü (Leptin Receptor)
- LPIN1 : Lipin 1
- LYPLAL1 : Lysophospholipase-Like 1
- MMP3 : Matrix Metallopeptidase 3
- MTHFR : 5,10-Methylene tetra hidrofolate reductase (5,10-Metilen tetra hidrofolat reduktaz)

MTTP : Mikrozomal Triglicerit Transfer Proteini (Microsomal Triglyceride Transfer Protein)

NAS : NAYKH Aktivite Skoru

NASH : Non Alkolik Steatohepatitis

NAYK : Non Alkolik Yağlı Karaciğer (Non- Alcoholic Fatty Liver, NAFL)

NAYKH : Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)

NCAN : Neuracan

NLRP : Nükleotid-bağlanım Oligomerizasyon Domain-benzeri Reseptör Proteinleri

NNMT : Nikotinamid N-metil transferaz (Nicotinamide-N- methyltransferase)

NOD : Nükleotid-bağlanım Oligomerizasyon Domaini

OR : Odds Ratio

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

PARVB : Parvin, Beta

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PEMT : Fosfatidil Etanolamin N-Metil Transferaz (Phosphatidylethanolamine N- Methyltransferase)

PNPLA3 : Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3

PPARGC1A : Peroksizom proliferator aktif reseptör gama koaktivatör 1 alfa (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha)

PPAR α : Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör alfa (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha)

PPAR γ : Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gama (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)

R : Reverse Primer

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)

SAMM50 : Sorting And Assembly Machinery Component

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

SOD2 : Superoxide Dismutase 2, Mitochondrial

SREBP-1 : Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1

T2D : Tip 2 Diyabet

TEMED : Tetrametiletilediamin

TG : Trigliserid

TGF- β 1 : Transforming Growth Factor, Beta 1

TNF : Tümör Nekroz Faktör

TNF α : Tümör Nekroz Faktör Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha)

UCP3 : Uncoupling Protein 3

VLDL : Çok düşük özgül ağırlığa sahip lipoprotein (Very Low Density Lipoprotein)

χ^2 : Chi-square (khi kare)



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. NAYKH'nın prevalansının farklı populasyonlara göre dağılımı.....	16
Şekil 1.2. NAYKH'nın Sınıflandırılması.....	17
Şekil 1.3. Makroveziküler/Mikroveziküler Steatoz Nedenleri.....	18
Şekil 1.4. NAYKH Progresyonu	18
Şekil 1.5. NASH Patogenezindeki 'Multiple Hit' yani 'Çoklu Vuruş' Hipotezi	19
Şekil 1.6. NAYKH'dan NASH Tanısına Giden Yol.....	20
Şekil 1.7. NAYKH Spektrumunun Histolojik Görüntüsü.....	21
Şekil 1.8. Hepatik Trigliseric Birikimi.....	25
Şekil 1.9. İnsülin Direnci ve NASH Progresyonu.....	26
Şekil 1.10. NASH'te Görülen Karaciğer Hasar Yolakları	27
Şekil 1.11. NAYKH'nın Patogenezinde Rol Oynayan Genler	31
Şekil 1.12. PNPLA3 Geninin 22. Kromozomdaki Lokasyonu	38
Şekil 1.13. PNPLA3 Gen I148M Polimorfizminin Sebep Olduğu Amino Asit Değişimi..	40
Şekil 1.14. PNPLA3 Gen I148M Varyantının Kronik Karaciğer Hastalığı Progresyonundaki Etkisi.....	41
Şekil 1.15. LCN-2 Geninin 9. Kromozomdaki Lokasyonu.....	42
Şekil 4.1. PNPLA3 gen rs738407 polimorfizminin 22. Kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jeldeki görünümü	63
Şekil 4.2. PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin 22. Kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jeldeki görünümü	64
Şekil 4.3. PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin 22.kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jel görünümü	65
Şekil 4.4. LCN-2 gen rs147792047 (A) ve rs141366243 (B) polimorfizmlerinin 9. kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jel görünümü.....	66
Şekil 4.5. LCN-2 gen rs139418967 (A), rs147787222 (B) ve rs140285982 (C) polimorfizmlerinin 9.kromozom üzerindeki yerleri ve poliakrilamid görünümü	67
Şekil 4.6. PNPLA3 gen rs738407, rs738409, rs2896019 polimorfizmlerinin bağlantı dengesizliği (Linkage Disequilibrium, LD).....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. GWAS Sonucu Tanımlanan ve NAYKH'nı Etkileyen Genetik Varyantlar ...	31
Çizelge 1.2. NAYKH ve NASH ile İlişkili Olan Genler.....	32
Çizelge 1.3. PNPLA3 Gen Varyantları ve Bu Varyantların p-Değerleri	39
Çizelge 1.4. Çalışmada Yer Alan LCN-2 Gen Polimorfizmleri.....	44
Çizelge 3.1. Polimorfizmlere Göre Kullanılan Primer Dizileri ve Enzimler	46
Çizelge 3.2. Polimorfizmlere Göre PCR İçin Annealing Koşulları ve Döngü Sayıları	52
Çizelge 3.3. Polimorfizmlere Göre RFLP İçin Kullanılan Enzimler, Tampon Çözeltileri, Distile Su, PCR Ürünü Miktarları, Kesim Reaksiyonu Sıcaklığı ve Kesim Süreleri..	53
Çizelge 3.4. Her Polimorfizm İçin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Koşulları	54
Çizelge 4.1. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda PNPLA3 rs738407 gen polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları ve cinsiyete göre dağılımları.....	59
Çizelge 4.2. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda PNPLA3 rs738409 gen polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları ve cinsiyete göre dağılımları.....	60
Çizelge 4.3. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda PNPLA3 rs2896019 gen polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları ve cinsiyete göre dağılımları.....	61
Çizelge 4.4. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda LCN-2 rs139418967 Gen Polimorfizmi polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları	62
Çizelge 4.5. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda LCN-2 rs147787222 Gen Polimorfizmi polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları	62
Çizelge 5.1: PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin farklı etnik gruplar arasındaki dağılımı.....	70
Çizelge 5.2: PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin farklı etnik gruplar arasındaki dağılımı.....	71

1.GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAYKH; NAFLD) çağımızın hastalığıdır. 1980'den önce tam anlaşılmasının yanı sıra, kökü endüstriyel devrim dönemine dayanır. Bunun sebebi de; besinlerin farklı şekilde işlenmeye başlanması ve bol miktarda besine karşın daha az fiziksel iş rağbetinin olması olarak söylenebilir. Bu hastalık, klinik tıbbın her alanını etkilemektedir ve artan prevalansı ile de etkilemeye devam edecektir (McCullough, 2006).

Karaciğer yağlanması bir histopatolojik bulgu olarak yıllardır bilinmesine rağmen yakın zamana kadar farklı bir hastalık olarak dikkate alınmamıştır. Karaciğer yağlanmaları hakkındaki bugünkü bakış açımız, 1980 yılında Ludwig sayesinde kazanılmıştır. Genel olarak düşünülen aksine Ludwig; hastalığı ilk tanımlayan kişi değil, hastalığa bu ismi veren ilk kişidir. Ludwig tarafından gösterilen yeni bakış açısı; histopatolojik bulguları alkolik karaciğer hastalığına benzediği halde alkol kullanmayan ya da önemli miktarda tüketmeyen kişilerde görülen bir hastalık tablosunun 'Non-alkolik Steatohepatitis (NASH)' (alkolsüz karaciğer yağlanması) olarak isimlendirilmesinden sonra şekillenmeye başlamıştır (Sonsuz, 2011). 'Önemli' olarak nitelendirilen miktarlar ise; günlük olarak erkeklerde 30 g'dan az, bayanlarda ise 20 g'dan az olan alkol tüketimi eşik sınırı olarak kabul edilmiştir (Tariq et al. 2014).

'Non alcoholic fatty liver disease', (NAFLD) yani Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH); kronik karaciğer hastalıklarının arasında göze en çok çarpan olup, farklı yaş grubundanki insanları etkiler. NAYKH'nın tanımı yapılırken; hepatik steatozun bir kanıtı olması (görüntüleme ya da histoloji ile) ve ikincil bir hepatik yağ birikimi için sebeplerin bulunmaması gerekmektedir (Chalasini et al. 2012). Karaciğer yağlanmasında rol oynayan ikincil sebepler; aşırı alkol kullanımı, ilaç tedavisi, kalıtsal bozukluklar (Wilson hastalığı, lipodistrofi gibi) olarak sıralanabilir (Younossi et al. 2014). Bir diğer deyişle NAYKH'nın tanısı yapılırken; hastanın 'önemli' bir alkol geçmişinin olmaması ve diğer karaciğer hastalık sebeplerinin ya da hepatik steatoz sebeplerinin hariç tutulması gerekmektedir (Pearlman et al. 2014). NAYKH; karaciğerdeki yağ içeriğinin artmış olması, yüksek değerdeki karaciğer enzimleri (hepatik transaminazlar, ALT, AST, alkalın fosfataz gibi diğer karaciğer enzimleri), ferritin (ferritinin; hepatik hasarı, inflamasyonu ya da insülin direncini belirttiği düşünülmektedir) ve lipid profilindeki değişimler ile

karakterize edilirken; obezite, tip 2 diyabet (T2D), insülin direnci ve dislipidemi'yi barındıran metabolik hastalıkların hepatik göstergesi olarak da tarif edilebilir. Ayrıca bu faktörlerin yanı sıra NAYKH, yüksek seviyelerdeki trigliserid (TG), düşük seviyelerdeki 'high-density lipoprotein' (HDL) kolesterol, yüksek kan basıncı, hasar gören glukoz toleransı ve kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkilidir. NAYKH'nın prevalansı yaşla, cinsiyetle ve etnik kökenle de ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda; NAYKH yaygınlığının yaşla arttığı görülmüştür (Chalasanı et al. 2012).

Bugüne kadar varsayılandan farklı olarak; NAYKH hastaları Hepatosellüler Kanser (HSK) geliştirme açısından çok yüksek risk taşımaktadırlar. Hepatit B ve Hepatit C (HBV/HCV) virüs enfeksiyonları, Hepatosellüler Karsinom'a sebebiyet açısından dünya genelinde en büyük risk faktörü olmalarına rağmen; obezite, T2D, alkol ve tütün suistimali de HSK riski ile ilişkilendirilmiştir. Almanya'da yapılan bir çalışma da görülmüştür ki; HSK etiyojisinde steatohepatitisin önemli rol oynadığı görülmüştür (Steatohepatitis'ten gelişen HSK, hastaların %24'ü iken; kronik HCV enfeksiyonu sonucu gelişen HSK %23.3). NAYKH'nın ileri safhalarının HSK geliştirebildiğini biliyoruz. Ayrıca steatoz, kriptojenik sirozdan HSK geliştirebilmesinin yanı sıra non-sirotik karaciğerden de geliştirebilir. Dolayısıyla, NAYKH'nın patogenezinde ve HSK'a dönüşümde rol oynayan moleküler yolların önemi artmaktadır (Naik et al. 2013).

1988-2008 yılları arasında National Health and Nutrition Examination Surveys'den toplanan verilere göre; diğer kronik karaciğer hastalıklarının prevalansı sabit kalırken, metabolik sendromun artışına istinaden NAYKH'nın da prevalansı hızla yükselmektedir (Puppala et al. 2012). Dünya genelinde, NAYKH'nın sıklığı %10-%50 arasında seyretmektedir (Hashimoto et al. 2014). NAYKH'nın yaygınlığı Batılı ülkelerin toplumları arasında da giderek artmaktadır. Batılı toplumlarda %35'e kadar gözlemlenebilmektedir (Naik et al. 2013). NAYKH ile günlük diyetin yakından ilişkisi olduğu için, obezite ve tip 2 diyabet ile bu risk daha da artmaktadır. Örneğin; İngiltere'nin genel popülasyonunda hepatik steatozun'un görülme sıklığı %17-33 olarak varsayılırken, bu sıklığın tip 2 diyabetli bireyler için daha da yüksek olabileceği (~%70) belirtilmiştir (Tariq et al. 2014). Ayrıca, NAYKH'nın prevalansı etnik farklılıkları da yansıtır; ABD'de, Afrikalı Amerikalılar'da görülen NAYKH sıklığının mütemediyen en düşük olduğu görülmüştür. Kaliforniya'da yapılan 159 kişilik NAYKH hastalarının popülasyon çalışmasında, non-Hispanik beyazlarda %45 olduğu tespit edilerek bunu Hispanikler'in (%28), Asyalılar'ın (%18) ve Afrikalı Amerikalılar'ın (%3) takip ettiği gösterilmiştir. Bütün grubun etnik

kompozisyonu kontrol edildikten sonra, Hispanikler'in en yüksek oranda, Afrikalı Amerikalılar'ın ise en düşük oranda NAYKH'nin prevalansını gösterdiği gözlemlenmiştir (Kim et al. 2008). Şekil 1.1'de NAYKH'nin prevalansının farklı populasyonlara göre dağılımı verilmektedir (LaBrecque et al. 2012). Ayrıca, Kafkaslar'ın ise ortada yer aldığı belirlenmiştir (Santoro et al. 2013).

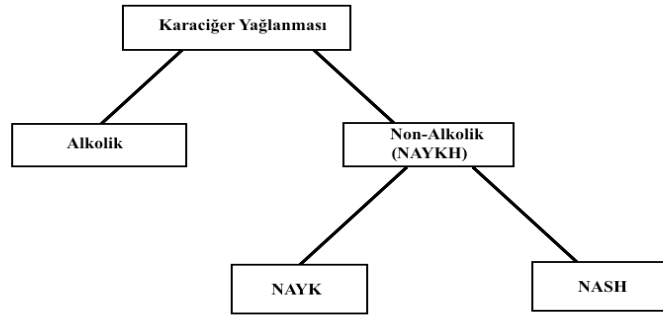
BÖLGE	ÇALIŞILAN POPULASYON	NAYKH'NİN BU POPULASYONLARDAKİ GÖRÜLME SIKLIĞI (%)
ABD	Pediyatrik Populasyon	13–14
	Genel Populasyon	27–34
	Morbid Obezite	75–92
	Avrupalı-Amerikalılar	33
	Hispanik-Amerikalılar	45
	Afrikalı Amerikalılar	24
Avrupa	Pediyatrik Populasyon	2.6–10
	Genel Populasyon	20–30
Batı Ülkeleri	Genel Populasyon	20–40
	Obezite ya da Diyabet	75
	Morbid Obezite	90–95
Dünya Geneli	Obez Populasyonu	40–90
Orta Doğu	Genel Populasyon	20–30
Uzak Doğu	Genel Populasyon	15
Pakistan	Genel Populasyon	18

Şekil 1.1. NAYKH'nin prevalansının farklı populasyonlara göre dağılımı (LaBrecque et al. 2012)

Japonya gibi doğu ülkelerinde ise NAYKH'nin prevalansı yaklaşık olarak %9.3 varsayılmaktadır. İlginç bir şekilde, Japonya'daki NAYKH hastalarının yaklaşık olarak yarısı aşırı kilolu değildir. Ayrıca, NAYKH'nin yaygınlığının farklı etnik gruplarda farklılık göstermesi; hepsinin metabolik sendrom oranlarının farklılığı (Afrikalı Amerikalılar için %21.6 vs beyazlar için %23.8 vs Meksikalı Amerikalılar için %31.9) ve bunun yanı sıra diğer genetik ve çevresel faktörler ile açıklanabilir (Kim and Younossi, 2008). Yakın tarihte ABD'de yapılan çalışmalar neticesinde, Amerikan populasyonunda

karaciğer enzim yüksekliği vakalarının %80'inin NAYKH'na bağlı olabileceği ve her Amerika'lı dört ya da beş yetiştinden birinde aslında NAYKH olduğunu belirtilmiştir. Asya ülkelerinde ise NAYKH'nın sıklığı %9-%40 arasındadır (Puppala et al. 2012). Ülkemizde de yağlı karaciğer hastalığının sıklığının %20-25 civarında olduğu tahmin edilmektedir.

Genellikle yağlı karaciğer yani diğer bir deyişle karaciğer yağlanması; alkolik ve non-alkolik olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 1.2). Alkol tüketiminin karaciğer hastalıklarına yol açtığı yüzyıllardır bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar ışığında, Alkolik Karaciğer Hastalığı; bayanlarda günlük 20 g üzeri, erkeklerde ise günlük 30 g üzeri alkol tüketiminde görülebilir yani NAYKH'nın tersi bir durum söz konusudur. NAYKH histolojik olarak, alkol (etanol) kullanımına bağlı karaciğer hasarından (Alcoholic liver disease, ALD; alkolik karaciğer hastalığı, AKH) ayırt edilemez. Şuan, NAYKH ile AKH hastalıklarının ortak patojenik süreç paylaştıkları düşünülmektedir (Liver International, 2006). NASH ve AKH hastalıklarının her ikisi de sitokin ve oksidatif stres aracılıklı karaciğer hasarını barındırırlar (Shimizu et al. 2007).



Şekil 1.2. NAYKH'nın Sınıflandırılması

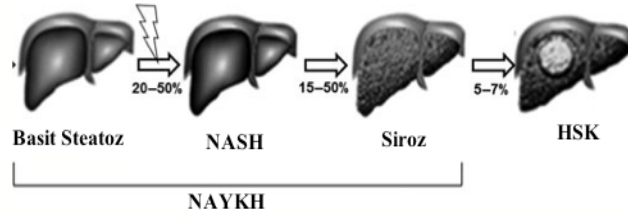
Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı'nı klinik olarak, kabaca ikiye ayırabiliriz. Bunlar; NAFLD (Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı, NAYKH) ve NASH (Non Alkolik Steatohepatitis)'tir. 'Steato' yağ; 'hepatit' ise karaciğerin iltihaplanması demektir. Sitoplazmada küçük yağ damlacıkları şeklindeki yağ birikimi 'mikroveziküler steatozis'; sitoplazmada çekirdeği kenara iten, büyük yağ damlacığı olursa 'makroveziküler steatoz' olarak adlandırılır (Şekil 1.3).

Makroveziküler Steatozis Nedenleri	Mikroveziküler Steatozis Nedenleri
<ul style="list-style-type: none"> • Alkolik karaciğer hastalığı • Obezite • Diabetes mellitus • Hepatit C enfeksiyonu 	<ul style="list-style-type: none"> • Alkolik karaciğer hastalığı • Reye sendromu • Gebelikte oluşan akut karaciğer hastalığı • Valporik asit toksitesi

Şekil 1.3. Makroveziküler/Mikroveziküler Steatozis Nedenleri

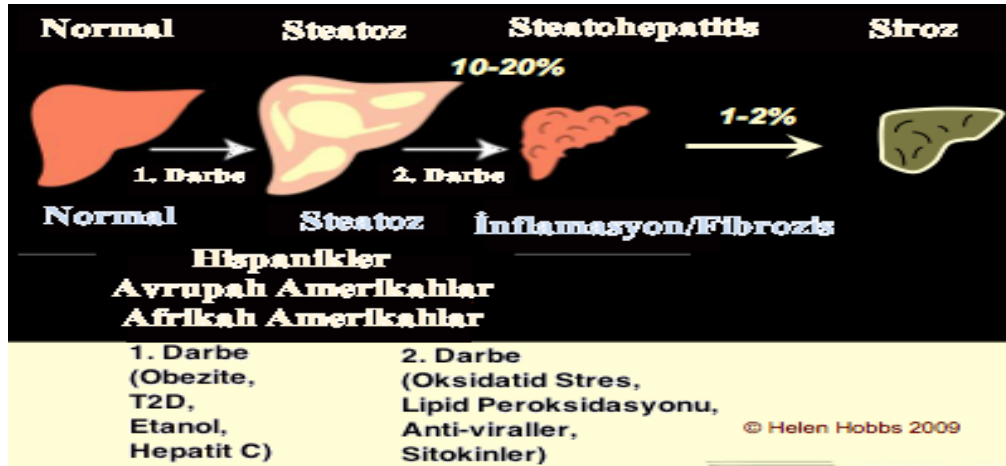
(<https://docs.google.com/document/d/1OYWECNu41GAoUciD7kH3okw79kiYhnUqRBalbZbvM/preview?pli=1>)

Karaciğerde fazla yağ birikimi sıklıkla iltihaplanmayı beraberinde getirir ya da bu yağ birikimi iltihaba yol açabilir. NAYKH daha çok benign ve non-progresif olmaya eğilimliken; NASH ise siroz ve nadiren Hepatosellüler Karsinom'a ilerleyebilir (Hashimoto et al. 2014). Şekil 1.4'te NAYKH'nın progresyonu basitçe şematize edilmiştir (Tariq et al. 2014). NASH'te, NAYKH'den farklı olarak, hepatosit balonlaşması şeklindeki hepatosellüler hasar görülmektedir (Chalasanı et al. 2012).



Şekil 1.4. NAYKH Progresyonu (Tariq et al. 2014)

NAYKH'da aslında, progresif aşamalar içeren geniş bir aralık görülmektedir. Bu ilerleyen aşamalar; nispeten benign steatoz (makroveziküler hepatik yağ birikimi), inflamasyon ve oksidatif stresin tetiklediği NASH, fibrozis ve son olarak hepatosellüler Karsinom'dur (Naik et al. 2013). İnsülin direnci ve oksidatif stresin NASH oluşumunda önemli etkileri olduğu düşünülmektedir. Ancak, NASH oluşumu kompleks bir yapıdır. Bu kompleks yapı da çevreyle etkileşim halindeki çoklu genetik faktörleri ve yaşam tarzını içerir. Çünkü NAYKH hastalarının sadece bir kısmı NASH geliştirmektedir (Kawaguchi et al. 2012).

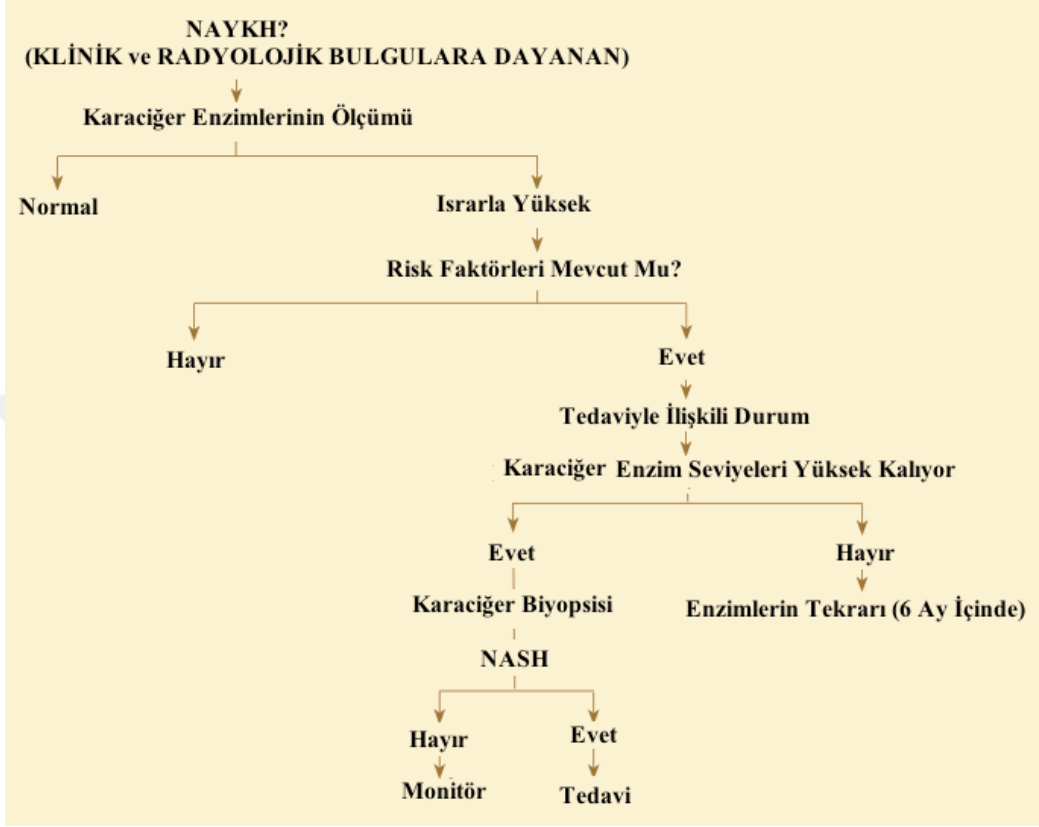


Şekil 1.5. NASH Patogenezindeki ‘Multiple Hit’ yani ‘Çoklu Vuruş’ Hipotezi

NAYKH'nın patogenezi halen daha soru işaretleri barındırır da, ‘iki vuruş/darbe’ hipotezi en çok geçerli olanıdır (Şekil 1.5). ‘İlk darbe’de; hepatositlerde yağ asitlerinin birikimine sebebiyet vererek karaciğer yağlanması ile sonuçlanır. Bundan sonra ilerlemezse de ‘basit yağlanma’ olarak kalmaktadır. ‘İkinci darbe’; Oksidatif stres, anormal sitokin üretimi, yağ metabolizması bozuklukları ve insülin direnci gibi faktörler aracılığıyla gerçekleşerek nekroinflamatuvar aktiviteyi ve fibrozisi tetiklemektedir (Çarlıoğlu et al. 2007).

