

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**Zayıf Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Tanısında
Sitokeratin 8/18 İmmun İşaretleyicisinin Yeri**

Uzmanlık Tezi

Dr. Pelin TELLİ
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Filiz AKYÜZ

İSTANBUL
2022

ÖNSÖZ

*Eğitimim süresince her alanda desteğini
esirgemeyen, aile sıcaklığını hissettiren
hocam Prof. Dr. Filiz AKYÜZ'e,
sevgili annem Sabahat TELLİ'ye,
Prof. Dr. Mine Güllüoğlu ve
Dr. Melek Büyük'e
teşekkürlerim ve saygılarımla*

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	IV
TABLolar	VI
ŞEKİLLER	VI
I- ÖZETLER	1
A- TÜRKÇE ÖZET	1
B- İNGİLİZCE ÖZET	2
II- GİRİŞ VE AMAÇLAR	3
III- GENEL BİLGİLER	5
A- NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI	5
1. Tanım	5
2. Hastalığın tarihçesi	5
3. Epidemiyoloji	7
4. Risk faktörleri ve eşlik eden hastalıklar	7
5. Tanı ve skorlama sistemleri	10
6. Histolojik bulgular	14
a. Steatoz	14
b. Hepatoselüler hasar	15
c. Lobüler inflamasyon	15
7. Histolojik skorlama sistemleri	16
a. NAFLD aktivite skoru (NAS)	16
b. Steatozis, Aktivite, Fibroz Skoru (SAF)	17
c. Yağlı Karaciğer Progresyon İnhibisyonu Algoritması (Fatty Liver Inhibition of Progression, FLIP)	18
B- SİTOKERATİNLER	18
1. Yapı ve fonksiyon	18
2. Hepatoselüler patolojilerde sitokeratinlerin rolü	19

IV- MATERYAL VE METOD	20
A- Hasta seçimi	20
B- Yöntem	20
C- İstatistiksel analiz	22
V- BULGULAR	23
VI- TARTIŞMA VE SONUÇ	38
VII- KAYNAKLAR	45



KISALTMALAR

- AFP: Alfa fetoprotein
- ALT: Alanin aminotransferaz
- ALP: Alkalen fosfataz
- Anti-HBs: Hepatit B virusu yüzey antikoru
- Anti-HCV: Hepatit C virus antikoru
- Anti-HIV: İnsan immune yetmezlik virusu antikoru
- APRI: AST/platelet oranı indeksi (*AST/platelet ratio index*)
- aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
- AST: Aspartat aminotranferaz
- BARD: BMI, AST/ALT Ratio, Diabetes mellitus skoru
- BMI: Beden kitle indeksi (*Body mass index*)
- BUN: Kan üre nitrojeni (*Blood urea nitrogen*)
- ER: Endoplazmik retikulum
- FIB-4: Fibroz-4 indeksi
- FLI: Yağlı karaciğer indeksi (*Fatty liver index*)
- FLIP: Yağlı karaciğer progresyonunun önlenmesi birliği (*The Fatty Liver Inhibition of Progression Consortium*)
- GCKR: Glukokinaz düzenleyici gen
- GGT: Gama glutamil transferaz
- HbA1c: Hemoglobin A1c
- HBsAg: Hepatit B virusu yüzey antijeni
- HCC: Hepatoselüler karsinom
- HCV: Hepatit C virus
- HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein (*High density lipoprotein*)
- HIV: İnsan immunyetmezlik virusu (*Human immunodeficiency virus*)
- HSI: Hepatik steatoz indeksi (*Hepatic steatosis index*)
- INR: Uluslararası normalize edilmiş oran (*international normalized ratio*)
- IR: İnsülin direnci
- LDL: Düşük dansiteli lipoprotein (*Low density lipoprotein*)

MAFLD: Metabolik disfonksiyonla ilişkili yağlı karaciğer hastalığı (*Metabolic dysfunction associated fatty liver disease*)

MBOAT7: Protein-7 içeren membrana bağlı O-aciltransferaz domain

MDB: *Mallory-Denk* cisimcikleri (*Mallory-Denk bodies*)

NAFL: Alkolik olmayan yağlı karaciğer (*Non-alcoholic fatty liver*)

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (*Non-alcoholic fatty liver disease*)

NAFLD-LFS: NAFLD-karaciğer yağ skoru (*NAFLD-Liver fat score*)

