



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNHİSTOKİMYASAL AÇIDAN NONALKOLİK  
STEATOHEPATİT(NASH), HEPATOSTEATOZ VE NORMAL KARACİĞER  
BİYOPSİLERİNDE KUPFFER HÜCRELERİ VE STELLAT HÜCRELERİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. BİRSEN BESNİLİ

Patoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

2009



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNHİSTOKİMYASAL AÇIDAN NONALKOLİK  
STEATOHEPATİT(NASH), HEPATOSTEATOZ VE NORMAL KARACİĞER  
BİYOPSİLERİNDE KUPFFER HÜCRELERİ VE STELLAT HÜCRELERİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. BİRSEN BESNİLİ

Patoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Yeşim Gürbüz

Patoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Kürşat Yıldız

2009

Etik Kurul Onayı: İAEK 1/19

Proje No: 2008 / 52

## **TEŞEKKÜR**

**Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda dört yıllık eğitimim süresinde, eğitimime olan katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kürşat Yıldız ve diğer tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.**

**Tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yeşim Gürbüz'e gösterdiği titiz çalışma ile deneyimlerini benimle paylaştığı için şükranlarımı sunarım.**

**Uzmanlık eğitimim sürecinde, desteklerinden dolayı sevgili asistan arkadaşlarım, bölüm sekreterlerimiz, laboratuvar teknisyenlerimiz ve diğer personelimize teşekkür ederim.**

**Tezimin klinik veriler ile korelasyonunda desteklerinden dolayı Sayın Yard. Doç. Dr. Altay Çelebi'ye teşekkür ederim.**

**İhtisasım süresince gösterdikleri anlayış, destek ve sevgi dolu yaklaşımlarından dolayı aileme teşekkür ederim.**

**Dr. Birsen Besnili**

**2009**

## **İÇİNDEKİLER :**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>1</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>4</b>
<b>RESİMLER VE ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>6</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>8</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>10</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Karaciğer Histolojisi</b>	<b>11</b>
<b>2.1.1. Kupffer Hücresi</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2. Stellat hücreler</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Nonalkolik Steatohepatitin Tarihçe ve Tanımlaması</b>	<b>14</b>
<b>2.3. Nonalkolik Steatohepatitin Patogenezi</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1. NASH Gelişiminde ilk Darbe:Hepatatik Steatoz, Obezite, İnsülin Direnci</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2. NASH Gelişimindeki ikinci Darbe</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2.1. Oksidatif Stres</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2.2. Lipid Peroksidasyonu ve NASH</b>	<b>21</b>
<b>2.3.3. NASH Patogenezinden sorumlu diğer faktörler</b>	<b>23</b>
<b>2.3.3.1. Sitokinler</b>	<b>23</b>
<b>2.3.4. Fibrozis Patogenezi</b>	<b>24</b>

2.3.4.1.	Leptin	25
2.3.4.2.	Adipokin	26
2.3.4.3.	Adiponektin	26
2.4.	Tedavi	28
2.4.1.	Tedavideki Amaçlarımız	29
2.4.2.	Vücut kilosunda azalma	29
2.4.3.	İnsülin duyarlılığını artırıcı ilaçlar	29
2.4.4.	Lipid düşürücü ajanlar	30
2.4.5.	Antioksidanlar	30
2.4.6.	Antihipertansif ilaçlar	30
2.4.7.	Hepatoprotektif Ajanlar	30
3.	MATERYAL METOD	31
3.1.	NASH' in Brunt kriterlerine göre sınıflaması	33
4.	BULGULAR	37
5.	TARTIŞMA	42
5.1.	Epidemiyoloji	43
5.2.	Etyoloji	44
5.3.	Genetik Yatkınlık	48
5.4.	Klinik Özellikler ve Laboratuar Bulguları	50
5.5.	Makroskopik Bulgular	50
5.6.	Mikroskopik Bulgular	50

<b>5.7.</b>	<b>NASH'te CRN Sınıflaması</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>TABLolar</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>RESİMLER</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>SONUÇLAR</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>ÖZET</b>	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>90</b>
<b>11.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>92</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>NASH</b>	: Nonalkolik steatohepatit
<b>ASH</b>	: Alkolik steatohepatit
<b>NAYKH</b>	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
<b>YK</b>	: Yağlı karaciğer
<b>BMI</b>	: Body mass index
<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>AST</b>	:Aspartat aminotransferaz
<b>GGT</b>	: Gama glutamil transpeptidaz
<b>VLDL</b>	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
<b>PMNL</b>	: Polimorf nüveli lökositler
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör
<b>TGF <math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor beta
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>RES</b>	: Retiküloendotelyal sistem
<b>SYA</b>	: Serbest yağ asitleri
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen ürünleri
<b>UCP-2</b>	: Mitokondrial uncoupling protein 2
<b>MDA</b>	: Malondialdehid

**HNE** : Hidroksinonenal

**MCD** : Metiyonin ve kolinden fakir

**PPAR-Gamma**: Peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma

**H-E** : Hematoksilen Eozin

**MT** : Masson's Trichrom



## RESİM VE ŞEKİLLER DİZİNİ:

<b>Resim 1:</b> Normal hepatositte yağ metabolizması.	16
<b>Resim 2:</b> İnsülin rezistansı etkisiyle sitokinlerin artması ve apolipoprotein B-100'ün azalması ile VLDL'nin perifere salınımında azalma.	16
<b>Resim 3:</b> NASH patogenezinde, steatoz ve fibrozisin mekanizmaları.	17
<b>Resim 4:</b> Yağ asitlerinin adipöz dokudan salınımının ve hepatosit tarafından tutulumunun artması.	19
<b>Resim 5:</b> Mitokondrial etki, sitokinlerin artışı, lipid peroksidasyonu etkisiyle inflamasyon, fibrozis ve hücre ölümü.	19
<b>Resim 6:</b> Brunt stage sınıflaması	35
<b>Resim 7:</b> CRN stage sınıflaması	56
<b>Resim 8 :</b> H-E, Zon 3 bölgesinde yağlanma, x40	72
<b>Resim 9 :</b> H-E, Zon 3 bölgesinde yağlanma, x40	72
<b>Resim 10 :</b> H-E, Zon 3 ağırlıklı pansiner yağlanma, x100	73
<b>Resim 11 :</b> H-E, Zon 3 bölgesinde yağlanma, x100	73
<b>Resim 12 :</b> H-E, Parenkimde noktasal nekroz, X400	74
<b>Resim 13 :</b> H-E, Parenkimde noktasal nekroz, X400	74
<b>Resim 14 :</b> H-E, İntranükleer glikojen ve parenkimde yangısal infiltrasyon x400	75
<b>Resim 15:</b> H-E, Balonlaşma ve PMNL' ler içeren noktasal nekrozlar, x400	75
<b>Resim 16:</b> H-E, Balonlaşma , x400	76
<b>Resim 17 :</b> M-T, Perivenüler fibrozis x200	76
<b>Resim 18 :</b> M-T, Perivenüler fibrozis x400	77
<b>Resim 19 :</b> M-T, Periselüler fibrozis x400	77

<b>Resim 20</b> : M-T, Periselüler fibrozis x400	78
<b>Resim 21</b> : Demir boyası,parenkimde demir birikimi x400	78
<b>Resim 22</b> :, CD68, Normal karaciğerde, Kupffer hücrelerinin lobüler dağılım paterni x 200	79
<b>Resim 23</b> : CD68, Normal karaciğerde, Kupffer hücrelerinin lobüler dağılım paterni x 200	79
<b>Resim 24</b> : CD68, Kupffer hücrelerinin portal, periportal dağılım paterni x 200	80
<b>Resim 25</b> : CD68, Kupffer hücrelerinin portal dağılım paterni x 400	80
<b>Resim 26</b> : CD68, agregat oluşumu x400	81
<b>Resim 27</b> : CD68, agregat ve lipogranülom paterni x200	81
<b>Resim 28</b> : CD68, lipogranülom paterni x400	82
<b>Resim 29</b> : CD68, lipogranülom paterni x400	82
<b>Resim 30</b> : CD68, lipogranülom paterni x400	83
<b>Resim 31</b> : SMA, Periselüler fibrozis x400	83
<b>Resim 32</b> : SMA, Perivenüler ve periselüler fibrozis x200	84
<b>Resim 33</b> : SMA Periportal fibrozis x200	84
<b>Resim 34</b> : SMA, Periportal fibrozis x200	85

## **TABLolar DİZİNİ:**

<b>Tablo 1:</b> NASH'te Hepatik Fibrozisin Moleküler Mekanizması	<b>27</b>
<b>Tablo 2 :</b> NASH te terapötik yaklaşımlar	<b>31</b>
<b>Tablo 3:</b> Brunt Sistem Grade	<b>34</b>
<b>Tablo 4:</b> Brunt Sistem Stage	<b>35</b>
<b>Tablo 5:</b> Dünyada obezite oranları	<b>45</b>
<b>Tablo 6:</b> Türkiye'de Metabolik Sendromun bölgelere göre dağılım sıklığı	<b>47</b>
<b>Tablo7:</b> Türkiye'de Metabolik Sendromun cinsiyete göre dağılımı	<b>47</b>
<b>Tablo 8 :</b> NASH etyopatogenezinde sorumlu genler ve aday genler	<b>49</b>
<b>Tablo 9:</b> NASH'in Etyopatogenezinin Temelindeki Aday Genler	<b>49</b>
<b>Tablo 10:</b> NASH' te CRN Skorlama Sistemi ( Clinical Research Network)	<b>55</b>
<b>Tablo 11:</b> Vaka gruplarına göre yağlanma oranları	<b>62</b>
<b>Tablo 12:</b> Olgu gruplarının içerdikleri lobüler yangı miktarları	<b>62</b>
<b>Tablo 13:</b> Olgu gruplarının genel inflamasyon miktarları	<b>63</b>
<b>Tablo 14:</b> Olgu gruplarında nükleer glikojen oranları	<b>63</b>
<b>Tablo 15:</b> Olgu gruplarında balonlaşma varlığı ve oranları	<b>63</b>
<b>Tablo 16:</b> Olgu gruplarına göre, demir varlığı	<b>64</b>
<b>Tablo 17:</b> NASH ve hepatosteatoz olgularında, Brunt gradeleri	<b>64</b>
<b>Tablo 18:</b> NASH ve hepatosteatoz olgularında, Brunt stageleri	<b>64</b>
<b>Tablo 19:</b> Olguların steatoz yoğunluğuna göre, lobüler inflamasyon oranları	<b>65</b>
<b>Tablo 20:</b> Olguların steatoz yoğunluklarına göre nükleer glikojen varlığı	<b>65</b>
<b>Tablo 21:</b> Olguların steatoz yoğunluklarına göre balonlaşma varlığı	<b>65</b>
<b>Tablo 22:</b> Olgu gruplarının Kupffer hücre yoğunluğu	<b>66</b>
<b>Tablo 23:</b> Olgu gruplarında, Kupffer hücre portal lokalizasyonları	<b>66</b>

<b>Tablo 24:</b> Olgu gruplarında agregat varlığı ve oranları	<b>66</b>
<b>Tablo 25:</b> Olgu gruplarında lipogranülom varlığı ve oranları	<b>67</b>
<b>Tablo 26:</b> Olguların Brunt grade'ine göre, agregat varlığı	<b>67</b>
<b>Tablo 27:</b> Olguların Brunt stage'ine göre, agregat varlığı	<b>67</b>
<b>Tablo 28:</b> Olguların Brunt grade'ine göre, lipogranülom varlığı	<b>68</b>
<b>Tablo 29:</b> Olguların Brunt stage'ine göre, lipogranülom varlığı	<b>68</b>
<b>Tablo 30:</b> Olguların Brunt grade'i ve Kupffer hücre portal lokalizasyonları	<b>68</b>
<b>Tablo 31:</b> Olguların Brunt stage'i ve Kupffer hücre portal lokalizasyonları	<b>69</b>
<b>Tablo 32:</b> Olguların steatoz yoğunluğuna göre, agregat varlığı	<b>69</b>
<b>Tablo 33:</b> Olguların steatoz yoğunluğuna göre, lipogranülom varlığı	<b>69</b>
<b>Tablo 34:</b> Olguların steatoz yoğunluğuna göre, Kupffer hücre portal lokalizasyonları	<b>70</b>
<b>Tablo 35:</b> Olgu gruplarının stellat hücre yoğunlukları	<b>70</b>
<b>Tablo 36:</b> Olguların Brunt stage'ine göre, stellat hücre yoğunlukları	<b>70</b>
<b>Tablo 37:</b> Olguların Brunt grade'ine göre, stellat hücre yoğunlukları	<b>71</b>
<b>Tablo 38 :</b> Olguların Kupffer hücresi grade'i ile stellat hücre yoğunlukları	<b>71</b>

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Nonalkolik steatohepatit (NASH), son yıllarda obezite ile paralel olarak sıklığı giderek artan, karaciğerde yağlanma ve inflamasyon ile seyreden, kronik bir hastalıktır. Basit yağlanmadan, fibrozis, karaciğer sirozu, karaciğer yetmezliği ve maligniteye ilerleyebildiğini gösteren yayınların yapılması ile önemi giderek artmıştır. Tanı için radyolojik, klinik ve histopatolojik incelemenin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Biyopsi tanı için mutlak gerekli bir yöntemdir.

NASH' li olgularda orta düzey karaciğer enzim yüksekliği vardır. Genelde ALT, AST den daha yüksektir. Alkol kullanılmadığı ve viral markırların negatifliği klinik olarak belirtilmelidir. Obezite, tip 2 diabetes mellitus, hiperlipidemi NASH ile sıklıkla birliktelik gösterir. Jejunoileal bypass ve bazı ilaçlar diğer risk faktörleridir.

NASH'in patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak diğer faktörlerle birlikte bazı sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL -1, IL-6, IL-8, IL-10 ve TGF-  $\beta$  vb.) önemli rol oynar. TNF $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 akut faz reaksiyonun başlamasını sağlayan tetikçilerdir. Diğer sitokinler ise, akut faz reaksiyonun modifikasyonunda rol alırlar. Sözünü ettiğimiz sitokinler, karaciğere portal venden kan yoluyla gelirler. Sinuzoidlerin endotel hücreleri kandaki sitokinleri Disse boşluğuna, oradan da hepatositlere ulaştırırlar. Disse boşluğuna uzanımları olan diğer hücreler stellat hücreleri (İto hücreleri) ve Kupffer hücreleridir. Her iki hücre tipinin de hem proinflamatuvar sitokinler için reseptörleri, hem de sitokinleri üretme yetenekleri vardır. Karaciğere özgü bu yapı sayesinde, sitokinler hepatosite ulaşırken, eş zamanlı olarak Disse boşluğundaki diğer hücreler tarafından da fark edilir. Gerek stellat hücreleri, gerekse Kupffer hücreleri kendilerine ulaşan akut faz reaksiyonu ile ilgili bilgileri çoğaltarak adeta ikinci proinflamatuvar sitokin yanıtı olarak hepatositlere sunarlar ( 1 ).

Karaciğer içerisinde ise, sitokinler, enfeksiyöz, toksik, iskemik, otoimmün hepatitler, fibrojeniz ve transplant reddi, viral çoğalmanın önlenmesi, kısmi hepatektomi sonrasında geride kalan karaciğer dokusunun yenilenmesi gibi pek çok hastalıkta önemli rol oynamaktadırlar (2). Sitokinlerin normal şartlar altında salınımları az miktarda olmasına rağmen, akut faz reaksiyonu sırasında çok yüksek düzeylere çıkarlar.

Kupffer hücrelerinin sitokin salgıladıkları ve pek çok karaciğer hastalığında aktif rol oynadıkları da göz önüne alınırsa, NASH etyopatogenezinde de önemli bir faktör olmaları olasıdır. Stellat hücrelerinin de sitokin ve büyüme faktörü sentezi yaptığı, karaciğer fibrozisinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Kupffer hücrelerinin TGF  $\beta$  (Transforming growth factor beta), TNF- $\alpha$  (Tümör nekroz faktör  $\alpha$ ) ve IL-1 (İnterlökin 1) gibi sitokinlerin salınımı ile stellat hücreleri ve fibroblastları aktive ederek NASH'i tetiklemesi mümkündür.

Kupffer hücreleri karaciğerde bulunan RES'in bir üyesidir ve sitokin salgılama yetenekleri vardır. NASH'te, bu hücrelerin, salgıladıkları sitokinler aracılığı ile inflamasyon ve fibrozis gelişiminde önemli rol oynaması olasıdır (3). Stellat hücreleri, sitokin ve büyüme faktörü sentezi ve sekresyonu yapabilen, bağ dokusu gelişiminde önemli rol oynayan hücrelerdir. Kupffer hücreleri, TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinlerin sekresyonu ile stellat hücreleri ve fibroblastları aktive ederler (4).

Bu çalışmanın amacı, karaciğer iğne biyopsilerinde, NASH etyopatogenezinde yaptıkları salgılar ve fibrogenezde önemli rol oynama ihtimali olan Kupffer hücreleri ve stellat hücrelerinin yoğunluğunu ve dağılım paternlerini araştırmak, normal karaciğer dokusu ve hepatosteatozdaki farklılıkları belirlemektir. Diğer bir amacımız ise, boyama yöntemleri ile görüntülediğimiz bu hücrelerin histopatolojik değerlendirmesinde NASH tanısı ve prognozu ile direk bağlantılı olabilecek histopatolojik bulguları aramaktır. Bu amaçla kurumumuzda incelenen 63 NASH, 13 hepatosteatoz, 13 viral hepatitli NASH ve 17 normal olgunun karaciğer biyopsilerini ayrıntılı şekilde, histopatolojik olarak inceledik ve grupları immunhistokimyasal olarak CD68 VE SMA boyaları ile boyadık. Elde ettiğimiz veriler arasındaki farkları ve bağlantıları istatistiksel olarak inceledik.

## **2.GENEL BİLGİLER:**

### **2.1Karaciğer Histolojisi:**

Normal erişkin karaciğeri 1400-1600 gram ağırlığında bir organ olup, metabolik dengenin sürdürülmesiyle görevlidir (5,6). Besinlerle alınan aminoasit, karbonhidrat, lipid ve vitaminleri işleyerek gerekli ürünleri sentezler ve ihtiyaç durumunda gerekli yerlere gönderilmek üzere depolar. Dolaşımdaki partikülleri fagosite eder, metabolitlerin biotransformasyonu, endojen, ekzojen artıkların

detoksifikasyonu ve safra ile atılımını sağlar. Karaciğer, depoladığı maddeleri gerektiğinde kan dolaşımına salgılaması nedeni ile endokrin, ürettiği safrayı kanallar aracılığı ile duodenuma aktıdığından dolayı ekzokrin bir organ olarak kabul edilir. Glisson kapsülü ile kuşatılmıştır. Kapsülden ayrılan ince bağ dokusu uzantılar, organı loblara ayırır. Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel birimleri karaciğer lobülleridir. Klasik karaciğer lobülü, ortasında santral ven bulunan, periferde portal alanlarla sınırlı altıgen şekilli yapıdır. Karaciğer santral venden başlayarak, perifere doğru ışınal tarzda birbirleri ile anastomozlaşarak ilerleyen, hepatosit kordonlarını ve aralarında sinüzoid kapillerini içerir. Lobüllerin köşelerinde yer alan portal alanda, bağ dokusu içinde, vena porta, arteria hepatica, safra duktusu, lenf damarları ve sinirleri bulunur. Bu yapıda, tek tük lenfosit, makrofaj, seyrek mast hücresi, eozinofil bulunabilir, normal koşullarda nötrofil ve plazma hücresi görülmez.

Karaciğer asinüsü, kısa eksenini iki portal ven, uzun eksenini iki santral ven arasında bulunan baklava şeklinde veya oval şekilli alandır. Portal bölgelere en yakın olan bölüm zon 1, en uzak olan bölüm zon 3 olarak bilinir. Kan dolaşımı portal alandan geldiği için zon 1, periportal bölgeye; zon 2, midzonal bölgeye; zon 3 ise santral ven çevresindeki sentrilobüller bölgeye uyar.

Karaciğer dolaşımının % 60-70'i portal ven, % 30-40'ı hepatik arter tarafından sağlanır. Karaciğerde, vena porta ile barsaktan alınan ürünler ve oksijen portal alandan, lobül içindeki sinüzoidlere, oradan parankim hücrelerine verilir. Bu hücrelerin ürettiği ürünler lobülün merkezinde bulunan santral vene, oradan da vena hepaticaya boşalır.

Hepatositler santral venden, portal alana doğru ışınal şekilde uzanan kordonlar oluşturur. Genellikle tek, bazen 2 nüveli poligonal hücrelerdir. Hepatositler iyi gelişmiş granüler ve agranüler endoplazmik retikulum, belirgin golgi kompleksi, mitokondri, ribozom, lizozom, peroksizom, lipid ve glikojen içerirler. Periportal bölgede kordonların en son sırasındaki hepatositler lobülün portal traktüsle sınırını belirleyen limiting plate'i (sınırlayıcı tabaka) oluşturur. Kordonlar, erişkin ve büyük çocuklarda tek sıra hücrelerden, 5-6 yaş altındaki çocuklarda 2 sıralı hücrelerden oluşur. Hepatositler safra kanalikülü denen ve hepatositler arasına yerleşmiş ince kanallara safra salgırlar. Safra kanalikülleri karşılıklı plazma membranlarının periferden bağlantı kompleksleri ile bağlanması ile oluşan, ışık mikroskopik düzeyde izlenemeyen, intersellüler alanlardır. Safra bu kanaliküllerden, duktullere, oradan da portal alanlarda yer alan safra kanallarına akıtılır. Portal alandaki safra kanalları tek

katlı kübik epitel ile döşelidir. Hepatosit kordonları arasında izlenen sinüzoidler, düzensiz lümenli endotel hücreleri ile döşeli, pencereci kapiller özelliği gösteren, altında yer alan bazal membranı, yer yer kesintili olan damarsal yapılarıdır. Bu yapı hepatositler ile sinüzoidler arasında madde alışverişini kolaylaştırır (7,8,9). Sinüzoid duvarında endotel hücrelerinden başka Kupffer hücreleri adını alan makrofajlar da bulunur.

Sinüzoidleri döşeyen endotel hücreleri ile hepatosit kordonları arasında Disse aralığı bulunur. Disse aralığında stellat hücreleri ( = ito hücreleri = lipositler ) bulunur. Normalde ışık mikroskopik incelemede bu hücreler izlenmez, ancak bazı patolojik durumlarda belirginleşir (10,11). Stellat hücreleri vimentin, dezmin, SMA ile boyandığından mezenkimal orijinli olduğu düşünölmüştür (12,13). Bazı araştırmalarda nöral proteinlerin ekspresyonu izlendiği için, nöral krest orijinli olabileceği düşünölmüştür. Glial fibriler asidik protein (GFAP), nöral hücre adezyon molekül (N-CAM) antikoru ve sinaptofizini eksprese edebilir (14,15,16,17,18). Bu hücrelerin A vitamini metabolizmasında rol oynadığı, ekstrasellöler matriks proteinlerini , proteoglikonları, büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılayabildikleri bilinmektedir. Prostoglandin ve tromboksan A2 gibi düzenleyici maddelere cevap olarak sinüzoid lümeninin çapını değiştirebilmektedir.

### **2.1.1 Kupffer Hücresi :**

Kupffer hücreleri hepatic sinüzoidlerin lümeninde bulunan, uzantılı yıldız şekilli sitoplazmalı, büyük çekirdekli, fagositoz yapabilen makrofajlardır (19,20). Sitoplazmik uzantıları ile sinüzoid duvarına tutunurlar ancak, sinüzoidleri döşeyen endotelial hücreler ile bağlantısal kompleksler oluşturmazlar, bu hücrelerin protoplazmik uzantıları arasındaki boşluklarda bulunurlar. Geniş endotelial pencerelerden perisinüzoidal boşluğa geçebilirler.

Kupffer hücreleri, fare fötal karaciğerinde monosit sirkülasyonunda göröldüğu için, primitif makrofajlardan kaynaklandığı düşünölmektedir. Ayrıca, bu hücreler yolk sac kesesinde de izlenmiştir (21). Bu bilgiler göstermiş ki, Kupffer hücreleri çift kökene sahiptir. Kupffer hücreleri sinüzoidler boyunca hasarlı alanlara ve bölgesel lenf nodlarına aktif olarak göç edebilir (22). Bu hücrelerin sitoplazmalarında lizozomlar, fagozomlar ve peroksidazdan zengin endoplazmik retikulum sisternaları bulunur. Partikülleri fagosite edip, uzaklaştırmak, portal kandaki çözünür materyalleri ayırmak, bu hücrelerin esas fonksiyonudur. Kupffer



hücrelerinin immün yanıtta primer rolleri fagositozla antijen ve immün komplekslerin temizlenmesidir (10). Ayrıca Kupffer hücreleri, immülojik cevabın başlatılması ve gastrointestinal kaynaklı endotoksinlerin temizlenmesinde önemli rol oynar (23,24,25,26).

Bu mekanizmaların içeriği tam olarak anlaşılmamakla birlikte, Kupffer hücrelerinin IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  ve IFN-gamma (İnterferon gamma) gibi proinflamatuvar ve inflamatuvar mediatörler ile, IL-10 gibi makrofaj aktivasyonunu baskılayan ve sitokin sekresyonunu inhibe eden mediatörlerin salınımını düzenlemesi, bu olayda rol oynayabilir. Çoğu sitokinler aktive Kupffer hücreleri tarafından salınır ve lokal etkileri vardır, mikrovasküler etki ile hepatosit ve stellat hücre fonksiyonlarını düzenler.

### **2.1.2. Stellat hücreler:**

Disse aralığında yerleşmiş sitokin ve büyüme faktörü sentezi ve sekresyonu yapabilen özelleşmiş hücrelerdir. Karaciğer fibrozisindeki hücre dışı matriks ve kollajen sentezinden sorumludur. Oksidatif stres ve TGF  $\beta$  hepatik stellat hücreleri aktive ederler (27). Kupffer hücreleri, TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 sekresyonu ile stellat hücreleri ve fibroblastları aktive eder (4). Yağlı karaciğerde hepatik stellat hücre aktivasyonu vardır ve fibrozis derecesi ile yakın ilişkilidir (28). Kupffer hücreleri ve hepatik stellat hücreleri arasında sitokin aracılar ile kurulan bu ilişki fibrozis ile sonuçlanır.

### **2.2 . Nonalkolik Steatohepatitin Tarihçe ve Tanımlaması:**

NASH genelde, obezite, diyabet ve hiperlipidemili hastalarda izlenen, karaciğerde yağlanma ile giden, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. İlk kez 1962 yılında H. Thaler tarafından anlamlı miktarda alkol kullanmayan, fakat alkolik steatohepatit ile uyumlu histolojik özelliklere sahip bir vaka bildirilmiştir (28). Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması terimi, ilk kez 1980'de J. Ludwig ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (29).

NASH, obezite prevalansının da artmasıyla toplumda giderek yaygınlaşan bir halk sağlığı sorunudur. Viral markırların negatifliği, karaciğer fonksiyon testlerinin orta düzeyde yüksekliği ile karakteristiktir. Genelde ALT, AST den daha yüksektir. NASH yetişkin erkek ve kadının yanı sıra, çocuklarda da görülebilmektedir. Vakaların tümünde, anlamlı miktarda alkol kullanımı yoktur.

NASH'in tanısı tek başına klinik veya laboratuvar değerleri ile konmaz. Tanı için "altın standart " karaciğer biyopsisinin incelenmesidir. Tanı karaciğer biyopsisi sonuçlarının, klinik ve laboratuvar incelemeleri ile desteklenmesi şeklinde konur.

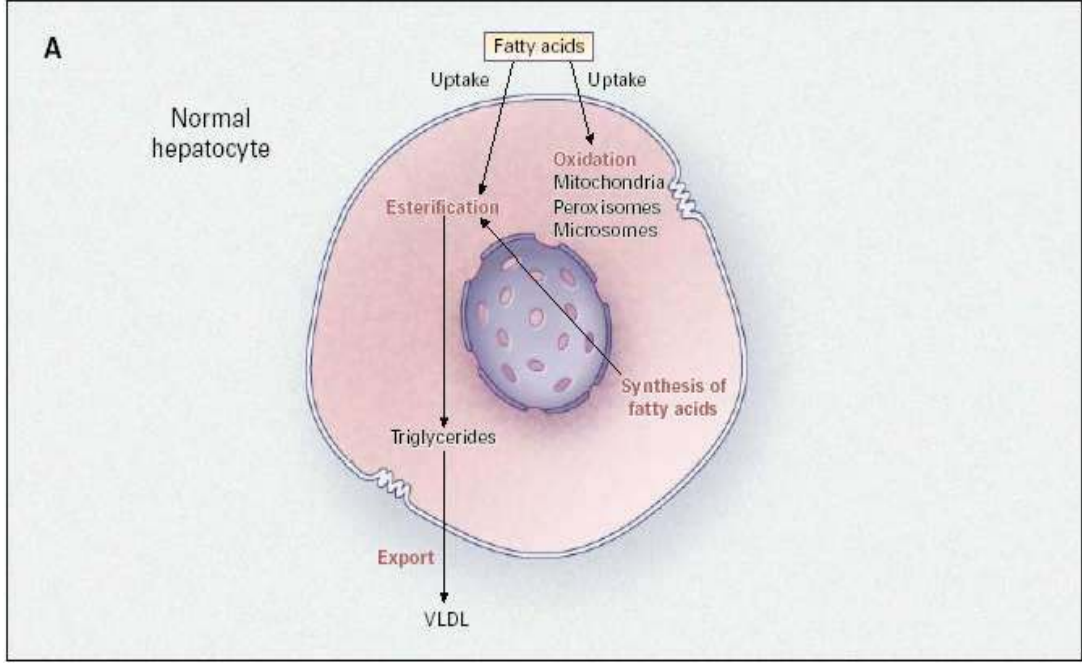
En önemli risk faktörleri obezite, insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus, hiperlipidemi, dislipidemi, metabolik sendrom'dur. Yapılan çalışmalarda hasta gruplarındaki obezite prevalansı % 90 lara varmaktadır. Ayrıca diyabet ve hiperlipidemi sıklığı da önemli ölçüde yüksek bulunmaktadır. Çoğu hastada insülin rezistansı vardır. Jejunoileal bypass ve bazı ilaçlar da NASH'e neden olan faktörler arasında sayılabilir. Oluş mekanizmasında, insülin rezistansı, hepatositlerde aşırı serbest yağ asitlerinin birikimi, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres söz konusudur (30). NASH basit steatozdan, steatohepatit, ilerlemiş fibrozis ve siroza kadar uzanan geniş bir spektrumu yansıtır. Siroza gidiş değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak yavaş seyirlidir ve bütün siroz türlerinde olduğu gibi karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinom riski taşır (55). NASH'li hastalarda kardiyovasküler risk artışı vardır. Metabolik ve vasküler komplikasyonlar geliştirebilir. NASH'li hastaların mortalite oranı, genel popülasyondan daha yüksektir (31).

### **2.3. Nonalkolik Steatohepatitin Patogenezi:**

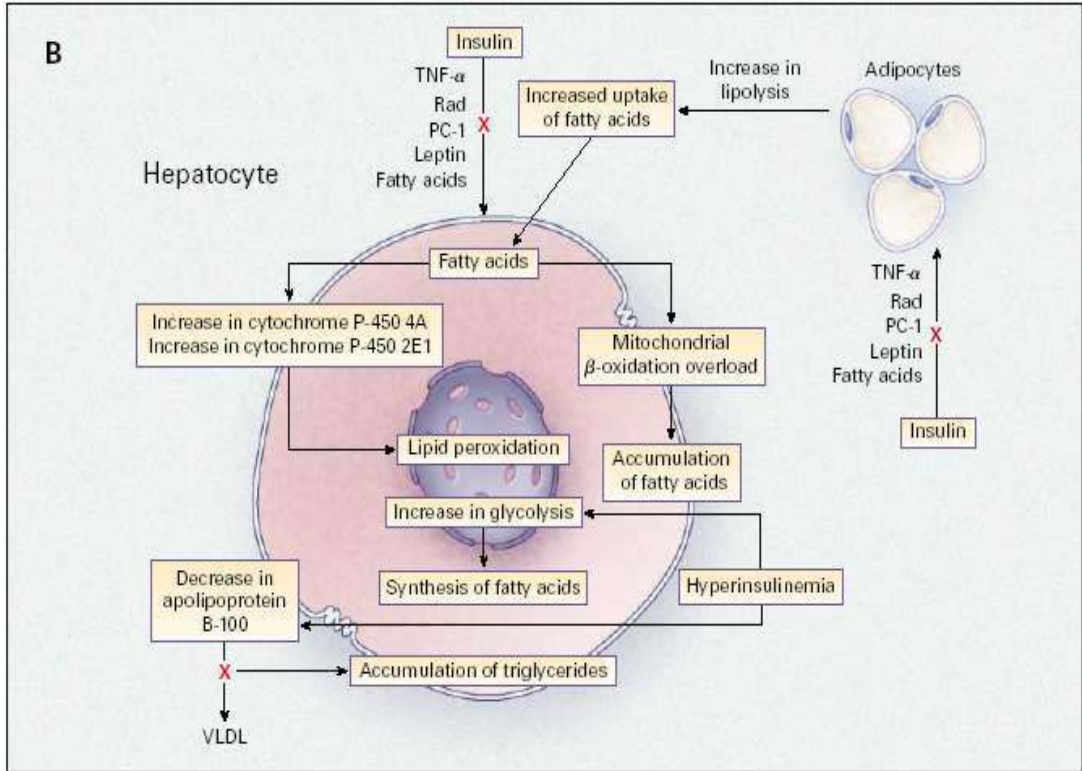
NASH patogenezi henüz yeterince iyi bilinmemektedir. Bazı hastalarda sadece steatoz, bazılarında steatohepatit ve progresif fibrozis gelişmesinin nedenleri bilinmemekle birlikte, vücut yağ dağılımı, antioksidan sistemlerdeki farklılıklar ve genetik yatkınlık suçlanmaktadır. İnsülin direnci, hepatik steatoz ve steatohepatite yol açabilen önemli bir mekanizmadır. Oksidatif hasarın, steatohepatitin nekroinflamatur bileşeninin ortaya çıkmasında gerekli olduğu düşünülmektedir (32).

Hangi mekanizma ile olursa olsun, sonuçta karaciğerde artmış trigliserid birikimi mevcuttur. Trigliserid birikimi, SYA' nin (Serbest yağ asitleri) karaciğere ulaşımındaki fazlalık, karaciğerde artmış yağ asidi sentezi, yağ asitlerinin azalmış  $\beta$  oksidasyonu ya da VLDL (Çok düşük dansiteli kolesterol) sentezinin azalması veya karaciğer dışına salınımındaki azalmadan kaynaklanabilir. Trigliseridlerin ana kaynağı yağ dokuda depo edilen ve karaciğerde, de nova sentezi ile yapılan yağ asitleridir (33). Aşırı karbonhidrat tüketimi de, karaciğerde yağ asitlerine çevrilerek,

trigliserid olarak depolanabilir (34). Sonuçta, yağ asidinin üretimi hepatic metabolizmanın hızını aşar ve özellikle trigliseridler birikir (Resim 1, 2).