NASH; hepatosit dejenerasyonu (hepatosit balonlaşması), nekroz, inflamasyon ve fibrozis gösterir. Fibrozisin varlığı, kronikliğe işaret etmektedir. Dolayısıyla da NASH tanısı, klinikopatolojik kriterler yani hem kliniğe hem de biyopsiye dayalı bilgi gerektirmektedir (Hashimoto et al. 2014). NAYKH ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda tanının heterojen olduğu ve çeşitli değerlendirme yöntemlerinden faydalanılarak konulduğu saptanmış olup; bu yöntemler Şekil 1.6’da şematize edilmektedir (Karaciğer biyopsisi, ultrasonografi gibi radyolojik testler ve karaciğer enzimlerini içine alan çeşitli kan testleri gibi). Karaciğer biyopsisi; tanı ve ‘staging’ yani evrelendirme için halen daha en iyi yöntemdir. Bu yöntem invazif bir yöntemdir. İnvazif bir yöntem olan biyopsi ve otopsi tanı için kullanılan bir yöntemdir. Son yıllarda, NAYKH ve NASH için bazı non-invasif tanı yöntemleri de kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bunlar biyopsinin ve otopsinin histoloji dayanaklı değerlendirmeleri kadar net bir tanımlama yapamazlar (Vernon et al. 2011). Non-invasif radyolojik yaklaşımlara Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), Ultrasonografi ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) örnek verilebilir. AST-ALT gibi karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesi de non-invasif yöntemlerdendir. Ayrıca non-invasif bir method olarak biyomarker testleri (The SteatoTest®, NAYKH fibrozis skor ve Kotrenen

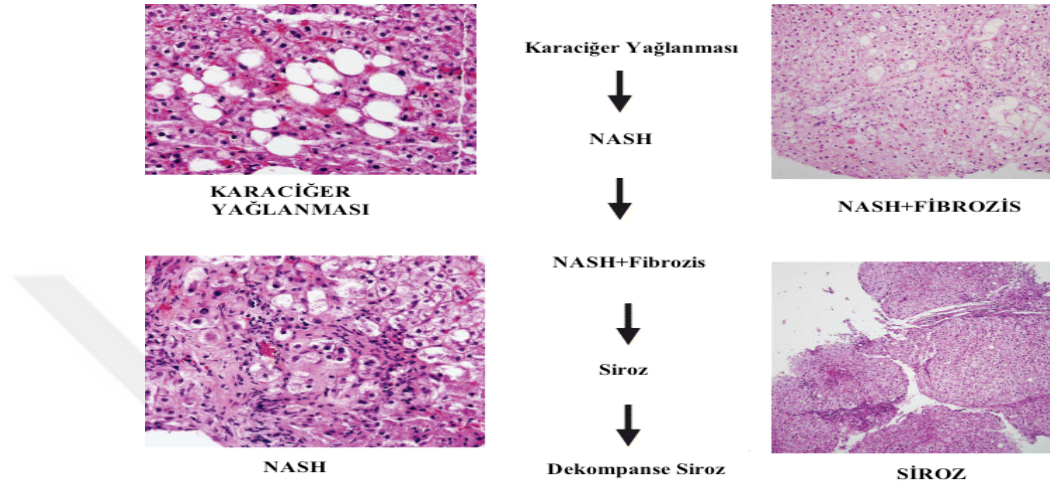
metodları gibi) de steatoz tanısı için kullanılabilir ve karaciğer biyopsisine olan ihtiyacı azaltabilir (www.patient.co.uk/doctor/steatohepatitis-and-steatosis-fatty-liver).



Şekil 1.6. NAYKH'dan NASH Tanısına Giden Yol (Kim and Youossi, 2008)

NAYKH'nın geniş bir aralığı olduğunu biliyoruz. Bu aralık; daha önce de belirttiğimiz gibi basit ilerleyici olmayan steatozdan, Non-alkolik Steatohepatitis'e yani NASH'e kadar uzanmaktadır (Şekil 1.7). Basit steatozdan NASH'a ilerlemede rol oynayan faktörler halen daha çok iyi anlaşılammıştır. NASH; inflamasyon, hepatosellüler balonlaşma ve zon 3'te Mallory-Denk cisimcikleri ile basit steatozdan ayrılır (Kucukoglu et al. 2014). Hepatositlerin toksinler ve immünolojik nedenlerle genişleyerek, sitoplazmalı ve boşluklu şekiller alması ve düzensiz hücre grupları yapmasına 'balonlaşma dejenerasyonu' (hepatosit hasarı) denilmektedir. Mallory Denk cisimcikleri ara filamentlerle alakalı kümeleşmelerdir (Strnad et al. 2008). Mallory Denk cisimcikleri benign steatoz ile NASH'i birbirinden ayırır. Hepatositlerin sitoplazmik hiyalin içermesidir. NASH ve diğer karaciğer hastalıklarıyla ilişkilidir (Zatloukal et al. 2007). Ayrıca, Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH); lipid metabolizmasındaki, hücresel

bütünlükteki, immün homeostazındaki ve doku onarımındaki düzensizlikleri içeren karmaşık bir hastalıktır. NASH oluşumu sırasında gerçekleşen patofizyolojik olaylar karaciğerin hem içinde hem de dışında gerçekleşir ve ince bağırsak ile adipoz dokudan yayılan sinyaller intrahepatik olaylarla birleştirilir (Duwaerts et al. 2014).



Şekil 1.7. NAYKH Spektrumunun Histolojik Görüntüsü
(<http://flipper.diff.org/app/items/5409>)

NASH'in, NAYKH spektrumu içerisinde spesifik bir alt grup olup, değişken miktarlardaki görülebilir yağ ve fibrozis ile karakterize edilen daha ciddi bir karaciğer hasarı olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, Non-Alkolik Steatohepatitis; NAYKH'nın en ilerleyici formudur (Sazci et al. 2008a). NASH, daha sonra, Siroz ve Hepatosellüler Karsinom'a ilerleyebilir ve karaciğerle ilgili ölümlerle de yüksek oranda ilişkilidir (Rozman, 2014). Kriptojenik Siroz'un en yaygın sebebi NASH'tir. T2D, obezite, insülin direnci ve hiperlipidemi NAYKH'da olduğu gibi sıklıkla NASH ile ilişkilidirler (Sazci et al. 2008b). NASH'in patolojik olarak dikkate değer bir steatohepatitis olarak tanımlanması için alkol, ilaç, toksin, infeksiyöz ajan ya da diğer teşhis edilebilir dış kaynaklı sebeplerin bulunmaması gerekmektedir (Farrell et al. 2007).

2010'da düzenlenen 'NAFLD/NASH of the European Association for the Study of the Liver (EASL)' kongresinde yapılan değerlendirmelere göre, karaciğer biyopsisi uygulanacak hastalar genellikle aşağıdaki formlardadır:

- Non-invazif yöntemlerle ilerlemiş fibrozis varlığı görülen ya da uyumsuz sonuçlar elde edilen metabolik sendroma sahip olan hastalar,

- NAYKH ile ilişkili olamayan kronik karaciğer hastalığı ve metabolik risk faktörlerinin belirtilerini bulduran hastalar (insülin direnci ve ultrasonografide steatoz varlığı),
- Bariatrik yani obezite ve kolesistektomi ile ilgili bir ameliyat geçiren hastalar (Véronique M et al. 2011).

Ayrıca, Serum ALT seviyesi NAYKH'da olduğu gibi, NASH tanısı için de önemli bir faktördür. Genel olarak, serum ALT seviyesi karaciğer biyopsisiyle desteklendiğinde, NAYKH'nın NASH ve ileri derecedeki fibrozise ilerleyip ilerlemeyeceği hakkında bize bilgi vermektedir. Ancak, normal ALT seviyeli hastaların tanısında, yüksek seviyedeki ALT'li hastalarınkine göre bir gecikme görülmektedir. Verma S. ve arkadaşlarının 2013 yılında, NASH ve ileri derecedeki fibrozis tayininde doğru ALT seviyelerini belirlemek için AUROC (alıcı işletim karakteristiği) analiz sistemini kullanarak yaptığı çalışmadan da anlayabileceğimiz gibi; normal ALT seviyeli hastaların yüksek ALT seviyeli hastalara oranla daha yaşlı olduğunu görüyoruz. Dolayısıyla karaciğer biyopsisinin erken tanı açısından ciddi bir öneme sahip olduğu görülmektedir. Karaciğer biyopsisinin sınırlı morbiditesi ve örnekleme hata riski olabilmesine karşın; NAYKH'da oluşabilecek tüm histolojik değişimleri değerlendirebildiğinden şuan için NASH ya da fibrozisin tanısında kullanılan en geçerli yöntemdir (Verma S et al. 2013).

NASH kendi içinde de alt kategorilere ayrılabilir. Bunlar; 'birincil' ve 'ikincil' NASH'tır. Birincil NASH, NASH'in baskın olan formudur ve metabolik sendromla ilişkisi bulunmaktadır. Yani; obezite, T2D, oksidatif stres, dislipidemi gibi durumlar söz konusudur. İkincil NASH de yine steatohepatitistir ancak bunun yanı sıra diğer sendromlarla (lipodistrofi, Wilson hastalığı gibi), bazı ilaç tedavileriyle ya da yan etkileriyle (amiodaron) ve morbid obezite cerrahileriyle birlikte seyretmektedir. Tam olarak kesin olmamakla beraber birincil ve ikincil NASH'in aynı patojenik mekanizmaları kullandıkları düşünülmektedir. Ayrıca, Alkolik steatohepatitis ve birincil NASH patogenezinde de ortak faktörlerin bulunduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, NASH'in çok iyi şekilde tetkik edilmesi gerekmektedir ki; aksi takdirde (çoğunlukla) birincil NASH olarak kabul edilir (Diehl et al. 2005).

NAYKH/NASH için ciddi bir sınıflandırma Matteoni, Brunt ve NASH Klinik Araştırma Ağı Patoloji Komitesi 'NASH Clinical Research Network Pathology Committee' (NAYKH Aktivite Skor-NAS'ı yazarlar) tarafından ileri sürülmüştür. 1999'da

Matteoni ve arkadaşları hastaları dört ayrı kategoriye bölmüşlerdir (tip 1, tip 2, tip 3, tip 4). Tip 1’te sadece steatoz görülürken, Tip 2’de ise steatozun yanı sıra lobüler inflamasyon da görülmektedir. Tip 3’te steatozun yanında balonlaşma dejenerasyonu da devreye girerken, Tip 4 ise hem Tip 3 özelliklerini hem de Mallory Denk cisimcikleri ve fibrozisi beraberinde getirmektedir. Tip 1 ve Tip 2 ‘non-NASH’ grubu olarak farz edilirken, Tip 3 ve Tip 4 ise ‘NASH’ olarak farz edilmektedir. Bu düşüncenin doğruluğu; Tip 3 ve Tip 4’ün Siroz ve karaciğerle ilgili ölümlerle olan ilişkisinin Tip 1 ve Tip 2’ye oranla daha yüksek olmasıyla da desteklenmektedir. Matteoni ve arkadaşlarına göre de aynı yorum yapılmaktadır. Balonlaşma dejenerasyonu ve steatoz NASH tanısı için geçerli iken steatoz ve inflamasyon (şiddetli olsa bile) tanı için yeterli değildir. Brunt ve arkadaşları ise NASH için yarı nicel bir analiz ileri sürmüşlerdir. Bu analiz; steatoz, inflamasyon ve balonlaşma dejenerasyonu için derecelendirme ve fibrozis için ise evrelendirme analizini kapsamaktadır. NASH Klinik Araştırma Ağı Patoloji Komitesi ise Brunt ve arkadaşlarına dayanarak, NAS’ı (NAYKH Aktivite Skor) geliştirmişlerdir. ≥ 5 olan skorlar NASH tanısı ile ilişkilendirilmiştir (Hashimoto et al. 2014).

Yaklaşık olarak NAYKH hastalarının 10-20%’sinde NASH’e ilerleme görülmektedir. NASH’li hastaların fibrozis ve Siroz geliştirmeleri muhtemeldir ve böylelikle karaciğer dekompanseasyonu yani işlev bozukluğu hatta hepatosellüler karsinom’a yol açabilir (Ganz and Szabo, 2013). NASH’li hastaların %25’inde Siroz görülebilir (Schwenger and Allard, 2014). ‘Yalnızca steatoz’lu hastaların yaklaşık olarak %3’ünde 10-20 yıllık dönemde siroz görülebilirken; NASH’li hastaların %5-8’i yaklaşık beş yıl içerisinde siroz geliştirebilirler (Pettinelli Pet al. 2011). NASH’in tetiklediği Siroz; Amerika’da karaciğer transplantasyonu sebepleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. İnflamatuar çevreden dolayı da NASH ve Siroz hastalarının %4-27’si hepatosellüler karsinom’a ilerleyebilirler (Kessler et al. 2014).

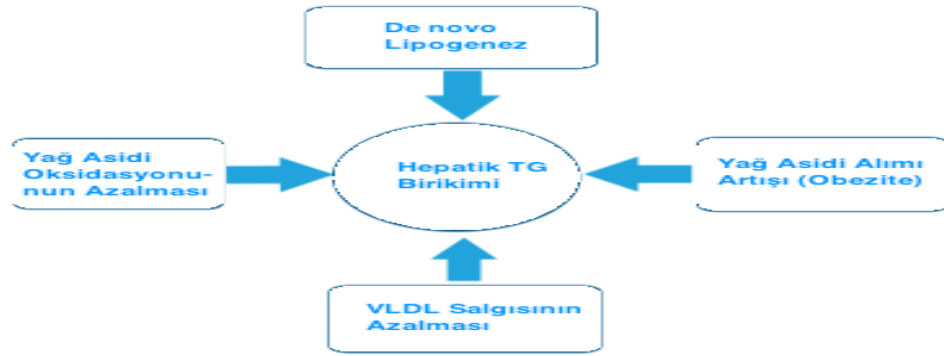
NASH’in genel olarak prevalansı %2-3’tür (Younossi et al. 2014). NASH’in Japonya’daki prevalansı yaklaşık olarak %1-8’dir. Avrupa genelinde yaklaşık olarak %5, Amerika’da ise %5.7-17’dir (McCullough AJ, 2006). Karaciğerde aşırı yağ birikiminin %20-30 olduğu Amerika ve Avrupa Ülkelerinde NASH’in popülasyondaki prevalansı %1-3’tür (Ludwing et al. 1980). Yaklaşık olarak, Amerika’nın genel popülasyonunda 6 milyon kişide NASH görülebilmektedir. NAYKH’da olduğu gibi, NASH prevalansı Hispanikler’de (beyazlara oranla) daha yüksek olmakla beraber Afrikalı Amerikalılar’da

daha düşük (obezitenin oranı yüksek olmasına karşın) seyretmektedir (Erickson, 2009). NASH'li hastaların %70'den fazlası şişman olup; %20-80'inde kolesterol yüksekliği görülmektedir. NASH hastalarının tanı anında %30'undan fazlasında T2D olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, NASH'li hastaların %8-20'sinde lipid metabolizması hasarlı bulunmaktadır. Metabolik Sendrom faktörlerinden biri olan obezite ile NASH arasında da ciddi bir ilişki mevcuttur. Bu durum; obezlerde NASH prevalansının, kilosu normal kişilere oranla altı kat daha fazla olmasıyla doğrulanmaktadır. Morbid obez erkeklerdeki NASH prevalansı da, morbid obez bayanlara göre iki kat daha fazla bulunmaktadır. Morbid obezlerin %24'ünde NASH, %3-11'inde siroz görülebileceği belirtilmiştir (Gören B ve Fen T, 2005).

Memelilerde karaciğer; metabolik homeostazisten sorumlu olan organ olup; karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarını kontrol eder. Karaciğerin yağları depolama gibi bir görevi bulunmadığından, normal fizyolojik şartlar altında hepatik trigliserid konsantrasyonu düşük seyretmektedir. Ancak tokluk ve açlığa istinaden karaciğere ve karaciğer dışına yağ asidi ve trigliserid açısından ciddi anlamda bir hareket söz konusudur (Kawano and Cohen, 2013). NAYKH'nın karaciğerde hepatositlerin sitoplazmalarında lipid birikimiyle karakterize edildiği bilinmektedir (Şekil 1.8). Yani; yağ hücrelerinde lipolizin artmasıyla ya da günlük yağ alımının artmasıyla, serbest yağ asitlerinde de artış görülmektedir. Yağlı karaciğerde toplam lipid miktarı, karaciğer ağırlığının %50'sine kadar çıkmakta ve bunların yarısından fazlasını trigliseridler oluşturmaktadır. Mitokondriyal işlev bozuklukları da yağ asidi beta (β) oksidasyonundaki bozukluk sayesinde lipid birikimine yol açarak NAYKH'na sebebiyet verebilmektedir. Zaten mitokondriyal işlev bozuklukları insülin direnci ile de alakalıdır. Hepatik steatoz yani yağlanma ayrıca, karaciğerdeki '*de novo* lipogenez' vasıtasıyla da sağlanmaktadır. *De novo* lipogenez; ince bağırsaktan karaciğere ulaşan karbonhidratı (CHO) yağ asidine dönüştüren enzimatik bir yoldur. Yani; glikozu Asetil KoA'ya dönüştürerek glikolizi, doymuş yağ asitlerinin biyosentezini ve trigliserid (TG) oluşumunu sağlar. NAYKH hastalarının karaciğerlerindeki trigliserid içeriğinin %30'unun bu yolla temin edildiği düşünülmektedir (Dubuquoy et al. 2011). Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1 (SREBP-1) bir transkripsiyon faktör olmakla beraber karaciğerdeki *de novo* lipogenezin büyük bir bölümünden sorumludur. İnsülin tarafından olumlu bir şekilde regüle edilir. Endoplazmik Retikulum stresi; aşırı enerji girişinden dolayı, lipidlerin karaciğerden dışarı taşınmasına yardımcı olan apolipoprotein B gibi proteinlerin sentezine olan ihtiyacın

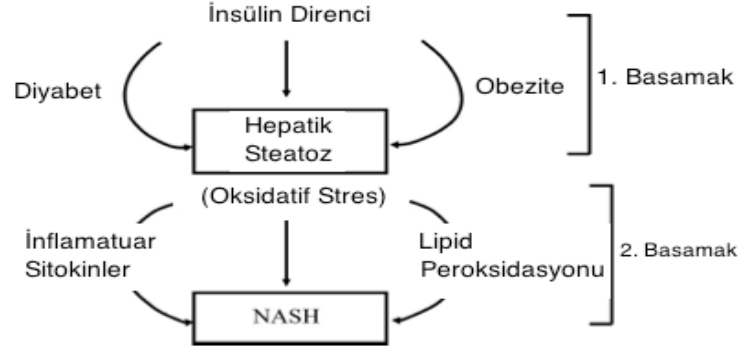
artmasından kaynaklanabilir. Endoplazmik Retikulum stresinin varlığında, SREBP-1 insülininden bağımsız olarak upregüle olur.

İnsülin direnciyle alakalı olan lipid açıklığındaki azalmanın da yağlanmayı tetiklediği bilinmektedir (Koo SH, 2013). Hepsini toparlayacak olursak; normal şartlar altında lipid homestazisi yağ asidi girişi ve çıkışı ile dengelenmektedir. Yağ asidi girişi günlük yağ, adipoz doku ve *de novo* lipogenezi ile sağlanırken; yağ asidi çıkışı ise metabolizma formlarında yani oksidasyonla ve VLDL şeklinde dışa gönderimle sağlanmaktadır (Duwaerts and Maher, 2014). Bunların hepsi 'ilk vuruş-darbe' faktörleri olmakla beraber sonuç olarak karaciğerde yağlanma görülmektedir.



Şekil 1.8. Hepatik Trigliserid Birikimi (Koo SH, 2013)

İnsülin; adipoz dokuda serbest yağ asidi esterifikasyonuna ve trigliserid yağ depolanmasına imkan verir (Şekil 1.9). İnsülin Direnci (İD), basit olarak, insüline duyarlı hücrelerin insüline normal yanıt verememesi olarak tanımlanabilir. İD geliştiği zaman; serbest yağ asitleri uygun olmayan biçimde karaciğer gibi adipoz olmayan (non-adipoz) dokulara yönelirler. Lipoliz inhibisyonunun azaltarak ve '*de novo* lipogenez'i arttırarak İD'i; karaciğere olan serbest yağ asidi akışını arttırır. Ayrıca İD'nin yağ birikimi dışındaki bir diğer sonucu ise trigliserid ve kolesterol esterlerinin hepatositlerden periferik taşınmasında rol oynayan Apolipoprotein B-100 sentezini baskılamasıdır. İnsülin Direnci NASH'in progresyonuna sebebiyet verdiği için 'ilk vuruş'ta önemli rol üstlenmesinin yanı sıra 'ikinci vuruş'ta da etkilerini devam ettirmektedir.



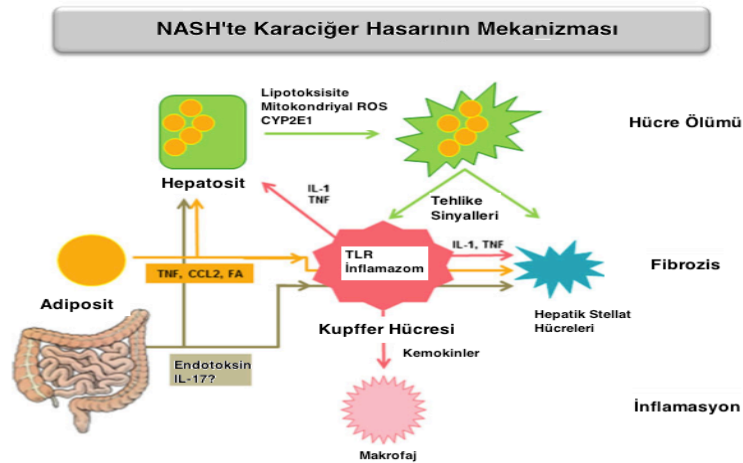
Şekil 1.9. İnsülin Direnci ve NASH Progresyonu (McCullough, 2006)

Yağ kütesinin artmasıyla ve adiposit farklılaşmasıyla, bu hücreler çeşitli sitokinler üretirler. Bu sitokinlerden adiponektin ve leptin insülin duyarlılığını artırıcı yönde etkilidir. İD ve obezite ‘koruyucu adipokin’ olan Adiponektin’in azalmasına neden olur. Adiponektin karaciğer glikoneojenezini engeller ve lipogenezi baskılar. Böylelikle düşük adiponektin yağ asidi oksidasyonunu engeller ve karaciğerde yağ birikimini artırır. Obezite geninin (ob) ürünü olan Leptin’in eksikliği İD’i, glukoz intoleransı ve karaciğer steatozu gibi sorunlarla birlikte görülmektedir. NASH’te serum leptin düzeyleri yüksek seyretmektedir ve fibrogenezis ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Ancak NAYKH’da sorun direkt olarak leptin düzeyi ile ilgili değil de leptin rezistansı ile ilişkili görülmektedir. Resistin, TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa) ve IL-6, IL-8 (İnterlökin-6 ve 8) ise İD veya bunun sonucunda ortaya çıkan metabolik bozuklukları artırıcı etkilere sahiptir. Obezlerde serum ve yağ dokusunda resistin düzeylerinin artmış olduğu görülmektedir. Hepatik glikoz üretimini ve *in vitro*’da adipositlerden glikoz alımını azaltarak İD ile alakalıdır. TNF- α ’nın karaciğer yağlanması NASH gibi ilerleyici hastalık formlarına dönüşmesinde etkili olan ‘ikincil vuruş’ faktörlerinden olduğu düşünülmektedir. TNF- α ; NAYKH hastalarında, obezlerde ve T2D’de artmaktadır ve hepatik İD’ne sebebiyet vermektedir. Bunun yanı sıra, mitokondriyal geçirgenliği artırarak, mitokondriyal solunuma hasar verir (McCullough, 2006). IL-8, IL-6 ve TNF- α gibi adipositokinler; lipid peroksidasyonu aracılığıyla hepatik inflamasyona katkıda bulunurlar. Apoptoz, lipotoksisite ve reaktif oksijen türlerinin artmasıyla da serbest yağ asitleri NASH’i tetiklemektedir (Walenbergh et al. 2013).