NAS: NAFLD Aktivite Skoru

NASH: Alkolik olmayan steatohepatit (*Non-alcoholic steatohepatitis*)

NFS: NAFLD fibroz skoru (*NAFLD fibrosis score*)

PNPLA-3: Protein-3 içeren patanin benzeri fosfolipaz domain

PT: Protrombin zamanı

SAF: Steatozis, Aktivite, Fibroz skoru

SK 8/18: Sitokeratin 8/18

TG: Trigliserid

TM6SF2: Transmembran 6 superaillesi üye-2

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*)

ŞEKİL, TABLO VE GRAFİK DİZİNLERİ

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hasta gruplarının demografik özellikleri	23
Tablo 2. Hasta gruplarının biyokimyasal özellikleri	25
Tablo 3. Hasta gruplarının sitolojik özellikleri	31

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. NAFLD tanılı hastaların dağılımı	10
Şekil 2. NAFLD gruplarının hepatik steatoz derecesine göre karşılaştırılması	26
Şekil 3. NAFLD gruplarının hepatositlerde balonlaşma derecesine göre karşılaştırılması...27	
Şekil 4. NAFLD gruplarının FLIP algoritmasına göre hepatositlerde lobüler inflamasyon derecesi açısından karşılaştırılması	28
Şekil 5. NAFLD gruplarının NAFLD aktivite skoruna göre hepatositlerde lobüler inflamasyon derecesi açısından karşılaştırılması	29
Şekil 6. NAFLD gruplarının portal inflamasyon derecesi açısından karşılaştırılması	30
Şekil 7. NAFLD tanılı hastalarda hepatositlerde sitokeratin 8/18 immun işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı arasındaki pozitif korelasyon ($r=0.461$, $p=0.027$)	33
Şekil 8. NAFLD tanılı hastalarda hepatositlerde sitokeratin 8/18 immun işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi arasındaki pozitif korelasyon ($r=0.461$, $p=0.027$)	34
Şekil 9. NAFLD tanılı hastalarda hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile FIB skoru arasındaki pozitif korelasyon ($r=0.694$, $p<0.001$) ...35	
Şekil 10. NAFLD tanılı hastaların hepatositlerinde gözlenen histolojik bulgular	36
Şekil 11. NAFLD tanılı hastaların hepatositlerinde gözlenen hepatoselüler hasar bulguları .37	

I. ÖZETLER

A- TÜRKÇE ÖZET

Giriş ve Amaç: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) kronik karaciğer hastalıklarının başta gelen nedenleri arasındadır. NAFLD spektrumu içinde basit yağlanmadan non-alkolik steatohepatit (NASH), ilerleyici fibroz, siroz ve HCC'ye kadar patolojiler yer almaktadır. NAFLD tanılı hastaların çoğu normal kilonun üzerinde olmasına karşılık %30 kadarının ise normal kiloda veya normal kilonun altında vücut ağırlığına sahip olduğu görülmektedir. Çalışmamızda zayıf NAFLD olarak tanımlanan bu hasta grubuyla zayıf olmayan NAFLD tanılı hastaların karaciğer biyopsi materyallerinde sitokeratin 8/18 boyanması açısından farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

Materyal ve metod: Çalışmaya karaciğer biyopsisiyle kanıtlanmış NAFLD tanılı 30 hasta (BMI \leq 25 kg/m² olan 15 hasta ve BMI $>$ 25 kg/m² olan 15 hasta) dahil edilerek demografik, biyokimyasal ve histolojik özellikleri kaydedildi. Biyopsi materyalleri arşivden çıkarılarak immunhistokimyasal yöntemle sitokeratin 8/18 boyası uygulanarak tek hepatopatolog tarafından NAFLD için Brunt skorlama sistemi, NASH-CRN skorlama sistemi ve FLIP algoritmasına göre yeniden değerlendirildi.

