



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞININ
TANISINDA KULLANILABİLECEK POTANSİYEL
BİYOMARKIRLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. YUSUF YILMAZ
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL, 2010



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞININ
TANISINDA KULLANILABİLECEK POTANSİYEL
BİYOMARKIRLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. YUSUF YILMAZ
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Prof. Dr. EROL AVŞAR

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. NAFLD'ın Epidemiyolojisi	6
2.2. NAFLD'ın Doğal Seyri	7
2.3. NAFLD'ın Etiyolojisi	8
2.4. NAFLD'ın Patogenezi	10
2.5. NAFLD Tanısını Koymada Karaciğer Biyopsisinin Rolü	12
2.6. NAFLD'ın Tedavisi	17
2.7. NAFLD Tanısında Biyokimyasal Belirteçler	18
2.8. Klasik Adipokinler ve NAFLD	20
2.9. Yeni Adipokinler ve NAFLD: Omentin, Chemerin ve Adipsin	23
2.10. Kemik-Karaciğer Aksı: Osteoprotegerin ve Osteocalcin	24
2.11. Anjiyogenez ve NAFLD: VEGF-A ve Onun Soluble Reseptörü	25
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Etik Kurul	26
3.2. Çalışma Popülasyonu	26
3.2.1. Alınma kriterleri	26
3.2.2. Dışlanma kriterleri	26
3.3. Klinik ve Biyokimyasal Özellikler	27
3.4. Karaciğer Histolojisi	28
3.5. Biyokimyasal Analiz	28
3.5.1. Adipokinler	29
3.5.2. Osteocalcin	29
3.5.3. Osteoprotegerin	30
3.5.4. Serum VEGF ve VEGFR-1 düzeylerinin ölçümü	30
3.6. Verilerin Analizi	30
4. BULGULAR	32
4.1. Yeni Adipokinler	34
4.2. Osteoprotegerin	36
4.3. Osteocalcin	38
4.4. VEGF ve sVEGFR-1	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	41
5.1. Omentin, Chemerin ve Adipsin	41
5.2. Osteoprotegerin	42
5.3. Osteocalcin	43
5.4. VEGF ve sVEGFR-1	45
5.5. Çalışmanın Kısıtlılıkları ve Yorum	46
6. KAYNAKLAR	47

ÖNSÖZ

Öncelikle her zaman samimiyeti ve güvenini yakından hissettiğim, öğrencilerine yaklaşımını ve bilimsel kültürünü örnek aldığım, gerek sosyal gerekse bilimsel her platformda maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili hocam Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Enstitüsü Müdürü ve Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Erol Avşar'a, ayrıca Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Çetin Özener'e; aynı zamanda bilimsel başarılarını ve akademisyenliğini örnek aldığım sorunlara pratik yaklaşımıyla akılcı çözümler üreten, mesleki eğitim ve görgüye önem veren ve bu alanda bizleri destekleyen Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Cem Kalaycı'ya; bilimsel olarak bitmek bilmeyen yüksek motivasyon ve enerjiye sahip gerek insani, gerek mesleki etik anlayışına hayran kaldığım Sayın Prof. Dr. Neşe İmeryüz'e; aynı bölümde çalışmanın kıvancına ulaştığım, birçok çalışmada vermiş oldukları desteklerin yanısıra bize aile ortamını hissettiren, Sayın Prof. Dr. Hülya Över Hamzaoğlu, Prof. Dr. Osman Özdoğan, Doç. Dr. Özlen Atuğ, Doç. Dr. Adnan Giral ve Doç. Dr. Deniz Duman'a; üzüntü ve sevinçlerimizi beraber paylaştığımız, çok sayıda ortak çalışmalara imza attığımız değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Oya Yönel Kartal'a, Dr. Yeşim Özen Alahdab, Dr. Alla Eldeen Kedrah, Dr. Ramazan Kurt'a, dahiliye asistanımız Dr. Bilge Aktaş'a, günün her saati yeni projeleri beraber değerlendirebildiğimiz, çalışkanlığı, bilimsel titizliği ve bilgisini takdir ettiğim değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Fatih Eren'e, çalışmalarımıza ayrı bir özveri ile desteklerini esirgemeyen çalışma ailemizin değerli hemşireleri Saadet İlhan, Songül Ülker, Mahiye Yılmaz, Sevgi Alan, Birgül Yılmaz'a, sekreterimiz Yıldız Atay, Sertan Barışık ve personelimiz Hüsamettin Karataş'a ayrıca teşekkür ediyorum.

Bu yoğun çalışma hayatımda bana katlanabilme sabrını gösteren varlıkları ile bana ilham ve dayanma gücü veren kalbimdeki yeri eşsiz olan sevgili eşim Tuğba ve biricik oğlum Bera'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-TUP-090909-0274) ve Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Serum omentin, chemerin, adipsin, osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OCN), vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF) ve onun soluble reseptörü VEGFR-1 (sVEGFR-1) ile nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) olan bireylerin klinik ve patolojik özellikleri arasındaki ilişki araştırıldı. Aday biyobelirteçlerin serum düzeyleri 99 biyopsi-kanıtlı NAFLD'lı hastada ve 75 sağlıklı kontrolde "ELISA" yöntemi ile değerlendirildi. İlişkiler çok değişkenli lineer regresyon modelleri kullanılarak analiz edildi. Serum adipsin düzeyleri hasta ve kontroller arasında anlamlı değişiklik göstermedi, ancak hem omentin hem chemerin düzeyleri biyopsi-kanıtlı NAFLD'lı hastalarda kontrollerden anlamlı derecede yüksek bulundu. Dikkat çekecek bir şekilde serum omentin seviyelerinin hepatosit balonlaşmasının bağımsız bir prediktörü olduğu saptandı. Serum OPG düzeyinin steatohepatit (kesin NASH + olası NASH) ile sağlıklı kontrol ayırımını yapabildiği gösterildi. Serum OCN seviyelerinin NAFLD'lı hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu, OCN'in hepatosit balonlaşma derecesini predikte ettiği bulundu. sVEGFR-1 düzeyleri de NAFLD'lı hastalarda anlamlı derecede düşüktü ve karaciğer fibrozisini predikte etmekteydi. Ancak bu bulgular VEGF için gözlenmedi. Bulgularımız aslında önümüzdeki birkaç yılda metabolik karaciğer hastalıklarının yaygın formlarının tanısında kullanılabilecek olan 'biyobelirteç biyopsi' için ümit verici olabilir.

Anahtar kelimeler: Biyobelirteçler, "ELISA", Karaciğer fibrozisi, Karaciğer yağlanması, Steatohepatit

ABSTRACT

It has been explored the association of serum omentin, chemerin, adipsin, osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OCN), vascular endothelial growth factor A (VEGF), and its soluble receptor VEGFR-1 (sVEGFR-1) with the clinical and pathological features of patients with NAFLD. Serum levels of the candidate biomarkers were assayed by ELISA in 99 patients with biopsy-proven NAFLD and 75 healthy controls. We analyzed associations using multivariable linear regression models. Adipsin levels were not altered, but both omentin and chemerin levels were significantly higher in patients with biopsy-proven NAFLD than in controls. Notably, serum omentin levels were an independent predictor of hepatocyte ballooning. Concentrations of OPG were useful for distinguishing between steatohepatitis (definite NASH plus borderline NASH) and healthy controls. Serum OCN levels were significantly lower in patients with NAFLD than in healthy controls and predicted the degree of hepatocyte ballooning. Levels of sVEGFR-1 – but not those of VEGF – were significantly lower in patients with NAFLD and predicted liver fibrosis. Our findings could actually hold promise for a “biomarker biopsy” to be used for the diagnosis of common form of metabolic liver disease in the next few years.

Key Words: Biomarkers, ELISA, Liver steatosis, Liver fibrosis, Steatohepatitis

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADA	: American Diabetes Association
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ATP III	: Adult Treatment Panel III
AUC	: Area under curve
DM	: Diyabetes mellitus
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EIA	: Enzyme immunoassay
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
HDL	: High-density lipoprotein
HOMA-IR	: Homeostasis model of insulin resistance
HSC	: Hepatik stellat hücre
hs-CRP	: High sensitivity C-reactive protein
İL	: İnterlökin
İR	: İnsülin rezistansı
LDL	: Low-density lipoprotein
mRNA	: Messenger Ribonucleic acid
MS	: Metabolik sendrom
NAFLD	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NAS	: NAFLD aktivite skoru
NASH	: Nonalkolik steatohepatit
NIDDK	: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney
NK	: Nükleer faktör
OCN	: Osteocalcin
OPG	: Osteoprotegerin
PIGF	: Plasental büyüme faktörü
PNPLA3	: Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
ROC	: Receiver operating characteristic
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SNP	: Single-nucleotide polymorphism
SOCS3	: Suppressor of cytokine signalling 3
SREBP-1	: Sterol Regulating Binding Protein-1
sVEGFR-1	: soluble VEGF receptor 1
SYA	: Serbest yağ asitleri
TGF	: Transforming growth factor
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VKİ	: Vücut kitle indeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

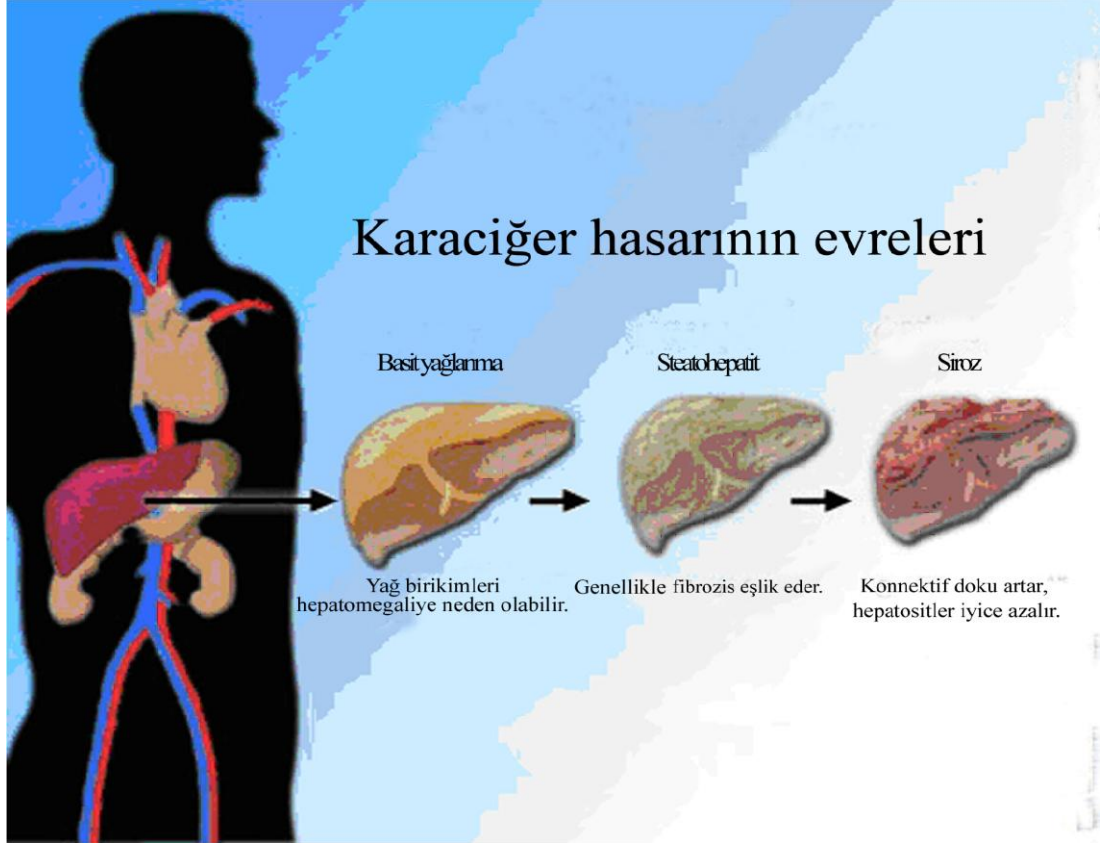
Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) kronik karaciğer hastalıklarının en sık nedenidir, tüm dünyadaki insidansı giderek artmaktadır (1). NAFLD terimi basit yağlanmadan nonalkolik steatohepatite (NASH) kadar uzanan geniş bir yağlı karaciğer değişikliği yelpazesini tanımlamak için kullanılır (2). Basit yağlanma genellikle selim bir seyre sahipken, steatohepatit ise karaciğer fibrozisine ve siroza ilerlemeye eğilimi nedeniyle morbidite ve mortalitenin artmasına yol açar (3). Bu nedenle, NASH hastalarının ileri derecede fibrozis oluşmadan erken dönemde saptanması, hastalığa agresif olarak müdahale edilebilmesinde esastır (4,5). Karaciğer biyopsisi, NASH'in kesin tanısını koymada altın standart olup NASH'i basit yağlanmadan ayırmada en iyi yöntemdir (1). Ne yazık ki invaziv olması, nadiren de ciddi komplikasyonlara yol açması nedeniyle hastalar tarafından kolaylıkla kabullenilmeyen bir tanı yöntemidir, ayrıca değerlendirici içi ve değerlendiriciler arasında değişkenliklere maruz kalabilir (4). Karaciğer biyopsisi, her ne kadar NAFLD tanı ve takibinde anahtar rolü oynasa da bazı kısıtlılıkları vardır (5). Bu sebeple; klinisyenler NASH ve karaciğer fibrozisi riskini taşıyan hastaları tanımlayabilmek için, klinik değerlendirmeye yardımcı olacak ek tanı yöntemlerine ihtiyaç duyarlar. Biyobelirteçler, NAFLD bünyesindeki NASH hastalarını daha iyi tanımlamada kullanılabilecek yöntemler olup bu durumdaki hastaların prognozunu belirlemede etkili olacaklarına dair ümit vermektedirler. NASH biyobelirteçlerinin geliştirilmesi teorik olarak iki farklı strateji ile geliştirilebilir: İlk strateji "bilgiye dayalı" (tümdengelimli; NASH patofizyolojisine dair güncel bilgimize dayanır) olarak tanımlanabilirken ikincisi daha çok "tarafsız"dır (tümevarımsal strateji) (4). "Bilgiye dayalı" yaklaşım NASH gelişimi ve doğal seyrinin altında yatan fizyopatolojik süreci direk olarak anlamaya dayanır. Hastalığın biyolojisi hakkında bilgi verebilecek yeni aday belirteçleri değerlendiren biyokimyasal çalışmalar bu yaklaşıma örnek olabilir (4). Bu bakımdan adipokinlerin, kemik-karaciğer aksının düzenleyicilerinin ve anjiogenetik moleküllerin karaciğer

hasarında aldıkları rolün anlaşılması gelecekte NASH biyobelirteçlerinin saptanmasına katkıda bulunabilir (6-8, 9-11,12-14).

Bu tez ile bilgiye dayalı yaklaşımla önceden belirlenen aday moleküllerin [omentin, chemerin, adipsin, osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OCN), vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF) ve onun soluble reseptörü VEGFR-1 (sVEGFR-1)] serum düzeyleri ile nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerin klinik, laboratuvar ve patolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) terimi basit yağlanmadan steatohepatite kadar uzanan geniş bir spektrumu kapsayan durumlar için kullanılan genel bir isimdir (1,15) (Şekil 1.).



Şekil 1. NAFLD'in klinik spektrumu

Tarihsel olarak, 1980 yılında Mayo Klinik'den Ludwig, o güne kadar henüz ismi konmamış; hepatomegali, anormal ALT, histolojik olarak yağlı karaciğer değişiklikleri, lobüler hepatit ve alkol kullanmayanlarda alkolik hepatitteki fibrozisi taklit eden bir hastalık tanımladı ve bu hastalığa NASH ismini verdi (16). Bu hastaların çoğu obez ve diyabetikdi (16).