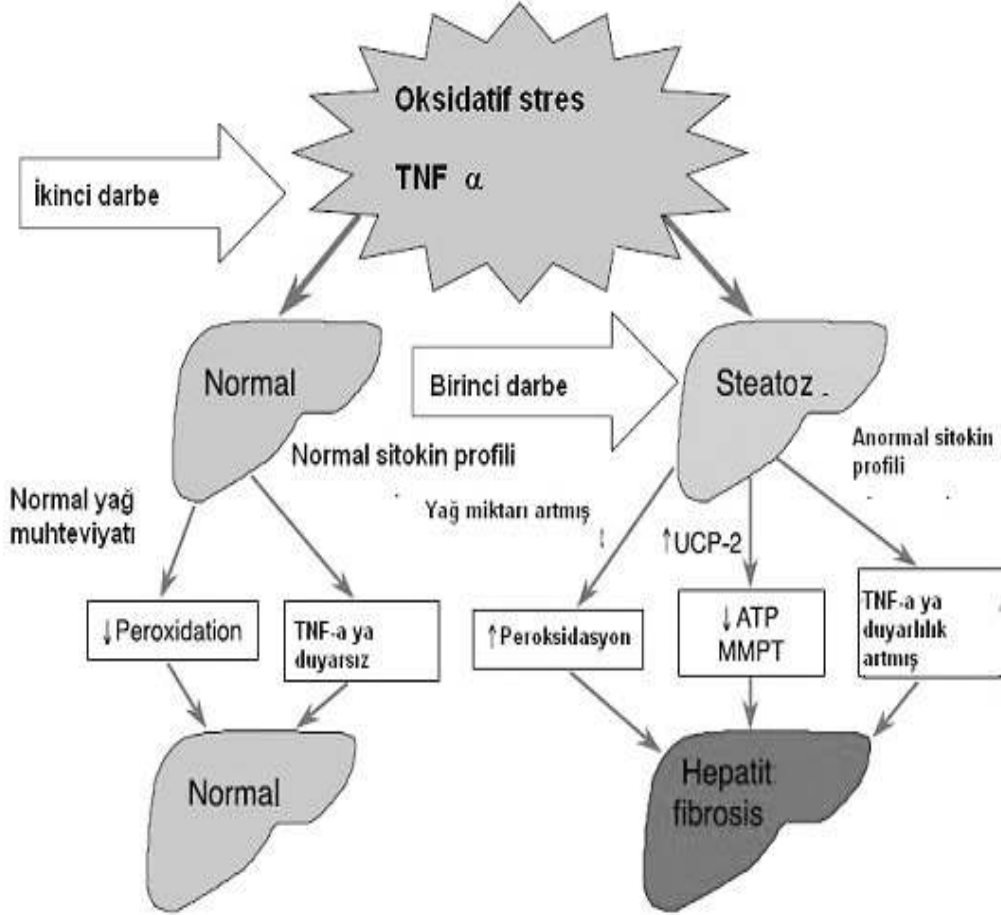


Resim 1: Normal hepatositte yağ metabolizması.



Resim 2: İnsülin rezistansı etkisiyle sitokinlerin artması ve apolipoprotein B-100'ün azalması ile VLDL'nin perifere salınımında azalma.

NASH patogenezinde iki aşamalı darbe teorisi öne sürülmektedir (35). Resim :3



Resim 3: NASH patogenezinde, steatoz ve fibrozisin mekanizmaları.

### 2.3.1. NASH Gelişiminde ilk Darbe:

#### Hepatik Steatoz, Obezite, İnsülin Direnci

Hepatik steatoz, trigliseridlerin karaciğerde aşırı oranda birikmesi ile ortaya çıkar ve NASH gelişimi için ilk darbeyi oluşturur (36). Hepatik lipid metabolizmasının alım, sentez, yıkım ve salınım basamaklarındaki bozuklukta insülin direnci önemli rol oynar (Resim 1). İnsülin direncinin moleküler patogenezi multifaktöryel gibi görünmekte olup, insülin etkisinin engellenmesinde rol oynayan birçok moleküler hedef belirlenmiştir. İnsülin direnci, hiperinsülinemi ve lipoliz ile hepatositlerde yağ birikimine neden olur. Yağ asitlerinin hepatositlere yüksek oranda girişiyle,

mitokondrial beta-oksidasyon doygunluğa ulaşır. Sonuç olarak, yağ asitleri hepatositlerde birikir.

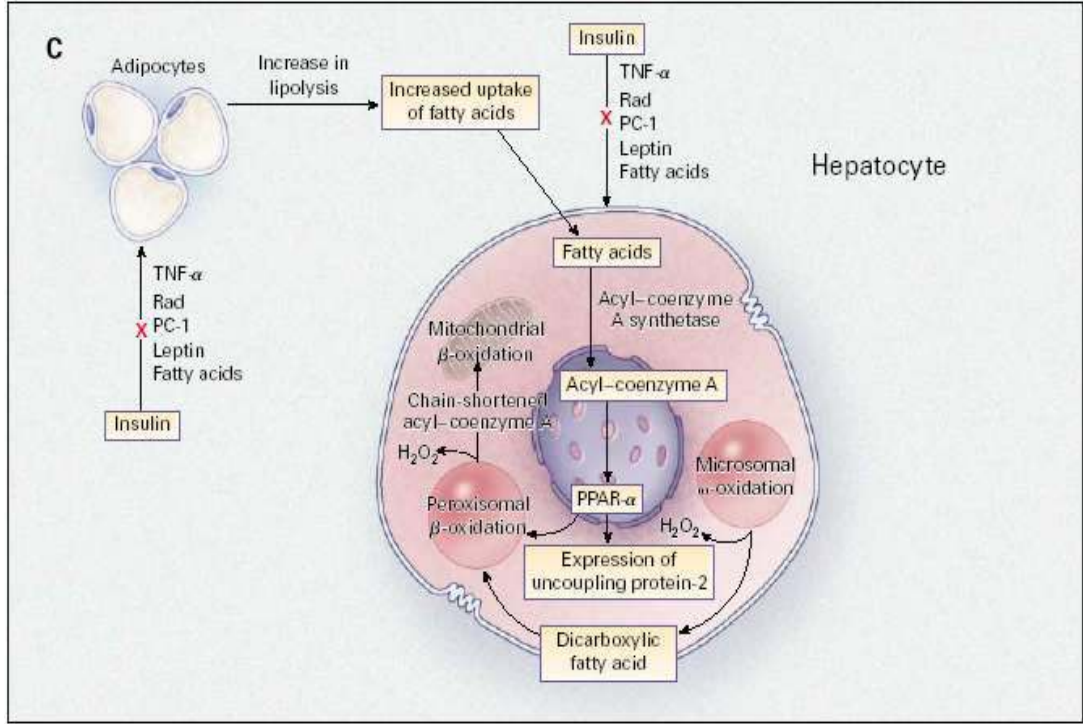
İnsülin direnci durumlarında hepatik yağ asidi serbestleşmesinin temel yolu olan VLDL'lerin ve apoprotein B 100 (apo B) yıkımının arttığı, karaciğerde fazla yağ asidi serbestleşmesinin azaldığı saptanmıştır (37). Ayrıca CYP2E1 ekspresyonu artarak prooksidanlar oluşur. Sonuçta yağ asitlerinin üretimi hepatik metabolizmanın hızını aşar ve özellikle trigliseridler birikmeye başlar. İnsülin direncine neden olan mekanizmalar başlıca 4 grupta toplanabilir :

- 1- Prereseptör nedenler: Anormal insülin ve insülin antikoru, kan akım bozukluğu.
- 2- Reseptöre ait nedenler: Azalmış reseptör sayısı ve afinitesi.
- 3- Postreseptör nedenler: Anormal sinyal iletimi ve fosforilasyon. İnsülin sinyalizasyonu, postreseptör tirozin kinaz aktivitesi ile olur (37,38). İnsülin reseptör substrate 1 ( IRS-1 ) postreseptör insülin rezistansından sorumlu temel mekanizmadır.
- 4- GLUT 4 ( Glikoz transport edici protein )'ün azalması (39).

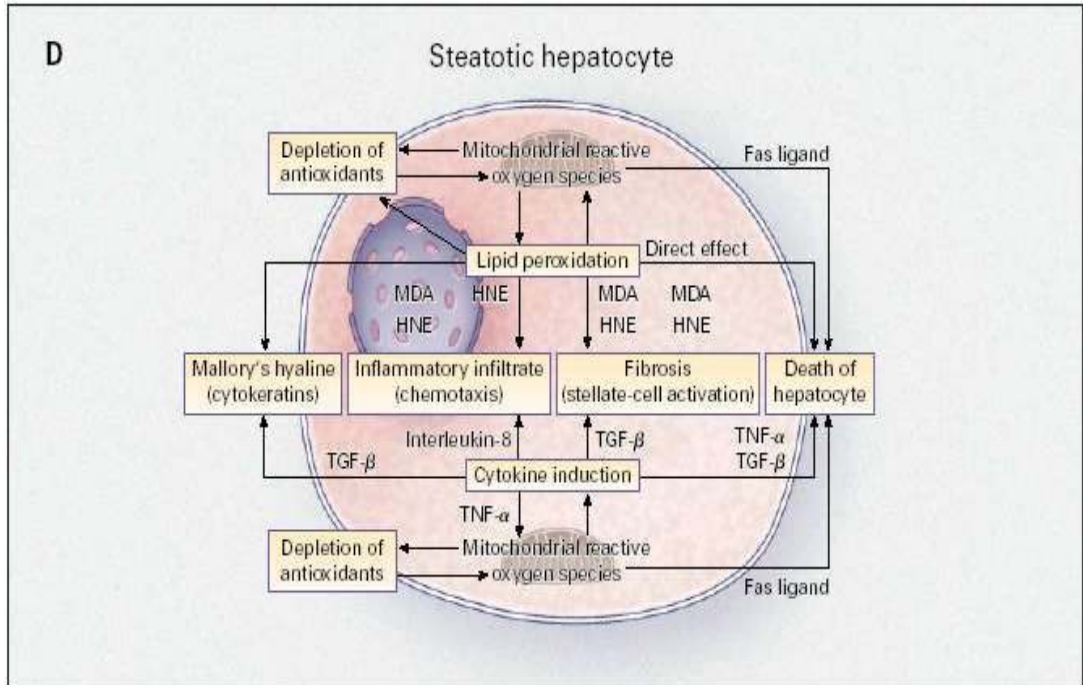
Artmış intrahepatik yağ asidi düzeyleri, steatozdan steatohepatit ve siroza ilerlemede büyük oranda sorumlu olan oksidatif stres için kaynak teşkil eder.

### **2.3.2. NASH Gelişimindeki ikinci Darbe :**

- 1) Oksidatif stres sonucu lipid peroksidasyonu.
- 2) Endotoksin-sitokin bağlantılı hücre hasarı. (Resim 4,5)



Resim 4: Yağ asitlerinin adipöz dokudan salınımının ve hepatosit tarafından tutulumunun artması.



Resim 5: Mitokondrial etki, sitokinlerin artışı, lipid peroksidasyonu etkisiyle inflamasyon, fibrozis ve hücre ölümü.

### 2.3.2. 1. Oksidatif Stres:

Oksidatif stres, reaktif oksijen ürünleri (ROS) ve bunların metabolitlerinin üretiminin, bunlara karşı olan savunma ve detoksifiye etme mekanizmalarının kapasitesini aşarak dengenin bozulması ile meydana gelir. Serbest radikaller genellikle serbest metallerle (Fe, Cu ) ilgili enzimatik veya enzimatik olmayan oksido-redüksiyon esnasında oluşabilir. En önemli radikaller süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve aktif hidroksil radikalidir. Yağ metabolizmasında kısa, orta, ve uzun zincirli SYA'nın artan akımı sonucunda beta – oksidasyon artmaktadır. Bu da NASH yolunda en önemli adım olan serbest radikal üretimi ile sonuçlanmaktadır (40). Sonuçta hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine maruziyet lipidler, DNA ve proteinler gibi hücresel makromoleküllerde hasara neden olabilir. Giderek artan bir şekilde ortaya çıkmaktadır ki, farklı oksidatif stres seviyeleri ile hücreler üzerinde farklı etkiler meydana gelir: belirgin bir etki olmayabilir veya hücre büyümesi, büyümenin durması, apoptozis ve nekrozun uyarılması gibi etkiler olabilir. Mitokondri bu ROS'lar için en önemli kaynağı oluşturmaktadır (41). Reaktif oksijen türlerinin artışı, aynı zamanda antioksidan ajan olan alfa tokoferol ( vitamin E ) ve glutatyonun (GSH) azalması ile eş zamanlıdır.

Serbest radikal üretimi için önemli bir enzim sistemi endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) sistemidir. Bu sistem açlık, tip 2 diyabet, santral obezite ve insülin direnci gibi NASH patogenezinde önem taşıyan faktörlere bağlı olarak artar. CYP2E1 enziminin uyarılması, yan ürünlerin salınımı ile ROS oluşumuna neden olur. CYP2E1, alkolik karaciğer hastalığında da önemli role sahip olan ROS oluşumu ve patogenezde merkezi role sahiptir. NASH indüksiyonunda potansiyel bir faktör olarak suçlanmaktadır. Deneysel NASH' te, CYP2E1 ekspresyonunun yaygınlığı ve lobüler dağılımı steatoz ve inflamasyonun dağılımı ile yakından ilişkili bulunmuştur (42). CYP2E1 ekspresyonu NASH hastalarının biyopsilerinde de artmış olarak bulunmuştur (43). Fakat CYP2E1 endojen lipidlerin peroksidasyonunda tek katalizör değildir ve CYP4E10 ve CYP4E14 de bu hastalarda artmış olarak bulunmuştur ve oksidatif stresin başlamasında alternatif olarak rol olabilirler (44).

CYP2E1 sisteminin NASH indüksiyonunda önemli bir role sahip olmasına rağmen başka kaynaklardan, özellikle de mitokondrilerden gelen serbest radikallerin ve TNF- $\alpha$  sitokininin rolü muhtemelen daha anlamlıdır. Eğer karaciğere mitokondrinin beta oksidasyon kapasitesini aşacak kadar SYA'i gelirse,

peroksizomlar ve sitozol diğerk potansiyel ROS üreticileri olarak rol alırlar ( 33). Kronik oksidatif stres varlığında hepatosit mitokondrilerinde adaptasyonlar geliştiğı gösterilmiştir. Non-alkolik steatohepatitli hastalarda megamitokondriler, mitokondial uncoupling protein-2 ( UCP-2 ) sentez artışı, mitokondrilerde inklüzyon kristal oluşumu ve ATP sentez defektleri saptanmıştır (45,46). NASH'te mitokondial disfonksiyon ve mitokondial DNA da mutasyon gözlenmektedir (47). Mitokondial disfonksiyonda yağ asitlerinin taşınması ve uzaklaştırılması aksar (48). Hepatik antioksidan savunmaların azalması da ROS 'un yapımını arttırabilir (49). Hepatositlerdeki oksidatif stres, nükleer faktör k beta ( NFkB )'yi aktive ederek, steatotik karaciğerin belirgin şekilde duyarlı olduğı sitokinler de dahil proinflamatuvar genlerin ekspresyonuna neden olur (50) .

İnsanlardaki NASH'te oksidatif stresin varlığına yönelik indirekt kanıtlar, NASH'in tedavisi için antioksidanın kullanıldığı pilot çalışmalardaki olumlu sonuçlardan elde edilmiştir (51,52). Bir diyet anketi ile yapılan çalışmada, NASH'li obez hastaların, NASH'li normal kilolu hastalara göre, antioksidanlardan fakir diyetle beslendikleri bildirilmiştir (53). NASH hastalarının karaciğer biyopsisinin mikroarray ile incelemesinde, birçok antioksidan enzimi kodlayan mRNA'ların ekspresyonu, normal karaciğere göre veya diğerk karaciğer hastalığı olanlara göre daha düşük olarak rapor edilmiştir (54). Tüm YK'lerde inflamasyon ve fibrozis gelişmediğı için ikincil fibrojenik darbe olan oksidatif stres diyet, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenebilir. MDA (Malondialdehid) ve HNE (Hidroksinonenal), NASH' li hastalarda , steatozlu hastalara göre artmış olarak bulunur ve bu durum oksidatif stresin arttığını gösterir .

Sıçanlarda MCD (metionin ve kolinden fakir diyet) ile yapılan çeşitli çalışmalarda NASH tablosu oluştuğı gözlenmiştir (37,42). Kolin ve metiyoninden fakir diyet oksidatif savunma mekanizmalarını azaltarak, oksidatif stresi arttırır (53). Anti-TNF- $\alpha$  antikoru, MCD diyet eksikliği olan NASH'li deney modellerinde, fibrozis ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu üzerinde olumlu etkilidir (54,55).

### **2.3.2. 2. Lipid Peroksidasyonu ve NASH**

Serbest radikallerin oluşumu, hücrenin gereksinimi olan oksijenin %90'ının harcanmasına, çeşitli metabolik bozukluklara ve lipid peroksidasyonu olarak bilinen doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açar. Oksidatif stres kısmında



belirtildiği gibi, mitokondriyal, mikrozomal, peroksizomal ve sitoplazmik lipid metabolizmasından masif serbest radikal çıkışı, lipid peroksidasyonuna neden olur.

Doymamış lipidlerin, serbest radikallerin etkisine maruziyeti, bir serbest radikal aracılı mekanizma olan lipid peroksidasyonunda zincirleme bir reaksiyon başlatır. Çoklu doymamış yağların diyete eklenmesi bu lipid peroksidasyonunu arttırır (41). Lipid peroksidasyonu, hücrel membranların yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına neden olur. Lipid peroksidasyonun sitotoksik ürünleri, nükleotidler ve protein sentezi gibi hücrel fonksiyonları bozabilir ve hepatik stellat hücrelerdeki kollojen gen ekspresyonunu modüle ederek karaciğer fibrogenezinde rol oynayabilir (56).

Okside proteinler veya lipidlerin varlığının deneysel çalışmalarda gösterilmesi ile oksidatif stresin NAYKH'lı ve NASH'li hastalarda bulunduğuna dair kanıt vardır (57,58). ROS aracılı lipid peroksidasyonu NASH patogenezinde merkezi bir role sahiptir. Pessayre ve arkadaşlarının derlemesinde belirtildiği gibi ROS ve lipid peroksidasyonu potansiyel olarak NASH'teki tüm tipik histolojik özellikleri açıklamaktadır (59). Plazma ve intrasellüler membranların peroksidasyonu hücre nekrozu/apoptozise ve megamitokondriye neden olabilir.

Lipid peroksidasyonunun önemli yıkım ürünleri MDA ve 4-HNE NASH'te yüksek konsantrasyonda izlenmiştir (60). 4-HNE ve MDA hepatik proteinleri kovalen olarak bağlayarak potansiyel olarak zararlı immün cevabı başlatan bileşenler oluşturabilirler. Ayrıca hepatosellüler stellat hücrelerinde ekstrasellüler matriks protein sentezi, Mallory cisimciklerinin oluşmasını uyarabilirler ve HNE nötrofil kemotaksisini uyarabilir.

NAYKH'ı bulunan hastalarda yapılan bir çalışmada, lipid peroksidasyonunun major aldehidik metaboliti 4-HNE bileşenleri immunohistokimyasal boyama ile karaciğerde yaygın olarak bulunmuştur (61).

HNE ve MDA; mitokondri DNA'sına, proteinlerine zarar vererek solunum zincirlerinde aksamaya neden olur. Böylece yeniden açığa çıkan serbest radikaller Kupffer hücrelerinde, hepatositlerde ve yağ dokusunda TNF- $\alpha$  ekspresyonunu aktive eder. TNF- $\alpha$  mitokondrielerde yapısal ve fonksiyonel olarak hasar verir (62). Bu, serbest radikallerin, lipid peroksidasyon ürünlerinin ve sitokinlerin elektron

trasport zincirinin ve böylece tüm hücrelerin metabolizmasının aktivitelerinde azalmaya neden olmaları anlamına gelir.

Lipid peroksidasyonunun derecesi serbest yağ asitlerinin varlığı ile bağlantılıdır ve steatotik karaciğerde ciddi zarar vereceğini göstermektedir (63).

### **2.3.3. NASH Patogenezinden sorumlu diğer faktörler :**

#### **2.3.3.1 Sitokinler:**

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 akut faz reaksiyonun başlamasını sağlayan tetikçilerdir. Diğer sitokinler ise, akut faz reaksiyonun modifikasyonunda rol alırlar. Sözümlü ettiğimiz sitokinler, karaciğere portal venden kan yoluyla gelirler. Sinuzoidlerin endotel hücreleri kandaki sitokinleri Disse boşluğuna, oradan da hepatositlere ulaştırırlar. Disse boşluğuna uzanımları olan diğer hücreler stellat hücreleri (İto hücreleri) ve Kupffer hücreleridir. Her iki hücre tipinin de hem proinflamatuvar sitokinler için reseptörleri, hem de sitokinleri üretme yetenekleri vardır. Karaciğere özgü bu yapı sayesinde, sitokinler hepatosite ulaşırken, eş zamanlı olarak Disse boşluğundaki diğer hücreler tarafından da fark edilir. Gerek stellat hücreleri, gerekse Kupffer hücreleri kendilerine ulaşan akut faz reaksiyonu ile ilgili bilgileri çoğaltarak adeta ikinci proinflamatuvar sitokin yanıtı olarak hepatositlere sunarlar (1).

Sitokinlerin en bilinen üretim kaynağı lökositlerdir. Ayrıca endotel hücreleri fibroblastlar ve çeşitli dokuların epiteli tarafından da sitokin üretimi gerçekleştirilmektedir. Karaciğer içerisinde ise, sitokinler, enfeksiyöz, toksik, iskemik, otoimmün hepatitler, fibrojen ve transplant reddi, viral çoğalmanın önlenmesi, kısmi hepatektomi sonrasında geride kalan karaciğer dokusunun yenilenmesi gibi pek çok hastalıkta önemli rol oynamaktadırlar (64). Sitokinlerin normal şartlar altında salınımları az miktarda olmasına rağmen, akut faz reaksiyonu sırasında çok yüksek düzeylere çıkarlar. Etki mekanizmaları çok geniş bir yelpaze gösterir. Sitokinler, hormonlardan farklı olarak parakrin ve otokrin yoldan çalışır ve hücre yüzeyindeki kendilerine özgü reseptörler aracılığı ile etkilerini gösterirler (2).

Sitokinler içinde en büyük grup, immunmodülatuar etkiye sahip olanlardır. Bu grupta önemli rol oynayan ve iyi tanınan TNF- $\alpha$ , oksidatif stres veya endotoksin gibi uyarılar sonrasında makrofajlar tarafından üretilir, lökositleri hasar bölgesine çekerek kemotaktik rol oynar. Ayrıca endotel hücrelerini uyararak, çeşitli adezyon moleküllerinin salgılanmasını sağlar. Böylece endotel üzerinde lökositlerin

yapışmasına uygun bir yüzey oluşturulup, doku içine lökosit göçü kolaylaştırılır. İlave olarak TNF- $\alpha$ , hasarlı dokuya göç eden lökositleri uyararak, onların yeni sitokinler ve reaktif oksijen molekülleri salgılamalarına neden olarak, akut faz yanıtının alevlenmesini sağlar. TNF- $\alpha$  nötrofil kemotoksisi, apoptotik süreç ve fibrojenizde de etkilidir (2,64,65).

TNF- $\alpha$ , endotoksin-sitokin bağlantılı hücre hasarı yapmak yoluyla, NASH patogenezinde önemli rol oynar. NASH hastalarının serumlarında, TNF- $\alpha$  düzeyinin kontrollere kıyasla artmış olduğu bilinmektedir (66). Ayrıca, NASH hastalarındaki artmış serum TNF- $\alpha$  düzeyine ince barsaktaki artmış bakteriyel üremenin ( bacterial overgrowth ), yani olası endotoksin kaynağının da eşlik ettiği gösterilmiştir (66). TNF- $\alpha$  ekspresyonu enteral endotoksinler gibi diğer faktörlerle uyarılır. Crespo ve arkadaşları, obez hastalardan NASH'i olanlarda, olmayanlara kıyasla, hem hepatik, hem de adipöz dokuda TNF  $\alpha$ -mRNA ekspresyonunun anlamlı derecede arttığını ve TNF- $\alpha$  nın leptin eksikliğinde de anlamlı derecede arttığını göstermiştir (64).

İnsülin rezistansı, NASH hastalarının hemen hemen tümünde görüldüğünden, hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (67). TNF- $\alpha$ , insülin reseptörlerinin tirozin kinaz aktivitesi ile etkileştiğinden, insülin rezistansının gelişiminden sorumlu önemli bir sitokindir (68) .

TNF- $\alpha$ , TGF  $\beta$ , IL- 8 ve IL-10 gibi çok sayıda sitokin ekspresyonu oksidatif stresin bir hücrel reaksiyonudur. IL-8 NASH'te, hepatosteatozdan daha fazla bulunur. NASH'in patogenezinde inflamasyonun önemini gösterir (69). Serbest radikaller ve sitokinler, karaciğerin TNF- $\alpha$ ' ya duyarlılığını arttırırlar. Sitokinler, fibrojenizi uyarırlar ve devamını sağlarlar (70). Karaciğerde fibrozis gelişiminde, bağ dokusu büyüme faktörünün (Connective tissue growth factor) rolü olduğu bilinmektedir (71).

#### **2.3.4. Fibrozis Patogenezi:**

Hepatik stellat hücreler, Disse aralığında yerleşmiş sitokin ve büyüme faktörü sentezi ve sekresyonu yapabilen özelleşmiş hücrelerdir. Karaciğer fibrozisindeki hücre dışı matriks ve kollajen sentezinden sorumludur. Oksidatif stres ve TGF  $\beta$  hepatik stellat hücreleri aktive ederler. Kupffer hücreleri, TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 sekresyonu ile stellat hücreleri ve fibroblastları aktive eder (72). NASH'te hepatik stellat hücre aktivasyonu vardır ve fibrozis derecesi ile direkt ilişkilidir (27).

Kupffer hücreleri ve hepatik stellat hücreleri arasında sitokin aracılar ile kurulan bu ilişki fibrozis ile sonuçlanır.

Stellat hücrelerinin daha yoğun olduğu perivenüler bölgede, CYP2E1, CYP2A1, CYP3A4 aktivitesi fazladır. TGF  $\beta$  hepatik stellat hücreleri, myofibroblast benzeri hücrelere dönüştürerek kollajen sentezini artırır. NASH'li hastalarda karaciğerde artmış TGF  $\beta$  konsantrasyonları saptanmıştır. TGF  $\beta$ , hem Kupffer, hem de stellat hücrelerden salınabilmektedir. Bir diğer büyüme faktörü, stellat hücrelerden salınan "Bağ doku büyüme faktörü olan" CTGF'dir. TNF- $\alpha$  da CTGF salınımını arttırmaktadır (73,74). Adipöz doku kaynaklı leptin de, fibroziste etkili başka bir moleküldür.

Son dönemlerde NASH'li hastalarda, fibrozisin tüm yönlerini aydınlatmaya yönelik inflamasyonun ve fibrozise gidişin temelleri, sebepleri açıklanılmaya çalışılmaktadır (Tablo 1). Bu çalışmalarda, immunohistokimyasal yöntemlerle, kollajen üreten perisinüzoidal hücreler olarak bilinen hepatik stellat hücreler ve hepatik fibrozisin diğer ekstrasellüler komponentleri üzerinde çalışılmaktadır (75).

Yapılan bir çalışmada, NASH'li hastalarda Kupffer hücrelerinde kitotriozidazın fazla yapıldığı gözlenmiştir. Bu enzim NASH'te sürecin ilerlemesinde rol oynar, komplikasyonsuz steatozun , ileri fibrozisli steatohepatite ilerlemesinde etkilidir (76,77). Hepatik stellat ve portal myofibroblastik hücreler CB2 (Cannabinoid reseptör 2) ekspresyonu yapar. Hepatositlerde bu reseptörlerin ekspresyonu, hastalığın ilerlemesinde etkilidir. Normal karaciğerde, hatta fibrozis olmayan durumlarda yoktur (78). CAR nükleer reseptörü (nuclear constitutive androstane receptor), ilaç metabolizmasındaki enzimlerin regülasyonunda önemli rol oynar. CAR, NASH gelişiminde araştırılmaktadır. CAR, NASH diyet modellerinde fibrozis ve hepatik hasarın kötüleşmesine neden olur (79).

#### **2.3.4.1. Leptin:**

Leptin sistemik olarak adipöz dokuda, lokal olarak karaciğerde stellat hücrelerinde üretilir. Hepatik parenkimde spesifik reseptör ile etkileşir. TGF  $\beta$ 'ı uyararak fibrozisi artırır (80,81). Leptin, besin alımını ve enerji dengesini kontrol eder. Enerji metabolizmasında santral (hipotalamik) uyarıda rol oynar. NASH'te açlık ile ilgili uyarılara direnç veya cevapsızlık vardır. Obezitede de leptin seviyesi yüksekliği gösterilmiştir (82).

Obez farelerde, leptin reseptörleri yoktur veya eksiktir, leptin fonksiyonu yoktur. İnsanda obezitede leptin seviyesi yüksektir, ancak NASH gelişen kişilerde yağ kütlesine göre yetersiz miktarda da olabilir (83). NASH'te leptin seviyesi yüksekliği ve periferde leptin direnci gösterilmiştir (84).

Leptinin glikoz metabolizmasında, fibrozis oluşumunda ve immün sistemde düzenleyici ve ayrıca hepatosit rejenerasyonun steatozlu hayvan modellerinde de, düzenleyici etkisi gösterilmiştir(84,85). Hayvan modellerinde yapılan bazı deneylerde lipotoksositeye karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (86).

#### **2.3.4.2. Adipokinler:**

Adipokinler otokrin, endokrin ve parakrin tarzda etki ederler. İmmün sistem düzenlenmesi ile ilgili moleküller, sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ , kompleman proteinler ), vasküler ve endotelial fonksiyonlarda etkili proteinler (anjiyotensinojen, renin- anjiyotensin sisteminin diğer proteinleri), glikoz dengesi, insülin regülasyonu ve enerji metabolizması ile ilgili hormonlar (adiponektin, rezistin ve leptin), lipid ve lipoprotein metabolizması (serbest yağ asitleri, lipoprotein lipaz, yağ asidi transport protein, apolipoprotein E, retinal-bağlayıcı protein) çeşitli endokrin ve reproduktif faktörler (kordikosteroid ve seks steroidleri) içerir. NASH'te, metabolik sendromda bazı adipokinlerin rolleri olduğu gözlenmiştir (86).

#### **2.3.4.3. Adiponektin:**

Adiponektin adiposit kaynaklı bir plazma proteindir ve insanda bilinen dolaşımdaki en fazla olan hormondur. Adiponektin konsantrasyonu ile obezite, hipertrigliseridemi, tip 2 diyabet, serum aterojenik markırlar, apo B ve apo E arasında ters oran vardır. NASH'te adiponektinin azalma miktarı inflamatuvar grade ile ilişkilidir, ancak ALT ile bir oran yoktur. Leptin ve TNF- $\alpha$  seviyesi ile ilişkisi arasında oran gösterilmemiştir. Adiponektin obezite ve insülin direnci ile negatif ilişkidir.

Adiponektin insülin etkisini düzenler ve karaciğerde glukoneogenez inhibisyonunda insülin sensitivitesini artırır. Aktive serbest yağ asidi oksidasyonunda metabolizmayı düzenler, lipogenezi baskılar. TNF- $\alpha$  üretimini baskılar. Adiponektin NASH'e karşı koruyucu bir faktör olarak bilinir (88,89,90). Bir çalışmada NASH'li hastaların karaciğer biyopsilerinde adiponektin reseptör II ekspresyonu ve adiponektinin azaldığı gösterilmiştir (81). Adiponektin karaciğerde

fibrozisi önleme etkisinin yanında, antiinflamatuvar etkiye sahiptir (91). Adiponektin, hayvan deneylerinde CCl 4 ile karaciğer hasarında, fibrozisi azaltır, endotoksin nedenli karaciğer hasarına karşı koruyucudur ve obezite ile lipoatrofiye insülin rezistansını düzeltir (92,93,94).

Obez deney modellerinde ve alkolik deney modellerinde adiponektin infüzyonu, hepatik steatoz, biyokimyasal markırlar, insülin, glikoz ve metabolik parametreleri düzeltir (95). Güncel çalışmalarda NASH'li hastaların karaciğer biopsilerinde, adiponektin ve adipo R II reseptörlerinin ekspresyonunda azalma gösterilmiştir. NASH'li hastalarda hipoadiponektinemi gösterilmiştir (96). PPAR gamma (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), adipöz doku fonksiyonunda ve adipogenezisin regülasyonunda etkili nükleer bir reseptördür. Hipoadiponektinemi, PPAR gamma mutasyonu veya polimorfizmi ile ilişkilidir. Adiponektinin genetik regülasyonu bilinmemektedir. Ancak bu mutasyon, hipoadiponektinemi ve tip 2 diyabette tespit edilmiştir. Diyabet için tiakolidinedion tedavisi adiponektin seviyesini yükseltir (96).

**Tablo 1: NASH'te Hepatik Fibrozisin Moleküler Mekanizması**

Mekanizma	Bulgular	Klinik
İnflamasyon	İnflamatuvar hücreler trombosit kaynaklı growth faktör ve TGF-B1 gibi fibrogenik faktörler salgılar. Bu faktörler stellat hücrelerinin profibrogenik etkisini uyarır. Matriks birikiminin olumsuzluğu, naturel kiler hücrelerinin azalması ve tükenmesi stellat hücrelerinin programlı ölümüne yol açar.	Antiinflamatuvar ilaçlar veya sitokinler fibrozisi engelleyebilirler. Kemokin antagonistleri geliştirilmiştir.
Oksidatif stres	Oksidatif stres ile ilişkili moleküler mediatörler, stellat hücrelerinden prokollajenleri artırır ve karaciğer fibrozisinin ilerlemesine katkıda bulunur.	NASH'te Antioksidan tedaviler faydalıdır. Ancak insanda etki yeterliliği kanıtlanmamıştır.
Apoptozis	Apoptotik hepatositler fibrogenezisi uyarır. Stellat hücreleri tarafından apoptotik cisimciklerin fagositozu süreci hızlandırır.	

Mekanizma	Bulgular	Klinik
Glikoz metabolizma değişiklikleri	Yüksek glukoz ve insulin seviyesi TGF- $\beta$ ve bağı dokusu büyüme faktörünün dengesini ve stellat hücre biyolojisini benzer stellat hücreleri uyarılır.	Hipergliseminin sıkı takip ve tedavisi fibrozisin ilerlemesini yavaşlatır.
Nükleer hormon reseptörleri	PPAR $\alpha$ , durgun stellat hücresinde belirgindir, aktivasyon süreci ile azalır. PPAR $\alpha$ , ligandı aktive stellat hücrelerinin çoğu özelliğini geri döndürüp fibrozisi durdurur.	NASH'in devam eden fibrozisinde tiazolidinedionların etkisi faydalıdır.
Endojen kannabinoid sistem	(Kannabinoidler) CB1 ve CB2 reseptörleri ile etkisini gösterir. CB2 antifibrotik etkilidir. CB1 fibrozisin inaktivasyonu, karaciğerde fibrogenik hücrelerin birikimini ve hepatik TGF-B'yı azaltarak fibrogenezisi azaltır.	CB1 reseptör antagonistleri, metabolik sendromun parametrelerini düzeltir ve obeziteyi azaltır.
Renin-angiotensin sistemi	Angiotensin II stellat hücrelerinde profibrogenik etki yapar.	Metabolik sendrom ve NASH'li hastalarda hipertansiyonun farmakolojik tedavisi gereklidir.
Adiponektin	Leptin etkili bir profibrogenik faktördür, stellat hücreleri direkt etkiler. Kanser gelişimine yol açar. Adiponektin karaciğer hasarında düzelme sağlar. Toksik karaciğer hasarından sonra fibrogenezisi durdurur.	Adiponektin reseptörleri NASH'te gelecek çalışmalar için hedef konulardandır.

