

T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA
DEMİR, HEPİDİN VE SİTOKİN DÜZEYLERİNİN
İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. SEMA UYSAL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FERAH ARMUTCU

**Bu uzmanlık tezi Fatih Üniversitesi tarafından P23011002_1 proje
numarası ile desteklenmiştir.**

Ankara-2011

ÖNSÖZ

Biyokimya uzmanlık eğitiminde, eğitimime katkıda bulunan başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU'na, desteğini her zaman hissettiğim tez danışmanı hocam Prof. Dr. Ferah ARMUTCU'ya, Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin ERDAMAR ve diğer öğretim görevlilerine, beraber uyum içinde çalıştığım asistan arkadaşım Dr. Abdullah AYYILDIZ'a, yüksek lisans öğrencisi Rukiye HASGÜL'e ve laboratuvar çalışanlarına, asistanlık eğitimim boyunca her türlü maddi manevi yardımını esirgemeyen eşime ve biricik kızıma teşekkür ederim.

Dr. Sema Uysal

2011

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	: ii
İÇİNDEKİLER	: iii-iv
ŞEKİL ve GRAFİKLER	: v
TABLolar	: vi
KISALTMALAR	: vii
1. GİRİŞ	: 1-3
2. GENEL BİLGİLER	: 4-26
2.1. Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	: 4-16
2.1.1. Tanımlama ve Önemi	: 4
2.1.2. Epidemiyoloji	: 5-6
2.1.3. Etyoloji	: 6
2.1.4. Patogenetik mekanizmalar	: 6-11
2.1.5. Klinik özellikler	: 11-12
2.1.6. Tanı	: 12-14
2.1.7. Histolojik özellikler	: 15
2.1.8. Doğal seyir	: 15
2.1.9. Tedavi	: 16-17
2.2. Demir metabolizması	: 17-19
2.3. sTfR	: 19-20
2.4. Hepsidin	: 21-24
2.4.1. Hepsidinin keşfi	: 21
2.4.2. Hepsidinin yapısı	: 21

2.4.3. Hepsidinin sentezi	: 22
2.4.4. Hepsidinin demir düzenleyici etkisi	: 22-23
2.4.5. Hepsidin sentezinin düzenlenmesi	: 24
2.5. İNFLAMATUAR SİTOKİNLER	: 24-27
2. 5. 1. TNF-alfa	: 25-26
2. 5. 2. IL-6	: 26-27
2. 5. 3. IL-8	: 27
3. MATERYAL ve METOD	: 28-33
3.1. Deney ve Kontrol Grupları	: 28
3.2. Kullanılan gereçler	: 29
3.3. Yöntemler	: 29-33
3.3.1. Hepsidin ölçümü	: 29-30
3.3.2. sTfr ölçümü	: 30-31
3.3.3. IL-8 ölçümü	: 31
3.3.4. TNF-alfa ölçümü	: 31-32
3.3.5. IL-6 ölçümü	: 32
3.3.6. Diğer biyokimyasal parametrelerin tayini	: 32-33
3.4. İstatistiksel Analiz	: 33
4. BULGULAR	: 34-43
5. TARTIŞMA	: 44-52
6. SONUÇLAR	: 53
7. ÖZET	: 54-55
8. SUMMARY	: 56
9. KAYNAKLAR	: 57-64

ŞEKİL ve GRAFİKLER:

Şekil 1: NASH'ta serbest yağ asidi metabolizması

Şekil 2: NAYKH tanı basamakları

Şekil-3: Plazmaya demir akışında hepsidin-ferroportin etkileşimi

Şekil-4: TNF- α düzeyinin NAYKH'nı belirlemedeki etkinliğinin ROC eğrisi ile değerlendirilmesi

Şekil-5: IL-6 düzeyinin NAYKH'nı belirlemedeki etkinliğinin ROC eğrisi ile değerlendirilmesi

Grafik 1: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun ALT düzeyleri

Grafik-2: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun ferritin düzeyleri

Grafik-3: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun sTfR düzeyleri

Grafik-4: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun IL-8 düzeyleri

Grafik-5: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun TNF- α düzeyleri

Grafik-6: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun IL-6 düzeyleri

TABLolar:

Tablo 1: TNF'nin NAYKH'daki patofizyolojik rolünü destekleyen bulgular

Tablo 2: Grupların demografik özellikleri

Tablo 3: Grupların ALT düzeyleri ve demir parametreleri

Tablo 4: Gruplara ait inflamatuvar sitokinler

Tablo 5: Hepatosteatoz derecesine göre grupların karşılaştırılması

KISALTMALAR:

NAYKH	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Non-alkolik steatohepatit
TG	: Trigliserid
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
SYA	: Serbest yağ asidi
ROT	: Reaktif oksijen türleri
4-HNE	: 4-hidroksinonenal
SREBP-1c	: Sterol regülatuar bağlanma proteini-1c
HDK	: Hepatik demir konsantrasyonu
HOMA	: Homeostasis Model Assessment
SAMe	: S-adenozilmetiyonin
UDCA	: Ursodeoksikolik asit
DBK	: Demir bağlama kapasitesi
TfR	: Transferin reseptörü
sTfR	: Soluble transferin reseptörü
DMT1	: Divalent metal transporter 1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TGF-β	: Transforming growth faktör beta
LEAP-1	: Liver-expressed antimicrobial peptide
EDRF	: Endotel kaynaklı damar genişletici faktör
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PGI2	: Prostasiklin
USG	: Ultrasonografi
IR-HIO	: İnsülin direnci-ilişkili hepatik demir yüklenmesi
DHIO	: Dismetabolik hepatik demir yüklenmesi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAYKH), görülme sıklığı giderek artan, siroz ve karaciğer yetmezliğine ilerleyebilen klinik ve patolojik bir durumdur. NAYKH, alkol almayan kişilerde alkole bağlı karaciğer hastalığının histolojik özelliklerinin gözlemlendiği bir karaciğer hastalığıdır. Hastalık, basit yağlanmadan nonalkolik steatohepatite, siroz ve hepatosellüler karsinoma kadar geniş bir klinik spektruma sahiptir. Basit yağlı karaciğerden (steatoz) oluşan hafif form ile inflamasyon ve hepatosit hasarının da bulunduğu ‘non-alkolik steatohepatit’ (NASH) şeklinde iki tablodan oluşur. NASH terimi ilk kez 1980 yılında tanımlanmış olup, NAYKH olgularının yaklaşık %10-15’i NASH’tir. Basit steatoz ve NASH tablolarının prognozları farklıdır. Basit steatoz iyi seyirli bir durum iken NASH hastalarının %20-30’unda ilerleyici tipte fibrozis ve siroz gelişme riski olduğundan iki tablonun ayırt edilmesi oldukça önemlidir.

NAYKH’nın patogenezi halen çok iyi bilinmemektedir. Bununla beraber mevcut çalışmalar patogeneziyle ilgili olarak tartışılmakta olan ‘iki darbe teorisi’ni ortaya atmaktadır. Steatozun birinci darbe döneminde trigliseridlerin (TG) yıkımıyla oluşan serbest yağ asitlerinin karaciğerde aşırı artışı ile ilk lezyonların meydana geldiği; ve bu başlangıç lezyonlarının karaciğeri oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , TGF- β , IL-6 ve IL-8 gibi) neden olduğu ikinci darbeye karşı savunmasız hale getirdiği ileri sürülmektedir. Bu durum, hepatositlerde inflamasyon ve fibrozisin oluşmasına ve sonuç olarak hepatik steatozun steatohepatite dönüşmesine neden olmaktadır.

‘İki darbe teorisi’ nin ‘ilk darbe’ sinden sorumlu olan hiperinsülinemi ve insülin direncidir. Obezite, tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve metabolik sendromun bir özelliği de insüline karşı direnç gelişimidir. Adipositlerdeki insülin duyarsızlığı adipöz dokuda lipaz regülasyonunu inhibe ettiğinden serbest kalan çok fazla miktarda yağ asiti, karaciğerde steatoza neden olan temel mekanizmadır.

İnsülin rezistansı metabolik sendromun anahtar komponentlerinden olup, obezite, metabolik sendrom ve NAYKH arasındaki ilişkiyi destekleyen bulgular oldukça fazladır. NAYKH’nın metabolik sendromun hepatik yansıması olduğu düşünülmekte olup, artık ‘birinci darbeden’ yaygın olarak insülin rezistansı sorumlu tutulmaktadır. Son zamanlarda NASH gelişiminde dikkatler ‘ikinci darbenin’ olası adaylarına çevrilmiştir. Oksidatif stres bu adayların en dikkat çekicilerinden olup, oksidatif stresi indükleyen olası faktörlerden birisi de aşırı intrahepatik demir varlığıdır. Bir geçiş metali olarak lipid peroksidasyonunu kolaylaştıran demir; malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi peroksidasyon yıkım ürünlerini oluşturmaktadır. Bu ürünlerin karaciğerdeki başlıca profibrojenik hücre tipi olan hepatik stellat hücrelerinin aktivatörü olduğu bilinmektedir. Demir azalmasının insülin duyarlılığını düzelttiği gösterilmiş olup, aşırı demir yükünün insülin direnci gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Demir, insülin direnci aracılığıyla birinci darbede önemli bir kofaktör olmasına rağmen sonraki darbede de büyük rol oynar. Steatozlu karaciğerde fazla miktardaki serbest yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu üretilen hidrojen peroksit, serbest demir varlığında yüksek reaktif özelliği olan hidroksil radikallerine dönüşür.

İnsanlarda demir yüklenmesi durumlarında demir atılımını artıran bir yol bulunmadığı için, demir metabolizması ve emilimi sıkı bir kontrole tabidir.

Hepatositler tarafından üretilen hepsidin, demir metabolizmasını kontrol eden bir hormondur. Hepsidin, diyetle alınan demirin duodenumdan emilimini, geri dönüştürülmüş demirin makrofajlardan salınımını ve hepatositlerden depo demirinin serbest bırakılmasını engelleyerek plazmaya demir girişini negatif olarak düzenler. Hepsidin üretimi de demir tarafından regüle edilir. Demir miktarı çok fazla olduğunda demir emiliminin ve depolardan demir salınımının sınırlanması için daha çok hepsidin üretilir. Demir eksikliğinde ise daha fazla demirin plazmaya girmesi için hepsidin üretimi azalır ya da hiç üretilmez. Yapılan çalışmalarda demir yüklenmesi olan NAYKH hastalarında hepsidin mRNA ekspresyonu ve serum TNF- α düzeyi yüksek bulunmuş, flebotomi tedavisinin bu hastalarda serum ferritin, transferin saturasyonu ve TNF- α düzeylerini düşürdüğü ve karaciğer fonksiyon testlerini düzelttiği gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasıyla; oksidatif strese olan katkılarını da göz önüne aldığımızda gerek demir metabolizmasının gerekse inflamasyon sürecinin NAYKH patogenezindeki etkilerini incelemeyi ve bununla ilişkili olarak tanıya katkı yapacak bazı laboratuvar testlerini araştırmayı planladık. Bu açıdan: *i* NAYKH tespit edilen hastalarda serum demiri, DBK, sTfR, ferritin ve hepsidin gibi demir metabolizması parametreleri ile TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi bazı inflamatuvar sitokin düzeylerini ölçerek sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırmak ve *ii*; NAYKH teşhisinde kullanılan bir diğer yöntem olan ultrasonografi sonuçlarına göre belirlenen NAYKH derecesi ile bu parametreler arasında bir ilişki bulunup bulunmadığını araştırmak bu çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI:

2. 1. 1. Tanımlama ve Önemi:

NAYKH, önemli miktarda alkol tüketmeyen kişilerde (erkekler için haftada 140 g etanol, kadınlar için haftada 70 g etanol) (1), hepatositlerin en az %5'inde lipid damlacıklarının görüldüğü karaciğerde aşırı yağ birikimi olarak tanımlanır (2).

Karaciğer yağlanmasında hepatositlerde morfolojik olarak makroveziküler veya mikroveziküler intrasitoplazmik yağ damlacıkları gözlenebilir. Makroveziküler yağlanmada, hepatosit sitoplazmasını dolduran ve nükleusu periferite iten tek büyük bir yağ vakuolü vardır. Mikroveziküler yağlanmada ise hepatosit sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacıkları bulunur ve nükleus periferite itilmez (3).

NAYKH, basit yağlanma ve steatohepatit (NASH) içeren geniş histolojik spektruma sahip klinik ve patolojik bir durumdur. NASH terimi 1980 yılında ilk kez Ludwig tarafından tanımlanmıştır (4). NAYKH'nın sadece basit yağlanma görülen şekli benignidir. Fakat NASH, siroz ve hepatosellüler kansere ilerleme riskine sahiptir. Steatohepatitin özellikleri arasında hepatosellüler hasar (balonlaşma, apoptozis/nekroz, Mallory cisimcikleri, dev mitokondri), inflamasyon ve fibrozis (presinüzoidal, perisellüler) bulunmaktadır (5).

NAYKH, alta yatan nedene göre primer ve sekonder olarak sınıflandırılabilir. Primer NAYKH insülin rezistansı ve metabolik sendrom ile ilişkilidir. NAYKH ile ilişkili diğer durumlar arasında total parenteral nutrisyon, akut açlık, abdominal cerrahi

girişim, bazı ilaçların kullanımı (amiodaron, glukokortikoid, sentetik östrojenler, diltiazem, aspirin ve metotreksat gibi) sayılabilir (6).

2. 1. 2. Epidemiyoloji:

NAYKH, farklı ülkelerde genel nüfusun %10-24'ünü etkilemektedir. Hastalığın prevalansı obez kişilerde %58-74'e kadar çıkabilmektedir (7). Asemptomatik aminotransferaz yüksekliği durumunda diğer nedenler ekarte edildiğinde NAYKH %42-90 vakada tespit edilmiştir (8). NAYKH çocuklarda %2.6 oranında (9) görülmekle beraber bu rakam obez çocuklarda %23-53'e kadar çıkmaktadır (10).

Obezite, tip 2 diabetes mellitus ve hiperlipidemi, tek başına veya kombine halde NAYKH ile sıklıkla ilişkili bulunan durumlardır (11). Obezite derecesi ile NAYKH prevalansı ve şiddeti arasında doğrudan ilişki mevcut olup obez insanlarda NAYKH prevalansı 4.6 kat artmıştır (7).

Basit steatozlu hastalarda siroz gelişme oranı %1.5 ve karaciğere bağlı ölüm oranı %1 olduğu için nispeten iyi prognoza sahip (12) ise de steatohepatitli hastaların %15'inde fibrozis, %3'ünde son dönem karaciğer yetmezliği gelişmektedir (13). NAYKH'na hepatosellüler karsinom (HCC) vakalarında da rastlanmaktadır; yapılan bir çalışmada HCC vakalarının en az %13'ünü NAYKH hastalarının oluşturduğu gösterilmiştir (14).

Dünya Sağlık Örgütü en az 2 milyon insanda hepatik steatozdan dolayı siroz gelişeceğini tahmin etmektedir. NAYKH karaciğer transplantasyonu endikasyonları arasında üçüncü sıradadır ancak gelecek yıllarda en önemli endikasyon olacağı düşünülmektedir (15). Bu açıdan obez çocuklarda NASH tespit edilmesi çok endişe

vericidir (16). Pediatri, iç hastalıkları, gastroenteroloji ve hepatoloji eğitimlerinde portal hipertansiyon komplikasyonlarından korunmak, karaciğer transplantasyonu ihtiyacını minimize etmek ve ilgili kardiyovasküler hastalıkları engellemek için bu konu vurgulanmalıdır (15).

2. 1. 3. Etyoloji:

Obezite, hiperglisemi, tip 2 DM ve hipertrigliseridemi en iyi bilinen risk faktörleridir (17, 18). NASH ile santral obezite (visseral obezite) arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Obez olmayan NAYKH hastalarının çoğunda santral obezite tespit edilmiştir. Santral obezite insülin rezistansı ve metabolik sendrom ile güçlü bir korelasyon gösterir (19, 20).

Hipertrigliseridemi, uzun süreli total parenteral nutrisyon, obezite için uygulanan cerrahi girişimler, geniş bağırsak rezeksiyonları, uzun süreli açlık sonrası hızlı kilo kaybı, jejunoileal by-pass, amiodaron, stilbestrol, tamoksifen, kortikosteroid, metotreksat, kalsiyum kanal blokörlerinden nifedipin ve diltiazem gibi ilaçların kullanımı NASH'a neden olabilmektedir (21).

