

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ



**LİZOMAL ASİT LİPAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN NON ALKOLİK
STEATOHEPATİT ETYOPATOGENEZİNDE ROLÜ OLABİLİR Mİ?**

DR. EMRULLAH DENGESİK

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

2015

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

LİZOZOMAL ASİT LİPAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN NON ALKOLİK
STEATOHEPATİT ETYOPATOGENEZİNDE ROLÜ OLABİLİR Mİ?

DR. EMRULLAH DENGESİK

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI DOÇ. DR. ALTAY ÇELEBİ

KOU KAEK 2014/343

2015

TEŞEKKÜR

Bu tezin her aŐamasında bana her zaman yardımcı olan ve değerli gürüŐ ve önerileriyle bana ıŐık tutan ayrıca tecrübe ve bilgi birikimiyle bana destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Altay Çelebi'ye en samimi ve içten duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim süresince değerli katkılarıyla bana yardımcı olan başta sayın Rektörümüz ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Saadettin Hülagü'ye ve tüm değerli hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bana yardım eden İç Hastalıkları'daki doktor arkadaşlarıma, Gastroenteroloji B.D. çalışanlarına, uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktor arkadaşlarıma ve diğer yardımcı personellere teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her türlü zahmet ve sıkıntılarında bana yardım eden ve hiçbir zaman haklarını ödeyemeyeceğim başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi dile getiriyor ve sevgilerimi gönderiyorum.

Bana hayat sevinci ve mutluluk kaynağı olan ve her türlü hayat mücadelesinde ruhuma dayanak olan çok sevdiğim biricik ve çok değerli eşim ve oğluma sonsuz sevgilerimi iletiyorum.

KISALTMALAR

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı: NAFLD
Lizozomal Asit Lipaz yetmezliği: LAL-D
Non alkolik steatohepatit: NASH
Hepatoselüler karsinoma: HCC
Real-time polymerase chain reaction: RT-PCR
High pressure liquid chromatography: HPLC
Homeostasis model assessment-insulin resistans: HOMA-IR
The European Association for the Study of the Liver: EASL
Diabetes Mellitus: DM
Alanin aminotransferaz: ALT
Aspartat aminotransferaz: AST
High density lipoprotein: HDL
Low density lipoprotein: LDL
Metilentetrahidrofolik asit redüktaz: MTHFR
Vücut kitle indeksi: VKİ
Ultrasonografi: US
Bilgisayarlı Tomografi: BT
Total parenteral nütrisyon: TPN
Apolipoprotein C3: APOC3
Patatin-benzeri fosfolipaz 3: PNPLA3
Tümör nekrozis faktör: TNF
Serbest yağ asitleri: SYA
Lipit peroksidasyonu: LP
Açlık kaynaklı adiposit faktörü: Fiaf
Toll like reseptörler: TLR
Transyağ asitleri: TFAS
Alkalen fosfataz: ALP
 γ -glutamiltransferaz: GGT
Manyetik rezonans: MR
Stres sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1: SREBP-1
Deoksiribonükleik asit: DNA

Çok düşük yoğunluklu lipoprotein: VLDL
C reaktif protein: CRP
Hidroksimetilglutaril-koenzim A: (HMG-CoA)
Açıl kolesterol açıl transferaz: (ACAT)
Highly Active Anti-Retroviral Therapy: HAART
Plasma cell membrane glycoprotein-1: (PC-1)
Ani nükeer antikor: ANA
AMA: Anti mitokondriyal antikor
HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni
HCV: Hepatit C virüsü
Lipase A, Lysosomal acid, Cholesterol esterase: LIPA
İnsülin reseptör substrat-1: IRS-1
Enzim replasman tedavisi: ERT

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	3
2.2. Non Alkolik Steatohepatit	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Etiyoloji	5
2.5. Patogenez.....	7
2.9. NAYKH'da Görüntüleme	12
2.10. NAYKH Tanısı	12
2.11. NAYKH'da Non İnvaziv Fibrozis Belirteçleri	15
2.12. NAYKH'da Doğal Seyir	15
2.13. Lizozomal Asit Lipaz Enzim Aktivitesi Ve Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	16
2.14. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği Patogenezi	17
2.15. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği Belirti Ve Bulguları	19
2.16. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği'ni Tarama Algoritması.....	21
2.17. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği'nde Enzim Replasman Tedavisi	22
2.18. Lizozomal Asit Lipaz Enzim Eksikliğinde Prognoz.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Numune Toplanması	25
3.2. Materyal-Metod.....	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ.....	40
7. ÖZET	41
8. ABSTRACT	43
9. KAYNAKLAR.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. NASH patogenezinde çift vuru (two-hit) hipotezi	7
Şekil 2. Çoklu paralel darbe modeli	9
Şekil 3. Hücresel kolesterol homeostazisinin şematik gösterimi	18
Şekil 4. Lizozomal Asit Lipaz Tarama Algoritması	21
Şekil 5. LAL enzim aktivitesinin LYM düzeyiyle karşılaştırılması	29
Şekil 6. NASH ve kontrol grubunda LAL aktivitesine göre olgu sayıları.....	30
Şekil 7. NASH grubunda LAL aktivitesine göre dağılım.....	30
Şekil 8. Kontrol grubunda LAL aktivitesine göre dağılım	31
Şekil 9. NASH hastalarının biyopsilerinin steatoz derecelerine göre dağılımı	31
Şekil 10. NASH grubunda LAL aktivitesine göre grade	32
Şekil 11. NASH grubunda LAL aktivitesine göre stage.....	33
Şekil 12. LAL enzim aktivitesinin PCT düzeyiyle karşılaştırılması	34
Şekil 13. LAL enzim aktivitesinin PLT düzeyiyle karşılaştırılması	34
Şekil 14. LAL enzim aktivitesinin biyopsideki steatoz yüzdesiyle karşılaştırılması	35
Şekil 15. LAL enzim aktivitesinin VLDL düzeyiyle karşılaştırılması	36

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Alkole bağı olmayan yağlı karaciğer hastalığının nedenleri	6
Tablo 2. NASH için Brunt tarafından önerilen skorlama sistemi	12
Tablo 3. İlerlemiş Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı için risk faktörleri.....	14
Tablo 4. NASH' ın histopatolojik olarak değerlendirilmesinde Brunt ve arkadaşları	14
tarafından önerilen sistem yaygın olarak kullanılmaktadır	14
Tablo 5. Lizozomal Asit Lipaz eksikliğinde çocuk ve yetişkinlerde görülen klinik belirti ve bulgular, serum belirteçleri ve karaciğer biyopsisi bulguları	20
Tablo 6. NASH ve kontrol grubunun antropometrik verileri	26
Tablo 7. NASH ve kontrol grubunun Hemogram parametrelerinin karşılaştırılması	26
Tablo 8. NASH ve kontrol grubunun laboratuvar verileri.....	27

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, NAYKH) hafif karaciğer yağlanması, yaygın karaciğer yağlanmasına, nonalkolik steatohepatit (NASH), karaciğer fibrozisi, hepatoselüler karsinom (HCC) ve siroza kadar ilerleyebilen bir yelpazeyi kapsamaktadır(1-3). NAYKH gelişmiş ülkelerde görülen en yaygın kronik karaciğer hastalığıdır. Alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalığı iki ana bölümden oluşur. Bir bölümü inflamatuvar süreç ve fibrozisin eşlik etmediği basit yağlı karaciğer hastalığı, diğer bölümü ise yağlanma ve nekroinflamatuvar sürecin rol aldığı NASH tablosudur. NASH sıklığı genel popülasyonda %2-3, obezlerde %20-30 ve morbid obezlerde %50'ye ulaşabilir (4-6). Nonalkolik steatohepatit günde 10-20 gramdan daha az alkol tüketimi olan hastalarda oluşan ve karaciğerde yaygın yağlanma ile beraber inflamatuvar süreçle karakterize olan bir tablodur. Nonalkolik steatohepatit NAYKH içinde bir alt grup olarak kabul edilir.

Hastalarda nonalkolik yağlı karaciğer hastalığından siroz veya NASH'a kadar geçen süreç aynı şekilde seyretmemektedir. NAYKH tanısı anında bile birçok hastada kronik karaciğer hasarı ve hatta bazen siroz tablosu gözlenebilmektedir. Bu durum bazı hastalarda tablonun sessiz ve hızlı ilerleyiş gösterdiğini düşündürmektedir. NAYKH tanısı alan hastalarda NASH gelişiminin erkenden tespit edilmesi ve tedavi edilmesi, siroz ve komplikasyonlarının oluşumunu engelleyebilir veya geciktirebilir. Basit yağlanmada 10-20 yıl üzerinde bir süre zarfında siroz gelişme riski %4'ün altındadır. NASH tablosunda ise beş yıl içinde %5-8 oranında siroz gelişebilir ve tüm hastalar içinde siroza ilerleme oranı %20' ye ulaşabilir (6). Son yayınlarda NASH hastalarında HCC geliştiği ve bazı hastalarda siroz gelişmeden HCC geliştiği bildirilmiştir.

İsveç'de NAYKH tanılı hastaların genel popülasyonla karşılaştırıldığı bir çalışmada, NASH tanılı hastalarda sağkalımının anlamlı derecede düşük olduğu ve sıklıkla kardiyovasküler ve karaciğer ile ilişkili nedenlerle kaybedildiği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada NAYKH tanılı hastaların çoğunda uzun zaman sonra bozulmuş glukoz toleransı ve diyabet gelişebileceği gösterilmiştir. Kilo artışı ve insülin direnci ile karaciğer fibrozisi arasında da belirgin bir ilişki olduğu gösterilmiştir (7).

Yine İsveç'te yapılmış NAFLD tanılı hastalarda 28 yıl süren çalışma sonunda aynı cinsiyet ve benzer yaş grupları karşılaştırıldığında ölüm oranının hafif derecede yüksek olduğu, fakat NASH tanılı hastalarda ise mortalitenin anlamlı ölçüde yüksek olduğu ve üçüncü en sık ölüm nedeni olarak karaciğerle ilgili hastalıkların rol oynadığı gösterilmiştir (8).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının gidişatını öngörmeye nekroinflamasyon ve fibrozis derecesinin bilinmesi önemlidir ve bu değerlendirmede altın standart yöntem karaciğer biyopsisidir. Karaciğer biyopsisi bazı riskleri olan invaziv bir yöntemdir. Karaciğerin non-invaziv olarak değerlendirildiği biyokimyasal (AST/ALT oranı, hipalbuminemi, hiperbilirubinemi), radyolojik (bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR), ultrasonografi (USG), biyolojik belirteçler (CRP, fibrotest, sitokin ve adipokinler, genetik testler (PNPLA3, APOC3) gibi yeni yöntemler geliştirilmiştir (9-11).

Avrupa Karaciğer Araştırmaları Derneği (The European Association for the Study of the Liver, EASL) ileri fibrozis şüphesi olan hastalara karaciğer biyopsisi yapılmasını önermektedir. Ayrıca diğer otoriteler NASH tanısı koymak için güçlü noninvaziv belirleyicilerin olmadığı ve ileri yaş, diyabet, obezite ve metabolik sendrom gibi ileri fibrozis risk faktörleri olan hastalara karaciğer biyopsisi yapmanın uygun seçenek olduğunu ileri sürmektedirler. Ancak, yaşam tarzı değişikliği, kilo verme ve mevcut insülin direncini kırma potansiyeli olan, karaciğer enzimleri ve noninvaziv belirteçlerde iyileşme tespit edilen hastalarda ise biyopsiden kaçınmayı önermektedir (10).

NASH'ın önemli nedenleri arasında; obezite, tip 2 diyabetes mellitus (DM) ve hiperlipidemi bulunmaktadır. Günümüzde epidemik bir sağlık sorunu haline gelen obezite NASH'ın bilinen en önemli nedenidir (12).

Bu etiyolojik faktörler bilinmekle beraber NASH tablosu etiyopatogenetik olarak henüz aydınlatılamamıştır. Lizozomal Asit Lipaz NASH benzeri histopatolojik ve klinik özelliklere sahiptir. Literatürde, Nonalkolik steatohepatit ile Lizozomal Asit Lipaz enzim aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmayı hedeflemiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada esas olarak Lizozomal Asit Lipaz enzim aktivitesi ile NASH arasındaki ilişkinin araştırılması ve NASH tablosunda Lizozomal Asit Lipaz enzim aktivite düzeyinin rol alıp almadığı hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) kadınlarda 10gr/gün, erkeklerde ise 20gr/gün üstünde alkol tüketimi olmaksızın karaciğerde oluşan yağlanma tablosu olarak adlandırılan özellikle makroveziküler yağlanmanın ön planda olduğu bir hastalıktır (2,13). Yine NAYKH inflamasyon ve fibrozis tablosunun olmadığı hepatositlerde yağlı birikimden ibaret olan basit yağlanmadan, inflamasyon ve fibrozisin eşlik ettiği steatohepatit tablosundan ve siroz tablosuna kadar gidebilen geniş bir histopatolojik yelpazedir (1,13). Hepatositlerde histolojik olarak %5'in üzerinde yağlanma olması karaciğerde yağlanma olarak adlandırılır, hepatositlerde %33'ün altında yağlanma olması hafif, %66'ın üstünde yağlanma olması ise ciddi yağlanma olarak adlandırılır (14).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, insülin direnci, visseral obezite, dislipidemi, diyabet, hipertansiyon gibi risk faktörlerine sahip olan kişilerde sık görülür, ayrıca NAYKH metabolik sendromun hepatic bir belirtisi olarak kabul edilir (15,16). İnsülin direnci ve sitokinler yağlanma ve steatohepatite neden olan ana faktörlerdir (17,18). Diyabet, dislipidemi ve obezite en önemli nedenlerdir (19,20).

Vücut kitle indeksi ile orantılı olarak NAYKH riski artar (21). Dünya çapında gittikçe artan bir sağlık problemi olan NAYKH prevalansı batı ülkelerinde %20-40 olarak tespit edilmiştir (22,23,24).

Genel popülasyon taramalarında USG veya BT ile yapılan çalışmalarda NAYKH sıklığının %15 ile %39 arasında değişen oranlarda olduğu bildirilmiştir (25,26). VKİ, 30 kg/m² ve üzerinde olanlarda NAYKH sıklığı %60-95, tip 2 diyabetiklerde %28-55 ve hiperlipidemisi olanlarda %20-92 olarak bildirilmiştir (1,27,28).

2.2. Non Alkolik Steatohepatit

Karaciğerde yağlanma ile beraber hepatositlerde baloni dejenerasyonu, mallory cisimcikleri, iltihabi infiltrasyon ile giden ve histopatolojik olarak alkole bağlı steatohepatitten ayrılamayan kronik bir karaciğer hastalığıdır. NAYKH içinde bir alt grup olarak kabul edilebilir. NAYKH basit yağlanmadan, steatohepatit ve fibrozis ile beraber karaciğer sirozuna kadar gidebilen bir tablodur. Obezite ve diyabet sıklığındaki artışa bağlı

olarak sıklığı dramatik şekilde artmıştır (29,30). Batı toplumlarında karaciğer hastalıklarının en sık sebebi olmuştur (31).

Nonalkolik steatohepatit terimi ilk kez 1980 yılında, Mayo klinikte nonalkoliklerle benzer histolojik bulgulara sahip bir hasta grubunda Ludwig ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Ludwig ve arkadaşları bu çalışmalarında nonalkolik steatohepatiti; “karaciğer biyopsisinde belirgin yağlanma, lobüler hepatit, fokal nekroz, miks tipte iltihabi infiltrasyon bulguları, çoğu hastada Mallory cisimcikleri ve fibrozis bulunan, sıklıkla orta yaşlı ve obez, tip 2 diyabetlilerde ve kadınlarda görülen bir durum” şeklinde ifade etmişlerdir (28).

2.3. Epidemiyoloji

NASH'ın kesin prevalansı; hastalığın sessiz seyri, yavaş ilerlemesi, tanı ve sonrasında biyopsi yapılmaması ve tanı noktasında tam bir görüş birliğinin olmaması nedeniyle tam olarak bilinmemektedir. Ancak obezite, diyabet ve metabolik sendromun artış göstermesi nedeni ile NAYKH kronik karaciğer hastalığının en sık sebebi olmuştur (32-34).

Japonlarda alkol kullanmayanlar arasında %14'lük genel prevalans mevcuttur (35). Amerika Birleşik Devletleri'nde muhtemelen karaciğer enzim yüksekliğinin en sık nedeni NASH'dır. 2004 yılında yapılan bir kohort çalışmada ABD halkında %34 oranında karaciğerde aşırı yağlanma olduğu saptanmıştır (36). Batı toplumunda NAYKH prevalansı %20-30 arasında değişmektedir ve bu oran morbid obezlerde %90'a ulaşmaktadır (37-39). NAFLD yelpazesi içinde klinik önemi ve ciddiyeti daha fazla olan NASH tablosu nadir ve genel popülasyonun %2-3'ünü oluşturur (15) ve morbid obezlerde ise %37 oranındadır (39,40). Bu tablo ürkütücüdür çünkü NASH; siroz, karaciğer yetmezliği ve HCC'ye kadar ilerleyebilir.

Yine ABD'de yapılan ve karaciğer enzim yüksekliği olup da hepatit ve otoimmün belirteçleri negatif olan 81 hastanın 26'sında yani %32'sinde steatohepatit tespit edilmiş. Hastaların dördünde fibrozis varken, iki hastada siroz görülmüştür (41). NASH diyabet, hiperlipidemi, hipertansiyon ve obezite ile ilişkilidir ve bu tablolar insülin direnci ile ilişkili olup insülin direnci sendromu olarak adlandırılır (20). NASH tanısı alan hastalarda %40-100 obezite, %21-75 diyabet ve %21-83 hiperlipidemi görülmektedir (42). Ancak

NASH bu risk faktörleri olmayan zayıf kişilerde de olabilir (43). Çocuklar dahil olmak üzere NASH tüm yaş gruplarında görülebilir (44,45).