NASH’teki karaciğer hasarı; inflamasyon, fibrozis ve hücre ölümünü barındırır. Yani burada ‘ikincil vuruş’tan söz etmek mümkündür. Hücre ölümüne neden olaylarda lipotoksisite ve oksidatif hasar ön plandadır. Doymuş yağ asitlerinin, kolesterolün ya da diğer toksik lipidlerin (uzun zincirli doymuş yağ asitleri; palmitat, stearat) hücre içinde

birikiminden lipotoksisite meydana gelmektedir. Doymuş yağ asitleri; Jun N-terminal kinazı (JNK) ve mitokondriyal ölüm yollarını aktive ederek hepatositleri öldürür (JNK, NASH hastalarının karaciğerlerinde aktive olur). Mitokondriyal işlev bozuklukları ya da sitokrom CYP2E1 (P450 2E1)'in aşırı aktivitesi aracılığıyla üretilen reaktif oksijen türleri ise oksidatif hasara sebebiyet vermektedir. CYP2E1 yağ asitlerini oksitler ve İD'nin sonuçlarından biridir. Hepatositler ölmeye başladığında tehlike sinyalleri salınmaya başlar. Bu sinyaller Kupffer hücrelerini ve hepatik stellat hücrelerini aktive eder. Sonrasında da sırasıyla inflamasyon ve fibrozis görülür (Şekil 1.10).

Kupffer hücreleri tehlike sinyallerine iki yol ile cevap verir. Bunlar; Toll benzeri reseptörler ve inflamazomdur. Toll benzeri reseptörler büyük bir aile olup, NASH ile ilgili her çeşit bileşiği (doymuş yağ asitleri, bakteriyel endotoksinler, hasarlı hücrenin DNA'sı gibi) fark ederler. Toll benzeri reseptör -2, -4 ve -9'un NASH patogeneziinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu reseptörlerin ortaklaşa çalışmalarıyla NF- κ B aktive olur ve pro-inflamatuar sitokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonları gerçekleşir. Kupffer hücrelerinde Toll benzeri reseptörlerin aktivasyonu ile uyarılan sitokinler ise TNF ve IL-1 β 'dir. Bu sitokinler hepatositlere etki ederek yağlanmayı ve sitotoksisiteyi artırır. Ayrıca, bu sitokinler hepatik stellat hücrelerini uyararak; fibrozisi tetikler. İnflamazomlar; nükleotid bağlanım oligomerizasyon domain (NOD) benzeri reseptör proteinlerinin (NLRP) etrafında lokalizedirler. NASH ile ciddi alakası bulunan inflamazom; NLRP3'tür. Yağlı karaciğerde tam anlamıyla inflammatuar bir etkinin yaratılabilmesi için; Toll benzeri reseptörlerin ve inflamazomların arasında koordinasyon bulunması şarttır.



Şekil 1.10. NASH'te Görülen Karaciğer Hasar Yolları (Duwaerts and Maher, 2014)

Adipoz dokunun ve ince bağırsağın da NASH geliştirmedeki önemi bilinmektedir. Adiposit kökenli yağ asitleri ve sitokinlerin de, aynı yolları kullanarak, steatoz, inflamasyon ve fibroziste rol oynadığı belirtilmektedir. İnce bağırsağın ise endotoksin kaynağı olmakla birlikte bağırsak bakterisi kökenli IL-17'nin NASH patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Duwaerts and Maher, 2014).

Genetik faktörler denildiğinde aklımıza ilk gelen tanım DNA varyasyonlarıdır. DNA varyasyonları; duplikasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar veya transpozisyonlar şeklinde olabilir. Bu varyasyonların hastalıkla ilişkisi olabilir ya da olmayabilir. Populasyonda tekrarlayan mutasyonlar şeklinde açıklanamayan, yaygın şekilde görülen DNA varyasyonlarına 'polimorfizm' denir (Strachan and Read, 2004). Bir varyasyonun polimorfizm olarak adlandırılabilmesi için, populasyonda en az %1 oranında görülmelidir. Eğer %1'den az ise 'mutasyon' tanımına dahil olmaktadır. DNA dizisinde en sık görülen polimorfizmler, 'tek nükleotid polimorfizmleridir' (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Tek nükleotid polimorfizmleri DNA'da meydana gelen tek nükleotid değişimleridir. Bu değişim sonucunda ise belirli bir gende ekspresyon değişimi ya da eksprese olan (ifade olan) proteinde fonksiyon değişikliği görülebilmektedir (Mehta et al. 2014). Tek Nükleotid Polimorfizmleri; her 100-300 baz çiftinde bir görülür. Tek nükleotid değişimlerine örnek olarak; AGGGCTAA şeklindeki bir dizinin ACGGCTAAA formuna dönüşmesi gösterilebilir. Burada ikinci nükleotitte Guanin>Sitozin değişimi göze çarpar. Bu değişimler kodlama bölgesinde (ekson) veya kodlanmayan bölgelerde (intron, promotor bölgesinde) olabilirler.

Tek nükleotid polimorfizmleri evrimde iyi korunmuşlardır. Nesilden nesile çok fazla değişim göstermezler. Bu sebeple populasyon çalışmalarında takibi daha kolaydır. İnsan DNA dizisinin %99'u aynıdır. DNA dizisi üzerinde bulunan SNP'lerin, hastalığın dış faktörlere (Bakteri, virüs, toksin, kimyasallar, ilaç vb.) nasıl yanıt vereceğinde önemli bir etkisi vardır. Bu sebeple SNP araştırmaları; biyomedikal ve farmakoloji alanlarında, hastalıklara tanı konmasında oldukça önem kazanmıştır (www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome).

1980'li yılların başında DNA polimorfizmleri marker olarak geliştirilmeye başlanmıştır. Bu markerları saptamada kullanılan ilk yöntem restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmidir (RFLP). Değişimi içeren DNA dizisi PCR ile çoğaltılır. Bu değişimin, bir restriksiyon enzimi tanıma bölgesi üzerinde olup olmaması, kesim sonrası oluşacak fragmanların büyüklüklerini belirler.

Dünya üzerindeki tüm nükleotid varyasyonlarının aynı veri tabanında toplanması için, akademik ve endüstriyel birimlerin ortaklığıyla bir konsorsiyum oluşturulmuştur. Bu veri tabanında 12 milyondan fazla varyasyon (tek nükleotid polimorfizmleri, insersiyon/delesyonlar, kısa ardı ardına tekrarlar) bulunmaktadır. Bu site aracılığıyla şimdiye kadar belirlenmiş SNP'lerle ilgili bilgilere ulaşılabilir (NCBI: National Center for Biotechnology Information-dbSNP).

Genetik bağlantı analizleri; 'aile temelli vs popülasyon temelli' ve 'aday gen çalışmaları vs genom boyu bağlantı çalışmaları (GWAS)' şeklinde iki geniş bölüme ayrılabilir.

Genom boyu bağlantı çalışması (GWAS) güçlü ve bir hipoteze bağlı kalmayan bir yaklaşım olmakla beraber, belirli bir hastalıkla ilgili genetik varyasyonları araştırmak için pek çok kişinin hızlı bir şekilde genomunun taranmasıdır. GWAs sadece fenotiple ilişkili olan gen bölgesini tanımlayabilir. 2003 yılında İnsan Genom Projesi'nin (Human Genome Project), 2005 yılında ise Uluslararası HapMap Projesi'nin (International HapMap Project) tamamlanmasının ardından bu tarz çalışmalar yapılarak; genetiğin yaygın hastalıklara olan etkisi araştırılmaktadır. Referans insan genom dizisi, insan genetik varyasyon haritası ve güncel teknoloji kullanılarak, tüm genom örnekleri genetik varyasyonlar açısından çalışılmaktadır (www.genome.gov/20019523).

Aday gen bağlantı çalışmaları ise çok yaygın bir yöntem olmakla beraber öncelikli bir hipoteze dayanarak yapılan yaklaşımlardır. Dolayısıyla seçili genler üzerine yoğunlaşılır çünkü bu genlerin hastalığındaki etiyolojik rolü daha önceden bir hipoteze dayandırılmaktadır. Kişilerin sahip oldukları fenotiple genetik varyasyonlar arasında bağlantı kurar. Aday gen çalışmalarında kullanılan varyasyonlar direk olarak probleme sebebiyet verebileceği gibi problem yaratan esas genin yanında yani 'bağlantı dengesizliği' (linkage disequilibrium) içinde de bulunabilirler. Seçilen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) sınırlı olması maliyeti düşürdüğü için de aday gen bağlantı çalışmaları tercih edilen bir yöntemdir.

(www.nchpeg.org/bssr/index.php?option=com_k2&view=item&id=70:candidate-gene-study&Itemid=119)

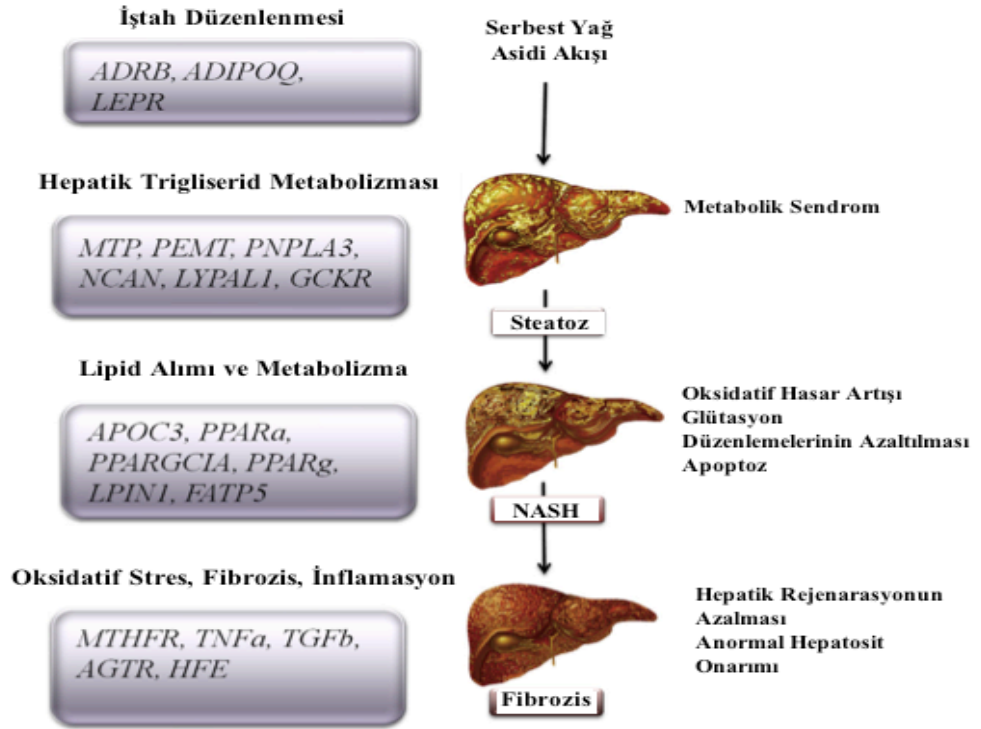
Aday gen bağlantı çalışmaları, vaka-kontrol SNP bağlantı çalışmaları ile senkronize bir biçimde yürütülmektedir. Poligenik hastalıkların çalışılmasında aile çalışmaları ve popülasyon vaka-kontrol çalışmaları kullanılmaktadır. Popülasyon vaka-kontrol çalışmaları; tüm genom tarama ya da aday gen çalışmalarını kapsayabilir. Vaka-kontrol çalışmalarının elverişliliğinden ve verimliliğinden dolayı yaygın durumlarda şüpheli risk

faktörleri açısından bir ön eleme için ideal bir yöntemdir. Aday gen vaka-kontrol çalışmaları yapılırken; çalışma dizaynı, vaka ve kontrol temini, aday genlerin seçilmesi, çalışma için seçilen polimorfizmlerin fonksiyonel olarak önemi ve istatistiksel analiz dikkatle yapılmalıdır aksi takdirde; doğru sonuçlar elde edilemez (Daly, 2003).

NAYKH'nın mekanizmasını düşündüğümüz zaman Metabolik Sendrom, T2D, obezite, İD gibi faktörlerin hastalığın seyrini, şiddetini ve ilerleyişini etkilediğini bilinmekle birlikte; genetik ve çevresel faktörlerin de NAYKH'da rol oynadığı bilinmektedir. Bu faktörler sayesinde populasyonlar arasında seyreden fenotipik çeşitlilikler açıklanmaya çalışılmaktadır.

NAYKH'nın patogenezinde rol oynayan yollar ile bu yollara etki eden gen polimorfizmlerin önemi merak uyandırmaktadır (Şekil 1.11). Örneğin; obezite ve T2D ile ilgili olan genetik polimorfizmler, mevcut çevresel faktörlerin de etkisiyle, lipid metabolizması, oksidatif stres, fibrojen ve inflamasyon gibi yolları etkileyerek NAYKH'nın gelişimine katkıda bulunabilir. NAYKH ile genetik arasındaki ilişkinin anlaşılmasıyla, hastalığın patogenezi ile ilgili yeni bakış açıları, yeni tanı araçları ve yeni terapötik hedefler geliştirilebilir. (Mehta et al. 2014).

NAYKH'da ileri düzeyli fibrozise etki eden genetik faktörlerle ilgili olarak yapılan aile kümele çalışmalarından elde edilen bilgilere göre de; NASH hastalarının benzer şekilde etkilenenlerinin yaklaşık olarak beşte birinin birinci dereceden akraba olduğu görülmüştür. Böylelikle akillara ortak gen havuzu gelebilir. NAYKH'daki fibrozis gelişimiyle ilgili bilinen genetik faktörler, alkolik karaciğer hastalığına ve Hepatit-C hastalığına oranla daha azdır. Dolayısıyla, önceki paragrafta da belirtildiği gibi, NAYKH'nın patogenezinde rol oynayan varyasyonlar ve bu varyasyonları içeren genler dikkat çekmektedir (Osterreicher and Brenner, 2007).



Şekil 1.11. NAYKH'nın Patogenezinde Rol Oynayan Genler (Mehta et al. 2014)

Çizelge 1.1. GWAS Sonucu Tanımlanan ve NAYKH'nı Etkileyen Genetik Varyantlar

GEN	SNP	Kromozom	STEATOZ' DAKİ ETKİSİ	NASH/FİBROZİS/ İNFLAMASYON'DAKİ ETKİSİ	Referanslar
PNPLA3	rs738409 rs6006460 rs3810622 rs2896019	22	↑ ↓ ↑ ↑	↑	Dongiovanni et al. 2013 Romeo et al. 2008 T. Kitamoto et al. 2013
FDFT1	rs2645424	8		↑	Dongiovanni et al. 2013
COL13A1	rs1227756	10		↑	Dongiovanni et al. 2013
EFCAB4B	rs887304	12		↑	Dongiovanni et al. 2013
NCAN	rs2228603	19	↑		Dongiovanni et al. 2013
LYPLAL1	rs12137855	1	↑		Dongiovanni et al. 2013
GCKR	rs780094	2	↑		Dongiovanni et al. 2013
PPP1R3B	rs4240624	8	↑		Dongiovanni et al. 2013
SAMM50	rs738491 rs3761472 rs2143571 rs6006473	22	↑	↑	T. Kitamoto et al. 2013
PARVB	rs5764455 rs6006611	22	↑	↑	T. Kitamoto et al. 2013

Çizelge 1.2. NAYKH ve NASH ile İlişkili Olan Genler

Hepatik Triglicerid Sentezinde, Depolanmasında ve Sevkiyatında Rol Oynayan Polimorfizmlerin Genleri	Lipid Metabolizmasını Etkileyen Polimorfizmlerin Genleri	Adipogenez, İştah Regülasyonu, Fibrozis, Oksidatif Stres ve İnflamasyonda Rol Oynayan Polimorfizmlerin Genleri	Referanslar
PNPLA3, NCAN, PPP1R3B, MTTP, PEMT, GCKR, LYPLAL1	APOE, APOC3, PPAR γ , PPAR α , PPARGC1A, LPIN1, FATP5, ADRB, PARVB	PPAR γ , MTHFR, TNF α , TGF- β 1, Angiotensin II, LEPR, ADIPOQ, HFE, SAMM50, PARVB, IL-1 β , SOD2, UCP3, CD14, CTGF, Matriks Metalloproteinaz	Dongiovanni et al. 2013 T. Kitamoto et al. 2013 Mehta et al. 2014 Osterreicher and Brenner, 2007

NAYKH, NASH gibi progresif karaciğer hastalıklarının GWAS ve vaka-kontrol çalışmalarından elde edilen genetik risk faktörlerini içeren genler aşağıda verilmektedir (Çizelge 1.1; Çizelge1.2):

- **MTTP:** Mikrozomal Triglicerit Transfer Proteini (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) 4. kromozomda bulunur. VLDL'nin toparlanmasını ve hepatositlerden salgılanmasını sağlar. Lipid metabolizmasında yani steatoz modülasyonunda görevlidir. MTTP -493 G/T gen polimorfizminde G alleli bağımsız olarak yüksek serum ALT seviyeleri ile ilişkilidir ve NASH hastalarında G alleli ve GG genotipi daha yaygındır (Osterreicher and Brenner, 2007).
- **PEMT:** Fosfatidil Etanolamin N-Metil Transferaz (Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase) 17. Kromozomda bulunur. Karaciğerde *de novo* fosfatidilkolin sentezini katalize ederek lipid metabolizmasında yer alır. Fosfatidilkolin; VLDL oluşumu için önemlidir, eğer elverişli olmazsa yağ damlacıkları hepatositlerin sitozolünde birikir. Yani PEMT; karaciğerle plazma arasındaki lipid akışında yer alarak, karaciğer kökenli lipoproteinler aracılığıyla esansiyel yağ asitlerinin kana ve çevre dokulara gönderimini sağlar. İşlev kaybı yani 'loss of function' mutasyonları NAYKH'na sebebiyet verir. (Mehta et al. 2014).
- **PPAR γ :** Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gama (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma) 3. kromozomda bulunur. Lipid metabolizmasında yer alarak, adipoz dokuda yüksek miktarda eksprese olur.

Ayrıca, adiposit farklılaşmasını, serbest yağ asidi alımını ve depolanmasını düzenler (Dongiovanni et al. 2013).

- **APOE:** Apolipoprotein E geni 19. kromozom yer alır. ApoE bir plazma protein olmasıyla beraber lipid metabolizmasında ve taşınmasında görev alır. İnsanlarda APOE ve VLDL sekresyonu arasında bir ilişki vardır. APOE3/3 genotipinin NASH'in etiyopatogenezinde rol oynayabileceği Türk NASH hastalarında belirtilmiştir (Sazci et al. 2008a).
- **APOC3:** Apolipoprotein C3 (Apolipoprotein C-III) 11. kromozomda lokalizedir. Lipid metabolizmasında yer alır. VLDL'yi meydana getiren ana bileşenlerin en önemlilerindedir. Lipoprotein lipazın fonksiyonunu inhibe eder (Dongiovanni et al. 2013).
- **LPIN1:** Lipin 1 geni, 2. kromozomda yer almaktadır. Fosfolipid ve triaçilgliserol metabolizmalarında rol oynar. Adipogenez ve adipoz doku ile karaciğer arasındaki normal metabolik akış için gereklidir. Ayrıca, LPIN1 geninin ikili aktivitesi (enzimatik-ko-aktivatör) mevcuttur. Uyarılabilen transkripsiyonel ko-aktivatör görevi görerek yağ asidi metabolizmasını kontrol eder (Mehta et al. 2014).
- **PPARGC1A:** Peroksizom proliferatör aktif reseptör gama koaktivatör 1 alfa (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha) 4. kromozomda bulunmaktadır. Lipid ve glikoz metabolik yollarındaki genleri kontrol eden önemli bir kofaktördür (Mehta et al. 2014).
- **PPAR α :** 22. kromozomda yer alan Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör alfa (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha), nükleer hormon reseptör ailesindedir ve karaciğer gibi yağ asidi yıkımı yüksek oranlarda olan hücrelerde eksprese olur. Hepatik yağ asidi girişi artınca ya da yağ asidi çıkışı azalmışsa; PPAR α aktivasyonu ile yağ asidi katabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonu artırılarak, trigliserid birikimi engellenir. Dolayısıyla, PPAR α azaltılarak düzenlenmesi; serbest yağ asidi yıkımını azaltarak NASH patogenezinde rol oynar (Dongiovanni et al. 2013).
- **FATP5:** Yağ Asidi Transport Proteini (Fatty Acid Transport Protein) yağların hepatik alımında rol oynarlar. Karaciğerdeki izoformlarından FATP5'in kodladığı protein; yağ asitlerinin hepatik alımını artırır. Dolayısıyla, 'gain of function' yani fonksiyon kazandırıcı polimorfizmler hepatik steatoza sebebiyet verebilir. 19. kromozomda yer alır (Dongiovanni et al. 2013).

- **ADRB:** Beta Adrenerjik Reseptör (Beta-Adrenergic Receptor) gen ailesi lipoliz vasıtasıyla lipid mobilizasyonunu uyararak enerji harcanmasını düzenler. $\beta 3$ adrenerjik reseptör 8. kromozomda, $\beta 2$ adrenerjik reseptör 5. kromozoda bulunmaktadır. $\beta 3$ adrenerjik reseptör gen polimorfizminde 64. kodonda arjinin bulunması NASH hastaları arasında daha sık görülmektedir. $\beta 2$ adrenerjik reseptör gen polimorfizminde ise 16. kodonda glisin bulunması düşük HDL kolesterol seviyeleri ile ilişkiliyken; 27. kodonda glutamin bulunması yüksek seviyedeki serum trigliserid ve steatozun yüksek prevalansı ilişkilidir (Osterreicher and Brenner, 2007).
- **MTHFR:** Metilentetrahidrofolat redüktaz (Methylenetetrahydrofolate Reductase) geni, 1. Kromozomda bulunmaktadır. DNA metilasyonu; gen ekspresyonunu ve hücrel farklılaşma esnasında genomik bütünlüğü düzenleyen önemli bir epigenetik mekanizmadır. Hücrel folat ile direk; plazma homosistein seviyeleriyle ise ters olarak ilişkilidir. MTHFR; 5,10- metilentetrahidrofolat'ı daha sonra homosistein metilasyonu için kullanılacak olan 5-metil tetrahidrofolat'a dönüştürür. Dolayısıyla, MTHFR geninde 'loss of function' yani işlev kaybı yaratan polimorfizmler düşük seviyelerde metilasyona sebep olarak, anormal gen ekspresyon modeline neden olabilirler (Sazci et al. 2008b).
- **TNF α :** Tümör Nekroz Faktör Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha) sitokin, 6. kromozomda lokalize olan bir gendir. TNF α bir pro-inflamatuar sitokindir. NASH'te; TNF α , oksidatif stres altında ise hepatositlerdeki apoptozu uyarır (Dongiovanni et al. 2013). Polimorfizm -238, NAYKH'na yatkınlık yaratır ve ayrıca İD ile de ilişkilidir (Osterreicher and Brenner, 2007).
- **NCAN:** Neuracan geni 19. kromozomda bulunur. En son yapılan genom boyu bağlantı analizine göre bu gendeki rs2228603 varyantının da steatozun şiddetiyle ve NAYKH ile ilgili olduğu bulunmuştur (Mehta et al. 2014).
- **GCKR:** Glukokinaz regülör geni, (Glucokinase (Hexokinase 4) Regulator) 2. kromozomda yer alır. Glikoz metabolizmasını düzenler. En son yapılan genom boyu bağlantı analizine göre bu gendeki rs780094 varyantının da hepatik steatozu arttırdığı ve histolojik NAYKH ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu polimorfizm histolojik olarak gösterilmiş lobüler inflamasyon ve/veya fibrozisle de ilişkilendirilmiştir. GCKR genindeki bir diğer polimorfizm olan rs1260326 ise

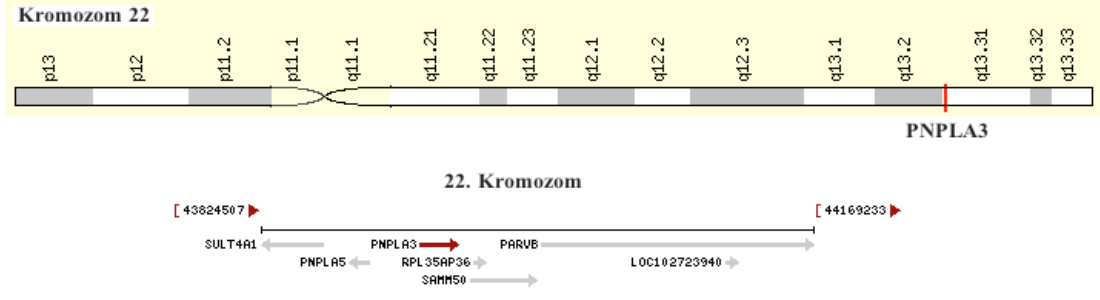
fruktoz-6-fosfat'a istinaden glikokinazı inhibe ederek, karaciğerin glikoz alımını arttırır (Mehta et al. 2014).