2. 1. 4. Patogenetik mekanizmalar:

Bugüne kadar NAYKH'nın patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. NAYKH, insülin rezistansına bağlı metabolik bozukluğun klinik yansıması olarak düşünülmektedir (13). Genel nüfusun yaklaşık %25'inde görülen insülin rezistansı hiperinsülinemi, bozulmuş glukoz toleransı, tip 2 diabetes mellitus, hipertrigliseridemi, düşük HDL seviyesi, hipertansiyon, bozulmuş fibrinolizis, artmış visseral yağ birikimi, hiperürisemi, polikistik over sendromu ve diğer lipid bozuklukları ile ilişkilidir. Bu

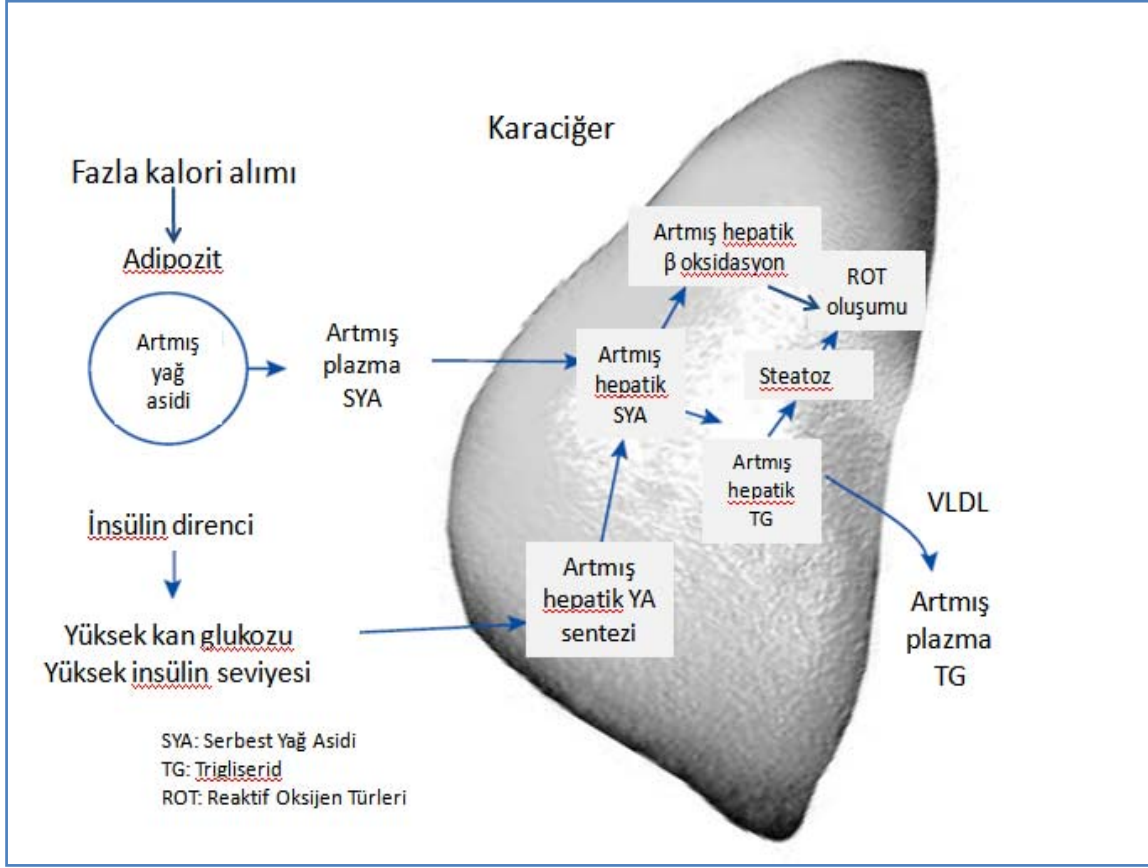
semptomların, özellikle hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve bozulmuş glukoz toleransının görüldüğü durum metabolik sendrom olarak adlandırılır (22).

Normalde ihtiyacımızdan fazla miktarda alınan karbonhidratlar yağ asitlerine çevrilir. Bu yağ asitleri adipöz dokuda trigliseridlere dönüştürülerek depolanır, karaciğere taşınır ya da kas dokusunda enerji kaynağı olarak kullanılır. Açlık dönemlerinde yağ dokusunda depolanan trigliseridler yağ asitlerine yıkılarak karaciğere taşınır; fosfolipid ve kolesterol esterlerinin yapımında kullanılırlar. Yağ asitlerinin bir kısmı da ekstrahepatik dokularda enerji kaynağı olarak kullanılan keton cisimlerine dönüştürülür. Periferal yağ dokusundan serbest yağ asidi salınımında artış, karaciğerde de novo serbest yağ asidi sentezinde artış, yağ asitlerinin karaciğerden düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) olarak salınımında azalma sonucu karaciğerde yağ birikimi olur (21).

İnsülin rezistansının hepatik trigliserid oluşumunu yöneterek karaciğere serbest yağ asidi akışını artırmada önemli rolü olduğu açıkça bilinmektedir. Hiperinsülinemi ve hiperglisemi 'sterol regülatuar bağlanma proteini-1c' (SREBP-1c) ve 'karbohidrat yanıt elemanı bağlanma proteini' gibi lipojenik transkripsiyon faktörlerinin up-regülasyonu ile de novo lipogenezi ilerletir. Ayrıca insülin aracılı SREBP-1c aktivasyonu serbest yağ asidi (SYA) oksidasyonunu inhibe eden malonil-CoA artışına ve hepatik TG birikimine neden olur (23).

Hepatik lipid birikimi her zaman hepatosellüler hasar ile sonuçlanmayabilir, sekonder değişikliklerin ilave olması önemlidir. Artmış hepatik SYA oksidasyonu oksijen radikallerinin oluşumuna, takiben lipid peroksidasyonu, sitokin indüksiyonu ve mitokondrial disfonksiyon gelişimine yol açar. SYA, hepatosit apoptozisine neden

olarak NAYKH hastalarında hücrel hasar mekanizmaları arasında yer almaktadır (12).



Şekil 1: NASH'ta serbest yağ asidi metabolizması ⁽²⁴⁾

Günümüzde NASH patogenezinde 'çift darbe teorisi' kabul görmektedir. Bu teoriye göre 'birinci darbe' olan steatoz oluşumunda tip 2 diyabet ve obezitede sıklıkla görülen insülin direnci sorumlu tutulmaktadır. İnsülin direnci hiperinsülinemiye neden olarak hormona duyarlı lipoprotein lipazı uyarır ve periferel dokularda lipolizi artırır. Artan yağ asidi miktarına bağlı olarak karaciğere yağ asidi alımı artar. Hiperinsülinemi yağ asitlerinin karaciğerde beta oksidasyona uğramasını engelleyerek ve glikolizi uyararak lipid sentezini artırır. Buna ilaveten hiperinsülinemi karaciğerde yağ asitlerinin trigliseridlere esterleşmesini ve karaciğerden salınımını azaltır (21).

Karaciğerde steatoz gelişiminden sonra lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresin yol açtığı 'ikinci darbe' sonucunda inflamasyon, fibrozis ve siroz gelişebilir. Normal karaciğerde SYA'nin mitokondri metabolizması bir serbest radikal kaynağıdır; SYA'nin β oksidasyonu ile hidrojen peroksit üretilir (24).

Mitokondrial reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumu oksidize lipid birikimini ilerleterek daha fazla lipid peroksidasyonuna, mitokondriyal DNA hasarına, β oksidasyon inhibisyonuna ve hücre sel hasar siklusunun devamına yol açar. Bu siklus mitokondriyal hasar, pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı, Kupffer hücrelerinde hasar, antioksidan enzimlerin ve vitaminlerin sürekli tüketimini içerir (24).

Artmış ROT oluşumu karaciğerdeki lezyonların 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi reaktif ve biyolojik olarak aktif lipid peroksidasyon ürünleri ile Fas ligand, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), transforming growth factor beta (TGF- β), interlökin-8 (IL-8) gibi çeşitli sitokinleri üretmesine katkıda bulunur. Fas ligand ve TNF- α ile tetiklenen hepatosit apoptozisi NASH patogenezindeki hepatosit ölümünde çok önemli bir rol oynar (25).

Apoptotik cisimlerin Kupffer hücreleri ve stellat hücreler tarafından yutulması TGF- β oluşumunu arttırır. TGF- β , 4-HNE ve obez kişilerin büyük adipositlerinden salgılanan leptin, stellat hücrelerin kollajen üreten myofibroblastik hücrelere dönüşümünü aktive eder. TGF- β aynı zamanda sitokeratinler arasındaki çapraz bağları oluşturan doku transglutaminaz enzimini aktive ederek Mallory cisimciklerinin oluşumunda rol oynar. Sonuç olarak, TGF- β , IL-8 ve 4-HNE gibi insan nötrofilleri için kemoatraktan olan moleküller bu süreçte önemli role sahiptirler (26).

NASH hastalarının çoğunluğunda karaciğer demir birikiminin saptanması demirin de oksidatif stresi tetiklediğinin düşündürmektedir. Ferröz demirin hidrojen peroksit varlığında Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalleri ürettiği bilinmektedir (27). Demir lipid peroksidasyonunu ve yıkım ürünleri olan malondialdehit ile 4-HNE oluşumunu kolaylaştırarak karaciğerde hepatik stellat hücreleri profibrojenik hücre tipine dönüştürmektedir (28).

Bu mekanizma primer demir yüklenme durumu olan herediter hemokromatozis ve sekonder demir yüklenme bozukluğu olan talasemi gibi hastalıklarda araştırılmıştır. Demir uzaklaştırma tedavilerinin (flebotomi ve demir şelatörleri) olumlu sonuç vermesi bu hastalıklarda demir ile indüklenen karaciğer hasarı hipotezini desteklemektedir. Bu nedenle, NASH'ta hepatik demir konsantrasyonu artışı gösterildiğinde benzer bir patojenik bağlantı kurularak NASH'ta demir uzaklaştırma tedavi yaklaşımının yararından söz edilmektedir (29).

Bu fikirleri temel alarak NASH'ta hepatik demir içeriğinin gerçekten artıp artmadığı sorusuna dönmemiz gerekir. Önceki bilgilere göre NASH hastalarında artmış serum demir parametrelerinin (serum ferritin veya transferrin satürasyonu) yüksek prevalans gösterdiği belirtilmiştir, fakat şu anda bunun patojenik bir anlamının olmadığı anlaşılmıştır (30). George ve arkadaşları (31), ilk kez NASH'ta demir ilişkili karaciğer hasarı hipotezini öne sürmüşler, hepatik demir artışının hepatik fibrozis şiddeti ile korele olduğunu bulmuşlardır.

Angulo ve arkadaşlarının (32), yaptığı bir çalışmada tüm NASH hastalarında anormal serum belirteçleri (%53 yüksek serum ferritini, %11 yüksek transferrin satürasyonu) olmasına rağmen hepatik demir konsantrasyonu (HDK) ve hepatik demir

indeksi normal bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise Younussi ve arkadaşları (33), HDK ile fibrozis derecesi arasında herhangi bir korelasyon olmadığını bulmuşlardır. Gerçekten bu çalışmalarda hastaların çoğu yüksek HDK'na sahip değildirler. Ayrıca siroz hastaları düşük hepatik fibrozis derecesine sahip hastalara göre daha düşük HDK'na sahiptirler. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada (34), NASH hastalarının çoğunluğunda (%90) hepatik demir artışı bulunamamıştır. Bu tutarsız sonuçların açıklaması, yanlış örneklem ve çalışma popülasyonunda muhtemel etnik farklılıklar olmasıdır. Şu anki verilerin doğrultusunda NASH hastalarında hiperferritinemi hepatik nekroinflamasyonun non-spesifik bir etkisi gibi durmaktadır (34).

Bu nedenle tahmin edildiği gibi NASH'ta serum demir belirteçleri (özellikle ferritin) artabilir fakat hepatik demir birikimi NASH'ın tipik bir özelliği değildir. Hepatik demir, hepatik fibrozisin bağımsız bir göstergesi değildir (29).

2.1.5. Klinik özellikler:

NASH hastalarının çoğunluğu sağ üst kadranda rahatsızlık hissi, yorgunluk, keyifsizlik dışında asemptomatik olup hepatomegali gözlenebilir (35). Aminotransferaz düzeylerinin yüksekliği (2-3 kat artış) yaygındır. AST/ALT oranınının 1'den büyük olması hastalık siroza ilerlemeden önce mevcut fibrozisi tahmin etmede yardımcıdır (30).

Hastaların %50'sinden azı yüksek alkalen fosfataz seviyelerine ve sadece %10-15'i yüksek serum direkt bilirubin düzeylerine sahiptir (35). Hipoalbuminemi, trombositopeni, yüksek bilirubin ve uzamış pıhtılaşma zamanı hastalığın ilerlediğine işaret etmektedir (18).

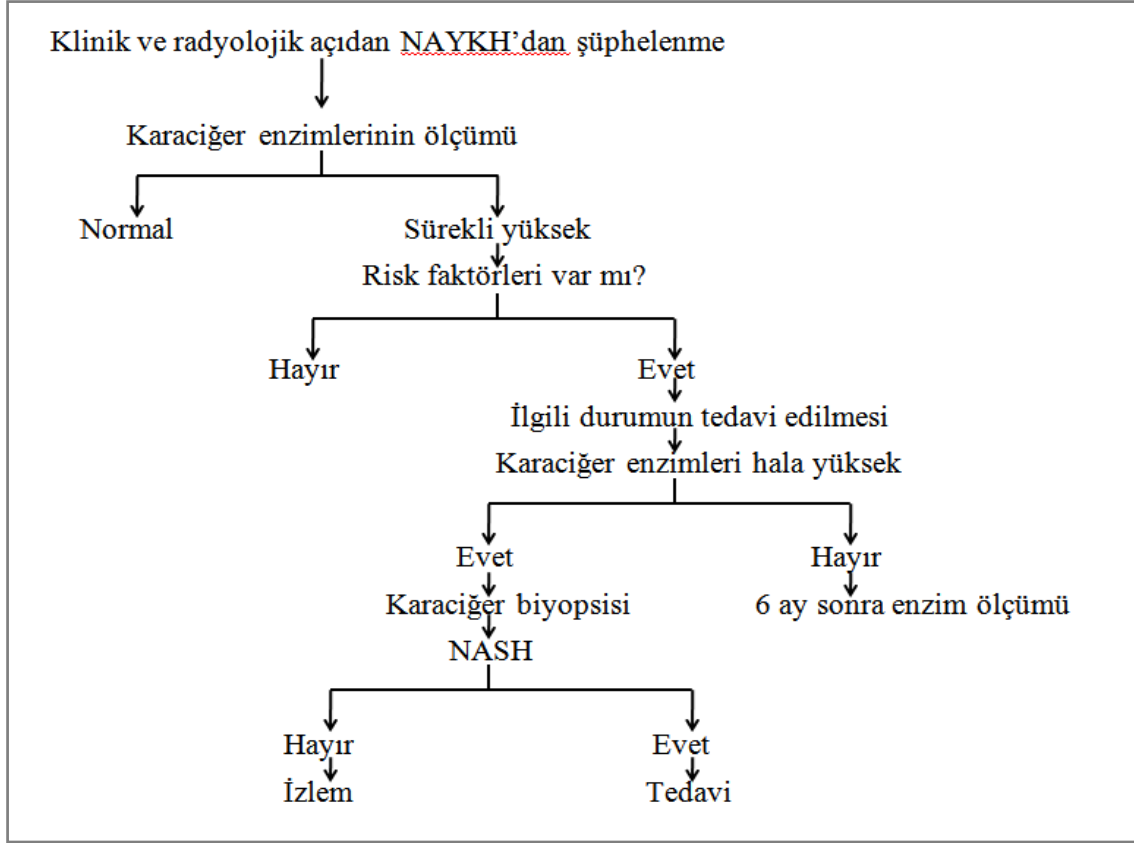
Yeni tanı almış NASH hastalarında fibrozis ve siroz görülme sıklığı az değildir. Hastaların ilk biyopsilerinde %66'sında fibrozis (18) ve %7-16'sında siroz tespit edilmiştir (36).

NASH, karaciğer biyopsisinde histopatolojik olarak alkol kullanımına bağlı hasara benzer özelliklere sahiptir. Makroveziküler steatoz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde balonlaşma ve nekroz NASH'ın başlıca histolojik özellikleridir (18, 36).

Bununla beraber hepatik demir fibrozis için artmış risk faktörü olarak gözükmemektedir (29). Yüksek ferritin hastaların yaklaşık %50'sinde bulunmaktadır. Yüksek ferritin düzeyleri her zaman artmış hepatik demir deposunu göstermez. NASH'ta genellikle hepatik demir düzeyleri normaldir. Yüksek ferritin ve transferin düzeyleri hepatik nekrozun sonucu olabilir (18).

2.1.6. Tanı:

NAYKH tanısı diğer karaciğer hastalıklarının dışlanması ile konur (Şekil 2).



Şekil 2: NAYKH tanı basamakları ⁽³⁷⁾

NAYKH tanısı için alkol tüketiminin özellikle dışlanması gerekir. Pek çok çalışmada fazla alkol tüketimini 20-40 g/gün olarak tanımlamaktadır (2). Son zamanlarda bu eşik erkekler için 20 g/gün altına, bayanlar için ise 10 g/gün altına çekilmiştir (37).