NASH'in patogenezi oldukça karışıktır ve bilgiler artıkça daha da karmaşık hale gelmektedir. En son öne sürülen teoriye göre, dört basamaklı bir süreç ile açıklanmaktadır (97). Birinci basamakta insülin ile kolaylaştırılan steatoz, ikinci basamakta intrasellüler lipid toksisitesi veya lipid peroksidasyonu ile indüklenen nekroz, üçüncü basamakta hepatositlerden lipidlerin salınması ve bunların hepatik venlere direkt ve inflamatuvar hasar yapması ve son olarak dördüncü basamakta sekonder kollaps ile venöz obstruksiyon gelişmesi ile fibröz septalaşma ve siroz oluşumu.

#### 2.4. Tedavi:

NASH için etkili tek bir tedavi henüz yoktur. NASH'in en önemli tedavi yaklaşımı, kilo verme, hiperlipidemi ve hipergliseminin tedavisi ve toksik olan ilaçların bırakılmasıdır (98,99,100). Metabolik sendrom varsa, komponentlerine yönelik tedavi de yapılmalıdır. Metabolik sendrom ve NASH'te varsa hipertansiyonun da tedavisi yapılmalıdır.

#### **2.4.1. Tedavideki Amaçlarımız:**

Leptin ve adiponektini artırmak, insülin rezistansını kırmak, insülin duyarlılığını artırmak, inflamasyonu önlemek veya çözmek, fibrozise gidişi önlemektir.

#### **3.4.2. Vücut kilosunda azalma:**

Kilo verme karaciğer yağ içeriğini azaltabilir, hatta normale döndürebilir. Bir çalışmada 10-30 kg vermenin, obez kişilerde karaciğer yağ içeriğini azalttığı gösterilmiştir (101). % 30 oranında fazla kiloya sahip kişilerde vücut ağırlığında yaklaşık % 10 oranında azalma laboratuvar parametrelerinde düzelmelere neden olur. Diğer yandan çok hızlı ve aşırı kilo verme SYA deşarjına yol açarak portal fibrozis ve inflamasyona neden olabilir (102). En etkin tedavi uzun zaman periyodunda sürdürülen düşük kalorili diyetdir. Diyetle ise düşük kalorinin yanında özellikle de çoklu doymamış yağ asitleri etkilidir.

Kilo verme AST ve ALT değerleri üzerinde anlamlı iyileşme sağlar.

Ancak hızlı kilo vermeden kaçınılmalıdır. Hızlı kilo verme bizzat karaciğerde yağlanmaya neden olur. Haftada 1 kg'ı aşmayan kilo kaybı önerilir.

#### **3.4.3. İnsülin duyarlılığını artırıcı ilaçlar:**

İnsülin direnci NASH patogeneğinde temel rol oynar. Bu sebeple NASH tedavisinde, insülin direncini azaltan ve hepatik insülin duyarlılığını arttıran ilaçlar önemlidir. İnsülin duyarlılığını arttıran ilaçlar, NASH'te metabolik, biyokimyasal ve histolojik bozuklukları düzeltmede kullanılabilir (44). Metforminin NASH'te nekroinflamatuvar aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir (103). Etkilerini insülin direncini PPAR gamma nükleer reseptörlerini aktive ederek, düzelterek gösteren roziglitazon ve piaglitazon da NASH'te yararlı etkiler göstermektedirler (104,105). Fakat bu ilaçların uzun dönem etkileri bilinmemektedir. Ayrıca tiazolidinlerin potansiyel hepatotoksik yan etkileri olması bu ilaçların uzun dönemde NASH tedavisinde kullanımlarını sınırlamaktadır.



#### **3.4.4. Lipid düşürücü ajanlar:**

Gemfibrozil: Trigliserid üretimini azaltırken, VLDL klirensini artırır. ALT'de anlamlı düşüşler sağlar (106). HMG CoA Redüktaz inhibitörlerinin, biyopsi kontrollü çalışmalarda steatozu düzelttiği, nekroinflamatuvar aktivite ve fibroziste gerileme yaparken, ALT'de minimal düşmeye yol açtığı gösterilmiştir (107).

#### **3.4.5. Antioksidanlar :**

Hücreleri serbest oksijen radikallerinden korumak için süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi birçok savunma mekanizması mevcuttur. Bunların yanında karoten, likopen, askorbik asit ve tokoferol gibi birçok besinin antioksidan etkileri mevcuttur. Katalaz ve glutatyon peroksidaz hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürerek detoksifiye etmektedir. Demir ve bakır gibi metallerin de antioksidatif etkileri mevcuttur. Güçlü antioksidan etkiye sahip olan fitoöstrojenler ve izoflavonlar da vardır. Genistein izoflavonoid bileşiklerinden olup, güçlü antioksidandır. Deneysel olarak, genisteinin koruyucu, önleyici etkisinden bahsedilmektedir (108).

E Vitamini: Antioksidan olup, oksidatif stresi azaltabilir. Yapılan çalışmalarda transaminazlarda düzelme sağlamış olup, USG ile yağlanmada gerileme sağlanmamıştır (109).

N-Asetil Sistein: Karaciğerde glutatyon düzeylerini artırır ve oksidatif stresten korur. Bir çalışmada hastalarda enzimatik ve histolojik düzelme sağladığı bildirilmiştir (110)

#### **2.4.6. Hipertansiyon kontrolü:**

Anjiotensin reseptör blokerleri ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri gibi ilaçlar kullanılabilir. Angiotensin II Tip 1 reseptör antagonisti telmisartan, NASH tedavisinde kullanılabilen ilaçlardandır. Telmisartan subkutanöz ve iç organlardaki yağı anlamlı olarak azaltır (111).

#### **2.4.7. Hepatoprotektif Ajanlar:**

Ursodeoksikolik asit: İmmünomodülatör, direkt sitoprotektif (karaciğer hücre membran stabilizasyonu) ve antiapoptotik etkisi vardır (112).

**Tablo 2 : NASH te terapötik yaklaşımlar**

<b>Strateji</b>	<b>Tedavi</b>
Kilo verme	Kalori kısıtlaması, egzersiz
İnsülin duyarlılığını arttırma	Metformin, PPAR ligantları (rozigitazon, pioglitazon )
Lipid düşürücü ilaçlar	Fibratlar ( klofibrat), balık yağı,
Antioksidanlar	Vitamin E, N-asetil-sistein, betain
Sitokin modülasyonu	Vitamin E
Apoptoz	Ursodeoksikolik asit

### **3. MATERYAL METOD**

Çalışmamızdaki olgular, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalında, 1996-2008 yılları arasında izlenen ve Kocaeli Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında karaciğer biyopsileri olan olgular arasından seçilmiştir.

Karaciğer biyopsilerinin içinden NASH, hepatosteatoz, steatozlu viral hepatit ve normal tanı almış toplam 106 olgu değerlendirilmeye alınmıştır. Bu olguların 63'ü NASH, 13'ü hepatosteatoz, 13'ü steatozlu viral hepatit, 17'si normal tanı almış olgulardır.

NASH olgularını seçerken, hepatit B ve C, otoimmün hepatit, primer bilier siroz ve alkol hikayesi olmayan, karaciğer biyopsilerinde %10'un üzerinde yağlanması olan, laboratuvar incelemelerinde karaciğer enzim yüksekliği bulunan vakalar arasından seçilmiştir. Bu vakalar seçilirken özellikle ALT değerlerinin 60'ın üzerinde olmasına dikkat edilmiştir. NASH grubundaki hiçbir hastada, gastrointestinal sistem cerrahisi ve son altı ayda karaciğer yağlanması yapan ilaç kullanımı öyküsü yoktur. AKŞ 140mg/dl'nin üstünde ve rastgele glukoz seviyesi 200mg/dl üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi. Kolesterol ve trigliserid değerleri en az iki ölçümde normalin üstünde olan olgular hiperlipidemik olarak değerlendirildi. BMI, vücut ağırlığı/ boy uzunluğunun metre olarak karesi kabul edilmiştir. BMI, 25'in üzeri obez olarak kabul edilmiştir. Tüm olgularda anormal

karaciğer biyokimyası olduğu zamanlarda biyopsi yapıldı. Tüm karaciğer biyopsileri hastaların biyokimyasal laboratuvar değerlerini bilmeyen iki patolog tarafından kör olarak değerlendirilmiştir. Proje Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

Hepatosteatoz olguları, viral hepatit, otoimmün hepatit, primer bilier siroz, alkol ve yağlanmaya neden olabilecek ilaç hikayesi olmayan, karaciğer biyopsisinde yağlanma tespit edilen, karaciğer enzimleri hafif yüksek, özellikle ALT değerleri 60'ın altında olan olgular seçilmiştir. Steatozlu viral hepatit olguları seçilirken, karaciğer biyopsisinde yağlanması olan ve histopatolojik görünümü NASH'e benzeyen, B veya C Hepatitli olgular arasından seçilmiştir. Diğer 17 normal olgu grubu da, karaciğer biyopsisinde herhangi bir patolojik tanı almayan, yağlanması olmayan, karaciğer enzimleri normal olan olgular olarak çalışma kapsamına alınmıştır. Tüm bu olgular belirlenirken, muayene bulguları, laboratuvar ve görüntüleme sonuçları ile değerlendirilip, klinik ile korele edilmiştir.

Çalışmamızdaki 106 olgunun biyopsi bloklarına H-E, MT, retikülin, orcein, demir ve immunhistokimyasal yöntemle CD68, SMA boyaları uygulanmıştır.

CD 68 için, CD68 Ab-4 ( PG-M1 Neomarkers Fremont, CA); SMA için, Aktin Smooth Muscle Ab-1 ( 1 A4 Neomarkers Fremont, CA) kullanılmıştır.

Kaplı lama alınan kesitler bir gece 56 C'lik etüvde bekletilip, sırasıyla ksilol, % 99,9'luk alkol, % 96'lık alkollerden geçirilmiştir. Akan suda yıkanmıştır. Her iki antikorda antijen retrieval için sitrat buffer kullanılmıştır (5 dakika düdüklü tencerede). Hidrojen peroksit sonrası, 30'ar dakika primer antikordarda bekletilmiştir. İyice yıkanarak, sırasıyla 25'er dakika biotinylated, streptavidin ve AEC kromogende bekletilen lamlar yıkandıktan sonra, mayer, H-E ile zıt boyası yapılmıştır. Su bazlı kapama maddesiyle kapatılmıştır.

Histopatolojik değerlendirmede olgular yağlanma oranlarına göre:

**1 ( hafif ):** % 1-30 ; **2 ( orta ):** % 30-70 ; **3( şiddetli):** % 70< olarak değerlendirilmiştir.

Tüm olgular, nükleer glikojen varlığı açısından incelenmiştir. Hepatositlerdeki balonlaşma ise, yok, minimal, mevcut ve belirgin olmak üzere 4 alt grupta değerlendirilmiştir.

Olgular,hepatik inflamasyon yoğunluğu ve lokalizasyonlarına göre sınıflandırılmıştır.

Portal inflamasyon: **(0): Yok ; (1): Hafif; (2): Orta ; (3): Belirgin** dört alt grupta incelenmiştir.

Lobüler inflamasyon, noktasal nekroz sayısı ( 20 büyütmede ): **1: < 2 odak** ( 20 büyütme ); **2: 2-4 odak** ( 20 büyütme ); **3: >4 odak** ( 20 büyütme ) olarak belirtilmiştir.

Genel inflamasyon değerlendirilmesi, lokalizasyona bakılmaksızın yalnız inflamasyon şiddeti ile değerlendirilmiş; **yok(0), hafif(1), orta(2) ve şiddetli (4)** olmak üzere 4 grupta incelenmiştir.

### **3.1. NASH' in Brunt Kriterlerine Göre Sınıflaması:**

Çalışmamızdaki NASH ve hepatosteatoz olguları, Brunt kriterlerine göre grade ve stageleri tekrar değerlendirilmiştir (45) :

Brunt kriterlerine göre, olguların gradeleri steatoz, balonlaşma ve inflamasyon oranlarına göre 3 grupta; stageleri ise fibrozisin oranı ve lokalizasyonu incelenerek 4 grupta değerlendirilmiştir.

Brunt kriterleri ayrıntılı olarak tablo: 3 ve 4'te, resim 6'da açıklanmaktadır.

**Brunt Kriterleri:**

**Tablo 3: Brunt Sistemi Grade**

<b>Grade</b>	<b>Steatoz</b>	<b>Balonlaşma</b>	<b>İnflamasyon</b>
<b>Hafif</b> <b>Grade-1</b>	<b>1-3</b> Esas olarak % 5-33 yağlanma	Minimal	L:1-2 P:yok-hafif
<b>Orta</b> <b>Grade-2</b>	<b>2-3</b> % 33'ün üzeri herhangi bir derecede yağlanma olabilir.	Mevcut	L:2 P:hafif-orta
<b>Şiddetli</b> <b>Grade-3</b>	<b>2-3</b> Tipik olarak > %66'nın üzerinde yağlanma (panasiner)	Belirgin	L:3 P: hafif-orta

**Steatoz grade 1:≤33%, grade 2>33%<66%, grade3≥66%**

**L:lobuler, P:portal**

**lobuler(0-3):**

**0:yok, 1:<2odak(20 büyütme), 2:2-4odak(20büyütme), 3:>4odak(20büyütme)**

**portal(0-3): 0:yok , 1:hafif, 2:orta, 3:belirgin**

**Fibrozis evrelemesi:**

**Stage 1:** Fokal veya yaygın perivenüler alanda perisellüler fibrozis

**Stage 2:** Yaygın veya fokalden daha fazla periportal fibrozis

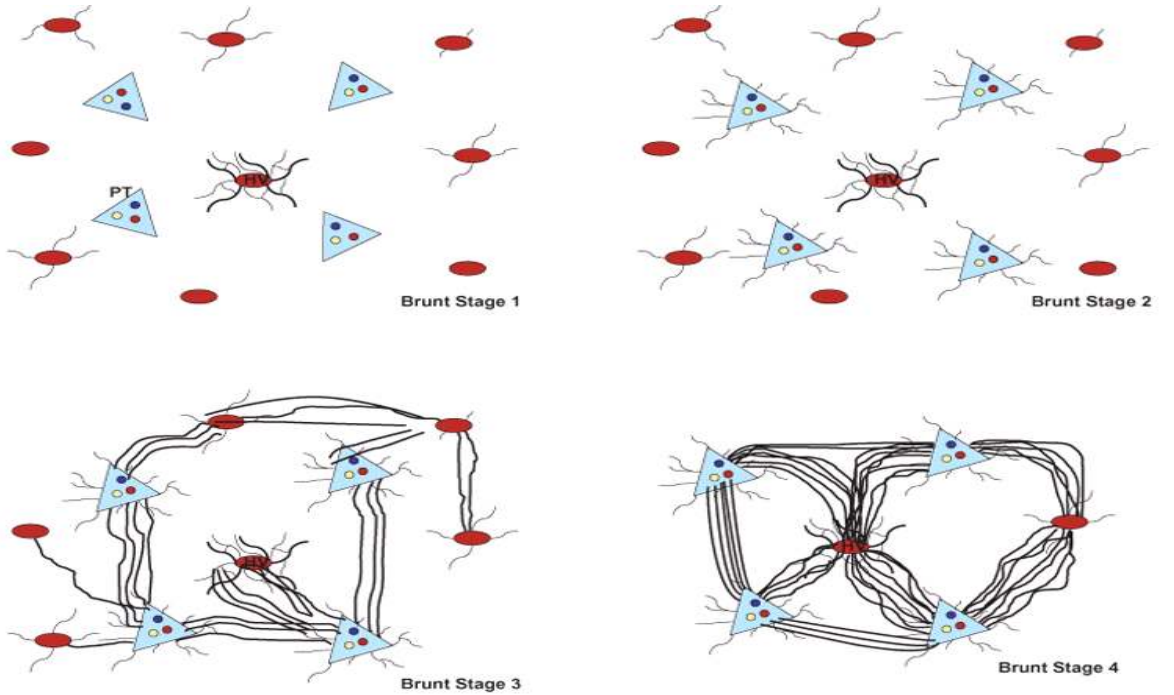
**Stage 3:** Fokal veya yaygın köprüleşme fibrozisi,

**Stage 4:** Siroz

**Tablo 4: Brunt Sistem Stage**

Stage	Zon 3, Perisinüzoidal	Portal Alan	Bridleşme	Siroz
1	Fokal veya yaygın	0	0	0
2	Fokalden daha fazla veya yaygın	Fokal veya yaygın	0	0
3	Bridleşen septalar	Bridleşen septalar	+	0
4	+/-	+/-	Yaygın	+

( Fibrozis varlığına göre stage )



Resim 6: Brunt stage sınıflaması

Preparatlara demir boyaları uygulanmış, pozitif (+) boyanan ve negatif (-) reaksiyon izlenenler olmak üzere 2 kategoride değerlendirilmiştir.

CD 68 boyası tüm gruplara uygulanmış, CD 68 pozitif (+) Kupffer hücre sayıları ve lokalizasyonları değerlendirilmiştir.

Kupffer hücreleri 10x40'lık büyütmede 10 alanda sayılmış, ayrıca hücre sayılarına göre 0-200 arasındakiler grade 1, 201-500 arasında olanlar grade 2, 500'ün üstü grade 3 olarak kabul edilmiştir. Kupffer hücre lokalizasyonlarına göre V (perivenüler), L (lobuler sinüzoidlerin içinde), P (Portal trakt içinde) olmak üzere belirtilmiştir. Kupffer hücre birikimleri incelenmiş, agregat ve lipogranülom mevcudiyetine göre, bu kriterlerin olup olmadığı değerlendirilmiştir.

SMA ile stellat hücre aktivasyonu değerlendirilmesi şu şekilde yapılmıştır: Normal (0), portal damarlar çevresinde düz kas aktini immünoaktivitesi, (1+) Hafif perisinüzoidal boyanma, (2+) Periportal boyanma, orta derecede perisinüzoidal boyanma, (3+) Portal traktlar arasında septa veya köprüleşme yapan SMA ekspresyonu, (4+) Sirotik bantları birbirine bağlayan, portal traktları birleştiren SMA ekspresyonu. Daha sonra istatistikler esnasında, 0 ve 1+ grubu 1, diğer 2+, 3+ ve 4+' ler grubu 2 olarak numaralandırılmış, SMA ekspresyonu şiddetine göre olgular 2 grupta incelenmiştir.

NASH, hepatosteatoz, steatozlu viral hepatit ve normal olgu grupları Chi-Square testi uygulanarak karşılaştırılmış,  $p < 0.05$  ve altı değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Olgular arasındaki istatistiksel farklar, aşağıdaki gruplar arasında değerlendirilmiştir:

- Olgu gruplarının yağlanma yoğunlukları,
- Olgu gruplarının içerdikleri lobüler yangı miktarları,
- Olgu gruplarının genel inflamasyon miktarları,
- Olgu gruplarında nükleer glikojen oranları,
- Olgu gruplarında balonlaşma varlığı ve oranları,
- Olgu gruplarına göre, demir varlığı,
- NASH ve hepatosteatoz olgularında, Brunt gradeleri,
- NASH ve hepatosteatoz olgularında, Brunt stageleri,
- Olguların steatoz yoğunluğuna göre, lobüler inflamasyon oranları,

- Olgu gruplarının Kupffer hücre yoğunluğu,
- Olgu gruplarında, Kupffer hücre portal lokalizasyonları,
- Olgu gruplarında agregat varlığı ve oranları,
- Olgu gruplarında lipogranülom varlığı ve oranları,
- Olguların Brunt grade'ine göre, agregat varlığı,
- Olguların Brunt stage'ine göre, agregat mevcudiyeti,
- Olguların Brunt grade'ine göre, lipogranülom varlığı,
- Olguların Brunt stage'ine göre, lipogranülom varlığı,
- Olguların Brunt grade'i ve Kupffer hücre portal lokalizasyonları,
- Olguların Brunt stage'i ve Kupffer hücre portal lokalizasyonları,
- Olguların steatoz yoğunluğuna göre, agregat varlığı,
- Olguların steatoz yoğunluğuna göre, lipogranülom varlığı,
- Olguların steatoz yoğunluğuna göre, Kupffer hücre portal lokalizasyonları,
- Olgu gruplarının stellat hücre yoğunlukları,
- Olguların Kupffer hücresi grade'i ile stellat hücre yoğunlukları,
- Olguların Brunt stage'ine göre, stellat hücre yoğunlukları,
- Olguların Brunt grade'ine göre, stellat hücre yoğunlukları incelenmiştir.

#### 4. BULGULAR

63 NASH, 13 hepatosteatoz, 13 steatozlu viral hepatit, 17 normal olmak üzere, 106 olgu çalışmamıza alınmıştır.

NASH grubundaki olguların yaşları 12-69 arasında olup, yaş ortalaması 40,8'dir. Hepatosteatozlu olguların yaşları 38-68 arasında olup, yaş ortalaması 49,92'dir. Steatozlu viral hepatit olgularının yaşları 1-59 arasındadır, yaş ortalaması 45,23'tür. Normal gruptaki olguların yaşları 3-62 arasındadır, yaş ortalaması 45,23'tür.

NASH olgularında kadın/erkek oranı 23/63 olup, % 36.50'si kadındır. Hepatosteatozlu olgularda kadın/erkek oranı 10/13 olup % 76.92'si kadındır. Steatozlu viral hepatit olgularında kadın/erkek oranı 8/13 olup % 61.53'ü kadındır. Normal kontrol grubunda kadın/erkek oranı 9/17 olup, % 52.94'ü kadındır.

Çalışmamızdaki NASH olgularının % 79.36'sı obez, % 33'ü diyabetli ve %60.31'i hiperlipidemiktir.



Olguların histopatolojik değerlendirilmesinde, NASH olgularında, belirgin perivenüler lokalizasyonlu yağlanma, polimorf nüveli lökositlerden zengin yangısal infiltrasyonlar, nüve içi glikojen birikimleri ve balonlaşma dikkati çekmiştir (Resim 8,9,10,11,12,13,14,15,16). Perivenüler, perisellüler fibrozis, olguların çoğunda belirgin olarak izlenmiştir. (Resim 17,18,19,20).

Gruplara göre yağlanma oranları incelendiğinde, NASH ve Hepatosteatoz gruplarında sırasıyla % 52.4 ve % 76.9 oranlarında hafif yağlanma izlendi. Steatozlu viral hepatit grubunda % 46.2 oranıyla olguların en fazla orta derecede yağlanma içerdiği izlenmiştir. **p<0.0001** ( Tablo 11 ).

Gruplara göre polimorf nüveli lökositlerden zengin noktasal nekroz sayıları incelendiğinde: NASH olgularında % 61.9, hepatosteatoz olgularında % 53.8, steatozlu viral hepatit grubunda ise % 53.8 oranında hafif şiddette noktasal nekroz izlenmektedir. Orta şiddette noktasal nekroz NASH olgularında % 22.2 olup, hepatosteatoz grubunda yalnız bir olgu izlenmiştir. **p< 0.0001** ( Tablo 12).

Olgu gruplarına göre genel inflamasyon değerlendirildiğinde, NASH grubunda % 71.4 oranında hafif inflamasyon, hepatosteatoz grubunda % 46.2 inflamasyonsuz, % 46.2 hafif inflamasyonlu bulunmuştur. **p<0.0001** ( Tablo 13 ).

Çalışma gruplarında nükleer glikojen varlığı incelenmiş, NASH' li olgu grubunda %46, hepatosteatozlu grupta % 38.5, steatozlu viral hepatit grubunda % 46.2 oranında nükleer glikojen izlenmiş; normal kontrol grubunda nükleer glikojen izlenmemiştir. NASH'te nükleer glikojen ile arasında (+) pozitif birliktelik gözlenmiştir. **p< 0.006** (Tablo 14 ).

Çalışma gruplarımızda hepatositlerde balonlaşma incelenmiş, NASH grubunda %92.1 , hepatosteatoz grubunda %53.9 oranında balonlaşma izlenmiştir. Normal kontrol grubumuzda balonlaşma izlenmemiştir. **p < 0.0001** (Tablo15 ).

Demir birikimi çok sık izlenen bir bulgu değildi. 2'si Steatohepatitli, 1'i normal gruptaki 3 olguda demir birikimi izlenmiştir. **p< 0.017** ( Tablo 16) ( Resim 21).

NASH ve hepatosteatozlu olgular Brunt gradelerine göre incelendiğinde, NASH olgu grubunda % 55.5'i grade 1, hepatosteatoz grubunda % 61.5'i grade 0 olarak bulunmuştur. **p<0.0001** ( Tablo 17).

NASH ve hepatosteatozlu olgular Brunt stagelerine göre karşılaştırıldığında, NASH grubunda olguların % 41.2'si stage 1, steatohepatit grubunda olguların % 69.2'si stage 0 bulundu. **p<0.032** (Tablo 18).

Olgularımız, steatoz yoğunluğu ile lobüler inflamasyon şiddeti açısından karşılaştırılmış, steatoz izlenmeyen kontrol grubumuzda hiç inflamasyon izlenmemiştir. Hafif steatozlu 54 hastanın % 51.9unda hafif inflamasyon, orta şiddette steatozlu 19 hastanın % 47.4 ünde hafif inflamasyon, şiddetli steatozlu 2 hastanın inflamasyon şiddeti ise %50 orta,%50 şiddetli inflamasyon izlenmiştir. **p< 0.0001** (Tablo 19).

Olgularımızı steatoz yoğunluğuna göre nükleer glikojen varlığı açısından araştırdığımızda, hafif steatozlu olgularda %42.9, orta derecede steatozlu olgularda %50, yoğun steatozlu olgularda %42.9 oranında nükleer glikojen izlenmiştir. Steatoz yoğunluğu ve balonlaşma varlığı açısından yapılan incelemede hafif steatozlu olgularda %67.3 oranında minimal balonlaşma, orta derecede steatozlu olgularda %53.8 oranında orta derecede balonlaşma, yoğun steatozlu olgularda %71.4 oranında belirgin balonlaşma izlenmiştir. Yağlanma izlenmeyen normal kontrol grubunda hiç nükleer glikojen birikimi ve balonlaşma izlenmemiştir. (Tablo 20, 21).

Olgulardaki CD 68 boyası ile Kupffer hücrelerinin değerlendirilmesinde, NASH'li karaciğerlerde, daha yaygın olmak üzere bu hücrelerin daha çok zon 3'de yerleşim gösterdiği, boyutlarının büyüdüğü, lobüler olarak gruplaşmalar ve lipogranülomlar oluşturduğu dikkati çekmiştir. İmmunhistokimyasal incelemede, agregat olarak saptanan alanların, H-E kesitlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesinde, bu alanlardaki Kupffer hücreleri seçilememekte, endotel hücreleri veya mononükleer yangısal hücreler ile karışabilmektedir. Ayrıca NASH'li olgularda yaygın olarak portal bölgelerde, Kupffer hücre toplulukları izlenmiştir. Özellikle lipogranülom yapılarında Kupffer hücrelerinin içinde lipid birikimleri olduğu izlenimi alınmıştır (Resim 26, 27, 28, 29, 30).

Ayrıca kontrol grubu dışındaki olgularda, portal bölgelerde Kupffer hücresi agregatları da izlenmiştir. (Resim 24, 25). Normal karaciğerlerde Kupffer hücreleri sayıca çok küçük boyutta, tek tek ve lobüler lokalizasyonda izlenmiştir (Resim 22, 23).

10 x 40'lık büyütmede CD 68(+) Kupffer hücreleri sayıldığında ortalama Kupffer hücre sayısı, NASH'li olgularda 431.3, hepatosteatozlu olgularda 477.69, steatozlu viral hepatitL olgularda 445, normal kontrol grubunda 477.94 tür. Grupların sayısal değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Olgular CD 68(+) Kupffer hücre gradelerine göre incelendiğinde, NASH olgularının % 46'sı grade 2, hepatosteatoz ve steatozlu viral hepatit olgularının % 46.2'si grade 3 bulundu. Normal grupta grade 2 ve grade 3 %41.2 oranında izlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. **P = 0.704** (Tablo22).

Olgu gruplarımızda Kupffer hücre lokalizasyonları, genel olarak lobüler olmasına rağmen, NASH grubunda % 41.3 oranında , hepatosteatoz ve steatozlu viral hepatit gruplarında % 30.8 oranlarında portal bölgelerde CD 68 (+) Kupffer hücreleri izlenmiştir. Normal kontrol gruplarında, portal bölgede Kupffer hücresi izlenmemiştir. (Tablo 23).

1'i NASH, diğeri steatozlu viral hepatit grubundan 2 vakada perivenüler CD 68(+) Kupffer hücresi izlenmiştir.

Olgu gruplarımız agregat varlığına göre incelendiğinde, NASH grubunda olguların % 68.25'inde, hepatosteatoz grubunda % 23.08'inde, steatozlu viral hepatit grubunda % 30.77 oranında agregat izlenmektedir. Normal gruptaki olguların hiçbiri agregat içermemektedir. **p< 0.0001** ( Tablo 24 ).

Olgu gruplarımız lipogranülom varlığına göre incelendiğinde, NASH grubunun % 60.32'sinde lipogranülom izlenmiştir. Hepatosteatoz ve normal gruptaki olguların hiçbirinde lipogranülom izlenmemiştir. Steatozlu viral hepatitli olguların % 23.08'inde lipogranülom izlenmiştir. **p< 0.0001** ( Tablo 25 ).

NASH ve hepatosteatoz olgularının Brunt grade'i ile agregat varlığı karşılaştırıldığında, grade 0'ların %75 inde agregat izlenmemiştir. Grade 1 olguların % 51.3 ünde, grade 2 olguların % 80.8'inde, grade 3 olguların tamamında agregat izlenmiştir. **p< 0.007** ( Tablo 26)

NASH ve hepatosteatoz olgularının Brunt stage'i ile agregat varlığı karşılaştırıldığında, stage 0'da %40, stage 1'de %82.1, stage 2'de %70, stage 3'de % 50 lipogranülom izlenmektedir. Stage 4 olan bir vakada lipogranülom izlenmemiştir. **p< 0.015** ( Tablo 27)

NASH ve hepatosteatoz olgularının Brunt grade'i ile lipogranülom varlığı karşılaştırıldığında, grade1 olguların % 48.7' sinde, grade 2 olguların % 61.5'inde, grade 3 olguların % 100'ünde lipogranülom izlenmiştir. Grade 0 olguların hiçbirinde lipogranülom izlenmemiştir. **p< 0.006** ( Tablo 28).

NASH ve hepatosteatoz olgularının Brunt stage'i ile lipogranülom varlığı karşılaştırıldığında, stage 0'da %28, stage 1'de %75, stage2'de %50, stage 3'de % 33.3 oranında lipogranülom izlenmiştir. Stage 4 olan tek olguda lipogranülom izledik. **p< 0.007** ( Tablo 29).

NASH ve hepatosteatoz olguları gradelerine göre incelendiğinde, grade 0 olguların %37.5'inde, grade 1 olguların % 38.5'inde, grade 2 olguların % 34.6'sında, grade 3 olguların tamamında portal bölgede CD 68(+) Kupffer hücreleri izlenmektedir. **P = 0.180** ( Tablo 30).

NASH ve hepatosteatoz olgularında Brunt stage'e göre, CD 68(+) Kupffer hücre lokalizasyonları değerlendirildiğinde, stage 0 olguların % 32'sinde, stage 1 olguların % 39.3'ünde, stage 2 olguların % 40'ında, stage 3 olguların % 50'sinde, stage 4 olguların % 100'ünde portal bölgede Kupffer hücreleri izlenmiştir. **P = 0.613** (Tablo 31).

Olgularımızın yağlanma oranları ile agregat varlığı karşılaştırılmıştır. Hafif yağlanmada % 44.9, orta derecede yağlanma içeren olgularda %69.2, belirgin yağlanma içeren olgularda % 71.4 oranında agregat izlenmiştir. **p<0.0001** (Tablo 32).

Olgularımızın yağlanma oranları ile lipogranülom varlığı karşılaştırılmıştır. Hafif yağlanmada % 32.7, orta derecede yağlanma içeren olgularda %61.5, belirgin yağlanma içeren olgularda % 64.3 oranında lipogranülom izlenmiştir. **p<0.0001** (Tablo 33).

Olgularımızın yağlanma oranları ile CD68(+) Kupffer hücre lokalizasyonu karşılaştırılmıştır. Hafif yağlanmada % 40.8, orta derecede yağlanma içeren olgularda %46.2, belirgin yağlanma içeren olgularda % 14.3 oranında Kupffer hücreleri portal bölgede izlenmiştir. **p<0.003** ( Tablo 34).

SMA ile boyanan kesitler incelendiğinde, immunreaktivitenin genelde perivenüler subepitelyal alanda olduğu, bağ dokusu gelişiminin belirgin olduğu

olgularda fibrotik alanların çevrelerinde yoğunlaştığı izlenmiştir. (Resim 31,32, 33,34).

Olgu grupları, SMA (+) stellat hücre varlığına göre değerlendirildiğinde, hafif boyanma (grup 1) yüzdesi, NASH vaka grubunda % 63.5, hepatosteatoz grubunda % 69.2, steatozlu viral hepatit grubunda % 84.6, normal grupta % 100 olarak bulunmuştur. En şiddetli boyanma NASH'li olgularda izlenmiştir. **p<0.018**(Tablo 35).

Olgularımızda SMA grade'i ile Brunt grade ve stage'i karşılaştırdık. Brunt stage ile SMA arasında stage arttıkça, SMA grade' inin arttığını, aralarında anlamlı ilişki olduğunu gözlemledik. Olguların stage 0'da %91.5, stage 1'de %78.8'inin SMA grade 1 olduğu izlenmiştir. Olguların stage 2 grubunda %54.5'inin, stage 3'te % 84.6 sının, stage 4'te %100 'ünün SMA grade 2 olduğu görülmüştür. **p< 0.0001** (Tablo 36).

Olgularımızda Brunt grade'i ile SMA grade'i arasında anlamlı ilişki olmadığını gözlemlenmiştir. **P = 0.092** (Tablo 37).

Kupffer hücre yoğunluğu ile stellat hücre grade'i araştırıldığında, grade 1 Kupffer hücreleri içeren olguların % 73.7'si SMA grade 1, grade 2 Kupffer hücreleri içeren olguların % 53.5'i SMA grade 1, grade 3 Kupffer hücreleri içeren olguların ise % 88.6'sı SMA grade 1 olarak izlenmiştir. **p< 0.001** Tablo: 38

## 5.TARTIŞMA

NASH klinikte obezite, bazen diyabet ve hiperlipidemi ile birlikte olan, karaciğer fonksiyon testlerinin orta düzeyde yüksekliği ve viral markırların negatifliği ile tanı konan, karaciğerde yağlanma ve inflamasyonla giden bir kronik karaciğer hastalığıdır (113).

Kimyasal olarak sağlıklı bir karaciğer kuru ağırlığının yaklaşık % 4-5 kadarı yağdır ve mikroskopta görülmez. Bu miktar % 5-6 yı geçtiği takdirde mikroskopik olarak karaciğerde yağ birikimi fark edilebilir. Bu yağ başlıca trigliseridlerden oluşmaktadır.