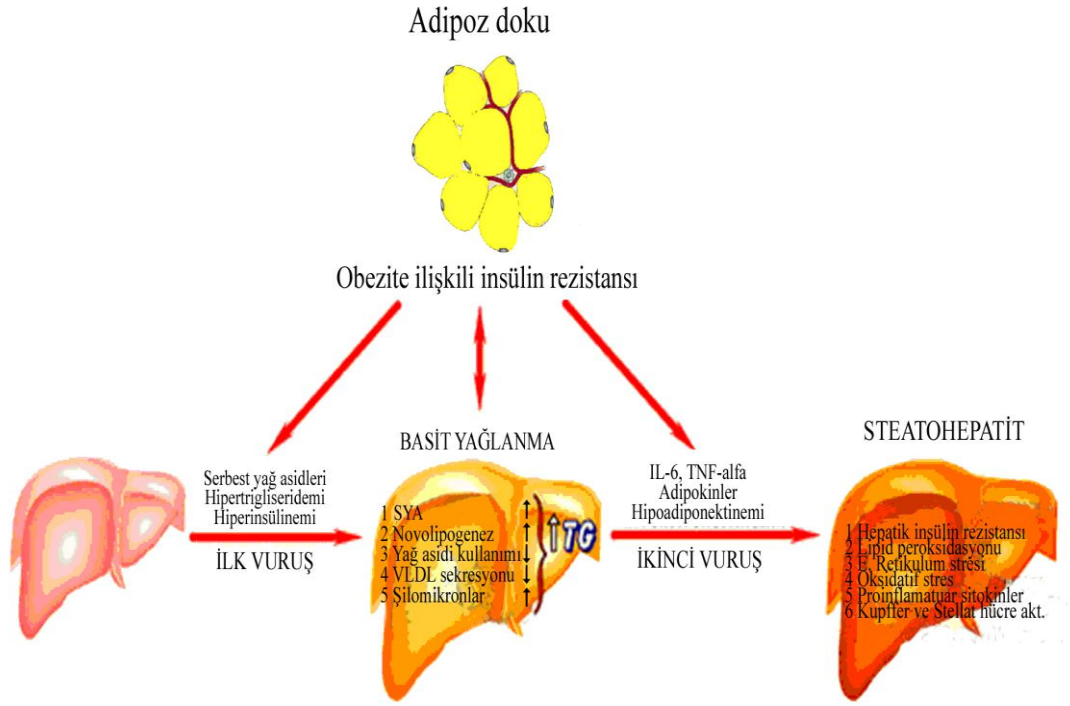
NAFLD, Kuzey ve Güney Amerika'da, Asya-Pasifik'de (Avustralya ve Yeni Zellendayı içeren), Ortadoğu ve Avrupa'da oldukça yüksek prevalansda (genel popülasyonun üçte birine kadar) görülmektedir, en yaygın karaciğer hastalıklarından biri olarak ortaya çıkmaktadır (17). Türkiye'de hepatoloji

polikliniklerine yönlendirilen en sık hastalıklardan bir tanesidir. Kaygı verici bir şekilde, NAFLD pediyatrik hastalarda da artan şekilde rapor edilmektedir (18). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tahminlerine göre, en az 20 milyon kişide karaciğer yağlanması nedeniyle siroz gelişecek ve NAFLD, gelecek dekad da karaciğer transplantasyonu için başlıca endikasyon olacaktır (19). Bu nedenle bu kaygı verici durumun tanısının önemi sürekli vurgulanmalıdır. Ayrıca artık basit yağlanmanın bile masum, selim bir durum olarak kabul edilmemesi gerektiğine dair kanıtlar ortaya çıkmaya başlamış, karaciğer yağlanması giderek önemli bir kronik karaciğer hastalığı nedeni ve artan bir halk sağlığı problemi olmuştur (20-22). Günümüze kadar NAFLD tedavisi için maalesef etkin bir ilaç bulunamamıştır (23). NAFLD prevalansının dramatik artışını göz önüne aldığımızda, NAFLD'lı hastalar arasında NASH'li hastaları belirleyebilecek invaziv olmayan, basit, standard, güvenilir biyobelirteçlere büyük ihtiyaç olduğu aşikardır (4,5). Bu tarz biyobelirteçlerin elde edilmesiyle hastalığın tanısında ve izleminde radikal değişikliklerin olacağı, karaciğer biyopsi gereksiniminde çok ciddi azalmaların olacağı açıktır (24,25). Günümüzde, karaciğer biyopsisi halen NASH kesin tanısını koymada ve NASH-basit yağlanma ayırımını yapmada en güvenilir yöntem olarak yerini korumaktadır (26). Ancak, invaziv doğası gereği hastalar tarafından kolaylıkla kabullenilmez, ciddi komplikasyonlarla sonuçlanabilir, ayrıca örneklem hatalarına yol açabilir (26-27). Klinisyenler bu nedenle NAFLD'lı hastalar arasında yüksek riske sahip NASH'li hastaları, fibrozisi olanları ayırt edebilecek yeni noninvaziv araçlara ihtiyaç duyarlar. NAFLD sıklıkla aşırı alkol tüketiminden ve diğer nedenli yağlanmalardan kaynaklanmayan yağlı karaciğer değişikliği (karaciğerdeki yağın, karaciğer ağırlığının %5-10'undan fazla olması) olarak tanımlanır (28). Ancak bu tanımlama halen tartışmalıdır, çünkü sirozda karaciğerde yağ birikimi gözlenmemektedir (29). Hepatik steatoz, morfolojik olarak yağ damlacıklarının hepatositlerin sitoplazması içine makroveziküler veya mikroveziküler birikimiyle ortaya çıkar (30). Makroveziküler steatozda büyük tek bir yağ vakuölü hepatosit sitoplazmasını doldurur, nükleusu periferde doğru iter ve karakteristik taşlı yüzük görünümüne neden olur.

Mikroveziküler steatozda, çok sayıda küçük yağ damlacığı hepatosit sitoplazmasını doldurur, nükleusu periferine itmez (30). Hepatik steatoz geri dönüşümlü olabilir veya NASH'e ilerleyebilir. Bu durum altta yatan tetikleyici nedenin durmasına veya devam etmesine göre değişiklik gösterebilir (26). NASH, basit yağlanmadan farklı olarak; steatozis, inflamasyon, fibrozis, hepatositlerin balonlaşması, apoptotik hücreler ve "Mallory"nin hyalini ile karakterizedir (1-3). İnflamasyonun boyutu steatozisin derecesiyle daima korele olmaksızın oldukça değişkendir. İnfiltratif inflamatuvar hücreler, lenfosit ve polimorfonükleer lökositlerden oluşur. Günümüzde apoptotik balonlaşmanın ve "Mallory"nin hyalin hepatositlerin, NASH başlangıcını gösterebileceğine inanılmaktadır (3). Karaciğer hücre ölümü ve inflamasyonu stellat hücre aktivasyonuna, bu da perisinüzoidal, perivenüler (terminal hepatik ven civarında) ve periselüler olarak ortaya çıkan karaciğer fibrozisinin gelişmesine yol açar. Hepatik steatoz, inflamasyon, agresif fibrogenez ve kalıcı hepatoselüler proliferasyon siroz gelişimine katkıda bulunur (31). İğne biyopsisi ile elde edilen numunedeki fibrozis evresinin, tüm karaciğeri yansıttığı farz edilir. Ancak gerçekte bölgesel fibrozisten dolayı bu, NASH'de (diğer karaciğer hastalıklarında da) doğru olmayabilir, üstelik NASH'de fibrozis sıklıkla bölgesel ve heterojendir (31).

NAFLD; obezite, metabolik sendrom, dislipidemi, insülin rezistansı ve tip 2 diyabetes mellitus ile ilişkilendirilmiştir (1,2). NAFLD, sıklıkla metabolik sendrom komponentleriyle birlikte ve bu nedenle genellikle metabolik sendromun hepatik manifestasyonu olarak kabul edilir (32). İnsülin rezistansı (İR) metabolik sendromun patogenezinde temel mekanizmadır, aynı zamanda NAFLD sürecinde başlatıcı faktör olarak rol aldığı düşünülmektedir (Şekil 2.) (32).

Önemli olarak son zamanlarda yapılmış bazı çalışmalarda bütün NAFLD'lı hastaların metabolik sendromun yeterli kriterlerini sağlamadıkları ve İR ile ilişkilerinin olmadığı gösterilmiştir (32).



Şekil 2. İnsülin rezistansı ile NAFLD/NASH arasındaki potansiyel mekanizmalar

2.1. NAFLD'ın Epidemiyolojisi

NAFLD, endüstrileşmiş ülkelerde genel popülasyonda % 20-40 oranında bulunan en yaygın karaciğer hastalığıdır (17-19). Obezlerde ve diyabetiklerde NAFLD'a daha sıklıkla rastlanır. NAFLD'lı hastaların içerisinde NASH % 10-20 oranında görülür. Batılı ülkelerde NASH prevalansı yaklaşık % 2-6'dır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde NASH'in genel popülasyonun % 5-6'sını etkilediği tahmin edilmektedir. NASH'in kriptojenik sirozun % 50'den fazlasının nedeni olduğu ileri sürülmüştür. NAFLD fibrozisin eşlik ettiği NASH'e progrese olabilir, bu durum siroz ve hepatoselüler karsinom ile sonuçlanabilir. ABD'de NAFLD erkeklerde kadınlardan 3-5 kat daha fazla görülmektedir, bu durum erkeklerin daha fazla vücut kitle indeksine (VKİ) sahip olmaları ve bazı erkek hastaların bildirdiklerinden daha çok alkol almalarından kaynaklanıyor olabilir. Endüstrileşmiş ülkelerde obezitedeki dramatik artıştan dolayı NAFLD ve NASH prevalansında da dramatik artışlar olmaktadır (1). ABD'de obez çocukların neredeyse %

50'sinde NAFLD bulunmaktadır. Çoğu ülkede NAFLD'lı hastaların % 80'den fazlasında artmış VKİ vardır, % 30- 40'ı obezdir, yaklaşık % 50'si insülin rezistansına sahiptir, % 20-30'u tip 2 diyabetikdir, % 80'i hiperlipidemik, % 30-60'ı hipertansiftir (1). NASH hastaları NAFLD'lı hastalara göre yaşça daha büyüktür, daha obezdir, çok daha sıklıkla yüksek serum karaciğer enzimlerine sahiptir, daha sıklıkla metabolik sendromları vardır ve diyabetiklerdir.

2.2. NAFLD'ın Doğal Seyri

NAFLD/NASH'in mortalitesi ve doğal seyri hakkında mevcut veriler birbirleriyle tutarsızdır, literatürdeki çalışmalardan elde edilen bilgilerde görüş birliğine varılamamıştır (17-19). NAFLD yavaş bir şekilde NASH'e progrese olabilir ve yıllar veya dekadlar sonra siroz veya hepatoselüler karsinom ile komplike olabilir

Bu bilgiler ışığında hastalığın doğal seyrinin kısa aralıklarla ölçümü zordur. Basit yağlanmalı hastalar daha selim bir seyre sahiptir. Örneğin, Danimarka'da Dam-Larsen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada çoğunluğu morbid obezden oluşan 109 bireylik bir kohort, neredeyse 17 yıl izlenmiş, siroz insidansı % 1'den daha az bulunmuş, takip sırasında basit yağlanması olan hastaların mortalitesi genel popülasyonun mortalitesinden farklı bulunmamıştır (33). Diğer taraftan NASH'e bağlı sirozu olan hastaların daha kötü prognaza sahip oldukları, bu hastaların % 9-26'sının 4-10 yıllık takip süresince öldükleri, en sık ölüm nedenlerinin son dönem karaciğer hastalığı olduğu gösterilmiştir (33). Adams ve ark., toplum kökenli bir örneklemede NAFLD'ı olan diyabetik hastaların olmayanlara göre daha az yaşadığını göstermiştir (34). Farklı bir çalışmada, Ekstedt ve ark., NAFLD'lı bireylerin (önemli bir kısmı NASH) hayatta kalımının eşleştirilmiş referans popülasyona göre azaldığını göstermişlerdir (35). Her iki çalışma da tam anlamıyla genel popülasyonu yansıtmayabilir. Ong ve ark.'nın NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) III veritabanını kullanarak yayınladıkları ilginç bir çalışmada NAFLD'lı kişilerin NAFLD'lı olmayan bireylere göre karaciğer ilişkili komplikasyonlardan ölme olasılığının daha yüksek olduğu gösterildi

(36). Bu risk, obeziteden ve diyabetin varlığından bağımsızdı. Ancak bu çalışmanın en büyük eksiği, yükselmiş serum aminotransferazların NAFLD belirteci olarak kullanılmasıdır, bu durum NAFLD'ın gerçek prevalansını % 50'den daha az tahmin eder (36). NAFLD'lı bireylerde çeşitli sebeplerle ölüm nedenleri arasında en sık kardiyovasküler hastalık ve malignite bulunmaktadır (37-39). NAFLD tanısı olan kişilerde aynı yaş ve cinsiyetteki genel popülasyona göre daha kısa sağ kalım süresi vardır, daha yüksek mortalitenin nedeni kardiyovasküler hastalıklardır. Artmış karaciğer enzimleri ile yüksek kardiyovasküler risk arasında güçlü bir ilişki birçok toplum kökenli çalışmada gösterilmiştir (40-41). Uzun dönemli veriler NAFLD'ın karaciğer yetersizliğine yol açabileceğini açıkça göstermiştir. Bilgi eksikliğine rağmen bazı kısa dönemli çalışmalar kriptojenik sirozlu hastaların etyolojisinin önemli bir kısmının altında NAFLD'ın yattığını ileri sürmektedirler.

2.3. NAFLD'ın Etiyolojisi

NAFLD'ın ilk evresi olarak algılanan basit yağlanma, adipoz dokunun yağ depolama kapasitesinin aşıldığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Özellikle visseral adipoz doku, NAFLD ve progresyonu için önemli bir risk faktörüdür (42,43). Birçok moleküler yolağa ilaveten lipid metabolizmasındaki düzensizlik ve doğal immün sistem NAFLD'daki karaciğer hasarında rol alır (43). Fibrozis gelişiminde de muhtemelen benzer moleküler mekanizmalar rol almaktadır. Yıllarca süren birkaç çalışma, NAFLD'da genetik yatkınlığın rolünü ortaya koymuştur. Örneğin, NAFLD'ın familial komponente sahip olduğu farkına varılmıştır (44). Mevcut bilgilerimiz artık açıkça, etnik farklılığın NAFLD'da duyarlılığa, özellikle progresyonuna yol açtığını ortaya koymaktadır. Bu durum basitçe diyetle veya sosyoekonomik farklılıklara bağlanamaz (45). Örneğin Amerika'da Hispanik beyazlarda NASH insidansı yüksekken, Afrikalı Amerikalılarda obezite oranı daha yüksek olmasına rağmen NASH insidansı daha düşüktür (19). ABD'deki karışık ırksal kalıtım gösteren böyle popülasyonların varlığı nedeniyle, literatürde kabul görmüş ırksal orijine dair genetik belirteçlerin kullanılmasıyla, bunlar gelecekte daha kesin olarak tanımlanabilecektir. Halk sağlığı ve/veya popülasyon tarama

stratejileri ile ilgili halk politikalarının oluşturulmasında mümkün olabilecek en yüksek düzeyde kullanılacak olan verilerin toplanması özel önem taşımaktadır. Son zamanlarda, gerek teknik gerekse mali kısıtlamaların kalkması, iyi tanımlanmış NAFLD'lı popülasyonlardan elde edilen örneklerin, NAFLD'lı hastalarda kontrol popülasyondan daha sık gözlenen genetik varyantların tayin edilmesi için genom taramasında kullanılmaya başlanmıştır. Yakın zamanda bu tekniğin kullanılmasıyla Dallas grubunun yaptığı çalışma NAFLD'a meyil ve onun progresyonuyla ilişkili olan PNPLA3 gen varyantlarındaki etnik farklılıkları tanımlamıştır (46). NAFLD'ın risk faktörleriyle ilişkili veya lipid metabolizmasının regülasyonunda etkili olduğu bilinen seçilmiş aday genlerde tek nükleotid polimorfizm (SNP) varyantları diğer gruplar tarafından araştırılmıştır (45). Buna ek olarak, gen-çevre etkileşimleri de keşfedilmeye başlanmıştır (44). Gen-çevre etkileşmesine son örnek NAFLD hastalarındaki diyetel yağa yanıt ve kardiyometabolik risk ile daha önceden ilişkilendirilmiş adiponektin genindeki iki yaygın SNP varyantının ilişkisidir (47). Birçok araştırmacı, NAFLD'ın başlamasını etkileyen gen varyantlarının toplandığı kromozomal bölgeleri ve klasik fare genetik yaklaşımlarını da kullanarak NAFLD'ın progresyonunu araştırmaya başlamışlardır (48). Farelerde keşfedilen böyle kromozomal bölgelerin ve içindeki genlerin tanımlanması, insan NAFLD ve progresyonuyla büyük ölçüde ilişkili olabilecek bölgelerin saptanmasını sağlayacak insan genom bölgelerini ortaya çıkarabilecektir. Özellikle kalıtsal faktörlerin etkin olduğu popülasyonlarda NAFLD'ın etyolojisinde çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı açık bir şekilde gözlenmektedir (44). Bu çevresel faktörler arasında özellikle doymuş yağ ve karbonhidrattan zengin Batı-tipi diyet ve yüksek derecede işlenmiş yemekler önde gelmektedir. Buna sedanter Batı hayat tipi de eklendiğinde kalorik dengesizlik meydana gelebilmekte ve bireylerin çoğunda, kilo artışıyla sonuçlanmaktadır. Hem yetişkin hem de çocuk popülasyonunda aşırı kilolu ve obezitenin artmış prevalansı, artmış NAFLD prevalansı ile ilişkilidir (44). Net bir şekilde diyetin bir yansıması olarak intestinal mikroflora içeriğinin NAFLD'ı etkileyen diğer faktörler olabileceği vurgulanmıştır (49).

2.4. NAFLD'ın Patogenezi

NASH gelişimi için öncelikle yağlı karaciğerin oluşması gerekir, böylece ikinci vuruşa duyarlı hale gelen karaciğerde hasarlanma başlar (50). İnsülin rezistansı hem basit yağlanmada hem de NASH'de ortak bulgu olmasına rağmen, insülin rezistansı olan hatta beraberinde metabolik sendromu (MS) da olan hastaların sadece küçük bir kısmında NASH gelişir. MS, insülin rezistansının en şiddetli formudur ve daha ileri evre NASH gelişimine zemin hazırlayabilir. Oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun basit yağlanmadan NASH'e ilerlemede santral rol oynadığına inanılır (51). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimindeki artış, hepatosit membranlarının ve organellerin lipid peroksidasyonunu, karaciğer nekroinflamasyonunu, satellit hücre aktivasyonunu ve fibrozisi tetikler. Bu bağlamda hem dolaşımda hem de karaciğerde serbest yağ asitleri (SYA)'nin artması, mitokondriyal anormallikler (disfonksiyon veya megamitokondriyum gibi yapısal anormallikler), barsak kökenli endotoksinler, etanol, adipokinlerin dengesiz üretimi hayvan modellerinde steatohepatit gelişiminden sorumlu tutulmuşlardır (52,53). İnsülin rezistansı ve periferik lipoliz, dolaşımdaki SYA havuzunun artmasına neden olur (54). Bu havuz karaciğerdeki trigliseridlerin önemli kaynaklarından biridir. SYA aynı zamanda karaciğerdeki mitokondriyal, peroksizomal ve mikrozomal ROS üretiminin ana kaynaklarından biridir. Karaciğer ve serum SYA konsantrasyonunun artması insülin rezistansının oluşmasına katkı sağlar. Feldstein ve ark., SYA'nın lizozomal permeabilizasyonu kolaylaştırdığını ve böylece hepatositlerden lizozomal proteaz olan katepsin B'nin serbestleştiğini, bunun da hepatosit apoptozisine ve ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir (55). Benzer bakış açısıyla obeziteden dolayı artan serum yağ asidi konsantrasyonları NASH'li hastalarda fibrozisin şiddetiyle korele bulunmuştur (55). SYA basit yağlanmadan NASH'e geçişte önemli rol oynar. Borst ve Conover, yağdan zengin (%50) diyetle insülin rezistansı olan obez hayvan modeli oluşturmuşlardır (56). Bu modelde, günlük kalori alımı arttırılmamış, hatta yem normalden daha az verilmiştir (% 12.4 yağ). Bu farelerin visseral ve

subkutan yağ dokusunda artış gözlenmiştir. Serum açlık insülini artarken, kaslarda insülinin stimüle ettiği glukoz transportu azalmış, serum TNF- α saptanamayacak düzeydeyken visseral yağ dokusunda TNF- α ekspresyonu artmıştır. Daha da önemlisi, serum yağ asidi konsantrasyonu yağdan zengin diyetle beslenen farelerde ve kontrollerde artış göstermemiş, ayrıca karaciğer TNF- α ekspresyon düzeyi değişmemiştir. Bu gözlem oldukça ilginçtir, çünkü obezite, artmış SYA konsantrasyonu ile güçlü ilişki içindedir. İnsülin rezistansını indüklemeye TNF- α , serbest yağ asidlerinden daha önemlidir. TNF- α visseral yağ dokusu makrofajlarında ve kasta eksprese edilir. Serbest yağ asidlerinin artış göstermediği bu hayvan modellerinde sistemik insülin rezistansının kaynağı bu dokulardaki TNF- α gibi gözükmektedir. Gerek hayvan gerekse insan çalışmaları, oksidatif stresin NASH'deki hepatoselüler hasara neden olan temel mekanizmalardan biri olduğunu göstermiştir. Ayrıca obezite sistemik oksidatif stresle korele bulunmuştur. Metabolik sendromu olan obez hastaların metabolik sendromu olmayan obez hastalara göre daha yüksek plazma oksidatif stres biyomarkır konsantrasyonuna sahip olduğu anlaşılmıştır (57). Obez farelerin adipoz dokularında ROS üretiminin arttığı selektif olarak gösterilmiştir. NAFLD tedavisi için kullanılan vitamin E, S-adenosylmethionine, betain, N-acetylcysteine gibi antioksidanlarla görülen yanıt da bu duruma indirek kanıt olarak ileri sürülebilir. Ancak şu ana kadar NASH ile oksidatif stres arasında nedensellik ilişkisini kurabilecek bir kanıt bulunamamıştır.