2.4. Etiyoloji

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının etiyolojisinde bir çok ajan ve sebebin olduğu bilinmektedir. İlaç ve toksinler bir grup, metabolik bozukluklar diğer bir grup olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. NAYKH ile obezite birlikteliği sıktır. Özellikle son otuz yıllık bir sürede obezite oranı giderek artmıştır ve buna paralel olarak çocuk ve erişkin nüfusta NAYKH oranları artmaktadır. Morbid obez olanlarda NAYKH oranı %90'lara çıkmaktadır ve bu hastalarda NASH oranı %9-40 arasındadır. Birkaç çalışmada beden kitle indeksi ile karaciğer hasarı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (46-48).

Karaciğer yağlanması vücut total yağ oranından ziyade vücuttaki yağ dağılımı daha önemlidir. Yapılan çalışmalarda bel-kalça oranı ve metabolik sendromun NAYKH ile korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur. Bundan dolayı batın içi ve visseral yağlanma NAYKH'da belirleyici rol alır (49).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı obezite olmaksızın Tip-2 Diabetes Mellitus ve glukoz intoleransı ile güçlü bir korelasyon gösterir (50). Nonalkolik steatohepatit tanı hastalarda Tip-2 Diabetes Mellitus ve glukoz intoleransı oranı %20-70 olarak saptanmıştır ve diyabetik hastalarda NASH oranı olmayanlara göre iki kat daha fazla görülür. Bir önemli husus da diyabetik hastalarda NAYKH varlığının kardiyovasküler hastalık riskini arttırabileceğidir (51).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı; bozulmuş glukoz toleransı olmayan zayıf hastalarda hiperinsülinemi ve insülin direnci ile ilişkilidir (52). Diyabet; siroz ve HCC gibi NAYKH'nın ilerlemiş tablolarının belirleyicisi olabilir (53). Yine NAYKH'da hiperlipidemi önemli yer tutar. Dallas Heart Study adlı bir çalışmada hiperlipidemili hastalarda %60 oranında NAYKH tespit edilmiştir ve NAYKH'lı kişilerde de önemli oranda hiperlipidemi saptanmıştır (54).

Kore'de yapılan başka bir çalışmada NAYKH riski hiperlipidemili hastalarda, hiperlipidemi olmayanlara oranla iki kat fazla saptanmıştır (55). Bu sebepler dışında bir çok hastada hiperlipidemi, DM, santral obezite olmaksızın NAFLD saptanabilmektedir.

NAYKH yağ metabolizmasında bozukluk, mitokondri hasarına sebep olan ilaçlar, metabolik nedenler, toksinler, cerrahi, genetik nedenlerle oluşmaktadır (**Tablo- 1**).

Tablo 1. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının nedenleri (56).

Kazanılmış metabolik Bozukluklar	Diyabetes mellitus Dislipidemi Obezite Kwashiorkor ve marasmus Açlık
Metabolizmanın doğuştan gelen bozuklukları	Abetalipoproteinemi Ailesel hepatosteatozis Galaktozemi Glikojen depo hastalığı Hereditör fruktoz intoleransı Homosistinüri Sistemik karnitin eksikliği Tirozinemi Weber-Christian sendromu Wilson hastalığı
Sitotoksik ve sitostatik ilaçlar	L-asparaginaz Azasitidin Azaserin Bleomisin Metotreksat Puromisin Tetrasiklin
Diğer ilaçlar ve toksinler	Amiodaron Dikloretilen Etiyonin Etil bromid Östrojenler Glukokortikoidler HAART Hidralazin Hipoglisin Orotat Perhexilene maleate

	Safrole Tamoksifen
Metaller	Antimon Baryum tuzları Kromatlar Fosfor Talyum ve uranyum bileşikleri
Diğer	İnflamatuvar barsak hastalığı Parsiyal lipodistrofi Jejunal divertiküloz Total parenteral beslenme Ciddi anemi Petrokimyasallara maruziyet Gastrik ve jejun-ileal bypass Biliyopankreatik diversiyon Geniş ince barsak rezeksiyonu

2.5. Patogenez

NAYKH patogenezinde bir çok sebep vardır. İlk olarak 1998 yılında Day ve James tarafından öne sürülen iki aşamalı hasar (two-hit) hipotezi kabul edilmiştir (57-59) (**Şekil-1**).



Şekil 1. NASH patogenezinde çift vuru (two-hit) hipotezi

Bu hipoteze göre karaciğer hasarına neden olan ilk aşama; yağ asidi metabolizmasındaki bozukluk sonucu oluşan yağlanmadır. İkinci aşama ise yağlanma nedeni ile savunmasız kalan hepatositlerde hücresel adaptasyon ve değişik sinyal yolları ile ilişkilidir. Bu ikinci vuru fibrozis ve nekroinflamasyonu başlatır. Fibrojenik kaskadın aktive olmasıyla fibrozis süreci başlar ve daha sonra NAYKH'lı hastalardan bir kısmında çevresel ve genetik sebeplerin etkisi ile siroza gidiş başlamaktadır.

Normal şartlarda serbest yağ asitleri (SYA) intestinal yolla emilerek veya trigliserid şeklinde yağ dokusundan lipoliz ile karaciğere taşınır. Karaciğere gelen serbest yağ asitleri

mitokondride oksitlenir ya da trigliserid halinde esterlenip fosfolipidler sentezlenerek VLDL (very low density lipoprotein) şeklinde hepatositlerden salınarak dokulara götürülür. Yağ asidi sentez ve metabolizması sıkı bir hormonal kontrol mekanizmasıyla düzenlenir. Karaciğerde biriken trigliseridler sebebiyle lipolizden ziyade lipogenez aktif olur ve böylece yağ dokusu ve intestinal yoldan sağlanan serbest yağ asidi miktarı artar. Sonuç olarak lipoprotein sentezindeki azalmadan dolayı karaciğerde trigliserid miktarı artar.

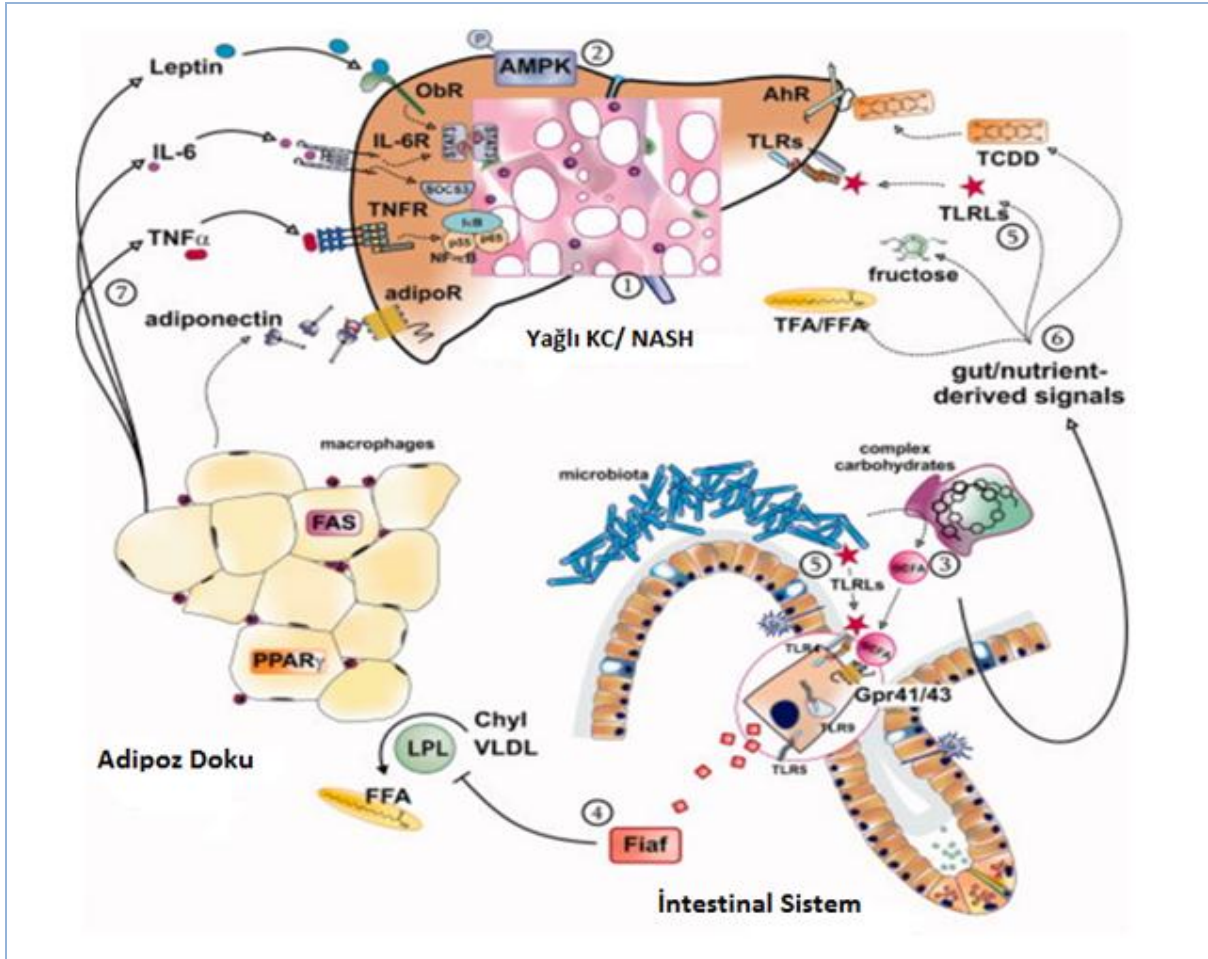
Güncel kanıtlar steatozadaki esas sebebin insülin direnci ve hiperinsülinemi kaynaklı olduğunu ortaya koymaktadır. NAYKH tanılı olup glukoz tolerans bozukluğu olmayan hastalarda bile klinik ve laboratuvar bulguları insülin direnci ve hiperinsülinemi desteklemektedir (60). İnsülin direncine neden olan moleküler mekanizma kompleksir ve tam olarak anlaşılammıştır. Obezite ve hiperinsülinemide artan serbest yağ asitleri; TNF-alfa, membran glikoprotein PC-1 ve leptin aracılı, insülinin sinyal yollarına etki ederler. Artan serbest yağ asitleri hepatik insülin direnci artışına insülin reseptör substrat-1(IRS-1) sinyalini down regüle ederek neden olurlar (61,62).

İnsülin; karaciğerde yağ asidi sentezini uyarır, mitokondrideki serbest yağ asitlerinin β -oksidasyonunu azaltır, apoB-100, ve VLDL'nin hücre içi degradasyonunu arttırıp hepatositlerden trigliseridlerin salınımını ve VLDL içeren veziküllerin ekzositozunu engeller (61-63). Ayrıca nonalkolik steatohepatit tanılı hastalarda apoB-100'ün karaciğerdeki bozulmuş sentezi de karaciğerde trigliserid birikimine katkıda bulunabilir (64).

Obezite, visseral yağ dokusu artışı, periferik insülin direnci birlikteliği sonucu, glukoneogenez artar , visseral yağ dokudan serbest yağ asidi salınması ve serbest yağ asitlerinin karaciğerde tutulumu artar. Ayrıca çevresel lipoliz; hepatik trigliserid yapımı ve birikimiyle ilişkilidir (18,65-67).

Çoklu paralel darbe modeli: Günümüzde NAYKH patogenezinde çoklu paralel darbe modelinin daha çok geçerli olduğu düşünülmektedir (**Şekil-2**). Bu hipoteze göre çoğu durumda yağlı karaciğer geliştikten sonra inflamatuvar sürece uygun zemin oluşur ve daha sonra inflamasyon ve fibrozis başlar. NASH yağlanmayı takiben gelişen inflamatuvar

süreç ve antilipotoksik etkinlikte yetersizlik olarak görülebilir. Bu durumda intestinal sistemde ve yağlı dokuda gelişen ve karaciğerde inflamasyonu uyaran bir çok paralel darbe olabilir denmiştir. Endoplazmik Retikulum disfonksiyonu, sinyalizasyon bozuklukları, sitokinler ve bağışıklık sisteminin NASH patogenezinde önemli rol oynadıkları saptanmıştır. Yine oksidatif stresler, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, kupfer hücrelerinde aktivasyon, lipid peroksidasyonu, adipokinlerin dengesinin bozulması, demir birikimi gibi nedenler eşliğinde genetik ve çevresel duyarlılığı olan hastalarda çoklu paralel darbe yoluyla inflamasyon ve fibrotik süreç uyarılmaktadır . Bu süreçler ve işleyiş henüz tam aydınlatılamamıştır (3).



Şekil 2. Çoklu paralel darbe modeli; 1-Lipotoksisite 2- İntestinal sistem kaynaklı sinyaller 3-Polisakkaritlerden oluşan hatalı ürünleri 4- Açlık kaynaklı adiposit faktörü (Fiaf) 5- Toll like reseptörler (TLR) 6- Trans yağ asitleri (TFAS) 7- Yağ doku kaynaklı sinyaller.

2.6. Non Alkolik Steatohepatit'in Klinik Bulguları

Nonalkolik steatohepatit hastalarının çoğunda belirti olmaz. Hastaların çoğunda başka amaçla yapılan değerlendirme sonucu hepatosteatoz, hepatomegali veya karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk saptanır. Bu hastaların birçoğunda yorgunluk, kırgınlık, sağ yanda müphem bir ağrı, dolgunluk hissi, hassasiyet gibi belirtiler olabilir (42). Hastalarda olabilecek tek fizik muayene bulgusu hepatomegalidir ve hastaların yaklaşık %25'inde saptanabilir (68). Ancak tetkikler sonucunda hastaların yaklaşık %75'inde hepatomegali saptanmıştır, ancak obez hastalarda fizik muayenede hepatomegaliyi tespit etmek zordur. Batında asit, spider anjiyom, palmar eritem gibi muayene bulguları siroz evresinde beklenen bulgulardır.

2.7. Non Alkolik Steatohepatit'in Laboratuvar Bulguları

Steatohepatit tanılı hastaların genelde tek laboratuvar bulgusu alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) veya her ikisinde hafif ya da orta düzeyde artıştır. Hastaların bir kısmında enzim düzeyleri normaldir (69). AST/ALT oranı genelde 1'in altında olan bu hastalarda fibrozis evresi ilerledikçe bu oran 1'in üzerine çıkar (53,70). Gama glutamil transferaz(GGT), alkalin fosfataz(ALP) düzeylerinde ise genelde 2 katın altında olmak üzere minimal bir artış vardır (71).

NAYKH hastalarında ANA düşük titrede pozitif olabilir. AMA ve HBsAg pozitifliği görülmez. Ayrıca karaciğer enzim yüksekliğinin tek nedeninin NAYKH olduğunu göstermek için Anti-HCV'nin de negatif olarak gösterilmesi gerekir. Yine NAYKH tablosunun HCV enfeksiyonu ve obezite ile birlikte olması sürecin dağa ağır seyredeceği anlamına gelir (72).

Nonalkolik steatohepatit hastalarında serum seruloplazmin ve Alfa-1 antitripsin düzeyleri normal düzeydedir, serumda ve karaciğerde demir düzeyleri yükselebilir, serum ferritin düzeyi %20-50 oranında yüksek saptanabilir ve bu yükseklik ilerlemiş hastalık tablosunun bulgusu olabilir (53,73). NAYKH olanlarda klinik ve laboratuvar bulguları hastalığın şiddeti ile korele değildir, hatta siroz gelişmiş olsa bile karaciğer enzimleri normal aralıkta olabilir (74).

2.8. NAYKH'nın Histopatolojisi

Non alkolik yağlı karaciğer hastalarında yağlanma genelde makroveziküler tipte ve karaciğer lobülü boyunca diffüz dağılım gösterir fakat mikroveziküler yağlanma paterni zaman zaman bildirilmektedir. Hafif lenfositik, nötrofilik tutulumlar veya mikst tipte inflamatuvar tutulumlar görülebilir. Ayrıca hepatosit çekirdeklerinde glikojen birikimi görülebilir. Histopatolojik olarak alkolik karaciğer hastalığından ayırdedilemeyen bu hastaların tümünde yağlanma vardır. Yağlanma VKİ ile korele olabilir ve alkolik hepatite göre NASH hastalarında yağlanma genelde daha şiddetlidir (75). Lenfositler, mononükleer hücreler ve polimorfonükleer hücreler ile karakterize lobüler inflamasyon NASH'ın göstergesi olabilir. İnflamasyonun şiddeti ile NASH'ın şiddeti koreledir ve alkolik hepatite göre inflamasyon genelde daha şiddetlidir (76).

Baloni dejenerasyonu, değişen miktarlardaki hepatosit nekrozu genelde vardır ve genellikle kötü prognozu gösterir (77,78). Mallory cisimciği ve hastaların yaklaşık %50 kadarında demir birikimi görülebilir. Perisellüler, perisinüzoidal ve periportal fibrozis NASH hastalarının %37-84'ünde tariflenmiştir. Yetişkin hastalarda özellikle perisinüzoidal fibrozis yaygındır ve daha çok zon 3 bölgesinde görülür (74). NAYKH olup da karaciğer enzimleri yüksek olanlarda %7-16 oranında siroz saptanmıştır (53,79).