Karaciğer biyopsisinin histolojik görünümü yağlanmanın etyolojisi hakkında net bilgi veremez. Genellikle, yağ birikmesi en çok santral hepatositlerde ( zon 3'te ) meydana gelir. Periportal hepatositlerde ( zon 1'de ) yağ birikmesi ise daha çok protein-kalori malnütrisyonu, Kwashiorkor, total parenteral beslenme, fosfor zehirlenmesi ve metotreksat hasarı gibi durumlarda görülür.

ASH ve NASH bazı ortak özellikler içermesine rağmen, belirgin farklılıklar da göstermektedir. Örneğin nötrofil infiltrasyonu ve Mallory cisimcikleri her ikisinde de görülür. Ancak nükleer vakuolizasyon ve steatozis NASH'te, alkolik steatohepatite göre daha şiddetlidir. Periportal fibrozis, Mallory cisimcikleri ve safra kanalikülü proliferasyonu alkolik steatohepatitte daha siktir. ASH ve NASH'in ayırıcı tanısını sadece histoloji ile yapmak mümkün değildir.

Ayaktan takip edilen hastalarda, rutin biyokimyasal testler ve klinik ile NASH ve ASH ayırıcı tanısını yapmak zordur. ASH tanısında AST/ALT, ortalama eritrosit partikül hacmi, GGT (gama glutamil transpeptidaz), bilirubin, transferin satürasyonu ve serum ferritin ölçümlerinden faydalanılabilir. ASH' te genelde AST/ALT >1, bilirubin ve MCV değerleri yükselmiştir. Protrombin zamanı uzamış olup, transferin satürasyonu ve serum ferritini değerleri değişkendir. ANA ve ASMA bazen (+) pozitif saptanabilir (114,115). Ancak, henüz ne tek, ne de kombine olarak hiçbir laboratuvar göstergesi alkol aldığını inkâr eden hastalarda, 30 gramın altında alkol alımını belirlemede yardımcı değildir.

### **5.1. Epidemiyoloji :**

Yağlı karaciğer sık rastlanan bir durum olmasına karşın, genel popülasyondaki oranı belli değildir. Histopatoloji ile tanı alan hastalar genel prevalansı göstermez. Karaciğer histolojisi olmadan laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ile yapılan çalışmalarda ise yağlı karaciğere neden olan bir çok hastalık ayırt edilemez ve hatalı sonuçlar elde edilir. Histoloji en kesin sonucu vermekle beraber, hiçbir inceleme tek başına yağlı karaciğer sıklığını belirlemede güvenilir değildir. İncelenen popülasyonun sosyal yapısı da epidemiyolojik sonuçları önemli oranda etkilemektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda NASH sıklığı, metabolik sendromlu, obez veya obezite için GIS cerrahisi uygulanmış kişilerde %2-5'ten (116,117,118). %20-30'a değişen oranlarda bulunmuştur (119). Obez kişilerden oluşan bir çalışmada ise bu oran % 69.5 olarak izlenmiştir (120). Bu oranlardaki geniş aralığın sebebi, NASH ile ilgili çalışmaların, farklı sosyoekonomik

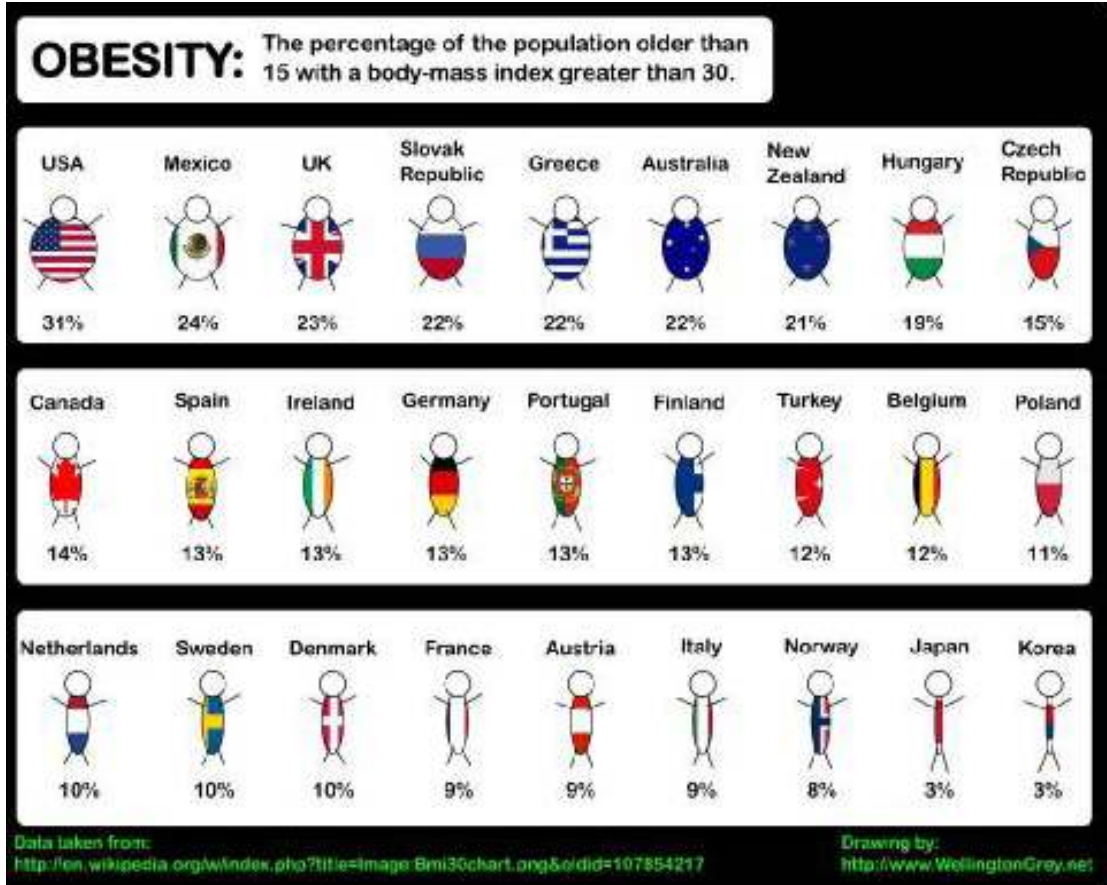
durumlardaki farklı toplumlarda yapılması ile ilgilidir. Gelişmiş batı toplumlarında, alkolik hepatit, non-alkolik steatohepatitten 10-15 kat daha fazla görülmektedir. Ülkemizde alkolizm batı toplumlarına göre daha ender rastlanan bir problemdir, ayrıca metabolik sendrom Türkiye genelinde oldukça yüksek sıklıkta izlenmektedir (genelde % 33.9, kadınlarda % 39.6, erkeklerde % 28) (Tablo 6-7). Bu nedenle NASH sıklığı ülkemizde araştırılması gereken bir konudur. Cinsiyet konusunda sonuçlar farklılıklar göstermektedir. NASH %65-83 oranında kadınlarda görülür(29,121,122,123). Fakat erkeklerde ve postmenopozal dönemdeki kadınlarda daha sık görüldüğüne dair yayınlar da vardır (124). Aşırı kilosu veya hipertrigliseridemi olmayan kişilerde yapılan bir çalışmada, NASH erkeklerde kadınlara göre anlamlı olarak sık bulunmuştur (125). Bizim olgularımızda NASH grubunda % 36.50 si, hepatosteatoz grubunda % 76.92 si kadındır. NASH tüm ırklarda görülebilir.

NASH en sık 40-59 yaşları arasında izlenir (126). Dünyada obezitenin artması ile birlikte çocuklarda NASH artmaktadır (127,128,129,130). Ancak günümüzde halen çocuklarda yüksek oranlarda gözlenmemektedir. Ultrasonografi ile yapılan çalışmalarda, çocuklarda NASH'e düşük sıklıkta da olsa (%1,8-3,4 ) rastlanmaktadır. 4-18 yaş çocuklarda rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda, NASH grubunda, olguların yaş ortalaması 40.8, hepatosteatoz grubunda 49.92'dir. NASH grubundaki olgularımızın yaş ortalaması dünya ortalamasının alt sınırlarındadır ve bu grupta 12 yaşında bir çocuk olgu vardır (% 1.58). Hepatosteatoz grubunda ise çocuk yaş grubunda olgu yoktur.

## **5.2.Etyoloji :**

NASH gelişimine yol açan faktörler: Obezite, insüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus, metabolik Sendrom, hiperlipidemi, obezite için yapılan GİS cerrahisi, ilaçlar (tamoksifen, östrojen, kortikosteroid, metotreksat, bazı kalsiyum kanal blokerleri gibi) ve kimyasallar (petrokimyasal ürünler, boya çözücüler, kokain vb.) dir (131,132). Gebelik, total parenteral beslenme, bazı metabolizma bozuklukları ve bazı kronik hastalıklar yağlı karaciğere sebep olabilmektedir.

NASH, obezite prevalansının ve tanı konma sıklığının artması nedeni ile önem kazanmış ve toplumda giderek yaygınlaşan bir halk sağlığı sorunu olmuştur. Gelişmiş ülkelerde obezitenin yetişkin popülasyonda % 20-30 oranında olduğu tahmin edilmektedir(133,134). Türkiyede ise obezite oranı % 12'dir (Tablo 5).



Tablo 5: Dünyada obezite oranları

Çoğu çalışmada, NASH'li hastaların % 69-100'ünün obez olduğu saptanmıştır (29,121,122,123). Bu hastaların çoğu normal kilolarından % 10 ile % 40 oranında fazladır. NASH sıklığı, zayıf popülasyonda % 3, obezlerde % 19, morbid obezlerde % 50'lik prevalansa sahiptir (135,136). Beslenme ve obezite ile ilgili yapılan çalışmalardan birinde, fruktozun aşırı tüketiminin NASH'in gelişiminde altta yatan patogenik mekanizma olabileceği ileri sürülmüştür (137). Obez pediatrik NASH grubunda yapılan bir çalışmada, karaciğer fibrozisinin genel obeziteden ziyade, abdominal obezitede izlendiği saptanmıştır (138). Bizim çalışmamızda NASH olgularının % 79.36'sı, hepatosteatoz olgularının % 76.92 si obezdir.

Diyabet ve obezite birlikteliği aditif etki gösterir. Tip II diyabetes mellitus ve kan glukoz düzeylerinde artma NASH'li hastaların % 34-75'inde görülür (29,121,122,123,139,140). İnsülin direnci NASH vakalarının çoğunda mevcuttur ve bu hormonun antilipolitik etkisine karşı gelişen direncin bir sonucu olarak karaciğere gelen yağ asitleri artar. Artmış plazma glukoz konsantrasyonu bulunan hastaların %34-75 inde NASH olduğu belirtilmektedir. NASH hastalarında, yalnız steatoz



olanlara kıyasla, insülin direncinin daha ağır seyrettiği gösterilmiştir (67). Bir otopsi çalışmasında Wantess ve Lentz, 22 steatohepatitli hastanın 20'sinde obezite, diyabet ya da her ikisinin birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir (135). Çalışmamızda NASH olgularının % 33'ü, hepatosteatoz grubundaki olguların % 30.76 'sı diyabetiktir.

Hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi ya da ikisi birlikte sık görülen diğer bir durum olup, NASH'li hastaların % 20-82'sinde bildirilmiştir (29, 121, 122, 123, 139, 140). Çalışmamızda NASH grubundaki olgularda % 60.31 oranında, hepatosteatoz grubundaki olgularda % 53.84 oranında hiperlipidemi izlenmiştir.

NASH'in klinik ve laboratuvar bulguları göz önüne alındığında metabolik sendromun bir komponenti olabileceği ve hastalığın patogenezinde insülin direnci ve inflamatuvar faktörlerin rolü pek çok çalışmada gösterilmiştir (131). Metabolik sendrom, sendrom X veya insülin rezistans sendromu olarak da bilinir. Bir grup metabolik bozukluk topluluğudur. Bu metabolik bozukluklar, glikoz intoleransı ( tip 2 diyabet, bozulmuş glikoz toleransı veya bozulmuş açlık glisemisi), insülin direnci, santral obezite, dislipidemi ve hipertansiyondur (141). NASH hiperinsülinemi ve metabolik sendrom ile ilişkili olabildiğinden kardiyovasküler risk artışı ile birlikte (39,142,143). Son yıllarda obezite ve diyabet prevalansındaki global artışla yakından ilişkili olarak metabolik sendromlu hasta sayısında ciddi artış gözlenmiştir (144). Dünyada, batı toplumlarında metabolik sendrom sıklığı % 35'tir. Türkiye'de ise bu oran %33.9'dur (Tablo 6-7).

(Tablo 6):Türkiye’de Metabolik Sendromun bölgelere göre dağılım sıklığı

**Metsar**  
METABOLİK SENDROM ARAŞTIRMA GRUBU

### ÖRNEKLEM SAYISAL DAĞILIMI (BÖLGE)

BÖLGE	ERKEK		KADIN	
	KIRSAL	KENTSEL	KIRSAL	KENTSEL
MARMARA	112	405	110	458
İÇ ANADOLU	105	243	106	238
DOĞU ANADOLU	88	94	84	93
KARADENİZ	125	121	126	123
G.D. ANADOLU	64	106	64	105
AKDENİZ	140	244	136	246
EGE	102	161	102	163
GENEL	736 (%17.3)	1374 (%32.2)	728 (%17.1)	1426 (33.4)
	2110 (%49.5)		2154 (%50.5)	

ERKEK YAŞ : 40.78 ± 14.97  
KADIN YAŞ : 41.00 ± 14.87

Tablo7: Türkiye’de Metabolik Sendromun cinsiyete göre dağılımı

**Metsar**  
TÜRKİYE METABOLİK SENDROM ARAŞTIRMA GRUBU

### TÜRKİYE’DE METABOLİK SENDROM PREVALANSI

	ERKEK	KADIN	TOPLAM
	%	%	%
KIRSAL	26.9	41.1	33.9
KENTSEL	28.6	38.8	33.8
GENEL	28	39.6	33.9

\* KIRSAL VE KENTSEL ERKEKLERİN YAŞI 40.78 ± 14.97, KADINLARIN YAŞI 41.00 ± 14.87

NASH ile birlikteliği daha az olan çeşitli durumlar vardır: ince barsak rezeksiyonu, total parenteral nütrisyon, jejunal divertikülozis, aşırı obezite için

uygulanan gastroplasti, jejunoileal bypass, Weber-Christian Hastalığı, abetalipoproteinemi ve amiodaron, tamoksifen, glukokortikoid ve sentetik östrojen ile tedavi gibi. Kilo verilmesi amacı ile uygulanan jejunoileal bypass cerrahisinden sonra karaciğer fonksiyon bozukluğu, obez hastaların % 40'ında görülebilmektedir.

Bir çalışmada uzun açlıkta da, intrahepatik lipid birikimi gösterilmiştir. Açlığa fizyolojik cevap, kas proteolizi ve adipöz dokuda lipolizin artması şeklinde olur. Glikoneogenez, oksidasyon ve ketogenez için amino asit ve serbest yağ asidi sağlanır. Bu bulgular aşırı ketogeneze karşı tedbir bulgularıdır. Bu mekanizma uzun açlıkta, hızlı kilo kaybında, anoreksiya nervozada ve parenteral beslenmede görülen NASH'i açıklayabilir. NASH'li kilolu çocuklarda, serum retinol seviyesi incelenerek yapılan bir çalışmada vit A yetmezliğinin NASH için bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (145).

Bütün bu etyolojik faktörler haricinde, hiçbir neden bulunamayan NASH hastaları da mevcuttur .Önceleri hastalığın edinsel tipte olduğu düşünülmüşse de, günümüzde genetik yatkınlığın rolü araştırılmaktadır (146).

### **5.3. Genetik Yatkınlık :**

Tüm risk gruplarında NASH gelişmemesi, bu antiteden genetik faktörlerin kısmen de olsa, sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Metabolik sendrom hastalarının %25'inde NASH saptanmıştır. Kişisel genetik ve çevresel faktörler NASH gelişiminde önemlidirler (147).

Bir çalışmada NASH'te, insülin direnci, apoptoz, hepatositlerde lipid birikimi ile ilgili enzimleri açıklamaya çalışan genetik moleküler mekanizmalar incelenmiştir. Hepatositte insülin direncinin lokalizasyonuna ait bir bilgi bulunamamıştır. NASH'li hastalarda lipid metabolizması, ekstrasellüler matriks yaplanması, rejenerasyonu, apoptozis ve detoksifikasyon süreçlerini kontrol eden genlerin incelenmesi, NASH'in moleküler patogenezini aydınlatmaya ve hedef tedaviyi belirlemeye yardımcı olabilir (148, 149).

NASH için genetik etki açık değildir. Genetik faktörler sonuç olarak NASH gelişimine neden olan bazı mekanizmaları tetikleyebilir; birçok sitokinin ekspresyonunu ve oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun yaygınlığını etkileyebilirler. NASH gelişiminde sorumlu genler ve aday genler Tablo 7 ve 8' de sıralanmıştır.

**Tablo 8 :** NASH etyopatogenezinde Sorumlu Genler :

- Obezite ile ilgili genler (11 beta hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1),
- İnsülin sensitivitesini belirleyen genler (PPAR-gamma),
- Hepatik lipid depolanmasını içeren genler (apolipoprotein E, mikrozomal trigliserid transfer protein),
- Yağ asidi oksidasyonunu içeren genler (CYPs, PPAR-alfa, acyl-Coa oksidase),
- Sitokin genleri (Interlökin-4, Transforming Growth Factor TGF-beta, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN-gamma, ),
- Oksidatif stresi etkileyen genler (HFE, ve TNF $\alpha$ ) ve oksidatif stres cevabında protein kodlamasını içeren genleri (manganaz süperoksit dismutaz, uncoupling protein-2 (UCP-2)) içerir (150).

**Tablo 9: NASH'in Etyopatogenezinin Temelindeki Aday Genler**

- Apo E ekspresyonu geni
- Fosfohidrolaz sentezi geni (trigliserid sentezi kilit enzimi)
- Hemokromatoz geni, HFE
- C282Y Mutantı
- H63D Mutantı
- CYP2E1 i kodlayan gen
- CYP4A ailesini kodlayan gen
- Glutatyon S-transferaz M 10'u kodlayan gen
- UCP-2 yi kodlayan gen
- Asetil-CoA-oksidadı kodlayan gen
- Tip1-kollajeni kodlayan gen

#### **5.4. Klinik Özellikler ve Laboratuvar Bulguları :**

NASH çoğunlukla asemptomatiktir. Diğer hastalıkları nedeniyle veya rutin tetkikleri esnasında, anormal karaciğer enzim düzeylerinin saptanması ile tanıda düşünülür. Bazı hastalarda yorgunluk, batın sağ üst kadranda ağrı veya dolgunluk hissi olabilir. Metabolik sendrom bulguları olabilir ancak, bazı hastalarda hepatomegali tek fizik muayene bulgusudur. Hastaların az bir kısmında da kronik karaciğer hastalığına ait bulgular olabilir. Spider nevus, palmar eritem, sarılık, ödem ve portal hipertansiyon ilerlemiş hastalıkta görülebilir. Obezite en sık saptanan muayene bulgusudur. Klinik incelemede alkolik karaciğer hastalığı (özellikle 20 gr./gün üzerindeki alkol kullanımı), Hepatit B, Hepatit C gibi kronik karaciğer hastalıkları dışlanmalıdır.

Laboratuvar bulgularında, karaciğer fonksiyon testleri orta düzeyde bozuktur. Genelde ALT, AST değerinden yüksektir (151). AST bazen, özellikle de siroz varlığında, ALT değerinden yüksek olabilir. Ama AST/ALT oranı hemen hiçbir zaman 2'den büyük değildir. ALT değerleri steatozun veya fibrozisin derecesi ile korele değildir. Alkalen fosfataz yüksekliği, glukoz tolerans bozukluğu, hipertrigliseridemi de görülebilir (152).

Radyolojik olarak, USG de yağlı karaciğer hiperekoik izlenebilir. BT veya MR da karaciğerde düzensiz yağ dağılımı görülür (153).

Biyopsi kesin tanı ve skora için mutlak gerekli bir yöntemdir. Ancak görüntüleme yöntemleri, klinik ve biyokimyasal incelemeler tanı için biyopsi sonucu ile birlikte değerlendirilip sentezlenmelidir (154,155,156).

#### **5.5. Makroskopik Bulgular :**

Karaciğer büyük ve yumuşaktır. Lipid birikimine bağlı sarı ve yağlı görülür. Geç evrede, özellikle siroz gelişirse, karaciğerde yağlanma azalabilir.

#### **5.6. Mikroskopik Bulgular :**

Yağlanma bütün NASH'li hasta biyopsilerinde rastlanan ve çeşitli seviyelerde tespit edilen bir bulgudur. NASH için tipik olan yağlanma, makrovezikülerdir. Hepatosit sitopazması içinde tek geniş bir vakuol olarak görülür ve hücre çekirdeğini periferite itmiştir. Yağlı hepatositler, normal hepatositlere göre

daha büyük görünümündedir. Makroveziküler yağlanma, pratikte H-E ile rahatlıkla tanınır. Karaciğerde yağlanma akademik amaçla gösterilmek istenirse, frozen kesitte Sudan black gibi yağ boyaları yapılabilir.

İleri olgularda mikroveziküler yağlanma içeren hepatositler de bulunmaktadır. Bu hepatositler görece daha küçüktür ve nükleusları santral yerleşimlidir. Sitoplazmaları küçük lipid vakuelleri ile doludur. Hepatositler eş zamanlı bu iki steatoz formunu da içerebilir. Alkolik karaciğer hastalığında bu mikst patern, fibrozis gelişiminde artma riskiyle ilişkilidir. Biz olgularımızda genelde makroveziküler yağlanma izledik (Resim 8,9,10,11,12,13,14).

Hasar ve yağlanma paterni zon 3'ten başlar ve bütün asinüsü tutabilir. NASH'te yağlanmanın zon 3'ten başlayışı tipiktir. Fakat amidaron kullanımı ile ilişkili steatohepatit ve çocuk olguların biyopsilerinde zon1 (periportal) başlangıçlı yağlanma, balonlaşma ve Mallory cisimleri gözlenebilir. Bizim olgularımızın çoğunluğu ise, başlangıç olarak perisentral yağlanma içermektedir; ancak belli bir oranın üstünde yağlanma izlenince karaciğer tama yakın yağlandığından, zon ayrımı yapılamamıştır (Resim 10 ).

NASH'in diğer temel komponentleri, inflamatuvar infiltrasyonlar, hepatosit hasarı ve parenkimal fibrozistir. NASH'li olgular içerdikleri yangısal infiltrasyon açısından incelendiğinde, steatohepatit inflamasyonu tipik olarak lobülerdir. Portal yangı çocukluk çağı steatohepatitlerinde izlenebilir. Yetişkin hastalarda NASH'te portal inflamasyon nadir görülür. Portal inflamasyon izlenirse, mononükleer hücre içerir ve nadir nötrofiller görülebilir. Çalışmamızda NASH olgularımızda % 36.50 oranında portal bölgelerde inflamasyon izlenmiştir. Grubumuzdaki tek pediatrik olguda, portal bölgede inflamasyon izlenmemiştir.

Lobüler infiltrasyon, kronik inflamatuvar hücreler ve polimorfonükleer lökositlerle karakterizedir. Lobüler infiltrasyonlardaki nötrofilik hücreler, NASH'i diğer karaciğer hastalıklardan ayıran bir özelliktir. ASH VE NASH'te steatohepatitin sentrilobüler lezyonlarında (balonlaşmış hepatositler, yağlı değişimler; Mallory cisimleri, perisellüler-perivenüler fibrozis) nötrofilik lökositler önemlidir; ancak bugünkü çalışmalar, steatohepatit patogenezinin ilişkin majör rolü T lenfositler ve makrofajların oynadığını göstermektedir (19).

Olgularımızda NASH grubunda en sık izlenen yangı PMNL'lerin yoğunlukta olduğu noktasal nekrozlardır (Resim 12,13,14,15). Geniş bir seri NASH hasta grubunda, ALT seviyesi, hepatik inflamasyon aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur, hastalığın fibrogenik progresyonu ile ilişkisi gösterilememiştir (157).

Biz çalışmamızda, karaciğer fonksiyon testleri normal olan bazı hepatosteatozlarda PMNL'lerden zengin noktasal nekrozlar izledik, bu durum bize biyokimyasal ve inflamatuvar veriler arasında tam bir bağlantı olamayacağını düşündürmüştür.

Rutin boyamada hepatositlerin içinde görülen seyrek ve geniş yağ vakuolleri Kupffer hücrelerinin içinde de bulunmuştur. Bu görünüm Kupffer hücrelerinin NASH patogenezinde etkili olduğunu ve yıpranmış hepatositlerin fagositozunda direkt bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Kupffer hücrelerindeki lizozomal aktivite, yağlı karaciğerde reaktif oksijen radikalleri oluşumunun mekanizmasında etkili olabilir (19)

İnflamasyonda lipogranümler de bulunabilir. Bu dokular portal alan veya lobül içindeki yağlanmaya bir cevap olarak oluşabilir. Lipogranümler, yağlanmış hepatosit etrafını çeviren mononükleer hücreler ve Kupffer hücrelerini kapsar. Tesadüfi olarak lipogranümlerde eozinofillere de rastlanabilir. Lipogranümler tanı koyduracak kadar diagnostik olmasa da, NASH'te not edilmesi gereken karakteristik bir bulgudur.

Daha büyük portal ve perivenüler lipogranümler ise daha az spesifiktir ve diğer karaciğer hastalıklarında da oluşabilir. Biz de NASH olgularında lipogranülom yapılarında Kupffer hücreleri ve yağ dokusunu birlikte gördük ve bunun yağların, hepatositlerin fagosite edilmesiyle ilgili olabileceğini düşündük (Resim27,28, 29,30).

Çalışmamızda, NASH olgularında % 60.3 oranında lipogranülom izledik. Hepatosteatoz olgularında ve normal karaciğerlerde ise hiç lipogranülom izlemedik. Bazı hepatosteatozlu olgularda PMNL'den zengin noktasal nekroz varlığını da saptadığımız göz önüne alınırsa lipogranülom NASH için oldukça spesifik bir histopatolojik bulgudur.

Hepatoselüler hasar, balonlaşma ve asidofilik dejenerasyon olmak üzere 2 farklı morfolojik görünümüdür. Balonlaşma dejenerasyonu intraselüler sıvı birikiminin sonucu olup, şişkin hepatositlerle karakterizedir. Balonlaşmış hepatosit

grupları tipik olarak zon 3 içinde yer alır. Biz de çalışmamızda, NASH olgularının % 92'sinde balonlaşmış hepatositleri yaygın olarak zon 3'te izledik (Resim 15,16).

Asidofilik cisimler ise apoptotik hücre ölümü sonucu oluşur ve sinüzoidlerin içinde küçük, eozinofilik sitoplazmik parçalar olarak not edilmişlerdir. Diastazlı PAS boyası ile, sinüzoidal Kupffer hücrelerinde izlenebilir. Mallory hyaline cisimcikleri alkolik karaciğer hastalığının karakteristik bulgusudur (158). Fakat NASH'te de bulunabilir.

Pediyatrik NASH'te Mallory hyalin cisimciklerine pek rastlanmaz (159,160). Yetişkin NASH vakalarında Mallory hyalin cisimciği sıklığı % 9,5 ile % 90 arasındadır (139,161). Steatoz, balonlaşma ve lobüler inflamasyon zemininde ek olarak Mallory hyalin cisimi varlığı NASH tanısını destekler, ancak histopatolojik tanı için mutlak şart bir bulgu değildir. Bulunduğu zaman Mallory hyalin cisimi zon 3'teki balonlaşmış hepatositlerin içinde yer alır.

Steatohepatitte glikojen dolu vakuolize nukleus varlığı yaygın olmakla birlikte, NASH için diagnostik bulgu değildir, ASH'te ise beklenmeyen bir bulgudur (158). Ek olarak bu nükleer değişiklikler altta yatan karaciğer hastalığından bağımsız olarak, çocuklarda görülebilir, Wilson hastalığında da izlenebilir.(160,162). Glikojenli nukleusun diyabetik karaciğerlerde sıklıkla görüldüğünü düşünürsek, NASH'lilerde beklenen bir bulgu olması doğaldır.

Glikojenlenmiş nukleus birçok çalışmada not edilmiş, değerlendirilmiş bir bulgudur. Pinto 32 NASH hastası üzerinde yaptığı çalışmada % 75 oranında glikojenlenmiş nukleus varlığından bahsetmektedir (140). Alkolik steatohepatitte bu oranı daha düşük, diyabetli ve obez hastalarda daha yüksek saptamıştır. Bizim çalışmamızda da, NASH olgularında %46 oranında, hepatosteatoz olgularında % 38.5 oranında glikojenli nukleus izlenmiştir.

Megamitokondri de denilen genişlemiş mitokondriler NASH'te görülebilir (163). Caldwell yaptığı çalışmada megamitokondrileri ultrastrüktürel olarak incelemiş ve NASH'te ASH'e göre daha fazla megamitokondri bulmuştur(164). Megamitokondrilerin karaciğer hasarı veya adaptif bir değişiklik olduğu düşünülmektedir.

NASH'teki fibrozis paterni, önemli karakteristik bir bulgudur. Başlangıç olarak stellat hücreleri ve kollajen depolanması, perivenüler (zon 3) bölgede yoğunlaşmıştır. Bazı bölgelerde kollajen, tek hücrelerin etrafını sarmış olarak



gözlenebilir ki perisellüler veya chickenwire fibrozis olarak tanımlanır ve alkolik steatohepatitte daha yaygındır. Bu fibrozis paterni, ASH ve NASH'i diğer nekroinflamatuvar, kolestatik ve diğer kronik metabolik karaciğer hastalıklarındaki fibrozisten ayırır (Diğer hastalıklardaki fibrozis genelde periportal lokalizasyonludur). Çalışmamızda NASH olgularımızda, sıklıkla perisellüler, perivenüler fibrozis paterni izlenmiştir. (Resim 17,18,19,20 )

NASH basit steatozdan, steatohepatit ve siroza kadar değişen paternde olabilir. Sıklıkla benign gidişlidir. NASH'te ilerleyici hasar olursa, portal fibrozis, porto-portal, porto-sentral septum formasyonu ( köprüleşme ) ve siroza ilerleyebilir. Sirotik karaciğerde steatoz ve inflamasyonun diğer karakteristik morfolojik bulguları bulunmayabilir. İleri evre NASH'lerde siroz, karaciğer yetmezliği ve HCC gelişebilir.

NASH olguları, çeşitli histopatolojik bulguların sentezlenmesi ile Brunt sistemine göre sınıflanır, biz de olgularımızı bu sisteme göre değerlendirdik. Brunt grade'i hücresel hasar ve yangıyı, stage'i ise bu etki sonucunda karaciğerde gelişen bağ dokusu gelişimini gösterir. Brunt sistemindeki grade ve stage sınıflamaları ayrıntılı olarak tablo 3 ve 4 'de gösterilmiştir. Çalışmamızdaki NASH'li olguların %55.5'i grade 1, % 39.7'si grade 2, % 4.8'i grade 3'tür. Brunt stageleri ise stage 0 % 25.4, stage 1 % 41.2, stage 2 % 15.9, stage 3 % 15.9, stage 4 % 1.6'dır (Tablo17-18).

#### **5.7. NASH'te CRN Sınıflaması :**

NASH'in evrelemesinde alternatif bir sınıflama da CRN skorum sistemidir. Tablo 10 'da ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Uygulaması daha pratik görünse de, yeni bir sınıflama olması ve popülaritesi Brunt sistemine göre daha düşük olduğundan, çalışmamızda bu sınıflamayı kullanmadık.

**Tablo: 10 NASH' te CRN Skorlama Sistemi ( Clinical Research Network)**

<b>Steatoz</b>	<b>Lobüler</b>	<b>Hepatosellüler</b>
<b>Grade</b>	<b>İnflamasyon</b>	<b>Balonlaşma</b>
<b>0:</b> <%5	<b>0</b> : Yok	<b>0</b> : Yok
<b>1:</b> 5-33%	<b>1</b> : < 2 odak ( 20 büyütme)	<b>1.</b> Hafif, az
<b>2:</b> 34-66%	<b>2</b> : 2 – 4 odak ( 20 büyütme )	<b>2</b> : Orta, belirgin
<b>3:</b> >66%	<b>3</b> : > 4 odak ( 20 büyütme )	<b>2</b> : Orta, belirgin

**Steatoz : 0 – 3, Lobüler İnflamasyon: 0 – 3, Balonlaşma : 0 – 2**

**Fibrozis( CRN Sınıflaması) :**

Stage 0: Yok

Stage 1a: Zon 3te hafif perisinüzoidal fibrozis (Mason trikrom boyası ile gösterilebilir).

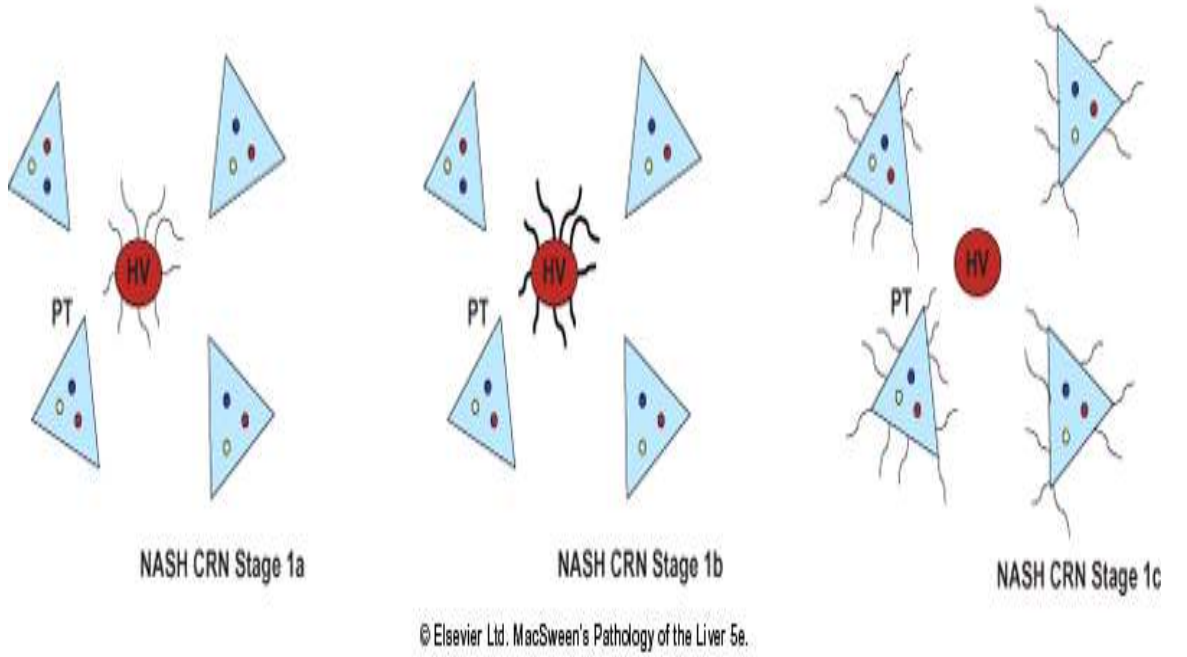
Stage1b: Zon 3te orta derecede perisinüzoidal fibrozis (H-E boyası ile görülebilir).