- **LYPLAL1:** Lysophospholipase-Like 1 geni 1. kromozomda lokalize olan bir gendir. Bu gendeki rs12137855 varyantının da hepatik steatozu arttırdığı ve histolojik NAYKH ile ilişkili olduğu en son yapılan GWAS'a göre belirlenmiştir. Ayrıca LYPLAL1, trigliserid yıkımında PNPLA3 proteinine yardımcı olur. Lobüler inflamasyon ve/veya fibrozisle de ilişkilendirilmiştir (Dongiovanni et al. 2013).
- **TGF- β 1:** Transforming Growth Factor, Beta 1 sitokinlerin transforming growth factor ailesinin polipeptid üyesidir. İnsanda TGFB1 geninde kodlanır. Bu gen 19. kromozomda yer alır. Aktive olan hepatik satellite hücreleri, fibrojenizasyon esnasında ekstrasellüler matriks birikiminin ana kaynağıdır. TGF- β 1; hepatik satellite hücrelerini aktive eder ve fibroziste rol oynar (Dongiovanni et al. 2013). Kodon 25'te arjinin bulunması ileri düzeyde fibrozisle ilişkilidir. Ayrıca, Anjiyotensin II (Angiotensin/Angiotensinogen II) proteininin de pro-fibrojenik fonksiyonu bulunmaktadır. Anjiyotensin ve TGF- β 1'deki polimorfizmlerin kombinasyonları sonucunda obez ve NAYKH olan hastalarda ileri derecede hepatik fibrozise rastlanılmıştır (Osterreicher and Brenner, 2007). Anjiyotensin II -6 A/A polimorfizmi; ileri düzeydeki 3. ya da 4. seviye fibrozisle pozitif ilişki göstermektedir (Mehta et al. 2014).
- **LEPR:** Leptin Reseptörü (Leptin Receptor, LEPR) geni 1. kromozomda bulunmaktadır. Bir adipositokin olan Leptin ile birlikte LEPR; besin alımını düzenlerler. LEPR polimorfizmleri insülin duyarlılığını ve lipid metabolizmasını etkileyerek NAYKH'nın progresyonunda rol oynayabilir. Gen-gen etkileşim analizine göre; LEPR ve PNPLA3 genleri arasında güçlü bir etkileşim bulunmaktadır (Mehta et al. 2014).
- **ADIPOQ:** Adiponektin (Adiponectin, ADIPOQ) geni 3. kromozomda bulunmaktadır. ADIPOQ'da kodlanan Adiponektin ise adiposit kökenli bir sitokondir. Adiponektin; glikoz metabolizmasında (insüline duyarlılaştırıcı), anti-inflamatuar ve anti-fibrojenik etkileri bulunmaktadır. Dolayısıyla; adipoz dokudaki İD'ne cevaben düşük seviyedeki Adiponektin, hepatik yağ birikimi ve NASH ile ilişkilendirilmektedir (Dongiovanni et al. 2013).
- **HFE:** Hemokromatozis geni (Hemochromatosis, HFE) 6. kromozomda lokalize olmakla beraber hücreler demir homeostazisinde rol oynamaktadır. Demir lipid

metabolizmasında da bazı enzimlerin ve taşıyıcıların bütünleyicisi olarak bulunmaktadır. Karaciğerde artan demir; yağlı karaciğerde oksidatif stresi artırıcı bir etki yaratır. C282Y mutasyonu açısından heterozigosite daha şiddetli fibrozisle ilişkilidir (Osterreicher and Brenner, 2007).

- **IL-1 β** : İnterlökin 1 beta bir sitokindir, IL1B (Interleukin 1, Beta) geninde kodlanmakta ve bu gen 2. kromozomda lokalize olmaktadır. TNF- α ve IL-1 β varyantları NAYKH'da rol oynayabilir. IL-1 β 'nın pro-inflamatuar etkisi bulunmaktadır. Pozisyon -511'de T alleli ve T/T genotipi NASH hastalarında daha sık görülmektedir. (Osterreicher and Brenner, 2007).
- **SOD2**: Mangan süperoksit dismutaz mitokondriyal enzimi, SOD2 (Superoxide Dismutase 2, Mitochondrial) geninde kodlanmaktadır. Bu gen 6. kromozomda yer almaktadır. MnSOD enzimi Reaktif Oksijen Türlerinin degradasyonunda görev alır (Osterreicher and Brenner, 2007). Yapılan çalışmalara göre; anti-oksidatif SOD2 47T>C polimorfizminin NASH ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Huang et al. 2014)
- **UCP3**: UCP3 (Uncoupling Protein 3) geni 11. kromozomda bulunmaktadır. Bu genin protein ürünü; mitokondriyi lipidlerin tetiklediği oksidatif strese karşı korur. Yağ asidi miktarı mitokondrinin oksidasyon kapasitesini geçecek kadar fazla olduğunda bu genin ekspresyonu artar ve gen ürünü yağ asitlerinin mitokondriden dışarı çıkarılmasına olanak sağlar. (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7352)
- **CD-14**: CD14 (CD14 Molecule) geni 5. kromozomda bulunmaktadır. Bağırsak kökenli endotoksin sitokin salınımına neden olarak NAYKH'nın patogenezinde yer alır. Bu genin protein ürünü bağışıklık sisteminin bir parçası olmakla beraber; gram negatif bakteriyel lipopoliskkarit ko-reseptör'ü (Toll benzeri reseptör (TLD-4) boyunca) olarak görev alır. Promotor bölgesinin içindeki polimorfizmden etkilenen CD14 gen ekspresyonu, T alleli steatozdan NASH'e ilerleme açısından risk faktörüdür (Osterreicher and Brenner, 2007).
- **CTGF**: Bağ Doku Büyüme Faktör (Connective Tissue Growth Factor, CTGF) geni 6. kromozomda bulunmaktadır. Fibrojenizde rol oynadığından dolayı da NAYKH'da ve özellikle de NASH'de aday genidir (Mehta et al. 2014).
- **MMP3**: Matriks metalloproteinaz enzimi, 11. kromozomda bulunan MMP3 (Matrix Metalloproteinaz 3) geninde kodlanır ve fibrojenizde rol almaktadır (Mehta et al. 2014).

- **NNMT:** Nikotinamid N-metil transferaz (NNMT, nicotinamide-N-methyltransferase) geni 11. kromozomda yer almakla beraber MTHFR geni gibi tek karbon (one-carbon) metabolizmasında rol almaktadır. NNMT gen ürünü olan enzim; nikotinamidi ve S-adenozil-metiyonin (S-adenosyl-methionine, SAM)'den salınan metil grubunu transfer eden reaksiyonda yer alan diğer piridin bileşiklerini metilleyerek, S-adenozil-homosistein (S-adenosyl-homocysteine, SAH) oluşumunu sağlar. Daha sonra ise homosistein oluşumu gözlemlenir. NNMT genin NASH etiopatolojisinde rol aldığı Türk hastalarda gösterilmiştir (Sazci et al., 2013).
- **SAMM50:** SAMM50 (Sorting And Assembly Machinery Component yani SAMM50) geni 22. kromozomda yer almaktadır. Bu gende kodlanan Sam50 proteini genel anlamda mitokondrinin bütünlüğünü sağlamaktadır. Sam50 proteinin uzun süreli eksikliği mitokondrideki solunumla ilgili proteinlerin miktarını etkiler. Mitokondriyal anormalliklerin NASH patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla, SAMM50 genin de mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına ve Reaktif Oksijen Türleri'nin giderilmesinde azalmalara yol açarak NAYKH'nın ilerlemesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (T. Kitamoto el al. 2013).
- **PARVB:** Parvin, Beta geni 22. kromozomda yer almaktadır. PARVB geninin ürünü Parvin- β 'dir. Parvin- β 'nin eksikliği integrine bağlı kinaz aktivitesi artışına ve hücre-matriks adezyonuna katkıda bulunur. Bu yolak ele alındığında karaciğerde fibrozis ile ilişkilendirilmiştir. Aşırı ekspresyonu sonucunda ise mRNA ekspresyonunu, serin 82 fosforilasyonunu ve PPAR γ 'nın aktivitesini artırır. Böylece lipojenik gen ekspresyonu da artar. Bu yolak ele alındığında ise karaciğerde lipid birikiminde rol oynayabileceği belirtilmektedir (T. Kitamoto el al. 2013).
- **PNPLA3:** PNPLA3 (Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3) geni Patatin-Like Phospholipase ailesinin bir üyesidir. 22. kromozomun uzun kolunda 13.31 bandında bulunmaktadır (22q13.31) ve büyüklüğü 40.750 bazdır. Daha da kesin olarak belirtecek olursak PNPLA3 geni; 22. kromozomun 44,319,619 baz çifti ile 44,360,368 baz çifti arasında lokalize olmaktadır (Şekil 1.12). PNPLA3 geni ayrıca, ADPN (Adiponutrin) geni olarak da bilinmektedir (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80339).



Şekil 1.12. PNPLA3 Geninin 22. Kromozomdaki Lokasyonu

PNPLA3 geninde kodlanan protein 481 amino asit büyüklüğünde olup, tahmini moleküler ağırlığı 52.865 kiloDalton (kDa)' dur. (www.uniprot.org/uniprot/Q9NST1)

PNPLA3 genin ürünü olan 'adiponutrin' esasen kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 ailesindedir. Adiponutrin birincil olarak, insanda ve hayvanda, beyaz adipoz dokuda ve karaciğerde eksprese olur ve ekspresyonu besin yönünden düzenlenir. Adiponutrin ekspresyonu obezite ile artmaktadır (Santoro et al. 2010). PNPLA3 geni Endoplazmik Retikulum'da, hepatositlerdeki ve adipositlerdeki lipid damlacıklarının yüzeyinde eksprese olurken; beslenmeden sonra ve İD sırasında yağ asitleri ve Karaciğer X reseptörünü (LXR) ile SREBP-1c (lipogenezin ana düzenleyicisi)'yi içeren insülin aracılığıyla sinyalleşme kaskadı vasıtasıyla karaciğerde uyarılır ve regüle edilir (Mehta et al. 2014)

Adiponutrin proteini çok fonksiyonlu bir enzim olup hem triaçilgliserol hidrolaz hem de açilgliserol transasetilaz aktivitelerine sahiptir. Triaçilgliserol lipaz (hidrolaz); adipositlerde triaçilgliserol hidrolizine yardımcı olan membran proteinidir ve adipositlerde enerji kullanımı ve depolanması arasındaki dengede yer aldığı düşünülmektedir. Ayrıca, PNPLA3 gen ürününün adipogenezde ve gliserofosfolipid biyosentezinde rol oynadığı ve beyaz adipositlerin farklılaşması esnasında upregüle olduğu bilinmektedir.

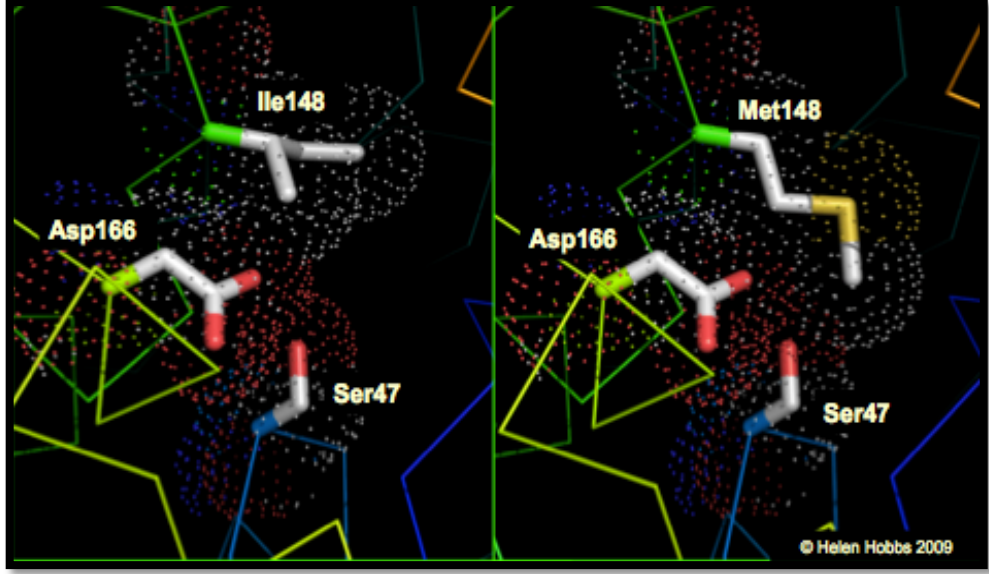
PNPLA3 geninin Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) ile olan ilişkisi bilindiği için ilk genom boyu bağlantı analizi çalışmasında; karaciğer yağ içeriğine istinaden, PNPLA3 genindeki genetik faktörler ile Hispanik, Afrikalı Amerikalı ve Avrupalı Amerikalı popülasyonlarındaki NAYKH yatkınlığı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu amaçla; hepatik yağ içerikleri proton manyetik rezonans spektroskopisi ile ölçülen üç farklı etnik gruptan oluşan 2111 kişilik bir popülasyonda 9,299 sinonim olmayan (nonsynonymous) yani tek nükleotid değişimi sonucunda farklı bir amino asidi kodlayan kodonun oluşmasına sebebiyet veren dizi varyantları incelenmiştir (Mato et al. 2014). Sonrasında, karaciğer biyopsisi ile Avrupalılar'da ve Asyalılar'da da teyit

edilmiştir. PNPLA3 geninin sadece yağlı karaciğerle ve trigliserid içeriği ile alakalı olmadığı bunların yanı sıra, inflamasyon ve fibrozisle de ilişkili olduğu son çalışmalarla da gösterilmiştir. Bu yüzden de PNPLA3 geninin NAYKH gelişimi ile ciddi anlamda ilişkili olduğu kanısına varılabilir. Japonlar'da NAYKH ile ilişkilendirilen genetik faktörlerin belirlenebilmesi için histolojik olarak tanısı konulan 529 NAYKH hastası ile 932 kişilik kontrol popülasyonunu içeren bir genom boyu bağlantı analizinin tablosu aşağıda verilmektedir (Çizelge 1.3) ve bu tablo bazı PNPLA3 gen varyantlarını ve bu varyantların Matteoni sınıflandırmasına göre gösterdikleri anlamlılık (p) değerlerini içermektedir (Kawaguchi et al. 2012). Bu çalışmadan esinlenilerek, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmine uyan varyantlar seçilip kendi popülasyonumuzda çalışıldı. Bizim popülasyonumuzda çalışılan polimorfizmler ise; rs738409, rs738407, rs3810622 ve rs2896019'dur. Ancak PNPLA3 rs3810622 gen polimorfizminin elde edilen verileri, Hardy-Weinberg dengesinde bulunmadığından dolayı burada sunulmamıştır.

Çizelge 1.3. PNPLA3 Gen Varyantları ve Bu Varyantların p-Değerleri (Kawaguchi et al. 2012)

dbSNPID	A1/A2	NAYKH		NAYKH vs KONTROL				Matteoni		
		Kontrol	Toplam	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	p-değeri	OR (95%CI)	p-değeri
rs738407	T/C	124/447/361 (0.627)	46/200/283 (0.724)	12/51/37 (0.625)	10/28/35 (0.671)	4/14/11 (0.621)	20/107/200 (0.775)	1.0×10^{-7}	1.56(1.32-1.83)	3.4×10^{-5}
rs738409	C/G*	247/468/217 (0.484)	88/236/203 (0.609)	20/59/21 (0.505)	21/30/22 (0.507)	8/11/9 (0.518)	39/136/151 (0.672)	1.4×10^{-10}	1.66(1.43-1.94)	3.6×10^{-6}
rs2076211	C/T*	248/473/211 (0.480)	92/242/195 (0.597)	21/58/21 (0.500)	21/30/22 (0.507)	8/11/10 (0.534)	42/143/142 (0.653)	1.4×10^{-9}	1.61(1.38-1.87)	3.2×10^{-5}
rs2896019	T/G*	246/473/213 (0.482)	91/234/204 (0.607)	20/57/23 (0.515)	22/29/22 (0.500)	7/12/10 (0.552)	42/136/149 (0.664)	1.5×10^{-10}	1.66(1.42-1.93)	2.6×10^{-5}
rs1010023	T/C*	249/473/210 (0.479)	94/239/196 (0.596)	21/57/22 (0.505)	22/29/22 (0.500)	7/12/10 (0.552)	44/141/142 (0.650)	1.5×10^{-9}	1.61(1.38-1.87)	6.5×10^{-5}
rs926633	G/A*	247/474/211 (0.481)	93/237/199 (0.600)	21/56/23 (0.510)	22/29/22 (0.500)	7/12/10 (0.552)	43/140/144 (0.654)	7.5×10^{-10}	1.62(1.39-1.89)	5.8×10^{-5}
rs3810622	T*/C	330/445/157 (0.407)	263/208/58 (0.306)	40/48/12 (0.360)	28/29/16 (0.418)	14/12/3 (0.310)	181/119/27 (0.265)	1.0×10^{-7}	0.64(0.55-0.75)	0.0017

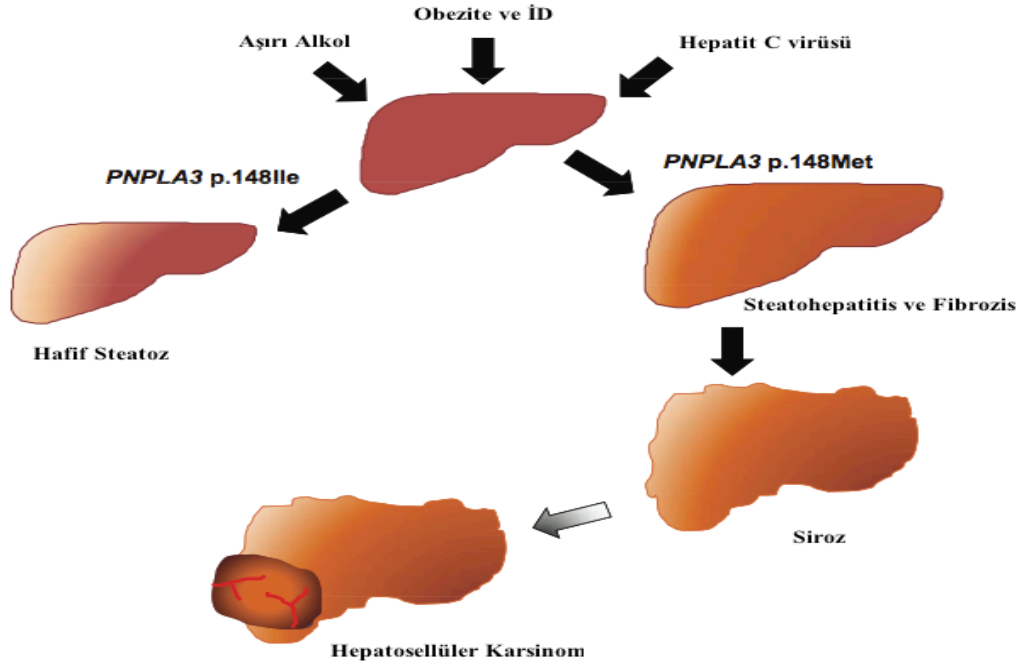
Adiponutrin I148M sinonim olmayan (nonsynonymous) polimorfizmi; C/G değişimi yani 148. amino asit pozisyonundaki izolösin amino asidinin metionin amino asidine dönüşmesiyle karakterize edilir (Şekil 1.13). Atasal allel; G allelidir (Santoro et al. 2010).



Şekil 1.13. PNPLA3 Gen I148M Polimorfizminin Sebep Olduğu Amino Asit Değişimi

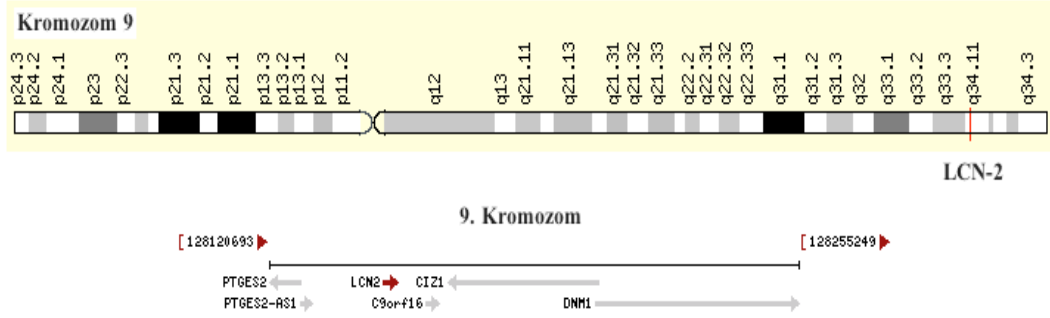
I148M varyantı; gen ürünü olan enzimin fosfolipaz aktivitesini aksatarak lipid katabolizmasını değiştirir ama yeni fonksiyonlar da edinebilir. Örneğin; son çalışmalarla fosfolipid sentezini arttırdığı da belirtilmiştir (Dongiovanni et al. 2013). *In vitro* yapılan çalışmalarda; I148M polimorfizminin trigliserid hidrolizine engel olarak fonksiyon kaybı ‘loss of function’ mutasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Diğer bir taraftan da; I148M polimorfizminin faredeki aşırı ekspresyonu steatoza sebep olarak, varyantın fonksiyon kazanımı ‘gain of function’a neden olduğunu işaret etmektedir (Sevastianova et al. 2011). Romeo et al. tarafından ilk defa tanımlanan rs738409 (I148M) varyantı missense bir mutasyon olup hepatik yağ içeriğini, hepatosit hasarını ve ALT seviyelerini etkileyen en güçlü faktördür (Mehta et al. 2014). I148M varyantı daha sonra NASH, ilerlemiş fibrozis ve yüksek oranda siroz ile ilişkili bulunmuştur (Friedrich et al. 2014). Dolayısıyla da, rs738409 polimorfizmi; NASH ve siroz açısından riskli grup olarak bilinen Hispanik popülasyonunda daha sık görülmektedir. rs738409 varyantının NAYHK hastalarında bulunma ihtimali sağlıklı kontrollere oranla daha yüksek olup, I148M varyantının doza bağımlı olarak yüksek ALT seviyeleri ile ilişkili olduğu İtalyan ve İngiliz popülasyonunda gösterilmiştir (3.3 kat artmış risk). Bu varyantın; İD, dislipidemi ve vücut külesinden bağımsız karaciğer yağını etkilediği belirtilmiş olup her iki popülasyonda da GG genotipinin yüksek LDL ile; sadece İtalyan popülasyonunda CG-GG genotiplerinin düşük HDL kolesterol ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yani G risk alleli 2. ve 3. aşama steatoz açısından risk faktörüdür (Mehta et al. 2014). Diğer bir çalışmada ise rs738409 genotipinin obezite ile artan yağ asidi akışının hafif/basit steatoza mı yoksa NASH’e gelişip gelişmeyeceği tartışılmıştır. Bu çalışmada; histolojik olarak kanıtlanan İtalyan NAYKH

obez hastalarında rs738409 G allelinin steatozun şiddetiyle ilişkilendirilen en güçlü etken olduğu ve GG genotipli hastaların şiddetli steatoz, daha yüksek lobüler inflamasyon, hepatosellüler balonlaşma ve NASH ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, çevresel stres etkenleri (obezite, kronik alkol tüketimi gibi), I148M ve hepatik hasar arasındaki ilişki ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1.14). Aşağıdaki şekilde; I148M PNPLA3 gen varyantının kronik karaciğer hastalığı progresyonu açısından etkisi şematize edilmiştir (Dongiovanni et al. 2013).