Hepatosit mitokondrileri SYA'nın β -oksidasyonu ve adenosin trifosfat (ATP)'in üretimi kaynağıdır, NASH patogenezinde de çok önemli bir yere sahiptir. Diyetle oluşturulmuş modellerde mitokondrinin yapısal anormallikleri, mitokondriyal DNA ve ATP'de azalma ve mitokondriyal disfonksiyonlar NASH'li hastaların karakteristik özellikleri olarak rapor edilmiştir (58). Oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı, basit yağlanmadan NASH'e progresyondaki yolakta tamamlayıcı komponentler olarak gözükmektedirler. Spesifik olarak, yağdan zengin diyetle beslenen sıçanların karaciğerindeki mitokondrilerde elektron transport zincirinin kapasitesinin azaldığı ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (59). Yağ asidinin aşırı

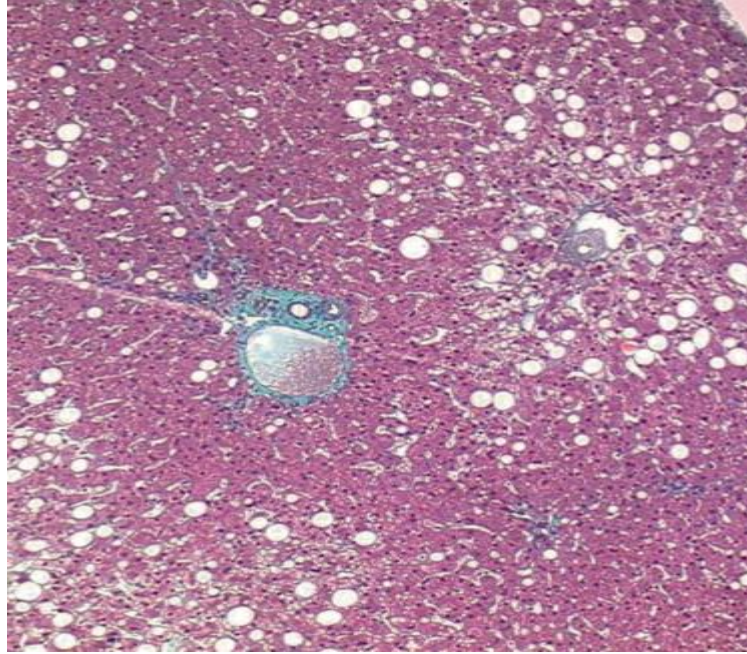
olması, mitokondriyal β -oksidasyon yolağından ziyade alternatif yolağın kullanılmasına yol açarak mitokondriyal hasar oluşturabilir. Bu hasarlanma peroksizomal ve mikrozomal oksidasyon sistemini de kapsar (60). Alternatif yağ asidi oksidasyon sistemi daha çok hidrojen peroksit üretir, bu da oksidatif strese katkıda bulunur. Sitokrom P450 2E1 ekspresyonunun ve indüksiyonunun arttığı iyi dizayn edilmiş hayvan ve insan NASH çalışmalarında daha önce gösterilmiştir. Çok kısa bir süre önce yapılan deneysel bir çalışmada araştırmacılar, maternal yağ alımının yavrularda karaciğerdeki mitokondriyal metabolizmayı bozarak ve hepatik lipogenezi up-regüle ederek NAFLD progresyonuna katkıda bulunduğunu oluşturdukları bir modelle göstermişlerdir (61). Büyük ölçekli gen ekspresyon çalışması, özellikle tüm genom dizi analizi, bu modelde örnekler arasındaki farkı ölçmek için kullanılan oldukça güçlü bir tekniktir (61). Bu teknik, analiz edilen dokudaki mRNA ekspresyonunu ölçebilecek özelliğe sahiptir; örneğin inflamasyon, oksidatif stres, lipogenez ve beta oksidasyonla ilgili genlerin ekspresyonunu değerlendirebilir.

2.5. NAFLD Tanısını Koymada Karaciğer Biyopsisinin Rolü

NAFLD tanısını koymak ve hastalığı evrelemek günümüzde halen basit değildir. Şu ana kadar tanı için tek kabul gören yöntem dikkatli bir tıbbi hikayenin karaciğer biyopsisi ile kombinasyonudur (62). Hastalığın evresinin değerlendirilmesi için tek yöntem bütün kısıtlamalarına rağmen karaciğer biyopsisidir. Biyopsinin hastalığın derecesini gerçekte olduğundan daha az veya fazla gösterebileceği de anlaşılmıştır (63). Karaciğer biyopsisinin invaziv olması ve teknik ile ilgili diğer eksikliklerinden dolayı hastalığın tanısı ve evrelendirilmesinde güvenilir bir invaziv olmayan metoda ihtiyaç vardır. Birkaç tane geliştirilmesine rağmen bunların hiçbiri rutin kullanıma girememiştir (4,5). NAFLD'lı hastaların çoğu anormal bir karaciğer enzim düzeyi ve/veya ultrason, tomografi gibi bir görüntüleme yönteminde yağlanmayla uyumlu bulguların saptanmasından sonra tanı alır (64). Bu testler genellikle bir karaciğer hastalığından şüphelenmekten ziyade başka nedenlerle yapılmıştır. NAFLD'lı hastaların, özellikle de kronik progresif

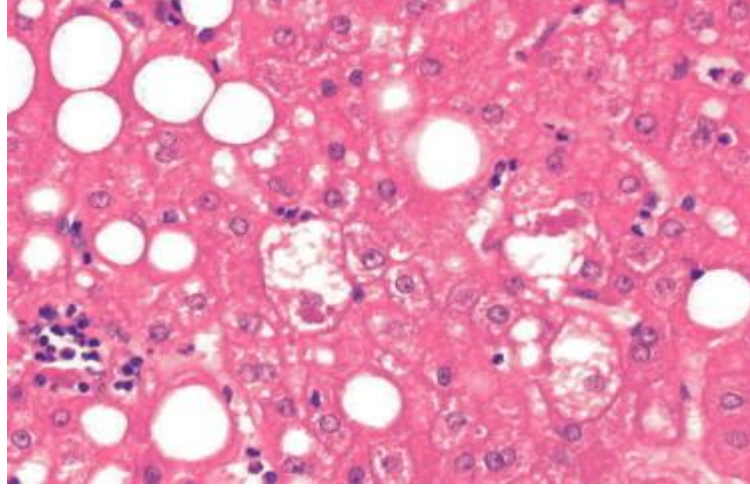
formunun normal karaciğer enzimlerine sahip olabileceğini akılda tutmak çok önemlidir (65). NAFLD ayrıca obezite, MS veya tip 2 diyabet ile ilişkili olmak zorunda değildir. Bu özelliklere sahip olmayan bireylerde de NAFLD gelişebilir, tersine bütün obez, metabolik sendromu veya diyabeti olan kişilerde NAFLD gelişmeyebilir (1).

Histolojik olarak steatozis hepatositlerde trigliserid birikimi olarak tanımlanmıştır ve hepatositlerin en az % 5-10'unda olan fazla birikim önemli steatozis olarak kabul edilmiştir (62). NAFLD'da steatozis genellikle makroveziküllerdir ve çoğunlukla sentrolobüler bölgede lokalizedir (62) (Şekil 3.).



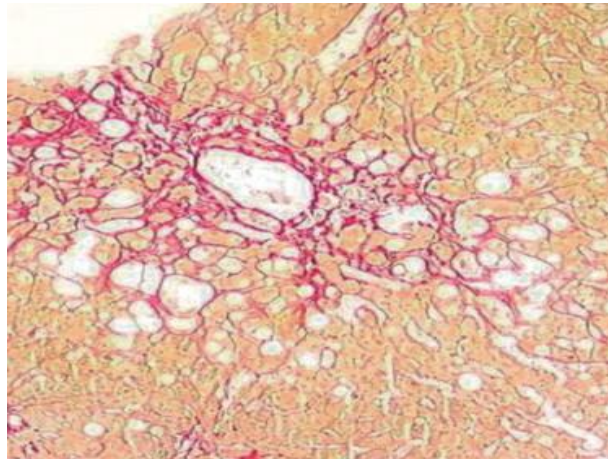
Şekil 3. Sentrolobüler bölgede orta derecede steatozis

Hepatosit balonlaşması hücresel hasarın bir ifadesidir ve genişlemiş, şişmiş hepatositler ile karakterizedir (66) (Şekil 4.). Balonlaşmış hücreler perivenüler bölgede steatotik hepatositlerle ve perisinüzoidal fibrozisle yakından ilişkilidir.



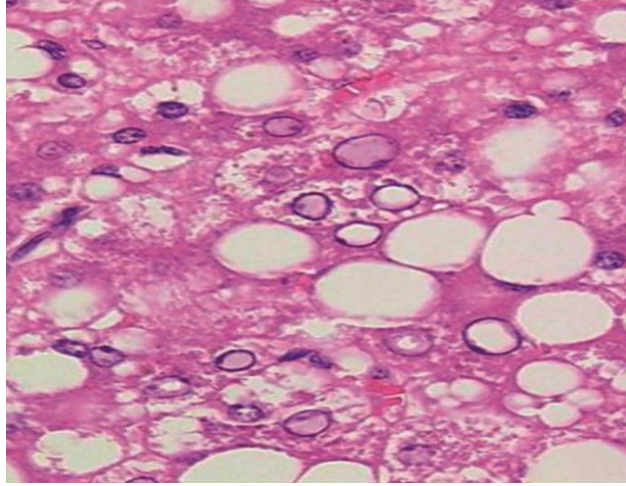
Şekil 4. İntrastoplazmik “Mallory”nin hyalinli balonlaşmış hücreleri. Birkaç inflamatuvar infiltrasyon mevcut.

Lobüler inflamasyon genellikle hafiftir, tipik olarak mononükleer ve polimorfonükleer lökositlerin mikst infiltrasyonu ile karakterizedir. Portal inflamasyon bazen eşlik edebilir, spesifik karakteristik bir özelliği yoktur, başlıca obez pediyatrik popülasyonda gözlenir (62). Hastalık progrese oldukça fibrozis meydana gelebilir. Gerçekten de doğal seyir çalışmalarında 3-6 yıl sonra hastaların % 35’inde fibrozisin progrese olabileceği, hastaların % 12’si kadar bir kısmının 8-10 yıl sonra siroza ilerleyebileceği gösterilmiştir (67). Steatohepatitteki fibrozisin karakteristik paterni diğer kronik karaciğer hastalarından ayırımı sağlayabilir. Ekstraselüler matriksin başlangıç birikimi NASH’de zone 3 lobülde perisinüzoidal alanda olur (Şekil 5.).



Şekil 5. Sentrolobüler alanda orta derecede perisinüzoidal fibrozis

Ek olarak fibröz septa formasyonu ile birlikte periportal fibrozis, neticede köprüleşme fibrozisi ve siroz ile sonuçlanabilir. NAFLD'da megamitokondri, hepatositlerde granüler demir pigmentasyonu, glikojene nükleuslar gibi ek özellikler de bildirilmiştir (Şekil 6.)



Şekil 6. Hepatositlerde glikojene nükleusların varlığı.

NAFLD'lı hastalarda patolojik değerlendirmenin temel amacı karaciğer hasarının boyutunun doğru olarak belirlenmesidir. Bunun yapılabilmesi için evrelendirme ve derecelendirmelerde histolojik skorlar geliştirilmiştir. Yarı-kantitatif bir değerlendirme sistemi NASH'in histolojik tanısını tek bir özellikten ziyade bir grup özelliğe dayandırmaktadır (68). Bu tarz bir yaklaşım yakın zamanda hem pediyatrik hem de erişkin popülasyon için oluşturulmuştur (69). Bu skorlama sisteminde histolojik özellikler 5 kategoride gruplandırılmıştır: Steatoz, inflamasyon, hepatoselüler hasarlanma, fibrozis ve muhtelif özellikler. Erişkin vakalarda patoloğlar arasında bu ana kategorilerde makul derecede (kappa değeri > 0.5) uyum gözlenmesi oldukça önemlidir. Ek olarak NAFLD aktivite skoru (NAS); aktif hasarın özelliklerini içeren bazı skorların (Steatozis:0-3, lobüler inflamasyon:0-3, balonlaşma:0-2) toplamından oluşur. Bu skorlamaya göre ≥ 5 puan alan vakalar NASH tanısı alırken, <3 puan alanlar NASH değildir. NAS'ın tanısal bir araç olarak kullanılmasının amaçlanmadığı, ideal olarak klinik çalışmalarda hastalığın

şiddetini değerlendirmede oldukça uniform olunmasının hedeflendiği açıkça vurgulanmıştır (69).

Klinik değerlendirmeler ve/veya 'skorlar' erişkin ve çocuklarda fibrozisin şiddetini (veya yokluğunu), veya NASH'in derecesini predikte eder. İnvaziv olmayan NASH ve fibrozis belirteçleri, görüntüleme yöntemleri henüz doku değerlendirmesinin yerini alamamıştır, bu testlerin geliştirilmesi ve validasyonu biyopsi gerektirir (67). Karaciğer biyopsisinin avantajları ve dezavantajları hastaya göre bireyselleştirilmelidir, ancak şu da bilinmelidir ki NAFLD'ın siroz dahil tüm spektrumu normal ALT değerine sahip olabilir. Fracanzani ve ark., steatozun ve nekroinflamatuvar derecenin yüksek ALT'si olan bireylerde daha fazla olduğunu fibrozisin ve sirozun normal ALT'li bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı fark taşımadığını göstermişler ve biyopsi gerekliliğinin altını çizmişlerdir (65). 9 çalışmadaki 856 NAFLD'lı hastanın kullanıldığı bilgisayar tabanlı bir analizde biyopsi yapılan bireylerin yapılmayanlara göre 5. yılda hayatta kalım avantajına sahip olduğu ileri sürülmüştür. Karaciğer biyopsisi NAFLD/NASH tanısında merkezi rol alır, karaciğer testlerini yükseltebilecek diğer olası hastalıkları dışlamada yardımcı olur. Ancak ağrı en yaygın komplikasyondur, nadiren analjezik gerektirir. Kanama en ciddi komplikasyondur, nadiren müdahale gerektirir, ölüme yol açabilir (62). Ölümlerin çoğunluğu maligniteli veya ileri evreli sirozlu hastalarda bildirilmiştir. Komplikasyonlar işlemi yapanın deneyimine ve hasta seçimine bağlı olarak değişebilir. Kullanılan iğnenin tipinin komplikasyon oranına etki etmediği kabul edilmektedir. Her halükarda karaciğer iğne biyopsisi organın küçük bir parçasını temsil eder, tüm karaciğeri yansıtmama dezavantajına sahiptir. Biyopsinin diğer potansiyel kısıtlılığı gözlemci varyasyonudur. Ek olarak, küçük örneklem boyutuna başka faktörlerin de ilavesi biyopsideki bu yorum uyumsuzluğunu arttırabilir. Ancak buradaki en önemli faktör patologların deneyim düzeyidir (63).

NASH tanısının konmasında ve fibrozisin belirlenmesinde kullanılabilecek noninvaziv metodların geliştirilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir (70). Ancak, hiçbir tek noninvaziv test histolojiden elde edilebilecek bilgiyi (örneğin inflamasyon, fibrozis, steatozis gibi) klinisyenlere

sağlayamamıştır. İnvaziv olmayan yöntemlerin başarısını noninvaziv belirteçlerin kombine edilmesiyle arttırabilmek için de çabalar harcanmıştır, böylece hafif fibrozis ile ağır fibrozisi doğru tahmin etmedeki doğrulukta bazı düzelmeler görülmüştür (71).