Stage 1c: Portal fibrozis

Stage 2: Zon 3te perisinüzoidal fibrozis ve periportal fibrozis

Stage 3: Bridleşen fibrozis

Stage 4: Siroz



Resim 7: CRN stage sınıflaması

Bir çalışmada 545 NAFLD'li olgu karaciğer biyopsileri ile incelenmiştir. Steatozun şiddeti ile inflamasyon ve NASH'in diğer bulguları karşılaştırılmıştır. Şiddetli steatoz, lobüler inflamasyon, zon 3 fibrozis, steatohepatit ile birliktelik göstermekte olup, Zon 3 steatoz, balonlaşma, Mallory cisimcikleri, ileri fibrozis ile sıklıkla birliktelik göstermiştir. Bu çalışmada şiddetli steatozlu hastaların steatohepatitli olma olasılığının daha yüksek olduğu vurgulanmış, ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (165).

Çalışmamızdaki veriler de bu bulguları desteklemektedir. Bizim olgularımızda hafif yağlanma NASH olgularının %52.4'ünde, hepatosteatozuların ise %76.9' unda vardır. Ağır yağlanma ise NASH olgularının %19'unda ve hepatosteatoz olgularının % 7.7' sinde izlenmiştir.  $p < 0.0001$  (Tablo 11). PMNL'lerden zengin yangısal infiltrasyon NASH'te daha sık ve yoğun izlenmektedir.  $p < 0.0001$  (Tablo 12). Zon 3 fibrozis ise NASH'te hepatosteatoza göre anlamlı olarak fazladır (Tablo 18).

Demir metabolizması ve NASH arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş bir konudur. NASH'li hastalarda yangılı hepatik sinüzoidlerde eritrosit

kümelerinin izlenmesi, bu hastalığın etyolojisinde, demir metabolizmasının rolü olabileceğini düşündürmüştür. NASH'li olgularda demir birikimi araştırılmış, 3 çalışmada olgularda, % 15 - % 55 arasında birikim saptanmıştır (29,166,167). Bir diğer çalışmada ise, NASH'li karaciğerde demir birikimi ile bağ dokusu gelişimi arasında bağlantı bulunmuştur (168). Deneysel bir çalışmada, NASH'li tavşan karaciğerlerinde izlenen eritrofagositoz ile demir birikiminin etyopatogeneizde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bu yayında, NASH'li olgularda eritrofagositozun nedeninin açıklanmasının tedavi planlamasında belirleyici olabileceği iddia edilmiştir (169). Yapılan klinik bir çalışmada ise, NASH hastalarının karaciğerlerinde önemli derecede demir birikiminin olmadığı ve demir miktarının prognozu etkilemediği sonucu elde edilmiştir (170).

Biz de olgularımızda demir boyası uyguladığımızda, iki hepatosteatozlu ve bir normal olmak üzere toplam üç olguda karaciğerde demir birikimi izledik. NASH'li olgularımızın hiç birinde demir birikimi izlemediğimizden ve eritrofagositoz saptamadığımızdan hastalığın etyopatogenezinde demir birikiminin önemli bir rolü olduğunu düşünmüyoruz.

Kupffer hücreleri karaciğerdeki inflamatuvar olaylarda çok önemli rol alan ve karaciğerdeki sitokinlerin çoğunu salgılayan hücrelerdir. Bu hücrelerden salınan proinflamatuvar bir sitokin olan TNF  $\alpha$ , I kappa-beta kinaz (IKK-TGF  $\beta$ ) aktivasyonuna, bu da nükleer faktör K  $\beta$ (NF-K $\beta$ ) aktivasyonuna sebep olur. NASH'li hastalarda Kupffer hücreleri TNF- $\alpha$  aktivasyonunu düzenleyen, interferon gamma, IL6, IL10, IL12 ve PG E2 de salgılar. Artan TNF- $\alpha$ , lipolize neden olur ve ortamda serbest yağ asitleri artar.

Kupffer hücreleri, TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 sekresyonu ile stellat hücreleri ve fibroblastları aktive eder (4). Kupffer hücreleri parafin kesitte görüntülemenin en pratik yolu immunhistokimyasal yöntemle bir makrofaj belirleyicisi olan CD 68 ile boyamaktır. Bu hücreleri görüntülemek için en spesifik CD68 klonu ise bizim çalışmamızda kullandığımız PG-M1'dir (3).

Kupffer hücreleri, inflamasyon ve fibrozis gelişiminde önemli rol oynadıklarından, bazı hastalıklardaki yoğunlukları araştırma konusu olmuştur.

Bir çalışmada, Kupffer hücreleri ve stellat hücreleri arasında bağlantılı fibrozis sürecinin PBS (primer bilier siroz) patogenezindeki rolü araştırılmıştır.

İmmunhistokimyasal olarak, Kupffer hücreleri CD68, stellat hücreleri SMA ile boyanarak incelenmiştir. Kupffer hücreleri ve stellat hücrelerinin periportal, periseptal alanlarda, fibröz bant ve septalarda sayıca artmış olduğu bulunmuştur. Bu hücrelerin perisinüzoidal etkileşiminin PBS'te fibrozis ve siroz gelişiminde önemli olduğu iddia edilmiştir (171).

Bilier atrezi ile ilgili bir çalışmada, hepatik portoenterostomiden (HPE) önceki bilier atrezili 6 çocuk, HPE'den sonra inatçı sarılıklı 6 ve sarılıksız 7 olmak üzere 13 çocuk ve kontrol grubu olarak sağlıklı 16 çocuk incelenmiştir. Bu çalışmada, bilier atrezili çocuklarda, Kupffer hücrelerinin aktive olduğu ve sayıca arttığı immunhistokimyasal olarak CD68 ile boyanarak gösterilmiştir. Kupffer hücrelerinden salınan ve ELISA ile tespit edilen IL-18'in, bilier atrezili hastalarda prognozla ilişkili olduğu ve prognostik belirteç olarak IL-18'den faydalanılabileceği vurgulanmıştır (172). Biz çalışmamızda hasta gruplarımızda ve kontrol grubumuzda Kupffer hücre sayısında, belirgin bir fark görmedik.

ASH'li hastalarda değişik fibrozis derecelerinde 40 hastada yapılan bir çalışmada CD68 ekspresyon düzeyinin fibrozisin şiddeti ile direkt olarak arttığı sonucuna varılmıştır ( 173 ).

NASH ve steatohepatitlerde Kupffer hücrelerinin yoğunluğu ve dağılımı İngilizce literatürde 3 yayında incelenmiştir.

Lefkowitz ve arkadaşları 11 steatohepatitli (5'i ASH' li, 7'si NASH'li) ve kontrol grubu olarak 7 normal ve hepatosteatozlu olguda Kupffer hücrelerinin dağılım paternlerini değerlendiren bir çalışma yapmışlardır. Kupffer hücrelerini immunhistokimyasal yöntemle CD68 (PG M-1) boyayarak değerlendirmişler ve steatohepatit olgularında dağılım paterni açısından belirgin farklılıklar saptamışlardır. Steatohepatitli olgularda, Kupffer hücreleri perivenüler ağırlıklı yerleşim göstermekte, çapları büyüyüp, sitoplazmaları yuvarlaklaşmakta, sitoplazmik lipid vakuelleri içermekte, agregatlar yapmaktadır. Kontrol grubunda ise, Kupffer hücreleri tek tek dizilim göstermekte, ince sitoplazmalı olarak izlenmektedir . Sonuç olarak, bu çalışmada ASH ve NASH etyopatogenezinde Kupffer hücreleri ve lenfositlerden oluşan kompleks sitokin ağının önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır (19).

Biz de çalışmamızda, dağılım paterni açısından benzer özellikler izledik. Agregat yapısı NASH'lilerde % 68.3 oranında izlenirken, hepatosteatozda % 23.1 oranında görülmüştür. Normal karaciğerde agregat yapısı gözlenmemiştir. Lipogranülom formasyonu daha spesifik özellikte olup, NASH'li olgularda % 60 oranında izlenmiştir; hepatosteatoz ve normal karaciğerde ise görülmemiştir. Biz Lefkowitz ve arkadaşlarından farklı olarak hepatosteatozlu olgularda agregat yapılarını izledik, bu durumun nedeni muhtemelen incelediğimiz hepatosteatozlu olguların sayısının daha çok olmasıdır (4 vs 13).

Park ve ark. 15'i hepatosteatozlu, 24'ü NASH'li 39 hastada, retrospektif olarak yaptıkları bir çalışmada, Kupffer hücrelerinde CD68, CD14, TNF- $\alpha$  ve UCP-2 ekspresyonu izlenmiştir. NASH grubunda genelde, CD68 pozitif (+) Kupffer hücre yoğunluğu, steatozlu olgu grubundan daha fazla bulunmuştur (  $19.2 \pm 5.2$  /  $9.3 \pm 3.2$  ). Ayrıca NAFLD'li olgularda, CD68(+) Kupffer hücre sayısının, hastalığın yangısal infiltrasyonunun şiddeti ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (174). Biz çalışmamızda Kupffer hücresi sayılarını NASH ve hepatosteatoz grubunda farklı bulmadık. Ayrıca yangının şiddeti ile de aralarında bir bağlantı saptayamadık. Bizim çalışmamızda NASH ve hepatosteatoz olgu sayısı Park'ın çalışmasındaki olgu sayısının yaklaşık iki katıdır (76 vs 39) ve Park, CD68 için kullandığı antikoron klonunu belirtmemiştir. Bizim kullandığımız CD68 PG M-1 klonu daha önce Baldus ve arkadaşları tarafından diğer 3 CD68 klonu ile karşılaştırılmış ve en çok pozitiflik veren klon olarak değerlendirilmiştir (72). Ayrıca boyamanın x100' lük büyütmede sayıldığı belirtilmiş, ancak kaç alanda incelendiği ifade edilmemiştir. Bulgularımız arasındaki bu farklılık teknik nedenlerden olabilir.

Yağlı karaciğer, steatohepatit ve normal karaciğer olgularında, CD68 boyanarak yapılan bir çalışmada, bizim olgularımızda da gözleendiği gibi Kupffer hücreleri sayısında belirgin bir fark izlenmemiştir, ancak steatohepatitli olgularda portal alanlarda makrofaj yığılımları dikkati çekmiştir (19).

Bizim çalışmamızda da CD68 pozitif (+) Kupffer hücreleri, NASH'li olgularda % 41.3, hepatosteatoz grubunda % 30.8 oranında portal bölgede izlenmiştir. Kontrol grubunda ise, portal bölgede Kupffer hücresi izlenmemiştir.  $p < 0.015$

Hepatik stellat hücreler, Disse aralığında yerleşmiş sitokin ve büyüme faktörü sentezi ve sekresyonu yapabilen özelleşmiş hücrelerdir. Karaciğer fibrozisindeki hücre dışı matriks ve kollajen sentezinden sorumludur. Bu hücrelerin

A vitamini metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Prostaglandin ve tromboksan A2 gibi düzenleyici maddelere cevap olarak sinüzoid lümeninin çapını değiştirebilmektedir. Oksidatif stres ve Kupffer hücrelerinden salgılanan TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1, hepatik stellat hücreleri ve fibroblastları aktive ederler (4). Stellat hücreler normalde ışık mikroskopik incelemede izlenmez, ancak bazı patolojik durumlarda belirginleşir (10,11). Stellat hücrelerinin, vimentin, dezmin, SMA ile ekspresyonu izlendiğinden mezenkimal orijinli olduğu düşünülmüştür (12,13). Bazı araştırmalarda nöral proteinlerin ekspresyonu izlendiği için ise, nöral krest orijinli olabileceği de düşünülmüştür. Stellat hücreler GFAP (glial fibriler asidik protein), nöral hücre adhezyon molekül (N-CAM) antikoru ve sinaptofizini eksprese edebilir (14,15,16,17,18).

Stellat hücrelerinin yoğunluğu, aktivasyonu fibrozis arasındaki ilişki çeşitli karaciğer hastalıklarında araştırılmıştır:

18 bilier atrezili bir çalışmada, immunhistokimyasal olarak  $\alpha$ -SMA ve prokollagen  $\alpha$ 1 mRNA veya TGF-  $\beta$  mRNA için insitu hibridizasyon yapılmıştır. TGF  $\beta$  yapımında Kupffer hücrelerinin rolü immunhistokimyasal olarak CD68 uygulanarak gösterilmiştir. Bu çalışmada bilier atrezili hastalarda artan kollagen yapımında aktive stellat hücrelerinin sorumlu olduğu ve bu hücrelerin fibrozis sürecinde önemli olduğu vurgulanmıştır (175).

Alkolic karaciğer hastalığındaki fibrozis oluşumu ile ilgili bir çalışmada, 87 perisentral hasarlı ancak portal alanların normal olduğu ASH olgusu ile 324 çeşitli stagelerdeki ASH olgusu ve 10 normal olgu kontrol grubu olarak incelenmiştir. Bu çalışmada erken stage olgularda stellat hücre aktivasyonu perisentral bölgede olup, fibrozis ilerledikçe daha diffuz izlenmiştir. Kupffer hücre aktivasyonu CD68 ekspresyonu ile gösterilmiştir. Tüm evrelerde, endotelial hücrelerde, periportal CD34 ekspresyonu izlenmiştir SMA ekspresyonu ile fibrozis evrelemesi yapılmıştır. Etanol hasarında fibrozisin, aktive stellat hücreleri, Kupffer hücreleri ve endotelial hücrelerin etkisi ile meydana geldiği vurgulanmıştır. Bu çalışmada, stellat hücre belirleyicisi olan smooth muscle-spesific  $\alpha$  actin (SMSA) ile fibrozisin perivenüler alandan başladığı daha sonra tüm karaciğere yayıldığı gözlenmiştir. Etanole bağlı fibrogenezisin stellat hücre ve Kupffer hücre aktivasyonuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (173).

Bir çalışmada 25'i tip 2 diyabetli, 52 obez hastada, karaciğer biyopsilerine immünohistokimyasal olarak kollajen IV, SMA ve laminin uygulanmıştır. Bu çalışmada aktive stellat hücreleri genelde zon 3'te ve perisinüzoidal bölgede izlenmiştir. Kollagen ve laminin sinüzoidal Disse aralığında diffuz, sentrilobüler alanda ve/veya sentral ven duvarında çeşitli yoğunluklarda izlenmiştir. Diyabetes Mellitus olmayan hastalarda sinüzoidal kollajen depozitleri ve SMA immünreaktivitesi şiddetli steatozun derecesi ile ilişkili, Diyabetes Mellitus'lu hastaların çoğunda sinüzoidal kollajen IV depozitleri ve stellat hücre aktivasyonu, steatozun derecesi ile ilişkisiz olarak daha yoğun bulunmuştur (176).

Sonuçta, diyabetik olmayan NASH'lilerde hepatik fibrozis stellat hücre aktivasyonu ile direk ilişkili bulunmuştur.

Washington ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 60 NASH'li, 16 steatohepatitli olgunun stellat hücre aktivasyonunu değerlendirmek için SMA ile boyanmış ve stellat hücre aktivasyonu ile fibrozis gelişimi arasında direk bir bağlantı bulunmuştur. Bu aktivasyon ile inflamatuvar aktivite ve yağlanmanın şiddeti ile paralellik izlenmemiştir. Bazı hastalarda stellat hücre aktivasyonunun fibrozise göre beklenenden fazla olması bu hastaların progresyon riski taşıyabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır (27).

Bizim çalışmamızda da, bu konuda yapılan diğer iki çalışmada olduğu gibi, SMA şiddeti ile Brunt stage karşılaştırılmış, stage arttıkça SMA ekspresyonunun arttığı izlenmiştir ve SMA ile stage(Brunt) arasında  $p < 0.0001$  ile oldukça anlamlı ilişki gözlenmiştir. ( Tablo 36 ) Ayrıca Washington ve arkadaşlarının da izlediği gibi, stellat hücre aktivasyonu ve yangısal infiltrasyonun şiddeti arasında bir anlam saptanamamıştır.



## 6.TABLolar :

Olgu gruplarına göre yağlanma oranları

	Steatoz				
	0	1	2	3	
<b>NASH</b>	0 (0,0%)	33 (52,4%)	18 (28,6%)	12 (19,0%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	0 (0,0%)	10 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	0 (0 %)	6 (46.1%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)	13
<b>Normal</b>	17 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					106

Tablo: 11

**p<0.0001**

Olgu gruplarında PMNL'ler içeren noktasal nekroz yoğunlukları

	PMNL				
	0	1	2	3	
<b>NASH</b>	8 (12,7%)	39 (61,9%)	14 (22,2%)	2 (3,2%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	5 (38,5%)	7 (53,8%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	2 (15,4%)	7 (53,8%)	4 (30,8%)	0 (0,0%)	13
<b>Normal</b>	16 (15,1%)	1 (9,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					106

Tablo 12:

**p<0.0001**

Olgu gruplarının genel inflamasyon miktarına göre karşılaştırılması

	İnflamasyon Seviyesi				
	0	1	2	3	
<b>NASH</b>	6 (9,5%)	45 (71,4%)	11 (17,5%)	1 (1,6%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	6 (46,2%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	3 (23,1%)	3 (23,1%)	7 (53,8%)	0 (0,0%)	13
<b>Normal</b>	15 (88,2%)	2 (11,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					106

Tablo: 13

**p<0.0001**

	Nükleer Glikojen	
<b>NASH</b>	29 (46,0%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	5 (38,5%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	6 (46,2%)	13
<b>Normal</b>	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		106

Tablo: 14

**p<0.006**

	Balonlaşma				
	0	1	2	3	
<b>NASH</b>	5 (7,9%)	32 (50,8%)	24 (38,1%)	2 (3,2%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	6 (46,2%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	2 (15,4%)	7 (53,8%)	4 (30,8%)	0 (0,0%)	13
<b>Normal</b>	17 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					106

Tablo: 15

**p<0.0001**

	Demir Birikimi Varlığı	
<b>NASH</b>	0 (0,0%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	2 (15,4%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	0 (0,0%)	13
<b>Normal</b>	1 (5,9%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		106

Tablo: 16 **p<0.017**

	Brunt Grade				
	0	1	2	3	
<b>NASH</b>	0 (0,0%)	35 (55,5%)	25 (39,7%)	3 (4,8%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	8 (61,5%)	4 (30,8%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	13
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					76

Tablo: 17 **p<0.0001**

	Brunt Stage					
	0	1	2	3	4	
<b>NASH</b>	16 (25,4%)	26 (41,2%)	10 (15,9%)	10 (15,9%)	1 (1,6%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	9 (69,2%)	2 (15,4%)	0 (0,0%)	2 (15,4%)	0 (0,0%)	13
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>						76

Tablo :18 **p<0.032**

Steatoz	PMNL İÇEREN LOBÜLER İNFLAMASYON				
	0	1	2	3	
1	17 (54,8%)	10 (32,3%)	2 (6,5%)	2 (6,5%)	31
2	2 (3,7%)	28 (51,9%)	17 (31,5%)	7 (13,0%)	54
3	0 (0,0%)	9 (47,4%)	6 (31,6%)	4 (21,1%)	19
4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					<b>106</b>

Tablo: 19

**p<0.0001**

Steatoz	NÜKLEER GLİKOJEN	
0	0 (0,0%)	17
1	21 (42,9%)	49
2	13 (50,0%)	26
3	6 (42,9%)	14
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>	<b>40/106 (37,7%)</b>	

Tablo : 20

**p<0.005**

Steatoz	BALONLAŞMA				
	0	1	2	3	
1	17 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	17
2	10 (20,4%)	33 (67,3%)	5 (10,2%)	1 (2,0%)	49
3	0 (0,0%)	12 (46,2%)	14 (53,8%)	0 (0,0%)	26
4	3 (21,4%)	0 (0,0%)	10 (71,4%)	1 (7,1%)	14
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>					<b>106</b>

Tablo : 21

**p<0.0001**

<b>CD 68(+) Kupffer H.si Grade'i</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>NASH</b>	9 (14,3%)	29 (46,0%)	25 (39,7%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	3 (23,1%)	4 (30,8%)	6 (46,2%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	4 (30,8%)	3 (23,1%)	6 (46,2%)	13
<b>Normal</b>	3 (17,6%)	7 (41,2%)	7 (41,2%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>				106

Tablo :22

**p=0.704**

<b>Kupffer H. Portal Lokalizasyonu</b>		
<b>NASH</b>	26 (41,3%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	4 (30,8%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	4 (30,8%)	13
<b>Normal</b>	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		106

Tablo:23

**p=0.180**

<b>Agregat</b>		
<b>NASH</b>	43 (68,3%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	3 (23,1%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	4 (30,8%)	13
<b>Normal</b>	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		106

Tablo: 24

**p<0.0001**

<b>Lipogranülom</b>		
<b>NASH</b>	38 (60,3%)	63
<b>Hepatosteatoz</b>	0 (0,0%)	13
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	3 (23,1%)	13
<b>Normal</b>	0 (0,0%)	17
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		106

Tablo:25 **p<0.0001**

<b>Brunt Grade</b>	<b>Agregat</b>	
<b>0</b>	2 (25,0%)	8
<b>1</b>	20 (51,3%)	39
<b>2</b>	21 (80,8%)	26
<b>3</b>	3 (100,0%)	3
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		76

Tablo:26 **p<0.007**

<b>Brunt Stage</b>	<b>Agregat</b>	
<b>0</b>	10 (40,0%)	25
<b>1</b>	23 (82,1%)	28
<b>2</b>	7 (70,0%)	10
<b>3</b>	6 (50,0%)	12
<b>4</b>	0 (0,0%)	1
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		76

Tablo: 27 **p<0.015**

Brunt Grade	Lipogranülom	
0	0 (0,0%)	8
1	19 (48,7%)	39
2	16 (61,5%)	26
3	3 (100,0%)	3
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>76</b>

Tablo:28 **p<0.006**

Brunt Stage	Lipogranülom	
0	7 (28,0%)	25
1	21 (75,0%)	28
2	5 (10,0%)	10
3	4 (12,0%)	12
4	1 (100,0%)	1
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>76</b>

Tablo:29 **p<0.007**

Brunt Grade	CD68(+) Kupffer H.si Portal Lokalizasyonu	
0	3 (37,5%)	8
1	15 (38,5%)	39
2	9 (34,6%)	26
3	3 (100,0%)	3
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>76</b>

Tablo:30 **p=0.180**

Stage	CD68(+)Kupffer Portal Lokalizasyonu	H.si
0	8 (32,0%)	25
1	11 (39,3%)	28
2	4 (40,0%)	10
3	6 (50,0%)	12
4	1 (100,0%)	1
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>76</b>

Tablo:31 **p=0.613**

Steatoz	Agregat	
0	0 (0,0%)	17
1	22 (44,9%)	49
2	18 (69,2%)	26
3	10 (71,4%)	14
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>106</b>

Tablo:32 **p<0.0001**

Steatoz	Lipogranülom	
0	0 (0,0%)	17
1	16 (32,7%)	49
2	16 (61,5%)	26
3	9 (64,3%)	14
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>106</b>

Tablo:33 **p<0.0001**



Steatoz	CD68(+) Kupffer H.si Portal Lokalizasyonu	
0	0 (0,0%)	17
1	20 (40,8%)	49
2	12 (46,2%)	26
3	2 (14,3%)	14
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>		<b>106</b>

Tablo:34 **p<0.003**

	SMA Yoğunluğu	
	0-1	2-3-4
<b>NASH</b>	63,50%	36,50%
<b>Hepatosteatoz</b>	69,20%	30,80%
<b>Steatozlu viral hepatit</b>	84,60%	15,40%
<b>Normal</b>	100 %	0 %

Tablo:35 **p<0.018**

Brunt Stage	Modifiye SMA		
	1	2	
0	43 (91,5%)	4 (8,5%)	47
1	26 (78,8%)	7 (21,2%)	33
2	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11
3	2 (15,4%)	11 (84,6%)	13
4	0 (0,0%)	2 (100,0%)	2
<b>Toplam Olgu Sayısı</b>			<b>106</b>

Tablo:36 **p<0.0001**

Brunt Grade	Modifiye SMA		
	1	2	
0	25 (89,3%)	3 (10,7%)	28
1	29 (69,0%)	13 (31,0%)	42
2	20 (60,6%)	13 (39,4%)	33
3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3
Toplam Olgu Sayısı			106

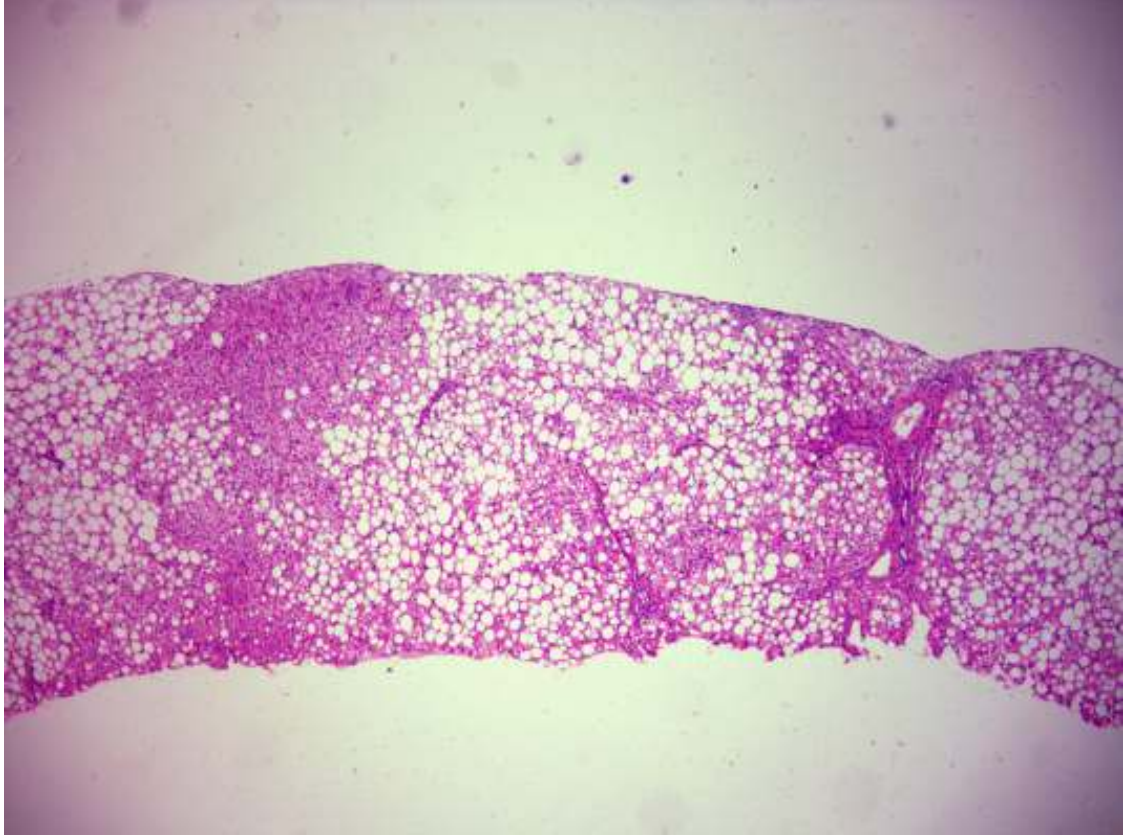
Tablo:37

**P=0.092**

CD68(+)Kupffer H.si Grade'i	Modifiye SMA		
	1	2	
1	14 (73,7%)	5 (26,3%)	19
2	23 (53,5%)	20 (46,5%)	43
3	39 (88,6%)	5 (11,4%)	44
Toplam Olgu Sayısı			106