İnsülin direnci, NAYKH ve metabolik sendrom arasındaki yakın ilişkiden dolayı insülin rezistansı mutlaka ölçülmelidir. İnsülin direnci birçok yolla ölçülebilir. Serum açlık glukozu ve serum açlık insülini kullanılarak yapılan Homeostasis Model Assessment (HOMA) hesabı kolay bir metottur.

Serolojik testler hepatit B ve C'yi ekarte etmek için yapılmalıdır. Negatif sonucu olanlarda özellikle metabolik sendrom ve insülin rezistansının olduğu durumlarda

sürekli yüksek seyreden karaciğer enzimlerinden muhtemelen NAYKH sorumludur (37).

Radyografik değerlendirme NAYKH için bir başka non-invaziv tanı aracıdır. Ultrasonografi (USG) veya bilgisayarlı tomografinin hepatik steatoz tespiti için duyarlılığı %93-100 arasındadır (38).

Manyetik rezonans da dahil hiçbir görüntüleme yöntemi progresif olmayan basit steatoz ile NASH hastalığını birbirinden tam olarak ayırt edemez. Teknoloji ilerlediği için bazı teknikler bize ümit vermektedir. Kontrast ultrasonografi ve manyetik rezonans spektroskopi gelecekte kullanışlı hale gelebilir. Ultrasonografik elastografi (FibroScan) hepatit C hastalarında kullanılan karaciğer katılığını ölçen non-invaziv bir metoddur (37).

Karaciğer biyopsisi NASH tanısı için altın standarttır. NASH tanısı için minimum histolojik kriterler tartışmalı olmakla beraber çoğu patolog, en az %5 hepatik steatoz, mikst lobuler inflamasyon ve hepatosellüler balonlaşma istemektedir (37).

Biyopsi sırasında olası örnek alma hatası (dağılımın dağınık olması, etkilenmemiş alandan örnek alınması yanlış negatifliğe sebep olabilir) ve NAYKH'nın efektif bir tedavisinin olmaması nedeniyle bazı klinisyenler NASH şüphesi olan hastalarında karaciğer biyopsisinin değerinden kuşkulandırlar. Buna rağmen karaciğer biyopsisi NASH tanısını doğru tespit edebilen tek testtir. Biyopsi bize karaciğer hastalığının derece ve prognozu hakkında önemli bilgiler verir. Birçok uzman karaciğer biyopsisinin hastalığın ilerlemesine karşı önlem alma konusunda hastaların dikkatini çekmeye yardımcı olduğunda hemfikirdir (39).

2.1.7. Histolojik özellikler:

NAYKH'da hafiften ileri dereceye kadar zon 3 hepatositleri etkileyen makroveziküler steatoz görülür. İlerleyen dönemlerde steatoz kaybolabilir (21).

NASH tanısı koymak için hepatositlerde balonlaşma, mallory cisimcikleri veya subsinüzoidal fibrozis olmalıdır (40). Fibrozis presinüzoidal kısımda başlar, bazen portal fibrozis, portasantral fibroz bantlar ve siroza ilerleyebilir.

Fibrozis şu şekilde evrenir:

1. Evre; zon 3 presinüzoidal fibrozis
2. Evre; zon 3 presinüzoidal + portal fibrozis
3. Evre; zon 3 presinüzoidal + köprüleşen fibrozis
4. Evre; siroz (41).

2.1.8. Doğal seyir:

NAYKH tanısı alan hastalarda insülin rezistansının komplikasyonu olan vasküler hastalık ve NAYKH sirozu görülebildiği için genel popülasyona göre mortalite artmıştır (12).

Hepatositlerde balonlaşma, mallory cisimcikleri veya fibrozis olmadıkça NAYKH benign seyirlidir ve kendini sınırlar (21). Steatohepatitin eşlik etmediği steatozlu hastalar %1.5 siroz gelişme riski ve %1 karaciğerle ilişkili ölüm nedenine sahiptir. Kriptojenik sirozlu hastaların önemli bir oranı daha önceden tanı almamış NASH hastalarıdır. Sirotik-stage NASH, yaklaşık %13 oranında hepatosellüler karsinoma komplike olabilir. Ayrıca NAYKH varlığı hepatit C ve alkol gibi hepatotoksik ajanların yaptığı karaciğer hasarını arttırabilir (12).

2.1.9. Tedavi:

NASH için çeşitli tedavi metodları uygulanmasına rağmen bu konuda henüz bir fikir birliğine varılamamıştır. Tipik strateji diyabet ve hiperlipidemi gibi metabolik sendromun ayrı komponentlerini hedef alarak kilo kaybı ve egzersizle tedaviye başlamaktır (37).

a) Kilo kaybı:

Devamlı ve yavaş biçimde kilo vermenin NASH hastalarında histopatolojiyi ve karaciğer enzim seviyelerini düzelttiği gösterilmiştir. Egzersiz, visseral yağ dokusunu azaltmada ve kilo kaybının sürekliliğini sağlamada yardımcıdır. Hızlı kilo kaybı periferal yağ dokusundan karaciğere gelen yağ asitlerini arttırarak karaciğerde yağlanmaya ve NASH'a sebep olur (42).

Kilo vermenin bir faydası da yağ dokusunun kaybına bağlı olarak insülin direncinin azalmasıdır. Morbid obezite için obezite cerrahisi veya ilaçların kullanımına bağlı kilo kaybı, karaciğer enzim düzeylerinde ve karaciğer histolojik bulgularında düzelme ile korelasyon göstermektedir (43).

b) İlaç tedavisi:

NAYKH tedavisinde günümüzde halen Biguanidler (Metformin), Glitazonlar gibi insülin duyarlılığını arttırıcı ilaçlar, E vitamini, betain ve S-adenozilmetiyonin (SAdMet) gibi antioksidanlar ile Ursodeoksikolik asit (UDCA) ve lipid düşürücü ilaçlar kullanılmaktadır (37).

Ayrıca hepatik demir birikiminin karaciğerdeki oksidatif stresi ve fibrozisi arttırması NAYKH'da patogenetik bir faktör olarak düşünülmektedir. 8 ay boyunca

flebotomi uygulanan NAYKH hastalarında serum aminotransferaz seviyeleri anlamlı olarak düşmüş, insülin direnci de düzelmiştir (44).

2. 2. DEMİR METABOLİZMASI:

Demir, vücutta ferrik (Fe^{+3}) veya ferröz (Fe^{+2}) şeklindeki oksidasyon durumlarında bulunabilir. Demirin redoks aktivitesi, yani elektron değişimi bir açıdan yararlıdır, fakat diğer taraftan fazla demir varlığında oluşan serbest demir, oksidan etki göstererek serbest radikal oluşumuna yol açar. Antioksidanlar serbest oksijen radikallerini, özellikle hidroksil radikalini yeterince detoksifiye edemezler ise hücreler bu durumdan ileri derecede zarar görürler (Fenton ve Heber Weis reaksiyonları). Bu yüzden organizma demiri hiçbir zaman serbest bırakmamaya çalışır; demir ya transferinle taşınır ya da ferritin şeklinde karaciğerde depolanır (45).

Organizmada bulunan demirin %60-70'i hemoglobinde ve dolaşımdaki eritrositlerde, %10'u myoglobinde, sitokromlarda ve demir içeren enzimlerde bulunur. %20-30'luk kısmı ise başlıca karaciğer ve retiküloendotelyal sistem makrofajlarında depolanır. İnsanlarda demir düzeyleri, yaşlanan eritrositlerden (yaklaşık 20 mg/gün) ve diğer kaynaklardan geri dönüşüm ile kontrol altında tutulmaktadır. Demiri organizmadan atan fizyolojik bir mekanizma yoktur. Gastrointestinal epitelin dökülmesi ve kanama dışında demir kaybı olmaz. Günlük demir kaybı 1-2 mg kadardır ve modern diyetler insan vücudunun günlük demir ihtiyacından daha fazla demir içermektedirler. Fazlası toksik olan demirin sistemik dengesi emilim kontrolü ile sağlanmaktadır (45).

Demirin emilim mekanizması çok iyi bilinmemektedir. Demirin neredeyse tamamı duodenumun proksimal kısmından emilir. Diyetle alınan inorganik demirin çoğu ferrik (Fe^{+3}) formdadır, enterositler tarafından emilmesi için ferröz (Fe^{+2}) hale indirgenmelidir. Bu olay fırçamsı kenar epitelinde bulunan askorbat bağımlı demir redüktaz enzimi ile meydana gelir. Oluşan ferröz demir divalent katyon taşıyıcı 1 (Divalent metal transporter 1, DMT1) aracılığıyla fırçamsı kenar membrandan enterosit içine alınır. Demirin enterositin bazolateral tarafından hücre dışına transferi ferroportin aracılığı ile olur (46, 47). Bakır içeren, seruloplazmin homologu hephaestin, enterositleri terk eden ferröz demiri ferrik demire oksitler (46). Enterositler tarafından emilen demir ya ferritin şeklinde depo edilir, ya enterositin yaşlanıp dökülmesi ile feçese atılır ya da plazmaya gönderilir. Portal dolaşımında demir transferine bağlanır. Transferrinin Fe^{+3} 'e afinitesi yüksektir, demiri hızlıca bağlar (47).

Transferrinin demir metabolizmasındaki rolü çok önemlidir. Demire nerede ihtiyaç varsa transferrin demiri oraya taşır. Hücrelerin büyük bir kısmı demiri plazmadan transferrin aracılığı ile alır (46, 48). Normalde transferrinin demirle saturasyonu %30 orandadır. Transferrinin demir bağlama kapasitesi tamamen dolduğu zaman plazmada transferrine bağlı olmayan serbest demir oluşur. Bu serbest demir karaciğer ve kalp hücrelerine girerek hücre hasar meydana getirebilir.

Transferrinle taşınan demirin çok az bir kısmı hepatositlere girer. Hepatositlere transferrinle gelen demir dışında; haptoglobüline bağımlı hemoglobin, hemopeksine bağımlı hem ve kısmen dolaşımdaki ferritine bağlı olan demir gibi farklı şekillerde demir girişi olur. Transferrin molekülü öncelikle kemik iliğine giderek eritroblast yüzeyinde reseptörle birleştiğinde demir ayrılır ve hücre içine girer. Mitokondride

protoporfirin halkasına bağlanarak hem oluşur. Hem molekülü hemoglobin yapımında kullanılır. Hem dışında demir apoferritinle birleşerek ferritin şeklinde depolanır (49).

2. 4. SOLUBLE TRANSFERRİN RESEPTÖRÜ (sTfR):

Plazmada demir transportuyla görevli olan transferrin kendi spesifik reseptörü ile etkileşerek demiri hücrelere verir. Transferrin reseptörü (TfR) 760 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. 190 kDa büyüklüğünde bir molekül olan fonksiyonel reseptör, disülfid köprüsü ile birleşen iki monomerdendir oluşur. Olgun eritrositlerin haricindeki bütün hücreler yüzeylerinde TfR taşırlar. Fakat bu reseptörler büyük miktarda eritrosit prekürsörleri, plasenta ve karaciğerde bulunurlar. Normal bir yetişkinde TfR'nin yaklaşık %80'i kemik iliğindedir. Prolifere olan hücrelerdeki reseptör yoğunluğu, demir kullanımıyla ilişkilidir. Demir kaybı sonucunda TfR sentezi indüklenir ve aşırı demir varlığında TfR miktarı azaltılır (50).

TfR'nin dolaşımdaki formu insan ve hayvan serumlarında tespit edilmiştir. Serumdaki soluble TfR (sTfR), doku reseptörünün monomerinden 100 aa kesilmesi ile meydana gelir (51). sTfR çoğunlukla ekzositoz öncesi multiveziküler cisimlerin içerisindeki eksozomların yüzeyinde, membran ilişkili bir serin proteaz aracılı proteolizle oluşur (52). Serum sTfR ölçümü hücresel TfR kütlesi ile orantılıdır (53).

sTfR düzeyleri eritropoietik aktiviteyi gösteren önemli bir belirteçtir (54, 55). Hipertransfüzyon, kronik böbrek yetmezliği, şiddetli aplastik anemi veya yoğun kemoterapi sonrası gibi eritroid hipoplazi ile karakterize olan durumlarda sTfR seviyeleri azaldığı gösterilmiştir (56). Konjenital diseritropoietik anemi, hemolitik anemi, herediter sferositoz, orak hücreli anemi, talasemi major ve intermedia,

megaloblastik anemi ya da sekonder polistemi gibi eritropoezin uyarıldığı durumlarda sTfR düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Eritropoezin hiç olmadığı durumlarda sTfR düzeyinin minimum değeri yaklaşık 0.5 mg/l, ciddi anemik talasemi hastalarında ise sTfR düzeyi 100 mg/l civarında bulunmuştur (55).

Demir durumu da serum sTfR düzeyini etkileyen başka bir faktördür (55). Transferrin saturasyonunun yüksek olduğu kişilerde (57, 58), genetik hemokromatozis hastalarında ve demir yüklenmesi olan Afrikalılarda (59) sTfR düzeyleri sağlıklı kişilere göre ortalama %20 düşük bulunmuştur. Demir eksikliği sTfR düzeyi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir (60).

Skikne ve arkadaşları (61), sTfR'nin demir durumu belirteci olarak kullanımının klinik yararlarını inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Sağlıklı gönüllülere düzenli flebotomi uygulandığı zaman ferritin progresif olarak düşerken sTfR düzeyinde fazla bir değişim gözlenmemiştir. Bununla beraber, demir eksikliği ve anemi geliştiği zaman sTfR anlamlı olarak artmıştır. Demir depolarını gösteren bir belirteç olan serum ferritini, fonksiyonel doku demir eksikliğinin göstergesi olan sTfR ve gelişmiş demir eksikliği belirleyicisi olan hemoglobin ile demir durumu tamamen değerlendirilebilir. Serum sTfR ve ferritin ölçümleri arasında iki taraflı bir ilişki olduğu için sTfR/ferritin oranı vücut demirinin değerlendirilmesinde kullanılabilir (61).

sTfR düzeyleri kronik hastalık anemisinde, akut enfeksiyonda ve kronik karaciğer hastalığında artış göstermez ve bu hastalıkları demir eksikliği anemisinden ayırmada yardımcı olur (62). Bunun yanında akut inflamasyonda sTfR seviyeleri geçici olarak düşebilir (54).

2. 3. HEPSİDİN:

2. 3. 1. Hepsidin Keşfi:

2001 yılında Park ve arkadaşları (63), idrarda karaciğer kaynaklı ve in vitro ortamda antibakteriyel etkiye sahip peptid yapıda bir madde keşfetmiş ve bunu 'hepsidin' (hepatik bakterisidal protein) olarak isimlendirmişlerdir. Krause ve arkadaşları, 2000 yılında hepsidin proteinini plazma ultrafiltratından izole etmiş ve LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) olarak adlandırmıştır (64). Antimikrobiyal özelliği ile keşfedilen hepsidin molekülünün demir metabolizmasındaki rolü ise diyetle demir yüklenen farelerin karaciğer hepsidin mRNA'sında aşırı ekspresyon tespit edilmesiyle dikkat çekmiştir (65).

2. 3. 2. Hepsidin yapısı:

Hepsidin yapı olarak dört disülfid bağı bir arada tutarak U şeklindeki bir eğriye benzer. Disülfid bağlanması son zamanlarda değişmiş durumdadır. Yeni modele göre iki bağ antiparalel β tabakasıyla stabilize edilir. Son bilgilerimize göre hepsidin kendi reseptörüne bağlanmak için bu disülfid bağlarından birine ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca yapı-fonksiyon çalışmaları hepsidin N-terminal bölgesinin demir regülasyonunda önemli role sahip olduğunu öne sürmektedir. Hepsidin amfipatik yapısı ve disülfid bağından zengin olması antimikrobiyal ve antifungal peptidlerin yaygın karakteristik özelliğidir. Bununla beraber hepsidin in vitro ortamda çok yüksek konsantrasyonlarda (10-30 μ M) ılımlı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (66).

2. 3. 3. Hepsidin sentezi:

Hepsidin hormonu, demir emilimi ve dokulara dağılımında başlıca regülatör olan 25 aminoasitten (aa) oluşan bir peptiddir. Başlıca hepatositlerden sentezlenen hepsidin makrofajlar, adipositler ve beyin hücrelerinde de az miktarda eksprese olur (66).

19q13.1 kromozomunda bulunan insan hepsidin geni (HAMP; OMIM 606464) hepsidini 84 aa'lık prepropeptid olarak kodlar. Bu öncül hormon enzimatik reaksiyonla endoplazmik retikulum lümenine 64 aa'lık prohepsidin molekülü olarak aktarılır. Posttranslasyonel modifikasyonla 39 aa'lık peptid ayrılmasıyla 25 aa'lık biyolojik olarak aktif olan hepsidin-25 meydana gelir (67, 68).