Morbid obez olanlarda siroz riski daha yüksektir. NASH'ın tanımlanması için henüz net bir histolojik kriter tanımlanmamıştır. Ancak Brunt'un önerdiği skorlama sistemi (**Tablo-2**) genel olarak kullanılan sınıflamadır (80).

Tablo 2. NASH için Brunt tarafından önerilen skorlama sistemi

Değişken	Skor	Tanımlama
Steatozis	0	Yok
	1	Asininin %33'e kadar, özellikle makroveziküler
	2	Asininin %34-66,
	3	Asininin %66'sının üzerinde (panasiner), sıklıkla mikst steatoz
Hepatosit balon dejenerasyon	0	Yok
	1	Arasıra zon III'de
	2	Bariz zon III'de
	3	Belirgin, dominant olarak zon III'de
Lobüler inflamasyon	0	Yok
	1	Seyrek nötrofiller, arasıra mononükleer hücreler, 20x objektifte her odakta 1 ya da 2 balonlaşmış hepatositle ilişkili nötrofiller, hafif kronik inflamasyon
	2	20x objektifte her odakta 3 ya da 4 akut ve kronik inflamasyon, nötrofiller zon III'de konsantr olabirler
	3	20x objektifte her odakta 4'ün üzerinde değişken
Portal inflamasyon	0	Yok
	1	Hafif, bazı portal alanlar
	2	Hafif ya da orta, çoğu portal alanlar
	3	Orta ya da şiddetli, çoğu portal alanlar
Evre	0	Fibrosis yok
	1	Zone III perivenüler, perisinuzoidal fibrosis
	2	Evre I değişimler + periportal fibrosis
	3	Köprüleşme fibrosis
	4	Sirozis

2.9. NAYKH'da Görüntüleme

Görüntüleme trkniklerine genelde karaciğer enzim yüksekliği sebebini araştırmak amacıyla veya NAYKH'dan şüphelenilen durumlarda başvurulur. Ultrasonografi en sık tercih edilen görüntüleme yöntemidir. Manyetik Rezonans (MRG) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) de karaciğer yağlanmasını gösterebilir. Görüntüleme teknikleri NAYKH tanısını desteklemektedir, hastalığın şiddetini göstermez ve tanı koydurmaz. Kesin tanı ve hastalığın şiddeti karaciğer biyopsisi ile elde edilebilir.

2.10. NAYKH Tanısı

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının tanısı fizik muayene, laboratuvar bulguları, hastadan alınan öykü ve radyolojik bulguların klinik ve histopatoloji ile kombinasyonuyla konur.

Çalışılması gereken Laboratuvar testleri şunlardır; kan sayımı, biyokimyasal testler, protrombin zamanı, HbSAg, transferrin saturasyonu, anti-HCV, Alfa-1 antitripsin ve ayrıca 40 yaşın altındaki kişilerde serum seruloplazmin ve antimitokondriyal antikör (AMA) şeklinde sıralanabilir. Böylece diğer etiolojiler dışlanmış olur. NAYKH 'nın tanısı için alkolik karaciğer hastalığı mutlaka dışlanmalıdır ve alkol alımı olanlarda ise günlük maksimum 20 gr kadar alkol alınmış olması şarttır.

Tanıda karaciğer biyopsisinin yeri ve rolü tartışmalıdır. Laboratuvar ve histolojik bulgular arasında korelasyonun zayıf olmasının nedeni; normal laboratuvar bulguları olan hastalarda da biyopside belirgin karaciğer hasarı görülebilmektedir (74). Karaciğer biyopsisi; yağlanma, nekroz, ve fibrozis derecesini belirlemede ve prognozu gösterme konusunda primer tetkiktir (81). Bu sebeplerden dolayı biyopsi yapılacak olan hasta özenle seçilmelidir.

Hastalığın ilerlemiş olabileceğini gösteren birçok laboratuvar ve biyokimyasal risk faktörü belirlenmiş olup, biyopsi yapılacak olan hastayı seçmede yol gösterici olabilir. Bu risk faktörleri; obezite, sebat eden karaciğer fonksiyon test anormallikleri, ileri yaş, metabolik sendrom, AST/ALT oranı >1 olanlar, portal hipertansiyon belirti ve bulguları veya herhangi bir görüntüleme tekniğinde fibrozis bulgularının olması ileri evre karaciğer hastalığının muhtemel göstergeleridir (**Tablo-3**) (53,78)

Tablo 3. İlerlemiş Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı için risk faktörleri (53, 69, 78, 82, 83)

Klinik
İleri yaş (>50 yaş)
Obezite
Diyabetes mellitus / insülin direnci
Hipertansiyon
Laboratuvar
AST/ALT oranı >1
Serum ALT seviyesi >2x normal üst sınır
Serum trigliserid seviyesi >155 mg/dl
Histopatolojik
Şiddetli yağlanma
Nekroinflamatuvar aktivite (hepatositte balonlaşma, nekroz)
Demir birikimi

Tablo 4. NASH' in histopatolojik olarak değerlendirilmesinde Brunt ve arkadaşları tarafından önerilen sistem yaygın olarak kullanılmaktadır (84)

Grade	1	2	3
Yağlanma	<% 33	%34 - %66	>%66
Balonlaşma dejenerasyonu	Az	Mevcut	Belirgin
İnflamasyon	Hafif	İlimli(orta)	Lobüler ilimli, Portal ilimli
Stage	Fibrozis		
1	Perisinüzoidal		
2	Perisinüzoidal ve portal/periportal		
3	Köprüleşen septalar		
4	Yaygın köprüleşme fibrozisi, siroz		

2.11. NAYKH'da Non İnvaziv Fibrozis Belirteçleri

Karaciğer biyopsisi tanı için temel teşkil etse de hem invaziv bir yöntem hem de pahalıdır. Bunun üzerine non-invaziv tanı teknikleri hala araştırılmaktadır. En önemli ilerlemelerden biri basit ve kullanışlı olan Fibro-Test yöntemiyle fibrozisin değerlendirilmesidir. Non-invaziv teknikler içinde en iyi olanı Fibro-Test yöntemidir. NAYKH olan hastalarla yapılan bir çalışmada Fibro-Test'in köprüleşme fibrozisi ve sirozu tespit etmede çok hassas olduğu ortaya konmuştur (85).

Fibro-Test'in cut-off değeri 0.70 olarak kabul edilince ileri fibrozis için pozitif tanı koydurucu değeri %73 ve spesifitesi %98 olarak tespit edilmiştir. Fibro-Test cut-off değeri 0.30 olarak kabul edilince, ilerlemiş fibrozis için %90 negatif prediktif değere sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle 0,3-0,7 arası değerlerde hastaya karaciğer biyopsisi yapılabilir. Fibro-Scan yönteminin de fibrozis tahmini ve karaciğer sertliğini tespit etmede başarılı olduğu bulunmuştur (86). Non-invaziv teknikler gelecekte karaciğer biyopsisinin yerini alabilir fakat tüm hastalarda bu durum söz konusu değildir.

2.12. NAYKH'da Doğal Seyir

Bu konuda prospektif olarak yapılmış yeterli sayıda çalışma yoktur. Retrospektif çalışmalardan elde edilen veriler NAYKH'nın büyük ölçüde iyi seyirli olduğunu destekler niteliktedir. Hepatositlerde fibrozis veya nekrozun gelişmediği hastalarda progresyon yavaş seyirlidir (87). Alkolik hepatitli hastalarda 5 yıllık sağkalım %50-75 oranında olup NAYKH'da prognozun alkolik hepaptite göre daha iyi olduğu gösterilmiştir (75). Diğer nedenlerde olduğu gibi NAYKH'da da siroza ilerleyen hasta oranı azdır ve kriptojenik sirozun en olası nedeninin NAYKH olabileceğini gösteren güçlü bulgular mevcuttur (88) ve bu sonuç da NAYKH'nın hepatoselüler kanserle ilişkili olduğunu gösterebilir niteliktedir (89).

NAYKH ile ilişkili doğal seyrin saptanması için büyük prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır, fakat kanıtlar NAYKH'nın progresif seyredebileceğini ve önemli mortalite ve morbidite nedeni olabileceğini ortaya koymuştur. Karaciğer biyopsisinde nekroz ve fibrozisin saptandığı steatohepatit hastalarında, morbidite ve mortalite riski yüksektir (90).

2.13. Lizozomal Asit Lipaz Enzim Aktivitesi Ve Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Lizozomal Asit Lipaz eksikliği nadir görülen otozomal resesif, Lizozomal Lipid Depo hastalıkları grubunda yer alır. Karaciğer, dalak ve diğer organlarda progresif kolesterol ester ve trigliserid birikimiyle karakterize bir hastalıktır (91). LAL-D (Lysosomal Acid Lipase Deficiency- Lizozomal Asit Lipaz eksikliği) dislipideminin yaygın olarak görüldüğü, artmış ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, prematüre mortalitesi ile ilişkili bir hastalıktır (91-93). Progresif karaciğer hastalığı Lizozomal Asit Lipaz eksikliğinin diğer bir karakteristik özelliğidir. Hastalar tipik olarak hepatomegali, artmış karaciğer enzimleri ve/veya mikroveziküler yağlanma ile prezente olur (91). LAL-D yeterince tanımlanmamış bir durumdur ve bazen etkilenen hastalara tanı konmuyor veya non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, nonalkolik steatohepatit, kriptojenik karaciğer sirozu gibi yanlış tanımlanmaktadır (94-96).

Bu hastalık ilk olarak 1956 yılında tanımlanmıştır. En hızlı ilerleyen hastalık tablosu infantlarda görülmektedir. İnfantlarda görülen bu hastalık Wolman hastalığı olarak adlandırılmıştır (97). Lizozomal asit lipaz eksikliği; LIPA (Lipase A) geninde mutasyon sonucu oluşur. Lizozomal Asit Lipaz LDL'deki kolesterol esterleri ve trigliseridlerin hidroliziyle serbest kolesterol ve yağ asitlerinin oluşumundan sorumludur (98-101). LAL eksikliği olan infantlarda genelde hayatın ilk birkaç haftası içinde başvurulur ve genellikle 6-12 ay arası bir sürede multiorgan yetmezliği sonucu hastalar kaybedilir (99). Hatta gebelik sürecinde bile belirti ve bulgular başlayabilir ve gebelikte fetal ultrasonografide batında asit ve polihidramniyoz saptanabilir (102).

İnfantlarda hastalığın özellikleri belirgin hepatosplenomegali, gelişim geriliği, ishal ve kusmadır. Bu infantlarda kolesterol esterleri ve trigliseridlerin karaciğerde masif bir şekilde birikmesi sonucu karaciğerde fibrozis ve siroz tablosu hızlı bir şekilde gelişir. Ayrıca aynı zamanda aşırı lipid birikimi dalak, vasküler endotel, adrenal bezler, intestinal mukoza, lenf nodları ve iskelet kaslarında da oluşur (103).

LAL eksikliği yetişkinlerde ve çocuklarda, infantlara göre çok farklı klinik özellik ve seyir gösterir. Semptomların başlangıç yaşı erkekte 44 kadında 68 yaş gibi geç yaşlarda da ortaya çıkabilirken, semptomların ortalama başlangıç yaşı hem kadın hem de erkekte 5 yaştır (91). Bu hastalarda lipid anormallikleri her yaşta görülebilir. Ailesel

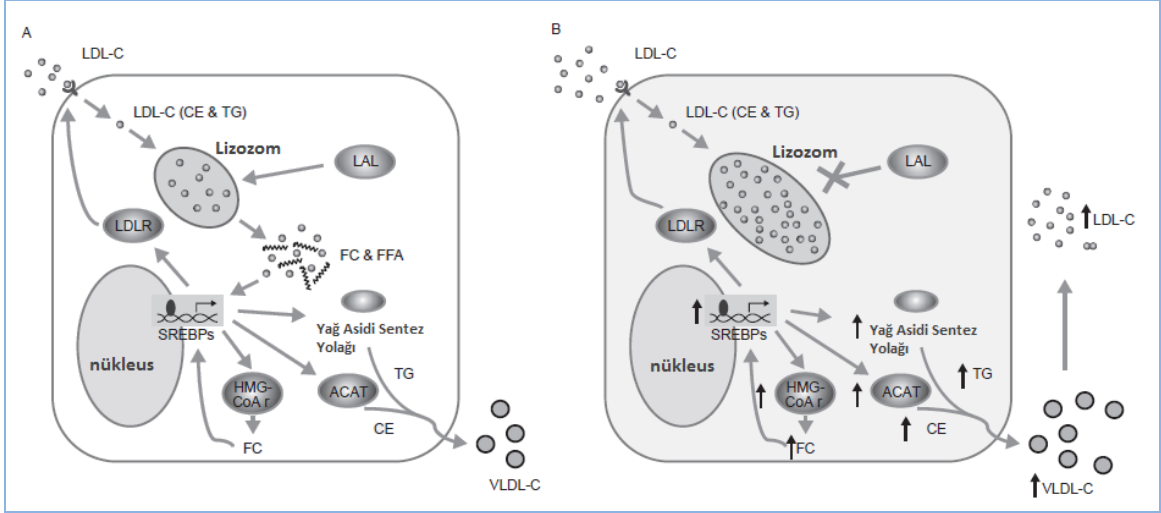
hiperkolesterolemi gibi daha yaygın genetik lipid metabolizma bozukluklarından ayırdedilemeyen lipid profili ile başvuruabilirler (104).

Şimdiye kadar LAL-D ile ilgili kırktan fazla fonksiyonel mutasyon saptanmıştır (91,105). LAL-D otozomal resesif bir hastalık olup etkilenen bireylerde ya homozigot ya da karışık heterozigot mutasyon olmasına rağmen bazı bireyler gizli mutasyonlara sahiptir. Saçma mutasyon, frameshift defekt ve stop kodonunda mutasyonla sonuçlanan nokta mutasyonlar en ağır mutasyonlardır ve genellikle etkilenmiş infantlarda saptanır. Daha hafif mutasyonların çocuk ve erişkinlerde mevcut olduğu düşünülmektedir (106). Kolesterol ester depo hastalıkları en sık çocukluk çağı ve adölesan çağda, erken kardiyovasküler hastalıklar veya NASH tablosu ile tespit edilir (107).

2.14. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği Patogenezi

Lizozomal Asit Lipaz kolesterol esterleri ve trigliseridlerin lizozomda hidrolizi nedeni ile lipid metabolizmasında anahtar role sahiptir. LDL'nin LAL tarafından lizozomda yıkılması sonucu oluşan serbest kolesterol ve yağ asitleri hücre içi kolesterol homeostazisinde kritik mediyatör olarak rol alır (108). Bu lipidler veya onların okside türevleri, ilgili genin transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek (sterol regulatory element-binding proteins [SREBPs]) doğrudan kolesterol sentezi ve re-uptake ve lipid sentezi ile ilişkili genlerin modülasyonu ve ekspresyonunu sağlarlar (109).

Normal şartlarda hücre içi serbest kolesterol birikimi SREBP-2 aracılıklı LDL reseptör down regülasyonu, Hidroksimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibisyonu, ve Açıl Kolesterol Açıl Transferaz'ın (ACAT) uyarılmasına yol açar (**Şekil-3**). Aynı zamanda hücre içi yağ asidi artışı; fosfolipid ve trigliserid ürünlerinin SREBP-1c aracılıklı yağ asit sentezi inhibisyonunun engellenmesine yol açar (110).



Şekil 3. Hüresel kolesterol homeostazisinin şematik gösterimi. (A) Sağlıklı bireyler, (B) LAL-D olan hastalar. ACAT; Açıl Kolesterol Açıl Ttransferaz, CE; kolesterol esterleri, FA;yağ asitleri, FC;serbest kolesterol, FFA;serbest yağ asitleri, HMG-CoA r; Hidroksimetilglutaril Ko-Enzim A Redüktaz, LAL; Lizozomal Asit Lipaz, LAL-D; LAL eksikliği; LDL-C; düşük ağırlıklı lipoprotein kolesterol, LDLR; düşük ağırlıklı lipoprotein kolesterol reseptörü, SREBPs; Stres sterol düzenleyici element bağlayıcı protein, TG; trigliserid,VLDL-C; çok düşük ağırlıklı lipoprotein kolesterol (108-110).

LAL aktivitesi yokluğunda veya aktivitesi azaldığında kolesterol esterleri ve trigliseridler lizozomda toplanamaz ve yıkılmaz. Sonuç olarak azalmış hücre içi serbest kolesterolün neden olduğu SREBP aracılıklı HMG-CoA redüktaz tarafından endojen kolesterol üretiminin ve LDL reseptörleri üzerinden endositozun up-regülasyonu, hem Apolipoprotein B (ApoB) ve belirgin şekilde çok düşük ağırlıklı lipoprotein kolesterol (VLDL-C) üretiminde artışa sebep olur (111).

LAL-D'de HMG-CoA redüktaz up-regülasyonundan dolayı serbest kolesterol seviyesinin hiç artmaması tam olarak anlaşılammıştır fakat LDL reseptör aktivitesinin feed-back inhibisyonu ve LDL'nin dolaşımdan uzaklaştırılmasının azalması buna neden olmuş olabilir. Halbuki LAL-D'deki kolesterol trafiği bu tasarıya uymamaktadır. Örnek olarak LDL kolesterolün hücre içine alınması LAL-D olan fibroblastlarda artmışken, Apo-B'nin hücre içine alınması bu hastalarda normal olarak saptanmıştır (108,112).

LAL aktivite eksikliğinin olduğu hepatositlerde kolesterol sentezindeki artışın yol açtığı kolesterolün karaciğerden atılmasının doğal yolu olan VLDL kolesterol üretimi ve

sekresyonunda önemli bir artış olur, bu nedenle LDL kolesterol üretiminde artış olur ve hiperkolesterolemi gelişimine neden olur (112).