Tablo: 38

**p<0.001**

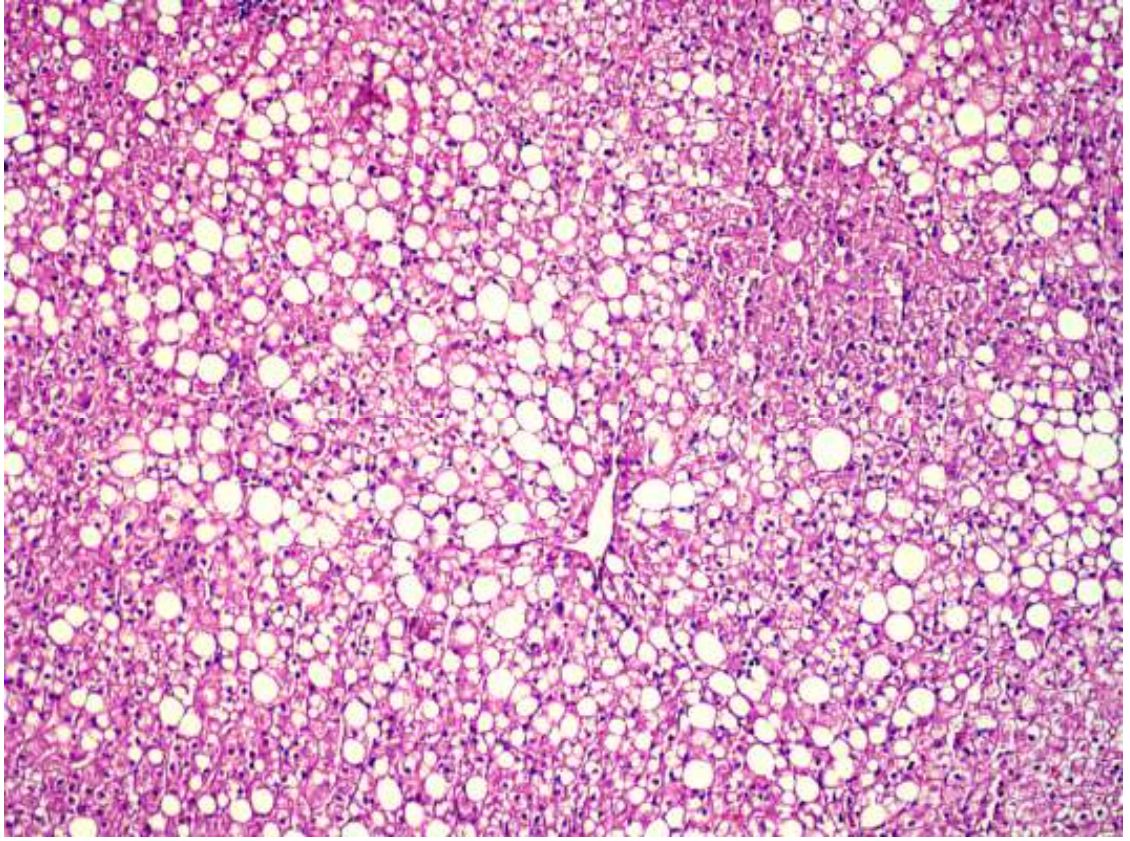


Resim 8 : H-E, Zon 3 yağlanma, x40

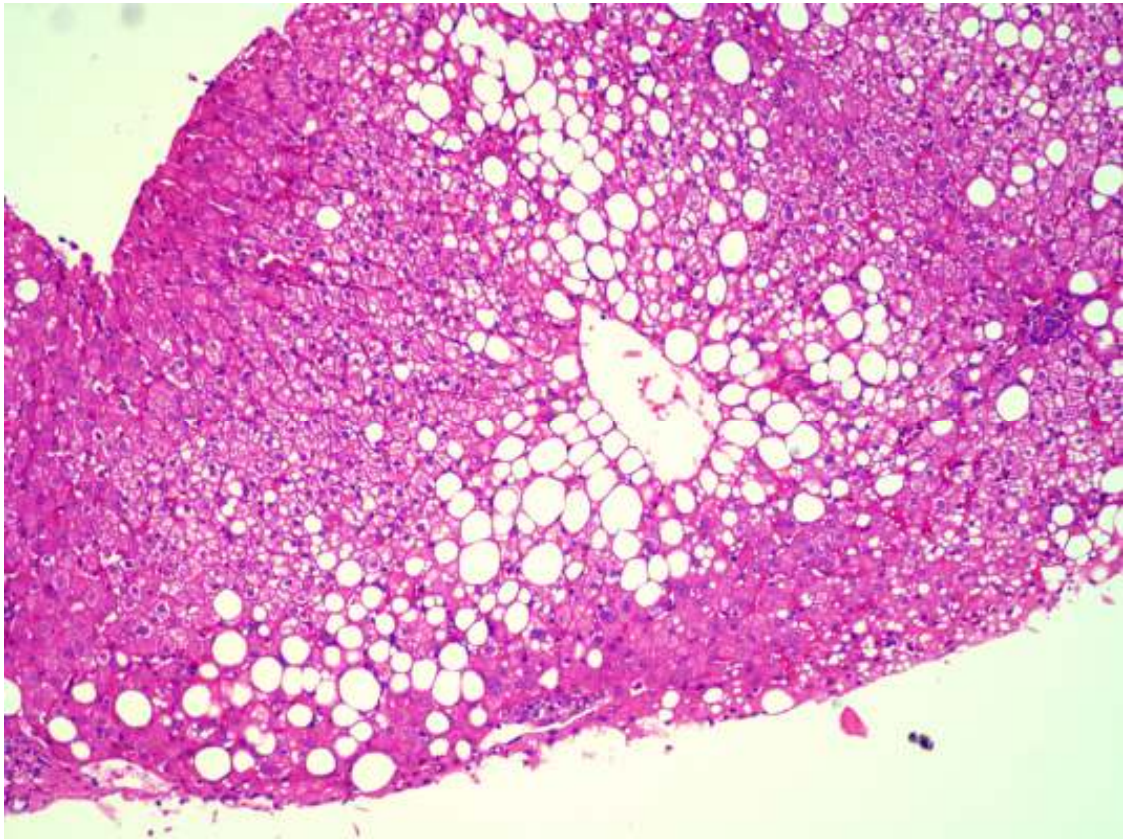


Resim 9 : H-E, Zon 3 yağlanma, x40



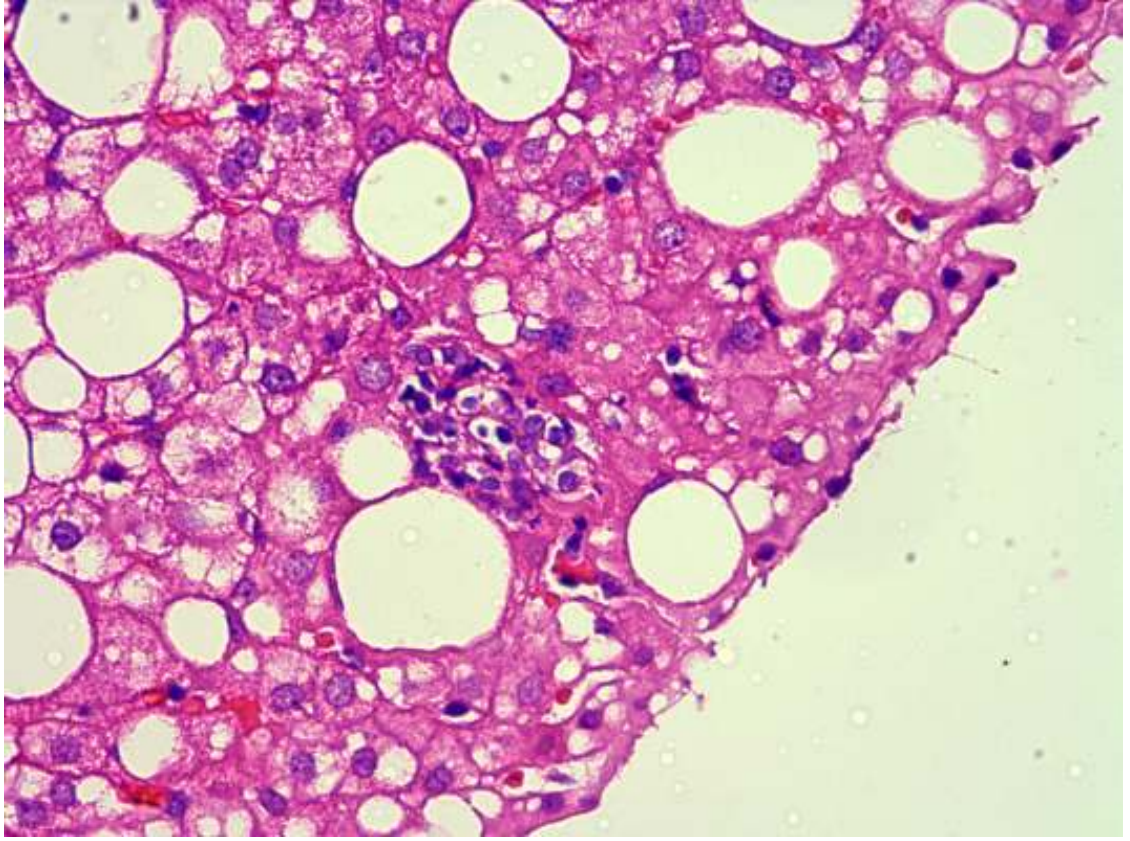


Resim 10 : H-E, Zon 3 ağırlıklı panasiner yağlanma, x100

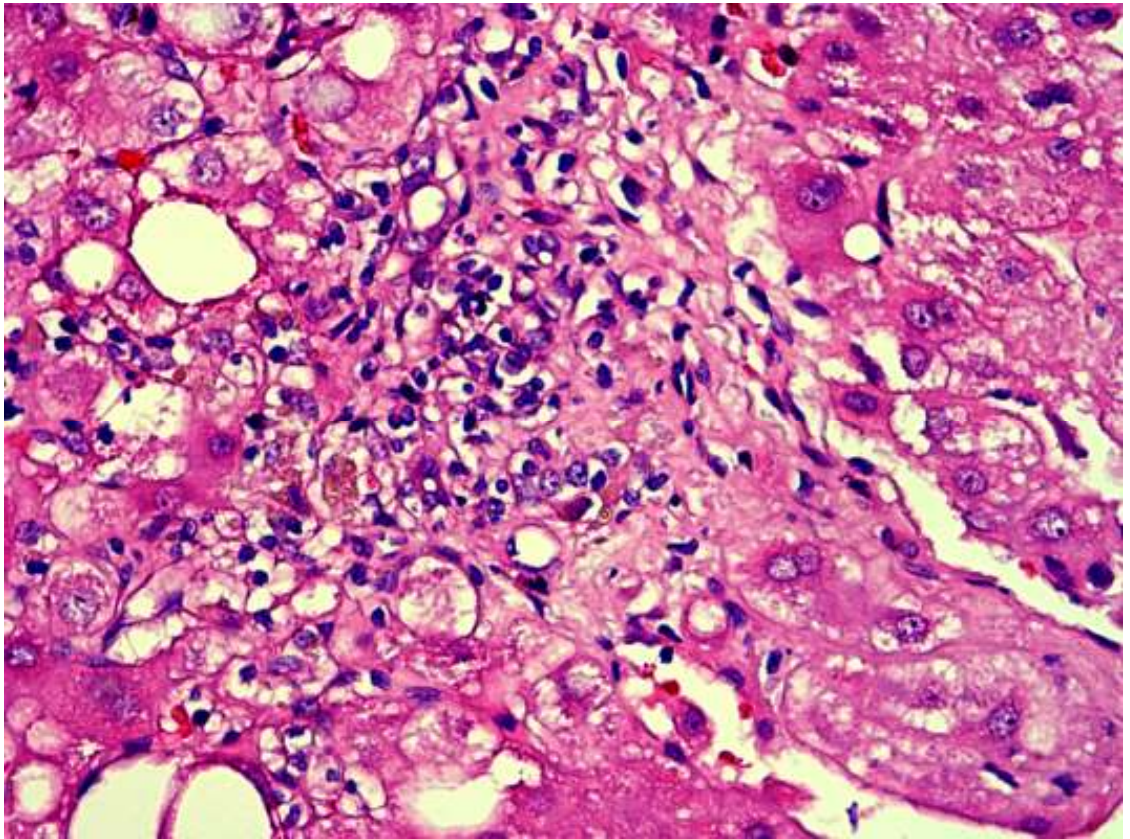


Resim 11 : H-E, Zon 3 yağlanma, x100



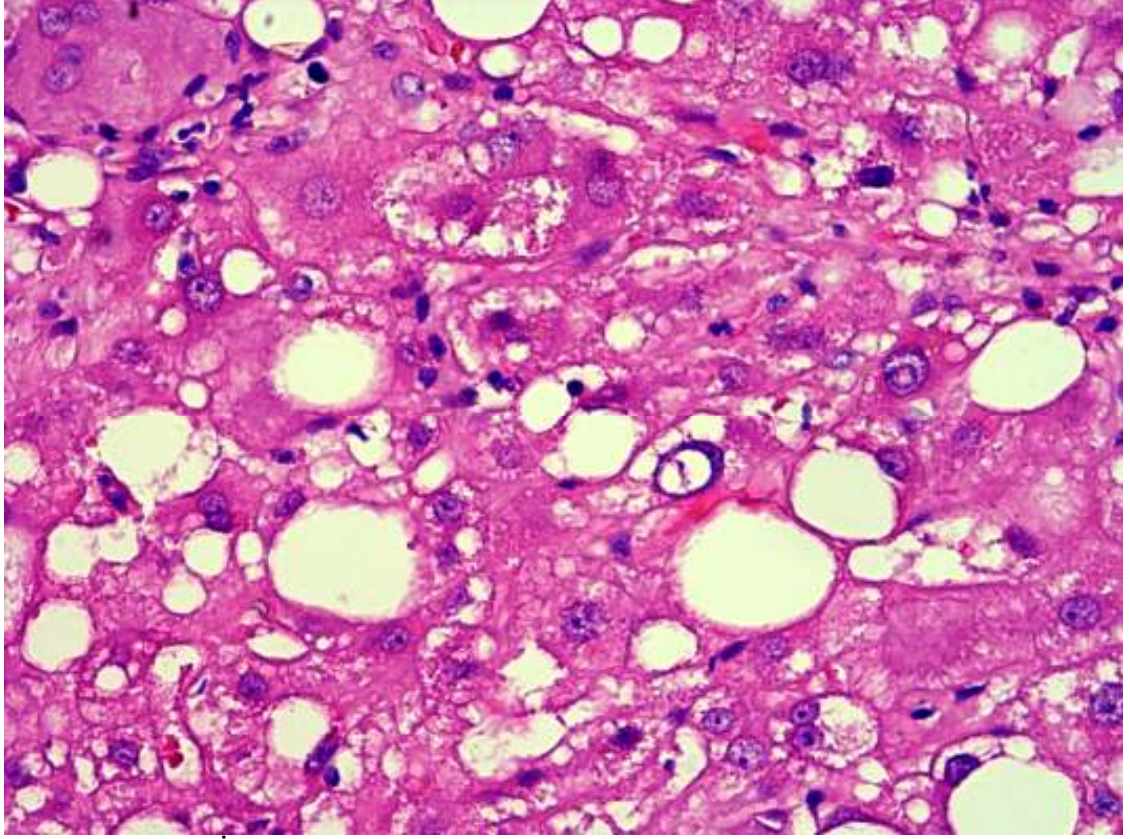


Resim 12 : H-E, Parenkimde noktasal nekroz, X400

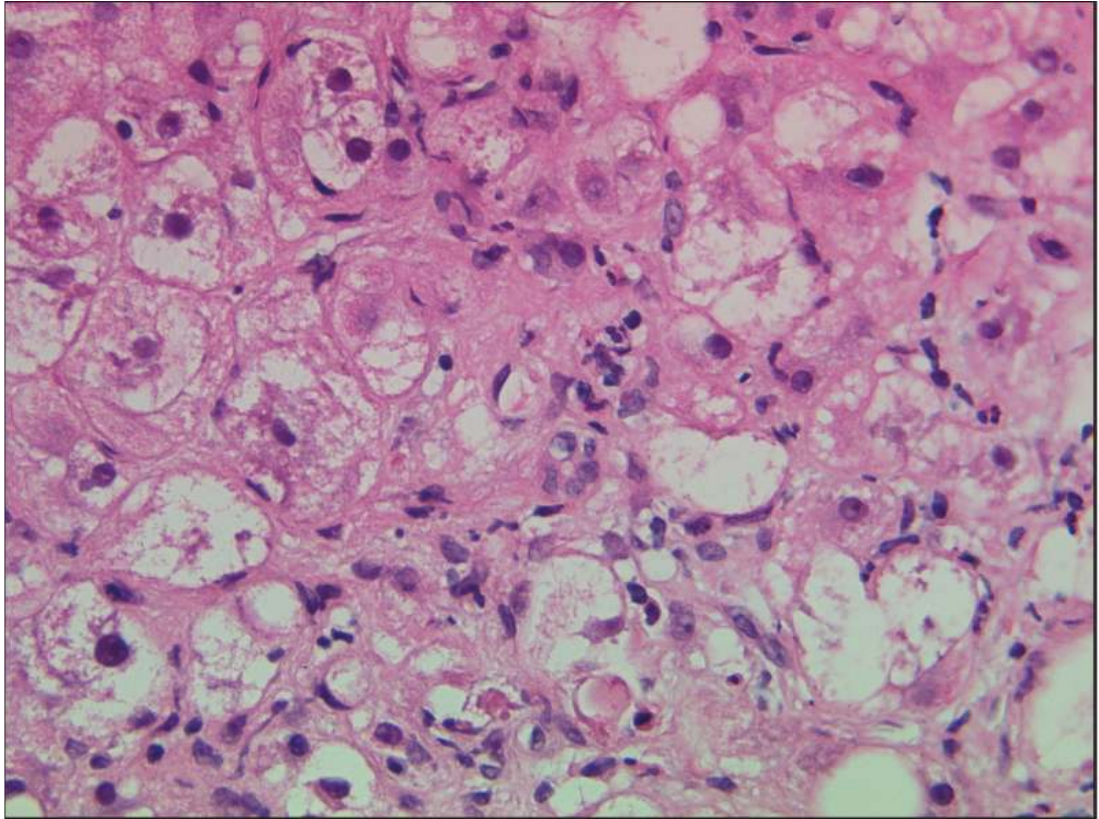


Resim 13 : H-E, Parenkimde noktasal nekroz, X400



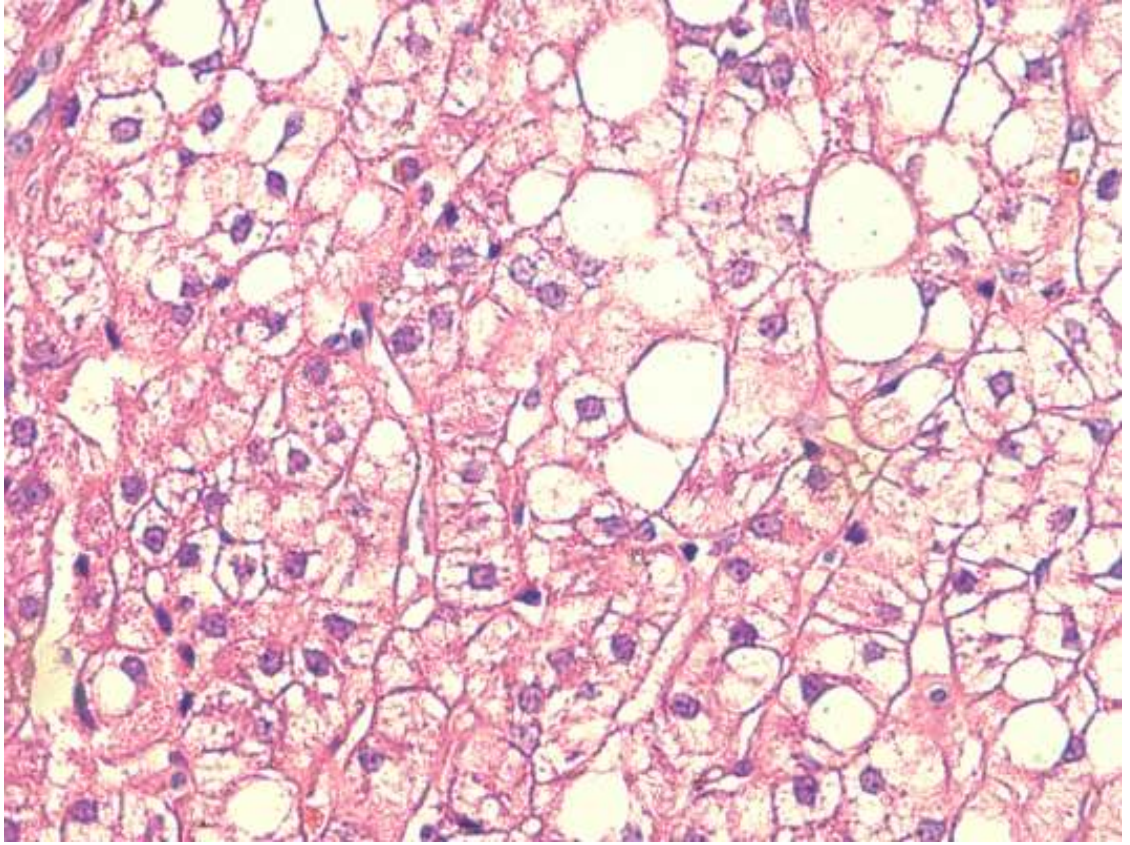


Resim 14 : H-E, İntranükleer glikojen ve parenkimde yangısal infiltrasyon x400

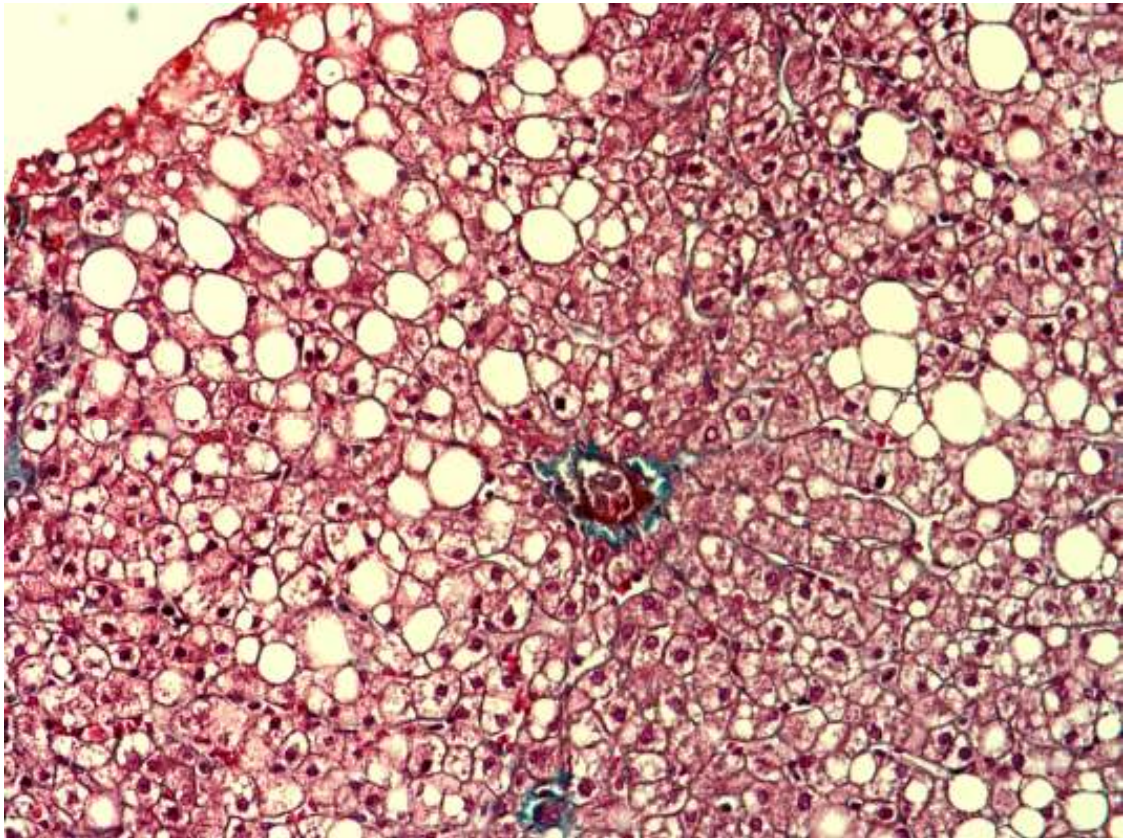


Resim 15: H-E, Balonlaşma ve PMNL' ler içeren noktasal nekrozlar, x400



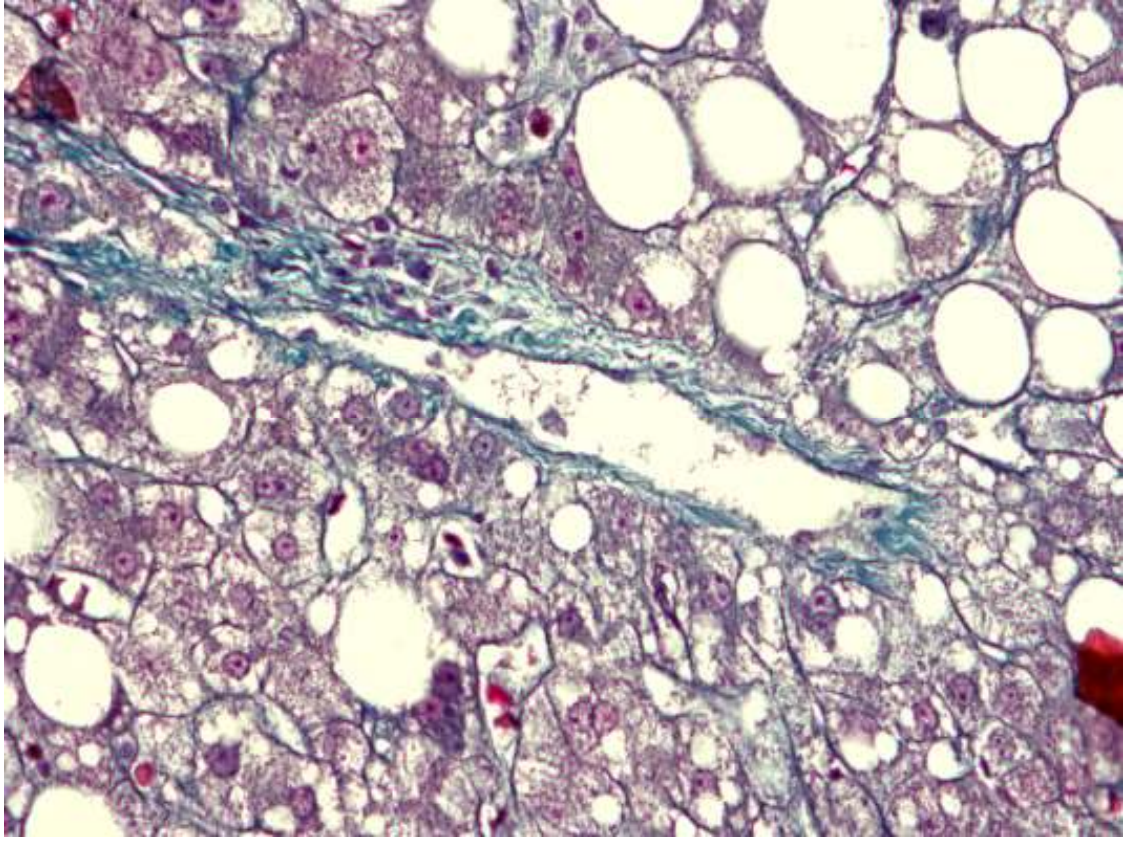


Resim 16 H-E, Balonlaşma , x400

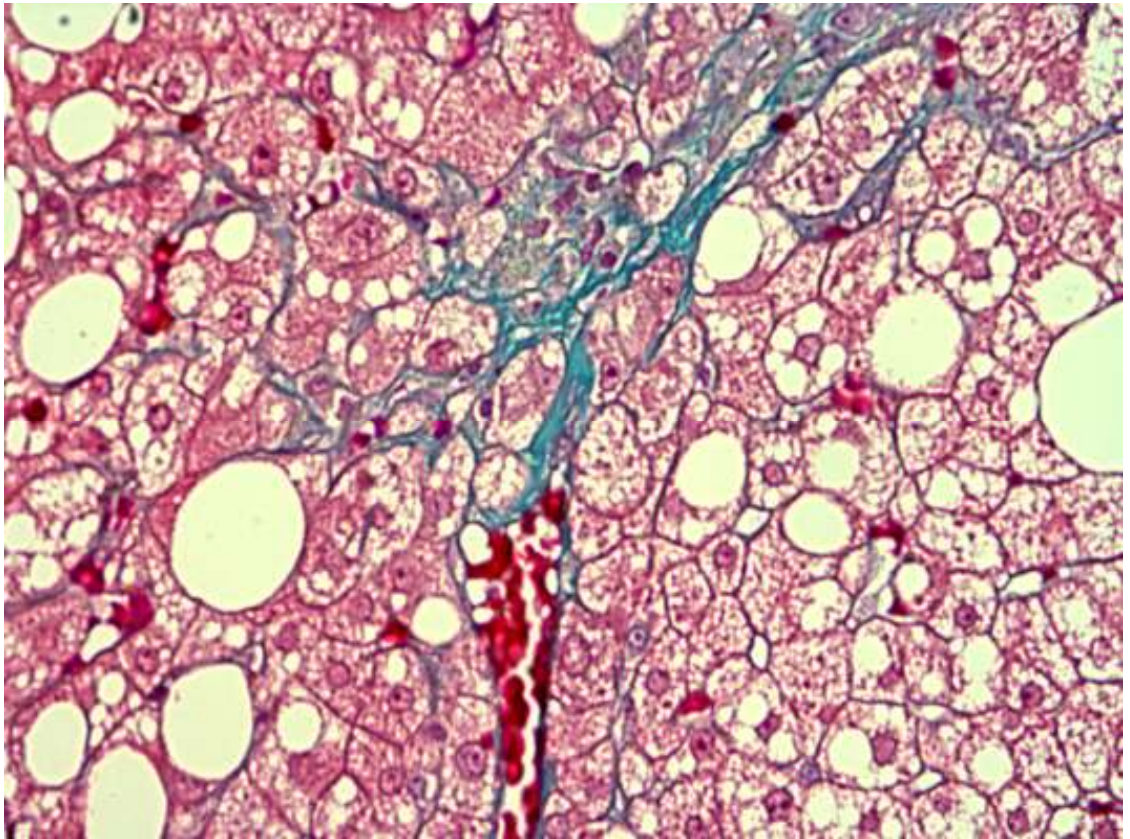


Resim 17 : M-T, Perivenüler fibrozis x200



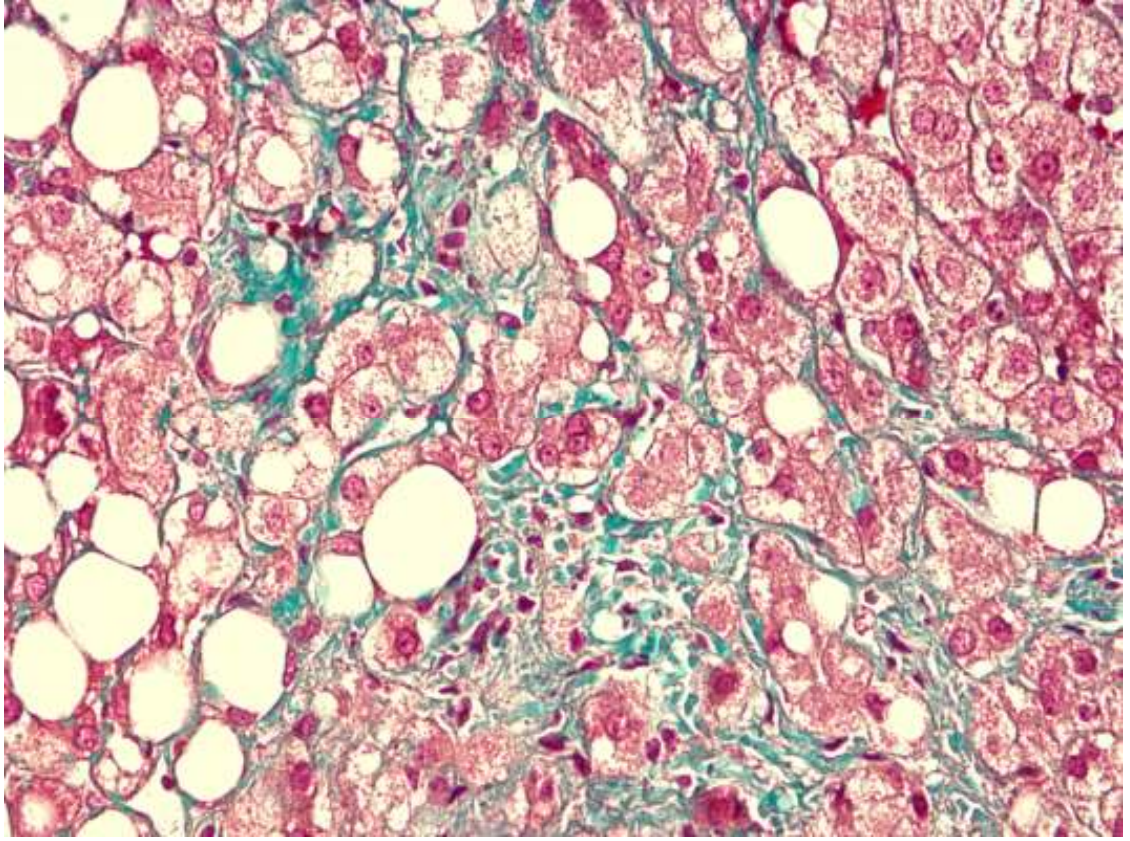


Resim 18 : M-T, Perivenüler fibrozis x400

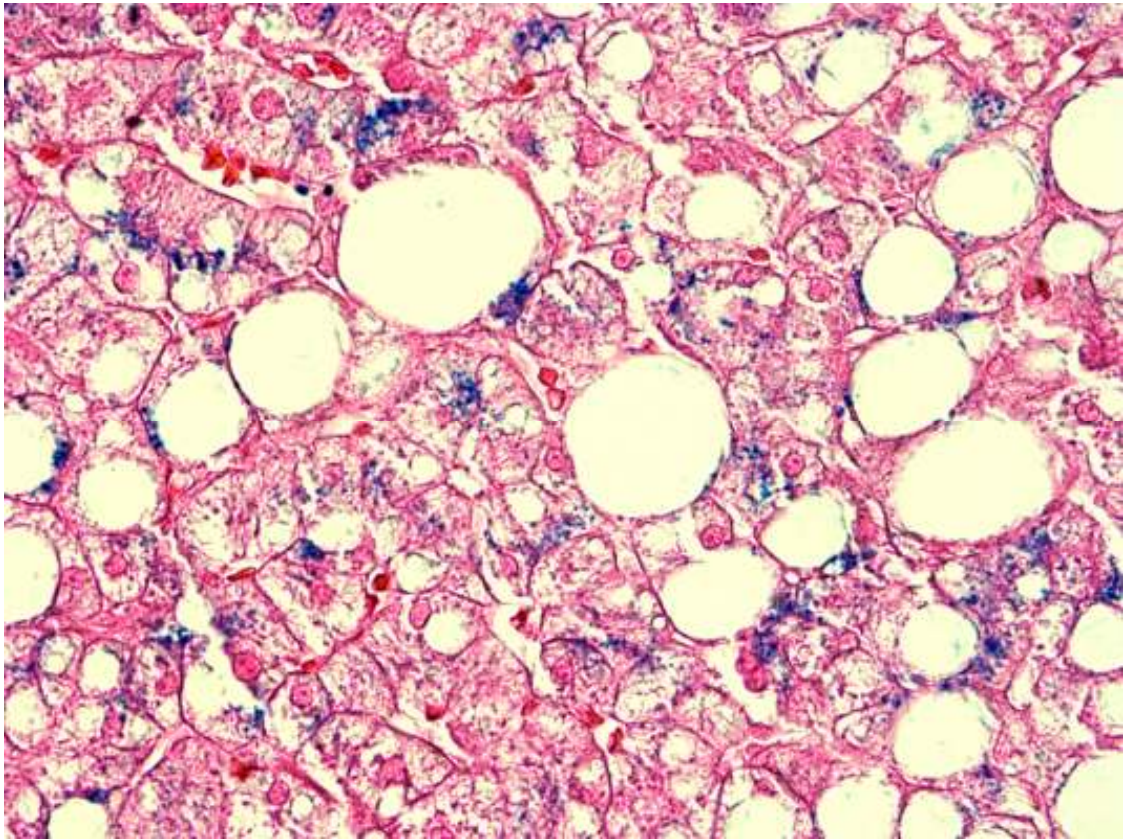


Resim 19 : M-T, Periselüler fibrozis x400



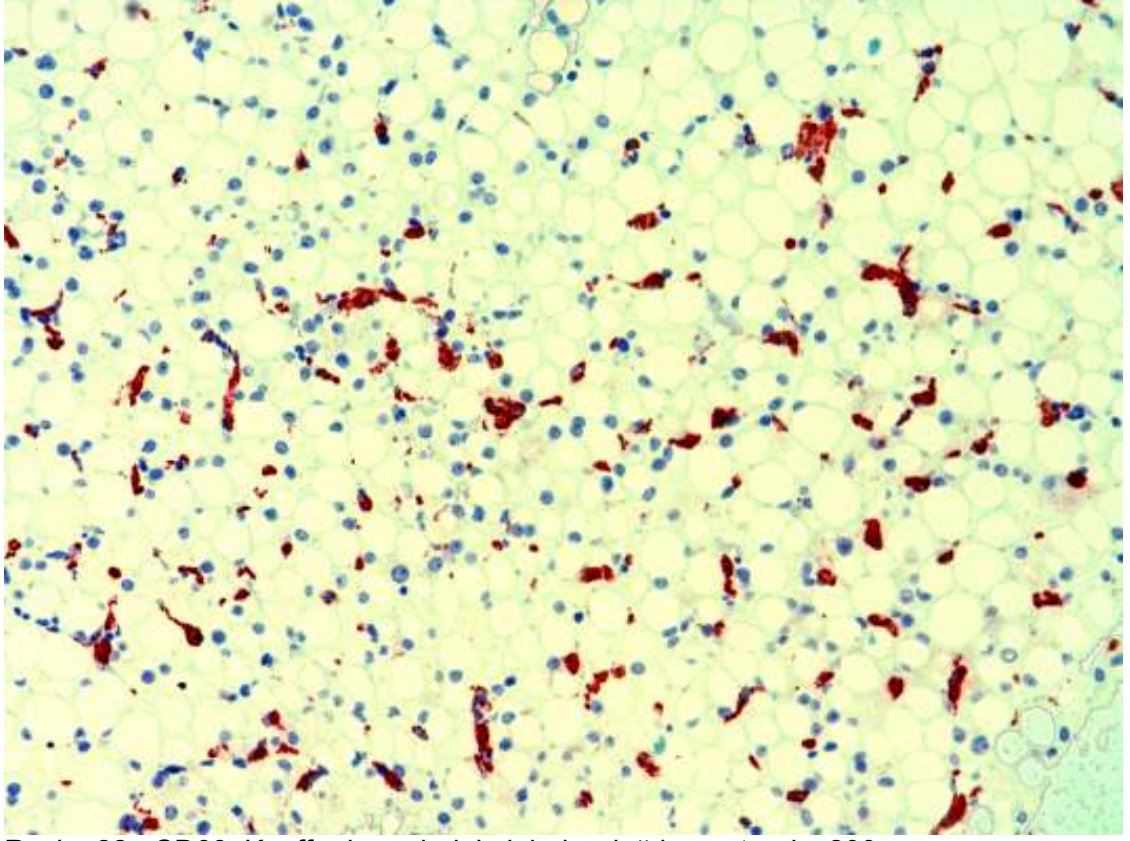


Resim 20 : M-T, Periselüler fibrozis x400

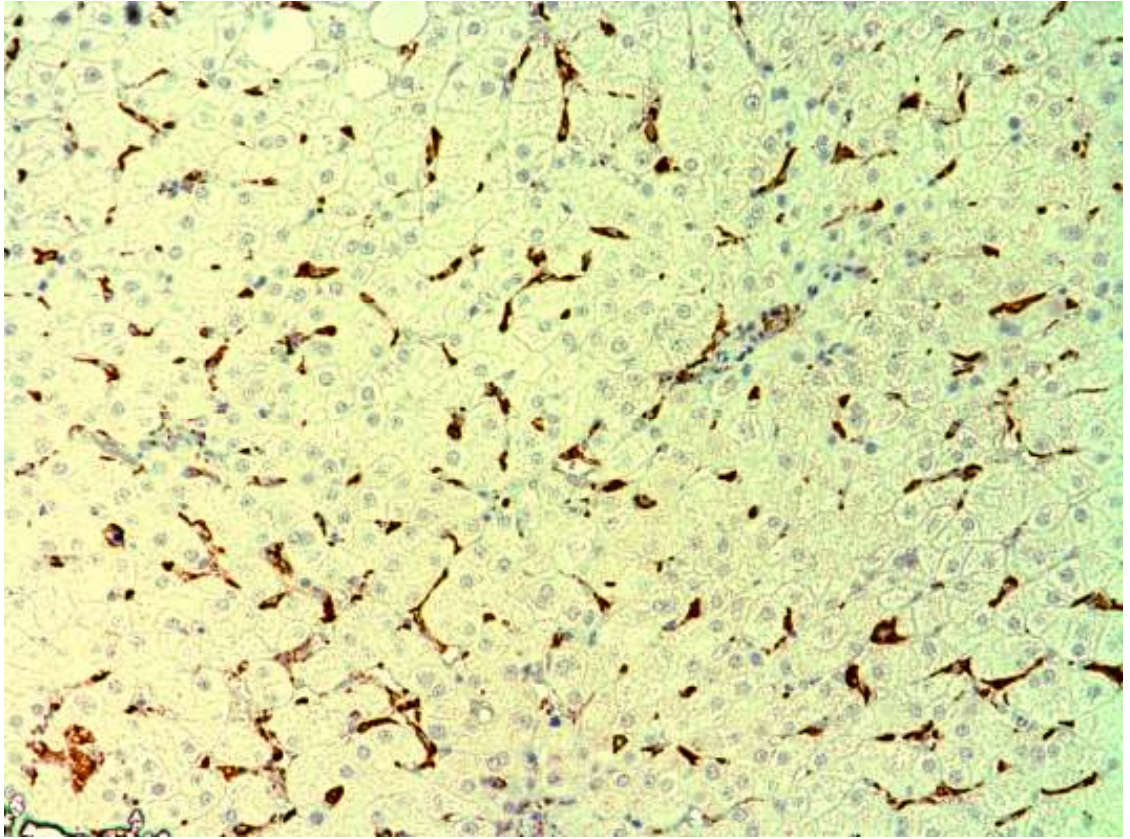


Resim 21 : Demir boyası,parenkimde demir birikimi x400



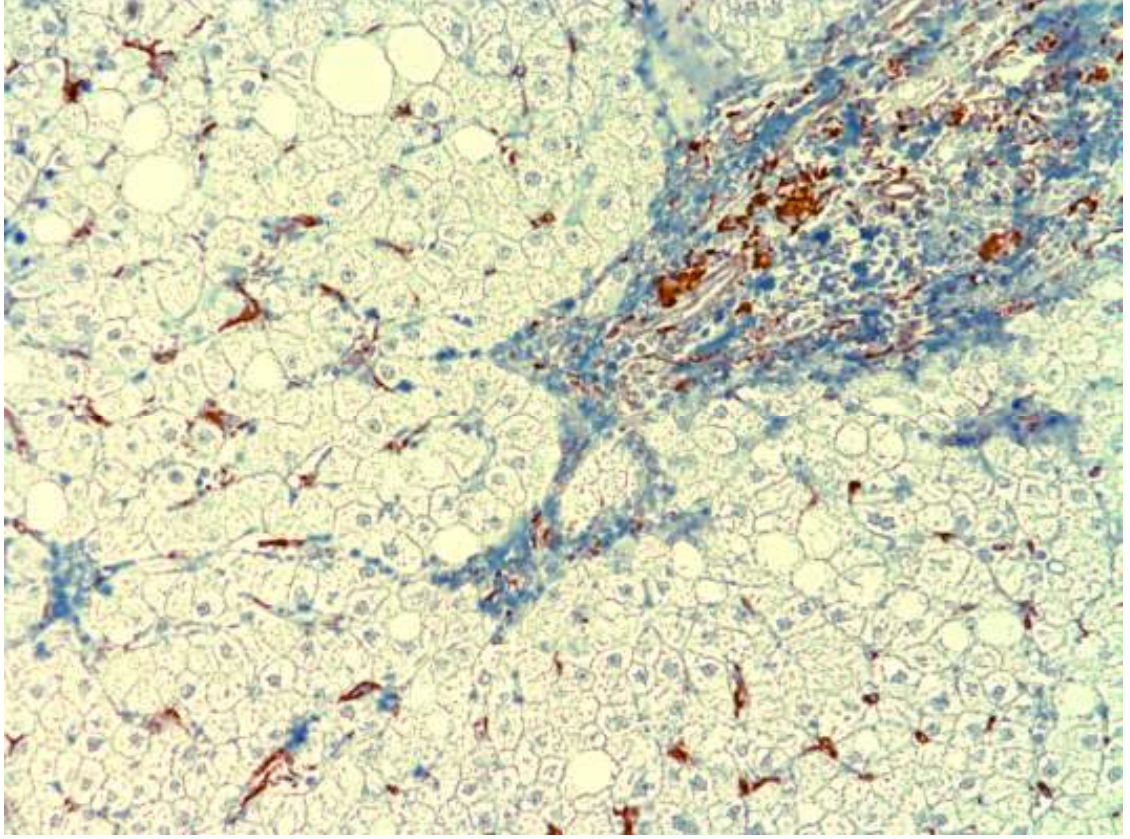


Resim 22 : CD68, Kupffer hücrelerinin lobüler dağılım paterni x 200

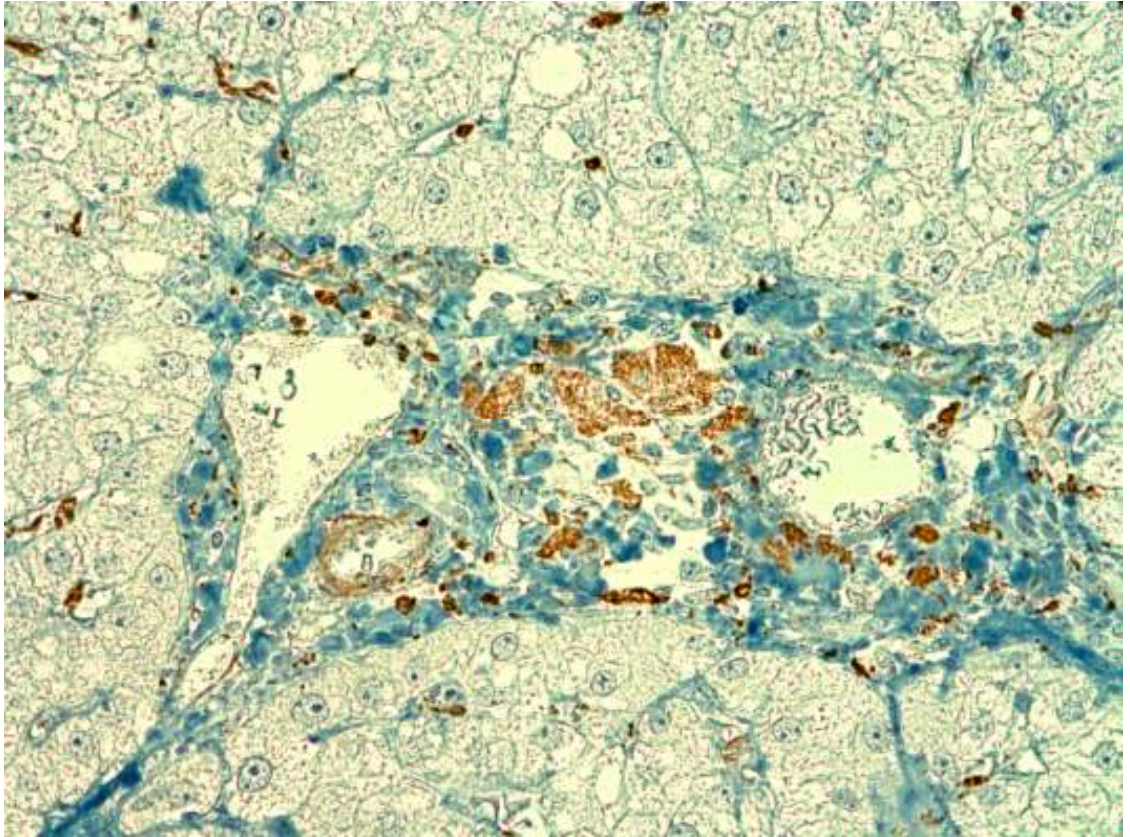


Resim 23 : CD68, Kupffer hücrelerinin lobüler dağılım paterni x 200



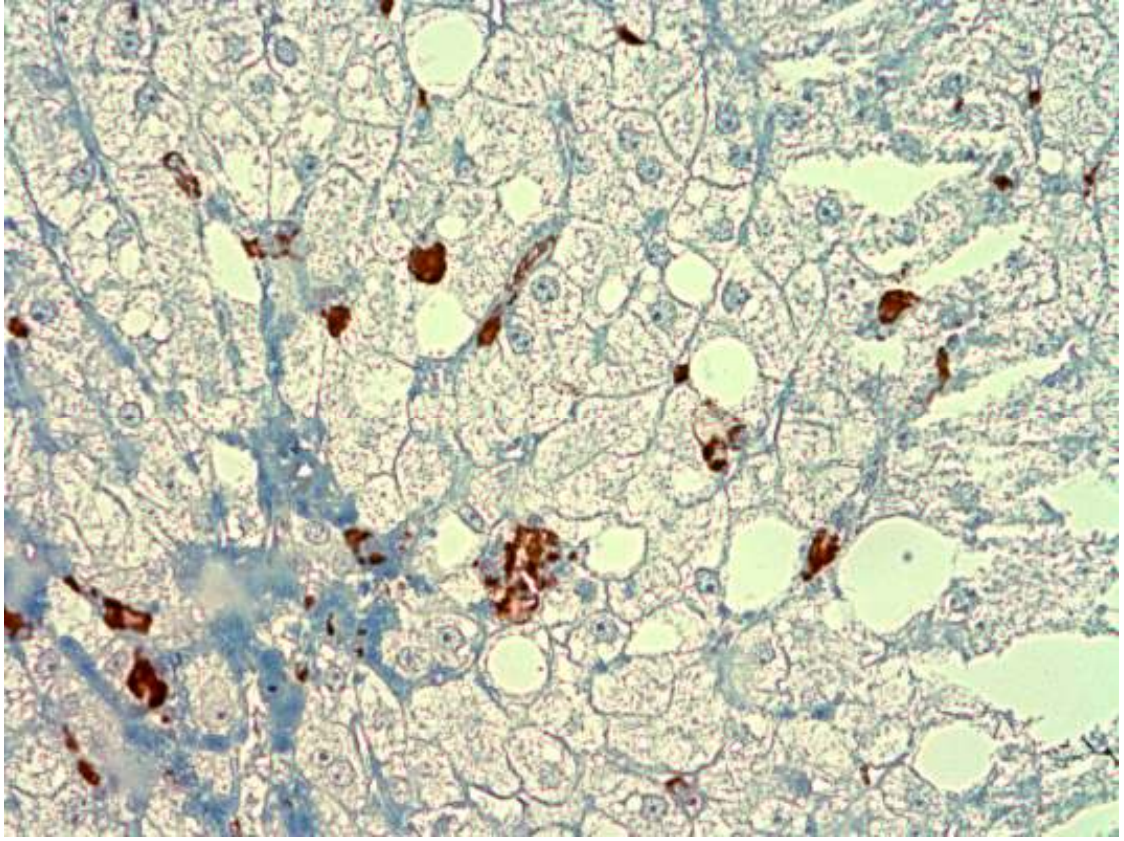


Resim 24 : CD68, Kupffer hücrelerinin portal, periportal dağılım paterni x 200

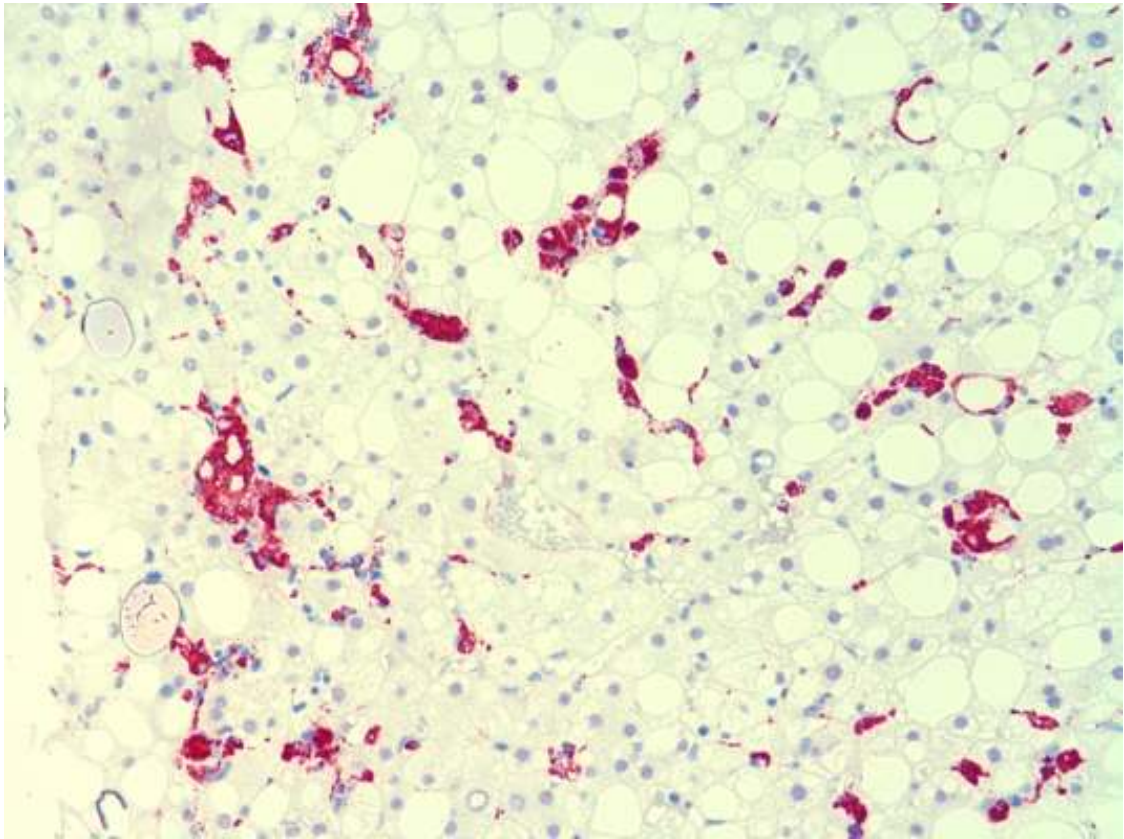


Resim 25 : CD68, Kupffer hücrelerinin portal dağılım paterni x 400



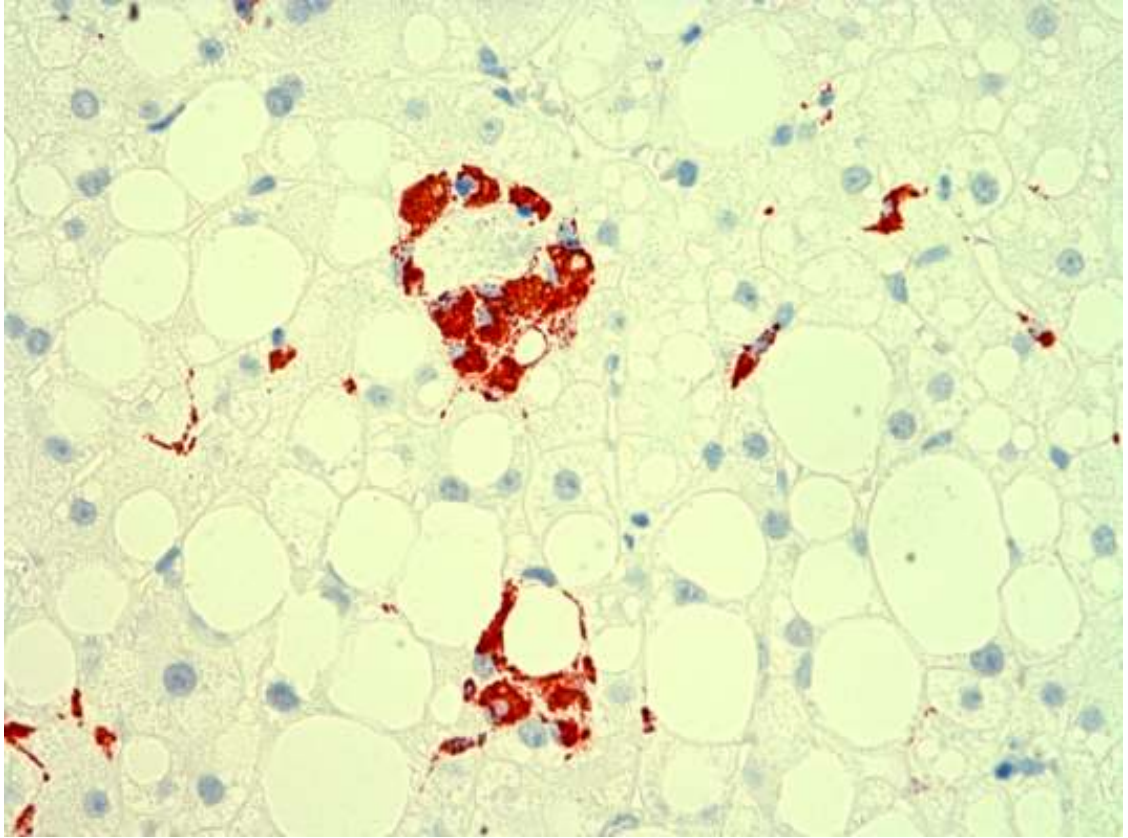


Resim 26 : CD68, agregat oluşumu x400

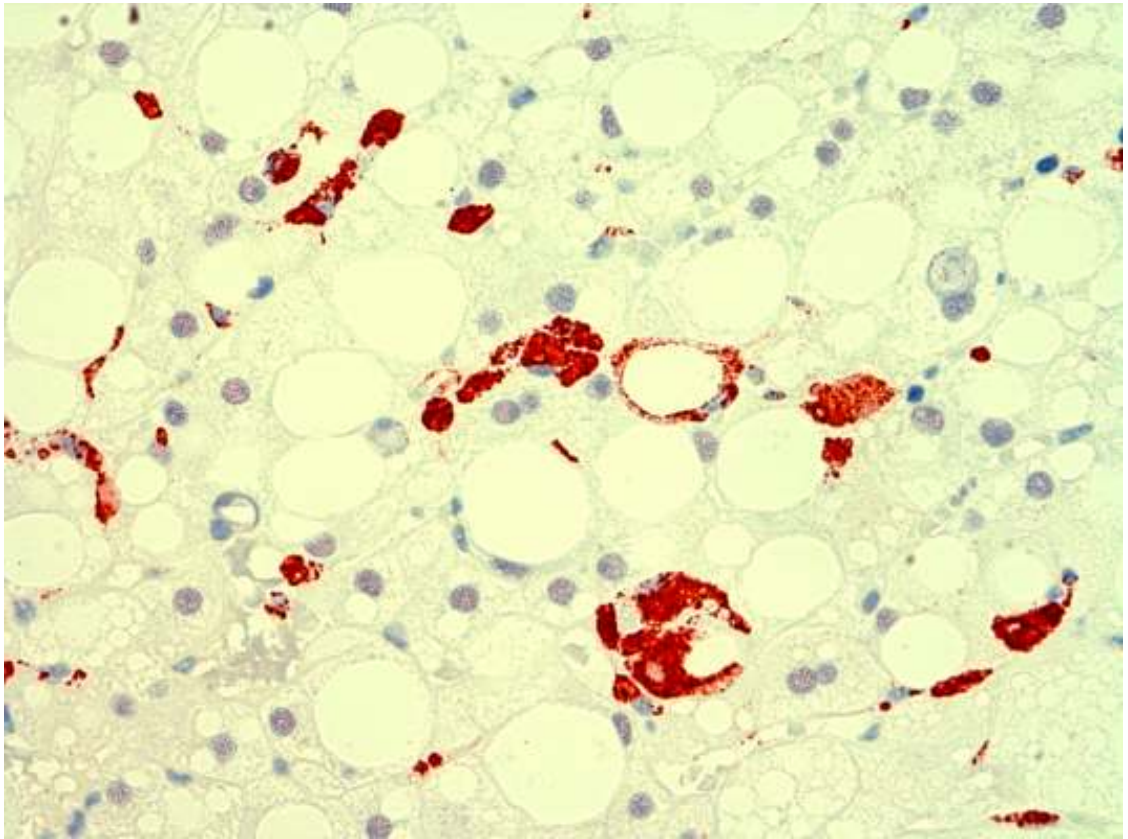


Resim 27 : CD68, agregat ve lipogranülom paterni x200



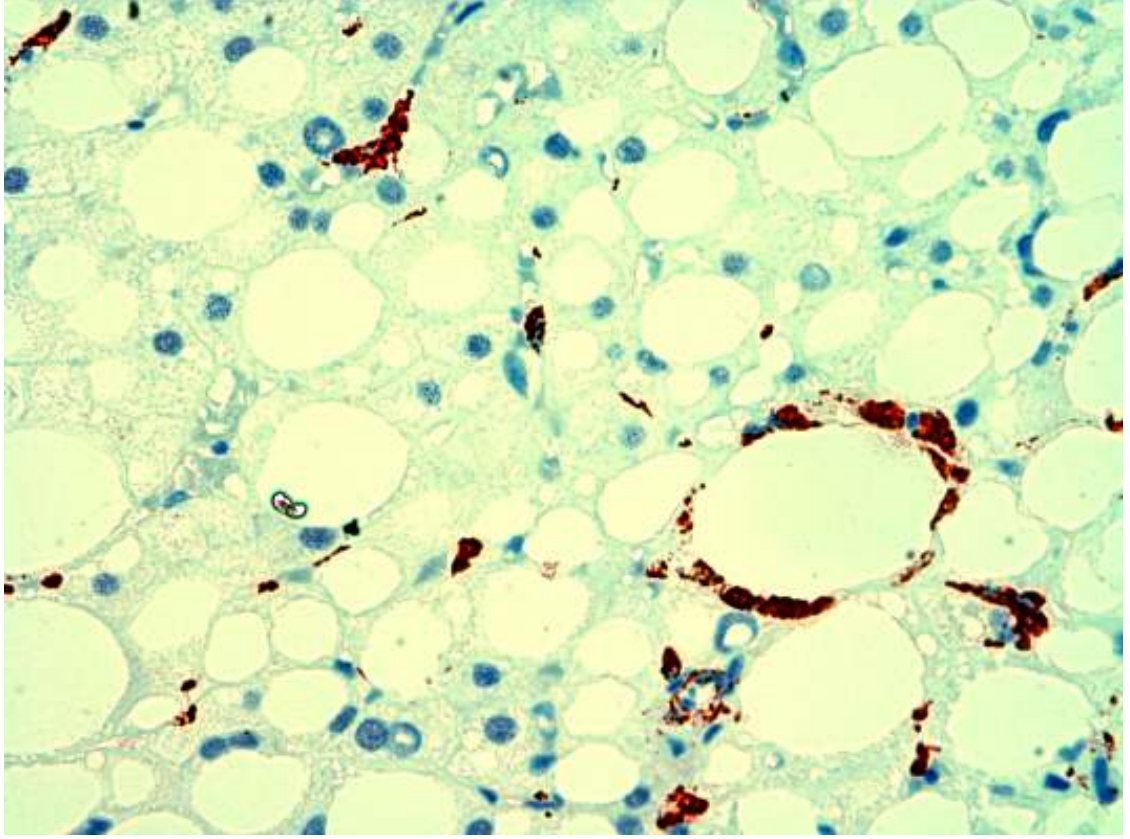