2. 3. 4. Hepsidin demir düzenleyici işlevi:

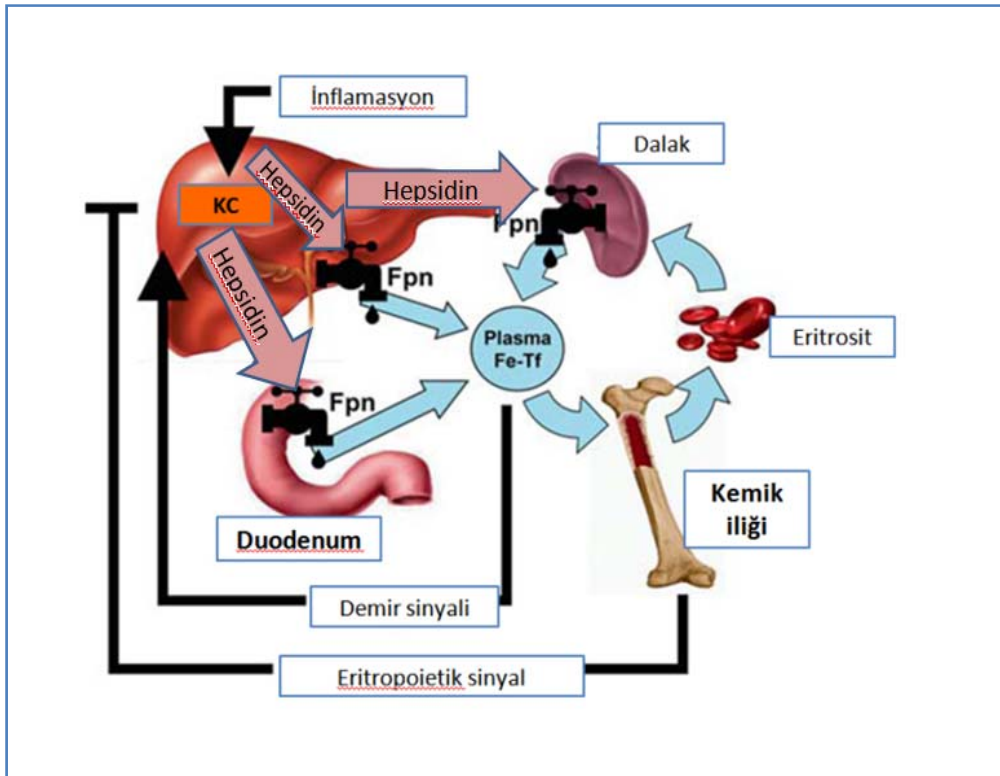
Hepsidin plazma demir konsantrasyonunun ana düzenleyicisidir. Hepsidin insanlarda ve farelerde kronik olarak aşırı eksprese olması hipokrom mikrositer özellikte demir eksikliği anemisine yol açar. Aksine insan ve farelerde hepsidin eksikliği karaciğerde aşırı demir birikimiyle sonuçlanır. Hepsidin tamamen yokluğu durumunda herediter hemakromatozisin en çok görülen ve ciddi seyreden formu olan juvenil hemakromatozise neden olur (66).

Hepsidin reseptörü olan ferroportin aracılığıyla plazma ve ekstrasellüler sıvıya demir transportunu kontrol eder (Şekil 3). Ferroportin vücutta demir metabolizmasında rol alan hücrelerde eksprese olur. Bu hücreler; diyet demirini absorbe eden enterositler, karaciğerde bulunan makrofajlar, yaşlı eritrositlerin tekrar dolaşıma

katılmasını sağlayan dalak makrofajları, karaciğerde demir depolayan hücreler ve gebelikte fetüse demir taşıyan plasental trofoblastlardır (69).

Ferroportin demirin hücreden atılımını sağlayan transmembran yerleşimli bir proteindir. Nemeth ve arkadaşları (70), hepsidin direkt olarak ferroportine bağlanmasıyla ferroportinin internalize olup yıkıldığını ve ferroportin kaybının hücresel demir atılımını sonlandırdığını göstermişlerdir.

Demir depoları yeterli veya yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır. Hepsidin, bağırsaklarda ferroportini internalize ederek demirin enterositlerden tek çıkış yolunu engellemiş olur. Demir depoları düşük olduğu zaman ise, hepsidin üretimi azalır, ferroportin molekülleri enterosit membranında yer alarak, demiri enterosit sitoplazmasından plazmadaki transferine aktarır (45, 71).



Şekil-3: Plazmaya demir akışında hepsidin-ferroportin etkileşimi ⁽⁶⁶⁾

2. 3. 5. Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi:

Plazma demir düzeyinin ve dokulardaki demir depolarının artması ile hepsidin sentezi uyarılır. Böylece makrofaj ve enterositlerden plazmaya demir salınımı azaltılır. Bu homeostatik mekanizma ile aşırı demir emilimi ve dokularda demir birikimi engellenir (72).

Hepsidin sentezi demir eksikliği anemisinde, hemolitik anemide ve inefektif eritropoez görülen anemilerde azalır. Hepsidin baskılanmasına aracılık eden mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber, dolaşımdaki ve depolardaki demirin düşüklüğü ve hipoksi durumunda kemik iliğinde eritroblastların gelişimi sırasında bazı proteinlerin üretiminin azalması sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (66).

Enfeksiyon ve inflamasyon sırasında hepsidin sentezi hızlıca artar. IL-6 molekülü STAT 3-bağımlı transkripsiyonel mekanizma aracılığıyla hepsidin sentezini uyarır. Gönüllü insanlara IL-6 infüze ederek üriner hepsidin ekskresyonunun infüzyon sonrası 2 saat içinde birkaç kat arttığı gösterilmiştir (73).

İnflamasyon sırasında artan hepsidin düzeyleri, enterositler, makrofajlar ve hepatositlerde ferroportinin hücre içine alımını ve yıkımını uyararak demirin bu hücrelerde tutulmasını ve plazmaya demir geçişini engellemektedir (71).

2. 5. İNFLAMATUAR SİTOKİNLER:

Sitokinler, infeksiyöz ajanlara veya yabancı antijenlere karşı yanıt sırasında salgılanan, immün ve inflamatuvar reaksiyonları düzenleyen proteinlerdir.

NAYKH patogenezinde birinci darbe döneminde karaciğerde TG'lerin yıkımıyla meydana gelen aşırı SYA birikimi sonrasında oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinlerin ikinci darbeye neden olduğu düşünülmektedir (17).

2. 5. 1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α):

1975 yılında ilk olarak Carswell ve arkadaşları tarafından endotoksin (lipopolisakkarit) verilen farelerin serumlarında tümör dokusunda nekroza yol açan bir medyatör olarak tanımlanmıştır (74). TNF- α başlıca monosit ve makrofajlar olmak üzere lenfositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve astrositler tarafından üretilmektedir. Monosit ve nötrofiller için kemotaktik bir ajan olan TNF- α fagositozu, endotele yapışmayı, süperoksit türevlerinin salınımını ve prokoagülan aktiviteyi uyarmaktadır. TNF- α , prostasiklin (PGI₂), endotel kaynaklı damar genişletici faktör (EDRF) ve platelet aktive edici faktör (PAF) sentezini uyarmaktadır. Böylece erken dönemde vazodilatasyondan ve damarda lökositlerin birikmesinden sorumludur (75).

NASH insanlarda obezite ile kuvvetli ilişkiye sahiptir (76). Adipoz dokunun da TNF- α ile birlikte pek çok farklı sitokin ve hormonu salgıladığı bilinmektedir (77). Obezlerde artmış adipoz doku kütlesi serum TNF- α 'nın major kaynağıdır. En son bulgulara göre karaciğer gibi organlarda bulunan immün hücreler obezite-ilişkili proinflamatuvar sitokin üretimi artışına katkıda bulunmaktadır (Tablo 1) (78).

Tablo 1: TNF'nin NAYKH'daki patofizyolojik rolünü destekleyen bulgular ⁽⁷⁸⁾

Obez ve NASH hastalarında artmış serum TNF düzeyleri
Obez hastaların adipoz doku ve karaciğerlerinde artmış TNF gen ekspresyonu
Hepatik fibrozisli NASH hastalarında TNF mRNA ekspresyonu yüksekliği
NAYKH hastalarında TNF polimorfizmlerinin artmış prevalansı
Önemli bir patofizyolojik mekanizması TNF olduğu bilinen alkolik steatohepatit ile NASH'ın karaciğer histolojisi benzerliği

2. 5. 2. İnterlökin-6 (IL-6):

IL-6; makrofajlar başta olmak üzere aktive olmuş T ve B lenfositleri, monositler, fibroblastlar, bağ dokusu ve yağ dokusu hücrelerinden salınan bir sitokindir (79). Obez hastaların yağ dokusunda IL-6 aşırı eksprese olur (80). Artmış hepatik IL-6 üretimi NASH gelişiminde önemli bir rol oynadığı gibi sistemik insülin direnci ve diyabette de önemli rol oynar (81). Kronik olarak yüksek olan IL-6 seviyeleri hiperinsülinemiye yol açar, iskelet kası hücrelerinin insülin bağımlı glukoz alımını bozar ve karaciğerde inflamasyon varlığına işaret eder (82).

İlk çalışmalar steatotik karaciğerde IL-6'nın oksidatif stresi baskılayarak ve mitokondrial disfonksiyonu önleyerek karaciğeri koruyucu etkisi olduğunu ileri sürmektedir (83). Kısa ve uzun süreli IL-6 maruziyetinin karaciğeri hasara ve apoptotik hücre ölümüne duyarlı hale getirmesi paradoksik bir etki olarak

gözükmektedir (84). IL-6 düzeyi yüksekliği kronik karaciğer hasarında inflamasyona katkıda bulunmaktadır ve anti-inflamatuar bir yanıt varlığını göstermektedir (85).

2. 5. 3. İnterlökin-8 (IL-8):

Periferik kan mononükleer hücreleri, fibroblastlar, endotelial hücreler ve keratinositler tarafından sentezlenen 8-14 kD ağırlığında bir sitokindir. IL-1 ve TNF tarafından yapımı uyarılmaktadır. İmmün yanıtta inflamasyon bölgesine nötrofil kemotaksisine neden olan en önemli mediatördür (86).

Artmış serum IL-8 seviyeleri obezite, diyabet, ateroskleroz ve çeşitli karaciğer hasarı gibi hastalıklarla ilişkili olduğu için IL-8'in inflamasyona ve doku hasarına neden olarak bu hastalıkların gelişiminde ve progresyonunda önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (87).

Chu ve arkadaşlarının (88) yaptığı bir çalışmada plazma IL-8 seviyeleri NAYKH hastalarında kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada hepatosteatozlu hastalara göre NASH hastalarının yüksek serum IL-8 düzeylerine sahip olduğu gösterilmiştir (89).

Kısacası NAYKH, insülin direnci, demir yüklenmesi, oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle meydana gelen, basit yağlanmadan steatohepatit, siroz ve hepatosellüler kansere ilerleyebilme potansiyeline sahip olan önemli bir hastalıktır.

3. MATERYAL ve METOD:

3. 1. Deney ve Kontrol Grupları:

Çalışmaya Ocak 2010 ile Aralık 2010 tarihleri arasında Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye polikliniğine başvuran kişilerden 41 kadın, 47 erkek olmak üzere toplam 88 gönüllü katılmıştır. 60 kişilik hasta grubu ultrasonografi ile karaciğer yağlanması tespit edilen ve/veya serum ALT düzeyi yüksek bulunan kişilerden oluşmuştur. Kontrol grubu 28 sağlıklı gönüllüden meydana gelmiştir.

Tüm olgulara yapılacak olan testler ve klinik anlamları hakkında bilgi verildi ve yazılı onayları alındı.

Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Radyodiagnostik bölümünde yapılan karaciğer ultrasonografisinde, karaciğer parankiminde böbrek ile karşılaştırıldığında homojen ekojenite artışı ve/veya damarsal yapılarda silinme görülen kişilere NAYKH tanısı kondu. NAYKH tanısı alan kişilerin, ayrıntılı anamnezleri alınarak, fizik muayeneleri yapıldı.

NAYKH tanısı konmadan önce tüm vakalar diğer olası karaciğer hastalıklarını dışlamak amacıyla klinik ve laboratuvar olarak değerlendirildi. Hastalarda alkolik karaciğer hastalığı, bilier obstrüksiyon, primer bilier siroz, otoimmün ve viral hepatitler, metabolik ve herediter karaciğer hastalıkları, total parenteral beslenme, protein-kalori malnutrisyonu, hızlı kilo verme, geçirilmiş barsak rezeksiyonu, inflamatuvar barsak hastalığı, tiroid hastalığı, malignite ve ilaç kullanımı tespit edilenler çalışmaya alınmadı. Alkol kullanım öyküsü (kadınlarda >20 gr/gün, erkeklerde >30 gr/gün), amiodaron, kortikosteroid, metotreksat, tamoksifen ve oral kontraseptif gibi sürekli ilaç kullanımı olan hastalar da çalışma dışında bırakıldı.

3. 2. Kullanılan Gereçler:

Hastalardan 10-12 saatlik açlık sonrasında vakumlu jelli düz tüplere 10 ml venöz kan alındı. Alınan numuneler bekletilmeden Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na ulaştırıldı. 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilen numunelerin serumları ayrıldıktan sonra biyokimyasal analizler yapılincaya kadar -80°C'de saklandı. ALT, demir ve demir bağlama kapasitesi ölçümünde Roche marka Cobas Integra 800 otoanalizörü kullanıldı. Serum ferritin düzeyleri Siemens marka Advia Centaur XP cihazında, serum IL-6 seviyeleri ise Siemens marka Immulite 2000 cihazında tayin edildi. Serum hepsidin, sTfR, IL-8 ve TNF- α ölçümü Biotek marka ELISA okuyucu ve yıkayıcı ile yapıldı.

3. 3. Yöntemler:

3. 3. 1. Hepsidin Ölçümü:

Serum hepsidin düzeyi ölçümü için DRG marka ELISA kiti kullanıldı. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra 30mL 40X konsantre halde olan wash solüsyonuna 1170 mL distile su eklenerek 1200 mL'ye hacmi tamamlandı. Liyofilize standart şişelerine 0.5 mL distile su eklenerek 0-3.85-11.5-23-70-140 ng/mL konsantrasyonlarına sahip standart solüsyonları hazırlandı. Aynı şekilde her kontrol şişesine 0.5 mL distile su eklenerek düşük ve yüksek konsantrasyonlu kontrol solüsyonları hazırlandı. ELISA plate'inin her kuyucuğuna 10 μ L Sample Buffer eklendi. 20 μ L standart, kontrol ve örnek serumları daha önce belirlenmiş kuyucuklara pipetlendi. Plate oda sıcaklığında 30 dk süreyle yaklaşık 500 rpm'de shaker üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her kuyucuğa 150 μ L deney tamponu ve 100 μ L

enzim konjugat solüsyonları ilave edildi. Tekrar plate 500 rpm'de shaker üzerinde oda sıcaklığında 180 dk inkübasyona bırakıldı. Sonra 5 kez 400 µL wash solusyonu ile yıkayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirildi. 100 µL enzim kompleks reaktifi pipetlendikten sonra 45 dk oda sıcaklığında plate inkübe edildi. Yine 5 kez 400 µL wash solusyonu ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra 100 µL substrat solüsyonu eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında 100 µL stop solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda plate absorbansı okutuldu. Standartların absorbans ve konsantrasyonlarıyla oluşan grafik yardımıyla serum hepsidin konsantrasyonları hesaplandı.

3. 3. 2. sTfR Ölçümü:

Serum sTfR ölçümü için Biovendor marka ELISA kiti kullanıldı. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra konsantre haldeki standartlara 0.1 mL distile su ilave edildi. Bu standart solüsyonları da 1/10 dilüe edildi (30 µL standart + 270 µL dilüsyon tamponu). Konsantre kontrol şişelerine 0.05 mL distile su eklendikten sonra 1/50 dilüe edildi (5 µL kontrol + 245 µL dilüsyon tamponu). 100 mL konsantre wash solüsyonuna 900 mL distile su eklenerek yıkama solüsyonu hazırlandı. Serumlar da 1/50 dilüe edildi (5 µL serum + 245 µL dilüsyon tamponu). 100 µL standartlar, kontroller ve dilüe edilmiş serumlar plate'e pipetlendi. Plate 300 rpm devirde shaker üzerinde 30⁰C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından 3 kez 350 µL wash solüsyonu ile yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µL konjugat solüsyonu eklendikten sonra 1 saat 300 rpm'de shaker üzerinde 30⁰C'de inkübe edildi. 3 kez 350 µL wash solüsyonu ile yıkama işleminden sonra 100 µL substrat solüsyonu pipetlenerek plate'in üzeri

kapatıldı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon tamamlandı. 100 µL stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurularak 450 nm'de absorbanslar okutuldu. Standartların absorbans ve konsantrasyonlarıyla meydana gelen grafik yardımıyla serum sTfR konsantrasyonları hesaplandı.