LAL-D olan hastalar tipik olarak lipid bozukluklarıyla; artmış total serum kolesterol, yüksek LDL, VLDL, düşük HDL kolesterol ve bazen yüksek trigliserid seviyeleriyle başvurabilirler (104). Ayrıca Apo-B içeren VLDL ve LDL gibi lipoproteinler nedeniyle plazma total kolesterol ve trigliserid düzeyleri artar (113).

2.15. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği Belirti Ve Bulguları

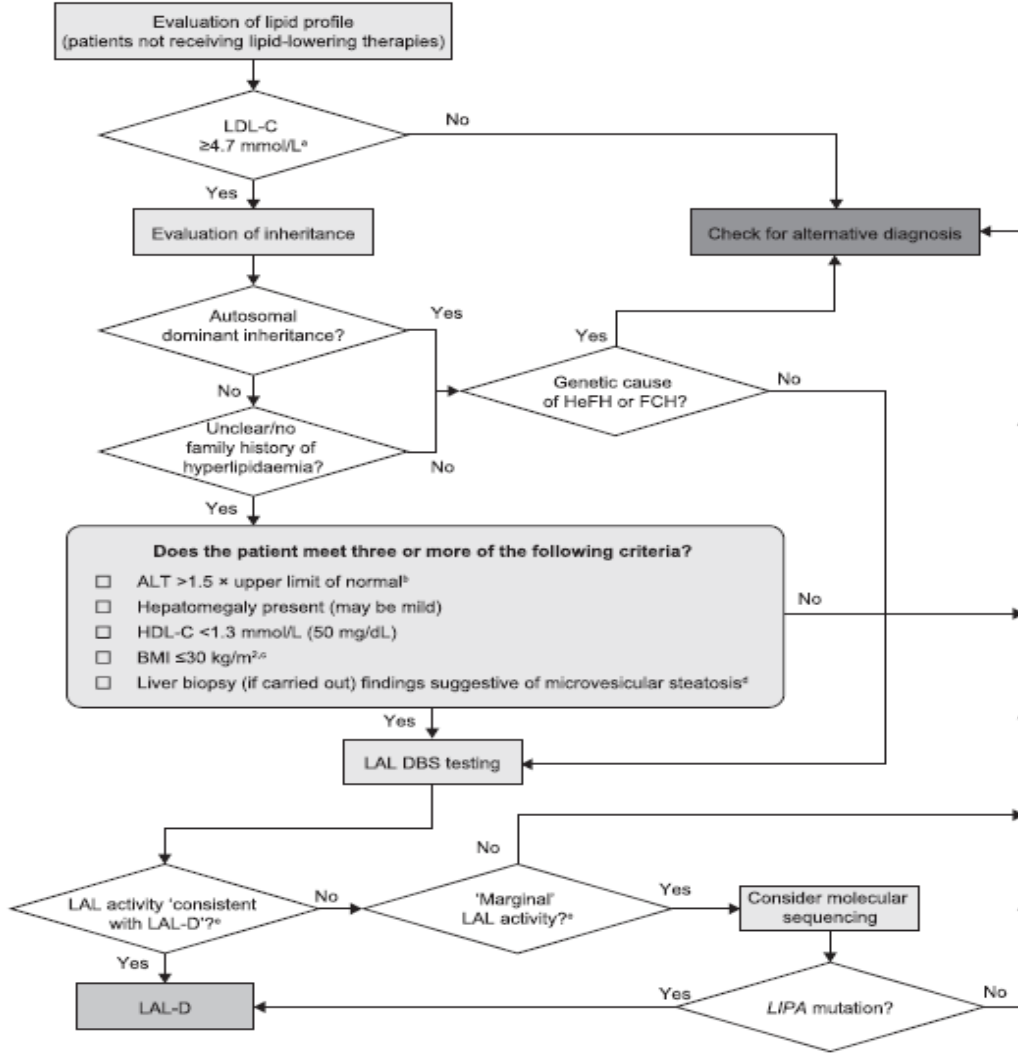
LAL aktivite eksikliği olan hastalar arasında önemli ölçüde farklılıklar olabilir. En yaygın olan klinik bulgular; lipid bozuklukları, hepatomegali, karaciğerin hücresel hasarı ve LAL-D'da daha yaygın olan diğer kardiyovasküler, karaciğer ve metabolik hastalıklar şeklinde sıralanabilir (**Tablo-5**).

Tablo 5. Lizozomal Asit Lipaz eksikliğinde çocuk ve yetişkinlerde görülen klinik belirti ve bulgular, serum belirteçleri ve karaciğer biyopsisi bulguları (91,114-118).

	Hepatomegali/Hepatosplenomegali
	İshal
	Karın ağrısı ve epigastrik ağrı
	Kusma
	Anemi
	Malabsorbsiyon
	Kolestaz
	Steatore
	Gelişim geriliği
	Safra kesesi disfonksiyonu
	Koroner arter hastalığı
	Anevrizma
	İnme
	Adrenal kalsifikasyon
	Özefagus varisleri
Serum belirteçleri	Artmış Total Kolesterol
	Artmış LDL düzeyi
	Azalmış HDL düzeyi
	Artmış serum transaminazları
Karaciğer biyopsisi bulguları	Parlak yeşil-turuncu renkte
	Genişlemiş lipid yüklü hepatosit ve kupfer hücreleri
	Mikroveziküler yağlanma (makroveziküler yağlanma ile birlikte mixt steatoz olabilir)
	Fibrozis
	Mikronodüler siroz

2.16. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği'ni Tarama Algoritması

Lizozomal Asit Lipaz eksikliğinin zamanında tanı konması otörlerce önerilen klinik deneyimlerle belirlenmiş algoritma oluşturulmuştur (Şekil-4).



Şekil 4. Lizozomal Asit Lipaz Tarama Algoritması

LAL aktivitesindeki 0.03 (nmol/punch/hour) altındaki değerler LAL aktivitesindeki yetmezlik, 0.03-0.15 (nmol/punch/hour) aralığındaki değerler sınırda LAL aktivitesi olarak tanımlanmıştır. 0.15-0.37 (nmol/punch/hour) arası değerler ise ileri derecede azalmış LAL aktivitesi, 0.37-0.50 (nmol/punch/hour) arası değerler ise laboratuvar tarafından azalmış ve geçiş zonundaki LAL aktivitesi olarak değerlendirilmektedir (119,120).

2.17. Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği'nde Enzim Replasman Tedavisi

Enzim replasman tedavisi (ERT) diğer lizozomal lipid depo hastalıklarında başarıyla kullanılmıştır ve LAL-D hastaları için de ümit vericidir (121). LAL-D hastalarında replasman tedavisinin amacı karaciğer enzim düzeylerini fizyolojik sınırlara indirmek, karaciğerde trigliserid ve kolesterol ester birikimini önlemek ve nihai olarak normal organ fonksiyonlarını geri getirmektir. Sebelipaz-Alfa bir rekombinant LAL enzimi olup, şu anda faz 3 çalışma kapsamındadır. Sebelipaz-Alfa ile ilgili ilk insan çalışması dokuz hastadan oluşan açık etiketli Faz-2 çalışması şeklinde yapılmıştır ve 7 hastada tedavi süresi uzatılmıştır ve alınan sonuçlar raporlanmıştır (122,123).

Bu ilk çalışmada hastalar dört haftada bir intravenöz infüzyon şeklinde tedavi aldılar. Tedavi alan hastalar tedaviyi iyi tolere ettiler ve sonuç olarak; transaminazlarda hızlı bir düşüş, total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid düzeylerinde dokulara doğru mobilize olduklarını düşündüren sonuçlar elde edilmiştir (122). Faz-2 çalışması sonunda hastaların enzim düzeyleri ve lipid düzeyleri bazal değerlerine dönmüştür. Uzatılmış çalışmaya katılan ve tekrar 4 haftada bir infüzyon tedavisi almaya başlayan hastaların her infüzyon öncesi verileri kaydedilmiştir. Yetmiş sekiz haftanın sonunda Sebelipaz-Alfa alan hastaların AST, ALT değerleri bazal değerlerine doğru düşmeye devam ederek normal aralığa gerilemiştir. Düzenli lipid düşürücü tedavi alanlarda ise LDL kolesterol ve trigliserid seviyelerinde sırasıyla %52 ve %40 iyileşme sağlanmış, ayrıca HDL kolesterol düzeylerinde ortalama %37 yükselme tespit edilmiştir (123). Elliikinci hafta sonunda ise başlangıca göre karaciğer yağlanması ortalama %52 ve karaciğer hacminde ise %12 azalma kaydedilmiştir. İkiyüz elli üzerinde uzun süreli tedavi alımında hastalarda acil sayılabilecek yan etki ve ilaç güvenliği ile ilgili herhangi bir problem oluşmamıştır. Ekseriyetle gelişen yan etkiler, hafif ve Sebelipaz Alfa ile ilişkisizdi. İnfüzyona bağlı yan

etkiler yaygın değildi ve en sık gastrointestinal sisteme ait ishal ve karında kramp şeklinde hafif yan etkiler görölmüştür.

2.18. Lizozomal Asit Lipaz Enzim Eksikliğinde Prognoz

Hastalığın prognozu ve günlük yaşantıdaki etkileri hastadan hastaya çok farklılık göstermektedir. Bazı çocuklar erken karaciğer yetmezliği nedeni ile karaciğer nakline gidebilirler (91). Koroner arter hastalığı, anevrizma ve inmeyi içerebilen ağır belirti ve bulgularla hastaların hayat kaliteleri negatif olarak etkilenir. Bazen belirgin semptomlar olmamakta ve erken kardiyovasküler olay veya karaciğer yetmezliği nedeni ile ani ölüm gelişene kadar hastalar tanı alamamaktadır. bazen de yanlış tanıları alabilmektedirler ve bu şekilde erken ölümler görölmektedir (95,124-127).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya başlanmadan önce KOÜ KAEEK'den 2014/343 numaralı etik kurul onayı alındı. Kontrol grubuna 15 erkek ve 15 kadın olmak üzere toplam 30 çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun sağlıklı birey çalışmaya alındı.

2007-2015 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji B.D. polikliniğine başvuran ve karaciğer biyopsisiyle NASH tanısı konan hastalar hastane veri sistemi üzerinden tarandı. Toplamda 85 hasta tespit edildi ve iletişim bilgileri kaydedildi. Hastalar telefonla arandı. Saptanan 85 hastadan 13 hastaya ulaşılamadı, 16 hasta ise çeşitli nedenlerle gelemeyeceklerini bildirdi. Ondört hasta başka şehirde yaşama sebebi ile, 11 hasta çalışmaya katılmak istemediklerinden çalışmaya alınamadı. Çalışmaya katılmayı kabul eden kalan 31 hasta çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınma kriterlerine uygun, karaciğer biyopsisiyle NASH tanısı almış olan bu 31 hasta hastaneye çağırıldı. Gelen hastaların fizik muayeneleri yapıldı ve dosyalarına kaydedildi. Son 6 ay içinde karaciğer biyopsisi yapılmış olan hastaların güncel antropometrik ölçümleri alındı. Karaciğer biyopsisi son 6 aydan evvel yapılmış olan hastaların antropometrik verileri ise karaciğer biopsisinin yapıldığı tarihteki dosya bilgilerinden alınarak kaydedildi. Tüm hastaların tanısal değerlendirme için biyopsi zamanında çalışılmış laboratuvar verileri hastane veri sisteminden elde edildi.

Hasta dosyalarından ve hastane veri sisteminden yararlanılarak elde edilen; hastaların boyları, kiloları, hemogram, açlık kan şekeri, insülin, total kolesterol, LDL, trigliserid, HDL, vitamin B12, TSH, ST3, ST4, HgA1c, Folik Asit, ALT, AST, ALP, GGT, Total Bilirubin, Direkt Bilirubin, Total Protein, Albumin, CRP, VKİ, HOMA-IR düzeyleri ve karaciğer biyopsisi sonuçları hasta dosyalarına kaydedildi. Biyopsi sonuçları Brunt kriterlerine göre skorlanmıştı.

Sağlıklı kontrol grubu ise alkol kullanımı öyküsü, diyabetes mellitus, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, hiperlipidemi, obezite, batın ultrasonografisinde karaciğer yağlanma bulgusu olmayan, karaciğer yağlanmasına neden olabilecek herhangi bir ilaç kullanmayan ve viral hepatit belirteçleri negatif olan ayrıca, Hemogram, Açlık Kan Şekeri, İnsülin, Total Kolesterol, LDL, Trigliserid, HDL, vitamin B12, Folik Asit, ALT, AST, ALP, GGT, Total Protein, Albumin, Total Bilirubin gibi parametreler içinden çalışılmış olan verilerle gönüllü kişilerden oluşturuldu.

Hasta ve kontrol grubu çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra aydınlatılmış onamları alındı. HOMA, (açlık kan şekeri mg/dl x açlık insülin seviyesi µU/ml)/405 formülüyle hesaplandı. HOMA-IR değerinin >2,5 olması “insülin direnci” olarak kabul edildi. Tüm batın ultrasonografileri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Radyoloji B.D. tarafından abdominal ultrasonografi konusunda deneyimli hekimler tarafından yapılmıştı. Vücut kitle indeksi boy ve ağırlık ölçümlerinden yararlanılarak Ağırlık(kg) / Boy(m²) formülü ile hesaplandı. VKİ’ nin 30 kg/m² üzerinde bulunması obezite olarak kabul edildi.

3.1. Numune Toplanması

Rutin tetkikleri yapılmış olan sağlıklı gönüllülerden ve gönüllü hastalardan yaklaşık olarak 1 cc. kadar kan alındı ve Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi ölçümü için Guthrie kartı üzerine yayıldı. Örnekler en az 4 saat oda ısısında kurumaya bırakıldı. Örnekler kuruduktan sonra nem tutucu saşesi bulunan plastik torbalara konuldu. Hazır bir şekilde ambalajlanan numuneler kurye tarafından Yorkhill Hospital, Glasgow, United Kingdom biyokimya laboratuvarında çalışılmak üzere gönderildi. Aynı gün gönderilemeyen numuneler +4°C'de gönderilecek olan süreye kadar muhafaza edildi. En geç 2 gün içinde numuneler gönderildi. LAL enzim aktivitesi sonuçları E-mail ve ayrıca resmi döküman şeklinde yazılı olarak da bildirildi.

3.2. Materyal-Metod

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Nümerik değişkenler Ortalama +/- standart sapma ve medyan (25. persantil - 75. persantil) ve frekans (yüzdeler) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenlerde Student-t testi, normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Mann Whitney U Testi ile, kategorik değişkenler arasındaki ilişkileri belirlemek için Kikare analizi kullanıldı. Nümerik Değişkenler arasındaki ilişki Pearson ve Spearman Korelasyon Analizi ile değerlendirildi. p<0.05 istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza yaşları 18 ile 60 arasında 10' u kadın, 21' i erkek olmak üzere toplam 31 NASH hastası alındı. Kontrol grubuna ise yaşları 22 ile 74 arasında, 15' i erkek ve 15'i kadından oluşan toplam 30 kontrol grubu çalışmaya alındı. NASH grubunda yaş ortalaması kontrol grubuna göre yüksekti ve ortalanca yaş NASH grubunda 42, kontrol grubunda 36 olarak saptandı fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.220$). Hasta ve kontrol grubunun demografik ve laboratuvar verileri aşağıda (**Tablo-6-7-8**) verilmiştir.