Resim 28 : CD68, lipogranülom paterni x400

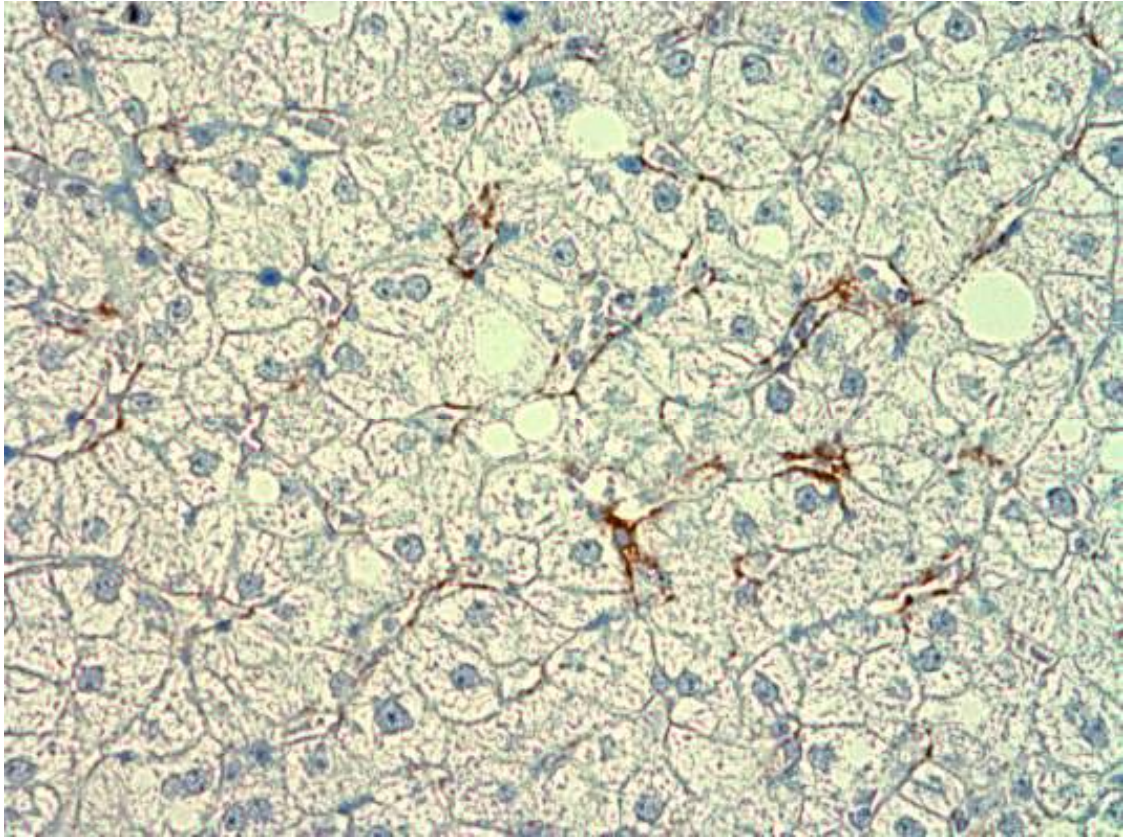


Resim 29 : CD68, lipogranülom paterni x400



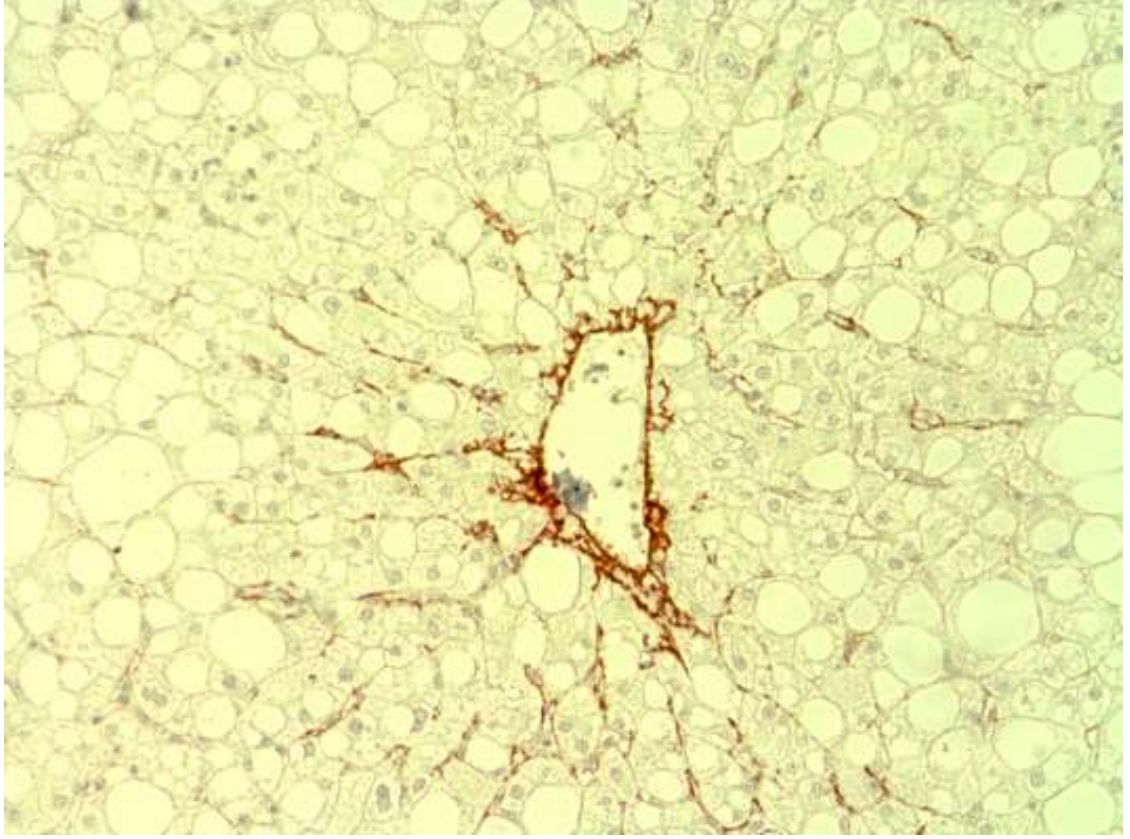


Resim 30 : CD68, lipogranülom paterni x400

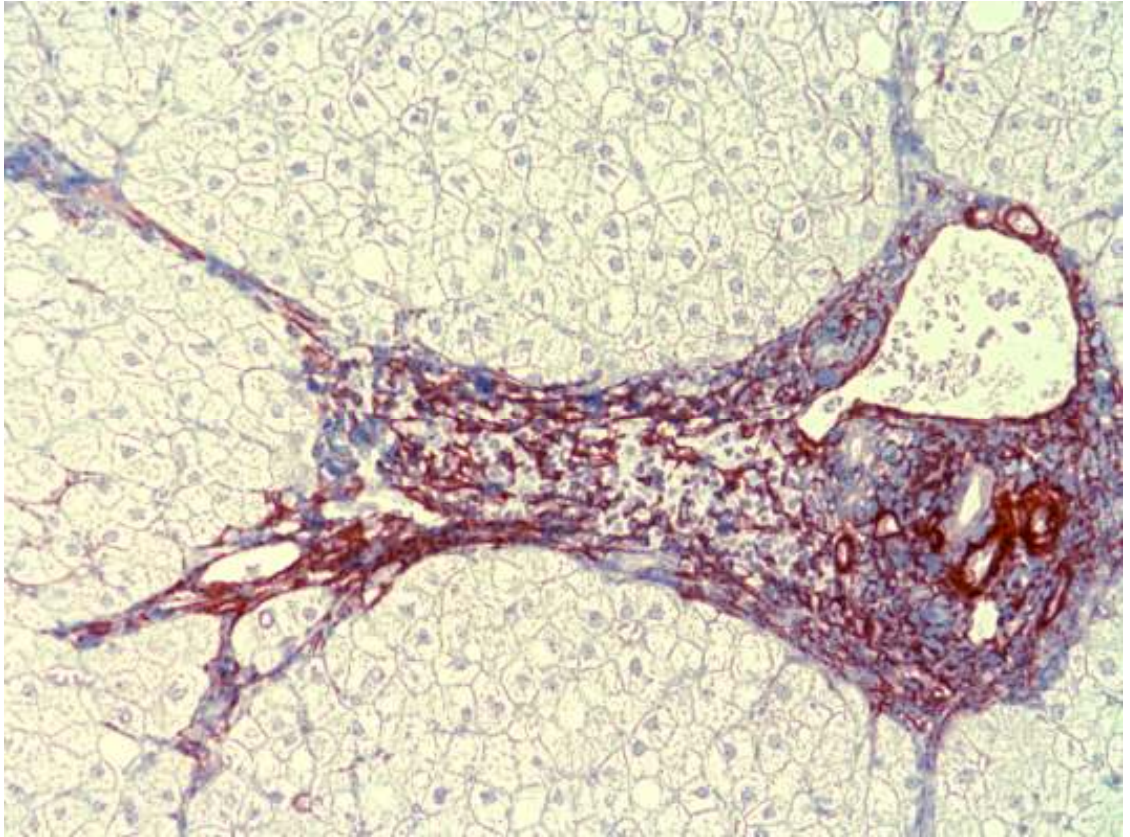


Resim 31 : SMA, Periselüler fibrozis x400

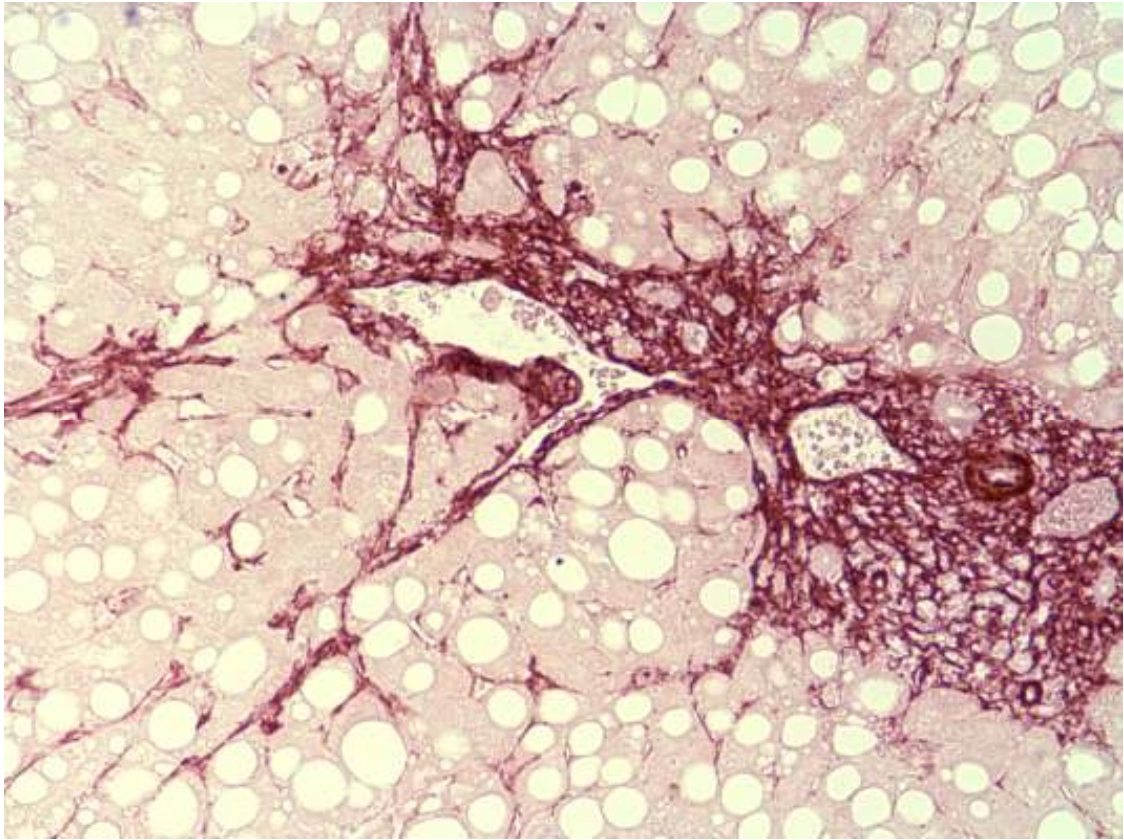




Resim 32 : SMA, Perivenüler ve periselüler fibrozis x200



Resim 33 :SMA, Periportal fibrozis x200



Resim 34 : SMA, Periportal fibrozis x200



## 8. SONUÇLAR:

Çalışmamız, İngilizce literatürde yayınlanan NASH ve steatohepatit olgularındaki Kupffer hücreleri ve stellat hücrelerini inceleyen en geniş olgu serisine sahip ve en kapsamlı histopatolojik incelemenin yapıldığı, immunhistokimyasal bir araştırmadır.

Olgu grupları karşılaştırıldığında, NASH'li olgularda, yağlanmanın derecesi ( $p<0.0001$ ), PMNL'lerden zengin yangısal infiltrasyon ( $p<0.0001$ ) ve bağ dokusunun artımı ( $p<0.0001$ ) hepatosteatozlu ve normal olgu gruplarından belirgin bir şekilde, daha fazla izlenmiştir (Tablo11,12,18). Bu bulguyu steatozun ağırlaşması, yangının ve fibrozisin artması ile NASH gelişimi arasında pozitif bir bağlantı olduğu şeklinde yorumlayabiliriz.

NAYKH' nda Kupffer hücrelerinin ve stellat hücrelerin rolü incelendiğinde, sayısal açıdan olmasa da dağılım paternleri arasında anlamlı farklılıklar bulundu. Öncelikle, NASH ve hepatosteatoz olgularında Kupffer hücrelerinin boyutlarının arttığını, sitoplazmalarının yuvarlaklaştığını izledik. Bu bulguyu hücrelerin aktive olduğu şeklinde yorumladık. Portal bölgede Kupffer hücre toplulukları ise NASH'lerde hepatosteatozdan fazla izlenmekte, normal karaciğerde bulunmamaktadır. NASH ve hepatosteatozlu olgularda Kupffer hücrelerin boyutlarında artma ve agregat yapma eğilimi izlenmektedir. Yalnızca NASH olgularında izlenen patern lipogranülom yapısıdır. Bu yapının karaciğerde izlenmesi olgunun yangısal ve ilerleyici bir seyir izleyeceği şeklinde yorumlanabilir.