3. 3. 3. IL-8 Ölçümü:

Serum IL-8 ölçümü için invitrogen marka ELISA kiti kullanıldı. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra 10 ng/mL standart elde etmek için standart şişesine standart dilüsyon buffer eklenerek ile 10 dk çözünmesi beklendi. Seri dilüsyonlar ile 500-250-125-62.5-31.2-15.6 pg/mL konsantrasyonlarına sahip standartlar hazırlandı. 50 µL standartlar, kontroller ve serumlar pipetlendikten sonra 50 µL Biotin konjugat ilave edildi. Plate, üzeri kapatıldıktan sonra 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 4 kez 400 µL wash solüsyonu ile yıkama yapıldı. 100 µL Streptavidin-HRP solüsyonu ilave edildi ve plate kapatılarak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 4 kez 400 µL wash solüsyonu ile yıkama işleminin ardından 100 µL stabilize kromojen eklenmesiyle kuyucuklardaki sıvı mavi renge dönüşmeye başladı. 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyon sonrasında 100 µL stop solüsyonu ilavesiyle mavi renkten sarı renge dönüşüm gerçekleşti. 450 nm dalga boyunda absorbanslar okutuldu. Standartların absorbans ve konsantrasyonlarıyla çizilen grafik yardımıyla serum IL-8 konsantrasyonları hesaplandı.

3. 3. 4. TNF-α Ölçümü:

Serum TNF-α ölçümü için invitrogen marka ELISA kiti kullanıldı. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra standart dilüent tamponu ile 2000

pg/mL konsantrasyona sahip stok standart hazırlandı. 10 dk tam çözünmesi beklendikten sonra seri dilüsyonlar ile 1000-500-250-125-62.5-31.2-15.6-0 konsantrasyonlu standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 50 µL inkübasyon tamponu eklendikten sonra 100 µL standartlar, kontroller ve serumlar pipetlendi. Plate kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 kez 400 µL yıkama yapıldı. 100 µL Streptavidin-HRP solüsyonu eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 4 kez 400 µL wash solüsyonu ile yıkama işleminin ardından 100 µL stabilize kromojen pipetlenmesiyle kuyucuklardaki sıvı mavi renge dönüşmeye başladı. Karanlıkta 30 dk inkübasyondan sonra 100 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm dalga boyunda absorbanslar okutuldu. Standartların absorbans ve konsantrasyonlarıyla çizilen grafik yardımıyla serum TNF-α konsantrasyonları hesaplandı.

3. 3. 5. IL-6 Ölçümü:

Ticari olarak temin edilebilen, solid faz, enzim işaretli, kemilüminesan immünometrik assay kiti ile Siemens marka Immulite 2000 cihazında 100 µL serumda IL-6 düzeyleri ölçüldü.

3. 3. 6. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü:

Serum ferritin düzeyleri ölçümünde ticari olarak temin edilebilen ferritin kiti kullanıldı. Direkt kemilüminometrik teknoloji kullanılarak sandwich assay yöntemiyle Siemens marka Advia Centaur XP cihazında ferritin tayini yapıldı.

Serum ALT düzeyleri enzimatik kolorimetrik yöntemle Roche marka Cobas Integra 800 cihazı ve ticari olarak temin edilebilen ALT kiti kullanılarak ölçüldü.

Serum demir seviyeleri guanidin/ferrozine metodu kullanılarak Roche marka Cobas Integra 800 cihazında ticari olarak temin edilebilen demir kiti ile enzimatik kolorimetrik olarak ölçüldü.

Serum demir bağlama kapasitesi (DBK) tayini Roche marka Cobas Integra 800 cihazında ticari olarak temin edilebilen demir bağlama kapasitesi kiti kullanılarak enzimatik kolorimetrik metod direkt ferrozine ile yapıldı.

3. 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatistiklerin hazırlanmasında SPSS for Windows 13,0 paket istatistik programı (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) kullanıldı. Veriler ortalama değer \pm standart sapma olarak verildi. Parametrik verilerin analizinde Student's t-test uygulandı. Non-parametrik verilerin analizinde Mann Whitney U testi ile Kruskall Wallis testi uygulandı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR:

4. 1. Demografik özellikler:

Çalışmaya kontrol grubu olarak 18 kadın (% 64.3) ve 10 erkek (% 35.7) olmak üzere toplam 28 sağlıklı birey katıldı. Hasta grubu ise USG ile NAYKH tanısı alan 23 kadın (% 38.3) ve 37 erkek (% 61.7) olmak üzere toplam 60 vakadan oluştu. Yaş ortalaması kontrol grubunda 48.10 ± 13.83 , hasta grubunda ise 47.70 ± 11.02 olarak bulundu. Grupların demografik özellikleri Tablo 2’te gösterilmiştir.

	Kontrol (n=28)	NAYKH (n=60)	p değeri
Yaş (yıl)	48.1±13.83	47.7±11.02	0.798
Cinsiyet (E/K)	10/18	40/20	0.023

Tablo 2: Grupların demografik özellikleri

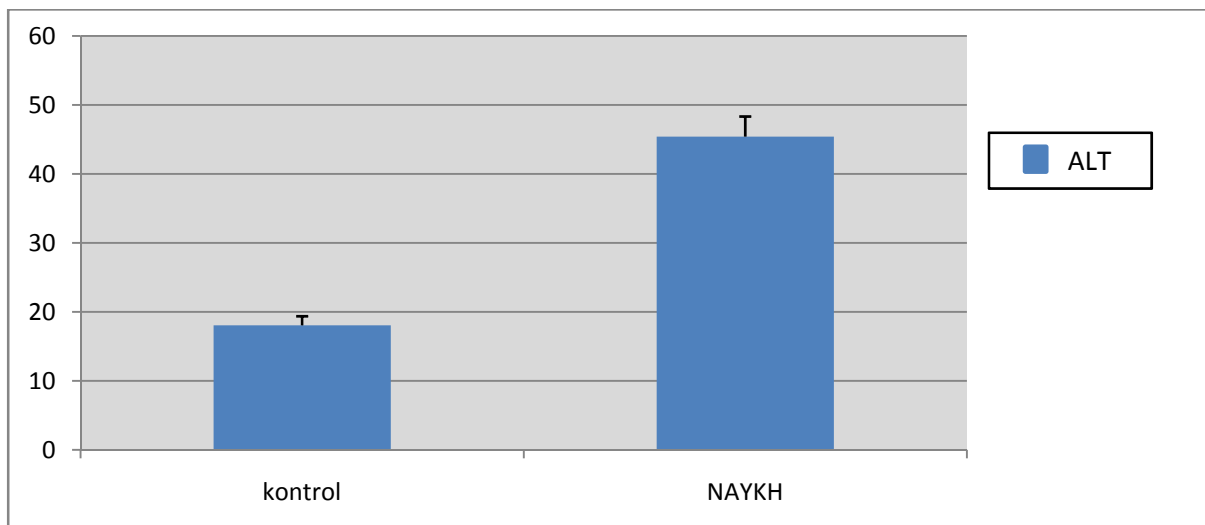
4. 2. NAYKH ile serum ALT düzeyleri ve demir parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi:

Çalışmaya katılan olguların serum ALT düzeyleri ve demir parametreleri Tablo 3’te gösterilmiştir. NAYKH olan vakaların serum ALT değerleri 45.4 ± 22.56 idi ve kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p=0.001$). NAYKH olgularının ferritin düzeyleri 117.54 ± 62.88 olarak bulundu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0.001$). Hasta grubu ile kontrol grubu arasında serum demir, SDBK ve hepsidin düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktu. NAYKH vakalarının serum sTfR

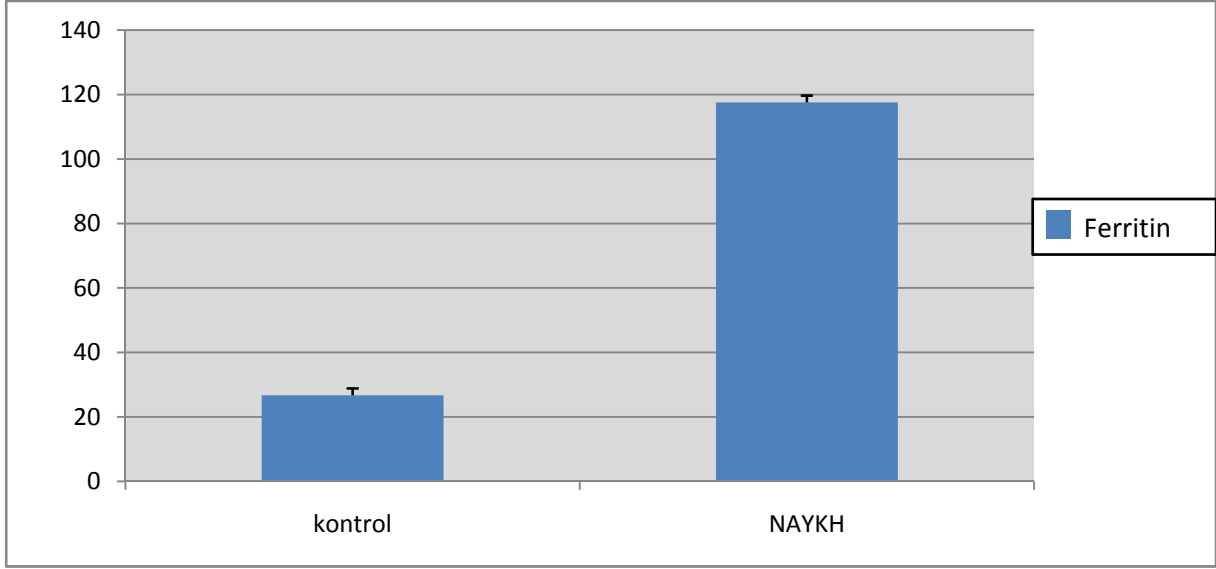
düzeyleri 2.72 ± 0.68 olarak tespit edildi ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$).

	Kontrol (n=28) Ort \pm SD (Min-max)	NAYKH (n=60) Ort \pm SD (Min-max)	p değeri
ALT* (U/L)	18.05 \pm 6.95 (6.0 - 31.0)	45.4 \pm 22.56 (19.55 - 116.25)	0.001
Ferritin* (ng/mL)	26.72 \pm 11.26 (8.0 - 61.4)	117.54 \pm 62.88 (31.3 - 253.0)	0.001
Demir (μg/dL)	83.3 \pm 26.36 (35.83 - 157.0)	84.94 \pm 25.16 (30.0 - 136.0)	0.661
SDBK (μg/dL)	247.8 \pm 75.16 (157.0 - 480.89)	229.06 \pm 52.98 (100.0 - 368.47)	0.412
Hepsidin (ng/mL)	25.16 \pm 13.32 (1.23 - 79.76)	24.93 \pm 9.7 (9.46 - 57.01)	0.904
sTfR* (μg/mL)	2.36 \pm 0.63 (1.68 - 4.7)	2.72 \pm 0.68 (1.18 - 5.14)	0.003

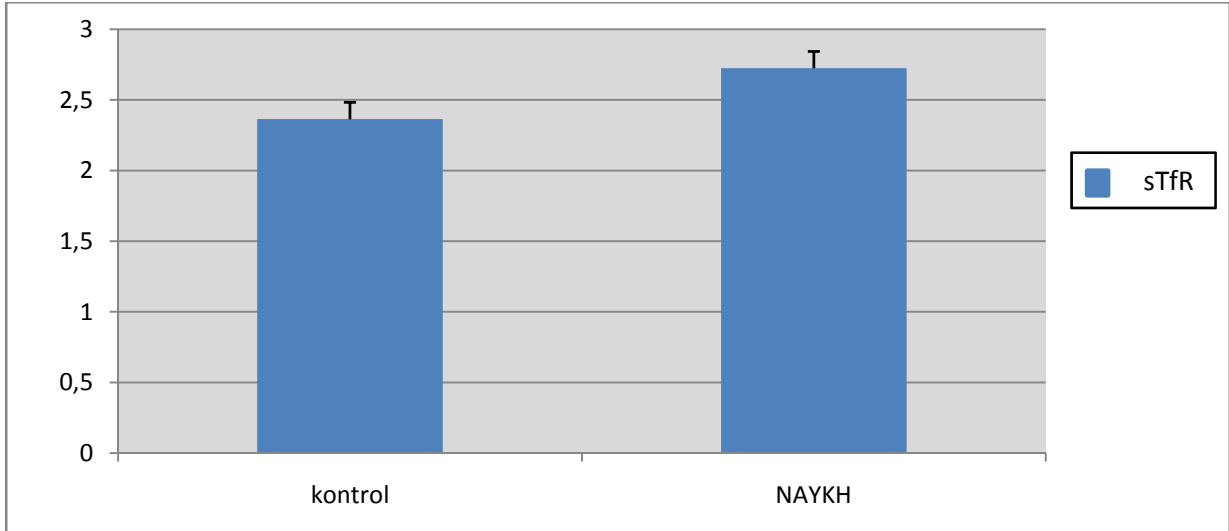
Tablo 3: Grupların ALT düzeyleri ve demir parametreleri * $p < 0.05$



Grafik-1: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun ALT düzeyleri



Grafik-2: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun ferritin düzeyleri



Grafik-3: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun sTfR düzeyleri

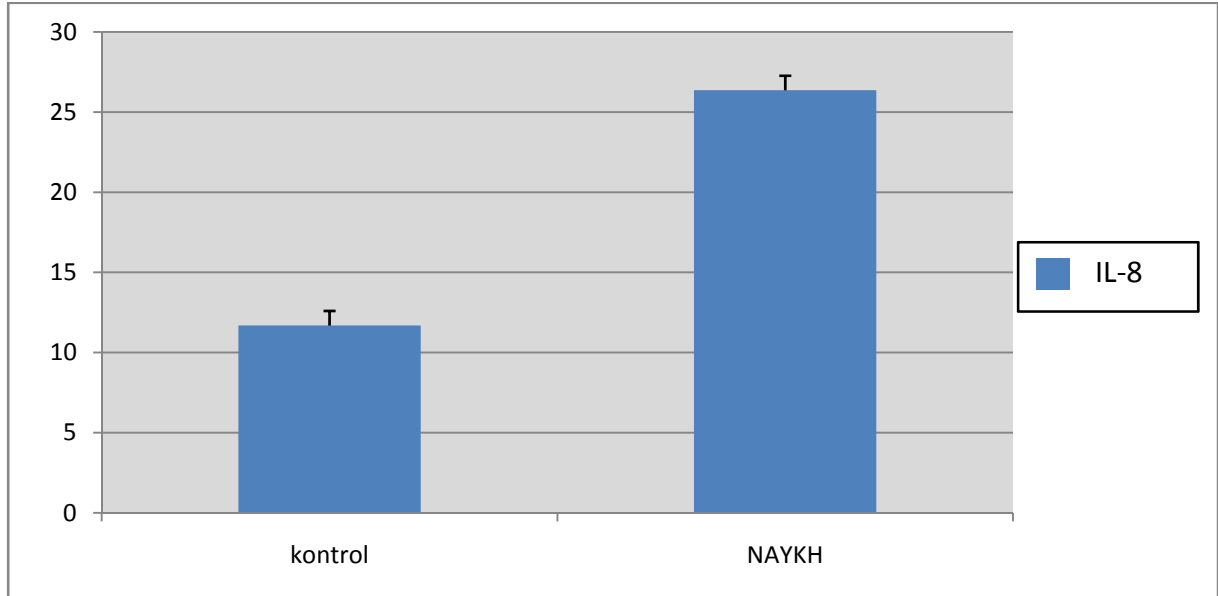
4. 2. NAYKH ile inflamatuvar sitokinler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi:

Çalışmaya katılan olguların inflamatuvar sitokinleri Tablo 4'te gösterilmiştir. TNF- α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri hasta grubunda sırasıyla 16.38 ± 5.31 , 3.30 ± 1.45 ve $26.36 \pm$

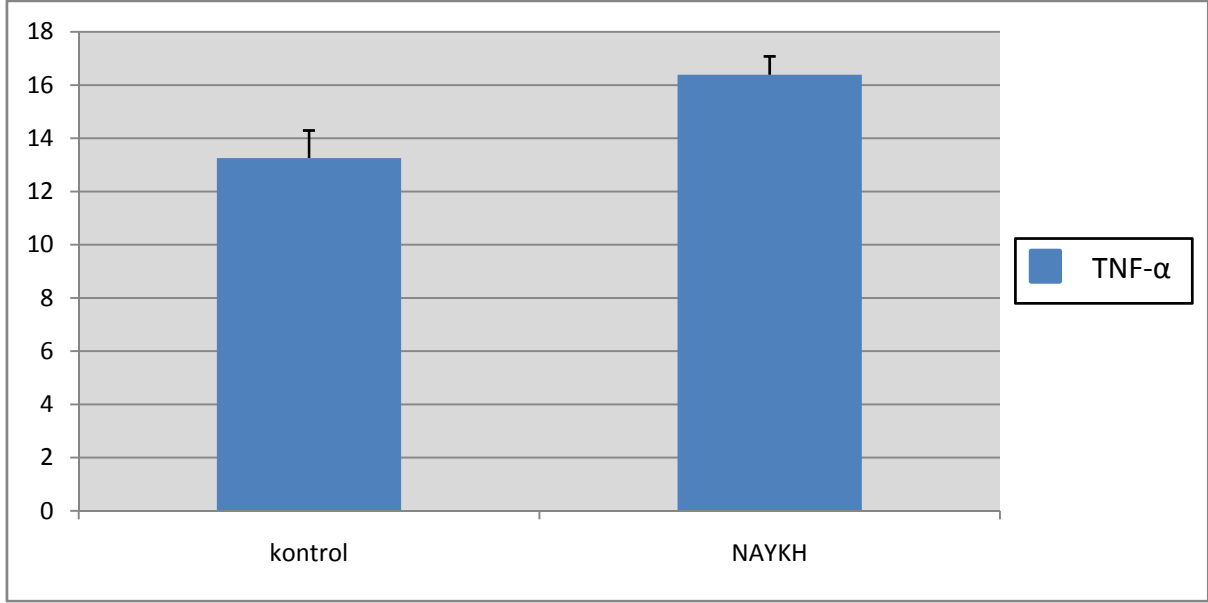
9.18 olarak bulundu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.001$). Serum TNF- α düzeyinin NAYKH'nı belirlemedeki etkinliği ROC eğrisi ile değerlendirildiği zaman yüksek bulundu (şekil-4). Serum IL-6 düzeyinin NAYKH belirlemedeki etkinliği ROC eğrisi ile değerlendirildiği zaman belirgin yüksek bulundu (şekil-5).