Tablo 6. NASH ve kontrol grubunun antropometrik verileri

Özellikler	Hasta(n=31)	Kontrol(n=30)	p değeri
Yaş (yıl)	42(31-49)	36(27,75-43,75)	0,220
Cinsiyet(E/K)	21/10	15/15	-
Kilo(kg)	96,04±17,38	70,5±14,18	<0,001
Bel çevresi(cm)	110,98±10,92	87,5±15,47	<0,001
BMI(kg/m ²)	30,52(29,2-35,98)	23,52(21,76-28,02)	<0,001

Tablo 7. NASH ve kontrol grubunun Hemogram parametrelerinin karşılaştırılması

Özellikler	Hasta(n=31)	Kontrol(n=30)	p değeri
WBC (x10 ³ /μL)	6,9(6,2-8,42)	7,21(5,55-8,79)	0,829
NEU (x10 ³ /μL)	3,81(2,57-4,7)	4,26(2,91-5,08)	0,245
LYM (x10 ³ /μL)	2,52(2,09-3,14)	1,93(1,79-2,48)	<0,05
HGB (g/dl)	14,98±1,47	13,77±1,91	<0,05
PLT (x10 ³ /μL)	240465,5±56747,2	241900±69496,39	0,930
MPV (fL)	7,55(6,93-8,5)	7,78(7,03-8,85)	0,535
PDW	17,91±1,21	18,28±1,4	0,287
PCT %	0,188±0,04	0,192±0,523	0,760

Tablo 8. NASH ve kontrol grubunun laboratuvar verileri

Özellikler	Hasta(n=31)	Kontrol(n=30)	p değeri
AKŞ (mg/dL)	100(90-120)	86,5(77,75-94,50)	<0,001
AST (IU/L)	51(34-107)	20(15,75-25,25)	<0,001
ALT (IU/L)	114(64-175)	16,5(11-34,25)	<0,001
GGT (IU/L)	76(36-127)	20(13-27,25)	<0,001
ALP (IU/L)	86(70-112)	63(51-78)	<0,001
Total bilirubin (mg/dL)	0,7(0,6-1)	0,6(0,4-0,7)	<0,05
LDH (U/L)	226,94±62,63	188,1±42,11	0,006
HOMA	5,25(3,18-8,57)	3,36(1,57-10,13)	0,150
Folat (ng/dl)	8,37(6,2-10,86)	7,31(6,53-9,68)	0,649
B12 (pg/dl)	346(270-430)	352,5(270-481)	0,646
TSH (µIU/mL)	1,83 (1,05-3,03)	1,29 (1-1,9)	<0,001
ST3 (pg/mL)	3,45±0,44	3,24 ±0,45	0,980
ST4 (ng/dL)	1,12(0,94-1,28)	1,12(1,04-1,17)	0,700
LAL (nmol/punch/h.)	0,40(0,32-0,63)	0,72(0,62-0,93)	<0,001
Trigliserid (mg/dL)	172,38±118,49	128,43±58,13	0,740
CRP (mg/dl)	0,37(0,2-1,08)	0,18(0,08-0,37)	<0,05
LDL (mg/dL)	130,06±39,73	126±24	0,634
HDL (mg/dL)	42,86±10	45,7±11,65	0,320
Total Kolesterol (mg/dL)	204,37±47,46	197,3±29,3	0,492
VLDL (mg/dL)	31,95±16,17	31,98±35,56	0,997
Ferritin (ng/mL)	105,25(50,42-272,5)	87,6(9-106,4)	<0,05
Demir (µg/dL)	94,66±39,7	70,38±41,81	<0,05
Transferrin saturasyonu (µg/dL)	27,77±11,96	25,82±13,22	0,562

Ortalama bel çevresi (cm) NASH grubunda daha yüksekti ve NASH grubunda ortalama 110.98±10.92 saptanırken, kontrol grubunda ise 87.5±15.47 saptandı ve bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıdır (p<0.001). NASH hastalarında vücut ağırlığı (kg) ortalaması kontrol grubundan daha yüksekti ve sırasıyla NASH grubunda 96.04±17.38, kontrol grubunda ise 70.5±14.18 saptandı ve bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıdır (p<0.001). Tüm hastalar VKİ'ne göre (kg/m²) karşılaştırıldığında NASH hasta grubunda kontrol grubuna göre obez veya aşırı kilolu birey sıklığı daha fazlaydı. BMI ortanca değeri NASH grubunda 30.52 (29,2-35,98) saptanırken kontrol grubunda 23.52 (21,76-28,02) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı (p<0.001).

Nonalkolik steatohepatit grubunda AKŞ (mg/dl), AST (IU/L), ALT (IU/L), GGT (IU/L), ALP (IU/L) ortanca değerleri kontrol grubuna göre daha yüksekti ve NASH grubunda sırasıyla 100 (90-120), 51 (34-107), 114 (64-175), 76 (36-127), 86 (70-112) saptanırken kontrol grubunda ise sırasıyla 86.5 (77,75-94,50), 20 (15,75-25,25) , 16.5 (11-34,25), 20 (13-27,25) , 63 (51-78) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p<0.001$).

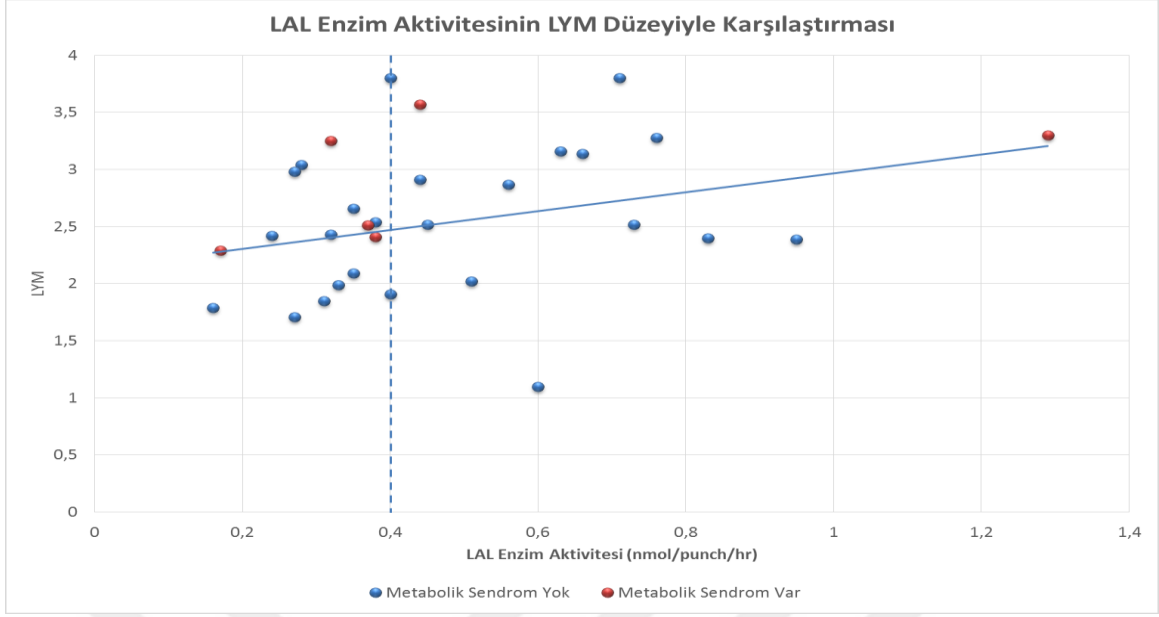
Ayrıca HOMA-IR ortanca değeri NASH grubunda daha yüksekti ve NASH grubunda 5.25 (3,18-8,57), kontrol grubunda 3.36 (1,57-10,13) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,150$). CRP (mg/dl) düzeyleri NASH grubunda ortanca değeri 0,37(0,2-1,08) ve kontrol grubunda ise 0,18(0,8-0,37) şeklinde, NASH grubunda daha yüksekti ($p<0.05$).

Folat düzeyi (ng/dL) ortanca değeri NASH grubunda daha yüksekti ve NASH grubunda 8.37 (6,2-10,86), kontrol grubunda ise 7.31 (6,53-9,68) olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.649$). Vitamin B12 (pg/dl) ortanca değeri NASH grubunda 346 (270-430), kontrol grubunda 352.5 (270-481) şeklinde kontrol grubunda daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.646$).

Ferritin (ng/mL) ortanca değeri NASH grubunda daha yüksek saptandı ve NASH grubunda 105,25 (50,42-272,5), kontrol grubunda ise 87,6 (9-106,4) düzeyindeydi ve bu yükseklik istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı saptandı ($p<0.001$). Serum demir ($\mu\text{g/dL}$) düzeyi ortalaması NASH hasta grubunda $94,66\pm 39,7$ saptanırken, kontrol grubunda $70,38\pm 41,81$ saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

Yaş ve diğer laboratuvar verileri arasında NASH ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

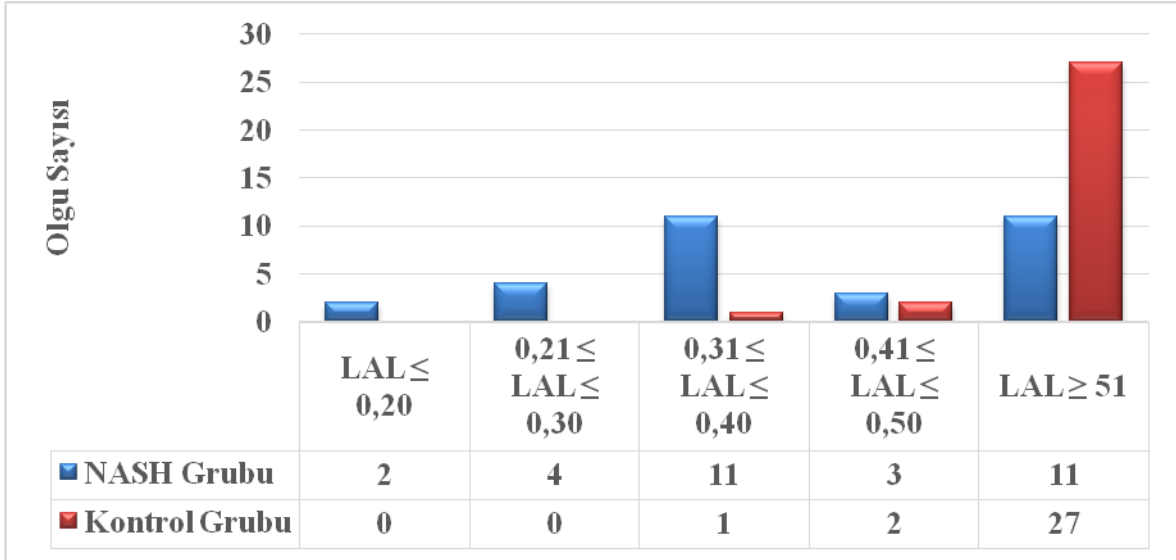
NASH grubunda LYM sayısı ortanca değeri kontrol grubuna göre daha yüksek saptandı ve NASH grubunda 2.52 (2,09-3,14), kontrol grubunda 1.93 (1,79-2,48) şeklindeydi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) saptandı (**Şekil-5**).



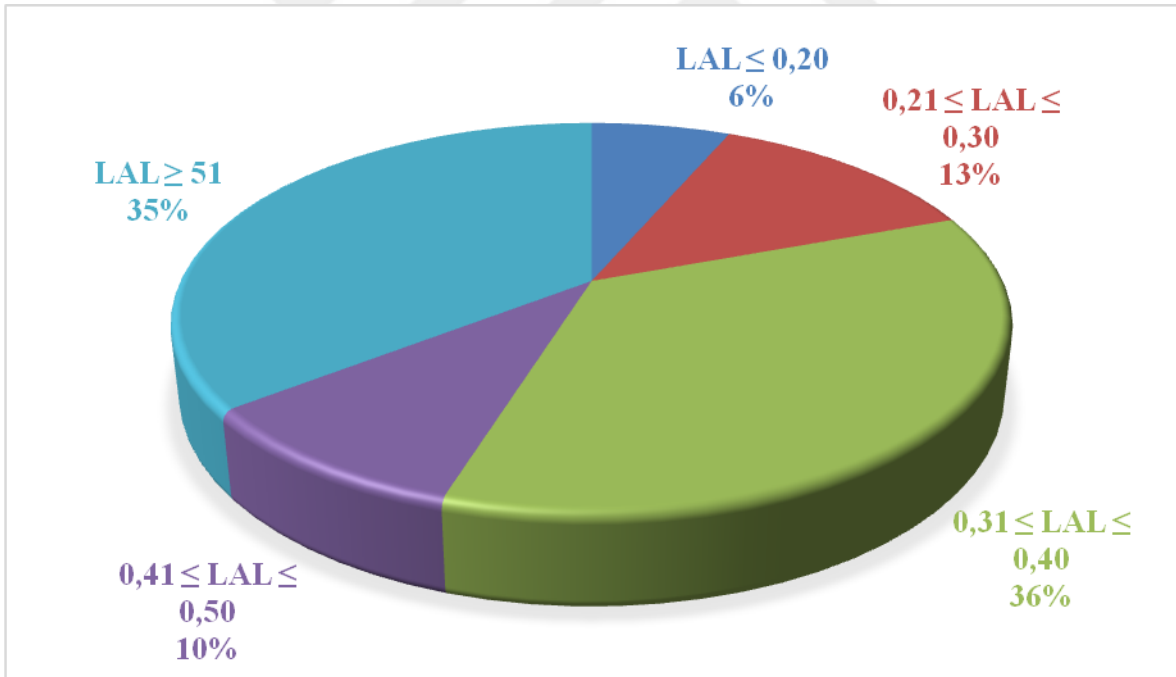
Şekil 5. LAL enzim aktivitesinin LYM düzeyiyle karşılaştırılması

Hemoglobin (g/dl) ortalama değeri NASH grubunda daha yüksekti ve sırasıyla $14.98 \pm 1,47$ ve $13.77 \pm 1,91$ şeklinde saptanmış olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). NASH grubunda TSH ($\mu\text{IU/ml}$) ortanca değeri kontrol grubuna göre daha yüksekti ve sırasıyla 1.83 (1,05-3,03) ve 1.29 (1-1,9) saptandı ve bu yükseklik istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$).

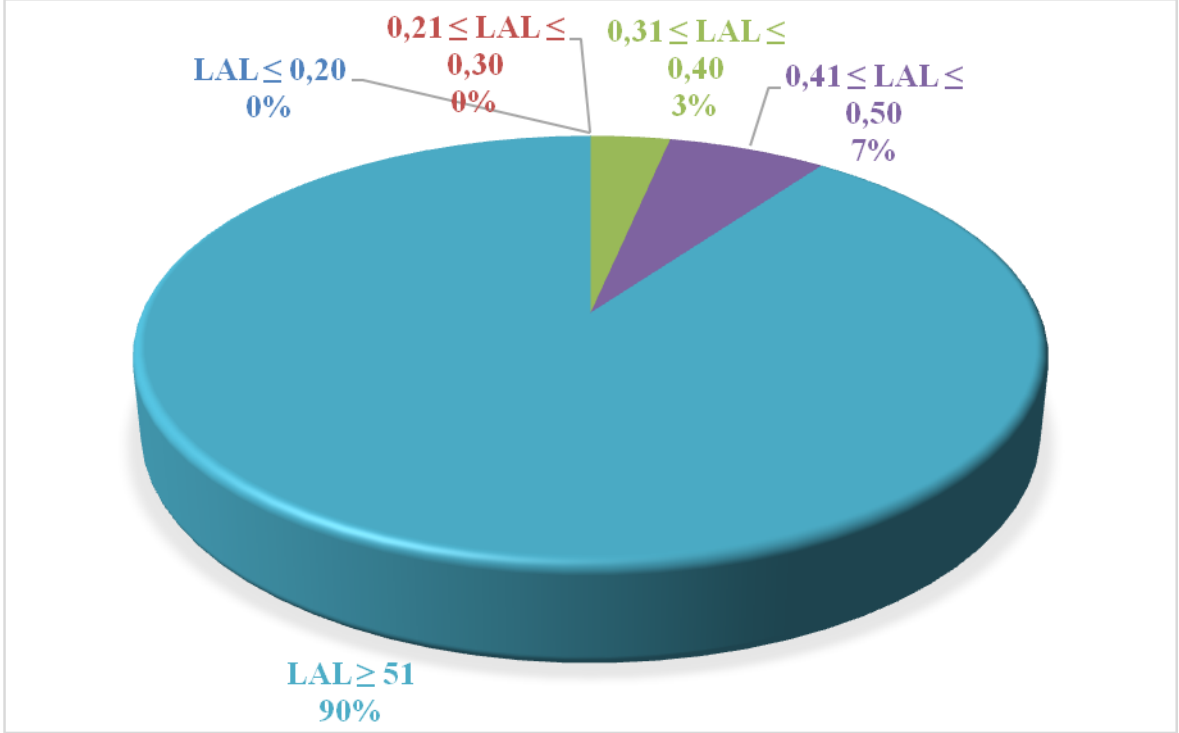
Yine yapılan analizler sonucu NASH grubunda Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi kontrol grubuna göre belirgin olarak düşüktü ve ortanca değer NASH grubunda 0.4 (0,32-0,63) (nmol/punch/h.), kontrol grubunda ise 0.72 (0,62-0,93) (nmol/punch/h.) saptandı ve bu düşüklük istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı saptandı ($p < 0,001$). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde çalışmaya alınan kontrol grubu ve NASH hastalarında LAL aktivitesi açısından yapılan değerlendirmede NASH hastalarının %64,51 kadarında LAL aktivitesi $\leq 0,50$ (nmol/punch/h.) iken, kontrol grubunun ise %10 kadarında LAL aktivitesi $\leq 0,50$ (nmol/punch/h.) olarak tespit edildi. NASH ve kontrol grubunda LAL aktivite düzeyi ile olgu dağılımı (**Şekil-6**), NASH grubunun (**Şekil-7**), ve kontrol grubunun (**Şekil-8**) LAL aktivitesine göre dağılımı verilmiştir.