2.6. NAFLD'ın Tedavisi

Günümüzde, NAFLD tedavisinde tek kabul edilmiş tedavi hastalığın evresine bakmaksızın yaşam tarzı değişiklikleridir (72). Bunlar kalori alımının kısıtlanması ve fiziksel aktivitenin artırılmasıyla kilo kaybını içerir. Diyet tercihi potansiyel öneme sahiptir, örneğin: düşük yağ/yüksek karbonhidrat veya yağdan zengin/düşük karbonhidrat. Bugüne kadar bu ciddi bir şekilde araştırılmamıştır, ancak bazı çalışmalar diyetin içeriğinin hastalığın ilerlemesinin önlenmesinde önemli role sahip olduğunu ileri sürmüştür (73). Diğer bir seçenek, genellikle morbid obezlere uygulanan bariyatrik cerrahidir (74). Kanıtlar her iki yaklaşımın NASH'i ve fibrozisi en azından bazı bireylerde geri çevirebileceğini düşündürmektedir. Her iki tedavi yaklaşımının önemli bir dezavantajı hızlı kilo kaybıdır. Bundan kaçınılmalıdır, çünkü NAFLD progresyonuna neden olabilir. Yıllar geçtikten sonra NAFLD tedavisini değerlendiren birkaç küçük çalışma bildirilmiştir. Statinler ve glitazonlar gibi çeşitli ilaçlar çalışılmıştır (75-79). Bu tedaviler büyük ölçüde NAFLD ile ilişkili risk faktörlerine göre seçilmiştir. Genel olarak etkinlikleri göreceli olarak orta derecede olmuş, bireylerin tamamı bu tedavilerden yarar görmemiş, bazılarında hastalık ilerlemiş, sonuçlar farklı popülasyonlarda doğrulanmamış veya sonuçlar çalışmadan çalışmaya büyük farklılıklar göstermiştir (76). Bazı çalışmalarda, NAFLD ve evreleri iyi tanımlanmamıştır. NAFLD tanımı çalışmadan çalışmaya sıklıkla değişkenlik gösterdi. Uniform diyagnostik ve evreleme kriterlerinin kullanımıyla gelecekte tedavilerin etkinliğinin daha sıkı bir şekilde değerlendirilebileceği umulmaktadır.

Günümüzde basit yağlanmaya, yaşam tarzı değişikliklerinden başka tedavi önerisi yapıp yapılmaması önemli bir sorudur. Bu hastaların tamamı kronik steatohepatite, siroza ilerlemeyecektir. NAFLD'ın bu evresindeki bütün hastaları ilaçlarla tedavi etmek maliyet etkin olmayabilir ki bunlarda risk/yarar

oranı da optimal olmayabilir. Çoğu kompleks metabolik hastalıklarda olduğu gibi NAFLD'lı hastaların bir alt grubu verilen tedaviye dirençli olabilir, bir kısmı tedaviden fayda görebilir, oysa diğer bir kısmı hastalıkta daha da kötüleşme gösterebilir (76). Bu hasta alt gruplarının özelliklerinin belirlenmesi kritik öneme sahiptir, böylece gelecekte verilecek tedavi modalitelerinin maliyet etkinliğini artırabilir, risk yarar oranını azaltabilir. Çoğu kompleks hastalıklarda olduğu gibi muhtemelen gelecekte, NAFLD'da kişisel genetiğe dayandırılan bireyselleştirilmiş tıbbi tedaviler yapılacaktır (81).

2.7. NAFLD Tanısında Biyokimyasal Belirteçler

NASH ile basit yağlanma ayırımı için karaciğer biyopsisi yapmanın gerekli olması nedeniyle steatohepatit tanı ve tedavisine yönelik araştırmalar sektöre uğramaktadır (80). Klinisyenlerin NASH biyobelirteçlerinden tüm beklentisi karaciğer biyopsisine ihtiyaç duymaksızın hastalığın tanısını koyabilmek ve izlemine yapabilmektir (4,5,82). Biyobelirteçler, aslında NAFLD spektrumunu anlama, tarama yapma, tanı koyma, prognozu belirleme ve terapötik uygulamanın izlenmesi gibi birçok alanda kullanılabilirler (4). Proteomiks, metabolomiks ve biyoinformatikteki gelişmeler çok sayıda biyobelirtecin tarafsız olarak araştırılmasında devrim yaratmıştır. Bunlar sayesinde NAFLD'ın NASH'i içeren çeşitli evreleri hakkında ve potansiyel sekelleri hakkında (ileri evre fibrozis, hepatoselüler karsinoma, son-evre karaciğer hastalığı) bilgi edinilebilir. Ancak biyobelirteçlerin klinik kullanımı için analitik metodlarla standardize edilmesi ve maliyetinin değerlendirilmesi de gereklidir (4). Yeni geliştirilen biyobelirtecin klinik değerinin olabilmesi için standarda uygun olarak elde edilebilmesi ve klinisyenler tarafından kolay yorumlanabilmesi gereklidir. Ayrıca NASH'i tanımlamada yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip olmalıdır ve basit yağlanmayı NASH'ten ayırabilmelidir. NAFLD olarak tanımlanan vakaların takibinde NASH ve fibrozise ilerleyebilecekleri değerlendirecek ve prognostik değeri olacak bir biyobelirteç elde etmek oldukça zordur. Çünkü prospektif bir çalışma dizaynına ve seri olarak karaciğer biyopsisi yapılmasına ihtiyaç vardır. Her ne kadar mevcut biyobelirteçler ve bunların kombinasyonları, kesitsel çalışmalarda NASH olan

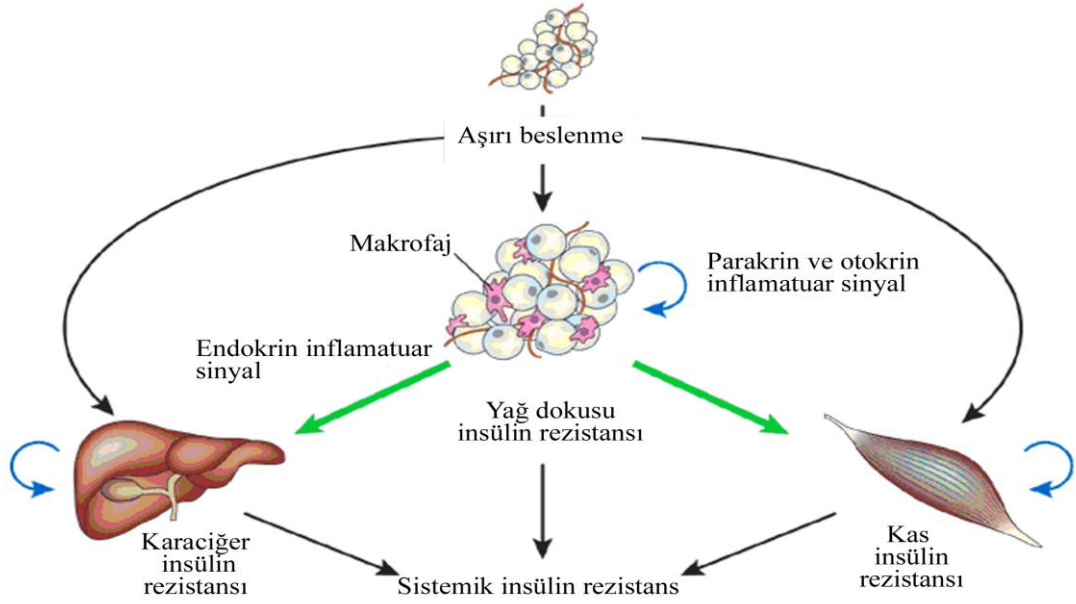
vakaları olmayanlardan ayırma da, hangi hastaların fibrozis ve son dönem karaciğer hastalığı geliştireceğini, hangilerinin geliştirmeyeceğini ayırt edecek biyokimyasal belirteçlerin kullanılmasına yönelik ileri çalışmalara gereksinim vardır. Teknolojik gelişmeler sayesinde birçok belirteçten oluşan profillerin (biyobelirteç biyopsinin), NASH tanısında altın standart olan karaciğer biyopsisinin yerini alacağı düşünülmektedir (82). NASH ile basit yağlanmayı ayırmaya yönelik giderek artan sayıda biyobelirteçlerin olması aslında yeni biyobelirteçlerin özenli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu sebeple tanıyı doğru koyabilmek için güvenilir istatistiksel metodlarla değerlendirmeye ihtiyaç vardır (4). Uygun istatistiksel tekniklerin uygulanması, biyobelirteçlerin NAFLD spektrumunu değerlendirme potansiyelini ve klinik kullanımını belirlemede son derece önemlidir. Genelde bir biyobelirtecin tanıyı doğru koyabilme özelliği sensitivite ve spesifitesiyle değerlendirilir (4). Sensitivite, biyobelirtecin doğru olarak NASH tanısı koyduklarının gerçekten hastalığı bulunanlara oranıdır. Benzer şekilde spesifite, biyobelirtecin doğru olarak NASH olmadığına dair tanısını koyduklarının gerçekten hastalığı bulunmayanlara oranıdır. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC=area under curve) biyobelirtecin ortalama sensitivitesini ifade eder ve biyobelirtecin performansını gösteren istatistiksel bir özettir (83). Prediktif değeri olmayan bir biyobelirtecin AUC değeri 0.5'tir. Hastalığı en iyi tahmin eden biyobelirtecin AUC değeri ise 1'dir. Aynı popülasyonda iki ya da daha fazla sayıda biyobelirteç karşılaştırılıyorsa eşleştirilmiş örnekler için uygun istatistiksel teknikler kullanılmalıdır. Bu şartlar altında, herhangi iki veya daha fazla sayıda biyomarkırın karşılaştırılması AUC'lerin karşılaştırılması ile olur. AUC'ler ancak büyük örneklem sayılarında yapılan çalışmalarda normal dağılıma sahiptir, yani bu durumda güvenilirliği yüksektir. AUC'ler bir markır için o markırın genel olarak tanısız performans hakkında bilgi verir. Fakat tanımlayıcı istatistikler (örneğin: AUC'ler arasındaki farka bakmak), bir belirtecin potansiyel klinik kullanımına karar vermek için yeterli değildirler. Öncelikle bu metod halen klinikle uyumlu olabilmesine rağmen orta dereceli bir etkiye sahip markırları ortaya çıkarmakta göreceli olarak duyarsızdır. Diğer önemli bir problem ise bu

teknik (AUC'lere bakmak) geleneksel risk profiline bir markır veya markır grubunun eklenmesi ile ilişkili olarak hesaplanacak risk durumundaki değişikliğin büyüklüğünü dikkate almaz (4,83). Oysa bu yeni durum hepatologlar için çok önemlidir. NAFLD konusundaki markırlar hakkında yapılacak gelecek çalışmalar, bu tür istatistik hesaplamalarının da ötesinde başka hesaplamalara (mesela rölatif risk, odds oranları gibi) ihtiyaç duyar. Ancak o zaman NAFLD/NASH konusundaki potansiyel markırların klinik kullanımı konusunda heyecan verici tartışmalar yapılabilir.

2.8. Klasik Adipokinler ve NAFLD

Beyaz adipoz doku, en çok erişkinlerde bulunur, üç ana fonksiyona sahiptir: 1) Enerji depolanması 2) SYA'nın sağlanması için trigliseridlerin hidrolizi, dokulara enerji desteği verilmesi 3) Adipokinlerin (adipositokinlerin) salınması (Şekil 7.).

Adipokinler terimi, önemli ölçüde adipoz dokuda eksprese edilen polipeptid sitokinler için kullanılır (85). Karaciğer hastalıklarında visseral adipoz doku eşsiz özelliğe sahiptir, çünkü burada üretilen sitokinler portal ven aracılığıyla direk olarak karaciğere ulaşabilir (86). Bazı adipokinler subkutanöz yağ dokusundan ziyade visseral yağ dokusunda eksprese edilir ve salınır. Adipokinlerin fonksiyonları giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Bunlardan en iyi tanımlananları leptin, adiponektin ve rezistindir (88).



Şekil 7. Adipokinlerin metabolik faaliyetleri

Leptin, 167 aminoasitli bir protein olup 1994'te "ob" geninin pozisyonel klonlanması ile keşfedilmiştir (89). Her ne kadar anoreksijenik hormon olarak bilinse de etkilerine karşı direnç oluşması nedeniyle obezitede artar (90). Hayvan modellerinde, adipöz doku dışı dokularda lipid birikimini önlemektedir. Özellikle karaciğerde bu etki, SREBP-1 (Sterol Regulating Binding Protein-1) ekspresyonunun azaltılmasıyla gerçekleşir (89). Leptinin, NASH patogenezi açıklayan çift vuruş hipotezinin her iki vuruşunda da rol oynadığı düşünülmektedir (86). Başlangıçta insülin rezistansının gelişimine ve sonrasında da steatoza katkıda bulunur (89). Karaciğer hasarında leptin, proinflamatuvar bir role sahiptir ve karaciğer fibrozisinin önemli bir mediyatörüdür. Karbon tetraklorür (CCl_4) kullanılan sıçanlarda, leptin enjeksiyonu sonucunda aktif hepatik stellat hücrelerin (HSCs) belirteci olan prokollajen-I, "transforming growth factor 1" (TGF 1) ve düz kas aktini artmaktadır. Sonuç olarak, karaciğer fibrozisi artmıştır (91). Ayrıca leptin enjeksiyonundan sonra serum TNF α seviyelerinde dramatik bir artış meydana gelmiştir. Bu durum, leptinin inflamasyonu arttırdığını ve fibrozis gelişimini bağımsız olarak etkilediğini düşündürmektedir. Sinüzoidal endotel

hücreler ve Kupfer hücreleri leptinin profibrojenik etkisinin ana hedefleri olarak saptanmıştır (91). Diğer yandan leptin dirençli veya leptin bulunmayan fareler, önemli derecede azalmış fibrojen yanıt vermiştir (90). Leptin güçlü mitojen etkiye sahiptir ve apoptozis inhibitörüdür. Bu fibrojenik etki, içinde bulunduğu HSCs üzerinden gerçekleşmektedir. Aktifleşen HSCs, leptin salgılamaya başlar ve karaciğer fibrozinin artmasını tetikler.

Adiponektin adipositler tarafından salgılanan ve anti-inflamatuvar olarak kabul edilen bir adipokindir (92). Vücut yağını azaltır ve karaciğer ile periferde insülin duyarlılığını artırır. Vücut kitle indeksi ve insülin rezistansı ile ters orantılıdır. Karaciğerde, serbest yağ asitlerinin oksidasyonunu artırarak ve/veya hepatositlerden serbest yağ asitlerinin de novo sentezini azaltarak lipid birikimine engel olur (93). Bu etkinin bir kısmı, yağ asidi sentezi düzenlemede anahtar role sahip olan SREBP-1'in reseptör sayısındaki azalma ile gerçekleşir (94). Adiponektinden yoksun bırakılan fareler, NASH'e sebep olan diyet ile beslendiklerinde "wild" tip farelere göre daha ciddi hepatosteatoz geliştirmektedirler (95). Ayrıca adiponektin, karaciğer inflamasyonu ve fibrozisine karşı koruyucu rol oynamaktadır. Kamada ve ark., adiponektin tedavisini uygulamanın CCl₄ ile oluşturulan fare modellerindeki karaciğer fibrozunu azalttığını ve HSCs'nin her iki adiponektin reseptörlerini (AdipoR1 ve AdipoR2) eksprese ettiğini bildirmişlerdir (93). Masaki ve ark., KK-Ay tipi obez farelerde endotoksine bağlı akut karaciğer hasarı modeli oluşturmuştur ve sonrasında adiponektinin TNF α sentezi ve / veya salınımını inhibe ederek karaciğer hasarını engellediğini saptamışlardır (94). Ayrıca Xu ve ark., farelerde yağlı karaciğer hastalığında adiponektinin koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir (95).

Rezistin adipoz doku ve makrofajlardan salgılanan son zamanlarda keşfedilmiş bir adipokindir (96). Bazı kemirgen çalışmalarına göre rezistinin temel etkisi karaciğer üzerindedir. Hepatik insülin rezistansına neden olur. İskelet kasları ve adipoz doku üzerinde de etkileri mevcuttur (97). Serbest yağ asitlerinin iskelet kaslarına alınmasını ve metabolizmasını engelleyerek insülin rezistansını artırmaktadır. Ayrıca rezistin tedavisinin, insülin inhibitörü olarak bilinen SOCS3 (supressor of cytokine signalling 3) geninin

ekspresyonunu belirgin olarak indüklediğine dair kanıtlar bulunmaktadır (96). Daha da önemlisi rezistinin proinflamatuvar etkileri olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Rezistin bu etkisini, nükleer faktör (NF) – kappa B'ye bağımlı yolak ile makrofajlarda bulunan TNF α ve IL-12'yi uyararak ve IL-6 ile IL-1 salınımını düzenleyerek göstermektedir (98). Yine bir çalışmada rezistinin karaciğer fibrozisinde rol oynadığına dair kanıtlar öne sürülmüştür (99).

2.9. Yeni Adipokinler ve NAFLD: Omentin, Chemerin ve Adipsin

Yakın zamanda birçok yeni adipokin tanımlanmıştır. Omentin temel olarak visseral yağ dokusunun vasküler fraksiyonundan eksprese edilen, subkutan adipoz dokuda ve olgun adipositlerde çok az miktarda bulunan 4 kDa boyutunda yeni bir adipokindir (100,101). Bu polipeptid hormon obezite, insülin ve glukoz homeostazisiyle yakından ilişkilidir, insan adipositlerinde insülin duyarlılığını artırıcı role sahiptir (101). İlginç olarak dolaşımdaki omentin seviyeleri obezite ve insülin rezistansı ile ters ilişkili, adiponektin ve HDL düzeyi ile korele bulunmuştur (102).

Chemerin insülin yolağında ve adiposit diferansiyasyonunda önemli rolü olan bir sitokindir (103). Kısa bir süre önce, Kukla ve ark., serum chemerin seviyelerinin NASH'li hastalarda daha yüksek olduğunu ve hepatosit balonlaşma dejenerasyonu, total kolesterol ve diyastolik kan basıncı ile pozitif ilişkisi olduğunu göstermiştir (104). Buna ek olarak Sell ve ark., chemerin düzeyini obez NAFLD'lı hastalarda yüksek bulmuştur (105).

Adipsin, aynı zamanda adiposit kompleman faktör D olarak da bilinir, kompleman aktivasyonunun alternatif yolağının hız kısıtlayıcı enzimidir (106). Adipsin klasik ve alternatif kompleman kaskadının diğer komponentleriyle birlikte, insanlarda primer olarak adipositler tarafından eksprese edilir ve bir adipokin olduğu kabul edilir (107). Visseral adipoz dokuda adipsinin yüksek derecede eksprese edilmesinin, artmış visseral yağ dokusu ile ilişkilendirilen metabolik komplikasyonlara bu molekülün katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (108).