Şekil 1.14. PNPLA3 Gen I148M Varyantının Kronik Karaciğer Hastalığı Progresyonundaki Etkisi (Dongiovanni et al. 2013)

- **LCN-2:** Lipokalinler büyük bir protein ailesi olup, küçük hidrofobik proteinlerin taşınmasında rol oynayan otuzun üstünde küçük, çözünebilen ve salgılanabilen proteinleri kapsar. Bu proteinlerin korunmuş motifleri olmasına karşın; sınırlı bölgelerdeki dizi homolojileri pek çok çeşitlilik göstermektedirler. Hepsinde karakteristik olarak sekiz sarmallı, aralıksız hidrojen bağlı anti-paralel β silindir bulunmaktadır (Borkham-Kamphorst et al. 2013). Lipokalin-2 (LCN-2), 24p3 ya da Notrofil Jelatinaz-ilişkili Lipokalin (NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin) geni 9. kromozomun uzun kolunun 34.11 bandında bulunmaktadır (Şekil 1.15) ve 25 kiloDalton (kDa)'dur.



Şekil 1.15. LCN-2 Geninin 9. Kromozomdaki Lokasyonu

LCN-2 sekretuar bir glikoproteindir ve birçok farklı doku ve hücre tipinde (adipositler, immünositler, karaciğer, makrofajlar gibi) eksprese olmaktadır (Ong et al. 2011). Serum, lipopolisakkarid, çeşitli büyüme faktörleri, retinoik asit, kortikosteroidler ve forbol esterler LCN-2'yi uyarmaktadırlar.

LCN-2'nin bazı fonksiyonları tanımlanmakla birlikte tam olarak hücrel ve ekstrasellüler fonksiyonların tam olarak netleşmemiştir. Kanserle, böbrek hasarıyla, kardiyovasküler hastalıklar ve alkol zehirlenmesi ile ilişkilidir (Terra et al. 2013). Ancak apoptozundaki, hücre sinyalindeki ve çoğalmasındaki rolleri tam anlamıyla netleşmemiştir. İnflamasyon, demir metabolizması gibi yollardaki görevleri üzerine çalışılmaktadır (Borkham-Kamphorst et al. 2013). LCN-2'nin inflamatuvar yollarda yer aldığı düşünülmektedir çünkü proinflamatuvar çekirdeksel bir faktör olan κB , LCN-2 ekspresyonunu aktive eder. Ayrıca bu genin obezite ve adipoz doku inflamasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Terra et al. 2013). LCN-2 geni; PPAR- γ , adiponektin ekspresyonlarını uyarır ve TNF- α 'nın glikoz metabolizmasındaki, PPAR- γ ekspresyonundaki ve adiponektin ile leptin salgısındaki etkisini aleyhine çevirebilir. Bu yüzden de LCN-2 seviyesinin, obeziteledeki inflamasyon ve İD'ne sebebiyetten çok cevaben yükseldiği düşünülmektedir. LCN-2 geni; inflamasyon ve enfeksiyondan kaynaklanan stresin altında olduğu hücrelerde upregüle olur. Epitel hücrelerdeki ve hepatositlerdeki upregülasyonu IL-1 β ve reaktif oksijen türleri tarafından gerçekleştirilir. LCN-2 geninin aşırı eksprese olması hücreleri oksidatif stresten korur. Lipokalin-2'nin; NAYKH ve hipertansiyon gibi hastalıkların risk faktörleri olan obezite, insülin direnci ve inflamasyon için biyo-belirteç olduğu bilinmektedir (Ong et al. 2011). Akut karaciğer yetmezliği de yüksek serum LCN-2 konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir çünkü genellikle akut karaciğer yetmezliğinde görülen yüksek seviyelerdeki pro-inflamatuvar sitokinlerin

aracılığıyla görülen immün hiperaktivitesinin bir sonucu olarak ele alınabilir (Roth et al. 2013).

LCN-2 aslen lökositlerde var olan bir glikoproteindir (NGAL). Endotoksinleri yönetmek için karaciğerde eksprese olduğu ve hidrojen perokside maruz kalındığında hepatik hücrelerde üretildiği bilinmektedir. NASH'in patogenezinde endotoksin, oksidatif stres ve sitokinlerin yer alması, son zamanlardaki NASH hastalarının karaciğerlerinde LCN-2 geninin eksprese olması bulgusu ile örtüşmektedir. Bu genin, hücreleri oksidatif stresin toksisitesinden korumak için eksprese olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte farelerde yapılan çalışmalar sonucunda da, hepatik parankimal hücrelerde LCN-2 proteinin ekspresyonuna, yakınlardaki inflamatuvar hücrelerin varlığından dolayı rastlanılmıştır. Son yıllarda, LCN-2 geninin hepatik hücreleri hidrojen peroksidin toksisitesinden korumada görev aldığı gösterilmiştir. Bütün bilgilerin ışığında; NASH hastalarının karaciğerindeki LCN-2 ekspresyonunun inflamatuvar hücre kaynaklı sitotoksik strese cevaben yükseldiği düşünülmektedir. Dolayısıyla LCN-2; NASH için potansiyel bir inflamatuvar belirteç olabilir (Semba et al. 2013).

Bu çalışmada; LCN-2 genin on beş tane aday nonsynonymous polimorfizmleri tespit edilerek, bu polimorfizmlerin arasından yalnızca restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi metoduna uygun olanlar çalışıldı. Bu SNP'ler; rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243'tür. Seçilen varyantların hepsi dünyada ilk defa bizim popülasyonumuz açısından değerlendirilmiştir. Aşağıdaki tabloda seçilen LCN-2 gen polimorfizmleri verilmektedir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Çalışmada Yer Alan LCN-2 Gen Polimorfizmleri

SNP No	DEĞİŞİM	TÜRÜ	POZİSYONU	İÇERİĞİ	
rs139418967	C/T	Missense Mutasyon	6. protein pozisyonu	Prolin → Lösin Değişimi	Polar → Hidrofobik, Alifatik
rs147787222	G/T	Missense Mutasyon	9. protein pozisyonu	Glisin → Valin Değişimi	Polar → Hidrofobik, Alifatik
rs140285982	C/T	Missense Mutasyon	18. protein pozisyonu	Alanin → Valin Değişimi	Polar → Hidrofobik, Alifatik
rs147792047	A/G	Missense Mutasyon	36. protein pozisyonu	İzolösin → Valin Değişimi	Alifatik → Hidrofobik, Alifatik
rs141366243	A/G	Missense Mutasyon	44. protein pozisyonu	Asparajin → Aspartik Asit Değişimi	Asidik → – Yüklü, Asidik

2. AMAÇ VE KAPSAM

Bu çalışmanın amacı; Non-alkolik steatohepatitis (NASH)'ta rol oynayan genlerin belirlenmesidir. Bu nedenle; literatürde daha önce GWAS ile belirlenmiş olan PNPLA3 geninin rs738409, rs738407 ve rs2896019 varyantları 'doğrulayıcı' nitelikte ele alınarak, bizim popülasyonumuzda ilk defa çalışılmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada 'aday' nitelikteki LCN-2 geninin rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243 varyantlarının da NASH ile olan ilişkileri hem dünyada hem de bizim popülasyonumuzda ilk defa çalışılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar, hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak karşılaştırılıp, bu SNP'lerin hastalık ile ilişkileri belirlenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Enzimler ve Primerler

Taq DNA polimeraz (Fermentas)

Proteinaz K (Sigma)

Çizelge 3.1. Polimorfizmlere Göre Kullanılan Primer Dizileri ve Enzimler

Gen Adı	SNP no	Primer	Enzim
PNPLA3	rs2896019	F: 5'-CCTTCCCCTAAACCCACAAT-3' R: 5'-CATGACAGCCCTTTCCTCAT-3'	<i>SfcI</i>
PNPLA3	rs738407	F: 5'-CTCCAAGGAGCGCTTATGAA-3' R: 5'-TCCTTCAACACTTGGCTCAT-3'	<i>MluCI</i>
PNPLA3	rs738409	F: 5'-CCCTGCTCACTTGGAGAAAG-3' R: 5'-AGGAGGGATAAGGCCACTGT-3'	<i>NlaIII</i>
LCN-2	rs141366243	F: 5'-CTCCACCTCAGACCTGATCC-3' R: 5'CTTCACCTCTCCTCCCCTCT-3'	<i>HpyI88III</i>
LCN-2	rs147792047	F: 5'-CTCCACCTCAGACCTGATCC-3' R: 5'CTTCACCTCTCCTCCCCTCT-3'	<i>AvaII</i>
LCN-2	rs139418967	F: 5'-CTCACTCGCCACCTCCTCTT-3' R: 5'-AGGTCTGAGGTGGAGTCCTG-3'	<i>BtgI</i>
LCN-2	rs147787222	F: 5'-CTCACTCGCCACCTCCTCTT-3' R: 5'-AGGTCTGAGGTGGAGTCCTG-3'	<i>AvaII</i>
LCN-2	rs140285982	F: 5'-CTCACTCGCCACCTCCTCTT-3' R: 5'-AGGTCTGAGGTGGAGTCCTG-3'	<i>SphI</i>

3.1.2. Kimyasallar

Agaroz	Sigma	
Akrilamid	Merck	8.00830.0500
Amonyum asetat	Riedel-de Haen	25006
Amonyum persülfat	Sigma	A 1433
Asetik asit	Riedel-de Haen	27225
Bisakrilamid	Sigma	M 7256
Borik asit	Fluka	71999
Brom fenol mavisi	Sigma	B 5525
Etanol	Merck	1.00986.2500
Etidium bromid	Sigma	E 8751
EDTA	Sigma	ED2SS
Formaldehit	Riedel-de Haen	15512
Gümüş nitrat	Fluka	85228
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum hidroksit	Riedel-de Haen	06203
Sodyum klorid	Riedel-de Haen	13423
Sodyum karbonat	Sigma	S 7277
TEMED	Merck	8.08742.0250
Tris baz	Sigma	T 1503
Sodyum Dodesil Sülfat	Fluka	71725

3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.3.1. DNA İzolasyon Çözeltileri

RBCL (eritrosit parçalama çözeltisi) pH 7,4

0.15 M NH₄Cl

0.01 M KHCO₃

0.01 M EDTA (pH 8,0)

WBL (beyaz hücre parçalama çözeltisi)

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA (pH 8,0)

Amonyum asetat çözeltisi

9.5 M $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilir)

TE tamponu (pH 8.0)

10 mM Tris HCl

1 mM EDTA pH 8.0 (+20°C)

SDS stok solüsyonu

10% (w/v) SDS

0.2-0.45 μm membran ile filtre edilmiş

3.1.3.2. Elektroforez Çözeltileri

5X TBE

0.45 M Tris Borat

0.01 M EDTA (pH 8,0)

% 8'lik non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid: bisakrilamid)

%8 Akrilamid-Bisakrilamid

1X TBE

Polimerizasyon için;

0.001 M amonyumpersülfat (APS), % 0,1 TEMED ilave edildi.

3.1.3.3. Gümüş Boyama Çözeltileri

10 X A solüsyonu: %5 asetik asit % 95 absolüt etil alkol

10 X B solüsyonu: %1 gümüş nitrat

C solüsyonu: 3 g NaOH, 0.02 g Boraks, %0,2 formaldehit

10 X D solüsyonu: 22,5 g Sodyum bikarbonat/ 1lt (opsiyonel)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)

Thermocycler (BIORAD T100)

Dikey elektroforez (BIORAD)

Yatay elektroforez (BIORAD)

Güç kaynağı (BIORAD Power Pac 3000)

UV transilimünatör (BIORAD)

Spektrofotometre (SHIMADZU)

CanoScan N670U (Canon)

Bilgisayar

3.1.5. Etik Kurul Onayı

Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurul'una yapılan başvuru sonucunda, çalışma için etik kurul onayı alındı (Etik kurul karar no: 4/13). Hasta ve gönüllüler için uygun onam formları hazırlandı.

3.1.6. Hasta Grubu

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'na başvuran, aynı anabilim dalında tedavi gören Non-Alkolik Steatohepatitis hastalarına ayrıntılı bilgi verildikten sonra onam formları imzalatıldı. Çalışmaya gönüllülükle katılmayı kabul eden 80 hastanın sadece koldaki damarlarından olmak üzere EDTA'lı tüplere 2 ml. yani yaklaşık olarak bir tatlı kaşığı kan alındı.

3.1.7. Kontrol Grubu

Ailesinde Non-Alkolik Steatohepatitis hastalığı ya da karaciğer ile ilgili herhangi bir bozukluk bulunmayan gönüllü katılımcılara ayrıntılı bilgi verilerek onam formları imzalatıldı. Daha sonra çalışmaya katılmayı kabul eden 313 gönüllü katılımcıdan sadece koldaki damarlarından olmak üzere EDTA'lı tüplere 2 ml. yani yaklaşık olarak bir tatlı kaşığı kan alındı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

1. 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet süspansiyon edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pellet tamamen süspansiyon edilip üzerine 500 µl SDS (%10'lük), 50µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de gece boyu bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml Amonyum asetat (9.5M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üstteki temiz kısım alınarak yeni bir falkon tüpe aktarıldı, pellet atıldı. Süpernatantın üzerine 20 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması için bekletildi. DNA alınarak bir eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1ml % 70 etanol koyuldu. Maksimum hızda (13.200 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Kurutma işlemi ile kalan alkol uçuruldu.
6. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100–300µl kadar TE (Tris-EDTA, pH= 8.0) tamponu eklenerek 56°C'de 1 saat bekletilerek +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü

1. Stok DNA tüpünden 1µl örnek alındı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine 99µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.
3. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu
4. DNA miktarı formüle göre hesaplandı:
Konsantrasyon= 100 (sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/µl DNA
5. OD 260/280 > 1,8 RNA, < 1,8 protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

3.2.3. GENOTİPLEME

Genotipleme; alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP) metodu ile yapıldı.

3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonunda 100 ng genomic DNA, 10 pmol forward ve reverse primerler kullanıldı. MgCl₂ miktarı her reaksiyon için 1.5 mM olacak şekilde ayarlandı. Her polimorfizm için annealing dereceleri ve döngü sayıları farklılık gösterebilmektedir. Çizelge 3.2'de bu değerler yer almaktadır. Total miktarı 25µl olan PCR karışımını 10mM Tris-Cl (pH 8,8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve uygun MgCl₂ miktarı, 200 µM dNTP ve 1,0 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas) içerecek şekilde hazırlandı.

PCR koşulları özetle şu şekilde sınıflandırılabilir;

- 95°C'de çift iplikçikli DNA'nın iki tek iplikçiğe ayrılması (**denatürasyon**)
- 50-60 °C'deki primerlerin tek iplikçik halindeki kalıp DNA'ya spesifik olarak bağlanmaları (**annealing/eşleşme**)
- **Extension** (sentez) 72°C'de, primerlerle sınırlandırılmış olan bölgenin Taq pol. tarafından amplifikasyonu.

Bu hususlara bağılı kalınarak, PCR şartları; 95°C’de 5 dk. ilk denatürasyon, 95°C’de 1 dk. denatürasyondan sonra uygun annealing derecesinde en az 30 sn. ve 72°C’de 1 dk. en az 30 döngü ve son olarak 72°C’de 10 dk. şeklinde yapıldı.

Çizelge 3.2. Polimorfizmlere Göre PCR İçin Annealing Koşulları ve Döngü Sayıları

GEN ADI	SNP NO	ANNEALING DERESESİ	ANNEALING SÜRESİ	DÖNGÜ SAYISI
PNPLA3	rs2896019	55°C	30 sn.	30X
PNPLA3	rs738407	56°C	1 dk.	35X
PNPLA3	rs738409	58°C	30 sn.	30X
LCN-2	rs141366243	59°C	30 sn.	30X
LCN-2	rs147792047	59°C	30 sn.	30X
LCN-2	rs139418967	59°C	30 sn.	30X
LCN-2	rs147787222	59°C	30 sn.	30X
LCN-2	rs140285982	59°C	30 sn.	30X

3.2.3.1.1. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kontrolü

Toplam 25µl hacimde gerçekleştirilen reaksiyondan kontrol amacı ile 5µl alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %8’lik poliakrilamid jele pUC-Mix (MBI) büyüklük (size) markır ile birlikte yüklenen PCR ürünleri, 20 V akımda yaklaşık 30 dk yürütüldü. PCR ürünleri markır ile kıyaslandı ve doğru bantlar elde edildiğinde, restriksiyon enzimleri ile kesime geçildi.

3.2.3.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzim kesiminin toplam hacmi 15 µl olup, her enzime uygun 1.5 µl 1X tampon çözeltisi, enzim, PCR ürünü ve steril distile su içerecek şekilde hazırlandı. Kesim reaksiyonları içerdikleri tampon çözeltilerine göre gece boyunca ya da enzim prospektüsünde yazan süreye uyularak gerçekleştirildi. Aynı şekilde, kesim reaksiyonunun gerçekleşeceği sıcaklık, enzim prospektüsünden faydalanılarak saptandı. Her polimorfizm için koşullar çizelge 3.3’de yer almaktadır. Kesim ürünleri poliakrilamid jelde yürütülüp,

gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi. Tarayıcı yardımı ile tüm görüntüler bilgisayara kaydedildi.

Çizelge 3.3. Polimorfizmlere Göre RFLP İçin Kullanılan Enzimler, Tampon Çözeltileri, Distile Su, PCR Ürünü Miktarları, Kesim Reaksiyonu Sıcaklığı ve Kesim Süreleri

Gen Adı	SNP nosu	Enzim	Tampon Çözeltisi	Enzim Miktarı	Steril Distile Su (µl)	PCR Ürünü (µl)	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Kesim Süresi
PNPLA3	rs2896019	<i>SfcI</i>	Buffer 4	2U	11.3	1.9	37	16 saat
PNPLA3	rs738407	<i>MluCI</i>	Buffer 4	2U	11.3	1.9	37	16 saat
PNPLA3	rs738409	<i>NlaIII</i>	CutSmart Buffer	2U	11.6	1.7	37	5-15 dk.
LCN-2	rs141366243	<i>Hpy188III</i>	CutSmart Buffer	2U	11.3	1.9	37	60 dk.
LCN-2	rs147792047	<i>AvaII</i>	Buffer R	2U	11.3	1.9	37	16 saat
LCN-2	rs139418967	<i>BtgI</i>	CutSmart Buffer	2U	11.3	1.9	37	5-15 dk.
LCN-2	rs147787222	<i>AvaII</i>	Buffer R	2U	11.3	1.9	37	16 saat
LCN-2	rs140285982	<i>SphI</i>	Buffer B	3U	11.7	1.5	37	16 saat

3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi

35 cm x 10 cm ebatlarında hazırlanan jelin elektroforezi için dikey elektroforez cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0,5 mm olarak ayarlandı. Yüzde sekizlik, onluk ve on ikilik PAGE stok solüsyonlarına sırası ile % 10'luk APS stoğundan % 1 hacim ve TEMED'den % 0,1 hacim ilave edilip 0,5 mm'lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 1/2 saat beklendi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektroforez cihazına yerleştirildi, 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım çizelge 3.4'de verildiği gibi ayarlandı ve çizelge 3.4'de verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

Çizelge 3.4. Her Polimorfizm İçin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Koşulları

SNP no	Akım			PAGE (%)	Yürüme zamanı (dk)
	mA	V	W		
rs2896019	~50	~180	20	8	30
rs738407	~50	~180	20	8	30
rs738409	~50	~180	20	8	30
rs141366243	~50	~180	20	8	35
rs147792047	~50	~180	20	8	35
rs139418967	~50	~180	20	8	35
rs147787222	~50	~180	20	8	35
rs140285982	~50	~180	20	8	35

3.2.3.2.2. Gümüş Boyama

Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile bekletildi. C solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlandı. Sonraki solüsyonlara geçerken aralarda distile su ile bir kaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

A solüsyonu (Asetik asit-etanol): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

B solüsyonu (Gümüş nitrat): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 10 dakika muamele edildi.

C solüsyonu (NaOH-Boraks-Formaldehit): 200 ml distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edildi ve jel bu solüsyona alındıktan sonra solüsyonun içerisine 1ml formaldehit ilave edilerek bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu.

D solüsyonunu (NaHCO₃): 200 ml distile suya stok solüsyondan 20 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

Distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

3.2.4 İstatiksel Analiz:

Odds ratio, %95 güven aralığı ve χ^2 analizi, conditional logistic regression analizi kullanarak yapıldı. Hücre frekansları 5'ten az olduğunda gerçek metodlar kullanılarak risk oranları hesaplandı. Tüm analizler SPSS Versiyon 21 kullanılarak yapıldı.



4.BULGULAR

Bu çalışmada; NASH hasta ve kontrol gruplarında PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) ve LCN-2 (Lipocalin-2) genlerindeki SNP'lerin allelleri ve genotipleri PCR-RFLP yöntemiyle saptanmıştır. Yapılan çalışmada; bizim popülasyonumuzdaki NASH hastaları açısından değerlendirilen PNPLA3 genindeki rs738407, rs738409 ve rs2896019 polimorfizmleri 'doğrulayıcı' nitelikte seçilirlen; LCN-2 genindeki rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243 polimorfizmleri 'aday' nitelikte seçilmiştir.

4.1. PNPLA3 gen rs738407 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları

PNPLA3 rs738407 gen polimorfizminde; MluCI restriksiyon endonükleaz kullanılarak bu polimorfizmin genotipleri belirlenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen verilere göre ($\chi^2=13.193$, $P=0.001$); bu varyant NASH ile ilişkilendirilmiş olup, NASH hastaları için bir risk oluşturduğu saptanmıştır. PNPLA3 genindeki rs738407 polimorfizminin AA genotipli NASH hastalarından elde edilen bilgilere göre; bu genotipli bireylerin NASH'e karşı koruyucu etki gösterdikleri görülmüştür ($\chi^2=13.192$, $P=0.000$, $OR=0.321$, $95\%CI=0.170-0.606$). Diğer taraftan; rs738407 polimorfizminin AG genotipinin NASH için risk teşkil ettiği görülmüştür. AG genotipi; NASH için 1.879 kat artılmış risk göstermektedir ($\chi^2=6.176$, $P=0.013$, $OR=1.879$, $95\% CI=1.138-3.104$). G allel sıklığının NASH hastalarında, kontrollere oranla, daha yüksek olduğu görülmüştür (NASH:%53.13; Kontrol:%39.49). Bu bağlamda, G allelinin istatistiksel olarak NASH için risk oluşturduğu görülmüştür ($\chi^2=13.192$, $P=0.000$, $OR=3.119$, $95\%CI=1.650-5.894$). Ayrıca, cinsiyete göre yapılan analizde de erkek NASH hastalarında rs738407 polimorfizminin risk oluşturduğu, allel ve genotip açısından da teyit edilerek, belirtilmiştir ($\chi^2=8.553$, $P=0.014$) (Çizelge 4.1).

4.2. PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları

PNPLA3 rs738409 gen polimorfizminde; NlaIII restriksiyon endonükleaz kullanılarak bu polimorfizmin genotipleri belirlenmiştir (Şekil 4.2). Elde edilen verilere istinaden, PNPLA3 genine ait rs738409 polimorfizmi istatistiksel olarak önemli derecede NASH ile ilişkilendirilmiş olup, NASH için risk teşkil etmektedir ($\chi^2=18.225$, $P=0.000$).