Şekil 6. NASH ve kontrol grubunda LAL aktivitesine göre olgu sayıları

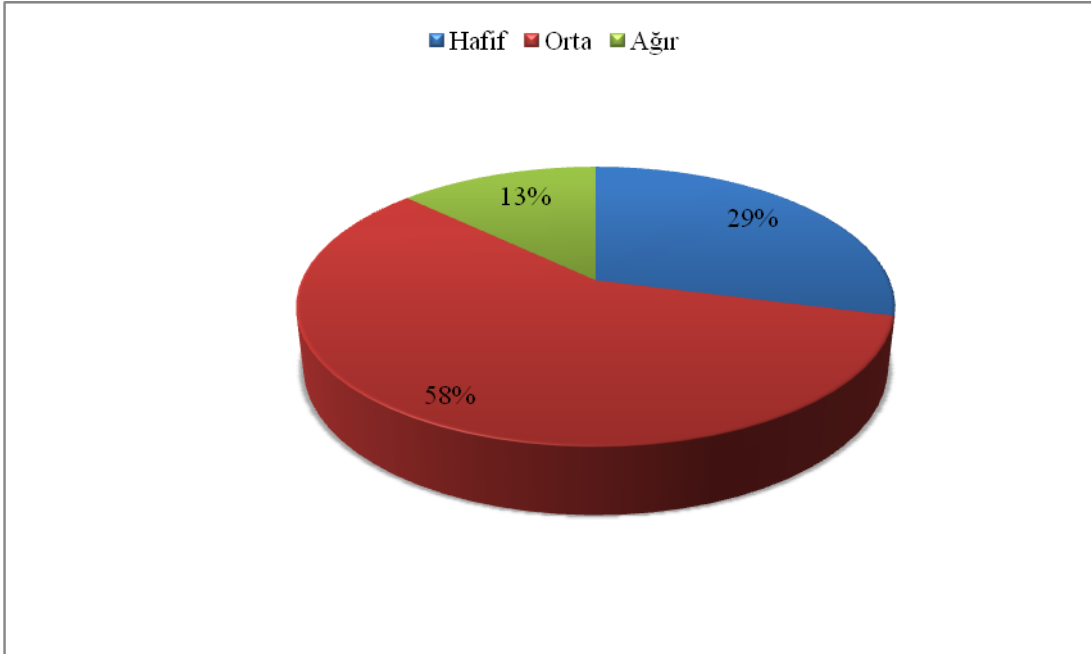


Şekil 7. NASH grubunda LAL aktivitesine göre dağılım



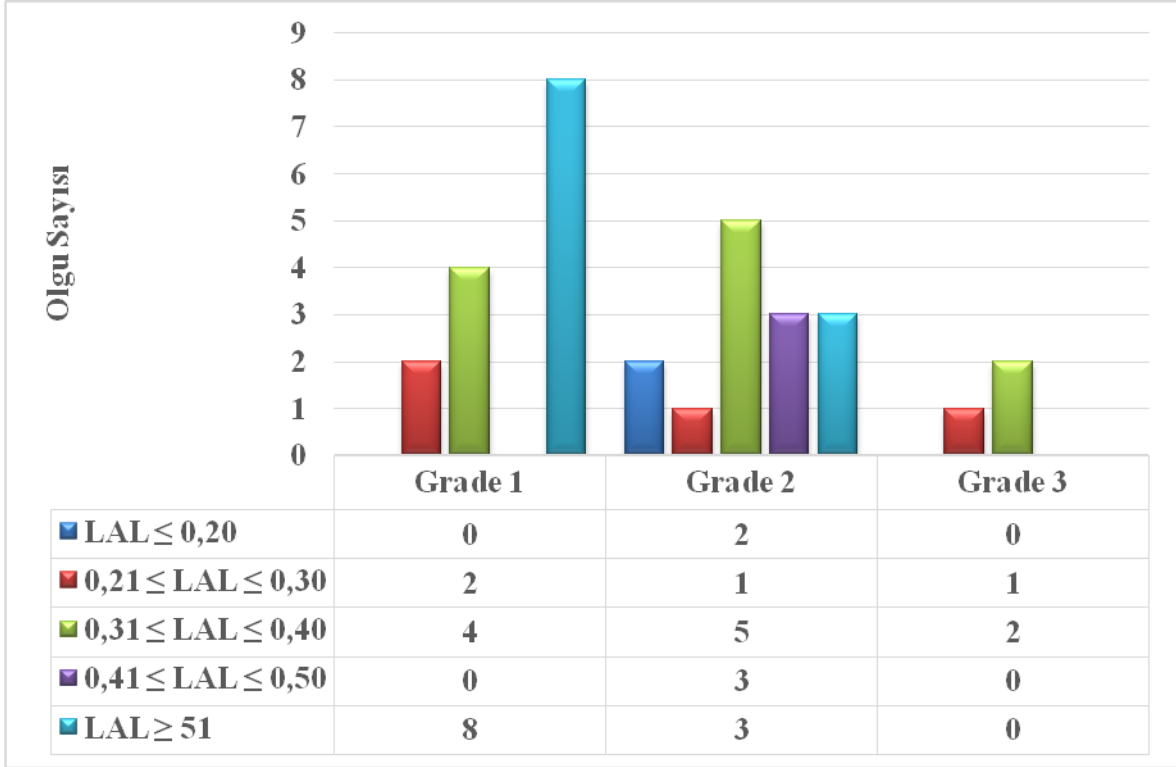
Şekil 8. Kontrol grubunda LAL aktivitesine göre dağılım

Hastaların %29' unde hafif steatoz (<%5-%33) , %58' inde orta dereceli steatoz (%33-%66) ve %13' ünde ise ağır steatoz(>%66) saptandı (**Şekil-9**).



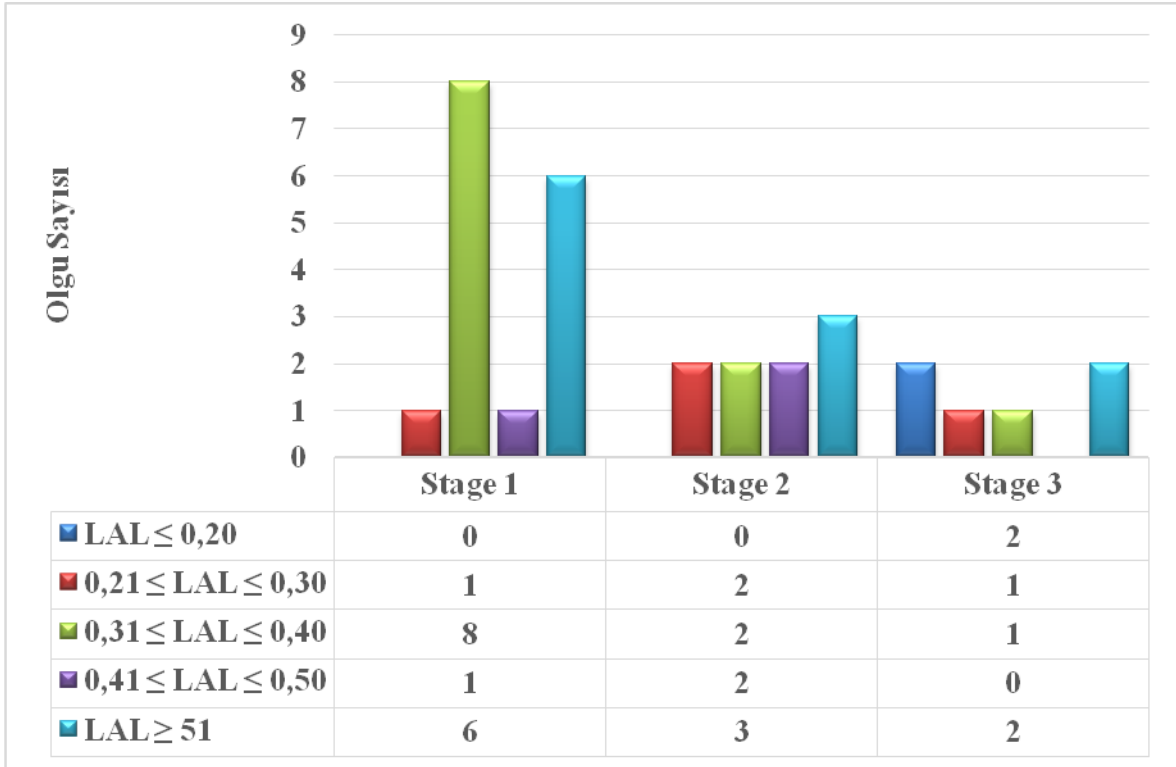
Şekil 9. NASH hastalarının biyopsilerinin steatoz derecelerine göre dağılımı

Hastalar biyopsileri Brunt sınıflamasına göre histolojik gradeleri açısından kıyaslandığında %45'i grade 1, %45' i grade 2, %10' u grade 3 olarak saptandı. Ayrıca düşük LAL aktivite aralığında grade 3 hastalar, daha yüksek LAL aktivite aralığında ise grade 1 hastalar yoğunlukta idi (**Şekil-10**).



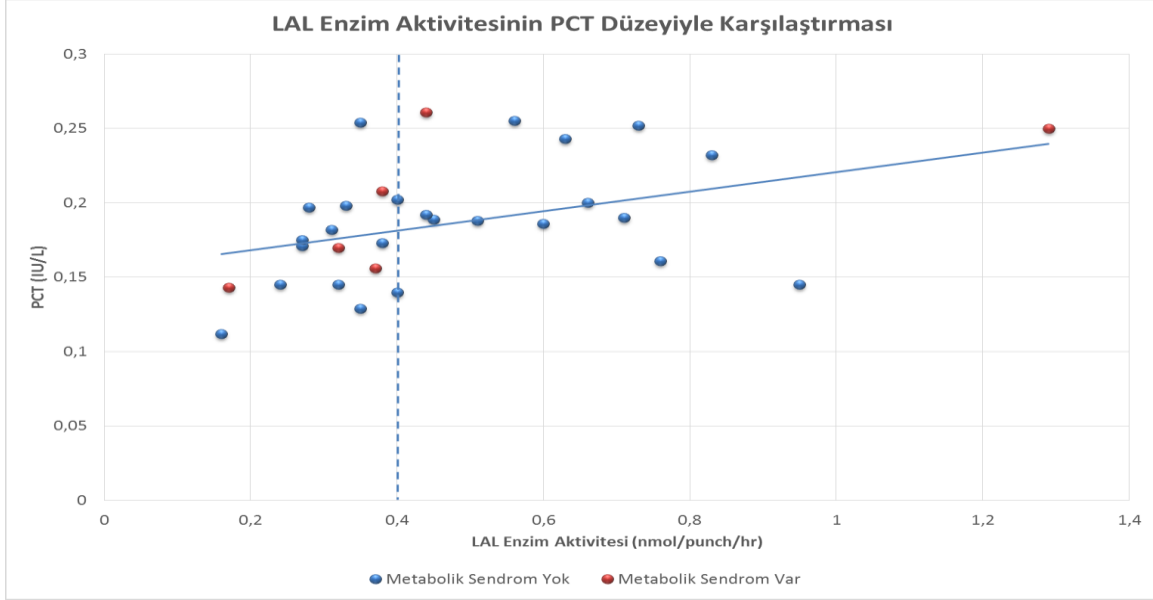
Şekil 10. NASH grubunda LAL aktivitesine göre grade

Hastalar Brunt sınıflamasına göre histolojik stagelerine göre kıyaslandığında %19,35'inde köprüleşme fibrozisi (stage 3), %29,03'ünde perisinuzoidal ve portal/periportal fibrozis (stage2), %51,6'sında periportal veya perisinuzoidal fibrozis (stage 1) saptandı. Karaciğer biyopsilerinde siroz (stage 4) saptanan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Ayrıca düşük LAL aktivite aralığında stage 3 daha yoğun görülürken, daha yüksek LAL aktivite aralığında ise stage 1 olan hasta sayısı hakimdi (**Şekil-11**).



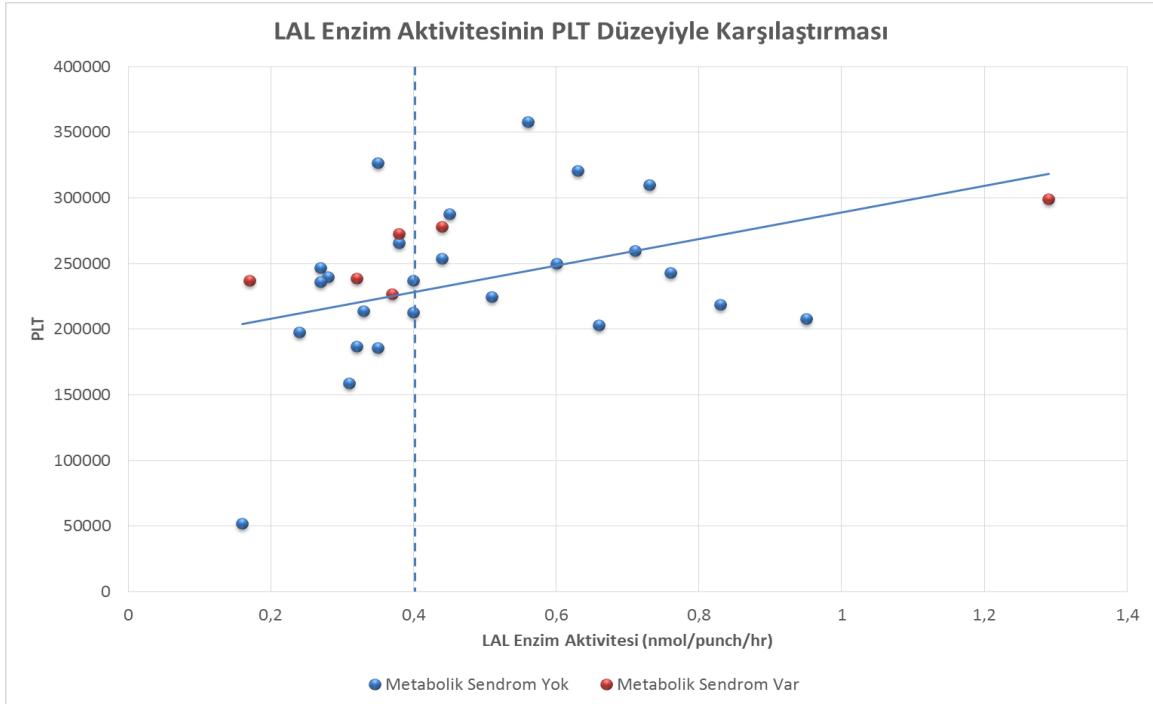
Şekil 11. NASH grubunda LAL aktivitesine göre stage

Yapılan korelasyon analizinde ilginç olarak Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi ile PCT arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.013$, $R: 0.442$) pozitif korelasyon saptandı (**Şekil-12**).



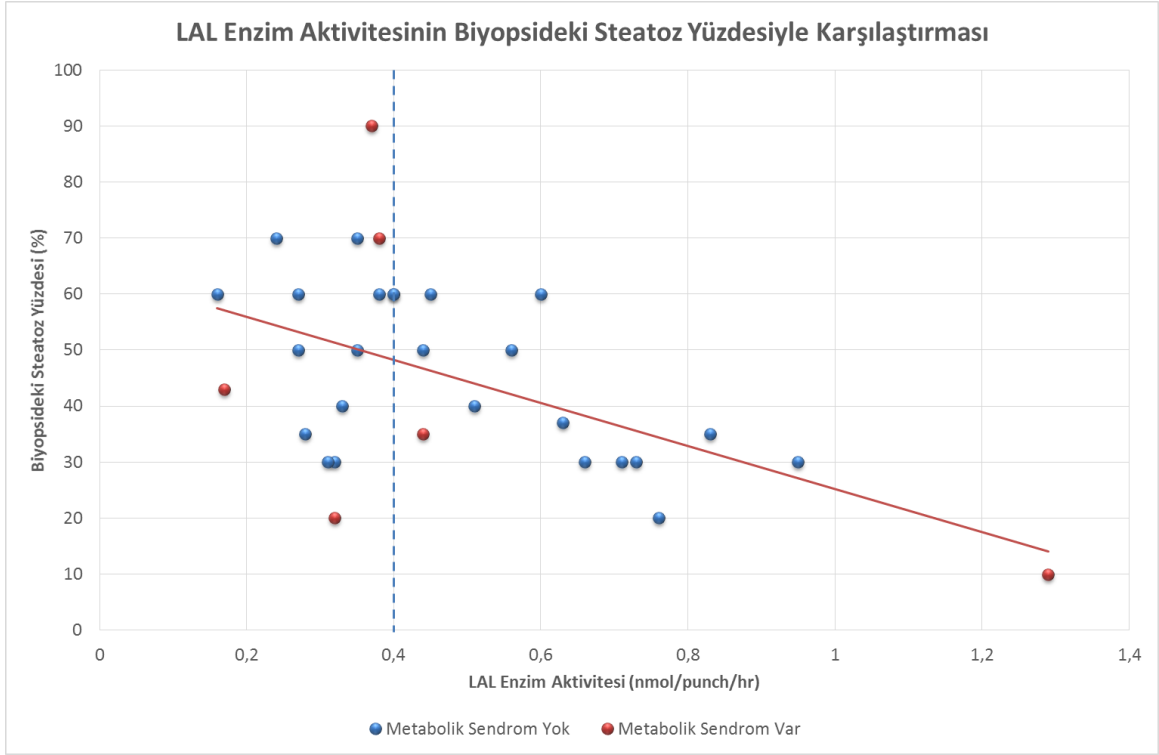
Şekil 12. LAL enzim aktivitesinin PCT düzeyiyle karşılaştırılması

Lizozomal Asit Lipaz Enzim aktivitesi ile trombosit sayısı arasında ilginç olarak istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.048$, $R: 0.338$) pozitif korelasyon saptandı (**Şekil-13**).