Bulgular: Hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile balonlaşma dejenerasyonu (r=0.461, p=0.027), FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi (r=0.461, p=0.027), NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecesi (r=0.545, p=0.007), portal inflamasyon varlığı (r=0.525, p=0.010), yaş (r=0.534, p=0.009), cinsiyet (r=0.464, p=0.026), serum glukoz değeri (r=0.537, p=0.008), direkt bilirubin (r=0.523, p=0.022) ve HbA1c (r=0.758, p=0.029) düzeyleri arasında pozitif korelasyon varlığı, hemoglobin (r=-0.473, p=0.030) ve hematokrit (r=-0.437, p=0.047) düzeyleri arasında negatif korelasyon varlığı tespit edildi. Zayıf NAFLD grubu ile normal kilonun üzerindeki NAFLD grupları arasında sitokeratin 8/18 işaretleyicisi boyanma varlığı veya boyanma patterni açısından anlamlı bir fark gösterilememekle beraber zayıf NAFLD grubunda karaciğer hasarı zayıf olmayan gruba göre daha ılımlı, serum trigliserid düzeyleri daha düşük (p=0.003) ve ALT değerleri daha yüksekti (p=0.031).

Sonuç: Hepatositlerde sitokeratin 8/18 immun işaretleyicisi ile boyanma varlığının zayıf olan ve olmayan yağlı karaciğer hastalığı ayırıcı tanısında rolü olmamakla birlikte, granüler boyanma varlığı progresyonun bir göstergesi olabilir.

Anahtar kelimeler: Zayıf NAFLD, sitokeratin 8/18, biyopsi, immunhistokimya

B- İNGİLİZCE ÖZET

The Diagnostic Role of Cytokeratin 8/18 Immunohistochemical Marker for Lean NAFLD

Background and Aims: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the leading causes of chronic liver diseases. NAFLD spectrum begins from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), progressive fibrosis, cirrhosis, and even HCC. Although most NAFLD patients are overweight and obese, 30% are lean. We analyzed lean and non-lean NAFLD patients' liver biopsies for cytokeratin 8/18 immunohistochemical staining differences.

Material and Methods: Thirty biopsy-proven NAFLD patients (15 patients with BMI ≤ 25 kg/m², 15 patients with BMI > 25 kg/m²) were included in the study. Demographic, biochemical, and histologic features of the patients were recorded. Biopsy specimens from our archive were re-stained with cytokeratin 8/18 marker and were re-evaluated by a single expert hepatopathologist according to Brunt's classification, NASH-CRN scoring system, and FLIP algorithm.

Results: The presence of pathological granular staining with cytokeratin 8/18 marker in hepatocytes positively correlated with ballooning degeneration ($r=0.461$, $p=0.027$), the grade of lobular inflammation according to the FLIP algorithm ($r=0.461$, $p=0.027$), the grade of lobular inflammation according to the NAFLD activity score ($r=0.545$, $p=0.007$), presence of portal inflammation ($r=0.525$, $p=0.010$), age ($r=0.534$, $p=0.009$), gender ($r=0.464$, $p=0.026$), serum glucose value ($r=0.537$, $p=0.008$), direct bilirubin ($r=0.523$, $p=0.022$) and HbA1c ($r=0.758$, $p=0.029$) levels, and negatively correlated with hemoglobin ($r=-0.473$, $p=0.030$) and hematocrit ($r=-0.437$, $p=0.047$) levels. There was no significant difference in the presence or staining pattern of cytokeratin 8/18 marker between the two groups. In the lean NAFLD group, liver damage was milder, serum triglyceride levels were lower ($p=0.003$) and ALT values were higher ($p=0.031$) compared to the non-lean group.

Conclusions: Although the presence of cytokeratin 8/18 immune marker staining has no role in the differential diagnosis of lean and non-lean NAFLD, the presence of granular staining may be an indicator of progression.

Keywords: Lean NAFLD, cytokeratin 8/18 immunohistochemical marker, biopsy

II. GİRİŞ VE AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) kronik karaciğer hastalıklarının başta gelen nedenleri arasındadır (1). Dünya çapında prevalansı %25'i aşmaktadır (2). Hepatik transaminaz yüksekliğinin Amerika Birleşik Devletleri ve Birleşik Krallık'da en sık nedeni olarak NAFLD gösterilmektedir (3, 4). Genel populasyonla kıyaslandığında NAFLD, hastaların yaşam sürelerinde belirgin kısalma ile ilişkilidir (5). NAFLD tanılı hastalarda önde gelen ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklar olmasına rağmen steatohepatit ve siroz gelişimiyle hepatoselüler karsinom (HCC) dahil karaciğer ilişkili sebeplerle mortalite oranı artmaktadır (6).