Bu polimorfizmin CC genotipli bireylerinin NASH'e karşı korundukları ($\chi^2= 11.427$, $P=0.001$, $OR=0.406$, $95\%CI=0.238-0.692$) gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, GG genotipli bireylerin NASH geliştirme riskinin 3.476 kat artmış olduğu gözlemlenmiştir ($\chi^2=11.759$, $P=0.001$, $OR=3.476$, $95\%CI= 1.646-7.343$). Elde edilen verilere göre C allelinin NASH'e karşı koruyucu etki gösterdiği ($\chi^2=11.759$, $P=0.001$, $OR=0.288$, $95\%CI=0.136-0.608$); G allelinin ise NASH için bir genetik risk faktörü olarak nitelendirilebileceği anlaşılmıştır ($\chi^2=11.427$, $P=0.001$, $OR=2.462$, $95\%CI= 1.446-4.194$). Vaka ve Kontroller Hardy-Weinberg dengesi içerisindedir (Çizelge 4.2). G allelinin bu çalışmadaki hastalarda görülme sıklığı %44, kontrollerin ise %28 olduğu tespit edilmiştir. Cinsiyete göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda; rs738409 polimorfizminin hem kadın hem de erkek NASH hastalarında ilişki gösterdiği gözlemlenmiştir ($\chi^2=9.971$, $P=0.007$; $\chi^2=8.432$, $P=0.015$ sırasıyla) (Çizelge 4.2). Ayrıca, kadın ve erkek NASH hastalarında görülen genotipik ilişkinin yanı sıra allelik ilişki de görülmüştür (Çizelge 4.2).

4.3. PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları

ScfI restriksiyon endonüklez vasıtasıyla, PNPLA3 rs2896019 gen polimorfizminin genotipleri saptanmıştır (Şekil 4.3). PNPLA3 rs2896019 gen polimorfizmi de NASH için risk göstermektedir ($\chi^2=6.144$, $P=0.046$). TT genotipli bireylerde NASH'e karşı koruyucu etki görülürken ($\chi^2= 5.208$, $P=0.022$, $OR=0.565$, $95\%CI=0.344 - 0.926$); G alleli taşıyan bireylerde 1.771 kat artmış risk gözlenmektedir ($\chi^2=5.208$, $P=0.022$, $OR=1.771$, $95\%CI=1.080 - 2.904$). Cinsiyete göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda; bayan hastalarda NASH ile hiçbir ilişki bulunamazken ($\chi^2=2.769$, $P=0.250$) (Çizelge 4.3); erkek hastalarda ilişki gözlemlenmiştir. NASH erkek hastalarının TT genotipine ve G alleleline sahip oldukları, bunun da NASH ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Hem kontrol grubu hem de vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi içerisindedir (Çizelge 4.3).

4.4. LCN-2 gen rs139418967 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları

BtgI restriksiyon endonüklez vasıtasıyla, LCN-2 rs139418967 gen polimorfizminin genotipleri saptanmıştır (Şekil 4.5.A). LCN-2 rs 139418967 gen polimorfizmi NASH için risk göstermektedir (Çizelge 4.4). LCN-2 rs 139418967 gen polimorfizminin genotip dağılımı; vakalarda TT genotipi %97.5, TC %2.5, CC %0 şeklinde iken; kontrollerde ise TT genotipi %99.7, TC %0.3, CC %0 şeklinde gözlemlenmektedir. Böylece TT genotipi

koruma etkisi gösterirken ($\chi^2= 3.983$, $P=0.046$, $OR=0.125$, $95\%CI=0.011-1.401$); TC genotipi ise NASH açısından risk teşkil etmektedir ($\chi^2= 3.983$, $P=0.046$, $OR=7.974$, $95\%CI=0.714-89.075$). C risk allelinin vakalardaki dağılımı 0.0125 iken; kontroldeki dağılımı 0.0016'dır ($\chi^2= 3.983$, $P=0.046$, $OR=7.974$, $95\%CI=0.714-89.075$) (Çizelge 4.4).

4.5. LCN-2 Gen rs147787222 Polimorfizminin Genotip ve Allel Sıklıkları

AvaII restriksiyon endonüklez vasıtasıyla, LCN-2 rs147787222 gen polimorfizminin genotipleri saptanmıştır (Şekil 4.5.B). LCN-2 rs147787222 gen polimorfizmi NASH için risk göstermemektedir (Çizelge 4.5). LCN-2 rs 147787222 gen polimorfizminin genotip dağılımı; vakalarda GG genotipi %97.5, GT %2.5, TT %0 iken; kontrollerde ise GG genotipi %99, GT %1, TT %0 olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmada; LCN-2 rs147787222 gen polimorfizminin GG genotipi ($\chi^2= 1.197$, $P=0.274$, $OR=0.397$, $95\%CI=0.062-2.305$) ve GT genotipi ($\chi^2= 1.197$, $P=0.274$, $OR=2.641$, $95\%CI=0.434-16.079$) anlamlı bulunmamıştır. T allelinin dağılımı da vakalarda %0.0125 iken; kontrollerde %0.0048 ($\chi^2= 1.197$, $P=0.247$, $OR=2.641$, $95\%CI=0.434-16.079$) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.1. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda PNPLA3 rs738407 gen polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları ve cinsiyete göre dağılımları

Gen	Vakalar	Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs738407	80(100.0)	313(100.0)	13.193	0.001	
AA	13(16.3)	118(37.7)	13.192	0.000	0.321(0.170-0.606)
AG	49(61.3)	143(45.7)	6.176	0.013	1.879(1.138-3.104)
GG	18(22.5)	52(16.6)	1.508	0.219	1.457(0.797-2.664)
AA+AG	62(77.5)	261(83.4)	1.508	0.219	0.686(0.375-1.255)
GG+AG	67(83.8)	195(62.3)	13.192	0.000	3.119(1.650-5.894)
Allel Sıklığı					
A alleli	75(46.87)	380(60.51)	1.508	0.219	0.686(0.375-1.255)
G alleli	85(53.13)	248(39.49)	13.192	0.000	3.119(1.650-5.894)
HWE(exact)	0.07	0.48			
Gen	Erkek Vakalar	Erkek Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs738407	41(100.0)	159(100.0)	8.553	0.014	
AA	5(12.2)	57(35.8)	8.526	0.004	0.249(0.092-0.669)
AG	26(63.4)	75(47.2)	3.441	0.064	1.941(0.957-3.939)
GG	10(24.4)	27(17.0)	1.187	0.276	1.577(0.692-3.596)
AA+AG	31(75.6)	132(83.0)	1.187	0.276	0.634(0.278-1.446)
GG+AG	36(87.8)	102(64.2)	8.526	0.004	4.024(1.495-10.828)
Allele Sıklığı					
A alleli	36(43.90)	189(59.43)	1.187	0.276	0.634(0.278-1.446)
G alleli	46(56.10)	129(40.57)	8.526	0.004	4.024(1.495-10.828)
HWE(exact)	0.11	0.87			
Gen	Bayan Vakalar	Bayan Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs738407	39(100.0)	155(100.0)	4.836	0.089	
AA	8(20.5)	61(39.4)	4.827	0.028	0.398(0.171-0.922)
AG	23(59.0)	69(44.5)	2.612	0.106	1.352(0.905-2.021)
GG	8(20.5)	25(16.1)	0.424	0.515	1.342(0.553-3.259)
AA+AG	31(79.5)	130(83.9)	0.424	0.515	0.745(0.307-1.810)
GG+AG	31(79.5)	94(79.5)	4.827	0.028	2.515(1.084-5.833)
Allele Sıklığı					
A alleli	39(50.00)	191(61.61)	0.424	0.515	0.745(0.307-1.810)
G alleli	39(50.00)	119(38.39)	4.827	0.028	2.515(1.084-5.833)
HWE(exact)	0.35	0.50			

Çizelge 4.2. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda PNPLA3 rs738409 gen polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları ve cinsiyete göre dağılımları

Gen	Vakalar	Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR; 95%CI
PNPLA3 Rs738409	80(100.0)	313(100.0)	18.225	0.000	
CC	23(28.8)	156(49.8)	11.427	0.001	0.406(0.238-0.692)
CG	43(53.8)	139(44.4)	2.236	0.135	1.455(0.889-2.381)
GG	14(17.5)	18(5.8)	11.759	0.001	3.476(1.646-7.343)
CC+CG	66(82.5)	295(94.2)	11.759	0.001	0.288(0.136-0.608)
GG+CG	57(71.3)	157(50.2)	11.427	0.001	2.462(1.446-4.194)
Allel Sıklığı					
C Alleli	89(0.56)	451(0.72)	11.759	0.001	0.288(0.136-0.608)
G Alleli	71(0.44)	175(0.28)	11.427	0.001	2.462(1.446-4.194)
HWE(exact)	0.50	0.09			
Gen	Erkek Vakalar	Erkek Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs738409	41(100.0)	158(100.0)	9.971	0.007	
CC	12(29.3)	83(52.5)	7.061	0.008	0.374(0.178-0.785)
CG	22(53.7)	66(41.8)	1.865	0.172	1.614(0.809-3.219)
GG	7(17.1)	9(5.7)	5.699	0.017	3.408(1.186-9.795)
CC+CG	34(82.9)	149(94.3)	5.699	0.017	0.293(0.102-0.843)
GG+CG	29((70.7)	75(47.5)	7.061	0.008	2.674(1.274-5.615)
Allel Sıklığı					
C Alleli	46(0.56)	232(0.73)	5.699	0.017	0.293(0.102-0.843)
G Alleli	36(0.44)	84(0.27)	7.061	0.008	2.674(1.274-5.615)
HWE(exact)	0.75	0.54			
Gen	Bayan Vakalar	Bayan Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs738409	39(100.0)	155(100.0)	8.432	0.015	
CC	11(28.2)	73(47.1)	4.530	0.033	0.737(0.576-0.943)
CG	21(53.8)	73(47.1)	0.568	0.451	1.311(0.648-2.650)
GG	7(17.9)	9(5.8)	6.071	0.014	1.148(0.986-1.336)
CC+CG	32(82.1)	146(94.2)	6.071	0.014	0.282(0.098-0.813)
GG+CG	28(71.8)	82(52.9)	4.530	0.033	2.266(1.054-4.872)
Allel Sıklığı					
C Alleli	43(0.55)	219(0.71)	6.071	0.014	0.324(0.129-0.814)
G Alleli	35(0.45)	91(0.29)	4.530	0.033	2.266(1.054-4.872)
HWE(exact)	0.75	0.12			

Çizelge 4.3. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda PNPLA3 rs2896019 gen polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları ve cinsiyete göre dağılımları

Gen	Vakalar	Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR; 95%CI
PNPLA3 Rs2896019	80(100.0)	313(100.0)	6.144	0.046	
TT	37(46.3)	189(60.4)	5.208	0.022	0.565(0.344-0.926)
TG	38(47.5)	115(36.7)	3.102	0.078	1.558(0.949-2.556)
GG	5(6.3)	9(2.9)	2.112	0.146	2.252(0.733-6.916)
TT+TG	75(93.8)	304(97.1)	2.112	0.146	0.444(0.145-1.364)
GG+TG	43(53.8)	125(39.9)	4.968	0.026	1.748(1.066-2.865)
Allel Sıklığı					
T alleli	112(70.0)	491(78.94)	2.112	0.146	0.444(0.145-1.364)
G alleli	48(30.0)	131(21.06)	5.208	0.022	1.771(1.080-2.904)
HWE(exact)	0.30	0.09			
Gen	Erkek Vakalar	Erkek Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs2896019	41(100.0)	158(100.0)	4.941	0.085	
TT	17(41.5)	96(60.8)	4.939	0.026	0.457(0.227-0.920)
TG	22(53.7)	57(36.1)	4.204	0.040	2.052(1.025-4.109)
GG	2(4.9)	5(3.2)	0.282	0.596	1.569(0.293-8.395)
TT+TG	39(95.1)	154(96.9)	0.290	0.590	0.633(0.118-3.387)
GG+TG	24(58.5)	63(39.6)	4.744	0.029	2.186(1.087-4.396)
Allel Sıklığı					
T alleli	56(68.29)	249(78.80)	0.282	0.596	0.637(0.119-3.409)
G alleli	26(31.71)	67(21.20)	4.939	0.026	2.186(1.087-4.396)
HWE(exact)	0.27	0.47			
Gen	Bayan Vakalar	Bayan Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR;95%CI
PNPLA3 Rs2896019	39(100.0)	155(100.0)	2.769	0.250	
TT	20(51.3)	93(60.0)	0.794	0.324	0.821(0.564-1.195)
TG	16(41.0)	58(37.4)	0.172	0.679	1.163(0.568-2.381)
GG	3(7.7)	4(2.6)	2.341	0.126	3.146(0.674-14.681)
TT+TG	36(92.3)	151(97.4)	2.341	0.126	0.318(0.068-1.483)
GG+TG	19(48.7)	62(40.0)	0.974	0.324	1.425(0.704-2.885)
Allel Sıklığı					
T alleli	56(71.79)	242(79.08)	2.341	0.126	0.318(0.068-1.483)
G alleli	22(28.21)	64(20.92)	0.974	0.324	1.425(0.704-2.885)
HWE(exact)	1.0	0.23			

Çizelge 4.4. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda LCN-2 rs139418967 Gen Polimorfizmi polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları

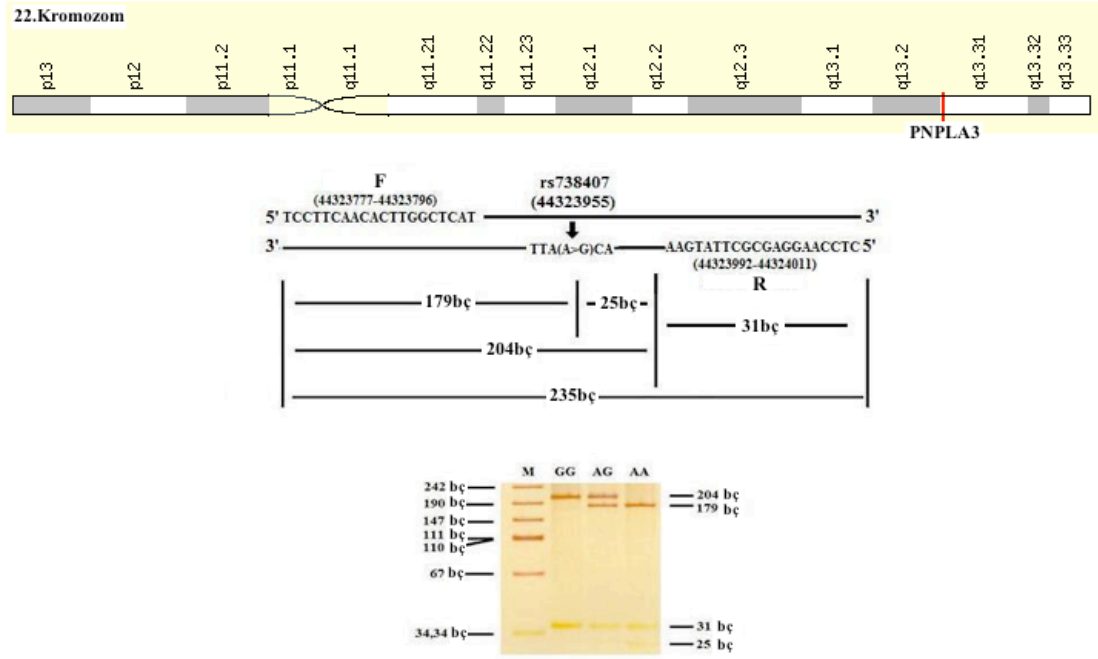
Gen	Vakalar	Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR; 95%CI
LCN-2 rs139418967	80(100.0)	312(100.0)			
TT	78(97.5)	311(99.7)	3.983	0.046	0.125(0.011-1.401)
TC	2(2.5)	1(0.3)	3.983	0.046	7.974(0.714-89.075)
CC	0	0			
Allel Sıklığı					
T Alleli	158(0.9875)	623(0.9983)	0	0	
C Alleli	2(0.0125)	1(0.0016)	3.983	0.046	7.974(0.714-89.075)

Çizelge 4.5. Non-Alkolik Steatohepatitis (NASH) hastalarında ve kontrol grubunda LCN-2 rs147787222 Gen Polimorfizmi polimorfizminin allel ve genotip sıklıkları

Gen	Vakalar	Kontroller	χ^2	P-Değeri	OR; 95%CI
LCN-2 rs147787222	80(100.0)	312(100.0)			
GG	78(97.5)	309(99.0)	1.197	0.274	0.397(0.062-2.305)
GT	2(2.5)	3(1.0)	1.197	0.274	2.641(0.434-16.079)
TT	0	0			
Allele Sıklığı					
G Alleli	158(0.9875)	621(0.99038)	0	0	
T Alleli	2(0.0125)	3(0.0048)	1.197	0.247	2.641(0.434-16.079)

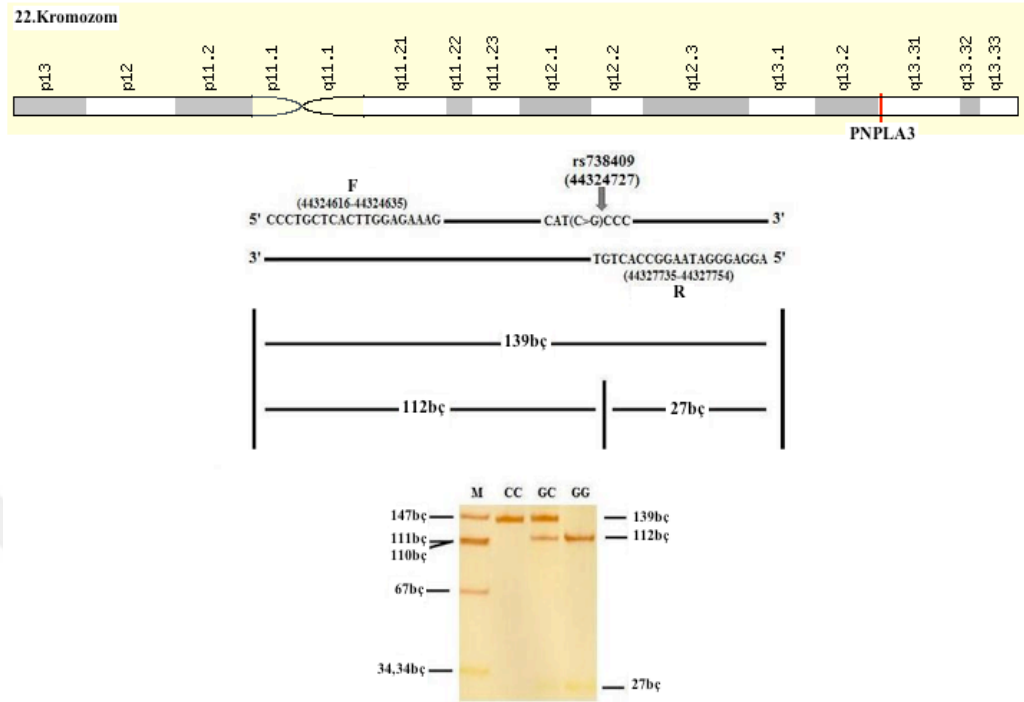
HWE, Hardy-Weinberg Dengesi; OR, (Tahmini) Risk Oranı; CI, Güven Aralığı; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; PNPLA3, patatin-like phospholipase domain-containing 3, LCN-2, lipocalin-2

Şekil 4.1. PNPLA3 gen rs738407 polimorfizminin 22. kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jeldeki görünümü



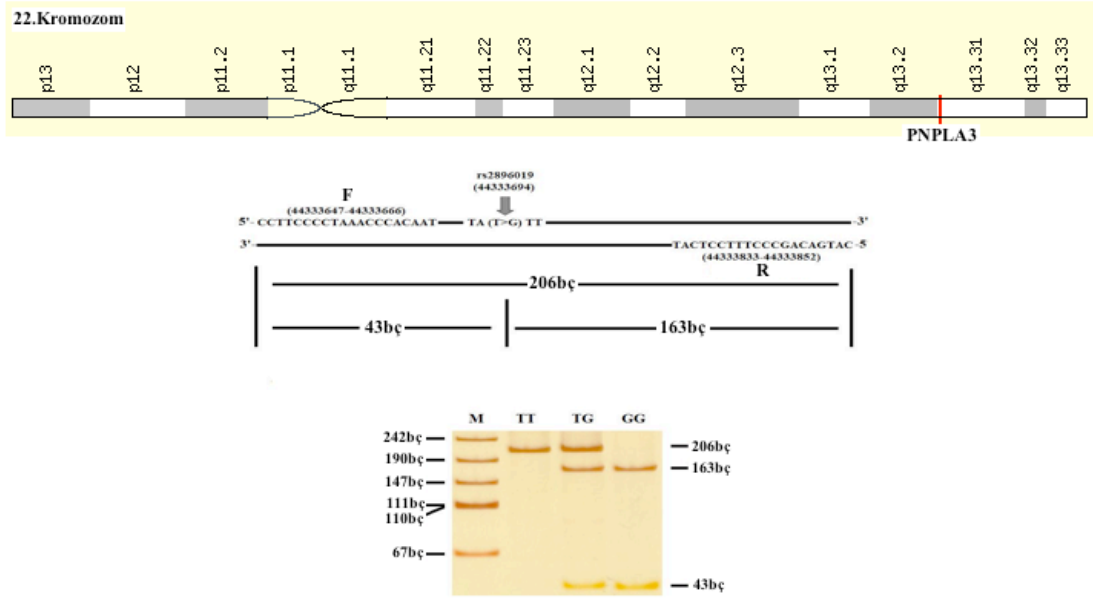
Şekil 4.1. Yukarıda PNPLA3 gen rs738407 polimorfizminin 22. kromozom üzerindeki yeri gösterilmektedir. MluCI restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5' ...AATT... 3') primerlerin 'annealing' bölgesi ile ilişkilendirilmiş olup, amplifikasyon ve RFLP ürünleri belirtilmektedir. Değişimin yani MluCI enziminin kesimine neden olan varyantın bulunduğu yer 44323955. bç'dir. Bu bölgenin amplifikasyonu sonucunda 235 bç'lik ürün elde edilirken; MluCI enzimi ile yapılan kesim sonrasında 204, 179, 31 ve 25 bç'lik fragmentler elde edilmektedir. Aşağıda; PNPLA3 geninin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi görüntüsü verilmektedir. Bu jel %8'lik Poliakrilamid Jel olup, 20W'ta 30 dakika yürütüldükten sonra gümüş boyama ile elde edilmiştir. M kolunu Marker'ı, GG kolunu iki fragmentten oluşan (204 ve 31 bç) GG genotipini, AG kolunu dört fragmentten (204, 179, 31 and 25 bç) oluşan AG genotipini, AA kolunu ise üç fragmentten (179, 31 ve 25 bç) oluşan AA genotipini belirtmektedir.