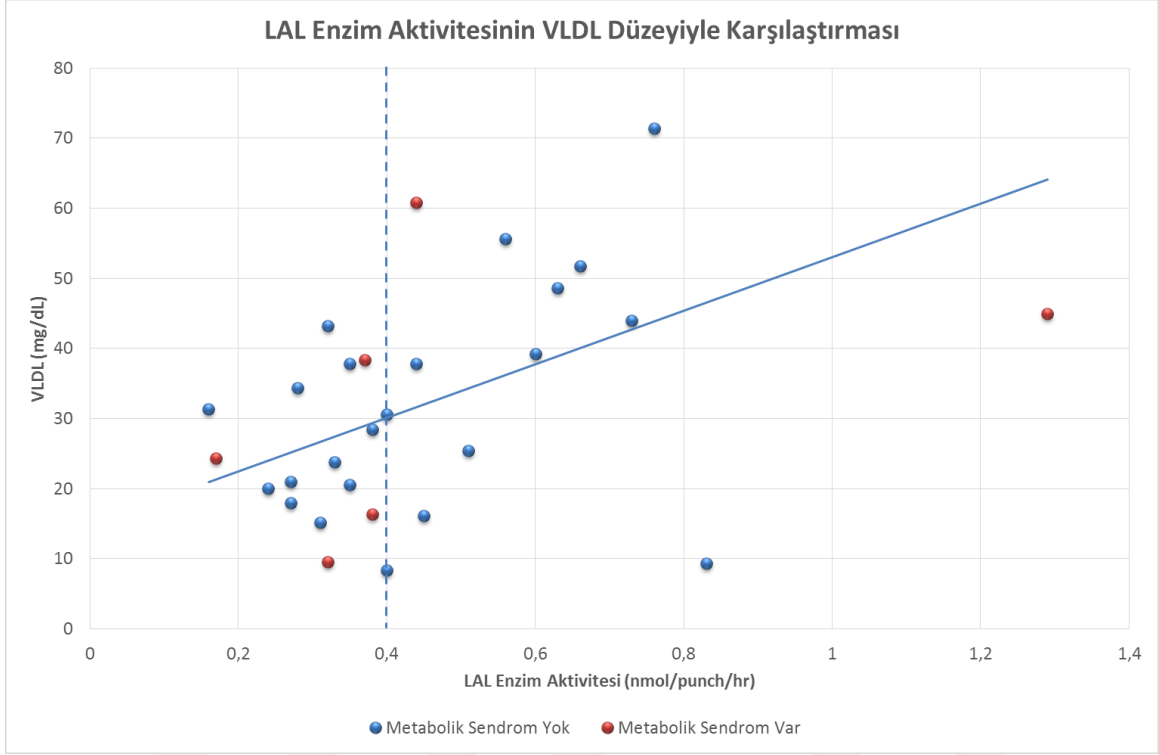
Şekil 13. LAL enzim aktivitesinin PLT düzeyiyle karşılaştırılması

Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi ile biyopsideki steatoz yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.025$, $R: -0.401$) negatif korelasyon saptandı (**Şekil-14**).



Şekil 14. LAL enzim aktivitesinin biyopsideki steatoz yüzdesiyle karşılaştırılması

Yine Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi ile VLDL arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.025$, $R: 0.416$) pozitif korelasyon saptandı (**Şekil-15**).



Şekil 15. LAL enzim aktivitesinin VLDL düzeyiyle karşılaştırılması

HOMA-IR'nın total bilirubin ($p=0.004$) ve WBC ($p=0.009$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı. PCT ile ALT arasında istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı korelasyon saptandı ($p=0.023$).

5. TARTIŞMA

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), insülin direnci, visseral obezite, dislipidemi, diyabet, hipertansiyon gibi risk faktörlerine sahip olan hastalarda sık görülmektedir ve ayrıca metabolik sendromun hepatik bir belirtisi olarak kabul edilmektedir. NAFLD tablosunun sıklığı gün geçtikte artmakta olup ciddiyeti gittikçe önem kazanan yaygın bir sağlık problemi haline gelmiştir (15).

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, NAFLD) hafif karaciğer yağlanmasından, yaygın karaciğer yağlanması, steatohepatit, karaciğer fibrozisi, hepatoselüler karsinom, siroza kadar ilerleyebilen geniş bir yelpazeden oluşmaktadır (1). NASH tablosu inflamatuvar süreç ve fibrozisin eşlik ettiği ve NAFLD yelpazesi içinde bulunan bir hastalıktır.

Günümüzde NASH kriptojenik karaciğer sirozunun en sık sebebi olarak kabul edilmektedir (40). Bundan dolayı NASH hastalığının erken tanınması ve tedavisi çok önemlidir. NASH'a benzer karaciğer hasarı oluşturan Lizozomal Asit Lipaz aktivitesinde tam eksiklik ölümcül olan Wolman hastalığı ile sonuçlanmaktadır. LAL aktivitesinde tam eksiklik doğum sonrası ilk haftalarda kendini gösterir ve genellikle 6-12 ay sonunda çoklu organ yetmezliği sonucu hastalar kaybedilir (99). LAL-D (Lizozomal Acid Lipase Deficiency) otozomal resesif bir hastalık olup etkilenen bireylerde ya homozigot ya da karışık heterozigot mutasyon mevcuttur buna rağmen bazı bireyler gizli mutasyonlara sahiptir. Saçma mutasyon, frameshift defekt ve stop kodonunda oluşan nokta mutasyonlar en ağır mutasyonlardır ve genellikle Wolman hastalığı tanımlı infantlarda saptanır. Fakat çocuk ve erişkinlerde daha hafif mutasyonların mevcut olduğu düşünülmektedir (106).

NASH ve Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi arasındaki ilişkinin tam olarak bilinmemesine karşılık, LAL eksikliği histopatolojisine benzer özelliklere sahip olan NASH hastalarında LAL aktivitesinin değerlendirildiği ve hafif mutasyonların klinik bulgu ve sonuçlarının hedefleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda esas olarak Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi ile NASH hastalığı arasındaki ilişkiyi ve NASH'ın etiopatogenezinde LAL aktivitesinin rol alıp almadığının araştırılması hedeflendi.

Bu iki grup arasında LAL aktivitesi bakımından NASH hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük LAL aktivitesi saptandı ($P < 0.001$). Kontrol grubu ve NASH hastalarında LAL aktivitesi açısından yapılan değerlendirmede NASH hastalarının %64,51 kadarında LAL aktivitesi $\leq 0,50$ (nmol/punch/h.) iken kontrol

grubunun ise %10 kadarında LAL aktivitesi $\leq 0,50$ (nmol/punch/h.) olarak tespit edildi. Bu sonuç düşük LAL aktivitesine neden olabilen farklı mutasyon veya genetik defektler sonucu NASH gelişimi ve NASH'ın nihai sonlanım noktaları olabilen kriptojenik siroza yol açabileceği sonucunu vermektedir.

PCT; MPV ve PDW'den türetilmiş bir terimdir ve hekimler tarafından yakın zamana kadar pek önemsenmemiştir. Son çalışmalarla birlikte PCT'nin otoimmün gastrit, aktif crohn hastalığı, akciğer tüberkülozu, koroner arter hastalığı, Diyabetes Mellitus gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda arttığını bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (128-131).

Hasta ve kontrol grubu arasında PCT (Plateletcrit) değerleri açısından bir fark olmamasına rağmen Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi ile PCT arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi ($p=0.013$, R: 0.442), bu sonuç yukarıda belirtilen diğer kronik inflamatuvar hastalıklarda görülen PCT değerindeki yükselmenin aksine bu çalışmada düşük PCT değerleri elde edilmiştir, ayrıca literatürde bu konuda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Yine elde edilen sonuçlarla Lizozomal asit lipaz ile biyopsideki steatoz yüzdesi arasında negatif anlamlı korelasyon saptandı ve yine bu konuda literatürde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır ($p=0.025$). Bu sonuç LAL aktivitesinin düşüklüğü nisbetinde karaciğer yağlanma derecesinin arttığını göstermektedir.

Ayrıca yapılan bu çalışmada Nonalkolik steatohepatitin beklenen laboratuvar bulgularına benzer şekilde Total bilirubin ($p<0.05$), ALT, AST, ALP, GGT düzeyleri ($p<0.001$) kontrol grubundan yüksekti.

LAL-D olan hastalar tipik olarak lipid bozukluklarıyla; artmış total serum kolesterol, yüksek LDL, VLDL, düşük HDL kolesterol ve bazen yüksek trigliserid seviyeleriyle başvurabilirler (104). Bizim çalışmamızda ise beklendiği gibi Total kolesterol, Trigliserid, LDL düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$), VLDL açısından değerlendirildiğinde ise NASH grubunda VLDL düzeyi daha düşüktü ve kontrol grubu ile VLDL bakımından fark saptanmadı ($p>0.05$) ancak Lizozomal asit lipaz aktivitesi ile VLDL arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0.025$) ve yine literatürde buna yönelik birebir yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde NASH hastalarında serum ve karaciğerde demir seviyesinin yükselebileceği ayrıca serum ferritin düzeyinde %20-50 oranında yükseklik saptanabileceği ve bu

yüksekliğin ilerlemiş hastalık tablosunun bulgusu olabileceği söylenmektedir (53,73). Bizim çalışmamızda da Literatür verileriyle örtüşen şekilde serum ferritin ve demir düzeyleri kontrol grubundan yüksekti ve ferritin ortanca değeri NASH grubunda kontrol grubundan yüksekti ($p<0.001$) ve serum demir düzeyi ortalaması NASH hasta grubunda, kontrol grubundan yüksek saptanmıştır ($p<0.05$).

Yine NASH hastalarında beklendiği üzere ortalama bel çevresi ve vücut ağırlığı NASH grubunda, kontrol grubundan yüksekti her iki yükseklik istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p<0.001$).

Literatürde VKİ, 30 kg/m^2 ve üzerinde olanlarda NAFLD sıklığı %60-95, tip 2 diyabetiklerde %28-55 ve hiperlipidemisi olanlarda %20-92 olarak bildirilmiştir (1,27,28). Bizim çalışmamızda ise hastaların %49.6'sında obezite, %19.35 metabolik sendrom, %64.5'inde hiperlipidemi ve %88 oranında insülin direnci mevcuttu. Literatürde morbid obez olanlarda NAYKH oranı %90'lara çıkmaktadır ve bu hastalarda NASH oranı %9-40 arasındadır.

Yine NASH sıklığı genel popülasyonda %2-3, obezlerde %20-30 ve morbid obezlerde %50' ye ulaşabilir (4-6). Bizim çalışmamızda ise tüm hastalar VKİ'ne göre karşılaştırıldığında NASH hasta grubunda kontrol grubuna göre obez veya aşırı kilolu birey sıklığı daha fazlaydı ($p<0.001$). Ayrıca bu çalışmada NASH hasta grubu içerisinde obez hasta oranı %49.6 iken, morbid obez olan hastalar ise NASH hastalarının %16.2'sini oluşturuyordu. Yine bizim çalışmamızda NASH grubunda HOMA-IR ortanca değeri kontrol grubundan yüksek saptandı. Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere literatür verileri ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da insülin direnci, hiperlipidemi ve obezite NASH hastalarında en sık risk faktörlerini oluşturuyordu.

6. SONUÇ

31 NASH hastası ve 30 kontrol grubu olmak üzere 61 kişiden oluşan , yaş aralığı geniş (18-74) olan çalışmamızda sonuç olarak şu kanılara varıldı.

Nonalkolik steatohepatit hastalarında insülin direnci, visseral obezite, dislipidemi, diyabet, hipertansiyon gibi risk faktörleri en sık olan etiyolojik faktörler arasında yer almaktadır.

Non alkolik steatotohepatit olan hastalardaki Lizozomal Asit Lipaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre düşük saptanması ve NASH grubunun önemli oranda <0.37 (nmol/punch/h.) sınırının altında saptanması ve kontrol grubundan bu sınırın altında hiçbir bireyin olmaması; NASH etiyopatogenezinde LAL enzim aktivitesini azaltan genetik mutasyonların rol alabileceğini göstermektedir.

Non alkolik steatohepatit'e ve NASH'a bağlı gelişen kronik karaciğer hastalığı, kriptojenik siroz ve HCC gelişiminde çevresel ve genetik faktörler sorumlu tutulmaktadır. Bu sonuçlar LAL enzim aktivitesindeki eksikliğin NASH etiyopatogenezinde önemli rolünün olduğu ve bu konuda daha çok çalışmanın yapılmasına ihtiyaç duyulduğu gerçeğini göstermektedir.

7. ÖZET

Nonalkolik steatohepatit (NASH), günümüzde sık görülen karaciğer hastalıklarındandır. NASH etyopatogenezinde obezite, diyabet, hiperlipidemi, insülin direnci gibi metabolik sendrom parametreleri suçlanmaktadır. Lizozomal asit lipaz eksikliği; LIPA geninde mutasyon sonucu oluşur. LAL tam eksikliğinde Wolman Hastalığı gelişmektedir, çocuk ve erişkinlerde ise daha hafif mutasyonlara bağlı NASH tablosuna benzer karaciğer histopatolojik bulguları görülmektedir. Literatürde NASH hastalarında LAL düzeyinin hastalık ile ilişkisi olup olmadığını araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda NASH hastalarında LAL enzim düzeylerini belirleyerek, LAL'in NASH etyopatogenezinde rolünün olup olmadığını araştırmayı hedefledik.

Bu çalışmada karaciğer biyopsisi ile doğrulanmış NASH hastaları ile Ultrasonografik değerlendirmede karaciğer yağlanması olmayan, karaciğer fonksiyon testleri normal sağlıklı gönüllü kontrol grubu karşılaştırıldı. İki grup; demografik veriler, Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi, metabolik sendrom parametreleri ve karaciğer fonksiyon testleri açısından karşılaştırıldı. Ayrıca NASH grubunun karaciğer biyopsisi bulguları ile, LAL aktivitesi arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı. LAL enzim aktivitesinin ölçülmesi Yorkhill Hastanesi Biyokimya Bölümü, Uunited Kingdom'da, DBS (dry blood spotting) yöntemi ile gerçekleştirildi. DBS ekstrelerinde LAL aktivitesi substrat olarak 4-metilumbelliferil palmitat kullanılarak ölçülmüştür. LAL aktivitesi Lalistat 2 varlığında ve yokluğunda, toplam lipaz aktivitesi değerlendirilerek belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılık için Student-t testi ve Mann Whitney-U Testi, kategorik değişkenler arasındaki ilişkileri belirlemek için Ki-kare testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyon için Pearson ve Spearman Korelasyon Analizi kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmaya yaşları 18 ile 60 arasında 10' u kadın, 21' i erkek toplam 31 NASH hastası alındı. Kontrol grubuna ise yaşları 22 ile 74 arasında, 15' i erkek ve 15'i kadın 30 sağlıklı gönüllü birey alındı. NASH grubunda yaş ortalaması kontrol grubuna göre yüksekti ve ortanca yaş sırasıyla 42 ve 36 olarak saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamsızdı. NASH grubunda Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi kontrol grubuna göre belirgin olarak düşüktü ve ortanca değer NASH grubunda 0.4 (0,32-0,63) (nmol/punch/h.), kontrol grubunda ise 0.72 (0,62-0,93) (nmol/punch/h.) saptandı ve bu fark istatistiksel olarak

anlamli saptandı (p<0.001). LAL aktivitesinde sınır kabul edilen 0.37 (nmol/punch/h.)'in altında olan hasta oranı NASH grubunda %42 saptanırken, kontrol grubunda ise bu seviyenin altında hiç hasta yoktu. Laboratuvar tarafından LAL aktivite eksikliği açısından kabul edilen 0.50 (nmol/punch/h.) sınır kabul edildiğinde; NASH hasta grubunun %65'i , kontrol grubunun ise %10'u bu eşik değerin altında saptandı. NASH grubunda LAL enzim aktivitesi ile; biyopsideki steatoz yüzdesi arasında negatif yönde anlamlı korelasyon saptandı (p=0.025, R:-0.401). LAL aktivitesi ile PCT (P=0.013, R: 0.442), PLT sayısı (p=0.048, R: 0.358) ve VLDL(p=0.025, R: 0.416) arasında ise pozitif korelasyon saptandı.

Çalışmamız NASH'lı hastalarda LAL aktivitesinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışmamızda NASH'lı grupta Lizozomal Asit Lipaz aktivitesinin kontrollere göre anlamlı düzeyde düşük bulunması ve bunun karaciğer biopsisindeki steatoz yüzdesi ile negatif korelasyon göstermesi, NASH etyopatogenezinde LAL enzim aktivitesinin de rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Non alkolik Steatohepatit, Lizozomal Asit Lipaz aktivitesi, kriptojenik siroz

8. ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is one of the common liver diseases today. Metabolic syndrome parameters, such as obesity, diabetes, hyperlipidemia, insulin resistance are accused of the pathogenesis of NASH. Lysosomal acid lipase (LAL) deficiency occurs as the result of mutations in LIPA gene. Wolman disease is the infantile form of the disease which is the result of complete absence of LAL activity. On the other hand milder mutations results in NASH like histopathological findings in the liver for children and adults and called as Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD). In the literature, there are no previous studies investigating the relationship with LAL enzyme levels in NASH patients. In our study we aimed to investigate the role of LAL enzyme activity in the pathogenesis of NASH by measuring the LAL enzyme levels in NASH patients.

In this study, liver function tests of the patients with NASH who are confirmed with liver biopsy compared to normal healthy control subjects without fatty liver disease which is evaluated by ultrasonography. The two groups were compared in terms of demographic data, lysosomal acid lipase activity metabolic syndrome parameters and liver function tests. In addition, liver biopsy findings of NASH group has investigated whether the relationship between LAL activity. The measurement of LAL enzyme activity was performed with dry blood spotting method in the Biochemistry Department of Yorkhill Hospital, United Kingdom. LAL activity in DBS extracts was measured using the substrate 4-methylumbelliferyl palmitate. LAL activity was determined by evaluating the total lipase activity in the presence and absence of Lalistat 2.

Student's t-test and Mann-Whitney U test were used for differences between groups and Chi-square analysis was used to determine the relationship between categorical variables. For the correlations between variables Pearson and Spearman's correlation analysis was used, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Total of 31 patients with NASH, aged between 18 and 60 (10 female, 21 male) were enrolled to the study. The control group was 30 healthy volunteers aged between 22 and 74 (15 male and 15 female). The mean age was higher in the NASH group compared to the control group and mean age was found to be 42 and 36, respectively. This difference was

not statistically significant. Lysosomal acid lipase activity is significantly lower in NASH group compared to the control group. The median LAL activity in the NASH group was 0.4 (0.32 to 0.63) (nmol / punch / hr.) and 0.72 (0.62 to 0.93) (nmol / punch / h.) in the control group with a statistically significant difference in between two groups ($p < 0.001$). The percentage of patients who are under the acceptable limits for the LAL activity 0.37 (nmol / punch / h.) was found as 42% in the NASH group but there were no patients in the control group at this level. When 0.50 (nmol / punch / h.) was accepted as threshold for the lack of activity which was set by the laboratory; 65% of patients in NASH group and only 10% of subjects in the control group were below this threshold. In the NASH group; the percentage of steatosis on biopsy was negatively correlated with LAL enzyme activity ($p = 0.025$, $R: -0.401$). There was a positive correlation between LAL enzyme activity and PCT ($P = 0.013$, $R: 0.442$), PLT count ($p = 0.048$, $R: 0.358$) and VLDL ($p = 0.025$, $R: 0.416$).

