

# Nonalkolik steatohepatit etyopatogenezinde oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal hasar, sitokinler ve endotoksinlerin rolü

Dr. Mustafa CANKURTARAN<sup>1</sup>, Dr. Serap ARSLAN<sup>2</sup>

Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı<sup>1</sup> ve Gastroenteroloji Bilim Dalı<sup>2</sup>, Ankara



Dr. Mustafa CANKURTARAN

**N**onalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), basit karaciğer yağlanması, nekroinflamasyon ve fibrozis ile karakterize steatohepatitise ve siroza kadar uzanan geniş klinik spektrumda görülen bir hastalıktır. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ve bunun bir sonucu ortaya çıkan Nonalkolik steatohepatitis (NASH) etyopatogenezinde öncelikle çeşitli metabolik faktörlerin etkisi ile karaciğerde basit bir yağlanmanın olduğu, sonrasında lipid peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitleri, sitokinler, endotoksinler, mitokondriyal değişiklikler, insülin rezistansı gibi faktörlerin etkisi ile steatohepatit geliştiği teorileri üzerinde durul-

maktadır. Primer NAYKH etyolojisinde ve bu hastalığın NASH'e gidiş sürecinde etkili olabilecek faktörler Tablo-1'de gösterilmiştir (1). NASH sıklıkla hipertansiyon, diyabet, insülin rezistansı, obezite, karaciğer demir birikimi gibi hastalıklarla birlikte görülmektedir ve bu sebeple etyolojide NASH kliniğinin sistemik bir hastalığın karaciğerle ilgili kısmını oluşturduğu görüşünden yola çıkarak, risk ve prognostik faktörler bulunmaya çalışılmıştır.

## OKSİDATİF STRES

NASH'de etyopatogenezde rol oynayan temel faktörlerden biridir. Reaktif oksijen metabolitleri temel olarak lipid peroksidasyonu, sitokin indüksiyonu ve fas ligand indüksiyonu ile steatohepatitise sebep olur (2). Karaciğerdeki prooksidan maddeler arasında sitokrom enzim sisteminden cyp2E-1, mitokondri kökenli reaktif oksijen metabolitleri, mitokondriyal yada peroksizom kaynaklı hidrojen peroksid, nitroradikaller, kupfer hücre kökenli bazı maddeler, aktive olmuş nötrofiller ve makrofajlar yer alır (3). Ancak karaciğer hasarına yol açan temel olay karaciğerin temel antioksidanlarından olan glutatyon sulfatın(GS) mitokondriyal alım sistemindeki defekte bağlı miktarının azalmasıdır. Hayvan modellerinde de GS azalmasına bağlı NASH olduğu gösterilmiştir. Hızlı kilo kaybı sonrasında oluşan NASH'de de reaktif oksijen türleri ve GS miktarındaki azalma sorumlu tutulmuştur. Serbest oksijen radikalleri doymamış yağlar etk-

**Tablo 1. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ve Nonalkolik steatohepatitis'de etyolojide suçlanan faktörler**

1. Diyet	9. Sitokinler
2. İnsülin rezistansı	10. Mitokondrial anormallikler
3. Genetik temeller	11. Lipid peroksidasyon defektleri
4. Hipertrigliseridemi	12. Cyp2-E anormallikleri
5. Demir metabolizma bozuklukları	13. Otoimmünite
6. Yıldız hücre aktivasyonu	14. Leptin
7. Oksidatif stres	15. Hayvan modelleri
8. Endotoksin hasarı	16. Çevresel hepatotoksinite

ileyerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Oksidatif stres sadece karaciğer hasarı yaparak değil, aynı zamanda başta TNF $\alpha$  olmak üzere çeşitli kemokin ve sitokinlerle karaciğerdeki inflamatuvar olayın devamında rol oynayarak NASH etyopatogenezinde çift yönlü etkiler yapar (4). Oksidatif stres AKH'nında da etanole ve metabolitlere bağlı oluşan prooksidan maddeler ile karaciğer hasarında etkili olur. Lipopolisakkaridler, yani endotoksinler de nitrik oksid miktarını artırarak karaciğerde oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunurlar.