Şekil 4.2. PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin 22. kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jeldeki görünümü



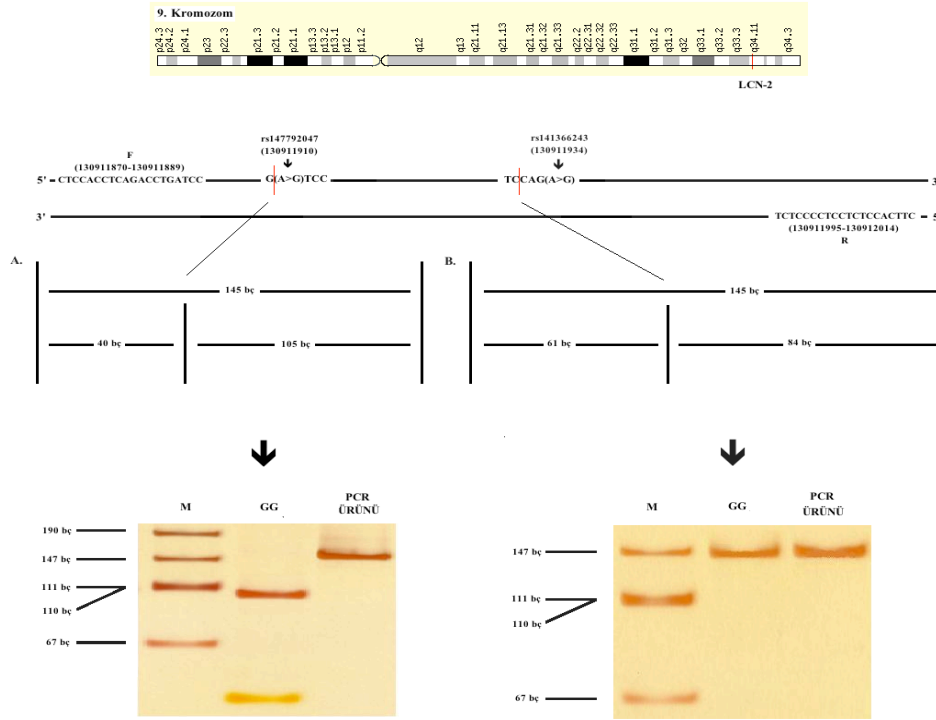
Şekil 4.2. Yukarıda PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin 22. kromozom üzerindeki çizimi verilmektedir. NlaIII restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5' ... CATG ... 3') primerlerin 'annealing' bölgesi ile ilişkilendirilmiş olup, amplifikasyon ve RFLP ürünleri belirtilmektedir. Değişimin yani NlaIII enziminin kesimine neden olan varyantın bulunduğu yer 44324727. bç'dir. Bu bölgenin amplifikasyonu sonucunda 139 bç'lik ürün elde edilirken; NlaIII enzimi ile gerçekleştirilen kesim sonrasında 112 ve 27 bç'lik fragmentler elde edilmektedir. Aşağıda; PNPLA3 geninin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi görüntüsü verilmektedir. Bu jel %8'lik Poliakrilamid Jel olup, 20W'ta 30 dakika yürütüldükten sonra gümüş boyama ile elde edilmiştir. M kolonu Marker'ı, CC kolonu tek fragmentten oluşan (139 bç) CC genotipini, GC kolonu üç fragmentten (139, 112 ve 27 bç) oluşan GC genotipini, GG kolonu ise iki fragmentten (112 ve 27 bç) oluşan GG genotipini belirtmektedir.

Şekil 4.3. PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin 22. kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jel görünümü



Şekil 4.3. Yukarıda PNPLA3 rs2896019 gen polimorfizminin 22. kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jel görünümünün çizimi verilmektedir. SfcI restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5' ...CTRYAG...3') primerlerin 'annealing' bölgesi ile ilişkilendirilmiş olup, amplifikasyon ve RFLP ürünleri belirtilmektedir. Değişimin yani SfcI enziminin kesimine neden olan varyantın bulunduğu yer 44333694. bç'dir. Bu bölgenin amplifikasyonu sonucunda 206 bç'lik ürün elde edilirken; SfcI enzimi ile yapılan kesim sonrasında 163 ve 43 bç'lik fragmentler elde edilmektedir. Aşağıda; PNPLA3 geninin Poliakrilamid Jel Elektroforezi görüntüsü verilmektedir. Bu jel %8'lik Poliakrilamid Jel olup, 20W'ta 30 dakika yürütüldükten sonra gümüş boyama ile elde edilmiştir. M kolonu Marker'ı, TT kolonu tek fragmentten oluşan (206 bç) TT genotipini, TG kolonu üç fragmentten (206, 163 ve 43 bç) oluşan TG genotipini, GG kolonu ise iki fragmentten (163 ve 43 bç) oluşan GG genotipini belirtmektedir.

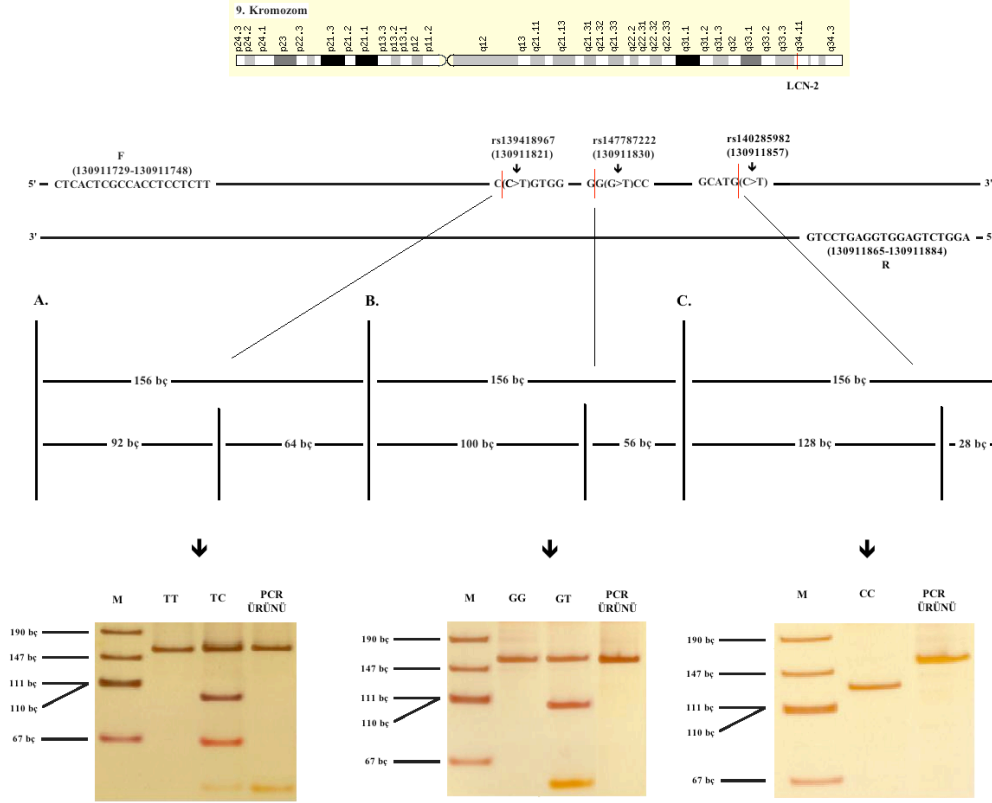
Şekil 4.4. LCN-2 gen rs147792047 (A) ve rs141366243 (B) polimorfizmlerinin 9. kromozom üzerindeki yerleri ve poliakrilamid jel görünümüleri



Şekil 4.4. Yukarıda LCN-2 gen rs147792047 (A) ve rs141366243 (B) polimorfizmlerinin 9. kromozom üzerindeki yeri ve poliakrilamid jel görünüm çizimleri verilmektedir. rs147792047 (A) polimorfizmindeki *Ava*II restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5'...GGWCC...3') ile rs141366243 (B) polimorfizmindeki *Hpy*188III restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5'...TCNNGA...3'), primerlerin 'annealing' bölgesi ile ilişkilendirilmiş olup, amplifikasyon ve RFLP ürünleri belirtilmektedir. Değişimin yani *Ava*II enziminin kesimine neden olan rs147792047 (A) varyantının bulunduğu yer 130911910. bç iken; *Hpy*188III enziminin kesimine neden olan rs141366243 (B) polimorfizminin bulunduğu yer ise 130911934. bç'dir. Her iki bölgenin amplifikasyonu tek bir amplifikasyon ile sağlanırken, amplifikasyon sonucunda 145 bç'lik ürün elde edilmektedir. *Ava*II enzimi (A) ile yapılan kesim sonrasında 105 ve 40 bç'lik fragmentler elde edilirken, *Hpy*188III (B) enzimi ile yapılan kesim sonrasında ise 61 ve 84 bç'lik iki fragment elde edilir. Aşağıda; LCN-2 geninin Poliakrilamid Jel Elektroforezi görüntüleri verilmektedir. Her iki jel de %8'lik Poliakrilamid Jel olup, 20W'ta 35 dakika yürütüldükten sonra gümüş boyama ile elde edilmiştir. rs147792047 (A) varyantı için M kolonu Marker'ı, GG kolonu iki fragmentten oluşan (105 ve 40 bç) GG genotipini gösterirken; rs141366243 (B) varyantı için M kolonu Marker'ı, GG kolonu ise tek

fragmentten oluşan (145 bç) GG genotipini göstermektedir. Ayrıca, her iki jelde PCR ürünleri de bulunmaktadır (145 bç).

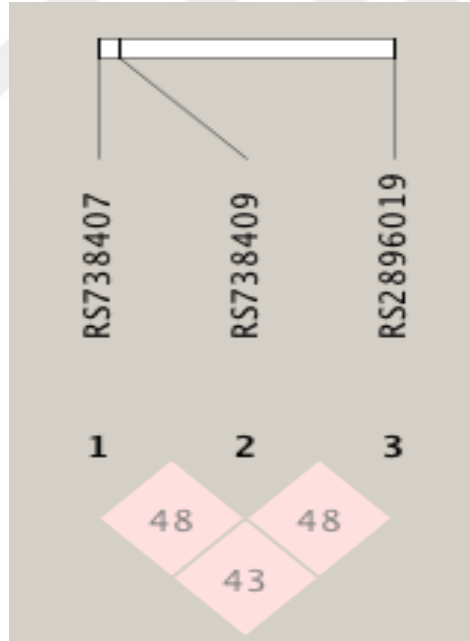
Şekil 4.5. LCN-2 gen rs139418967 (A), rs147787222 (B) ve rs140285982 (C) polimorfizmlerinin 9. kromozom üzerindeki yerleri ve poliakrilamid jel görüntüleri



Şekil 4.5. Yukarıda LCN-2 gen rs139418967 (A), rs147787222 (B) ve rs140285982 (C) polimorfizmlerinin 9. kromozom üzerindeki yerleri ve poliakrilamid jel görüntüleri verilmektedir. rs139418967 (A) polimorfizmindeki BtgI restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5'...CCRYGG...3'), rs147787222 (B) polimorfizmindeki AvaII restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5'...GGWCC...3') ve rs140285982 (C) polimorfizmindeki SphI restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (5'...GCATGC...3'), primerlerin 'annealing' bölgeleri ile ilişkilendirilmiş olup, amplifikasyon ve RFLP ürünleri belirtilmektedir. Değişimin yani BtgI enziminin kesimine neden olan rs139418967 (A) varyantının bulunduğu yer 130911821. bç ve AvaII enziminin kesimine neden olan rs147787222 (B) polimorfizminin bulunduğu yer 130911830. bç iken; SphI enziminin kesimine neden olan rs140285982 (C) varyantının bulunduğu yer ise 130911857. bç'dir. Üç bölgenin amplifikasyonu tek bir amplifikasyon ile sağlanırken, amplifikasyon sonucunda 156 bç'lik ürün elde edilmektedir. BtgI enzimi (A) ile yapılan kesim sonrasında

92 ve 64 bç'lik iki fragment, AvaII (B) enzimi ile yapılan kesim sonrasında 100 ve 56 bç'lik iki fragment elde edilirken; SphI enzimi (C) ile yapılan kesim sonrasında 128 ve 28 bç'lik iki fragment elde edilmektedir. Aşağıda; LCN-2 geninin Poliakrilamid Jel Elektroforezi görüntüleri verilmektedir. Üç jel de %8'lik Poliakrilamid Jel olup, 20W'ta 35 dakika yürütüldükten sonra gümüş boyama ile elde edilmiştir. rs139418967 (A) varyantı için M kolonu Marker'ı, TT kolonu tek fragmentten oluşan (156 bç) TT genotipini, TC kolonu üç fragmentten oluşan (156, 92 ve 64 bç) TC genotipini; rs147787222 (B) varyantı için M kolonu Marker'ı, GG kolonu ise tek fragmentten oluşan (156 bç) GG genotipini, GT kolonu üç fragmentten oluşan (156, 100 ve 56 bç) GT genotipini; rs140285982 (C) varyantı için M kolonu Marker'ı, CC kolonu ise iki fragmentten oluşan (128 ve 28 bç) CC genotipini göstermektedir. Ayrıca, her üç jelde PCR ürünleri de bulunmaktadır (156 bç).

Şekil 4.6. PNPLA3 gen rs738407, rs738409, rs2896019 polimorfizmlerinin bağlantı dengesizliği (Linkage Disequilibrium, LD)



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada; NASH hasta ve kontrol gruplarında PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) ve LCN-2 (Lipocalin-2) genleri çalışılarak, bu genlerdeki SNP'lerin allelleri ve genotipleri bizim popülasyonumuz açısından PCR-RFLP yöntemiyle saptanarak değerlendirilmiştir. Çalışmada seçilen PNPLA3 genindeki rs738407, rs738409 ve rs2896019 polimorfizmleri 'doğrulayıcı' nitelikte iken; LCN-2 genindeki rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243 polimorfizmleri 'aday' niteliktedir.

PNPLA3 geninde çalışılan rs738407, rs738409 ve rs2896019 polimorfizmleri daha önce de dünya genelinde genom boyu bağlantı çalışmalarında (GWAS) ve vaka-kontrol çalışmalarında NASH açısından değerlendirilmiştir (Romeo et al. 2008; Rotman et al. 2010; Hotta et al. 2010; Speliotes et al. 2010; Speliotes et al. 2011; Sookoian and Pirola, 2011; Zain et al. 2012; Peng et al. 2012; Kawaguchi et al. 2012; Kitamoto et al. 2013). Biz de 'Genetic Testing and Molecular Biomarkers' adlı dergide yayına kabul olan, Türk popülasyonunda yapmış olduğumuz bu çalışma ile PNPLA3 genindeki ilgili varyantların NASH için farklı ölçülerde risk oluşturduklarını doğrulamış olduk (Islek et al. 2014).

PNPLA3 gen ürünü olan protein bir 'single-pass type II membrane protein' olup; hem triaçilgliserol lipaz (triacylglycerol lipase) hem de açilgliserol o-açiltransferaz (acylglycerol o-acyltransferase) aktiviteleri mevcuttur. PNPLA3 geni *in vitro* koşullarda trigliseride karşı hareket eder ve yağ asitlerinin transferini sağlar (mono- ve diaçilgliserol (Jenkins et al. 2004).

PNPLA3 I148M sinonim olmayan, *nonsynonymous*, polimorfizmi; C/G değişimi yani 148. amino asit pozisyonundaki izolösin amino asidinin metionin amino asidine dönüşmesiyle karakterize edilir (Santoro et al. 2010). I148M (rs738409); PNPLA3 genindeki en çok çalışılan varyant olmakla beraber, NASH, NAYKH gibi kronik karaciğer hastalıklarının tümüyle ciddi anlamda ilişkili bulunmuştur (Romeo et al. 2008; Romeo et al. 2010; Tian et al. 2010; Valenti et al. 2010; Valenti et al. 2011).

PNPLA3 geninin N terminalinde Ser-Asp katalitik çiftini (catalytic dyad) (Gly-X-Ser-X-Gly and Asp-X-Gly/Ala) içeren konsensüs dizilerin bulunmasının yanı sıra patatin-benzeri (patatin-like) domain (rezidü 10-179, UniProt) bulunmaktadır (Wilson et al. 2006). I148M (rs738409) varyantı çok korunumlu bir şekilde, konsensüs dizilerin arasında yer alır ve katalitik çifte bağlanma özelliğini yok ederek fonksiyon kaybı yani 'loss of function' etkisine neden olur. PNPLA3 148M alleli yani G alleli, 148I alleli yani C alleli ile

mukayese edildiğinde; 148M (G) allelinin daha yüksek derecede karaciğer yağ içeriğiyle yani steatoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Romeo et al. 2008; Kotronen et al. 2009). Dolayısıyla NAYKH ve NAYKH'nın progresif bir formu olan NASH ile ciddi anlamda ilişkilidir.

PNPLA3 rs738409 gen polimorfizminde; NlaIII restriksiyon endonükleaz kullanılarak bu polimorfizmin genotipleri belirlenmiştir (Şekil 4.2). Literatürde rs738409 polimorfizminin NASH ile olan ilişkisi konusunda pek çok çalışma mevcuttur (Çizelge 5.1). PNPLA3 gen rs738409 varyantı bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak önemli derecede NASH ile ilişkilendirilmiş olup, NASH için risk teşkil etmektedir. ($\chi^2=18.225$, $P=0.000$). Bu polimorfizmin CC genotipli bireyleri NASH'e karşı korunuyorlarken ($\chi^2=11.427$, $P=0.001$, $OR=0.406$, $95\%CI=0.238-0.692$); GG genotipli bireylerin NASH geliştirme riskinin 3.476 kat artmış olduğu gözlemlenmiştir ($\chi^2=11.759$, $P=0.001$, $OR=3.476$, $95\%CI=1.646-7.343$). C allelinin NASH'e karşı koruyucu etki gösterdiği ($\chi^2=11.759$, $P=0.001$, $OR=0.288$, $95\%CI=0.136-0.608$); G allelinin ise NASH için bir genetik risk faktörü olarak nitelendirilebileceği anlaşılmıştır ($\chi^2=11.427$, $P=0.001$, $OR=2.462$, $95\%CI=1.446-4.194$). Vaka ve Kontroller Hardy-Weinberg dengesi içerisinde (Çizelge 4.2). G allelinin bu çalışmadaki hastalarda görülme sıklığı %44, kontrollerde ise %28 olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 5.1: PNPLA3 gen rs738409 polimorfizminin farklı etnik gruplar arasındaki dağılımı

Populasyon	G Allelinin Görülme Sıklığı (%)	Referans
Meksikalılar (çocuklar)	61	Larrier-Carrasco E et al.,2013
Amerikalı Hispanikler	49	Romeo et al., 2008
Japonlar	48	Kawaguchi et al., 2012
Han Çinlileri	34	Peng et al., 2012
Türkler	28	Çizelge 4.2
İtalyanlar (obez)	26	Romeo et al., 2010
Avrupalı Amerikalılar	23	Romeo et al., 2008, Rotman et al., 2010
Afrikalı Amerikalılar	17	Romeo et al., 2008

Cinsiyete göre yapılan istatistiksel verilere dayanarak; rs738409 polimorfizminin hem bayan hem de erkek NASH hastalarında ilişki gösterdiği gözlemlenmiştir ($\chi^2=9.971$,

P=0.007; $\chi^2=8.432$, P=0.015 sırasıyla) (Çizelge 4.2). Ayrıca, bayan ve erkek NASH hastalarında görülen genotipik ilişkinin yanı sıra allelik ilişki de görülmüştür (Çizelge 4.2).

Bu çalışmada yer alan diğer PNPLA3 gen polimorfizmleri ise rs738407 ve rs2896019 polimorfizmleridir. PNPLA3 rs738407 gen polimorfizminde; MluCI restriksiyon endonükleaz kullanılarak bu polimorfizmin genotipleri belirlenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen verilere göre ($\chi^2=13.193$, P=0.001); bu varyant NASH ile ilişkilendirilmiş olup, NASH hastaları için bir risk oluşturduğu saptanmıştır. Bu çalışmada PNPLA3 genindeki rs738407 polimorfizminin AA genotipinin NASH'e karşı koruyucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir (NASH ($\chi^2=13.192$, P=0.000, OR=0.321, 95%CI= 0.170-0.606). Diğer taraftan ise; bu polimorfizmin AG genotipinin NASH için 1.879 kat artmış risk gösterdiği gözlemlenmiştir ($\chi^2=6.176$, P=0.013, OR=1.879, 95% CI= 1.138-3.104). G allel sıklığının NASH hastalarında, kontrollere oranla, daha yüksek olduğu görülmüştür (NASH:%53.13; Kontrol:%39.49). Elde edilen bu veri, Japonlar'da G allele sıklığının NAYKH hastalarında %72, kontrolde ise %63 olarak tespit edilidği çalışmayı doğrulayan bir niteliktedir (Kawaguchi et al., 2012). Dolayısıyla, G allelinin istatistiksel olarak NASH için risk oluşturduğu saptanmıştır ($\chi^2=13.192$ P=0.000, OR=3.119, 95%CI= 1.650-5.894). Ayrıca, cinsiyete göre yapılan analizde de erkek NASH hastalarında rs738407 polimorfizminin risk oluşturduğu görülmüştür ($\chi^2=8.553$, P=0.014). Bu ilişki allel ve genotip açısından da doğrulanmıştır (Çizelge 4.1).

PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminde; SclI restriksiyon endonükleaz vasıtasıyla bu varyantın genotipleri saptanmıştır (Şekil 4.3). PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizmi de NASH için risk teşkil etmektedir ($\chi^2=6.144$, P=0.046). TT genotipi; bireylerde NASH'e karşı koruyucu etki gösterirken ($\chi^2= 5.208$, P=0.022, OR=0.565, 95%CI=0.344 - 0.926); G alleli taşıyan bireylerde 1.771 kat artmış risk görülmektedir ($\chi^2=5.208$, P=0.022, OR=1.771, 95%CI=1.080 - 2.904). Ayrıca, PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizmi farklı etnik gruplar arasında farklı allel dağılımları göstermektedir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2: PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin farklı etnik gruplar arasındaki dağılımı

Populasyon	G Allelin Görülme Sıklığı (%)	Referans
Japonlar	45, 48	Kitamoto et al., 2013 Kawaguchi et al., 2012
Türkler	21	Çizelge 4.3

Cinsiyete göre istatistiksel analiz yapıldığında; bayan hastalarda PNPLA3 gen rs2896019 polimorfizminin NASH ile hiçbir ilişki görülmezken ($\chi^2=2.769$, $P=0.250$) (Çizelge 4.3); erkek hastalarda ilişki gözlemlenmiştir. NASH erkek hastalarının TT genotipine ve G alleleline sahip oldukları, bunun da NASH ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Burada da hem kontroller hem de vakalar Hardy-Weinberg dengesi içerisinde (Çizelge 4.3).

Çalıştığımız bu üç polimorfizm arasında, şu ana kadar yapılan diğer çalışmalarda da görüldüğü gibi; NASH ile en çok ilişkilendirilen polimorfizm rs738409'dur (Çizelge 4.2). Japon NAYKH hastalarında yapılan çalışma sonucunda; rs738409 varyantının G risk allelinin NAYKH için ciddi bir risk faktörü olmasının yanı sıra bu allelin yüksek seviyelerdeki transaminazlarla (ALT, AST), ferritin seviyeleriyle ve fibrozis aşamasıyla ilişkili olduğu görülmüştür (Hotta et al., 2010). PNPLA3 geni açısından noksan bırakılan farelerde ve transgenik farelerde ise karaciğer yağlanmasına rastlanmamıştır (Chen et al., 2010; Basantani et al., 2011; Li et al., 2012). Diğer taraftan, yine farelerde yapılan bir çalışmada I148M polimorfizminin aşırı ekspresyonu sonucunda karaciğer yağlanması gözlemlenmiştir (Li et al., 2012). Dolayısıyla, PNPLA3 geninin NAYKH hastalarının karaciğerlerinde anormal lipid metabolizmasında yer aldığı ve PNPLA3 gen polimorfizmlerinin NASH progresyonunda önemli roller üstlendiği düşünülmektedir. PNPLA3 gen rs2896019 ve rs738407 polimorfizmleri ise kodlanmayan bölgede yani intronda yer alarak, NAYKH ile ilişkilidir (Kawaguchi et al., 2012; Kitamoto et al., 2013). PNPLA3 gen rs738407 ve rs2896019 polimorfizmlerinin fibrozisle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Kitamoto et al., 2013). Bu varyantlar intronda yer alıp, amino asit değişikliğine sebep olmadıkları için gen ekspresyonunda kontrol edici noktalar olabilirler. Genin ekspresyonuyla ilgili yollara ya da bu yollaradaki konsensüs dizilere etki ederek gen ekspresyonu regülasyonunda rol oynayabilirler. Ayrıca mRNA (messenger RNA)'nın, miRNA (microRNA) ile regüle edildiği bilindiği üzere; belki de PNPLA3 gen rs2896019 ve rs738407 polimorfizmlerinin introndaki prosesleme işlemi esnasında problem yaratarak genin ekspresyonunu etkilediği düşünülebilir. Çünkü mRNA proseslenmesi sırasında bazı intronik bölgeler miRNA'ya dönüşebilir ve böylece miRNA, mRNA'nın ekspresyonunu etkileyebilir.