2.10. Kemik-Karaciğer Aksı: Osteoprotegerin ve Osteocalcin

OPG, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör süperfamilyasından bir sekretuar proteindir. Kemik iliği stromal hücreleri, immün sistem hücreleri, vasküler düz kas ve endotelial hücreleri de içeren çeşitli dokulardan üretilir (109). Kemik metabolizmasının düzenlenmesinde aldığı önemli rol dışında, önemli antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiye sahiptir. OPG'nin birçok hücre tipi için sağkalım faktör olarak rol oynadığı gösterilmiştir (110). Bu etkiyi TNF-ilişkili apoptozisi indükleyen liganda (TRAIL) bağlanması suretiyle duyarlı hücrelerde apoptozisi inhibe ederek gösterir (111). Hepatosit apoptozisi NAFLD'da karaciğer hasarının anahtar mediyatörüdür. Basit yağlanmanın NASH'e ilerlemesinden apoptozis sorumlu tutulmaktadır (112,113).

Kanıtlar obezite ve insülin rezistansının azalmış OPG konsantrasyonları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan bir çalışma insülin rezistansı olan obez bireylerde düşük serum OPG değerleri bildirmiştir (114). Ek olarak premenopozal obez kadınlarda dolaşımdaki OPG seviyeleri insülin rezistansı ile ilişkili bulunmuştur (115). İlginç olarak OPG'nin insanlarda adipoz dokudan üretilebildiğine dair kanıt vardır (116). Bu kanıt bu molekülün NAFLD patogenezinde rol alan bir adipokin rolü görebileceğini düşündürmektedir. OPG'nin bu metabolik durumlarla olan ilişkisi ve anti-apoptotik özelliğine rağmen henüz NAFLD'da OPG'yi araştıran bir çalışma yapılmamıştır.

OCN, osteoblastlar tarafından üretilen kemikte en bol bulunan kollajenöz olmayan proteindir (117). Kemik formasyonu ve "turnover" markırı rolünün yanısıra, OCN'nin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan kemik kökenli hormon olduğu kısa bir süre önce gösterilmiştir (118). Doğal tip hayvanlara göre OCN -/- "knockout" fareler anormal yağ kitlesi, artmış serum trigliserid, bozulmuş insülin sekresyonu, insülin rezistansı ve glukoz intoleransı ile karakterizedir. İlginç olarak, OCN-null farelerde karaciğerde insülin hedef genlerinin ekspresyonu uniform bir şekilde azalmış gözükmektedir (118). Klinik insan çalışmaları OCN ile insülin rezistansı, serum glukozu, trigliserid ve adipozite arasında ters ilişki rapor etmişlerdir (119). Bundan başka değişik etnik gruplarda serum OCN ile metabolik

sendrom varlığı arasında negatif ilişki bildirilmiştir (120-123). Kronik karaciğer hastalığı konusunda yapılan bir pilot çalışmada primer biliyer siroz ve kronik alkole bağlı karaciğer hastalığında azalmış OCN seviyeleri saptanmıştır (124). 28 obez hastada yapılan son bir çalışmada, Fernández-Real ve ark., dolaşımdaki OCN konsantrasyonlarının karaciğer hasarının kan belirteçleriyle (AST ve ALT'yi de içeren) negatif bir ilişkide olduğunu göstermiştir (125). Ek olarak obez bireylerde kilo kaybını takiben gelişen ALT'deki değişiklikler OCN konsantrasyonlarındaki değişiklikler ile lineer şekilde ilişkili bulunmuştur (125).

2.11. Anjiyogenez ve NAFLD: VEGF-A ve Onun Soluble Reseptörü

Vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF) vasküler fonksiyonu ve anjiogenezi etkileyen potent bir sitokindir (126). Metabolizmada VEGF'nin çeşitli etkilere sahip olduğu bilinmektedir (127, 128). VEGF'nin sistemik düzeyinin diyabetik hastalarda değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (129,130). İlginç olarak, VEGF adacık hücrelerinin revaskülarizasyonunu düzelterek pankreas adacıklarının hayatta kalımını artırır, β hücreleri için koruyucu rol oynar (128). Barylski ve ark.'nın yaptığı bir pilot çalışmada metabolik sendromlu hastalarda VEGF seviyeleri azalmış olarak bulunmuştur (131) . Ancak bu bulgu sonraki bir çalışmada konfirme edilmemiştir (132). VEGF aynı zamanda kronik karaciğer hastalıklarının fizyopatolojisinde rol alır, bu molekül karaciğer fibrozisinin erken evrelerinde yaygın olarak hipereksprese edilir (133). VEGF'nin bu biyolojik aktivitesi onun reseptörü olan VEGFR-1 aracılığıyla modüle edilir. VEGFR-1 mRNA'nın alternatif kırılma (splicing) VEGFR-1'in soluble kesime uğramış (truncated) formu (sVEGFR-1) sekrete edilir ve bu VEGF'nin doğal endojen inhibitörü gibi rol oynayabilir (134). Buna uygun olarak VEGF'nin sVEGFR-1'e bağlanmasıyla anti-anjiyojenik etki oluşur (135). İlginç olarak, VEGFR-1'in selektif aktivasyonunun hepatotoksine maruz kalan farelerde hepatosit proliferasyonunu in vivo stimüle ettiği, karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir (136). Böylece VEGF-1 agonistlerinin bazı seçilmiş kronik karaciğer hastalıklarında organ fonksiyonlarının korunmasında terapötik potansiyele sahip olabileceği ileri sürülebilir (136).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul

Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Protokol no: MAR-YÇ-2009-0155, Tarih:08.05.2009) ve çalışmaya katılan tüm bireylerden aydınlatılmış onam alındı.

3.2. Çalışma Popülasyonu

Bu çalışma, toplamda 99 adet NAFLD'lı hasta (50 erkek ve 49 kadın, ortalama yaş, 48 ± 8 yıl) ve 75 adet sağlıklı kontrolden (37 erkek ve 38 kadın, ortalama yaş, 48 ± 7 yıl) oluşan bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Çalışmaya alınan hastalar, Haziran 2009 - Nisan 2010 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğinden biyopsi ile tanısı kesinleştirilmiş bireyler arasından seçildi. Kontrol grubu ise aynı tarihlerde Gastroenteroloji ve İç Hastalıkları Polikliniğine başvuran tetkikleri yapıp herhangi bir kronik hastalık saptanmayan bireylerden oluşturuldu.

3.2.1. Alınma kriterleri

18-70 yaş arası biyopsi kanıtlı nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan hastalar

3.2.2. Dışlanma kriterleri

1-Erkeklerde 140 gr/hafta, kadınlarda 70gr/haftadan fazla alkol kullanımı olanlar.

2-Viral hepatit, hemokromatoz, Wilson hastalığı, otoimmün hepatit, primer biliyer siroz, sklerozan kolanjit, biliyer darlık, alfa-1 antitripsin eksikliği, iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, malignite saptanan hastalar.

3-Östrojen, amiodaron, steroid, tamoksifen, metotreksat, valproate gibi yağlanma ile ilişkili olabilecek ilaç kullanımı olan hastalar ve antihiperlipidemik ilaç kullananlar

4-Diyabet için insülin tedavisi almakta olan hastalar

5- Gebeliği, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği (Cr>1.4) olan hastalar

75 adet yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş gönüllü sağlıklı kişiler kontrol grubu olarak belirlendi. Kontrol grubundaki tüm vakalar, normal karaciğer fonksiyon testleri ve normal karaciğer ultrason bulguları olan sağlıklı kişilerden seçildi. 20 g/gün'ün üzerinde alkol tüketimi olan ve herhangi bir ilaç kullanımı olan bireyler kontrol grubuna dahil edilmedi.

3.3. Klinik ve Biyokimyasal Özellikler

Tüm vakalara fizik muayene, antropometrik ve biyokimyasal ölçümler yapıldı. Vücut kitle indeksi, boy ve kilo ölçümlerine göre hesaplandı. Diyabetes mellitus tanısı, ADA kriterlerine göre konuldu (137). Metabolik sendrom tanısı, ATP III kriterleri kullanılarak konuldu. İnsülin rezistansının tahmini HOMA-IR indeksi hesaplanarak yapıldı.

$\text{İnsülin rezistansı} = \frac{\text{Açlık plazma insülini (mikrounit/ml)} \times \text{Açlık plazma glukozu (milimol/l)}}{22.5}$
(<2.5 ise normal, ≥2.5 ise insülin rezistansı mevcut)

Sfigmomanometre ile sessiz bir odada, 10 dakikadan fazla dinlenmiş bir şekilde kan basıncı ölçümü yapıldı. Sigara içme durumları sorgulandı. Rutin kan tetkikleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin laboratuvarlarında çalışıldı. Serum yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein (hs-CRP) düzeyi iki kez, rastgele, kör olarak ve BN Prospec® ile nefolometrik yöntemle ölçüldü (Dade Behring, Marburg, Almanya). Yüksek duyarlılıklı CRP için intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla %4.6 ve %6.1'dir ve en düşük ölçüm limiti 0.19 mg/dl'dir.

3.4. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer biyopsisi, lokal anestezi ile 16-gauge Hepafix iğnesi (Braun Melsungen AG, Melsungen, Almanya) kullanılarak ultrason eşliğinde yapıldı. Bütün biyopsi örnekleri, % 10'luk formaldehit ile fikse edildi ve sonrasında parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 4 mikron kalınlığında hazırlanan kesitler, Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Klinik bilgilerden habersiz, tecrübeli bir patolog, NASH ön tanısı olan hastaların biyopsi materyallerini, NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) NASH Klinik Araştırma Ağı Skorum Sistemi'ne göre değerlendirdi (69). Steatoz, 0 dan 3'e kadar 4 derece olarak skorlandı (S0: Steatoz olmaması ya da % 5'ten daha az olması; S1: %5-33; S2: %33-66; S3: >%66 olarak tanımlanmıştır). Lobüler inflamasyon evrelemesi, Evre 0: Odak yok; Evre 1: her 200× alanda <2 odak; Evre 2: her 200× alanda 2-4 odak; Evre 3: her 200x alanda >4 odak olarak tanımlanmıştır. Balonlaşma değerlendirilirken ise balonlaşmış hücre yoksa 0 puan, birkaç tane varsa 1 puan, çok sayıda varsa veya balonlaşma aşıkâr ise 2 puan alır. Fibrozis evrelemesi, Evre 0: Fibrozis yok; Evre1: perisinüzoidal veya periportal fibrozis; Evre 2: perisinüzoidal ve portal / periportal fibrozis; Evre 3: köprüleşme fibrozisi; Evre 4: siroz olarak tanımlanmıştır. Fibrozisin, hastalık aktivitesinin bir sonucu olduğu ve genellikle geri dönüşümsüz olduğu düşünülür ve aktivite skorunun bir komponenti olarak puanlamaya dahil edilmez. Histolojik NASH skoru, steatoz (0-3), lobüler inflamasyon (0-3) ve balonlaşma (0-2) skorlarının toplanması ile elde edilir. Bu toplama sonucunda 0 ile 8 arasında bir değer saptanır. 0-2 arasında skoru bulunanlar basit yağlanma, 5 ve üstünde skoru bulunanlar ise kesin olarak NASH olarak değerlendirilir. Skoru 3 ve 4 olarak saptanan vakalar ise olası NASH olarak tanımlanır (69).

3.5. Biyokimyasal Analiz

Çalışmaya katılan ve tüm gece aç bırakılan bütün bireylerden sabah saat 8:00 – 9:00 arasında antekübital venden, kan numuneleri alındı ve tüm tüplere hemen 100 µL aprotinin (Trasyol®) eklenerek 2500 g'de 10 dakika

soğuk santrifüj edildi. Elde edilen serumlar -80°C'de inceleme öncesine kadar dondurularak saklandı ve inceleme için sadece bir defa çözüldü.

3.5.1. Adipokinler

Serum omentin seviyelerinin ölçümü için ticari olarak elde edilebilen “enzyme immunoassay” (EIA) kit (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) kullanıldı. Üreticinin protokolüne uygun bir şekilde ölçüm yapıldı. Minimum ölçüm limiti 0.4 ng/ml idi. Serum chemerin düzeyi kantitatif bir EIA kit (Biovendor, Modrice, Çek Cumhuriyeti) kullanılarak değerlendirildi. Minimum ölçüm limiti 0.13 ng/mL ng/ml idi. Serum adipsin seviyeleri, “ELISA” kiti (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) kullanılarak üreticinin protokolüne uygun olarak ölçüldü. Minimum saptanabilen konsantrasyon 0.013 ng/ml idi. Bütün serum örnekleri, klinik bilgilerden habersiz şekilde analiz edildi. Tüm ölçümler iki kez yapıldı ve ortalama bir sonuca göre değerlendirildi. Tüm kitler için intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla <%9 ve <%12 idi.

3.5.2. Osteocalcin

Serum OCN düzeyleri, katı-faz (plastik) mikrokuyucuklu plakada üretici firmanın talimatnamesine göre yapılan enzim ile duyarlılığı çoğaltılmış immün-analiz (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) ile saptanmıştır. Bu analiz, insan osteocalsininin farklı epitoplarına spesifik monoklonal antikoları kullanmaktadır. Kalibratör ve örnekler, yakalayıcı monoklonal antikolarla kaplı mikrokuyucuklar ve “horseradish” (yaban turpu) peroksidaz enzimi ile işaretli monoklonal antikolarla reaksiyon gösterirler. Sandviç şeklinde bağlanmaya imkan veren inkübasyon aralığından sonra mikrokuyucuklu plaka, enzim ile işaretli bağlanmayan antikoların ortamdaki uzaklaştırılması için yıkandı. Enzim ile işaretli bağlı antikolar kromojenik reaksiyon ile ölçüldü. Osteocalsin konsantrasyonu ile orantılı substrat yıkımı miktarı absorbans değerlerinin kolorimetrik olarak ölçülmesiyle saptandı. Tüm ölçümler iki kez ve rastgele olarak yapıldı ve sonuçların ortalaması alındı. Tüm ölçümler körleme olarak yapıldı. Saptama sınırı, bağlanmanın olmadığı

“0” standardına ait optik dansitelerin replikasyonlarının ortalaması üzerindeki iki standart sapmanın belirgin olan konsantrasyonuna göre saptanmış olup 0,4 ng/mL'dir. Analiz içi ve arası standart sapmanın ortalamaya oranı sırasıyla 4.5% and 3.3%'dü.

3.5.3. Osteoprotegerin

Serum OPG düzeyi ticari olarak elde edilen bir “ELISA” kiti kullanılarak (Biomedica Medizinprodukte GmbH, Wien, Austria) üreticinin protokolüne uygun olarak ölçüldü. Minimum ölçüm limiti 0.14 pmol/L idi. Bütün serum örnekleri, klinik bilgilerden habersiz şekilde analiz edildi. Tüm ölçümler iki kez yapıldı ve ortalama bir sonuca göre değerlendirildi. Tüm kitler için intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla <% 7ve < %9 idi.

3.5.4. Serum VEGF ve VEGFR-1 düzeylerinin ölçümü

Serum VEGF (Biovendor, Modrice, Czech Republic) ve sVEGFR-1 (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) konsantrasyonları ticari olarak elde edilen “ELISA” kitleri kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde ölçüldü. Bütün serum örnekleri, klinik bilgilerden habersiz şekilde analiz edildi. Tüm ölçümler iki kez yapıldı ve ortalama bir sonuca göre değerlendirildi. Tüm ölçümler için intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla <% 5 ve < %8 idi. Minimum saptanabilen konsantrasyon VEGF için 14 pg/mL, sVEGFR-1 için 0.03 ng/mL idi.

3.6. Verilerin Analizi

Sürekli verilerin dağılımı tek örnekli Kolmogorov-Smirnov testi ile araştırıldı. Normal dağılan değişkenler ortalama \pm standart sapma (SS) şeklinde tanımlandılar. Normal dağılım göstermeyenler ise ortanca ve çeyrek değerler genişliği olarak bildirildi. Kategorik değişkenler ise sayılarla tanımlandılar. Normal olarak dağılan sürekli değişkenlerin bulunduğu iki çalışma grubu arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Student's t-test kullanıldı. Normal dağılım sağlanamadıysa Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Dağılımı yığılım gösteren veriler logaritmik transformasyon uygulandıktan sonra değerlendirildi. Çalışmadaki değişkenler arasındaki korelasyon Spearman'ın korelasyon katsayısı ile test edildi. NAFLD hastalarında fibrozis skorunun prediktörleri çok aşamalı lineer regresyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Tablo 1'de yer alan tüm değişkenler potansiyel prediktörler olarak tanımlandı. Tüm istatistiksel analizler için Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) SPSS 11. 0 versiyonu kullanıldı. $P < 0.05$ (iki yönlü) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

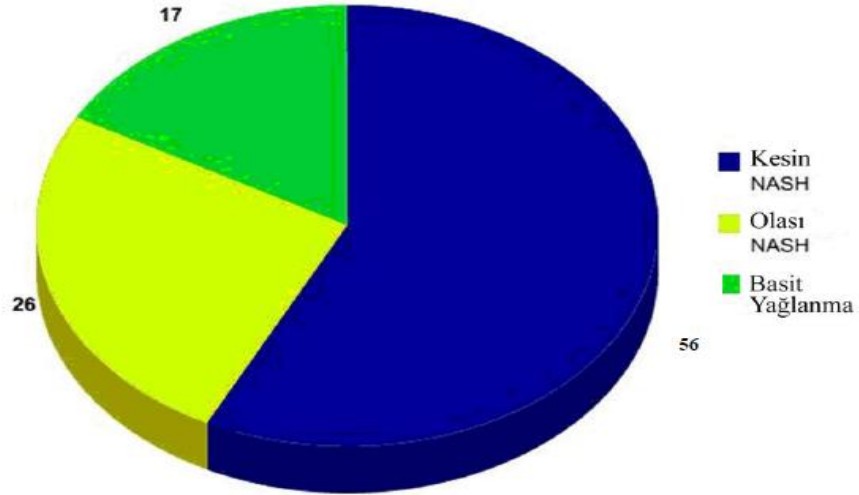
4. BULGULAR

Çalışma popülasyonunun genel özellikleri Tablo 1.'de özetlenmiştir. Her iki çalışma grubu yaş, cinsiyet, sistolik ve diyastolik kan basıncı ve HDL kolesterol ve sigara kullanımı açısından farklılık göstermemekteydi.