## SİTOKİNLER VE ENDOTOKSİN

NASH etyopatogenezinde son yıllarda endotoksin aracılı çeşitli sitokin salınımlarının belirgin rol oynadığını gösteren yayınlar vardır. Özellikle obez ve diyabetik hastaların bakteriyel endotoksinlere daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir. Karaciğer hasarında temel olarak TNF $\alpha$  ve interferon- $\gamma$  sorumlu tutulan sitokinlerdir, hasar sonucunda fibrozis gelişiminde de TGF- $\beta$  en önemli sitokin olarak saptanmıştır (5). Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ICAM-1 ve İNOS ile regüle edilmektedir. Bu maddelerin hasarlı karaciğer dokusundaki ekspresyonunun artışı NASH etyopatogenezinde lokal proinflamatuvar sitokinlerin belirgin rol oynadığını göstermektedir. Lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan 4-hidroksinoneal ve malonilaldehid gibi maddeler ICAM-1 ve İNOS gibi inflamatuvar cevap düzenleyicilerinin transkripsiyonunu NF- $\kappa$ B'yi aktive ederek gerçekleştirmektedirler (6). Sitokinler için temel kaynak aktive olmuş karaciğer dokusunu infiltre eden makrofajlar ve T-lenfositlerdir.

Endotoksinlerle indüklenen birçok sitokin hem AKH hem de NAYKH patogenezinde karaciğer hasarına yol açan faktörlerdendir. TNF $\alpha$  stellat hücre aktivasyonunda, mitokondrial matriks-gen

ekspresyonlarında, matriksin yeniden modellenmesinde görev alır (7). TNF $\alpha$  promoter bölgesinde 238 ve 308 pozisyonlarındaki polimorfizm insülin rezistansına sebep olur. Bakteriyel aşınış ve TNF salınımı suçlu bulunsada lipopolisakkaridlerin adsorpsiyonunun arttığı Chron hastalığında NASH gelişimi riskinin artmaması tek başına sitokinlerin etyopatogenezini açıklamaya yetmeyeceğini gösterir. Adipositler iyi bir TNF $\alpha$  kaynağıdır. Lipid peroksidasyon ürünleri ve sitokinler hepatosit ölümüne, Mallory cisimciği oluşumuna, yıldız hücre aktivasyonuna ve polimorfonükleer lökosit aktivasyonuna sebep olurlar.

Nitrik oksit süperoksid anyon ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturarak oksidatif hasarın gelişmesinde rol oynamaktadır (8). NASH hastalarında histopatolojik hasarın derecesi ile karaciğerdeki nitrik oksit süperoksid ile reaksiyona girmesinden oluşan oksidatif bir madde olan tirozin nitrat birikimi arasında korelasyon gösterilmiştir. Aktive T hücrelerinden salınan lokal proinflamatuvar sitokinler NASH patogenezinde önemli bir yer tutar.

Endotel hücreleri ve yıldız hücrelerde endoglin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri karaciğer hasarının gelişmesinde fibrozis için temel sitokin olan TGF- $\beta$  için reseptör görevini üstlenirler.