	Kontrol (n=28) Ort \pm SD (Min-max)	NAYKH (n=60) Ort \pm SD (Min-max)	p değeri
IL-8*(pg/mL)	11.69 \pm 4.80 (5.05 - 23.19)	26.36 \pm 9.18 (17.44 - 47.32)	0.001
TNF-α*(pg/mL)	13.25 \pm 5.47 (7.89 - 36.57)	16.38 \pm 5.31 (7.63 - 35.99)	0.001
IL-6*(pg/mL)	1.76 \pm 0.55 (0.75 - 3.46)	3.30 \pm 1.45 (1.18 - 7.12)	0.001

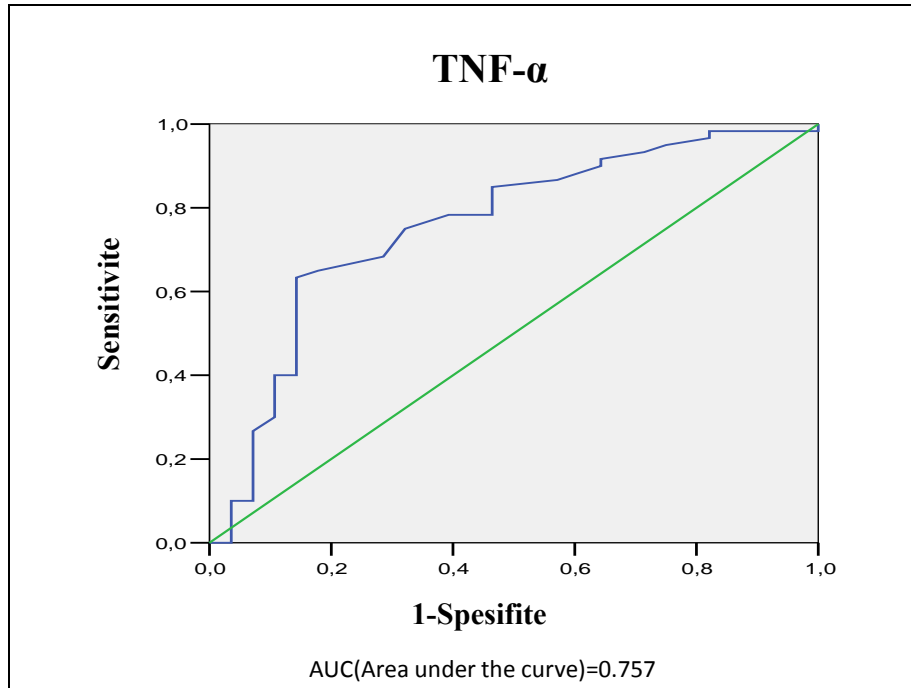
Tablo 4: Gruplara ait inflamatuvar sitokinler * $p<0.05$



Grafik-4: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun IL-8 düzeyleri

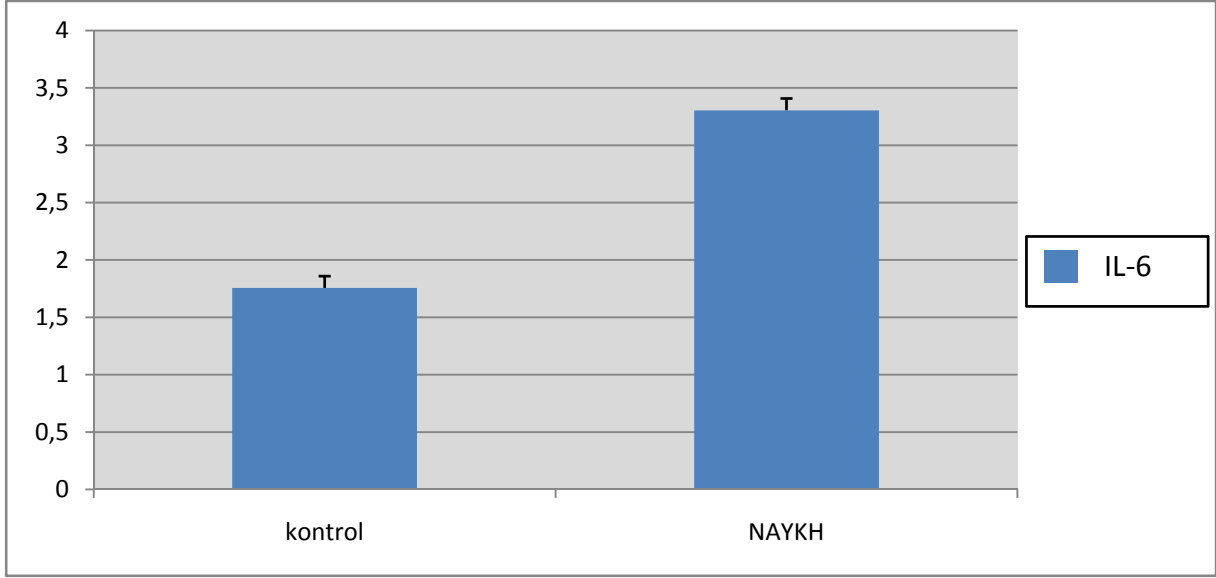


Grafik-5: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun TNF- α düzeyleri

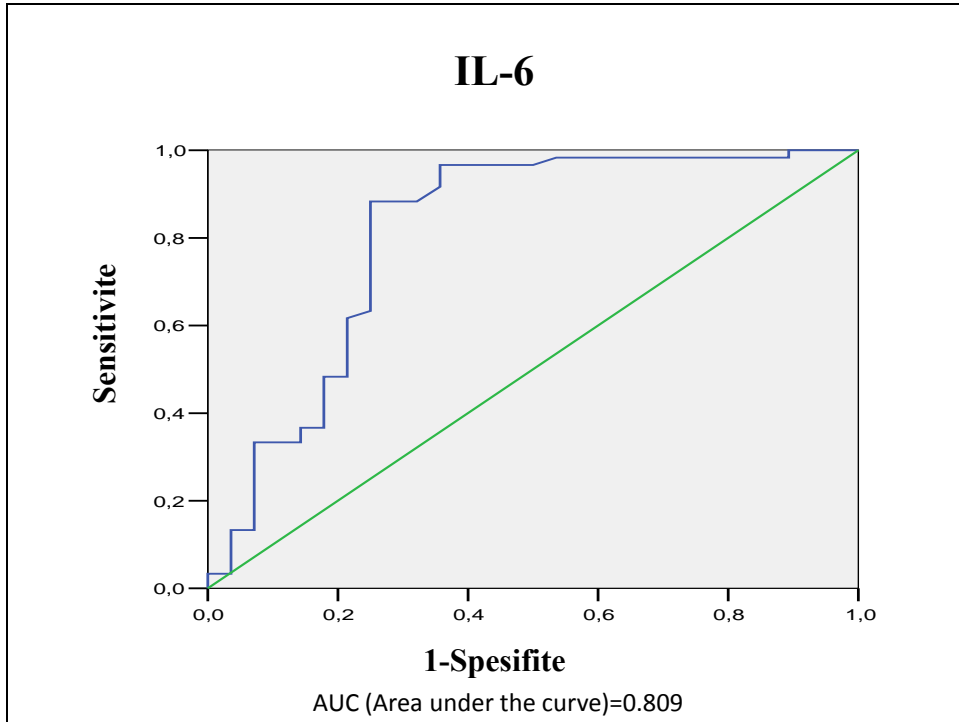


Şekil-4: TNF- α düzeyinin NAYKH'nı belirlemedeki etkinliğinin ROC eğrisi ile değerlendirilmesi

TNF- α için 13,40 pg/ml cut-off düzeyi kabul edilerek hepatosteatoz %75 sensitivite ve %68 spesifite ile predikte edilebilir (AUC=0.757).



Grafik-6: Kontrol ve NAYKH hasta grubunun IL-6 düzeyleri



Şekil-5: IL-6 düzeyinin NAYKH'nı belirlemedeki etkinliğinin ROC eğrisi ile değerlendirilmesi

IL-6 için 2,05 pg/ml cut-off düzeyi kabul edilerek hepatosteatoz %88 sensitivite ve %75 spesifite ile predikte edilebilir (AUC=0.809).

4. 3. Hepatosteatoz derecesine göre grupların birbiriyle karşılaştırılması:

Yapılan karaciğer USG sonuçlarına göre çalışmaya katılan olgular hepatosteatozun derecesine göre minimal hepatosteatoz (n=17), orta derecede hepatosteatoz (n=20) ve belirgin hepatosteatoz (n=23) olarak 4 gruba ayrıldı. Normal karaciğer (n=28) saptanan kişiler kontrol grubunu oluşturdu. Hepatosteatoz derecesine göre grupların birbiriyle karşılaştırılması Tablo 5'te verilmiştir.

Gruplar arasında ALT düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p=0.001). Gruplar ikişerli olarak karşılaştırıldığında;

Minimal hepatosteatozlu ve orta hepatosteatozlu grup arasında ALT düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0.113).

Belirgin hepatosteatozlu grupta minimal hepatosteatozlu gruba göre ALT düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (p=0.001).

Belirgin hepatosteatozlu grupta orta hepatosteatozlu gruba göre ALT düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (p<0.05).

Gruplar arasında ferritin düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p=0.001). Gruplar ikişerli olarak karşılaştırıldığında;

Minimal hepatosteatozlu ve orta hepatosteatozlu arasında ferritin düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0.214).

Belirgin hepatosteatozlu grupta minimal hepatosteatozlu gruba göre ferritin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.001$).

Belirgin hepatosteatozlu grupta orta hepatosteatozlu gruba göre ferritin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$).

Gruplar arasında TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p<0.05$). Gruplar ikişerli olarak karşılaştırıldığında;

Orta hepatosteatozlu grupta minimal hepatosteatozlu gruba göre TNF- α düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$).

Belirgin hepatosteatozlu grupta minimal hepatosteatozlu gruba göre TNF- α düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$) bulunurken, belirgin hepatosteatozlu ve orta hepatosteatozlu arasında TNF- α düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.421$).

Gruplar arasında IL-6 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0.001$). Gruplar ikişerli olarak karşılaştırıldığında:

Minimal hepatosteatozlu ve orta hepatosteatozlu grup arasında IL-6 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p=0.821$), belirgin hepatosteatozlu grubun IL-6 düzeyi minimal hepatosteatozlu gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$).

Belirgin hepatosteatozlu grupta orta hepatosteatozlu gruba göre IL-6 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.001$).

Gruplar arasında IL-8 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0.001$). Gruplar ikişerli olarak karşılaştırıldığında:

Minimal hepatosteatozlu ve orta hepatosteatozlu grup arasında IL-8 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p=0.180$), belirgin hepatosteatozlu grubun IL-8 düzeyleri minimal hepatosteatozlu gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.001$).

Belirgin hepatosteatozlu grubun IL-8 düzeyleri orta hepatosteatozlu gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).

Hastalar hepatosteatozun derecesine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında yaş, demir, SDBK, sTfR ve hepsidin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

	Kontrol (n=28)	Minimal (n=17)	Orta (n=20)	Belirgin (n=23)
Yaş (yıl)	48.1 ± 13.83	51.88 ± 10.71	46.35 ± 11.52	45.78 ± 10.42
Cinsiyet (E/K)	10/18	12/5	11/9	17/6
ALT (U/L)	18.05 ± 6.95 ^a	32.38 ± 7.26 ^{a, d}	43.09 ± 22.78 ^{a, c}	57.03 ± 24.53 ^{a, c, d}
Ferritin (ng/mL)	26.72 ± 11.26 ^a	84.48 ± 39.14 ^{a, d}	105.51 ± 58.22 ^{a, c}	152.43 ± 65.68 ^{a, c, d}
Demir (µg/dL)	83.3 ± 26.36	87.43 ± 23.39	80.88 ± 27.91	86.62 ± 24.6
SDBK (µg/dL)	247.8 ± 75.16	217.5 ± 63.85	231.34 ± 42.92	235.62 ± 53.09
Hepsidin (ng/mL)	25.16 ± 13.32	25.3 ± 9.98	24.33 ± 9.64	25.17 ± 9.97
sTfR (µg/mL)	2.36 ± 0.63	2.6 ± 0.56	2.6 ± 0.67	2.92 ± 0.75 ^a
IL-8 (pg/mL)	11.69 ± 4.80 ^a	21.21 ± 7.89 ^{a, d}	24.65 ± 8.20 ^{a, c}	31.66 ± 8.38 ^{a, c, d}
TNF-α (pg/mL)	13.25 ± 5.47	14.39 ± 5.97 ^{b, d}	18.01 ± 5.66 ^{a, b}	16.44 ± 4.06 ^{a, d}
IL-6 (pg/mL)	1.76 ± 0.55 ^a	2.93 ± 1.26 ^{a, d}	2.67 ± 1.00 ^{a, c}	4.13 ± 1.56 ^{a, c, d}

Tablo 5: Hepatosteatoz derecesine göre grupların karşılaştırılması

- a: $p < 0.05$; minimal, orta, belirgin steatozlu grubun kontrol grubuyla karşılaştırılması
- b: $p < 0.05$; minimal ve orta steatozlu grubun birbirleriyle karşılaştırılması
- c: $p < 0.05$; orta ve belirgin steatozlu grubun birbirleriyle karşılaştırılması
- d: $p < 0.05$; minimal ve belirgin steatozlu grubun birbirleriyle karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

NAYKH, basit yağlanmadan steatohepatit, fibrozis ve siroza uzanan geniş spektruma sahip klinik bir durumdur. NAYKH aynı zamanda hepatosellüler karsinom veya karaciğer yetmezliğine ilerleme potansiyeline de sahiptir. NAYKH dünyada prevalansı hızla artmakta olan ve yaygın görülen bir karaciğer hastalığıdır (3).

NAYKH kesin tanısı için histolojik inceleme gerekli olup USG, invaziv olmayan tanı yöntemlerinden biridir. NAYKH hastalarının çoğu asemptomatik olduğundan tarama amaçlı incelemelerde serum ALT yüksekliği ile hastalıktan şüphelenilmektedir. Çalışmamızda USG ile hepatosteatoz tespit edilen ve/veya serum ALT düzeyi yüksek olan hastalar NAYKH grubu olarak kabul edilmiştir. NAYKH grubunun serum ALT düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (sırası ile 45.4 ± 22.56 , 18.05 ± 6.95 , $p=0.001$). USG ile saptanan hepatosteatoz derecesine göre hastalar gruplara ayrıldığında belirgin hepatosteatozlu grupta minimal ve orta hepatosteatozlu gruplara göre serum ALT düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırası ile $p=0.001$, $p<0.05$). Hepatosellüler hasar varlığında serum aminotransferaz düzeylerinin arttığı bilinmektedir (90).