Tablo 1. Grupların genel özellikleri

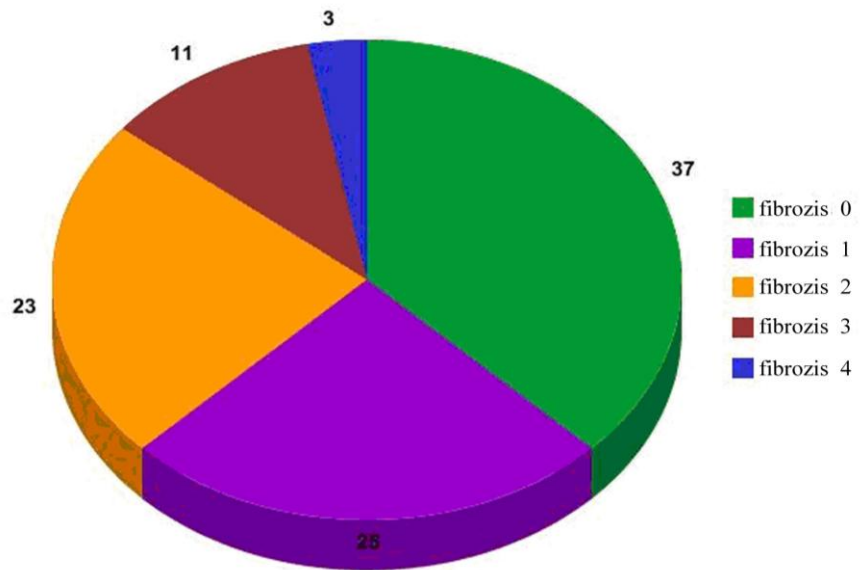
	NAFLD (n = 99)	Kontrol (n = 75)	P değeri
Cinsiyet (E/K)	50/49	37/38	anlamsız
Yaş (yıl)	48 ± 8	48 ± 7	anlamsız
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	30.6 ± 4.9	27.4 ± 4.3	<0.01
Diyabetes mellitus (evet/hayır)	29/70	0/75	<0.001
Metabolik sendrom (evet/hayır)	61/38	0/75	<0.001
HOMA-IR	3.7 (2.3-5.1)	1.6 (0.6-2.5)	<0.001
Sistolik kan basıncı (mmHg)	138 ± 22	126 ± 20	anlamsız
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	85 ± 13	82 ± 11	anlamsız
AST (U/L)	44 ± 19	24 ± 10	<0.001
ALT (U/L)	68 ± 32	21 ± 11	<0.001
Total kolesterol (mg/dL)	219 ± 49	188 ± 47	<0.01
HDL kolesterol (mg/dL)	45 ± 11	44 ± 19	anlamsız
LDL kolesterol (mg/dL)	148 ± 51	127 ± 22	<0.001
Trigliserid (mg/dL)	185 ± 88	143 ± 69	<0.001
hs-CRP (mg/dL)	3.3 (2.7-4.9)	-	-
Histolojik steatoz	2 (1-3)	-	-
Lobüler inflamasyon	2 (1-3)	-	-
Balonlaşma	2 (1-2)	-	-
NASH skoru	5 (4-7)	-	-
Fibrozis	1 (0-2)	-	-

Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, biyopsili NAFLD grubunda vücut kitle indeksi, HOMA-IR, AST, ALT, total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid ölçümleri kontrol grubundan farklı olarak saptandı. Diyabet ve metabolik sendrom prevalansı NAFLD grubunda kontrollere göre daha yüksekti. NAFLD'lı hastalarda grupların dağılımı şöyledir: kesin NASH (n=56), olası NASH (n=26), basit yağlanma (n=17) (Şekil 8.).

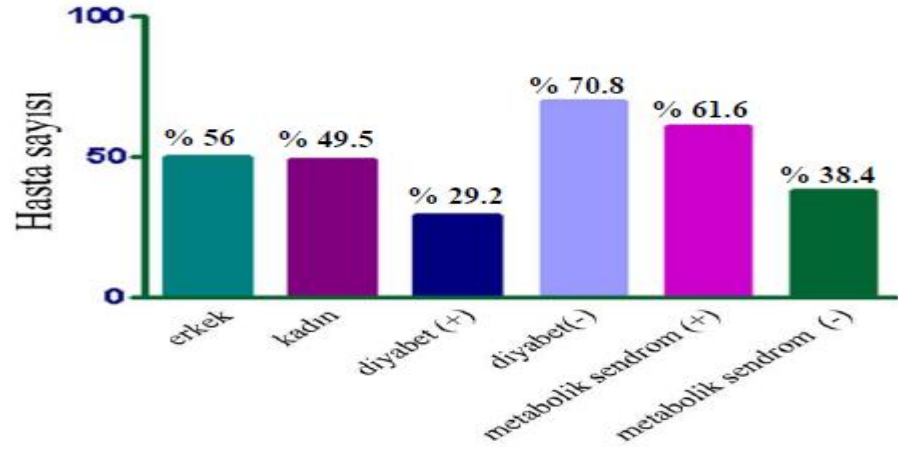


Şekil 8. NAFLD spektrumundaki hastaların alt gruplara göre dağılımı (n=99)

Çalışmaya katılan hastaların fibrozis skorlarının dağılımı Şekil 9.'da gösterilmiştir.



Şekil 9. NAFLD'lı hastaların fibrozis skorlarına göre dağılımı (n=99)



Şekil 10. 99 NAFLD'lı hastada cinsiyetin, diyabetin, metabolik sendromun dağılımı

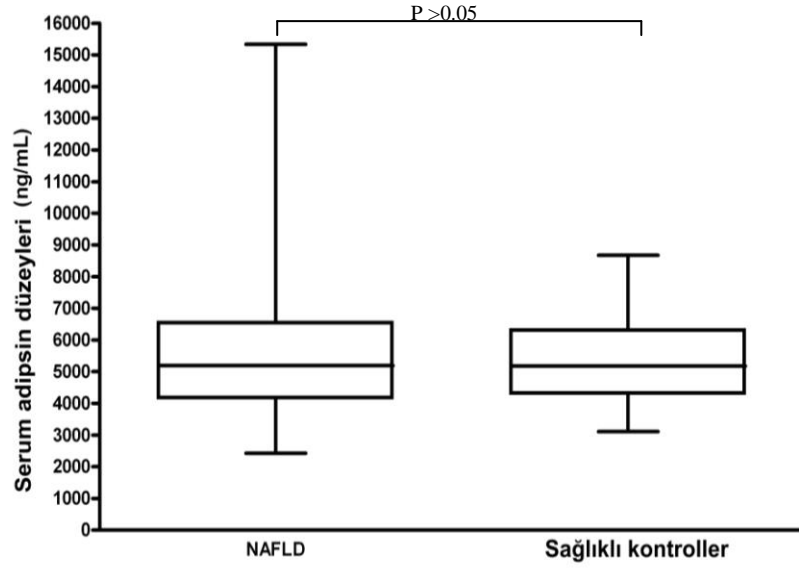
4.1. Yeni Adipokinler

Çalışmaya katılan bireylerin serum adipokin düzeyleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

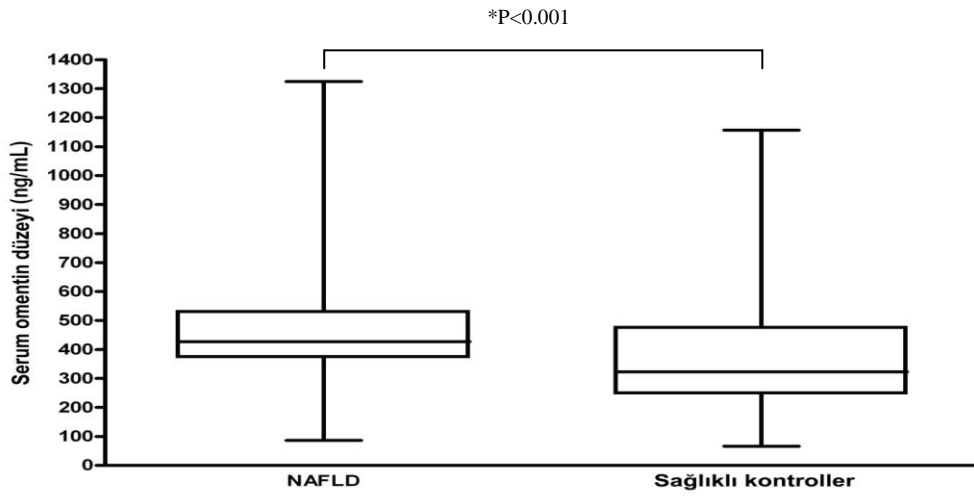
Tablo 2. Çalışmaya katılan bireylerin serum adipokin düzeyleri

	NAFLD (n = 99)	Kontrol (n = 75)	P değeri
Adipsin (ng/mL)	5601 ± 2039	5330 ± 1334	anlamsız
Omentin (ng/mL)	460 ± 181	376 ± 196	< 0.001
Chemerin (ng/mL)	219 ± 83	159 ± 43	< 0.001

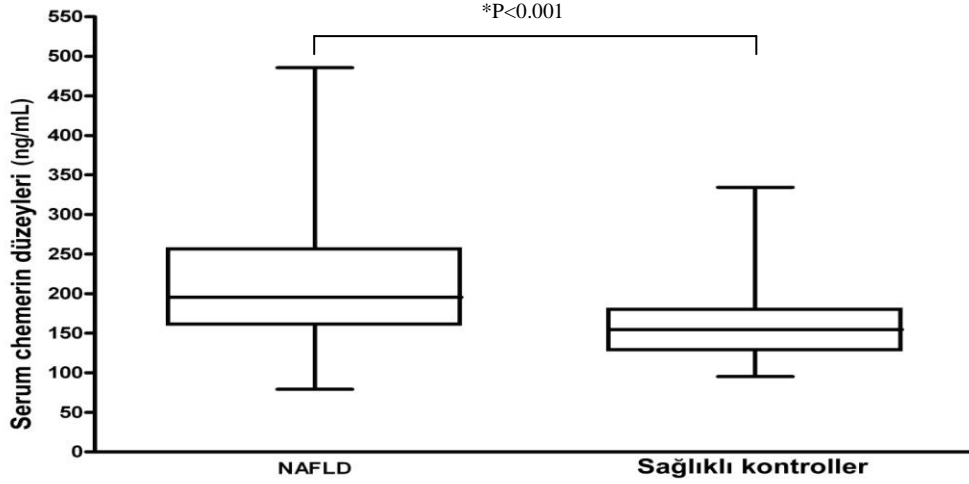
Adipsin düzeyleri hasta ve kontroller arasında farklılık göstermemektedir (Şekil 11.), oysa hem omentin (Şekil 12.) hem de chemerin düzeyleri (Şekil 13.) biyopsi kanıtlı NAFLD'lı hastalarda kontrollerden anlamlı olarak yüksek saptandı (her ikisi için de P değeri < 0.001).



Şekil 11. Hastalarda ve kontrollerde serum adipsin düzeyleri



Şekil 12. Hastalarda ve kontrollerde serum omentin düzeyleri



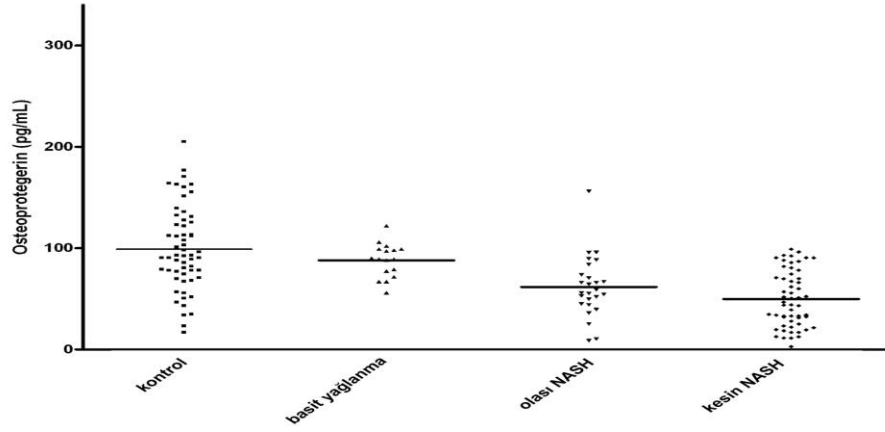
Şekil 13. Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde serum chemerin düzeyleri

Adipsin, herhangi bir klinik, biyokimyasal ve histolojik parametre ile anlamlı korelasyon göstermedi. Serum omentin düzeyleri anlamlı derecede CRP ($r = 0.29$, $P < 0.01$) ve hepatosit balonlaşma derecesi ($r = 0.27$, $P < 0.01$) ile ilişkilirken serum chemerin karaciğer fibrozisi ile orta derecede ilişki gösterdi ($r = 0.22$, $P = 0.04$). Seçilmiş adipokinler ile NASH skoru arasında bir ilişki saptanmadı ve bu moleküllerden hiçbiri basit yağlanma ve kesin NASH ayırımını yapamadı. Serum omentin seviyelerinin basamaklı lineer regresyon analizi ile yaş, cinsiyet, VKİ, DM, MS, HOMA-IR, kan basıncı, karaciğer enzimleri, lipid değerleri ve CRP ile ayarlama yapıldıktan sonra hastalardaki hepatosit balonlaşma derecesinin tek bağımsız prediktörü olduğu gösterildi ($\beta = 1.42$; $t = 2.79$, $P < 0.01$).

4.2. Osteoprotegerin

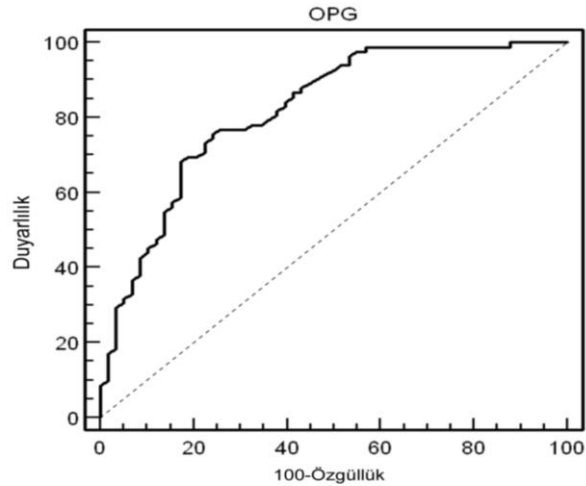
NAFLD spektrumundaki OPG düzeyleri Şekil 14.'de gösterilmiştir. Kruskal-Wallis testi serum OPG düzeylerinin dört çalışma grubu arasında anlamlı derecede farklı olduğunu gösterdi ($P < 0.001$). Spesifik olarak , Dunn'ın çoklu karşılaştırmalı post-hoc testi OPG değerlerinin kesin NASH grubunda (ortanca: 45 pg/mL, çeyrek değerler genişliği: 26–72 pg/mL $P < 0.001$) ve olası NASH grubunda (57 pg/mL, çeyrek değerler genişliği: 44–78 pg/mL , $P < 0.001$) kontrollerden (92 pg/mL, , çeyrek değerler genişliği:72–

126 pg/mL) anlamlı derecede düşük olduğunu gösterdi. Basit yağlanma (89 pg/mL, çeyrek değerler genişliği:74–99 pg/mL) ile kontroller arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 14. NAFLD spektrumunda ve kontrollerde serum osteoprotegerin düzeyleri (Kruskal-Wallis testi, $P < 0.001$)

OPG kullanılarak steatohepatit (kesin NASH + olası NASH) ve sağlıklı kontrol ayırımını yapan ROC eğrisi altında kalan alan 0.82 idi (Şekil 15.). OPG için eşik değer (cut-off) < 74 pg/mL kullanıldığında % 75.6 duyarlılık % 75.9 özgüllük ile ayırım sağlar.



Şekil 15. Steatohepatit (kesin + olası NASH) sağlıklı kontrol ayırımında osteoprotegerin kullanılarak oluşturulan ROC eğrisi

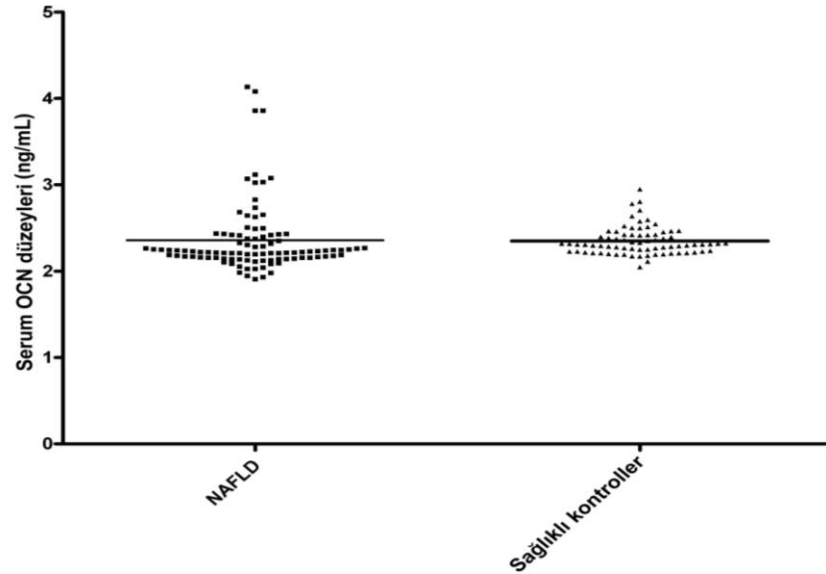
İki değişkenli analiz tüm çalışma kohortunda OPG düzeyleri ile insülin rezistansı arasında (HOMA-IR ile değerlendirildi) istatistiksel olarak anlamlı

bir ilişki ortaya çıkardı ($r = -0.35$, $P < 0.01$). Serum OPG düzeyleri kesin ve olası NASH'li hastalarda ALT ($r = -0.46$, $P < 0.001$) ve AST ($r = -0.44$, $P < 0.001$) ile anlamlı derecede ve ters bir ilişki içindeydi, ancak hastalığın evresi veya herhangi bir patolojik özelliği ile ilişkisi gözlenmedi.

Çok değişkenli lojistik regresyon analizi yapılarak serum OPG düzeyinin 74 pg/mL'nin altında olmasının potansiyel karıştırıcılar için ayarlama yapıldıktan sonra NASH'e bağımsız katkısı araştırıldı. Sonuçlar serum OPG düzeyinin 74 pg/mL altında olmasının bağımsız olarak NASH varlığı ile ilişkili olduğunu ortaya çıkardı (OR: 3.24, 95% CI: 1.95–4.33, $P < 0.001$).