## MİTOKONDRIAL VE SİTOKROM ENZİM ANORMALLİKLERİ

Mitokondri karaciğer serbest yağ asidi oksidasyonunda, ATP oluşumunda ve bazal reaktif oksijen metabolitleri oluşumunda temel rol oynar

Mitokondri de uzun zincirli yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu ve solunum zinciri polipeptidleri içmembranda, orta ve kısa zincirli yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu ve trikarboksilik asit siklusu matrikste gerçekleşmektedir (9). Nükleer DNA dışında 13

**Tablo 2. İlaçlara bağlı Nonalkoliksteatohepatitis'de mitokondrial etki mekanizmaları**

Etken	Mekanizma
Ethanol, bakır	MtDNA'da oksidatif hasar
Dideoksinukleosid, fialuridine	MtDNA replikasyonunu bozar
İnterferon- $\alpha$	MtDNA transkripsiyonunu bozar
Amiodorone, perheksilin, tamoksifen, TNF- $\alpha$ , nitrikoksit, endotoksin	Direk mitokondrial solunumu etkiler
Salisilik asit, valproik asit	Koenzim-A miktarını azaltır.
Amiodorone, perheksilin, valproat Tetrasiklin, amineptin	Direk b-oksidasyonu bozar
Oral kontraseptif	Mitokondride fonksiyonel ve yapısal değişiklikler

tane solunum zinciri polipeptidini kodlayan ayrı bir mitokondrial DNA(mtDNA) vardır. Mitokondri de yağ asitlerinin girişi kamitinpalmitoiltransferaz enzimi ile denetlenir, bu enzimde malonilkoenzim-A ile kontrol altında tutulur. Malonyl koenzim-A'nın yüksek olduğu durumlarda mitokondrial oksidasyon azalacak ve yağ asitleri trigliserid olarak karaciğerde depo edilecek ve steatosis gelişecektir (10). Mitokondride yağ asitleri oksidasyona uğrarken, oluşan asetil-koenzim-A trikarboksilik asit siklusuna girer ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi devam eder. Ancak bunun sonucunda yan ürün olarak çok fazla miktarda serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar ve oksidatif hasar ile NASH gelişimine katkıda bulunur. Oluşan reaktif oksijen metabolitleri hem nükleer hem de mtDNA'da delesyon ve mutasyonlara sebep olarak apoptozis, yaşlanma ve hücre ölümünde temel rol oynar, NASH'de ortaya çıkan nekrozdan sorumlu mekanizma olarak üzerinde çalışmalar devam etmektedir (11). Reaktif oksijen metabolitleri, Kupfer hücrelerinden ve hepatositlerden TNF $\alpha$  salınımını artırır ve adipoz doku kökenli TNF $\alpha$  mitokondrial solunum zincirini olumsuz yönde etkiler ve mitokondrial geçirgenlik delikleri açılır ve sitokrom-c yoluyla elektron transferi bozulur. Primer steatozda mega-mitokondri ya da lineer kristalin inklüzyonları gibi çok sayıda yapısal mitokondri anomalisi de gösterilmiştir (12) Solunumsal zincirdeki her elektron kaybına yol açan olay, daha fazla reaktif oksijen metaboliti oluşmasına, bu da olayın bir kısır döngüye dönüşmesine sebep olmaktadır.

Artmış mitokondrial serbest oksijen radikalleri primer ve sekonder tüm steatohepatit nedenlerinde etyolojide yer alır. Sekonder durumlarda alkol, ilaç, Wilson hastalığı gibi sebeplerde ayrıca reaktif oksijen metabolitleri oluşumuna sebep olurlar. Bu ikincil etki yağlanmaya bağlı oluşan karaciğer hasarının obesiteye göre sekonder

steatohepatitislerde neden daha fazla olduğunu açıklar. Sekonder steatohepatitiste bazı etyolojik faktörlerin ne şekilde mitokondrial hasar yapıtları Tablo 2'de gösterilmiştir (1).

Dietteki kalori alımının azaltılması serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak genel olarak yaşlanmayı ve oksidatif hasarın rol oynadığı bir çok hastalığı düzeltebilir (13). NASH'li hastaların kilo verdiklerindeki düzelme, kalori alımının azalması sonucu oluşan temelde mitokondrial kaynaklı reaktif oksijen metaboliti azalmasına bağlı olabilir.