Portal bölgede Kupffer hücre toplulukları izlenmesi ise, Brunt grade'i arttıkça artmaktadır. Bunun yanında Kupffer hücre agregatlarının varlığı, NASH'lerin yangısal infiltrasyonu ve hücre hasarını gösteren Brunt grade'i ile doğru orantılı artmaktadır ( $p< 0.007$ ) (Tablo 26). Lipogranülomların formasyonları ile Brunt grade'i arasında anlamlı bir bağlantı vardır ( $p< 0.006$ ) ( Tablo 28). Yani bu histopatolojik yapılar yalnızca NASH ve steatohepatit ayırıcı tanısında yardımcı olmamakta aynı zamanda hücresel zarar şiddeti hakkında da direkt bilgi vermektedir.

Çalışmamızdan anladığımız üzere, PMNL'lerden zengin noktasal nekrozlar, sıklıkla karaciğer fonksiyon testleri normal olgularda da izlenmektedir ve NASH için spesifik bir histopatolojik bulgu değildir. (hepatosteatozlu olgularda % 61.5 oranında). Lipogranülom ise klinik gidiş ile daha bağlantılı bir histopatolojik bulgu

izlenimi vermektedir. Bunun yanında Kupffer hücre agregatları ve lipogranülom yapıları H-E kesitlerde rahatlıkla atlanmakta, diğer yangısal hücre yada endotel proliferasyonu ile karışabilmektedir. NASH'li olguların daha sağlıklı değerlendirilmesi için olgulara konvansiyonel histokimyasal yöntem ile CD68 uygulaması hastalığın hem tanısı, hem de prognozunun belirlenmesinde yararlı olabilir.

Olguların stellat hücre yoğunluklarının karşılaştırılmasında, NASH olgularında, hepatosteatoz olgularına göre, yoğun SMA ekspresyonu izlenmektedir. Kontrol grubunda ise zayıf boyanmaya rastlanmaktadır ( $p < 0.018$ ) ( Tablo 35 ). Yani stellat hücre aktivasyonu NASH'te daha belirgindir. Olgulardaki bağ dokusu artımını gösteren Brunt stage'i, SMA ekspresyonu ile direkt bağlantı göstermektedir ( $P < 0.0001$ ) (Tablo 36). Sonuçta, NASH'teki bağ dokusu artımının primer sorumlusunun stellat hücreler olduğunu söyleyebiliriz.

Olgularımızdaki demir birikimini değerlendirdiğimizde ise NASH olgularının hiçbirinde boyanma olmaması ve hiçbir olguda eritrofagositozu görmememiz, bu olayın etyopatogenezinde bize karaciğerde demir birikiminin yeri olmadığı izlenimini vermektedir.

Sonuç olarak, NASH gelişiminde yağlanma, noktasal nekrozlar ve fibrosizin yoğunluğu önemli histopatolojik parametrelerdir. Bu hastalığın patogenezinde, prognozunda ve tanısında Kupffer hücreleri önemli rol oynamaktadır ve bu hastarda CD68 ile değerlendirilmeleri anlamlı bilgiler verecektir. NASH'lilerde stellat hücre aktivasyonu ise fibrogenezde önemli rol oynamaktadır, demir birikiminin ise etyopatogeneizde rolü yoktur.

## 9.ÖZET:

Nonalkolik steatohepatit (NASH), son yıllarda obezite ile paralel olarak sıklığı giderek artan, karaciğerde yağlanma ve kronik inflamasyon ile seyreden, kronik bir hastalıktır. Biyopsi tanı için mutlak gerekli bir yöntemdir.

NASH'in fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak diğer faktörlerle birlikte bazı sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL -1, IL-6, IL-8, IL-10 ve TGF-  $\beta$  vb.) önemli rol oynar. Kupffer hücreleri karaciğerde bulunan RES'in bir üyesidir ve sitokin salgılama yetenekleri vardır. NASH'te, bu hücrelerin, salgıladıkları sitokinler aracılığı ile inflamasyon ve fibrozis gelişiminde önemli rol oynaması olasıdır. Stellat hücreleri, sitokin ve büyüme faktörü sentezi ve sekresyonu yapabilen, bağ dokusu gelişiminde önemli rol oynayan hücrelerdir. Kupffer hücreleri, TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinlerin sekresyonu ile stellat hücreleri ve fibroblastları aktive ederler.

Bu çalışmanın amacı, karaciğer iğne biyopsilerinde, NASH etyopatogenezinde yaptıkları salgılar ve fibrogenezde önemli rol oynama ihtimali olan Kupffer hücreleri ve stellat hücrelerinin yoğunluğunu ve dağılım paternlerini araştırmak; NASH, hepatosteatoz ve normal karaciğer dokularında karşılaştırmalı olarak, aralarındaki farklılıkları belirlemektir. Ayrıca, bu biyopsileri histopatolojik olarak CD68 ve SMA boyaları ile değerlendirerek, tanı ve prognoza yardımcı olacak yeni morfolojik kriterler aramaktır. Bu amaçla kurumumuzda incelenen 63 NASH'li, 13 hepatosteatozlu, 13 viral hepatit ve NASH içeren, 17 normal karaciğer biyopsisi ayrıntılı şekilde, histopatolojik olarak incelenmiş ve grupları immunhistokimyasal olarak CD68 ve SMA boyaları ile boyanmış, Kupffer hücreleri ve stellat hücreler açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler arasındaki farklar ve bağlantılar istatistiksel olarak incelenmiştir.

Histopatolojik değerlendirmede, gruplar arasında yağlanmanın derecesi, noktasal nekroz sıklığı ve bağ dokusu artımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.0001$ ). Olgulardaki Kupffer hücreleri CD68 boyası ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında hücre sayısı açısından bir fark bulunamamıştır, buna rağmen lipogranülom yapıları sadece NASH grubunda izlenmiştir ( $p<0.0001$ ), agregat yapıları ise, NASH ve hepatosteatozlarda izlenirken, normal karaciğerlerde saptanamamıştır ( $p<0.0001$ ). Ayrıca lipogranulom ve agregat yapılarının görülme sıklığının Brunt grade'i ile doğru orantılı olarak arttığı, yani karaciğerdeki hücre hasarının derecesini belirlediği izlenmiştir. Histopatolojik değerlendirmede,

transaminazları normal seyreden hastaların çoğunda, PMNL'lerden zengin noktasal nekroz görüldüğünden, bu bulgunun NASH tanısına yardımcı olduğu düşünülmemektedir, ancak lipogranülom formasyonu NASH'e özgü bir bulgu olarak izlenmiştir. Kupffer hücre toplulukları H-E ve CD68 boyaları ile karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, CD68 boyası ile Kupffer hücreleri izlenen alanlar H-E kesitlerde çoğunlukla tanınmamakta, mononükleer yangı ve endotel proliferasyonu ile karıştırılabilmektedir. Sonuç olarak, NASH'li karaciğer olgularında tanıyı doğrulamak ve hücre hasarının derecesini belirlemek için, konvansiyonel boyalar dışında, CD68 immunhistokimyasının da yapılması önerilebilir.

Brunt stajeleri ile stellat hücre aktivasyonu arasında bulunan anlamlı bağlantı ( $p<0.0001$ ) da stellat hücrelerin, NASH'de fibrozis gelişiminde primer rol oynadığı bilgisini bir kere daha doğrulamaktadır. Olgularımızdan yalnızca 3 tanesinde izlenen demir birikimi ise, bize NASH etyopatogenezinde, bu olayın yerinin olmadığı izlenimini vermektedir.

Sonuç olarak, NASH gelişimi, histopatolojik olarak yağlanmanın, noktasal nekrozların ve fibrozisin gelişimi ile direkt olarak bağlantılıdır. Bu hastalığın patogenezinde, prognozunda ve tanısında Kupffer hücreleri önemli rol oynamaktadır. Bu hastalarda, biyopsi materyellerinin CD68 ile değerlendirilmeleri, Kupffer hücreleri hakkında anlamlı bilgiler verecektir. NASH'lilerde stellat hücre aktivasyonu ise fibrogenezde önemli rol oynamaktadır. Demir birikiminin ise etyopatogenezde rolü yoktur.

## 10. ABSTRACT

NASH is a chronic disease whose prevalence has recently risen in line with obesity and which goes on with steatose and inflammation in liver. Biopsy is mainly required method for diagnosis.

The pathophysiology of NASH has not been enlightened completely. However, with other factors, some cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 ve TGF- $\beta$ ) plays an important role. Kupffer cells are the elements of RES located in liver and have the ability of cytokine secretion. It is possible that these cells play an important role in developing inflammation and fibrosis through cytokines they secrete in NASH. The stellat cells are the ones which can synthesize and secrete the cytokines and growing factor and also play an important role in developing fibrous tissue. Kupffer cells activate the stellat cells and fibroblasts with the cytokine secretion such as TGF  $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-1.

The aim of this work is to study the distribution patterns and intensity of Kupffer cells and stellat cells which possibly play an important role in making secret in NASH aetiopathogenesis and to determine the difference in normal tissue and NAFLD (Nonalcoholic fatty liver disease) in liver needle biopsies. In addition we will try to find new diagnostic and prognostic histopathological markers for NASH. With this aim, we searched histopatologically in detail 63 NASH, 13 hepatosteatosis, 13 viral hepatitis with NASH and 17 normal liver biopsies which were examined in our institute. Then we stained the groups immunohistochemically with CD68 and SMA stains to detect Kupffer and stellat cell population. We examined the difference and relation between the data statistically.

The grade of steatosis, spotty necrosis and fibrosis is statistically different between NASH and hepatosteatosis group ( $p < 0.0001$ ). After studying the Kupffer cells in case with CD68 stain, we did not find any differences in number, yet the lipogranalom structures were only seen in NASH group. We did not find aggregate structures in normal livers.

Furthermore, we saw that the appearance prevalence of lipogranulom and agregat structures rose directly proportionally with the Brunt grade, that is it stated the grade of the cell injury in liver. In hitopathologic study, since spotty necrosis were common in most of the patients whose transaminazis are normal, it is not believed this finding will help to diagnose NASH. On The other hand, lipogranulom formation seem to be a special finding for NASH. Additionally, aggregates and lipogranulomas were identified clearly with CD68 stain but could be misdiagnosed as , mononuclear inflammation or endothel proliferation in H-E stains. As a result we recommend to perform the CD68 immunohistochemical as well, apart from conventional stains in order to determine the cell injury and to confirm the diagnosis in liver biopsy materials with NASH.

The important relation between Brunt stages and stellate cells activation verified once more that the stellat cells play an important role in developing fibrosis in NASH. The iron deposit seen in only 3 cases none of which were NASH. ( $p < 0.0001$ ).

Finally the grade of steatosis, spotty necrosis and fibrosis is directly related with NASH formation. Kupffer cells play an important role in NASH pathogenesis, prognosis and diagnosis. In these patients, when these biopsies are studied with CD68 stain, it will provide meaningful information about Kupffer cells. In livers with NASH, the stellat activation plays an important role in fibrogenesis. Yet, iron deposit has no role on etyopathogenesis.

## **11. KAYNAKLAR**

- 1)**Ramadori G, Christ B. Cytokines and hepatic acute phase response. *Semin Liv Dis* 1999; 19(2):141-155
- 2)**Maher JJ. Cytokines: Overview. *Semin Liv Dis* 1999; 19(2):109-115
- 3 )** Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumor necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006 Mar; 55(3), 415-424
- 4)**Baldus S.E, Zırbes T.K, Weidner I.C, Flucke U, Dittmar E, Thiele J, Dienes H.P. Comparative quantitative analysis of macrophage populations defined by CD68 and carbohydrate antigens in normal and pathologically altered human liver tissue. *Analytical cellular pathology* 1998; 16: 141-150
- 5)**Rappaport AM. Physioanatomic consideration. In: Schiff L, Schiff ER, eds. *Disease of the liver*. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1982:1-57
- 6)**Schaffner F, Popper H. Structure of the liver.In: Berk JE, Haubrich WS, Kalser MH, Roth JLA, Schaffner F, eds. *Bockus gastroenterology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1985:2625-2658
- 7)**Henricksen JH, Horn T, Christoffersen P. The blood lymph barrier in the liver. A review based on morphological and functional concepts of normal and cirrhotic liver. *Liver* 1984;4:221-232
- 8)**Jones EA. Hepatic sinusoidal cells: new insights and controversies. *Hepatology* 1983;3:259-266
- 9)**McCuskey RS. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 1985;5:683-692
- 10)** Bronfenmayer S, Schaffer F, Popper H. Fat-storing cells(lipocytes) in human liver. *Arch pathol lab med*, 1966;82:447-453
- 11)** Cameron RG,Neuman MG Blendis LM. Multivesicular stellate cells in primary biliary cirrhosis.*Hepatology*, 1997;26:556-553
- 12)** Yokoi Y,Namihisa T, Kuroda H et al. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells ( Ito ceels ). *Hepatology*,1984;4:709-714
- 13)** Ballardini G, Groff P,Badiali de Giorgi L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity :desmin-negatif Ito cells in normal rat liver.*Hepatolog*, 1994;19:440-446

- 14)** Neubauer K, Knittel T, Aursch S, Fellmer P, Ramadori G, Glial fibrillary acidic protein-a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol*, 1996;24:719-730
- 15)** Niki T, De Bleser PJ, Xu G, Van Den Berg K, Wisse E, Geerts A. Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CC14-induced fibrotic rat liver. *Hepatology*, 1996;23:1538-1545
- 16)** Nakatani K, Seki S, Kawada N, Kobayashi K, Kaneda K. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in perisinusoidal stellate cells of the human liver. *Cell Tissue Res*, 1996;283:159-165
- 17)** Cassiman D, van Pelt J, De vos R, Van Lommel F, Desmet V, Yap P, Roskams T. Synaphtophysin: a novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J pathol*, 1999; 155:1831-1839
- 18)** Geerts A. On the origin of stellate cells : mesodermal, endodermal or neuroectodermal ? *J Hepatol*, 2004; 40:331-334
- 19)** Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer Cell Agregation and Perivenular Distribution in Steatohepatitis. *Mod pathol* 2002;15(7):699-704
- 20)** Wisse E, Knook DL. Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Amsterdam: Elsevier ;1977
- 21)** Naito M, Takahashi K, Ohno H, Nishikawa SI. Yolk sac macrophage –a possible kupffer cell precursor in the fetal Mouse liver. In : Wisse E, Knook DI, Decker K, eds. *Cells of the Hepatic sinusoid*. Rijswijk : Kupffer Cell Foundation, 1989 ;2 :419-420
- 22)** MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol*, 1992 ; 263:G17-G23
- 23)** Sirica AE. Biology of biliary epithelial cells. *Prog Liver Dis*, 1992; 10:63-87
- 24)** Rogoff TM, Lipsky PE, Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. *Gastroenterology*, 1981 Apr;80(4):854-860
- 25)** Wigg AJ, Roberts-Thomsmon IC, Dymock RB, McCarty PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non- alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-211
- 26)** James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-1636
- 27)** Washington K, Wright K, Shyr Y, et al. Hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000;31:822-828



- 28)** Thaler H. The fatty liver and its pathogenetic relation to liver cirrhosis. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 1962.335:180-210
- 29)** Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 1980. 55: 434-438
- 30)** Knecht R.J. Non-alcoholic steatohepatitis: Clinical Significance and Pathogenesis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplements*. 2001, 234, 88-92
- 31)** Fan J.G, Impact of non-alcoholic fatty liver disease on accelerated metabolic complications. *Journal of Digestive Diseases* 2008,9, 63-67
- 32)** Angulo P. Non alcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 2002; 16: 1221-31
- 33)** Donnelly KL , Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun, J, Baldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease.*Journal of Clinical Investigation*, 2005; 1150: 1343
- 34)** Scherlock S, Dooley S. Nutritional and metabolic liver diseases. In: Scherlock S, Dooley S ( eds ). *Diseases of the Liver and Biliary System*. Eleventh edition, Milan, Blackwell Publishing. 2002, p: 423-431
- 35)** James OFW, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis. ( NASH ): a disease of emerging identity and importance. *J. Hepatol* 1998;29: 495-501 1999; 353: 1634-1636
- 36)** James O, Day C. Nonalcoholic Steatohepatitis: Another Disease of Affluence. *Lancet*. 1999 May 15; 353(9165):1634-1636
- 37)** Neuschwander-Tetri Ba. A resistance movement in NASH. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2813-2814
- 38)** Saltiel Ar. New perspectives into the molecular pathogenesis treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001;104:517-529
- 39)** Hsiao PJ, Kuo KK, Shin SJ, Yang YH, Lin WY, Yang JF, Chiu CC, Chuang WL, Tsai TR and Yu ML. Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *J. Gastroenterol Hepatol*. 2007 Dec: 22(12): 2118-2123
- 40)** Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis. *J. Gastro Hepatol* 2002; 17 (Suppl 3) 377-384
- 41)** Cortez-Pinto H. Oxidative Stress in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease. In: *Steatohepatitis(NASH and ASH)*. Eds: Leuschner U, James OFW, Dancygier H. Dordrecht, Kluwert Academic Publishers, 2001: 54-61
- 42)** Weltman Md, Farrell Gc, Liddle C, Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 111: 1645-1653

- 43)**Weltman Md, Farrell Gc, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P4502E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27:128-133
- 44)**Idilman R, Mızrak D, Corapcıoğlu D, Bektař M, Doganay B, Saykı M, Coban S, Erdem E, Soykan I, Emral R, Uysal A.R, Ozden A. Clinical trial : Insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin rezistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis, *Alimentary Pharmacology-Therapeutics*, 2008; 28: 200-208
- 45)**Brunt E.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease In MacSween R. N. M, Burt D.A, Bernard C. Portman, Ihsak K.G, Scheuer P.J, Anthony P.P in *Histopathology of the Liver*; 5. Edition; Churchil Livigstone Oxford; 2008 p: 367-397
- 46)**Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko V, et al. Alteration in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis-a pilot study. *JAMA* 1999; 282: 1659-1664
- 47)** Hiromu Kawara, Masayuki Fukura, Mutsumi Tsuchishima and Shujiro Takase  
Mutation of Mitokonrial DNA in Livers From Patients Wits Alcoholic Hepatitis and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Alcoholism: Clinical and experimental research*.2007; Jan:31; 54-60
- 48)** Serviddio G,Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis *Molecular Aspects of Medicine*; 2008, 29, 22-35
- 49)** Nobuhiro Sato. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J. Gastroenterol Hepatol*; 2007 Jun; 22 : 1-6
- 50)**Garcia-Ruiz C, Colell M, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa J. Role of oxidative stres generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutatione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 1995; 48: 825-834
- 51)** Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi Mr, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour Aa, Naserimoghadam S. Probucol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol* 2003;38:414-418
- 52)** Lavine Je, Vitamin E treatment of non-alcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *J Pediatr* 2000; 136;734-738
- 53)** Harrison Sa, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2485-2490
- 54)**Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 244-251

- 55)** Takamatsu S, Norio N, Kudah A, Nakamura N, Kawamura T, Teramoto K, Arl. influence of Risk Factors For Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease on the progression and prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 2008, 55, 609-614
- 56)** Poli G, Albano E, Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987;45:117-143
- 57)** Sanyal Aj, Campbell-Sargent C , Mirshahi F , Rizzo Wb , Contos Mj , Sterling Rk , Luketic Va , et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 58)** Garcia –Monzon C, Martin-Perez E, Iacono OL, Fernandez-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, Larranaga E, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000;33:716-724
- 59)** Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in liver disease* 2001;21:57-69
- 60)** Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner L. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol , Med* 1991;11:81
- 61)** Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 2002;37:56-62
- 62)** Lancaster JR, Laster SM, Gooding LR. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 1989 May 8; 248(1-2): 169-174
- 63)** Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47:233-261
- 64)** Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Gene expression of TNF- $\alpha$  and TNF-receptors, p53 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-1163
- 65)** Canbay A, Friedman S, Gores G. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39:273-8
- 66)** Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-211
- 67)** Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:274-280

- 68)** Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;371:665-668
- 69)** Torer N, Ozenirler S, Yucel A, Bukan N, Erdem O. Importance of cytokines, oxidative stress and expression of BCL-2 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*; 2007; 42; 1095-1101
- 70)** Leuschner U. Pathogenesis of NASH. In: Leuschner U. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Revised Edition. 2004. Dr. Freiburg, Falk Pharma GmbH, 2004:14-19
- 71)** Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville Ac, Huet S, Martinez V Gauthier JM. Expression of connective tissue growth factor in experimental and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30:968-976
- 72)** Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Boering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. *Hepatology* . 2008; Nov 19; (Epub ahead of print)
- 73)** Franklin TJ. Therapeutic approaches to organ fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:79-89
- 74)** Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; 35: 62-73
- 75)** Friedman SL. The Cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835
- 76)** L. Malaguarnera M Di Rosa, A. M. Zambito, N. Dell'Ombra, F Nicoletti, M. Malaguarnera. Chitotriase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2006,55;1313-1320
- 77)** Malaguarnera L, Rosa M.D, Zambito A.M, dell' Ombra N, Marco R.D, Malaquarnera M. Potential role of chitotriase gene in non-alcoholic fatty liver disease evolution. *American journal of Gastroenterology* 2006; 101; 2060 – 2069
- 78)** Mendez-Sanchez N, Zamora-Valdes D, Pichardo-Bahena R, Barredo-Prieto B, Ponciano-Rodriguez G, Bermejo-Martinez L, Chavez-Tapia NC, Baptista-Gonzalez HA, Uribe M. Endocannabinoid receptor CB2 in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver int.* 2007 Mar; 27(2) 215-219
- 79)** Yamazaki Y, Kakizaki S, Horiguchi N, Sohara N, Sato K, Takagi H, Mori M, Negishi M. The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*; 2007, 56: 565-574
- 80)** Cayon A, Crespo J, Mayorga M, Guerra A, Pons-Romero F. Increased expression of Ob-Rb and its relationship with the overexpression of TGF-  $\beta$ 1 and

the stage of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver international* 2006, 26; 1065-1071

**81)** Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54; 117-121

**82)** Evans RM, Barish GD, Wang Y-X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, 2004; 10:1-7

**83)** Saibara T. 'Insufficient' leptin production for the fat mass: a risk factor for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *J. Gastroenterol*, 2003; 38; 522-523

**84)** Chitturi S, Farrell G, Forst L et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity. *Hepatology*. 2002; 36 :403-409

**85)** Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ, Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 1997; 389:374-377

**86)** Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J. Hepatol*. 2002; 37:206-213

**87)** Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, 2002; 16:663-678

**88)** Si-Wen Chen Yue - Xiang Chen-Jian Shi - Yong Lin-Weri-Fen Xie The Restorative Effect of Taurine on Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis. *Dig. Dis. Sci* ( 2006 ) 51: 2225-2234

**89)** Aygun C, Kocaman O, Şentürk Ö. Adiponectin : Is it a novel treatment modality to alleviate liver injury in non-alcoholic fatty liver disease ( NAFLD ) *Med Hypotheses*. 2008; 70 (2) : 457-458

**90)** Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia N .C, Zamaro-Valdes D, Uribe M. Adiponectin, structure, function and pathophysiological implications in non-alcoholic fatty liver disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2006, 6, 651-656

**91)** Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007; 22: 87-92

**92)** Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125:1796-1807

**93)** Yamauchi T, Kamon J, Waki H et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity . *Nat. Med*, 2001; 7:941-946

- 94)** Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H et al. Adiponectin protects LPS induced liver injury through modulation of TNF- $\alpha$  in KK-Ay obese mice *Hepatology*, 2004; 40:177-184
- 95)** Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu YL, Lam KSL, Cooper GJS. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin Invest*, 2003; 112:91-100
- 96)** Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- $\alpha$  or adiponectin. *Hepatology*, 2004; 40:46-54
- 97)** Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2004;24:99-106
- 98)** Kawada N, Otagawa K. Role of Oxidative Stress and Kupffer Cells in Hepatic Fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007; Suppl. 1: 85-86
- 99)** Mishra P, Younossi Z.M. Current Treatment Strategies For Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Current Drug Discovery Technologies* 2007; 4: 133-140
- 100)** Arun J Sanyal. Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2002; 17: 385-388
- 101 )** Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology*, 1999;99:1408-1413
- 102)** Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991;12:224-229
- 103)** Uygun A, Kadayıfçı A, Isik A, et al. Metformin in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ali Pharmacol Ther*, 2004;19:537-544
- 104)** Neuschwander Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- $\alpha$  ligand rosiglitazone. *Hepatology*, 2003;38:1008-1017
- 105)** Pomrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2004;39:188-196
- 106 )**Basaranoğlu M, Acbay O, Sonsuz A. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 1999;31:384
- 107)** Horlandder J, Kwo P. Atorvastation for the treatment of NASH. *Hepatology*, 1997; 26:544A
- 108)** Yalniz M, Bahcecioğlu I.H, Kuzu N, Poyrazoğlu O.K, Bulmus O, Celebi S, Ustundağ B, Ozercan I.H.Sahin K. Preventive Role of Genistein in an Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis Model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007; 22: 2009-2014

- 109 )** Lavine JE: Vitamine E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study: *J: Pediatr* 2000;136:734-738
- 110)** Gulbahar O, Karasu Z, Ersoz G, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with N-acetylcysteine. *Gastroenterology*, 2000;118:A1444
- 111)**Fujita K, Yoneda M, Wada K, Mawatari H, Takahashi H, Kirikoshi H, Inomori M, Nozaki Y, Maeyama S, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Nakajima A. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, controls progress of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 2007; 52; 3455 - 3464
- 112)** Stiehl A, Benz C, Sauer P, Mechanism of hepatoprotective action of bile acids in liver disease. *Gastroenterol Clin N Am* 1999;28:195-209
- 113)**B. Van Hoek. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Brief Review.* Taylor-Francis, Health sciences 2004
- 114)** Fletcher LM, Knoh-Gain I, Powell EE, Powell LW, Halliday JW. Markers of chronic alcohol ingestion. I. Patients with non-alcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. *Hepatology* 1991;13:445-459
- 115)** Storey EI, Anderson GJ, Mack U, Powell LW, Halliday JW. Desialylated transferrin as a serologic marker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet* 1987;2:1292-1294:255-262
- 116)** McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*, 2002; 34:255-262
- 117)** Youssef WI, McCullough AJ. Diabetes mellitus, Obesity, and hepatic steatosis. *Seminars in Gastrointestinal Disease.* 2002; 13:17-30(123)100) Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liv Dis*, 2001; 21:17-26
- 118)**Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of non-alcoholic steatosis syndromes. *Semin Liv Dis.* 2001; 21: 17-26
- 119)** Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G et al. Nonalcoholic fatty liver steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917-923
- 120)** Garcia –Monzon C, Martin-Perez E, Lo Jacono O et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol*, 2000; 33:716-724
- 121)** Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R et al. The natural history nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of 42 patients up to 21 years. *Hepatology*, 1990; 11:74
- 122)** Itoh S, Yougel T, Kawagoe K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1987; 82:650

- 123)** Lee R.G. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20:594
- 124)** Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 2002; 122:1649-1657
- 125)** Oshibuchi M, Nishi F, Sato M, Ohtake H, Okuda K. Frequency of abnormalities detected by abdominal ultrasound among Japanese adults. *J Gastroenterol Hepatol*, 1991. 6(2):165-8
- 126)** Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I Kusano Y. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci*, 1995. 40 ( 9 ): 2002-2009
- 127)** Manco M, Marcellini M, Devito R, Comparcola D, Sartorelli MR, Nobilli V. Metabolic Syndrome and liver histology in paediatric non-alcoholic steatohepatitis, *international Journal of Obesity*; (2008) 32; 381-387
- 128)** Norberto C. Chavez-Tapia, Francisco Sanchez-Avila, Francisco Vasquaez-Fernandez, Adriana Tornes-Machorro, Felix I. Tellez-Avila and Misael Uribe. Non-Alcoholic Fatty-Liver Disease in Pediatric Populations, *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*; (2007) 20; 1059-1073
- 129)** Imhof A, Kratzer W, Boehm B, Meritinger K, Trischler G, Steinbach G, Piechotowski I, Koenig W. Prevalence of non-alcoholic fatty liver and characteristics in overweight adolescents in the general population. *Eur J. Epidemiol* 2007, 22, 889-897
- 130)** Barshop N.J., Sirlin C.B, Schwimme J.B, Lavine J.E. Review article, epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology-therapeutics*; 2008, 28: 13-24
- 131)** Cortez-Pinto H, Camilo ME, Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis ( NAFLD/NASH ): diagnosis and clinical course. *Best Practice Clinical Gastroenterology* 2004;18:1089-104
- 132)** Klowler WC, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl J Med* 2002;346:393-403
- 133)** Preiss D, Satar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clinical Science*, 2008; 115:141-150
- 134)** Chantal A. Rivera. Risk factors and mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Pathophysiology* 2008, 15; 109-114
- 135)** Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis ( steatohepatitis ) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990;12:1106-10
- 136)** Silverman JF, O'Brien KF, Long S, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol*, 1990;85:1349-55



- 137)** Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette J.L, Diehl A.M, Johnson R.J, Abdelmalek M.F. Fructose Consumption as a Risk Factor for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Hepatology*, 2008; 48: 993-999
- 138 )** Manco M, Bedogni G, Marcellini M, Devito R, Ciampalini P, Sartorelli M.R, Comparcola D, Piemonte F, Nobili V. Waist circumference correlates with liver fibrosis in children with non-alcoholic steatohepatitis ; *Gut* 2008; 57 ; 1283-1287
- 139)** Diehl AM, Goodman Z, Islak KG Alcohol-like disease in nonalcoholic. A clinical and histologic comparison with alcohol induced liver injury. *Gastroenterology*, 1988;95:1056-1062
- 140)** Pinto HC, Baptista A, Camilo ME et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathologic comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 1996;41:172-179
- 141)** Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie Biologie*, 2006; 54:375-386
- 142)** Watts G.F, Gan S.K. Nutrition and metabolism, non-alcoholic fatty liver disease-pathogenesis, cardiovascular risk and therapy. *Current opinion in Lipidology* 2008,19:92-94
- 143)** Marchesini G, Brizi M, Bianchi G. Non-alcoholic fatty liver disease. A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-1850
- 144)** Zimmet P. Alberti KG, Shaw J. Global and Social Implications of The Diabetes Epidemic. *Nature*, 2001;414:782-87.
- 145)** Koca S.S, Bahcecioglu İ.H, Poyrazoglu O.K, Ozercan İ.H, Sahin K, Ustundağ B. Weltman Md, Farell Gc, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996;111:1645-1653
- 146)** Diehl AM. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Semin Liv Dis* 1999;19:221-29
- 147)** Tokushigo K. Yatsuji S, Hashimoto E. Ayae Kabutake, Maki Tobarı, Makiko Taniai and Keiko, Shiratori. Familial Aggregation in Patients With Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Internal Medicine* 2008, 47, 405-410
- 148)** Younossi ZM, Gorreta F, Ong JP, Schlauch K, Del Giacco L, Elariny H, Van Meter A, Younoszai A, Goodman Z, Baranova A, Christensen A, Grant G, Chandhoke V. Hepatic gene expression in patients with obesity-related non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international* 2005;25:760-77
- 149)** Piro D.S, Spadaro L, Ressello M, Spampino D, Oliveri C.E, Vasquez E, Benigno R, Brancato F, Purrello F, Rabuazzo A.M. Molecular determinants of insulin resistance cell apoptosis and lipid accumulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition, Metabolism-Cardiovascular Diseases* 2008; 18; 545-552

- 150)** Wedemeyer H, Michael P, Manns MD. Fatty liver disease-it's more than alcohol and obesity. Study of the liver(EASL); 2003; July 3-6, Geneva, Switzerland
- 151)** Hermos J.A, Coher S.A, Hall R, Gagnon D.R, Brophy M.T, Fiore L.D. Association of elevated alanine aminotransferase with BMT and diabetes in veteran outpatients. Diabetes Research and Clinical Practice 2008; 80; 153-158
- 152)** Ajay Duseja, Kiran K. Thumuru, Ashim Das, R.K. Dhiman, Y.K. Chawla, S. Bhadada, Anil bhansali. Insulin tolerance test is comparable to homeostasis model assessment for insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Indian Journal of Gastroenterology 2007; 26:170-173
- 153 )** Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. Gastroenterology, 1994; 107:1103-1109
- 154)** Harrison S.A, Oliver D, Arnold H.L, Gogia S, Neuschwander-Tetri N.A. Development and Validation of a Simple NAFLD Clinical Scoring System for Identifying Patients without Advanced Disease. Gut. 2008; 57; 1441-1447
- 155)** Einar Brönjsson, Paul Anquilo Non-alcoholic Fatty liver disease Scandinavian Journal Of Gastroenterology 2007;42:1023-1030
- 156)** David Pres and Naveed satar. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. Clinical Science, 2008; 115:141-150
- 157)** Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular Basis and Mechanisms of Progression of Non-alcoholic Steatohepatitis. Trends Mol Med. 2008 Feb; 14(2): 72-81
- 158)** Hall P de la. Alcoholic liver disease. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, et al. ( eds ). Pathology of the Liver. London: Churchill Livingstone, 1994: 317-349
- 159 )** Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30:48-53
- 160 )** Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, et al. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. J Pediatr 1995;127:700-704
- 161 )** Powell EE, Cookslew WGE, Hanson R et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty two patients for up to 21 years. Hepatology, 1990; 11:74-80
- 162)** Nagore N, Scheuer PJ. The pathology of diabetic hepatitis. J Pathol 1988; 156:155-160
- 163)** Brut AD, Mutton A, Day C Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. Semin Diagn Pathol 1998; 15;246-258

**164)** Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, et al. Mitochondrial abnormalities in nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:430-434

**165)** Naga Chalasani, Laura Wilson, David E. Kleiner, Oscar W. Cummings, Elizabeth M. Brunt, Aynur Ünalp for the NASH Clinical Reserch Network. Relationship of Steatosis Grade and Zonal Location to Histological Features of Steatohepatitis in Adult Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Journal of Hepatology*, 2008; 48:829,834

**166)** Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 2467-2474

**167)** Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*, 1994; 107:1103-1109

**168)** George DK, Golwurm S, Macdonald GA, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*, 1998; 144:311-318

**169)** Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Ikura Y, Ueda M, Arakawa T, Hato F, Kawada N. Am Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *J Pathol.* 2007 Mar;170(3):967-980

**170)** Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, Matteoni CA, Boparai N, O'Neill R, et al. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 1999;30:847-50

**171)** J. Mathew, J. E. Hines K. Toole, S.J. Jahnsen, O.F.W James; A.D. Burt Quantitative analysis of macrophages and perisinusoidal cells in primary biliary cirrhosis *Histopathology* 1994, 25, 65-70

**172).** Urushihara N, Iwagaki H, Yagi T, Kohka H, Kobashi K, Morimoto Y, Yoshino T, Tanimoto T, Kurimoto M, Tanaka N. Elevation of serum Interleukin 18 Levels and Activation of Kupffer Cells in Biliary Atresia. *J. Pediatr Surg.* 2000 Mar; 35(3); 446-449

**173)** Chedid A, Arain S, Snyder A, Mathurin P, Capron F, Naveau S. The Immunology of Fibrogenesis in Alcoholic Liver Disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004, Vol. 128:11; 1230-1238

**174)** Park J.W, Jeong G, Kim S.J, Kyung M, Park S.M. Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: Comprehensive study of clinical and immunohistochemical finding in younger Asian patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007; 22: 491-497

**175)** Ramm G.A, Nair V.G, Bridle K.R, Shepherd R.V, Crawford D.H.G; Contribution of Hepatic Parenchymal and Nonparenchymal Cells to Hepatic Fibrogenesis in Biliary Atresia; American Journal of Pathology, Vol 153, No.2, August 1998; 527-535

**176)** Jaskiewicz K, Rzepko R, Sledzinski Z. Fibrogenesis in Fatty Liver Associated with Obesity and Diabetes Mellitus Tip2 , Dig. Dis. Sci. 2008; 53; 785-788