NAYKH patogenezinden insülin direnci, oksidatif stres ve sitokinler sorumlu tutulmakta olup NAYKH ve demir metabolizması arasındaki ilişki halen tartışmalıdır. Demir yüklenmesi, insülin direnci ve karaciğer yağlanması arasında güçlü ilişki olduğu ortaya atılmıştır (91). Mendler ve arkadaşları (92), açıklanamayan hepatik demir yüklenmesi ve insülin rezistansı sendromunun en az bir komponentinin varlığında 'İnsülin direnci-ilişkili demir yüklenmesi' (IR-HIO) sendromunu tanımlamışlardır. Ayrıca diyabetes mellitus ve insülin direnci olan hastalarda yüksek

serum ferritin düzeyleri sıklıkla rapor edilmiştir (93-97). Fargion ve arkadaşları (98) hiperferritinemi olan 40 hastalık kohort çalışmasında % 69 oranında insülin direnci tespit etmişlerdir. Bu ilişkiyi açıklamak için çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir. Demir yüklenmesinin insülin direncine yol açtığı ve demir azaltımının insülin duyarlılığını arttırdığı iddia edilmektedir (99, 100). Hiperinsülinemiye yol açan insülinin azalmış hepatik ekstraksiyonu ve metabolizması demir depolarının artması ile meydana gelmektedir (101, 102). İnsülin direnci ile demir yüklenmesi arasındaki bu ilişki tersten de önemlidir çünkü transferin reseptör eksternalizasyonu arttığında insülin hücrel demir alımını stimüle etmektedir (103, 104).

Demir, insülin direnci aracılığı ile gerçekleşen ‘ilk vuruş’ta önemli bir faktör olmakla beraber ‘ikinci vuruş’ta da önemli rol oynamaktadır (91). Bazı yazarlara göre demir oksidatif stres için bir substrat rolü oynamaktadır (105). Steatotik karaciğerde, aşırı serbest yağ asidi vasıtasıyla gerçekleşen β oksidasyon reaksiyonu hidrojen peroksit üretimine yol açmaktadır. Hidrojen peroksit serbest demir varlığında yüksek reaktiviteye sahip hidroksil radikallerine dönüşmektedir (106). Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar demir yüklenmesinin oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir (107-109).

Bu tez çalışmasında NAYKH vakalarında serum ferritin düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırası ile 117.54 ± 62.88 , 26.72 ± 11.26 , $p=0.001$). USG sonuçları ile hepatosteatoz derecesine göre hastaları gruplara ayırdığımızda serum ferritin düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı. Belirgin hepatosteatozlu grupta minimal ve orta hepatosteatozlu gruba göre ferritin düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (sırası ile

p=0.001, p<0.05). Birçok çalışmada hepatik steatoz ve NASH ile hiperferritinemi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (92, 98). Şu anki bilgilerin ışığında NASH'ta saptanan ferritin yüksekliği hepatik nekroinflamasyonun spesifik olmayan bir etkisidir. Ferritinin akut faz reaktanı olarak fonksiyonu gördüğü de bilinmektedir. Bu nedenle NASH'ta serum demir parametreleri (özellikle ferritin) yükselebilir fakat hepatik demir yüklenmesi NASH'ın karakteristik bir özelliği değildir (29).

Demir aynı zamanda fibrozisin hepatosellüler nekroza ve Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile inflamasyona ilerlemesine neden olmaktadır (110). Demir-ilişkili karaciğer hasarı hipotezini ilk defa savunan George ve arkadaşları (29), 52 hastadan oluşan çalışmalarında intrahepatik demir artışının % 41 olduğunu ve hepatik fibrozisin şiddetiyle hepatik demir artışının korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar sonraki çalışmalarla doğrulanmamıştır. Bu çalışmalara göre transferin saturasyonu ve hepatik demir depo artışı ile NASH'ın histolojik şiddeti arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir (31, 92, 111-115). Birçok yazar hiperferritineminin demir yüklenmesi belirteci değil de insülin direnci sendromu için marker olabileceğini düşünmektedir (116).

Çalışmamızda NAYKH ve kontrol grubunun serum demir ve DBK düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (sırası ile p=0.661, p=0.412). Yapılan USG ile hepatosteatoz derecesine göre hastaları ayırdığımızda da serum demir ve DBK düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Angulo ve arkadaşlarının (30) yaptığı 144 hastadan oluşan benzer bir çalışmada hastaların hepatik demir konsantrasyonları ve hepatik demir indeksinin normal, serum transferin saturasyon

düzeylerinin yüksek olduğu ve fibrozis şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Karaciğer, demir birikiminin gözlendiği başlıca organ olması ve hepsidin üretimi nedeniyle demir homeostazında merkezi bir role sahip olması açısından önemlidir (63, 64, 65). Hepsidin intestinal demir emilimini bloke ederek ve makrofajlardan demir geri dönüşümünü sağlayarak plazma demir seviyelerini kontrol eden başlıca demir regülatuar hormondur. Hepsidin, hücreden demir çıkışını sağlayan ferroportini bağlayarak ferroportinin hücre içine penetrasyonunu ve intrasellüler yıkımını indükler (70, 117, 118). Aigner ve arkadaşlarının (119) yaptığı çalışmada demir yüklenmesi olan NAYKH hastalarında demir yüklenmesi olmayan NAYKH grubuna ve kontrol grubuna göre hepsidin mRNA ekspresyonunun ve serum TNF- α düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu ve flebotomi tedavisi ile hastaların serum ferritin, transferin satürasyonu ve TNF- α düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir. Normal demir homeostazisinde serum ve doku demiri arttığında hepsidin seviyesinin de yükseldiği in vitro ve hayvan deneylerinde gösterilmiştir (65, 120). İnsanlarda üriner hepsidin ferritine oranı demir yüklenmesine karşı gelişen hepsidin cevabına uygunluk göstermektedir (121-126).

İnsülin direnci-ilişkili (dismetabolik) hepatik demir yüklenmesi (IR-HIO=DHIO) hiperferritinemi ile birlikte normal veya yüksek transferin satürasyonu, NAYKH varlığı veya yokluğu ve vücut kitle indeksinin $> 25 \text{ kg/m}^2$ olması, dislipidemi, anormal glukoz metabolizması gibi metabolik değişikliklerden birinin eşlik etmesi sonucunda ortaya çıkan bir durumdur (92). Barisani ve arkadaşları (127), DHIO olan hastalar ile NAYKH, hemokromatozis ve talasemi hasta grubunda demir ile ilişkili moleküllerin

ekspresyonlarını incelemiştir. Buna göre üriner hepsidin seviyelerini DHIO hastalarında NAYKH olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Fakat hepsidin mRNA ekspresyonu DHIO ve NAYKH grubunda birbirine benzer şekilde saptanmıştır. Hepsidin mRNA'sı ile üriner hepsidin seviyeleri arasında korelasyon bulunmamıştır. Bunun bir açıklaması da üriner hepsidin değerine karaciğer dışı hepsidin kaynağının katkıda bulunmuş olabileceğidir. Fakat bu ekstrahepatik hepsidin üretiminin dolaşımdaki total hepsidin miktarına olan katkısının hesaplanması çok güçtür. Örneğin, adiposit hepsidin ekspresyonu hepatik dokuya göre yaklaşık 150 kat daha düşüktür ancak obezlerde bu miktar artmaktadır (128). Üriner hepsidin/ferritin oranını ise NAYKH grubunda DHIO grubuna göre anlamlı derecede yüksek tespit etmişlerdir. Bunu da bu hastaların yetersiz hepsidin üretimine bağlamışlardır. İlginç biçimde DHIO grubunun hepatik hepsidin mRNA seviyeleri demir parametreleri ile korele bulunmamıştır. Bu hastalarda olası diğer etkenlerin hepsidin üretimini etkilediğini öne sürmüşlerdir (127). Yaptığımız tez çalışmasında NAYKH hasta grubunun serum hepsidin seviyeleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırası ile 24.93 ± 9.7 , 25.16 ± 13.32 , $p=0.904$). Hasta grubumuzun demir yüklenmesi varlığına göre gruplandırılmaması ve hepsidin üretiminde etkili olabilecek farklı mekanizmalar bu sonucun açıklaması olabilir.

Riva ve arkadaşlarının (129) yaptığı bir çalışmada hepatik demir yüklenmesi olan 81 hastada transferin saturasyon seviyelerine göre hepatik demir yükü ve demir dağılımı ile metabolik değişimlerin sayısı incelenmiştir. İki ve daha fazla sayıda metabolik değişikliği ve steatozu olan hastaların, bir metabolik değişikliği olan ve

steatozu bulunmayan hastalara göre daha düşük hepatik demir, düşük transferin saturasyonu ve yüksek sinuzoidal demir seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Hepatik demir yüklenmesi olan hastaların normal transferin saturasyonuna sahip olması hepatik demir birikiminin klasik herediter hemakromatozise göre farklı mekanizmalarla gerçekleşmesine bağlı olabilir. Bu mekanizmalar arasında makrofajlarda demir retansiyonu ve demir geri dönüşümünde defekt ileri sürülmektedir (129). Obezite ve hiperinsülineminin demir eksikliği gelişimini kolaylaştırdığı son çalışmalarda ortaya konmuştur. Morbid obezlerde adipozitlerde artmış hepsidin üretimi intestinal demir emiliminin azalmasına, makrofaj demir salıverilmesine ve demir depolanmasının azalmasına yol açmaktadır (128).

IR-HIO patogenezinde demir yüklenmesi ve metabolik değişikliklerin açıklanabilmesi için hepsidin-direnci hipotezi ortaya atılmıştır. Bir diğer olası görüş de; IR-HIO'nun poligenik, hepsidin üretim defekti, insülin direnci veya metabolik sendrom ile ilişkili multifaktöriyel bir hastalık olmasıdır (129).

TfR, eritroid hücreler başta olmak üzere tüm hücrelerin yüzeyinde bulunan bir transmembran proteindir. TfR hücrelere demir alımıyla ilgilidir ve hücre yüzeyindeki ekspresyonu hücrel demir ihtiyacı arttığında artmaktadır. Serum sTfR konsantrasyonu hücre yüzeyinde TfR ekspresyonunu yansıtmaktadır. Bu miktar demir eksikliği anemisinde artmakta iken demir yüklenmesi varlığında azalmaktadır (130). Serum ferritininin aksine sTfR inflamatuvar bir durum varlığında değişim göstermez. Obezite düşük dereceli sistemik inflamatuvar bir durumdur. Serum ferritini yerine serum sTfR düzeyi ölçümü, doku demir kullanılabilirliğini gösterme açısından daha doğru olacaktır (131). Serum sTfR düzeyleri obezlerde obez olmayanlara göre daha

yüksek bulunmuştur ve obezitenin dokularda demir eksikliği gelişimine yol açtığı öne sürülmüştür (132, 133). Freixener ve arkadaşları (131) santral obezitesi ve hiperferritinemisi olan 75 erkek hastanın serum sTfR konsantrasyonlarını obez olmayan erkeklere göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda NAYKH hastalarında kontrol grubuna göre sTfR düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırası ile 2.72 ± 0.68 , 2.36 ± 0.63 , $p=0.003$). NAYKH ve obezite arasında kuvvetli ilişki olduğundan dolayı sTfR düzeyinin obezlerde yüksek bulunduğu araştırmalar çalışmamızın sonucunu desteklemektedir.

NAYKH patogenezinde ortaya atılan ‘çift darbe’ teorisine göre ‘ikinci darbe’de yağ asitlerinin beta oksidasyonu, oksidatif stres, pro-inflamatuvar sitokinler ve endotoksemi yer almaktadır (134).Yaptığımız çalışmada TNF- α düzeyleri NAYKH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (sırası ile 16.38 ± 5.31 , 13.25 ± 5.47 , $p=0.001$). Ultrasonografik inceleme yapılan hastaları hepatosteatoz derecesine göre sınıflandırdığımızda orta ve belirgin hepatosteatozlu grupta minimal hepatosteatozlu gruba göre TNF- α düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). NASH tanısı alan obez hastalarda TNF- α üretiminin arttığı bilinmektedir. Crespo ve arkadaşları (135), 52 obez hastada karaciğer hastalığının şiddeti ile adipoz ve karaciğer dokusunda TNF- α gen ekspresyonu korelasyonunu çalışmışlardır. NASH hastalarının karaciğer ve adipoz dokularında TNF- α ’nın aşırı eksprese olduğunu ve önemli hepatik fibrozisi olmayanlara göre daha yüksek seviyede olduğunu göstermişlerdir. Yine bir başka çalışmada NAYKH tanısı alan 99 İtalyan hastanın kontrol grubuna göre TNF- α polimorfizminin prevalansı yüksek bulunmuştur (136).

Jarrar ve arkadaşlarının (137) yaptığı bir çalışmada NAYKH hastalarında obez ve obez olmayan kontrol grubuna göre TNF- α , IL-8 ve IL-6 düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. IL-6'nın artmış hepatik üretiminin NASH, insülin direnci ve diyabet gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (81). Karaciğerden artmış IL-6 salınımı sistemik insülin direncine neden olmaktadır. TNF- α ve IL-8'in lokal artışı hepatositlerde oksidatif stresi ilerletir, bu da apoptozise ve inflamatuvar hücrelerin karaciğere göçünde artışa neden olmaktadır (78). NAYKH'nda sistemik inflamasyonun rolünü açıklamak için histolojik olarak tanısı doğrulanmış 47 kişiden oluşan NAYKH grubu (22 basit steatoz, 22 NASH) ile 30 sağlıklı gönüllüden meydana gelen kontrol grubunda genel inflamasyon belirteçleri (C reaktif protein, TNF- α ve IL-6), kemokinler (CC-kemokin ligand 2 [CCL] / monosit kemoatraktant protein 1 [MCP], CCL19 ve CCL21), adipokinler (adiponektin ve leptin) ve bir oksidatif stres belirteci (8-isoprostane F2a) çalışılmıştır. NAYKH grubunda kontrol grubuna göre çeşitli inflamatuvar sitokinlerin arttığı (IL-6, CCL2/MCP1 ve CCL19) tespit edilmiştir (138).

Yaptığımız çalışmada IL-6 seviyeleri NAYKH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırası ile 3.30 ± 1.45 , 1.76 ± 0.55 , $p=0.001$). USG ile hepatosteatoz derecelerine göre hastaları sınıflandırdığımızda belirgin hepatosteatozlu grupta orta hepatosteatozlu gruba göre IL-6 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.001$).

NAYKH'nı belirlemede biomarker olarak ortaya konulan parametrenin etkinliğini testi ile değerlendirilmesi gerekir. ROC eğrisi NAYKH varlığını gösterebilecek tüm eşik değerler için duyarlılık ve yanlış pozitiflik oranını (1-spesifite) değerlendirir.

Grafik altında kalan alan ise ‘Area under curve-AUC’ bu testin hastalığı belirlemedeki etkinliğini gösterir. AUC’un %70 olması iyi bir belirteç olduğunu, %80 olması ise etkin bir belirteç olduğunu gösterir (139). Bu amaçla çalışmamızda serum IL-6 ve TNF- α düzeylerinin NAYKH’ni belirlemedeki etkinliği ROC eğrisi ile değerlendirildi ve yüksek değerler bulundu (AUC sırayla; 0.809 ve 0.757).

IL-8 seviyeleri ise NAYKH grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırası ile 26.36 ± 9.18 , 11.69 ± 4.80 , $p=0.001$). USG ile hepatosteatoz derecelerine göre hastaları sınıflandırdığımızda gruplar arasında IL-8 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0.001$).

Sonuç olarak çalışmamızda NAYKH olan kişilerde demir parametrelerinden serum ferritin ve sTfR düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken serum hepsidin, demir ve DBK düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmadı. İnflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri NAYKH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. NAYKH patogenezinde demir metabolizmasının ve inflamasyonun etkilerini açıklamak için hasta sayısı artırılarak yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu söylenebilir.

6. SONUÇLAR:

- 1) NAYKH grubunda serum ALT seviyeleri beklenildiği gibi yüksek bulundu.
- 2) USG ile steatoz derecesine göre yapılan gruplandırmada serum ALT düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi.
- 3) NAYKH grubunda serum ferritin ve sTfR düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu.
- 4) USG ile steatoz derecesine göre yapılan sınıflandırmada serum ferritin ve sTfR düzeylerinin gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği bulundu.
- 5) NAYKH grubu ile kontrol grubunun serum demir, DBK ve hepsidin düzeyleri arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi.
- 6) NAYKH grubunda serum TNF- α , IL-8 ve IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu.
- 7) USG ile steatoz derecesine göre yapılan sınıflandırmada serum TNF- α , IL-8 ve IL-6 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi.
- 8) Vaka sayısının artırılmasıyla demir parametreleri, inflamatuvar sitokinler ve oksidatif stresin de ele alındığı daha ileri ve kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği kanısına varıldı.

7. ÖZET

Gelişmiş ülkeler başta olmak üzere NAYKH sıklığı tüm dünyada giderek artmaktadır. Demir ile NAYKH arasındaki ilişkiyi araştıran değişik çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda demir yüklenmesinin, insülin direnci ve oksidatif stres oluşumunu kolaylaştırarak NAYKH patogenezinde yer aldığı öne sürülmektedir.

Bu çalışmada NAYKH'lı kişilerde ve kontrol grubunda demir parametreleri; ferritin, demir, DBK, hepsidin, sTfR ile inflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-6 ve IL-8 çalışılmıştır.