Mikrozomal lipooksigenazlar, özellikle cyp2E1 ve cyp4A NASH etyopatogenezinde rol oynar. NASH'li hastaların immunohistokimyasal boyanma patternleri ve analizleri yapıldığında karaciğer cyp3A ekspresyonunda belirgin bir azalma, başta karaciğer hasarının en çok olduğu terminal hepatik venül çevresindeki cyp2E1 ekspresyonunda belirgin artış dikkati çekmektedir. Cyp2E1 ekspresyonu etanol alımı, yüksek karbonhidrat ve yağlı yemek, açlık ve DM'ta artarak oksidatif hasar oluşmasına yol açar ve adhezyon molekülleri ve çeşitli sitokinler ile nekroinflamatuvar hasarın ilerlemesine sebep olur. ASH etyopatogenezinde cyp2E1 daha belirleyici rol oynar (14). Cyp2E1 ekspresyonu tek başına NASH gelişimi için yeterli değildir çünkü normalde birçok ilaç kullanımı sonrası bu ekspresyon gerçekleşmekte ancak belirgin karaciğer hasarı olmamaktadır. Ancak cyp2E1 ekspresyonu oksidatif stres için bir başlangıç stimulus görevi üstlenmektedir. Cyp4A'da bir diğer önemli mikrozomal lipid oksidasyon enzimidir ve cyp2E1 ile alterne ekspresyonları sonucunda birbirlerini peroksizom proliferasyonu aktive edici reseptör(PPAR) $\alpha$  denetiminde regüle etmektedirler ve cyp2E1 ekspresyonu yada cyp4A ekspresyonu ile NASH etyopatogenezinde belirleyici rol oynarlar.

## LİPİD PEROKSİDASYONU

Hayvan modellerinde oluşturulan tüm steatoz tiplerinde lipid peroksidasyonunda belirgin rol oynadığı etan ve hepatik tiyobarbitürik asit reaksiyonları ile ölçülerek daha önceki çalışmalarda gösterilmişti (2). Lipid peroksidasyon ürünleri mtDNA'yı etkiler ve solunum zincirindeki elektron transferinde rol oynayan proteinlerin yapısını bozar. Artmış mitokondrial kökenli serbest oksijen radikalleri yağ depolama oksitleyecek ve lipid peroksidasyonunu arttıracaktır. Lipid peroksidasyonu hücre ölümüne ve hepatosit nekrozuna sebep olur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malonilaldehit ve 4-hidroksinoneal gibi maddeler immün hepatite ve Mallory cisimciği oluşumuna neden olabilirler (11). Yağlanma ve lipid peroksidasyonu da GS ve vitamin-E gibi antioksidan maddelerin tüketimine de sebep olurlar.

Hayvan modellerinde peroksizmal açılko-A oksidaz enzimi defektif olan ratlarda hidrojen peroksid üretimi artar, oluşan hidrojen peroksit peroksizom proliferasyonunu ve peroksizmal yağ asidi oksidasyonunu artırır, cyp2E1 indüksiyonu yapar. Yağ asidi oksidasyonu PPARα ile regüle olur. Bu reseptör kompleksindeki mutasyonlar ve bu reseptörlerin aşırı ekspresyonu NAYKH'ni ve buradaki yağ metabolizmasını belirgin etkilemektedir (15).

Mitokondrial b-oksidasyon orta ve uzun zincirli yağ asitlerinin büyük bir kısmının oksidasyonundan sorumludur. Organizmadaki yağ asitlerinin

çoğunluğu uzun zincirlidir ve açlıkta enerji kaynağı olarak kullanılırlar. Karnitin, düzenli oksidatif fosforilasyon ve enzimler için gerekli proteinlerin sentezi mitokondrial b-oksidasyonunu etkilemektedir (16).