Aday gen olarak, bu çalışmada yer alan gen ise LCN-2 (Lipocalin 2) genidir. Lipokalin-2 (LCN-2), 24p3 ya da Notrofil Jelatinaz-ilişkili Lipokalin (NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin) sekretuar bir glikoproteindir ve birçok farklı doku ve hücre

tipinde (adipositler, immünoisitler, karaciğer, makrofajlar gibi) eksprese olmaktadır (Ong et al., 2011). LCN-2'nin tam olarak hücrel ve ekstrasellüler fonksiyonları aydınlanamamıştır. Kanser, böbrek hasarı, kardiyovasküler hastalıklar ve alkol zehirlenmesi gibi hastalıklarla ilişkilidir (Terra et al., 2013). Apoptozundaki, hücre sinyalindeki ve çoğalmasındaki rolleri tam anlamıyla netleşmemiştir. İnflamasyon, demir metabolizması gibi yollardaki görevleri üzerine çalışılmaktadır (Borkham-Kamphorst et al., 2013). LCN-2'nin inflamatuvar yollarda yer aldığı düşünölmek ile birlikte bu genin obezite ve adipoz doku inflamasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Terra et al. 2013). LCN-2 seviyesinin, obezitelerekte inflamasyon ve İD'ne sebebiyetten çok cevaben yükseldiği düşünölmektedir. LCN-2 geninin aşırı eksprese olması hücreleri oksidatif stresten korur. Lipokalin-2'nin; NAYKH ve hipertansiyon gibi hastalıkların risk faktörleri olan obezite, insülin direnci ve inflamasyon için biyo-belirteç olduğu bilinmektedir (Ong et al. 2011). Farelerde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; yakınlardaki inflamatuvar hücrelerin varlığından dolayı, hepatik parankimal hücrelerde LCN-2 proteinin ekspresyonuna rastlanılmıştır. Son yıllarda, LCN-2 geninin hepatik hücreleri hidrojen peroksidin toksisitesinden korumada görev aldığı gösterilmiştir. Bütün bilgilerin ışığında; NASH hastalarının karaciğerindeki LCN-2 ekspresyonunun inflamatuvar hücre kaynaklı sitotoksik strese cevaben yükseldiği düşünölmektedir. Dolayısıyla LCN-2; NASH için potansiyel bir inflamatuvar belirteç olabilir (Semba et al. 2013).

Bu çalışmada; SNP veritabanından LCN-2 genine ait on beş tane aday nonsynonymous polimorfizmleri tespit edilerek, bu polimorfizmlerin arasından yalnızca Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi metoduna uygun olanlar çalışılmıştır. Bu SNP'ler; rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243'tür. Seçilen varyantların hepsi dünyada ilk defa bizim popülasyonumuz açısından değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel verilere dayanarak LCN-2 gen rs139418967 ve rs147787222 varyantlarının anlamlı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5).

LCN-2 gen rs139418967 polimorfizminin genotipleri, BtgI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak saptanmıştır (Şekil 4.5.A). LCN-2 gen rs139418967 polimorfizminin genotip dağılımı; vakalarda TT genotipi %97.5, TC %2.5, CC %0 şeklinde iken; kontrollerde ise TT genotipi %99.7, TC %0.3, CC %0 şeklinde görölmektedir. Böylece TT genotipi koruma etkisi gösterirken ($\chi^2= 3.983$, $P=0.046$, $OR=0.125$, $95\%CI=0.011-1.401$); TC genotipi ise NASH açısından risk teşkil etmektedir ($\chi^2= 3.983$, $P=0.046$, $OR=7.974$, $95\%CI=0.714-89.075$). C risk allelinin vakalardaki

dağılımı 0.0125 iken; kontroldeki dağılımı 0.0016'dır ($\chi^2= 3.983$, $P=0.046$, $OR=7.974$, $95\%CI=0.714-89.075$) (Çizelge 4.4). Yani; yapılan bu çalışmada LCN-2 gen rs 139418967 polimorfizmi NASH için risk göstermektedir (Çizelge 4.4).

Bir diğer aday SNP olan LCN-2 gen rs147787222 polimorfizminin genotipleri AaII restriksiyon endonükleaz enzimi aracılığıyla saptanmıştır (Şekil 4.5.B). LCN-2 gen rs147787222 polimorfizminin genotip dağılımı; vakalarda GG genotipi %97.5, GT %2.5, TT %0 iken; kontrollerde ise GG genotipi %99, GT %1, TT %0 olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmada; LCN-2 gen rs147787222 polimorfizminin GG genotipi ($\chi^2= 1.197$, $P=0.274$, $OR=0.397$, $95\%CI=0.062-2.305$) ve GT genotipi ($\chi^2= 1.197$, $P=0.274$, $OR=2.641$, $95\%CI=0.434-16.079$) anlamlı bulunamamıştır. T allelinin dağılımı da vakalarda %0.0125 iken; kontrollerde %0.0048 ($\chi^2= 1.197$, $P=0.247$, $OR=2.641$, $95\%CI=0.434-16.079$) olarak göze çarpmaktadır (Çizelge 4.5). Dolayısıyla, LCN-2 rs147787222 gen polimorfizmi NASH için risk göstermemektedir (Çizelge 4.5).

Seçilen beş polimorfizmin arasından yalnızca LCN-2 gen rs139418967 ve rs147787222 polimorfizmlerinin anlamlı sonuçlar vermesi; sadece bu varyantların bizim popülasyonumuz açısından SNP olup, diğer varyantların (rs140285982, rs147792047 ve rs141366243) mutasyon olarak değerlendirilebilmesi görüşüne dayandırılabilir. Başka bir deyişle; LCN-2 gen rs140285982, rs147792047 ve rs141366243 polimorfizmleri bizim popülasyonumuzda henüz polimorfizm olarak evrimleşmemiştir. LCN-2 aday gen çalışmasında hasta sayısının yetersiz olması, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermesine rağmen, sonucun netleşmesine engel teşkil etmektedir. Hasta sayısı arttırıldığı takdirde, bu çalışmada da anlamlı bulunan LCN-2 gen rs139418967 polimorfizminin çalışılmasında yarar olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada bizim popülasyonumuz açısından ilk defa çalışılan PNPLA3 gen rs738407 rs738409 ve rs2896019 polimorfizmleri ve dünyada ilk defa bizim popülasyonumuzda çalışılan LCN-2 gen rs139418967, rs147787222, rs140285982, rs147792047 ve rs141366243 polimorfizmleri yer alarak bu varyantların NASH ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir. PNPLA3 gen çalışması ‘doğrulayıcı’ nitelikte olup, allelik heterojenitenin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Böylece, hipotezin doğruluğu yapılan bağlantı analizlerinde de görülmüştür (Şekil 4.6). Bu çalışmada yer alan PNPLA3 gen polimorfizmleri NASH ile farklı derecelerde ilişki gösterdiği için NASH’in evrelendirilmesinde (staging) bu varyantların farklı ekspresyonları bize ipucu verebilir. LCN-2 gen çalışması ‘aday gen’ niteliğinde olmakla beraber hepatosellüler koruyucu ya da diyetle bağlı hepatosellüler zarar verici bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Ancak daha çok hepatosellüler koruyucu etkisi bulunduğu kanısı hakimdir. Seçilen LCN-2 gen polimorfizmleri bu çalışmada NASH hastaları açısından değerlendirildiğinde; minimum allel sıklıklarının çok düşük olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, hepatosellüler koruyucu etkisi daha ön plandadır. Daha net bilgiler elde edebilmek için LCN-2 gen polimorfizmleri üzerine çalışmalar yapılmalıdır.

PNPLA3 gen polimorfizmleriyle ilgili olan bu çalışma ‘Genetic Testing and Molecular Biomarkers’ dergisinde yayına kabul edilmiştir. LCN-2 gen polimorfizmleriyle ilgili olan çalışma ise hasta sayısı artırılarak yayına sunulacaktır.

KAYNAKLAR

- Basantani MK, Sitnick MT, Cai L, Brenner DS, Gardner NP, Li JZ, Schoiswohl G, Yang K, Kumari M, Gross RW, Zechner R, Kershaw EE (2011) Pnpla3/adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res* 52:318–329
- Borkham-Kamphorst E, van de Leur E, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, Tacke F, Berger T, Mak TW, Weiskirchen R (2013) Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1832(5):660-73. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.01.014
- Carlioglu A, Isik A, Turkay C, Uz E, Eraslan E (2007) Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Olan Olgularımızın Klinik Özellikleri. *Yeni Tıp Dergisi* 2007
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ (2012) 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. *Am J Gastroenterol*. 2012 Jun;107(6):811-26. doi: 10.1038/ajg.2012
- Chen W, Chang B, Li L, Chan L (2010) Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* 52:1134–1142
- Daly AK (2003) Candidate gene case-control studies. *Pharmacogenomics*. 2003 Mar;4(2):127-39 doi:10.1517/phgs.4.2.127.22629
- Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ (2005) Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005 Feb;54(2):303-6 doi: 10.1136/gut.2003.024935
- Dongiovanni P1, Anstee QM, Valenti L. (2013) Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5219-38
- Dubuquoy C, Robichon C, Lasnier F, Langlois C, Dugail I, Foufelle F, Girard J, Burnol AF, Postic C, Moldes M (2011) Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J Hepatol*. 2011 Jul;55(1):145-53. doi: 10.1016/j.jhep.2010.10.024
- Duwaerts CC, Maher JJ. (2014) Mechanisms of Liver Injury in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Curr Hepatology Rep*(2014) DOI 10.1007/s11901-014-0224-8
- Erickson SK (2009) NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD). *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S412-6. doi: 10.1194/jlr.R800089-JLR200
- Farrell, G. C., George, J., de la M. Hall, P. and McCullough, A. J. (2007) Overview: An Introduction to NASH and Related Fatty Liver Disorders, in *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders* (eds G. C. Farrell, J. George, P. de la M. Hall and A. J. McCullough), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470987438.ch1
- Friedrich K, Wannhoffl A, Kattner S, Brune M, Hov JR, Weiss KH, Antoni C, Dollinger M, Neumann-Haefelin C, Seufferlein T, Schemmer P, Schirmacher P, Stremmel W, Gotthardt DN (2014) PNPLA3 in end-stage liver disease: alcohol consumption, HCC

- development, and transplantation-free survival. *Hepatology (Clinical)* 2014 DOI: 10.1111/jgh.12540
- Ganz M, Szabo G (2013) Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology Int* (2013) 7 (Suppl 2):S771–S781 DOI 10.1007/s12072-013-9468-6
- Goren B, Fen T (2005) Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı-Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Review. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2005;25(6):841-50
- Hashimoto E, Tokushige K, Ludwig J. (2014) Diagnosis and Classification of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Current Concepts and Remaining Challenges. *Hepatology Res.* 2014 Mar 25. doi: 10.1111/hepr.12333
- Hotta K, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A (2010) Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet.* 2010 Dec 22;11:172. doi: 10.1186/1471-2350-11-172.PMID:21176169[PubMed - indexed for MEDLINE]
- <http://flipper.diff.org/app/items/5409>
- <https://docs.google.com/document/d/1OYWecNu41GAoUciD7kH3okwkf79kiYhnUqRBalbZbvM/preview?pli=1>
- Huang YS, Chang CH, Lin TL, Perng CL (2014) Genetic variations of superoxide dismutase 2 and cytochrome P450 2E1 in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2014 Mar 20. doi: 10.1111/liv.12533
- Islek EE, Sazci A, Ozel MD, Aygun C (2014) Genetic Variants in the PNPLA3 Gene Are Associated with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Genet Test and Mol Biomarkers* 2014 doi: 10.1089/gtmb.2014.0019
- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):48968-75. Epub 2004 Sep 10.
- Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, Yasui K, Saibara T, Hashimoto E, Kawanaka M, Watanabe S, Kawata S, Imai Y, Kokubo M, Shima T, Park H, Tanaka H, Tajima K, Yamada R, Matsuda F, Okanoue T for the Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) (2012) Genetic Polymorphisms of the Human PNPLA3 Gene Are Strongly Associated with Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Japanese. *PLoS One.* 2012;7(6):e38322. doi: 10.1371/journal.pone.0038322
- Kawano Y, Cohen DE. (2013) Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013 Apr;48(4):434-41. doi: 10.1007/s00535-013-0758-5
- Kessler SM, Simon Y, Gemperlein K, Gianmoena K, Cadenas C, Zimmer V, Pokorny J, Barghash A, Helms V, Rooijen N, Bohle RM, Lammert F, Hengstler JG, Mueller R, Haybaeck J, Kiemer AK (2014) Fatty Acid Elongation in Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2014 Apr 4;15(4):5762-73. doi: 10.3390/ijms15045762

- Kim CH, Younossi ZM. (2008) Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2008 Oct;75(10):721-8
- Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A, Hotta K (2013) Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hum Genet*. 2013 Jul;132(7):783-92. doi: 10.1007/s00439-013-1294-3
- Koo SH. (2013) Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013 Sep;19(3):210-5. doi: 10.3350/cmh.2013.19.3.210
- Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, Arkkila P, Arola J, Kiviluoto T, Fisher RM, Ehrenborg E, Orho-Melander M, Ridderstråle M, Groop L, Yki-Järvinen H (2009) A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 2009;52:1056–1060
- Kucukoglu O, Guldiken N, Chen Y, Usachov V, El-Heliebi A, Haybaeck J, Denk H, Trautwein C, Strnad P (2014) High-fat diet triggers Mallory-Denk body formation via misfolding and crosslinking of excess keratin 8. *Hepatology*. 2014 Feb 12. doi: 10.1002/hep.27068
- LaBrecque et al., Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis, (2012) *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, 2012*
- Li JZ, Huang Y, Karaman R, Ivanova PT, Brown HA, Roddy T, Castro-Perez J, Cohen JC, Hobbs HH (2012) Chronic overexpression of PNPLA3I148 M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest* 2012 Nov 1;122(11):4130-44.doi:10.1172/JCI65179
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980 Jul;55(7):434-8
- Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC (2014) Systems biology for hepatologists. *Hepatology*. 2014 Jan 21. doi: 10.1002/hep.27023
- McCullough Arthur J. (2006) Pathophysiology of Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Mar;40 Suppl 1:S17-29
- Mehta R, Birerdinc A, Younossi ZM (2014) Host genetic variants in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2014 Feb;18(1):249-67. doi: 10.1016/j.cld.2013.09.017
- Naik A, Košir R, Rozman D. (2013) Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics*. 2013 Aug;102(2):84-95.doi: 10.1016/j.ygeno.2013.
- Ong KL, Tso AW, Cherny SS, Sham PC, Lam TH, Lam KS, Cheung BM; Investigators of the Hong Kong Cardiovascular Risk Factor Prevalence Study (2011) Role of genetic variants in the gene encoding lipocalin-2 in the development of elevated blood pressure. *Clin Exp Hypertens*. 2011;33(7):484-91. doi: 10.3109/10641963.2010.549276
- Osterreicher CH, Brenner DA (2007) The genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2007 Apr-Jun;6(2):83-8

- Pearlman M, Loomba R (2014) State of the art: treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014 May;30(3):223-37. doi: 10.1097/MOG.0000000000000060
- Peng XE, Wu YL, Lin SW, Lu QQ, Hu ZJ, Lin X (2012) Genetic variants in PNPLA3 and risk of non-alcoholic fatty liver disease in a Han Chinese population. *PLoS One*. 2012;7(11):e50256. doi: 10.1371/journal.pone.0050256. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23226254 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Pettinelli P, Obregón AM, Videla LA (2011) Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp*. 2011 May-Jun;26(3):441-50. doi: 10.1590/S0212-16112011000300003
- Puppala J, Siddapuram SP, Akka J, Munshi A. (2012) Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *J Genet Genomics*. 2013 Jan 20;40(1):15-22. doi: 10.1016/j.jgg.2012.
- Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1461-5. doi: 10.1038/ng.257
- Romeo S, Sentinelli F, Cambuli VM, Incani M, Congiu T, Matta V, et al. (2010) The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol* 2010;53:335–338.
- Roth GA, Nickl S, Lebherz-Eichinger D, Schmidt EM, Ankersmit HJ, Faybik P, Hetz H, Krenn CG (2013) Lipocalin-2 serum levels are increased in acute hepatic failure. *Transplant Proc*. 2013 Jan-Feb;45(1):241-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.02.047
- Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ; NASH CRN (2010) The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010 Sep;52(3):894-903. doi: 10.1002/hep.23759. PMID: 20684021 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Rozman D (2014) From Nonalcoholic Fatty Liver Disease to Hepatocellular Carcinoma: A Systems Understanding. *Dig Dis Sci*. 2014 Feb;59(2):238-41. doi: 10.1007/s10620-013-2998-x
- Santoro N, Feldstein AE, Enoksson E, Pierpont B, Kursawe R, Kim G, Caprio S (2013) The association between hepatic fat content and liver injury in obese children and adolescents: effects of ethnicity, insulin resistance, and common gene variants. *Diabetes Care*. 2013 May;36(5):1353-60. doi: 10.2337/dc12-1791
- Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, Cali AM, Narayan D, Shaw MM, Pierpont B, Savoye M, Lartaud D, Eldrich S, Cushman SW, Zhao H, Shulman GI, Caprio S (2010) A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):1281-90. doi: 10.1002/hep.23832
- Sazci A, Akpinar G, Aygun C, Ergul E, Senturk O, Hulagu S (2008a) Association of Apolipoprotein E Polymorphisms in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2008 Dec;53(12):3218-24. doi: 10.1007/s10620-008-0271-5

- Sazci A, Ergul E, Aygun C, Akpınar G, Senturk O, Hulagu S (2008b) Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Cell Biochem Funct.* 2008 Apr;26(3):291-6
- Sazci A, Ozel MD, Ergul E, Aygun C (2013) Association of nicotinamide-N-methyltransferase gene rs694539 variant with patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013 Nov;17(11):849-53. doi: 10.1089/gtmb.2013.0309
- Schwenger KJP, Allard JP (2014) Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014 February 21; 20(7): 1712-1723 doi:10.3748/wjg.v20.i7.1712
- Semba T, Nishimura M, Nishimura S, Ohara O, Ishige T, Ohno S, Nonaka K, Sogawa K, Satoh M, Sawai S, Matsushita K, Imazeki F, Yokosuka O, Nomura F (2013) The FLS (fatty liver Shionogi) mouse reveals local expressions of lipocalin-2, CXCL1 and CXCL9 in the liver with non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2013 Jul 23;13:120. doi: 10.1186/1471-230X-13-120
- Sevastianova K, Kotronen A, Gastaldelli A, Perttila J, Hakkarainen A, Lundbom J, Suojanen L, Orho-Melander M, Lundbom N, Ferrannini E, Rissanen A, Olkkonen VM, and Yki-Jarvinen H (2011) Genetic variation in PNPLA3 (adiponutrin) confers sensitivity to weight loss-induced decrease in liver fat in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:104–11
- Shimizu I, Kamochi M, Yoshikawa H, Nakayama Y (2012). Gender Difference in Alcoholic Liver Disease, Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects, Dr. Ichiro Shimizu (Ed.), ISBN: 978-953-307-985-1, InTech, DOI: 10.5772/27178
- Sonsuz A. Yağlı Karaciğer Hastalığı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Gastroenterolojide Klinik Yaklaşım Sempozyum Dizisi* No: 38 Mart 2004; s. 171-80
- Sookoian S, Pirola CJ (2011) Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011 Jun;53(6):1883-94. doi: 10.1002/hep.24283. Epub 2011 May 14. Review.PMID:21381068 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF; GIANT Consortium; MIGen Consortium; NASH CRN, Hirschhorn JN (2010) PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* 2010 Sep;52(3):904-12. doi: 10.1002/hep.23768.PMID: 20648472 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, Eiriksdottir G, Garcia ME, Launer LJ, Nalls MA, Clark JM, Mitchell BD, Shuldiner AR, Butler JL, Tomas M, Hoffmann U, Hwang SJ, Massaro JM, O'Donnell CJ, Sahani DV, Salomaa V, Schadt EE, Schwartz SM, Siscovick DS; NASH CRN; GIANT Consortium; MAGIC Investigators, Voight BF, Carr JJ, Feitosa MF, Harris TB, Fox CS, Smith AV, Kao WH, Hirschhorn JN, Borecki IB; GOLD Consortium (2011) Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* 2011 Mar;7(3):e1001324. doi: 10.1371/journal.pgen.1001324. Epub 2011 Mar 10.PMID:21423719[PubMed - indexed for MEDLINE] Free PMC Article
- Strachan, T. and Read, A.P., (2004). *Human Molecular Genetics 3*. Garland Science, Taylor and Francis Group, London and New York.

- Strnad P, Zatloukal K, Stumptner C, Kulaksiz H, Denk H (2008) Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Dec;1782(12):764-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.08.008
- Tariq Z, Green CJ, Hodson L. (2014) Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Liver Int*. 2014 Mar 12. doi: 10.1111/liv.12523
- Terra X, Auguet T, Agüera Z, Quesada IM, Orellana-Gavaldà JM, Aguilar C, Jiménez-Murcia S, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Menchón JM, Fernández-Aranda F, Richart C (2013) Adipocytokine levels in women with anorexia nervosa. Relationship with weight restoration and disease duration. *Int J Eat Disord*. 2013 Dec;46(8):855-61. doi: 10.1002/eat.22166
- Tian C, Stokowski RP, Kershenovich D, Ballinger DG, Hinds DA (2010) Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 2010;42:21–23.
- Valenti L, Alisi A, Galmozzi E, Bartuli A, Del Menico B, Alterio A, Dongiovanni P, Fargion S, Nobili V (2010) I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010 Oct;52(4):1274-80. doi: 10.1002/hep.23823.PMID:20648474[PubMed - indexed for MEDLINE]
- Valenti L, Nobili V, Al-Serri A, Rametta R, Leathart JB, Zappa MA, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Alterio A, Roviario G, Daly AK, Fargion S, Day CP (2011) The APOC3 T-455C and C-482T promoter region polymorphisms are not associated with the severity of liver damage independently of PNPLA3 I148M genotype in patients with nonalcoholic fatty liver. *J Hepatol*. 2011 Dec;55(6):1409-14. doi: 10.1016/j.jhep.2011.03.035. Epub 2011 Jul 21.PMID:21777557[PubMed - indexed for MEDLINE]
- Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. (2013) Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) *Liver Int*. 2013 Oct;33(9):1398-405. doi: 10.1111/liv.12226
- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM (2011) Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Aug;34(3):274-85. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011
- Véronique M, Meriem A, Laurent S and Magali S (2011). Metabolic Steatosis & Fibrosis: Review of the Non-Invasive Tools for Diagnosis and Screening, Liver Biopsy in Modern Medicine, Dr. Yoshiaki Mizuguchi (Ed.), ISBN: 978-953-307-883-0, InTech, DOI: 10.5772/20794
- Walenbergh SM, Koek GH, Bieghs V, Shiri-Sverdlov R (2013) Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins. *J Hepatol*. 2013 Apr;58(4):801-10. doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.014
- Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ (2006) Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res*. 2006;47:1940–1948.

www.genecards.org

www.genome.gov/20019523

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7352

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80339

www.nchpeg.org/bssr/index.php?option=com_k2&view=item&id=70:candidate-gene-study&Itemid=119

www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome

www.patient.co.uk/doctor/steatohepatitis-and-steatosis-fatty-liver

www.uniprot.org/uniprot/Q9NST1

Younossi ZM, Reyes MJ, Mishra A, Mehta R, Henry L. (2014) Systematic review with meta-analysis: non-alcoholic steatohepatitis - a case for personalised treatment based on pathogenic targets. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014 Jan;39(1):3-14. doi: 10.1111/apt.12543

Zain SM, Mohamed R, Mahadeva S, Cheah PL, Rampal S, Basu RC, Mohamed Z (2012) A multi-ethnic study of a PNPLA3 gene variant and its association with disease severity in non-alcoholic fatty liver disease. *Hum Genet.* 2012 Jul;131(7):1145-52. doi: 10.1007/s00439-012-1141-y. Epub 2012 Jan 19. PMID:22258181[PubMed - indexed for MEDLINE]

Zatloukal K, French SW, Stumftner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, Cadrin M, Omary MB (2007) From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? *Exp Cell Res.* 2007 Jun 10;313(10):2033-49

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kocaeli’nde doğdum. İlk ve ortaokulu 50. Yıl Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda okudum. 2007 yılında Kocaeli 24 Kasım Anadolu Lisesi’nden mezun oldum. 2011 yılında Yeditepe Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü’nden mezun oldum. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programına başladım. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