4.3. Osteocalcin

Serum OCN seviyeleri NAFLD'lı hastalarda (ortanca 2.22 ng/mL; çeyrek değerler genişliği: 2.15–2.41 ng/mL) sağlıklı kontrollere (ortanca 2.30 ng/mL; çeyrek değerler genişliği: 2.22–2.42 ng/mL) göre anlamlı derecede düşük bulundu (Mann-Whitney U test, $P < 0.001$, Şekil 16.).



Şekil 16. NAFLD'lı hastalarda ve kontrollerde serum osteocalcin düzeyleri ($P < 0.001$)

Ardından serum OCN düzeyleri ile hastalığın klinik, biyokimyasal ve histolojik özellikleri arasındaki ilişki incelendi. NAFLD'lı hastalarda serum

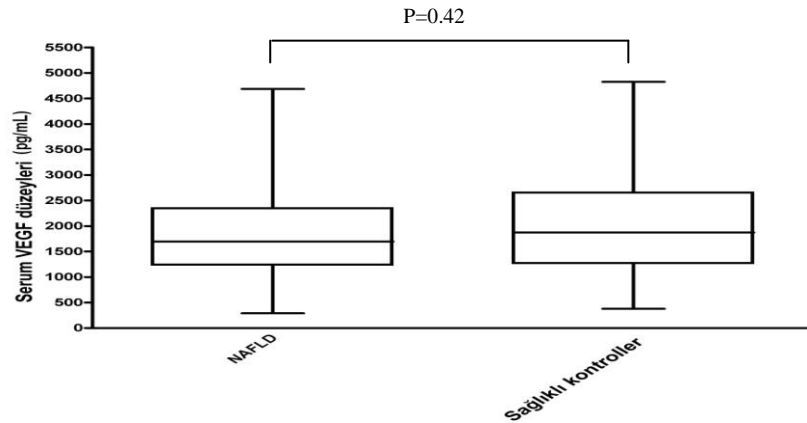
OCN düzeyi ALT ($r = -0.36$, $P < 0.001$), AST ($r = -0.39$, $P < 0.001$), HOMA-IR ($r = -0.30$, $P < 0.01$) ve hepatosit balonlaşma derecesi ($r = -0.20$, $P < 0.05$) ile ters ilişkili bulundu. Serum OCN düzeyi ile NASH skorları arasında herhangi bir ilişki saptanmadı, bu molekül basit yağlanma ile steatohepatit ayırımını yapamadı.

Serum OCN seviyelerinin basamaklı lineer regresyon analizi ile yaş, cinsiyet, VKİ, DM, MS, HOMA-IR, kan basıncı, karaciğer enzimleri, lipid değerleri ve CRP ile ayarlama yapıldıktan sonra hastalardaki hepatosit balonlaşma derecesinin tek bağımsız prediktörü olduğu gösterildi ($\beta = -0.24$; $t = -2.146$, $P < 0.05$).

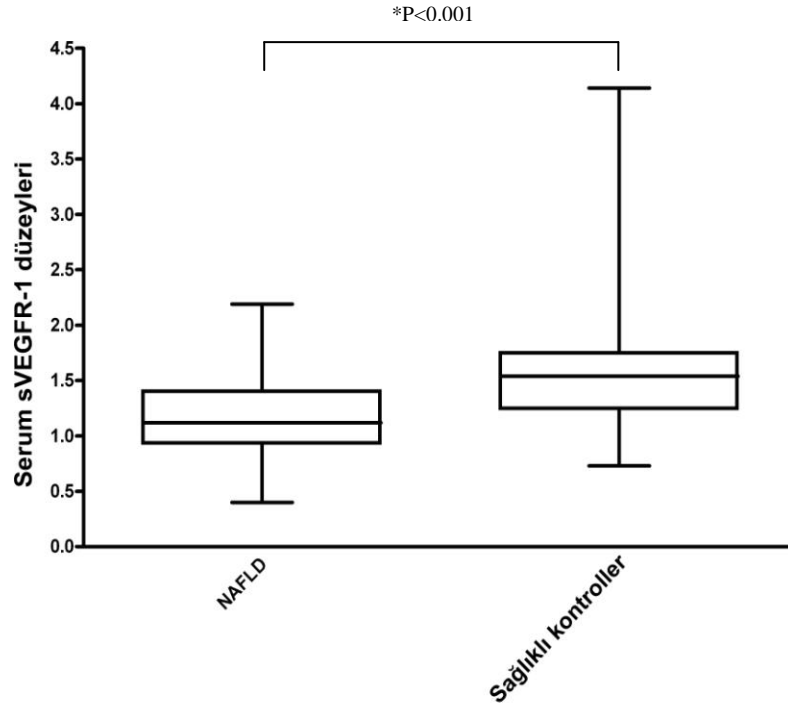
4.4. VEGF ve sVEGFR-1

Serum VEGF düzeyleri NAFLD'lı hastalarda (1882 ± 942 pg/mL) sağlıklı kontrollerden (1985 ± 945 pg/mL) farklılık göstermedi ($P = 0.42$, Şekil 17.).

Ancak, sağlıklı kontrollerle (1.59 ± 0.58 ng/mL) karşılaştırıldığında serum sVEGFR-1 düzeylerinin NAFLD'lı hastalarda (1.16 ± 0.34) anlamlı derecede daha düşük olduğu bulundu ($P < 0.001$, Şekil 18.).



Şekil 17. NAFLD'lı hastalarda ve kontrollerde serum VEGF düzeyleri



Şekil 18. NAFLD'lı hastalarda ve kontrollerde serum sVEGFR-1 düzeyleri

Sigara kullanımının etkisi ne VEGF ne de sVEGFR-1 serum düzeylerinde görüldü. Cinsiyete spesifik analizler sonucu değıştirmeydi. Serum VEGF ve sVEGFR-1'in klinik, biyokimyasal ve histolojik parametrelerle olan tek değışkenli korelasyon katsayıları değerdendirildi. NAFLD'lı hastalarda VEGF'nin herhangi bir parametre ile korelasyonu saptanmazken sVEGFR-1 düzeyleri HOMA-IR ($r = -0.26$, $P < 0.01$) ve karaciğer fibrozis derecesi ($r = -0.21$, $P < 0.05$) ile ters ilişkili bulundu. Serum VEGF ve sVEGFR-1 düzeyleri ile NASH skorları arasında herhangi bir ilişki bulunmadı, bu moleküllerin basit yağlanma-NASH ayırımını yapamadığı gözlemlendi. Serum sVEGFR-1 konsantrasyonlarının basamaklı lineer regresyon analizi ile yaş, cinsiyet, VKİ, DM, MS, HOMA-IR, kan basıncı, karaciğer enzimleri, lipid değerleri ve CRP ile ayarlama yapıldıktan sonra hastalardaki karaciğer fibrozisinin tek bağımsız prediktörü olduğu ortaya kondu ($\beta = -0.19$; $t = -1.81$, $P < 0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

5.1. Omentin, Chemerin ve Adipsin

Yeni adipokinlere ilişkin olarak bu tez; (a) biyopsi kanıtlı NAFLD'lı hastalarda serum omentin ve chemerin düzeylerinin (adipsin'de farklılık gözlenmedi) sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğunu, (b) Omentinin metabolik parametreleri de kapsayan potansiyel karıştırıcılardan bağımsız olarak hepatosit balonlaşmasını predikte ettiğini gösterdi.

NAFLD'lı hastalarda chemerin ile ilgili elde ettiğimiz bulgular Kukla ve ark.'nın pilot çalışmalarındaki bulgularının daha büyük bir hasta grubuyla doğrulanmasıdır (104). Morbid obezlerde chemerin ile VKİ, CRP ve HOMA-IR arasında pozitif ilişki saptayan Sell ve ark.'dan farklı olarak; bu tez çalışmasında bu parametrelerle chemerin arasında anlamlı bir ilişki bulamadık (105). Çalışma popülasyonlarımızın farklılığı bu tutarsızlığı en azından kısmen açıklayabilir. Her halükarda, bulgularımız NAFLD'lı hastalarda chemerin ile insülin rezistansı arasında bağımsız temel bir ilişkiyi desteklememiştir. Benzer şekilde, adipsin seviyeleri NAFLD'lı hastalarda değişiklik göstermedi, adipsin hastalarda herhangi bir klinik, biyokimyasal ve histolojik parametre ile korele bulunmadı. Çalışmamızın önemli bir bulgusu; omentin düzeylerinin NAFLD'lı hastalarda önemli derecede artış göstermesi ve hepatosit balonlaşma dejenerasyonu ile bağımsız biyokimyasal korelasyon göstermesiydi. Omentinin hepatosit balonlaşması ile pozitif korelasyonu bizim bilgimize göre şu ana kadar hiç bildirilmemiştir. Omentin düzeylerinin insülin rezistansı ve metabolik sendromun diğer özelliklerinden bağımsız bir şekilde hepatosit balonlaşması ile ters ilişkide olmasından dolayı, bu molekülün NAFLD gelişimi ve progresyonunda rol alabileceğini düşündürebilir. Hepatosit balonlaşması; büyüme, şişme, yuvarlaklaşma ve karakteristik ağsı sitoplazma ile karakterize balonlaşma dejenerasyonuna işaret eder (66). Balonlaşma, mikrotübüler bozulmanın yapısal delili olarak kabul edilir ve büyük ihtimalle litik nekroza giden hücreyi temsil eder (66). Genel olarak, serum omentin düzeyinin insülin rezistansı ve obezite ile negatif ilişkili olduğu düşünülmektedir (101,102). Bu gözlemler; omentin

düzeşinin NAFLD'lı hastalarda yüksek değil daha düşük olması gerektiğini düşünür. Ancak NAFLD'da bizim şu anda bilmediğimiz çeşitli dengeleyici mekanizmalarla omentin düzeyi regüle ediliyor olabilir, bu nedenle şu an kesin çıkarımlarda bulunmak doğru olmayabilir. Çalışmamızın çarpıcı bulgusu omentin seviyelerinin NAFLD'lı hastalarda artış göstermesidir. şu ana kadar literatürde NAFLD'da serum omentin düzeyine dair bir bilgi yoktur. Bu paradoksal ilişkinin nedenlerini ortaya çıkarabilecek ilave çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar bilhassa, omentin düzeylerinin NAFLD popülasyonunda hastalığın düşük insülin sekresyonu, yüksek insülin rezistansına karşı gelişen karşıt düzenleyici (counter-regulatory) mekanizmalardan dolayı daha yüksek olup olmadığını gösterebilecek şekilde dizayn edilmelidir (1).

5.2. Osteoprotegerin

Bu çalışmada, OPG konsantrasyonlarının NAFLD'ın daha şiddetli formlarında (kesin ve olası NASH) anlamlı derecede düşük olduğunu, bu düşüklüğün basit yağlanmada gözlenmediğini gösterdik. HOMA-IR ile ters bir ilişkinin yanısıra, iki değişkenli analiz OPG ile serum aminotransferazları arasında anlamlı bir ilişki ortaya çıkardı. Bu bulgular NAFLD'lı hastalardaki düşük OPG seviyelerinin sadece insülin rezistansının etkisini yansıtamayacağını, bundan başka yaygın karaciğer nekroinflamatuvar değişikliklerin de katkısını düşündürmektedir. Bulgularımızın tamamı, OPG düzeylerinin NAFLD'lı hastaların içinden ilerlemiş hastalığı olan NASH'i noninvaziv belirleyebilecek yararlı bir markır olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Eğer bağımsız olarak valide edilirse, bu markırın düzeyinin ölçülmesi NASH riski yüksek olan hastaların biyopsi için seçiminde kullanılabilir. OPG, belirgin antiinflamatuvar etkileri olan pleiotropik bir sitokindir (110). Ek olarak, insülin rezistansı ile ilişkilidir (114,115). Ayrıca kronik karaciğer hastalıklarında kemik mineral yoğunluğunun regülasyonunda rol oynadığı ileri sürülmektedir (138). Daha önce OPG düzeylerinin alkoliklerde kemik mineral yoğunluğunda azalma ile ilişkisiz olarak yükseldiğı gösterilmiştir (139,140). Ek olarak, serum OPG düzeyleri primer biliyer sirozlu

hastalarda yüksektir (141). Moschen ve ark., 193 tane kronik karaciğer hastasında yaptıkları bir çalışmada serum OPG seviyelerinin sirotik olmayanlarda 1.6 kat, sirotik hastalarda 2.8 kat arttığını göstermişlerdir (138). Alkolik steatohepatitli hastalardan elde edilen bulguların aksine, biz serum OPG seviyelerini NAFLD'ın daha ciddi formlarında yüksek değil daha düşük bulduk. OPG'nin NAFLD patogenezindeki biyolojik rolü nedir? OPG TRAIL için inhibitör (decoy) reseptör rolüne sahiptir, onun biyolojik etkilerini nötralize eder (110). İlginç olarak, TRAIL hepatositlerde apoptozisin önemli bir indüktörüdür (142). Hepatosit apoptozisinin basit yağlanmanın NASH'e progresyonunda çok önemli rolü olduğunu biliyoruz (4). Bütün bu bilgiler ışığında, NAFLD'da serum OPG düzeyinin azalmasının hepatosit apoptozisine karşı protektif mekanizmalarda defekte neden olabileceği hipotezi kurulabilir. Gerçekte, OPG birikiminin birçok hücre tipinde azalmış apoptozis ile korele olduğu bilinmektedir (110). Bizim çalışmamızda, serum OPG düzeyleri AST ve ALT ile negatif bir ilişki içindeydi. Bu ilişki merak uyandırıcıdır, çünkü NAFLD tanısındaki ilk ipucu sıklıkla ALT yüksekliğidir. Bu gözlemler OPG'nin NAFLD 'dan sorumlu fizyopatolojik değişiklikler üzerinde en az iki ayrı mekanizma ile (ilki insülin rezistansı, ikincisi hepatositleri apoptozisten koruyarak) genel koruyucu etki göstereceğini düşündürmektedir. Bütün bunlara rağmen, NAFLD'lı hastalarda OPG'nin azalmasının altında yatan asıl mekanizmanın ortaya çıkarılması için başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Serum OPG'nin hem hücresel kaynağının hem de sekresyon mekanizmalarının tam olarak aydınlatılamamış olmasından dolayı, NAFLD'lı hastalarda serum OPG'deki belirgin azalmanın üretim eksikliğini mi yoksa bu molekülün artmış tüketimini mi yansıttığı açık değildir.

5.3. Osteocalcin

Bu çalışma literatürde ilk kez olarak; (a) biyopsi kanıtlı NAFLD'lı hastalarda serum OCN konsantrasyonlarının eşleştirilmiş kontrollerden anlamlı derecede daha düşük olduğunu, (b) OCN konsantrasyonlarının NAFLD'lı hastalarda HOMA-IR, AST ve ALT ile ters ilişki gösterdiğini, (c) OCN seviyelerinin yaş, cinsiyet, VKİ, DM, MS, HOMA-IR, kan basıncı,

karaciğer enzimleri, lipid değerleri ve CRP'nin de dahil olduğu geniş bir potansiyel karıştırıcı spektrumu ile ayarlama yapıldıktan sonra hastalardaki hepatosit balonlaşma derecesi ile bağımsız ters ilişkide olduğunu ortaya koymuştur.

Diğer ilginç bir bulgu, hepatosit balonlaşma derecesi ile OCN arasında zayıf ancak anlamlı negatif bir korelasyon olmasıdır, bilgimize göre bu durum şu ana kadar hiç rapor edilmemiştir. Üstelik HOMA-IR'ı içeren potansiyel karıştırıcılarla ayarlama yapıldıktan sonra dahi, OCN hepatosit balonlaşma derecesi ile negatif ilişkili olarak kalmıştır. Çalışmamızda HOMA-IR ve OCN arasında gözlenen bu negatif ilişki daha önce de bildirilmiştir (123). Böylece kemik metabolizmasının insülin rezistansının regülasyonunda rol aldığı ileri sürülmüştür (143). OCN ve serum transaminazları arasında da bulduğumuz güçlü ters ilişki daha önce obez bireylerde yapılan bir çalışmada da saptanmıştır (125). Ancak kendi çalışmamız bu ilişkinin VKİ artışından bağımsız olduğu, henüz saptanamayan hepatosit hasarı ile ilişkili bazı faktörlerin bu durumu izah edebileceği ileri sürülebilir. OCN düzeylerinin hepatosit balonlaşması ile olan ters ilişkisinin insülin rezistansından ve metabolik sendromun diğer özelliklerinden bağımsız bir şekilde olması OCN'nin NAFLD gelişiminde ve progresyonunda rol alabileceği hipotezini ileri sürdürebilir. Hepatosit balonlaşması; hücrede büyüme, şişme, yuvarlaklaşma, karakteristik ağsı sitoplazma ile karakterize hepatosit dejenerasyonudur. Mikrotübüler bozulmanın yapısal delili olarak kabul edilir ve büyük ihtimalle litik nekroza giden hücreyi temsil eder (66). Serum AST ve ALT nasıl karaciğer hasarının göstergesi olarak kabul edilebiliyorsa bu çalışmayla elde edilen bulgularla serum OCN düzeyinin karaciğer hasarının ve özellikle litik nekrozun potansiyel biyobelirteci olma ihtimalinin bulunduğunu destekler. Ancak şunu da kabul etmek gerekir ki; kesitsel (cross-sectional) dizayn edilmiş bir çalışmadan elde edilen bulgularla nedensellik ilişkisi çıkarmaktan sakınılmalıdır.