Our study is the first study in the literature investigating the LAL activity in NASH patients. In the study, lysosomal acid lipase activity in NASH group was significantly lower compared to controls and there was a negative correlation between the percentage of steatosis on liver biopsy and LAL activity that shows the LAL enzyme activity may also play a role in the pathogenesis of NASH.

Keywords: Non-alcoholic steatohepatitis, lysosomal acid lipase activity, cryptogenic cirrhosis

9. KAYNAKLAR

1. Matteoni, C.A., et al., Nonalcoholic fatty liver disease: aspectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999. 116(6): p.1413-9.
2. Younossi, Z.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations*. *Mod Pathol*, 1998. 11(6): p. 560-5.
3. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. *Hepatology*, 2010. 52(5): p. 1836-46.
4. Dowman, J.K., J.W. Tomlinson, and P.N. Newsome, *Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011. 33(5): p. 525- 40.
5. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update*. *Obes Rev*, 2010. 11(6): p. 430-45.
6. Krawczyk, M., L. Bonfrate, and P. Portincasa, *Nonalcoholic fatty liver disease*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010. 24(5): p. 695-708.
7. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes*. *Hepatology*, 2006. 44(4): p. 865-73.
8. Soderberg, C., et al., *Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up*. *Hepatology*, 2010. 51(2): p. 595-602.
9. Fierbinteanu-Braticevici, C., et al., *Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis*. *World J Gastroenterol*, 2010. 16(38): p. 4784-91.
10. Adams, L.A. and A.E. Feldstein, *Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis*. *J Dig Dis*, 2011. 12(1): p. 10-6.
11. Miller M. H., F.M.A., Dillon JF. , *Systematic review of performance of noninvasive biomarkers in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease*, in *Liver Int*. 2011. p.461-473.
12. Kopec, K.L. and D. Burns, *Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy*. *Nutr Clin Pract*, 2011. 26(5): p. 565-76.
13. Falck-Ytter, Y., et al., *Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes*. *Semin Liver Dis*, 2001. 21(1): p. 17-26.

14. Ploeg R. J., D.A.A., Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al, *Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis*. *Transplantation*, 1993. 55: p. 807–13.
15. *Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Final Report. (Adult Treatment Panel III)*, in *Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP)* 2002. p. 3143–421.
16. Shulman A.I., M.D.J., *Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome*. *N Engl J Med*, 2005. 353: p. 604-15.
17. Tilg, H.D., A. M., *Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis*. *N Engl J Med*, 2000. 343(20): p. 1467-76.
18. Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, *Obesity, inflammation, and insulin resistance*. *Gastroenterology*, 2007. 132(6): p. 2169-80.
19. McCullough, A.J., *Update on nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Gastroenterol*, 2002. 34(3): p. 255-62.
20. Clark, J.M., *The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults*. *J Clin Gastroenterol*, 2006. 40 Suppl 1: p. S5-10.
21. Haslam D.W., J.W.P., *Obesity*. *Lancet*, 2005. 366: p. 1197–209.
22. Neuschwander-Tetri, B.A. and B.R. Bacon, *Nonalcoholic steatohepatitis*. *Med Clin North Am*, 1996. 80(5): p. 1147-66.
23. Loguercio C, D.S.T., D'Auria MV, de S, I, Federico A, Tuccillo C, et al. , *Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver*. . *Dig Liver Dis* 2004. 36: p. 398–405.
24. Loguercio C., D.G.V., De Sio I., Tuccillo C., Ascione A., Baldi F., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects*. *J Hepatology*, 2001. 35: p. 568–74.
25. Alexander, W.S., et al., *Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6*. *Curr Biol*, 1999. 9(11): p. 605-8.
26. El-Hassan AY, I.E., Al-Mulhim FA et al. , *Fatty infiltration of the liver: analysis of prevalence, radiological and clinical features and influence on patient management*. *Br J Radiol*, 1992. 65: p. 774-778.
27. Lee, R.G., *Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients*. *Hum Pathol*, 1989. 20(6): p. 594-8.

28. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. *Mayo Clin Proc*, 1980. 55(7): p. 434-8.
29. Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:1048-58.
30. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49:306-17.
31. de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008; 48 (Suppl.1):104-12.
32. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003; 289:76-9.
33. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287:356-9.
34. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 2002; 288:1723-7.
35. Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, et al. Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Jpn J Med* 1988; 27:142-9.
36. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40:1387-95.
37. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42:44-52.
38. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; 45:600-6.
39. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-19.
40. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-31.
41. Reaven G. Syndrome X: 10 years after. *Drugs* 1999; 58 (suppl 1): 19-20, 75-82.
42. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107:1103-9.

43. Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1983; 78:374-7.
44. Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *J Pediatr* 1995; 127:700-4.
45. Reid AE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: Feldman M FL, Brandt LJ., ed. *Sleisenger and Fordtrans's Gastrointestinal and Liver Disease*. 9th ed; 2010:1402.
46. Park J-W, Jeong G, Kim S. Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: Comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:491-7.
47. Moretto M, Kupski C, Mottin. Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. *Obes Surg* 2003; 13:622-4.
48. Hsiao PJ, Kuo KK, Shin SJ. Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:2118-23.
49. Stranges S, Dorn J, Muti P. Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: A population-based study. *Hepatology* 2004; 39:754-63.
50. Targher G, Bertolini L, Padovani R. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:1212-8.
51. Targher G, Bertolini L, Rodella S. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:2119-21.
52. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917-23.

53. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30:1356-62.
54. Browning JD. Statins and hepatic steatosis: Perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology* 2006; 44:466-71.
55. Lee JY, Kim KM, Lee SG. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007; 47:239-44.
56. İliçin G BK, Süleymanlar G, Ünal S,. İç Hastalıkları. 3rd ed; 2012.
57. Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16:679-90.
58. Metha K, VanThiel DH. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002; 60:289-93.
59. Copaci I, Micu L, Voiculescu M. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A review. *J Gastrointestin Liver Dis* 2006; 15:363-73.
60. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell G. NASH and insülin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35:373-9.
61. Angulo P, Lindor K. Insulin resistance and mitochondrial abnormalities in NASH: A cool look into a burning issue. *Gastroenterology* 2001; 120:1281-5.
62. Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 2006; 6:177-81.
63. Neuschwander-Tetri B. A resistance movement in NASH. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2813-14.
64. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002; 35:898-904.
65. Jensen MD, H.M., Rizza RA, Cryer PE, Miles JM. , *Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity*. *J Clin Invest* 1989. **83**: p. 1168–73.

66. Parekh, S. and F.A. Anania, *Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2191-207.
67. Gastaldelli A, C.K., Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R et al., *Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects*. *Gastroenterology* 2007. **133**: p. 496–506.
68. Diehl, A.M., *Nonalcoholic steatohepatitis*. *Semin Liver Dis*, 1999. **19**(2): p. 221-9.
69. Garcia-Monzon C, M.-P.E., Iacono OL et al. , *Characterization on of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity*. *J Hepatology*, 2000. **33**: p. 716-724.
70. Palck-Ytter Y, Y.Z., Marchesini G et al. , *Clinical features and natural history non alcoholic steatosis syndrommes*. *Semin Liver Dis* 2001. **21**: p. 17-26.
71. Pinto, H.C., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients*. *Dig Dis Sci*, 1996. **41**(1): p. 172-9.
72. Lonardo A, Adinolfi L, Loria P. Steatosis and hepatitis C virus. Mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology* 2004; 126:586-97.
73. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2004; 39:179-87.
74. Mofrad P, Contos MJ, Haque M. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37:1286-92.
75. Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo M, De Moura M. Nonalcoholic steatohepatitis- a long-term follow-up study: Comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 2003; 48:1909-13.
76. Zafrani E. Non-alcoholic fatty liver disease: An emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004; 444:3-12.

77. Gramlich T, Kleiner D, McCullough A. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2004; 35:196-9.
78. Ratziu V, Giral P, Charlotte F. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118:1117-23.
79. Abdelmalek M, Liu C, Shuster J. Familial aggregation of insulin resistance in first-degree relatives of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:1162-9.
80. Elizabeth M. Brunt, MD. Nonalcoholic steatohepatitis: Pathologic features and differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22:330-8.
81. Scheuer P: Classification of chronic viral hepatitis. A need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13:372-4.
82. Willner IR, Waters B, Patil SR, et al. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2957-61.
83. Kim WR, Poterucha JJ, Porayko MK, et al. Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62:1802-5.
84. Brunt, E.M., *Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology*. *Semin Liver Dis*, 2001. 21(1): p. 3-16.
85. Ratziu V, Massard J, Charlotte F. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology* 2006; 6:6- 19.
86. Yoneda M, Yoneda M, Mawatari H. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Liver Dis* 2008; 40:371-8.
87. Teli M, James O, Burt A. The natural history of nonalcoholic fatty liver: A follow-up study. *Hepatology* 1995; 22:1714-19.

88. Poonawala A, Nair S, Thuluvath P: Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: A case-control study. *Hepatology* 2000; 32:689-92.
89. Bugianesi E, Leone N, Vanni E. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123:134-40.
90. Matteoni C, Younossi Z, Gramlich T. Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116:1413-19.
91. Bernstein DL, Hulkova H, Bialer MG, Desnick RJ. Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol* 2013;58:1230-43.
92. Elleder M, Chlumska A, Hyanek J, Poupetova H, Ledvinova J, Maas S, et al. Subclinical course of cholesteryl ester storage disease in an adult with hypercholesterolemia, accelerated atherosclerosis, and liver cancer. *J Hepatol* 2000;32:528-34.
93. Elleder M, Chlumska A, Ledvinova J, Poupetova H. Testis _ a novel storage site in human cholesteryl ester storage disease. Autopsy report of an adult case with a long-standing subclinical course complicated by accelerated atherosclerosis and liver carcinoma. *Virchows Arch* 2000;436:82-7.
94. Hulkova H, Elleder M. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. *Histopathology* 2012;60:1107-13.
95. Gasche C, Aslanidis C, Kain R, Exner M, Helbich T, Dejaco C, et al. A novel variant of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease associated with mild phenotype and improvement on lovastatin. *J Hepatol* 1997;27: 744-50.
96. Chatrath H, Keilin S, Attar BM. Cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in an asymptomatic adult. *Dig Dis Sci* 2009;54:168-73.
97. Abramov A, Schorr S, Wolman M. Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *AMA J Dis Child* 1956;91:282-6.

98. J.A. Burke, W.K. Schubert. Deficient activity of hepatic acid lipase in cholesterol ester storage disease. *Science*, 176 (1972), pp. 309–310.
99. C. Aslanidis, S. Ries, P. Fehringer, C. Buchler, H. Klima, G. Schmitz. Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal acid lipase activity. *Genomics*, 33 (1996), pp. 85–93.
100. F. Pagani, R. Pariyarath, R. Garcia, C. Stuani, A.B. Burlina, G. Ruotolo, *et al.* New lysosomal acid lipase gene mutants explain the phenotype of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *J Lipid Res*, 39 (1998), pp. 1382–1388.
101. A.D. Patrick, B.D. Lake. Deficiency of an acid lipase in Wolman's disease. *Nature*, 222 (1969), pp. 1067–1068.
102. J. Stein, B.Z. Garty, Y. Dror, E. Fenig, M. Zeigler, I. Yaniv. Successful treatment of Wolman disease by unrelated umbilical cord blood transplantation. *Eur J Pediatr*, 166 (2007), pp. 663–666.
103. R. Boldrini, R. Devito, R. Biselli, M. Filocamo, C. Bosman. Wolman disease and cholesteryl ester storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and liver biopsy. *Pathol Res Pract*, 200 (2004), pp. 231–240.
104. S.W. Fouchier, J.C. Defesche. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. *Curr Opin Lipidol*, 24 (2013), pp. 332–338.
105. Reynolds, T. Cholesteryl ester storage disease: a rare and possibly treatable cause of premature vascular disease and cirrhosis. *J Clin Pathol*. 2013; 66: 918–923.
106. Saito, S., Ohno, K., Suzuki, T., and Sakuraba, H. Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *Mol Genet Metab*. 2012; 105: 244–248.
107. G. Assmann, U. Seedorf Acid lipase deficiency: Wolman disease and Cholesterol ester storage disease C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill, New York (2001), pp. 3551–3572.

108. Goldstein, J.L., Dana, S.E., Faust, J.R., Beaudet, A.L., and Brown, M.S. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem.* 1975; 250: 8487–8495.
109. Jeon, T.I. and Osborne, T.F. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23: 65–72.
110. Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002; 109: 1125–1131.
111. Cummings, M.H. and Watts, G.F. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in cholesteryl ester storage disease. *Clin Chem.* 1995; 41: 111–114.
112. Ginsberg, H.N., Le, N.A., Short, M.P., Ramakrishnan, R., and Desnick, R.J. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis. *J Clin Invest.* 1987; 80: 1692–1697.
113. Levy, R., Ostlund, R.E. Jr., Schonfeld, G., Wong, P., and Semenkovich, C.F. Cholesteryl ester storage disease: complex molecular effects of chronic lovastatin therapy. *J Lipid Res.* 1992; 33: 1005–1015.
114. G.A. Grabowski, L. Charnas, H. Du Lysosomal acid lipase deficiencies: the Wolman disease/cholesteryl ester storage disease spectrum. D. Valle, A.L. Beaudet, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, S.E. Antonarakis, A. Ballabio (Eds.), *Scriver's online metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw Hill (*January 2006*) [accessed 28.10.13]
http://www.ommbid.com/OMMBID/the_online_metabolic_and_molecular_bases_of_inherited_disease/b/abstract/part16/ch142.
115. S.A. Jones, D.L. Bernstein, M.G. Bialer, A. Dhawan, J.C. Hendriksz, C.B. Whitley, *et al.* Severe and rapid disease course in the natural history of infants with lysosomal acid lipase deficiency. *Mol Genet Metab*, 111 (2014), pp. S57–S58.

116. B. Zhang, A.F. Porto. Cholesteryl ester storage disease: protean presentations of lysosomal acid lipase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 56 (2013), pp. 682–685.
117. A.L. Beaudet, G.D. Ferry, B.L. Nichols Jr., H.S. Rosenberg. Cholesterol ester storage disease: clinical, biochemical, and pathological studies. *J Pediatr*, 90 (1977), pp. 910–914.
118. Y. Eto, T. Kitagawa. Wolman's disease with hypolipoproteinemia and acanthocytosis: clinical and biochemical observations. *J Pediatr*, 77 (1970), pp. 862–867.
119. Guardamagna O, Cagliero P, Abello F. Management of inherited atherogenic dyslipidemias in children. *Ther Apher Dial* 2013;17:150-61.
120. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clin Chim Acta* 2012;413:1207-10.
121. G.A. Grabowski. Therapy for lysosomal acid lipase deficiency: replacing a missing link. *Hepatology*, 58 (2013), pp. 850–852.
122. M. Balwani, C. Breen, G.M. Enns, P.B. Deegan, T. Honzik, S. Jones, *et al.* Clinical effect and safety profile of recombinant human lysosomal acid lipase in patients with cholesteryl ester storage disease. *Hepatology*, 58 (2013), pp. 950–957.
123. Whitley CB. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN) Annual Meeting 2013 [Oral Presentation, 11 October 2013].
124. S. vom Dahl, K. Harzer, A. Rolfs, B. Albrecht, C. Niederau, C. Vogt, *et al.* Hepatosplenomegaly lipidosis: what unless Gaucher? Adult cholesteryl ester storage disease (CESD) with anemia, mesenteric lipodystrophy, increased plasma chitotriosidase activity and a homozygous lysosomal acid lipase -1 exon 8 splice junction mutation. *J Hepatol*, 31 (1999), pp. 741–746.

125. L. Pisciotta, R. Fresa, A. Bellocchio, E. Pino, V. Guido, A. Cantafora, *et al.* Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) due to novel mutations in the *LIPA* gene. *Mol Genet Metab*, 97 (2009), pp. 143–148.
126. H.R. Sloan, D.S. Fredrickson. Rare familial diseases with neutral lipid storage. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson (Eds.), *The metabolic basis of inherited disease*, McGraw Hill Inc, New York (1972), p. 808.
127. F.M. Yatsu, F.C. Hagemenas, L.C. Manaugh, T. Galambos Cholesteryl ester hydrolase activity in human symptomatic atherosclerosis. *Lipids*, 15 (1980), pp. 1019–1022.
128. Öztürk ZA, Dag MS, Kuyumcu ME *et al.* Could platelet indices be new biomarkers for inflammatory bowel diseases? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; **17**: 334–41.
129. Tüzün A, Keskin O, Yakut M, Kalkan C, Soykan I. The predictive value of mean platelet volume, plateletcrit and red cell distribution width in the differentiation of autoimmune gastritis patients with and without type I gastric carcinoid tumors. *Platelets* 2014; **5**: 363–6.
130. Beyan C. Plateletcrit may not be a useful predictor in patients with slow coronary flow. *J Cardiol* 2014; **63**: 244.
131. Akpınar I, Sayın MR, Gursoy YC *et al.* Plateletcrit and red cell distribution width are independent predictors of the slow coronary flow phenomenon. *J Cardiol* 2014; **63**: 112–8.