NAFLD tanısında karaciğerde steatozun radyolojik olarak veya doku biyopsisiyle histolojik olarak gösterilmesi, kronik karaciğer hastalığı ile karaciğer yağlanması diğer olası sebeplerinin ve alkol kullanımının dışlanması gerekmektedir (7). NAFLD spektrumunda yer alan hastalıklar histolojik olarak non-alkolik yağlı karaciğer (NAFL) ile başlayıp non-alkolik steatohepatit (NASH) olarak devam etmektedir. NAFL'de steatozis varken NASH'de ek olarak hepatoselüler inflamasyon bulguları mevcuttur (8). NAFLD tanılı hastaların değişik çalışmalarda yaklaşık %90'a kadar çıkan oranında histolojik olarak basit steatoz mevcut olup bu hastalar spektrum içindeki en iyi prognoza sahip hastalardır (9, 10). NAFLD tanılı hastalar arasında %10 ile %30 arasında değişen oranlarda bildirilen NASH hastalarının %25-40'ında progresif karaciğer fibrozu gelişmekte, bu hastaların %20-30'unda da siroz gelişimiyle sonuçlanmaktadır (11, 12). NASH'e bağlı siroz gelişen hastalarda HCC insidansı artmakla birlikte NASH'de non-sirozik HCC görülme sıklığının da artış gösterdiği bilinmektedir (13).

Hepatik steatoz risk artışıyla ilişkili durumlar arasında insülin rezistansı, obezite, tip-2 diabetes mellitus, hipertansiyon, dislipidemi, bazı ilaçlar, nutrisyonel faktörler, metabolik hastalıklar, infeksiyonlar, bazı endokrinolojik bozukluklar yer almaktadır (7).

NAFLD risk artışıyla ilişkili faktörler arasında yaş, cinsiyet, genetik faktörler, etnik grup, metabolik sendrom varlığı ve nutrisyonel faktörler bulunmaktadır (8).

Tip-2 diabetes mellitus hastalarının %50-80'inde, obez hastaların yaklaşık %70'inde değişik nedenlerle yapılmış karaciğer görüntülemelerde NAFLD düşündürecek bulguların varlığına dair yayınlar mevcuttur (14, 15). Yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığı açısından benzer diyabetik olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında tip-2 diyabetik hastalarda hepatik steatoz yaklaşık olarak %80 daha fazla bulunmuştur (16).

NAFLD epidemiyolojisi incelendiğinde bu hastaların %70 kadarının normal kilonun üzerinde, %30 kadarının ise normal kiloda veya normal kilonun altında vücut ağırlığına sahip olduğu görülmektedir (17). Zayıf NAFLD terimi beden kitle indeksi (BMI) $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ olup alkol kullanımı olmaksızın hepatik steatoz varlığını ifade etmektedir (17). Bu hastalarda normal BMI'ye rağmen viseral yağlanmada artış ve karakteristik olarak obez hastalarda görülmesi beklenen metabolik disfonksiyon mevcuttur (17). Ancak patogenetik mekanizmalar net olarak ortaya konmuş değildir. Bu hastaların karaciğer biyopsi materyallerinin sitolojik incelenmesinde zayıf olmayan NAFLD'lardan ayırt ettirici noktaların bulunması hastalık patogenezi hakkında açıklayıcı bilgiler sunarak zayıf hastaların klinik takibine katkı sağlayacak öneriler sunabilir.

Sitokeratinler ara filaman proteinlerinin en önemli epitel spesifik alt grubudur (18). Sitokeratinlerin temel fonksiyonu hücreleri mekanik ve kimyasal streslerin neden olabileceği hücre ölümünden korumak olup ayrıca keratin tipi ve doku spesifik olmak üzere hücre sinyalizasyonu, stres cevabı ve apoptozda da görevleri olduğu bilinmektedir (18). Erişkin insan hepatositleri sitokeratin 8/18 eksprese eder ve bu sitokeratinler hepatositi apoptoz ve nekrozdand korur (19).

Karaciğer biyopsi materyallerinde yağlı karaciğer tanısının konulmasında ve steatohepatit ayırımında balonlaşma dejenerasyonu ve steatozisin gösterilmesi kritik önem taşır (20). Balonlaşma dejenerasyonunun değerlendirilmesinde ve yüzdelenmesinde patoloğlar arasında yaklaşım farklılıkları bulunabilmektedir (21). Tanıda objektif belirleyici arayışları devam etmekte olup sitokeratin 8/18'in balonlaşma dejenerasyonu gösteren hepatositlerin membranlarında boyanma göstermezken normal hepatositlerde hem membranöz hem sitoplazmik boyanma göstermesi bu konudaki çalışmalarını yoğunlaştırmıştır (22).