Peroksizmal b-oksidasyon, düz ve dallı zincirli fattyaçılko-A olmak üzere iki grup enzimatik yol ile gerçekleşir (17). Temelde zincir kısaltıcı, tam oksidasyonla sonlanmayan reaksiyonlardır. Kongenital defektler ağır klinik tablo ile seyreden NASH patogenezinde de peroksizmal oksidasyon sistemlerinin indüklendiği gösterilmiştir. Bu sistem özellikle PPARα ile regüle olmaktadır.

Mikrozomal cyp4A enzimleri karaciğerde ve böbrekte eksprese olurlar ve yağ asitlerini w-1 bölgelerinden hidroksile ederler (16) ve dikarboksilik asitler oluşur. Dikarboksilik asitler peroksizomlarda tamamen fattyaçılko-A oksidaz ile b-oksidasyona uğrar. Sistem minör bir yağ asidi oksidasyon sistemi olmasına rağmen, büyük oranda dikarboksilik asit oluşur. Cyp4A tamamen PPAR-α ile regüle olmaktadır. Mikrozomal oksidasyon çeşitli yollarla diğer iki oksidasyon sistemine bağlıdır.

Sonuç olarak basit karaciğer yağlanmasından steatohepatitise geçiş sürecinde reaktif oksijen metabolitleri, lipid peroksidasyon defektleri, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, sitokinler ve endotoksinler önemli rol oynamaktadır. Bu konularda yapılan çalışmalar arttıkça hastalık patogenezi daha iyi aydınlanacak ve tedavi için yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. KS., Malet, P.F. Nonalcoholic Steatohepatitis. Mayo Clin Proc 2000; 75: 733-739
2. Letteron, P., Fromenty, B., Terris, B., ve ark. Acute and chronic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. J Hepatol 1996; 24: 200-208
3. Zhang, C., Walker, L.M., Hinson, J.A., ve ark. Oxidant stress in rat liver after lipopolysaccharide administration: effect of inducible nitric oxide synthase inhibition. J Pharmacol Exp Ther 2000; 293: 968-972
4. Chitturi, S., Farrell, G.C. Etiopathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. Seminars in Liver Dis 2001; 21(1): 27-41
5. Yamakawa, T., Tanaka, S., Yamakawa, Y., ve ark. Augmented production of tumor necrosis factor alpha in obese mice. Clin Immunol Immunopathol 1995; 75: 51-56
6. Baeurle, P.A. ve Henkel, T. Function and activation of NF-κB in the immune system. Annu Rev Immunol 1994; 12: 141-179
7. Farrell, G.C. Is bacterial lipopolysaccharide the flash that ignites NASH? Gut 2001; 48: 148,149
8. Carmelo, G.M., Perez, M.E., Iacona, O., ve ark. Characterisation of pathogenetic and prognostic factors of Nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. J Hepatology 2000; 33: 716-724
9. Green, D.R. ve Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-1312
10. McGarry, J.D. ve Foster, D.W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body formation. Annu Rev Biochem 1980; 49:395-420
11. Pesayre, D., Berson, A., Fromenty, B., Mansouri, A. Mitochondria in steatohepatitis. Seminars in Liver Dis 2001; 21(1):57-69
12. Pesayre, D. Mitochondrial dysfunction in hepatic steatosis. Falk Symposium 121 " Steatohepatitis" 2000 s-35
13. Sohal, R.S., Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. Science 1994; 273: 59-63
14. Maher, J. The cyp2E1 knockout delivers another punch: first ASH, now NASH. Hepatology 2001; Jan: 311-312
15. Fan, C.Y., Pan, J., Usuda, N., ve ark. Steatohepatitis, spontaneous peroxisomal proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl co-A oxidase. Implications for peroxisomal proliferator activated receptor alpha natural ligand metabolism. J Biol Chem 1998; 273: 15639-15645
16. Desvergne, B. ve Wahli, W. Peroxisome proliferator activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 1999; 20: 649-688
17. Sambasiva, M. ve Janardan, K. Peroxisomal b-oxidation and steatohepatitis. Seminars in Liver Dis 2001; 21(1): 43-55