5.4. VEGF ve sVEGFR-1

VEGF ve onun soluble reseptörü VEGFR-1'in kronik metabolik karaciğer hastalıklarının gelişmesindeki rolü açık değildir. Bu çalışmada, biyopsi kanıtlı NAFLD'lı hastalarda serum VEGF ve sVEGFR-1 ile hastalığın histolojik özellikleri ile klinik karakteristikleri arasında bir ilişki tanımladık. Bu tezde, literatürde ilk kez olarak, histolojik olarak kanıtlı NAFLD'lı hastaların yaş ve cinsiyet bakımından eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede daha düşük serum sVEGFR-1 konsantrasyonu bildirildi. Ek olarak, sVEGFR-1 düzeylerinin yaş, cinsiyet, VKİ, DM, MS, HOMA-IR, kan basıncı, karaciğer enzimleri, lipid değerleri ve CRP'yi içeren oldukça geniş potansiyel karıştırıcı spektrumu ile ayarlama yapıldıktan sonra da hastalardaki karaciğer fibrozisi ile ters ilişkisi bulundu. Bunun aksine, serum VEGF düzeyinde hastalarda herhangi bir değişiklik saptanmadı. Bunlardan başka biz aynı zamanda serum VEGF ve sVEGFR-1 düzeylerinin insülin direnci ile negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koyduk. sVEGFR-1'deki azalmanın pankreastaki adacık hücrelerindeki mikrovaskülaritede önemli ölçüde azalmayla sonuçlandığı gösterilmiştir (127). Bu bilgi insülin rezistansı ile sVEGFR-1 arasında bulduğumuz ters ilişkiyi açıklayabilir. Daha da ilginç olarak, serum sVEGFR-1 düzeyinin NAFLD'lı hastalarda karaciğer histolojisi ile olan ilişkisini ortaya koyduk. Düşük sVEGFR-1 düzeyleri fibrozisin fazla olduğunu işaret ediyordu. Düşük serum sVEGFR-1 seviyelerinin daha yüksek fibrozis evresi ile ilişkili olduğuna dair bulgumuz hepatotoksinlere bağlı oluşturulmuş fare modelinde karaciğer hasarı ile sVEGFR-1 arasındaki ilişkiyi yansıtır (144). İlginç olarak, Yoshiji ve ark. karaciğer stellat hücrelerinde VEGFR-1 ekspresyonunun fibrogenizde önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (145). VEGF düzeyinde değişiklik olmazken serum sVEGFR-1 düzeyinde azalma olması diğer VEGF-1 ligandlarının (VEGF'den başka) NAFLD patogenezinde rol alabileceğini düşündürmektedir. İlgi çekici bir şekilde, VEGF-B ve plasental büyüme faktörü (PIGF) VEGFR-1 için özel ligandlardır (146). İlginç olarak, PIGF^{-/-} fareler hiperinsülinemi, insülin direnci ve yüksek enerji deposu ile karakterizedir (147). Bunların tamamı NAFLD'lı hastalarda da bildirilmiştir. Gelecekteki çalışmalar yağlı karaciğer

hastalarında serum VEGF-B ve PlGF'nin düzeyini de araştırmalıdır. Daha önce de ifade ettiğimiz gibi, kesitsel çalışmalardan elde edilen bulgularla hemen bir neden sonuç ilişkisine varmak doğru değildir. Ancak bulgularımız da NAFLD'lı hastalarda azalmış sVEGFR-1 düzeylerinin karaciğer fibrozisi ile ilişkisini açıkça ortaya koymuştur. Jaroszewicz ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada bizim bulgularımızla uyumlu olmayacak şekilde sirozlu hastalarda plazma VEGF ve sVEGFR-1 seviyesi anlamlı derecede yüksek bulundu (148). Bu tutarsızlık belki hastaların etyolojilerinin farklılığından dolayı kaynaklanıyor olabilir. Gerçekten de, bahsedilen bu çalışmada hiç bir siroz hastasının etyolojisinde NASH yoktu.

5.5. Çalışmanın Kısıtlılıkları ve Yorum

Çalışmamızın kısıtlılıklarından bahsetmek kayda değer gibi gözükmektedir. İli, bu çalışma gözlenen ilişkilerin altında yatan mekanizmayı aydınlayabilecek şekilde dizayn edilmemiş olmasıdır. İkinisi, örneklemimizin göreceli de olsa az sayıda olması bulgularımızın genelleştirilmesini sınırlar. Uncs, alışma popülasyonumuzun sadece Türk'lerden ibaret olması nedeniyle, elde ettiğimiz bulgular diğer etnik gruplara genelleştirilemez. Özetle; biyopsi ile tanı koyduğumuz NAFLD'lı hastalarda aday biyomarkırlarla hastalığın histolojik özellikleri arasında birçok bağımsız ilişki ortaya çıkardık.

Bulgularımız aslında önümüzdeki bira yılda metabolik karaciğer hastalıklarının yaygın formlarının tanısında kullanılabilecek olan 'biyomarkır biyopsi'için mit verici gelişmelere neden olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S412-6.
2. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005;50:171-80.
3. Brunt EM. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2009;13:533-44.
4. Yilmaz Y, Kedrah AE, Ozdogan O. Cytokeratin-18 fragments and biomarkers of the metabolic syndrome in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2009;15:4387-91.
5. Yilmaz Y, Dolar E. Biomarkers for noninvasive biochemical diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis: tools or decorations? *World J Gastroenterol* 2009;15:4346-7.
6. Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:672-90.
7. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009;2009:831670.
8. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med*. 2009;9:299-314.
9. Goral V, Simsek M, Mete N. Hepatic osteodystrophy and liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1639-43.
10. Fernández-Real JM, Ortega F, Gómez-Ambrosi J, Salvador J, Frühbeck G, Ricart W. Circulating osteocalcin concentrations are associated with parameters of liver fat infiltration and increase in parallel to decreased liver enzymes after weight loss. *Osteoporos Int*. 2010 Mar 4. DOI: 10.1007/s00198-010-1174-9.

11. Wariaghli G, Mounach A, Achemlal L, Benbaghdadi I, Aouragh A, Bezza A, El Maghraoui A. Osteoporosis in chronic liver disease: a case-control study. *Rheumatol Int.* 2010;30:893-9.
12. Kitade M, Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kaji K, Shirai Y, Yamazaki M, Uemura M, Yamao J, Fujimoto M, Mitoro A, Toyohara M, Sawai M, Yoshida M, Morioka C, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Crosstalk between angiogenesis, cytokeratin-18, and insulin resistance in the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2009;15:5193-9.
13. Redaelli CA, Semela D, Carrick FE, Ledermann M, Candinas D, Sauter B, Dufour JF. Effect of vascular endothelial growth factor on functional recovery after hepatectomy in lean and obese mice. *J Hepatol* 2004 Feb;40:305-12.
14. Amarapurkar AD, Amarapurkar DN, Vibhav S, Patel ND. Angiogenesis in chronic liver disease. *Ann Hepatol* 2007;6:170-3.
15. Almeda-Valdés P, Cuevas-Ramos D, Aguilar-Salinas CA. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2009;8 Suppl 1:S18-24.
16. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
17. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009;8 Suppl 1:S4-8.
18. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:511-31.
19. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007;11:1-16.
20. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann MB, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:1236-43.

21. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1567-73.
22. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-73.
23. Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, Smircic Duvnjak L, Barsic N, Lerotic I. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60 Suppl 7:57-66.
24. Estep JM, Birerdinc A, Younossi Z. Non-invasive diagnostic tests for non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med* 2010;10:166-72.
25. Myers RP. Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2009;8 Suppl 1:S25-33.
26. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009;49:306-17.
27. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis*. 2008;28:386-95.
28. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115:141-50.
29. Björnsson E. The clinical aspects of non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2008;54:7-18.
30. Cortez-Pinto H, Camilo ME. Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): diagnosis and clinical course. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:1089-104.
31. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:145-71.

32. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis.* 2010;42:320-30.
33. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann MB, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:1236-43.
34. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1567-73.
35. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-73.
36. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008; 49:608-12.
37. Lizardi-Cervera J, Aguilar-Zapata D. Nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease. *Ann Hepatol* 2009;8 Suppl 1:S40-3.
38. Schindhelm RK, Diamant M, Heine RJ. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease risk. *Curr Diab Rep* 2007;7:181-7.
39. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007;191:235-40.
40. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:437-43.
41. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2729-35.

42. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial character of the second hit. *Hippokratia* 2009;13:128.
43. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2010;5:145-71.
44. Day CP. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:255-60.
45. Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genes and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Diab Rep* 2008;8:156-63.
46. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461-5.
47. Wang ZL, Xia B, Shrestha U, Jiang L, Ma CW, Chen Q, Chen H, Hu ZG. Correlation between adiponectin polymorphisms and non-alcoholic fatty liver disease with or without metabolic syndrome in Chinese population. *J Endocrinol Invest* 2008;31:1086-91.
48. Merriman RB, Aouizerat BE, Bass NM. Genetic influences in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40 Suppl 1:S30-3.
49. Musso G, Gambino R, Cassader M. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:76-83.
50. Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulcier AM, Naveau S. Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:458-69.
51. Ariz U, Mato JM, Lu SC, Martínez Chantar ML. Nonalcoholic steatohepatitis, animal models, and biomarkers: what is new? *Methods Mol Biol* 2010;593:109-36.
52. Takitani K, Miyazaki H, Yoden A, Tamai H. Children's toxicology from bench to bed--Liver Injury (2): Mechanism of antioxidant therapy for

- nonalcoholic fatty liver disease. *J Toxicol Sci* 2009;34 Suppl 2:SP223-8.
53. Lickteig AJ, Fisher CD, Augustine LM, Cherrington NJ. Genes of the antioxidant response undergo upregulation in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Biochem Mol Toxicol* 2007;21:216-20.
 54. Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:672-90.
 55. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Ryzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-94.
 56. Borst SE, Conover CF. High-fat diet induces increased tissue expression of TNF- α . *Life Sci* 2005;77:2156-65.
 57. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3023-8.
 58. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006;6:1-28.
 59. Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Romano AD, Giudetti AM, Capitanio N, Petrella A, Vendemiale G, Altomare E. Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Eur J Clin Invest* 2008;38:245-52.
 60. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis* 2004;8:639-71, xi.
 61. Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA,

- McConnell JM, Byrne CD. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* 2009;50:1796-808.
62. Straub BK, Schirmacher P. Pathology and biopsy assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:197-202.
 63. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:503-22.
 64. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:202-8.
 65. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008;48:792-8.
 66. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol* 2008;48:821-8.
 67. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:195-203.
 68. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic stetaohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
 69. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
 70. Estep JM, Birerdinc A, Younossi Z. Non-invasive diagnostic tests for non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med* 2010;10:166-72.

71. Myers RP. Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2009;8 Suppl 1:S25-33.
72. Sullivan S. Implications of diet on nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:160-4.
73. Quercioli A, Montecucco F, Mach F. Update on the treatments of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009;9:261-70.
74. Pillai AA, Rinella ME. Non-alcoholic fatty liver disease: is bariatric surgery the answer? *Clin Liver Dis* 2009;13:689-710.
75. Kiyici M, Gulten M, Gurel S, Nak SG, Dolar E, Savci G, Adim SB, Yerci O, Memik F. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2003;17:713-18.
76. Hyogo G, Tazuma S, Arihiro K, Iwamoto K, Nabeshima Y, Inoue M, Ishitobi T, Nonaka M, Chayama K. Efficacy of atorvastatin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with dyslipidemia. *Metabolism* 2008;12-1711-8.
77. Nelson A, Torres DM, Morgan AE, Fincke C, Harrison SA. A pilot study using simvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: A randomized placebo-controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2009;10:990-4.
78. Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T; LIDO study group. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology* 2010;2:445-53.
79. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KY, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-85.
80. Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008;28:396-406.

81. Sanal MG. The blind men 'see'the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:831-44.
82. Yilmaz Y, Ulukaya E, Dolar E. A "biomarker biopsy" for the diagnosis of NASH: promises from CK-18 fragments. *Obes Surg* 2008;18:1507-8.
83. Cook NR. Statistical evaluation of prognostic versus diagnostic models: beyond the ROC curve. *Clin Chem* 2008;54:17-23.
84. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-56.
85. Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol* 2010;318:69-78.
86. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009;50:957-69.
87. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009;54:1847-56.
88. Moran O, Phillip M. Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects--a review. *Pediatr Diabetes* 2003;4:101-9.
89. Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab* 2008;10:973-93.
90. Blüher S, Mantzoros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* 2009;89:991S-997S.
91. Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2005;11:4822-6.
92. Chiarugi P, Fiaschi T. Adiponectin in health and diseases: from metabolic syndrome to tissue regeneration. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:193-206.
93. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 2008;43:811-22.
94. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004;40:177-84.

95. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
96. Barnes KM, Miner JL. Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr Protein Pept Sci* 2009;10:96-107.
97. McTernan PG, Kusminski CM, Kumar S. Resistin. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:170-5.
98. Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004;255:439-47.
99. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1128-36.
100. Schäffler A, Neumeier M, Herfarth H, Fürst A, Schölmerich J, Büchler C. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 2005;1732:96-102.
101. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E1253-61.
102. de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, Ndubuizu K, Patil S, Schwartz A, Kligman M, Fried SK, Gong DW, Shuldiner AR, Pollin TI, McLenithan JC. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 2007;56:1655-61.
103. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2010;doi:10.1016/j.tem.2010.08.001.
104. Kukla M, Zwirska-Korcza K, Hartleb M, Waluga M, Chwist A, Kajor M, Ciupinska-Kajor M, Berdowska A, Wozniak-Grygiel E, Buldak R.

- Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:235-42.
105. Sell H, Divoux A, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Bedossa P, Tordjman J, Eckel J, Clément K. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2892-6.
 106. Cianflone K, Maslowska M, Sniderman A. The acylation stimulating protein-adipsin system. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995 May;19 Suppl 1:S34-8.
 107. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911-9.
 108. Goralski KB, Sinal CJ. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: getting to the fat of the matter. *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85:113-32.
 109. D'Amelio P, Isaia G, Isaia GC. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *J Endocrinol Invest* 2009;32(4 Suppl):6-9.
 110. Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol* 2009;88:1-17.
 111. Chamoux E, Houde N, L'Eriger K, Roux S. Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. *J Cell Physiol*. 2008;216:536-42.
 112. Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 - the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:1103-9
 113. Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 2005;10:3093-9.
 114. Ugur-Altun B, Altun A, Gerenli M, Tugrul A. The relationship between insulin resistance assessed by HOMA-IR and serum osteoprotegerin levels in obesity. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68:217-22.

115. Ugur-Altun B, Altun A. Circulating leptin and osteoprotegerin levels affect insulin resistance in healthy premenopausal obese women. *Arch Med Res* 2007;38:891-6.
116. An JJ, Han DH, Kim DM, Kim SH, Rhee Y, Lee EJ, Lim SK. Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue. *Yonsei Med J* 2007;48:765-72.
117. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37:432-6.
118. Kim YS, Paik IY, Rhie YJ, Suh SH. Integrative physiology: defined novel metabolic roles of osteocalcin. *J Korean Med Sci* 2010;25:985-91.
119. Fernandez-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:237-45.
120. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:827-32.
121. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellström D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 2009;24:785-91.
122. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:45-9.
123. Saleem U, Mosley Jr TH, Kullo IJ. Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1474-8.

124. Szalay F, Lakatos P, Németh J, Abonyi M, Büki B, Tarján G, Holló I. Decreased serum osteocalcin level in non-alcoholic and alcoholic chronic liver diseases. *Orv Hetil* 1991;132:1301-5.
125. Fernández-Real JM, Ortega F, Gómez-Ambrosi J, Salvador J, Frühbeck G, Ricart W. Circulating osteocalcin concentrations are associated with parameters of liver fat infiltration and increase in parallel to decreased liver enzymes after weight loss. *Osteoporos Int* 2010;doi:10.1007/s00198-010-1174-9.
126. Sung HK, Michael IP, Nagy A. Multifaceted role of vascular endothelial growth factor signaling in adult tissue physiology: an emerging concept with clinical implications. *Curr Opin Hematol* 2010;17:206-12.
127. Watada H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J* 2010;57:185–191.
128. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* 2006;55:2974-85.
129. Makino N, Maeda T, Sugano M, Satoh S, Watanabe R, Abe N. High serum TNF-alpha level in type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2005;19:347-55.
130. Lim HS, Blann AD, Chong AY, Freestone B, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in diabetes: implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes Care* 2004;27:2918-24.
131. Barylski M, Kowalczyk E, Banach M, Cieciewicz J, Pawlicki L, Kowalski J. Plasma total antioxidant activity in comparison with plasma NO and VEGF levels in patients with metabolic syndrome. *Angiology* 2009;60:87-92.

132. Wada H, Satoh N, Kitaoka S, Ono K, Morimoto T, Kawamura T, Nakano T, Fujita M, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K. Soluble VEGF receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance. *Atherosclerosis* 2010;208:512-7.
133. Amarapurkar AD, Amarapurkar DN, Vibhav S, Patel ND. Angiogenesis in chronic liver disease. *Ann Hepatol* 2007;6:170-3.
134. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
135. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 2009;61:915-22.
136. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890-3.
137. ACE/ADA Task Force on Inpatient Diabetes. American College of Endocrinology and American Diabetes Association Consensus statement on inpatient diabetes and glycemic control. *Diabetes Care* 2006;29:1955-62.
138. Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, Millonig G, Kaser S, Mühllechner P, Habior A, Graziadei I, Vogel W, Tilg H. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 2005;43:973-83.
139. Fábrega E, Orive A, García-Suarez C, García-Unzueta M, Antonio Amado J, Pons-Romero F. Osteoprotegerin and RANKL in alcoholic liver cirrhosis. *Liver Int* 2005;25:305-10.
140. García-Valdecasas-Campelo E, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, De la Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sánchez-Pérez MJ, Martínez-Riera A, Gómez-Rodríguez Mde L. Serum osteoprotegerin and RANKL levels in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 2006;41:261-6.
141. Szalay F, Hegedus D, Lakatos PL, Tornai I, Bajnok E, Dunkel K, Lakatos P. High serum osteoprotegerin and low RANKL in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:395-400.

142. Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:491-508.
143. Kassi E, Papavassiliou AG. A possible role of osteocalcin in the regulation of insulin secretion: human in vivo evidence? *J Endocrinol* 2008;199:151-3.
144. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890-3.
145. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003;52:1347-54.
146. Cao Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci Signal* 2009;2:re1.
147. Hemmeryckx B, van Bree R, Van Hoef B, Vercruyse L, Lijnen HR, Verhaeghe J. Adverse adipose phenotype and hyperinsulinemia in gravid mice deficient in placental growth factor. *Endocrinology* 2008;149:2176-83.
148. Jaroszewicz J, Januszkiewicz M, Flisiak R, Rogalska M, Kalinowska A, Wierzbicka I. Circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients with liver cirrhosis: possible association with hepatic function impairment. *Cytokine* 2008;44:14-17.