Tanıyı kolaylaştıracak marker arayışının yanında zayıf olan ve olmayan NAFLD tanılı hastalar arasında bu marker açısından farklılık olup olmadığının araştırılması yeni tanısal stratejilerin geliştirilmesini sağlayabilir.

Literatürde zayıf NAFLD patofizyolojisi, zayıf olmayan NAFLD tanılı hastalarla karşılaştırıldığında metabolik parametrelerdeki farklılıklarına ilişkin çalışmalar olmakla birlikte zayıf NAFLD ile zayıf olmayan NAFLD tanılı hastaların karaciğer biyopsilerinde sitokeratin 8/18 ekspresyonu açısından farklılıkları araştırılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada zayıf olan ve olmayan NAFLD tanılı hastaların karaciğer biyopsi materyallerinde sitokeratin 8/18 boyanması açısından farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

III. GENEL BİLGİLER

A- NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI

1. Tanım

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) karaciğerde basit yağlanmadan siroz ve organ yetersizliğine kadar gidebilen bir karaciğer hastalığı spektrumu olarak tanımlanmaktadır (23). NAFLD tanısının konulabilmesi için histolojik olarak veya görüntüleme yöntemleriyle hepatik steatoz kanıtlarının olmasıyla birlikte karaciğerde sekonder yağlanmaya sebep olabilecek alkol tüketimi, steatojenik ilaçların uzun süre kullanımı veya herediter monogenik bozuklukların olmaması gerekmektedir (24). NAFLD histolojik olarak non-alkolik yağlı karaciğer (NAFL) olarak tanımlanan %5 veya daha fazla hepatik steatoz ile birlikte balonlaşma dejenerasyonu formunda hepatoselüler hasar kanıtının olmaması (basit yağlı karaciğer) ve non-alkolik steatohepatit (NASH) olarak tanımlanan %5 veya daha fazla hepatik steatoza fibroz olsun veya olmasın inflamasyon ve hepatoselüler hasar kanıtlarının eşlik etmesi tablolarına ayrılmaktadır (24).

2. Hastalığın tarihçesi

Yağlı karaciğer terimi ilk kez *Thomas Addison* tarafından 1836'da Birleşik Krallık'da kullanılmıştır (25). Avusturyalı patolog *Karl baron von Rokitansky* 1839 yılında yaptığı otopsi çalışmaları neticesinde karaciğerde yağ birikiminin fibrosis gelişimi ve siroza neden olabileceği fikrini öne sürmüştür (26). Diyabetik bir hastada yağlı karaciğeri ilk kez *William Pepper* 1884'de bildirmiştir (27). *Roberts Bartholow* 1885'de obezite ve yağlı karaciğer arasında bağlantı olabileceğini bildirmiştir (28). Patolog *Mallory* 1911'de kendi ismiyle anılan Mallory cisimciklerini katlanması bozulmuş sitokeratin, übikitin ve çeşitli ısı-şok proteinlerinden oluşan düzensiz filamentöz yapılar olarak ilk defa alkolik sirozda tarif etmiştir (29). *Charles Connor* 1938'de diyabetik hastalarda yağlı karaciğer varlığının siroz gelişimine neden olabileceğini özofagus varis kanaması geçiren iki diyabetik vaka ile rapor etmiştir (30). *Westwater ve Feiner* 1958'de obez hastaların karaciğerlerinde yağlanmanın histolojik bulgularını rapor etmiş olup *Elizabeth Brunt* ve arkadaşları tarafından yayınlanan derlemede alkolik karaciğer hastalığındaki histolojik değişikliklerin obez ve diyabetik hastaların karaciğerlerindeki histolojik değişikliklerle gösterdiği benzerliklere değinilmiştir (31). *Heribert Thaler*'in 1962 yılında klinik ve patolojik tanımlamalarını takip eden yıllarda