Çalışmaya USG ile hepatosteatoz saptanan ve/veya serum ALT düzeyi yüksek olan 60 hasta ile 28 sağlıklı olmak üzere toplam 88 kişi katılmıştır. NAYKH grubunda serum ALT, ferritin, sTfR, TNF- α , IL-8 ve IL-6 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, serum demir, DBK ve hepsidin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Ayrıca USG ile hepatosteatoz derecesine göre hastalar minimal, orta ve belirgin hepatosteatoz şeklinde gruplara ayrılarak demir parametreleri ve inflamatuvar sitokin düzeylerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediği incelendi. Gruplar arasında serum ALT, ferritin, TNF- α , IL-8 ve IL-6 seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Sonuç olarak çalışmamızda NAYKH grubunda ferritin, sTfR, TNF- α , IL-8 ve IL-6 düzeylerinin yüksek olması, demir metabolizmasının ve sitokinlerin hastalığın patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir. Olgu sayısı artırılarak demir parametreleri açısından yapılacak daha ileri çalışmalar NAYKH patogenezinde katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, demir metabolizması, sitokinler, ultrasonografi.

8. SUMMARY

The incidence of NAFLD is increasing all over the world primarily in the developed countries. There are several studies investigating the relation between iron and NAFLD. The studies suggested that iron overload is favoured the insulin resistance and oxidative stress play a role in NAFLD pathogenesis.

In this study iron parameters, ferritin, iron, UIBC, hepcidin, sTfR and inflammatory cytokines like TNF- α , IL-6, IL-8 in NAFLD patients and controls were determined.

A total of 88 cases, 60 NAFLD patients are detected hepatosteatosis by USG and/or have high levels of serum ALT and 28 healthy individuals in the study. The serum ALT, ferritin, sTfR, TNF- α , IL-8 and IL-6 levels were significantly high in NAFLD patients when compared to control group. There is no significant difference in the serum iron, UIBC and hepcidin levels between NAFLD and control groups.

In addition, patients are grouped in according to the degree of hepatosteatosis by USG as minimal, moderate and severe hepatosteatosis and then, iron parameters and inflammatory cytokine levels are compared among the three groups. There were significant difference for the serum ALT, ferritin, TNF- α , IL-8 and IL-6 levels of the groups compared.

In conclusion, high ferritin, sTfR, TNF- α , IL-8 and IL-6 levels of the NAFLD group in this study suggest that iron metabolism and cytokines play a role in the pathogenesis of the disease. Further studies with iron parameters by increasing the number of cases will contribute to the pathogenesis of NAFLD.

Keywords: Nonalcoholic fatty liver disease, iron metabolism, cytokines ultrasonography.

9. KAYNAKLAR:

1. Machado M, Cortez-Pinto H. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrom. *Curr Opin clin Nutr Metab Care* 2006;9:637-642.
2. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrom. *Am J Med Sci* 2005;330:326-335.
3. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World Gastroenterol* 2008;14:193-199.
4. 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.
5. Hubscher SG. Histopatological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopatology* 2006;49:450-465.
6. Pachos P, Paletas K. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrom. *Hippokriata* 2009;13:9-19.
7. Ballentini S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalance and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. *Ann. Intern. Med.* 2000;132:112-7.
8. Daniel S, Ben-Menachem T, Vasudevan G, Ma CK, Blumenkehl M. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3010-3014.
9. 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;40:2002-2009.
10. Franzese A, Vajro P, Argenziano A, Puzziello A, Iannucci MP, Saviano MC, Brunetti F, Rubino A. Liver involvement in obese children: ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in a Italian population. *Dig Dis Sci* 1997;42:1428-1432.
11. James O, Day C. Nonalcoholic steatohepatitis: Another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-6.
12. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med.* 2005;22:1129-33.
13. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.
14. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002;36:1349-54.
15. Schreuder TC, Verwer BJ, van Nieuwkerk CM, Mulder CJ. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2008;14:2474-86.
16. Wieckowska A, Feldstein AE. Nonalcoholic fatty liver disease in the pediatric population: a review. *Curr Opin Pediatr.* 2005;17:636-41.
17. Chitturi S, Farrell GC. Ethiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:27-41.
18. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;16:1221-1231.
19. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
20. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin

- resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-9.
21. Gören B, Fen T. Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2005;25:841-850.
 22. Reaven G. Diet and Syndrome X. *Current Atherosclerosis Reports* 2000;2:503-507.
 23. Bjorntorp P. Body fat distribution, insulin resistance and metabolic diseases. *Nutrition* 1997;13:795-803.
 24. Patrick L. Nonalcoholic fatty liver disease: relationship to insulin sensitivity and oxidative stress. Treatment approaches using vitamin E, magnesium, and betaine. *Altern Med Rev.* 2002;7:276-91.
 25. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437-43.
 26. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol* 2002;282:G193-G199.
 27. Fujita N, Miyachi H, Tanaka H, Takeo M, Nakagawa N, Kobayashi Y, Iwasa M, Watanabe S, Takei Y. Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:424-32.
 28. Khan MF, Wu X, Tipnis UR, Ansari GA, Boor PJ. Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynenal in livers of iron loaded rats: quantitation and localization. *Toxicology* 2002;173:193-201.
 29. Chitturi S, J George. Interaction of iron, insulin resistance, and nonalcoholic steatohepatitis. *Current Gastroenterology Reports* 2003;5:18-25.
 30. Backon BR, Farakvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-1109.
 31. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:311-8.
 32. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.
 33. Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, Matteoni CA, Boparai N, O'Neill R, McCullough AJ. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 1999;30:847-50.
 34. Chitturi S, Weltman M, Farrell GC, McDonald D, Kench J, Liddle C, Samarasinghe D, Lin R, Abeygunasekera S, George J. HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology* 2002; 36:142-9.
 35. Kumar KS, Malet PF. Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75:733-739.
 36. Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001;121:710-723.
 37. Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome, *Cleve Clin J Med.* 2008;75:721-8.
 38. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745-750.
 39. Collantes R, Ong JP, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease and the epidemic obesity. *Cleve Clin J Med* 2004;71:657-664.

40. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: An agenda for clinical research. *Hepatology* 2002;35:746-52.
41. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1991;94:2467-74.
42. Sanyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: Fat or fiction? *Am J Gastroenterol* 2001;96:274-6.
43. Dixon JB, Bhathal PS, O'brein PE. Weight loss and nonalcoholic fatty liver disease: falls in gamma glutamil transferase concentrations are associated with histologic improvement. *Obes Surg* 2006;16:1278-1286.
44. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, Vanni E, Fargion S. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(6):1251-8.
45. Ganz T. Hpcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology* 2006; 29:35.
46. Umbreit J. Iron deficiency: a concise review. *Am J Hematol* 2005; 78: 225-31.
47. Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hpcidin central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol* 2007; 78: 1-10.
48. Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences 2 nd Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.
49. Cüre E. Ratlarda demir yüklenmesi ile oluşturulan oksidatif stresin önlenmesinde kafeik asit fenetil ester'in etkinliğinin araştırılması (uzmanlık tezi) Isparta S. D. Ü. Tıp fakültesi, 2007.
50. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erithropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta*. 2003 Mar;329(1-2):9-22.
51. Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J Biol Chem* 1990;265:19077-81.
52. Baynes RD, Shih YJ, Cook JD. Mechanism of production of the serum transferrin receptor. *Adv Exp Med Biol* 1994;356:61-8.
53. R'zik S, Loo M, Beguin Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. *Haematologica* 2001; 86:244-51.
54. Beguin Y, Huebers HA, Joseph B, Finch CA. Transferrin receptor in rat plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:637-40.
55. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990;75:102-7.
56. Beguin Y, Oris R, Fillet G. Dynamics of erythropoietic recovery after bone marrow transplantation: role of marrow proliferative capacity and erythropoietin production in autologous versus allogeneic transplants. *Bone Marrow Transplant* 1993;11:285-92.
57. Kim SW, Luykx DM, de Vries S, Duine JA. A second molybdoprotein aldehyde dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica* NCIB 11946. *Arch Biochem Biophys* 1996;325:1-7.
58. Thorstensen K, Romslo I. Measurement of serum transferrin receptors in screening for hemochromatosis. *Clin Chem* 1992;38:1510.
59. Baynes RD, Cook JD, Bothwell TH, et al. Serum transferrin receptor in hereditary hemochromatosis and African siderosis. *Am J Hematol* 1994;45:288-92.
60. Ahluwalia N. Diagnostic utility of serum transferrin receptors measurement in assessing iron status. *Nutr Rev* 1998;56:133-41.

61. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990;75:1870-6.
62. Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992;119:385-90.
63. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:7806-10.
64. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfid-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters* 2000;480:147-50.
65. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. A new mouse-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is over-expressed during iron overload. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:7811-9.
66. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009;122:78-86.
67. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008;93:90-7.
68. Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:690-9.
69. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:191-200.
70. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-3.
71. Başol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE. Demir homeostazının yeni düzenleyicisi hepsidin. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2007;5:177-125.
72. Anderson GJ, Darshan D, Wilkings SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 2007; 20: 665-74.
73. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271-1276.
74. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1985;260:2345-54.
75. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . *Eur J Biochem* 1991;202:3-14.
76. Lebovitz HE. The relationship of obesity to the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract Suppl* 2003; 134: 18-27.
77. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. *J Clin Invest* 1995; 95:2111-2119.
78. Copaci I, Micu L, Voiculescu M. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis* 2006;15:363-373.
79. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: Diabetes, 1996;45:1455-62.
80. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 2009; 50: 957-969.

81. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Gastroenterology* 2008;103:1372-1379.
82. Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferré T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F, Smith U. Over expression of IL-6 leads to hyperinsulinemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* 2008;51:1306-1316.
83. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996;274:1379-83.
84. Jin X, Zimmers TA, Perez A, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* 2006;43:474-484.
85. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:831670.
86. Sarnanta KA, Oppenheim JJ, Matsushima K. Interleukin-8 (Monocyt derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophil. *Biol Chemistry* 1990;265:187-9.
87. Kim CS, Park HS, Kawada T, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:1347-1355.
88. Chu CJ, Lu RH, Wang SS, Chang FY, Lin SY, Yang CY, Lin HC, Chang CY, Wu MY, Lee SD. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-8 in Chinese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology* 2007; 54:2045-8.
89. Törer N, Özenirler S, Yücel A, Bukan N, Erdem O. Importance of cytokines, oxidative stress and expression of BCL-2 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42:1095-101.
90. Kew MC: Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet* 2000;355:591-592.
91. Machado M, Cortez-Pinto H. Nash, insulin resistance and iron. *Liver Int*. 2006;26:1159-62.
92. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, Deugnier Y. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999;117:1155-63.
93. Kaye TB, Guay AT, Simonson DC. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and elevated serum ferritin level. *J Diab Complications* 1993;7:246-9.
94. Dinneen SF, Silverberg JD, Batts K P, O'Brien P C, Ballard DJ, Rizza RA. Liver iron stores in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1994;69:13-5.
95. Tuomainen TP, Nyyssonen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, Lakka T, Kaplan GA, Salonen JT. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1013 eastern Finnish men. *Diab Care* 1997;20:426-8.
96. Turnbull AJ, Mitchison HC, Peaston RT, Lai LC, Bennett MK, Taylor R, Bassendine MF. The prevalence of hereditary haemochromatosis in a diabetic population. *Quarterly J Med* 1997;90:271-5.

97. Wrede CE, Buettner R, Bollheimer LC, Scholmerich J, Palitzsch KD, Hellerbrand C. Association between serum ferritin and the insulin resistance syndrome in a representative population. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:333–40.
98. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, Taioli E, Valenti L, Fiorelli G. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2448-55.
99. Facchini FS. Effect of phlebotomy on plasma glucose and insulin concentrations. *Diab Care* 1998;21:2190.
100. Fernandez-Real JM, Penarroja G, Castro A, Garcia-Bragado F, Hernandez-Aguado I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 2002;51:1000–4.
101. Niederau C, Berger M, Stremmel W, Starke A, Strohmeyer G, Ebert R, Siegel E, Creutzfeldt W. Hyperinsulinaemia in non-cirrhotic haemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation? *Diabetologia* 1984;26:441–4.
102. Dandona P, Hussain M A, Varghese Z, Politis D, Flynn D M, Hoffbrand AV. Insulin resistance and iron overload. *Ann Clin Biochem* 1983;20:77–9.
103. Davis RJ, Corvera S, Czech MP. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1986;261:8708–11.
104. Tanner LI, Lienhard GE. Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization. *J Biol Chem* 1987;262:8975–80.
105. Blendis L, Oren R, Halpern Z. NASH: can we iron out the pathogenesis? *Gastroenterology* 2000;118:981–3.
106. Videla LA, Fernandez V, Tapia G, Varela P. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals* 2003;16:103–11.
107. Brown KE, Dennery PA, Ridnour LA, Fimmel CJ, Kladney RD, Brunt EM, Spitz DR. Effect of iron overload and dietary fat on indices of oxidative stress and hepatic fibrogenesis in rats. *Liver Int* 2003;23:232–4.
108. Cornejo P, Varela P, Videla LA, Fernandez V. Chronic iron overload enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat liver. *Nitric Oxide* 2005;3:54–61.
109. Ibrahim W, Lee US, Yeh CC, Szabo J, Bruckner G, Chow CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *J Nutr* 1997;127:1401–6.
110. Pietrangelo A. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J Hepatol* 1998;28:8–13.
111. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, Massarenti P, Piga A, Marchesini G, Rizzetto M. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2004;39:179–87.
112. Deguti MM, Sipahi AM, Gayotto LC, Palácios SA, Bittencourt PL, Goldberg AC, Laudanna AA, Carrilho FJ, Cançado EL. Lack of evidence for the pathogenic role of iron and HFE gene mutations in Brazilian patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:739–45.
113. Duseja A, Das R, Nanda M, Das A, Garewal G, Chawla Y. Nonalcoholic steatohepatitis in Asian Indians is neither associated with iron overload nor with HFE gene mutations. *World J Gastroenterol* 2005;11:393–5.
114. Moon JH, Park SH, Oh KC, Jung JO, Shin WG, Kim JP, Kim KO, Park CH, Hahn T, Yoo KS, Kim JH, Kim DJ, Lee MS, Park CK, Jun SY. Association of hepatic iron

- deposition and serum iron indices with hepatic inflammation and fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Gastroenterol* 2006;47:432–9.
115. Uraz S, Aygun C, Sonsuz A, Ozbay G. Serum iron levels and hepatic iron overload in nonalcoholic steatohepatitis and chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci* 2005;50:964–9.
 116. Fernandez-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E, Balançá R, Casamitjana-Abella R, Cabrero D, Fernández-Castañer M, Soler J. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diab Care* 1998;21:62–8.
 117. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F and Wessling-Resnic M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is upregulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:1324–1328.
 118. Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, Beaumont C and Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin, *Blood* 2005; 102:3979–3984.
 119. Aigner E, Theurl I, Theurl M, Lederer D, Haufe H, Dietze O, Strasser M, Datz C, Weiss G. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:1374-83.
 120. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 2007;110:2182–2189.
 121. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461–2463.
 122. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005;105:4103–4105.
 123. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, Sakellaropoulos N, Papanikolaou G. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica* 2006;91:809–812.
 124. Piperno A, Girelli D, Nemeth E, Trombini P, Bozzini C, Poggiali E, Phung Y, Ganz T, Camaschella C. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE related hemochromatosis. *Blood* 2007; 110: 4096–4100.
 125. Kearney SL, Nemeth E, Neufeld EJ, Thapa D, Ganz T, Weinstein DA, Cunningham MJ. Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:57–63.
 126. Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, Nemeth E. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta thalassemia. *Haematologica* 2007;92:583–588.
 127. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, Meneveri R, Nemeth E, Ganz T, Piperno A. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol.* 2008;49:123-33.
 128. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marchand-Brustel Y. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788–796.
 129. Riva A, Trombini P, Mariani R, Salvioni A, Coletti S, Bonfadini S, Paolini V, Pozzi M, Facchetti R, Bovo G, Piperno A. Reevaluation of clinical and histological criteria

- for diagnosis of dysmetabolic iron overload syndrome. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4745-52.
130. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1111–37.
 131. Freixenet N, Remacha A, Berlanga E, Caixàs A, Giménez-Palop O, Blanco-Vaca F, Bach V, Baiget M, Sánchez Y, Félez J, González-Clemente JM. Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia. *Clin Chim Acta.* 2009;400:111-6.
 132. Yanoff LB, Menzie CM, Denking B, Sebring NG, McHugh T, Remaley AT, Yanovski JA. Inflammation and iron deficiency in the hypoferrremia of obesity. *Int J Obes (London)* 2007;31:1412–9.
 133. Lecube A, Carrera A, Losada E, Hernández C, Simó R, Mesa J. Iron deficiency in obese postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2006;14:1724–30.
 134. McCullough AJ. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis* 2007;11:75-104.
 135. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in non-alcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-1163.
 136. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:274-280.
 137. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:412-21.
 138. Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, Birkeland K, Bjørø K, Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol.* 2006;44:1167-74.
 139. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiving operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983;48:839-43.