obez ve diyabetik hastalarda yağlı karaciğer hastalığı ile ilgili birçok yayın literatüre eklenmiştir (31). *Jurgen Ludwig* ve arkadaşları 1980'de histolojik olarak alkolik yağlı karaciğere benzeyen ancak alkol kullanımı olmayan hastalarda gözlenen yağlı karaciğer hastalığının progresif formunu tanımlamak için NASH terimini literatüre kazandırmışlardır (32). *Ludwig*'in çoğu kadın ve diyabetik olan 20 hastalık serisinde lobüler hepatit, inflamatuvar infiltratlar, Mallory cisimcikleri, fokal nekroz, fibroz ve 3 hastada siroz rapor edilmiştir (32). *Moran* ve arkadaşları 1983'de transaminaz yüksekliği olan 3 obez çocukta steatohepatit bildirmiştir (33). *Fenton Schaffner* ve *Heribert Thaler* 1986'da ilk kez NAFLD terimini kullanmıştır (34). *Diehl, Goodman* ve *Ishak* 1988'de nütrisyonel veya hormonal faktörlerin karaciğer histolojisinde alkol benzeri değişiklikler yapabileceğini öne sürmüştür (35). Aynı yılda *Thaler* günümüzdeki NASH skorumu sistemlerinde kullanılan hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu terminolojisini ilk kez kullanmıştır (36).

1990'lardan sonra NASH ve NAFLD ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. *Bacon* ve arkadaşları 1994'de normal kiloda, diyabetik olmayan ve kan lipid düzeyleri normal aralıkta olan kişilerde de NASH görülebileceğini bildiren çalışmalarını yayınlamışlar bu tarihe kadar daha çok obez ve diyabetiklerin hastalığı olarak görülen durumu değiştirmiştir (37). *Amadeo Lonardo* 1995'de yağlı karaciğer hastalarındaki ultrasonografik olarak parlak görünüme dikkat çekmiş olup aterosklerozla ilişki kurmuştur (38). *Christopher Day* ve *Oliver James* 1998'de NAFLD kohortlarında siroz oranlarının değişiklik gösterdiğini fark ederek yaptıkları patofizyolojik çalışmalarda oksidatif stres ve sitokinlerin NASH'de inflamasyon ve nekroz üzerinde etkili olduğunu desteklemiştir (39). *Matteoni* ve arkadaşları 1999'da yaptıkları çalışmada basit yağlı karaciğer ve NASH gruplarının histopatolojik ve prognostik açıdan farklı değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuşlardır (40). *Elizabeth Brunt* ve arkadaşları 1999'da hepatik steatoz, balonlaşma nekrozu ve lobüler/portal inflamasyon varlığına göre NASH'de aktivite derecelendirilmesi ve fibroz sınıflamasıyla ilgili ilk histolojik skorumu sistemini önerdikleri makalelerini yayınlamışlardır (41). *The NASH Clinical Research Network (NASH CRN)* tarafından *Kleiner* ve arkadaşları önderliğinde 2005'de yayınlanan ve tüm NAFLD spektrumunu ele alarak klinik çalışmalarda semikantitatif olması dolayısıyla günümüzde de kullanılmaya devam edilen NAFLD aktivite skoru (NAS) dünya çapında kabul gören ilk NAFLD skorumu sistemidir (42). *Bedossa* ve arkadaşları 2012'de NASH'nin histolojik tanısını standardize etmek amacıyla steatoz skoru, aktivite derecesi ve fibrosis düzeyini birleştiren bir tanısal algoritma yayınladılar (43). *The Fatty Liver Inhibition of Progression (FLIP)* konsorsiyumu *Bedossa* ve arkadaşlarının yayınladığı algoritmayı kabul edip doğrulamıştır (43). SAF skorumu sistemi (Steatozis, Aktivite, Fibroz) karaciğer

hasarının semikantitatif olarak ele alınmasında NAS ile aynı değişkenleri kullanmasına rağmen, FLIP algortiması NASH tanısı için steatozis, balonlaşma ve lobuler inflamasyonun eş zamanlı olarak birlikte bulunmasını gerektirmektedir (43). Çalışmaların hızla devam ettiği bu alanda hastalıkla ilgili bilinci arttırmak, alkol ile ilgili stigmatizasyonu engellemek amacıyla nomenklatür konusunda getirilen yeni öneriler arasında 2019'da bildirilen metabolik disfonksiyonla ilişkili yağlı karaciğer hastalığı (MAFLD) yer almaktadır ancak bu terminoloji hedeflenenin ilerisinde steatozisle giden diğer metabolik karaciğer hastalıklarını da kapsamaktadır (44).

3. Epidemiyoloji

Kronik karaciğer hastalıkları dünya çapında yılda yaklaşık 2 milyon ölümden sorumlu olup bu ölümlerin yarısı siroz komplikasyonlarına ve diğer yarısı da hepatoselüler karsinom (HCC) ve viral hepatitlere bağlıdır (45). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2019'da karaciğer sirozu tüm ölüm nedenleri arasında 11. sırada yer almaktadır (46). Karaciğer sirozunun en sık nedenleri bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Batı ülkelerinde NAFLD ve alkole bağlı karaciğer hastalıkları en sık nedenler olarak öne çıkarken doğuda hepatit B karaciğer sirozunun en sık nedeni olmaya devam etmektedir (47).

Kronik karaciğer hastalıkları içinde NAFLD sıklığı giderek artmaktadır. Son 30 yıl içinde NAFLD prevalansı 391.2 milyondan 882.1 milyona çıkmıştır (1). NAFLD spektrumunda yer alan NASH'nin karaciğer sirozuna ve siroz zemininde olmaksızın hepatoselüler karsinoma (HCC) yol açma riskinden dolayı NAFLD prevalansındaki artış endişe vericidir (6). Dünya çapında görüntüleme yöntemleriyle tanı konulmuş NAFLD prevalansı %25.24 olup bölgelere göre değerlendirildiğinde en yüksek prevalans %31.79 ile Orta Asya ve %30.45 ile Güney Amerika'da, en düşük prevalans %13.48 ile Afrika'da rapor edilmiştir (48). NAFLD hastaları arasında bir klinik endikasyonla karaciğer biyopsisi yapılanlarda NASH prevalansı %59.1 olarak görülmüşken herhangi bir spesifik endikasyon olmaksızın (karaciğer donörlerinde random biyopsi gibi) yapılan karaciğer biyopsilerinde NASH prevalansı %6.6 ile %29.8 arasında bulunmuştur (48). Meta-analizlere göre genel popülasyonda NASH prevalansı %1.5 ile %6.4 arasında değişmektedir (48).

4. Risk faktörleri ve eşlik eden hastalıklar

Hepatik transaminaz yüksekliğinin Amerika Birleşik Devletleri ve Birleşik Krallık'da en sık nedeni olarak NAFLD gösterilmektedir (3, 4).

NAFLD tanılı hastalarda serum trigliserid (TG) yüksekliği ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterol düşüklüğü olduğu bilinmektedir (49). NAFLD tanılı hastalarda düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol yüksekliğinin %65'lerin üzerinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (50). Endokrinoloji kliniklerinde takipli dislipidemili hastalarda NAFLD oranının yaklaşık %50 olduğu bildirilmektedir (51).

Tip 2 diyabet, NAFLD ile güçlü bir birliktelik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda tip 2 diyabetik hastalarda %32 ile % 70 arasında değişen oranlarda NAFLD görüldüğü belirtilmektedir (52).

Obezite şimdiye kadar NAFLD ile en çok ilişkilendirilmiş ve üzerinde çalışılmış risk faktörü olarak öne çıkmaktadır. Bariyatrik cerrahi geçiren morbid obez hastalar incelendiğinde değişik çalışmalarda %95'e kadar çıkan NAFLD oranları bildirilmektedir (53). Bununla beraber sadece morbid obezite değil obezitenin tüm spektrumunda NAFLD oranlarının normal kilodaki popülasyona göre yüksek olduğu bildirilmektedir (24).

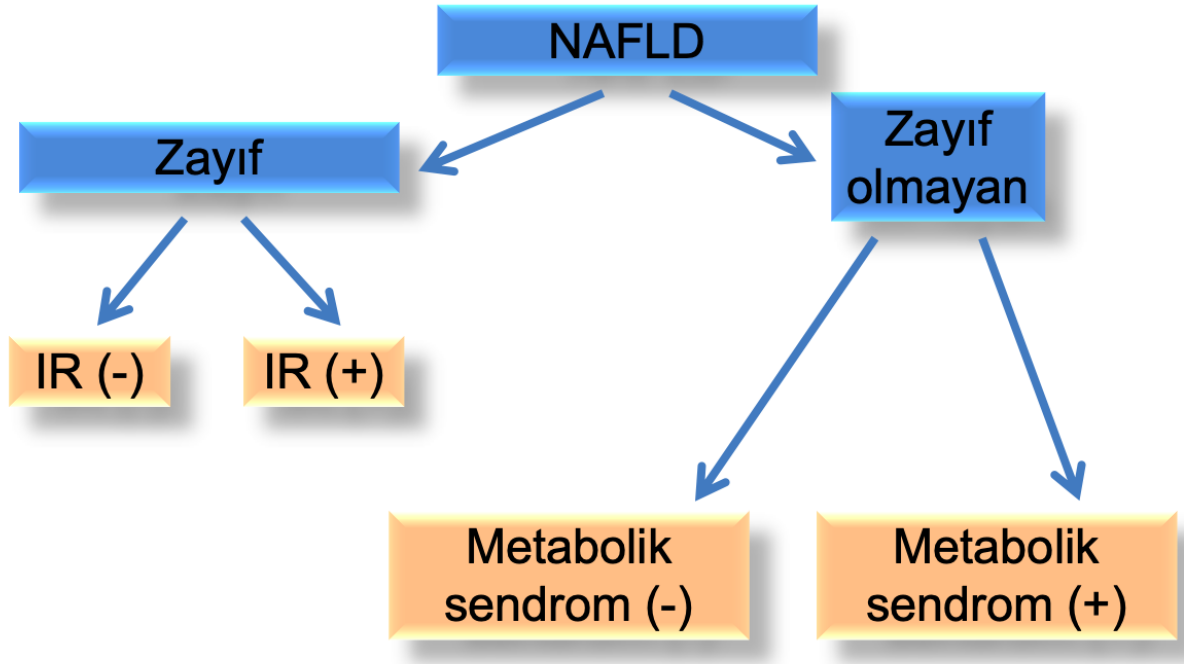
NAFLD vakalarının çoğunda bulunan dislipidemi, tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon gibi metabolik risk faktörleri metabolik sendromla (2001 yılında kabul edilen *Adult Treatment Panel III* kriterlerine göre metabolik sendrom tanısı için bel çevresinin erkeklerde 102 cm ve üzerinde, kadınlarda 88 cm ve üzerinde olması; serum trigliserid seviyesinin 150 mg/dL ve üzerinde bulunması veya hipertrigliseridemi için ilaç tedavisi kullanılıyor olması; serum HDL kolesterol seviyesinin erkeklerde 40 mg/dL ve kadınlarda 50 mg/dL'nin altında bulunması; arteriyel tansiyonun 130/85 mmHg ve üzerinde bulunması veya hipertansiyon nedeniyle ilaç tedavisi kullanılıyor olması; açlık plazma glukoz değerinin 100 mg/dL ve üzerinde saptanması veya antidiyabetik ilaç tedavisi kullanılıyor olması kriterlerinden en az 3 tanesinin karşılanıyor olması gerekmektedir) NAFLD birlikteliğini yansıtmaktadır (54).

Genetik araştırmalar NAFLD ile ilişkili olduğu gösterilen bazı genetik varyantlar ve polimorfizmlerin varlığını göstermektedir. Varlığı karaciğerde lipid depolanması ve NAFLD histolojik ciddiyetinde artışla ilişkili olduğu gösterilen PNPLA-3 (protein-3 içeren patanın benzeri fosfolipaz domain/adiponutrin/acilgliserol O-aciltransferaz/kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 epsilon) alelinde tek nükleotid polimorfizm rs738409 CG varyantının NAFLD açısından en önemli genetik komponent olduğu düşünülmektedir (55). TM6SF2 (transmembran 6 superalesi üye 2) geni rs58542926 varyantlarındaki çeşitli mutasyonların karaciğer trigliserid içeriğinde artışla beraber dolaşımdaki lipoprotein içeriğinde azalmaya neden olarak NAFLD progresyon riskini arttırdığı, bununla beraber kardiyovasküler hastalık riskini düşürdüğüne ilişkin yayınlar mevcuttur (56). GCKR (glukokinaz düzenleyici gen) geni üzerindeki rs780094 varyantının karaciğerde lipid birikimiyle orta düzeyde ilişkili

olduğu ile ilgili araştırmalar mevcuttur (57). MBOAT7 (protein-7 içeren membrana bağlı O-aciltransferaz domain/lizofosfolipid aciltransferaz-7) rs641738 varyantı ile hepatik fibrozis ve NAFLD'da HCC'ye progresyon arasında ilişki olduğuna dair veriler mevcuttur (58).

NAFLD tanılı hastaların %70 kadarının normal kilonun üzerinde, %30 kadarının ise normal kiloda veya normal kilonun altında vücut ağırlığına sahip olduğu görölmektedir (17). Bu noktada normal kiloda veya normal kilonun altında vücut ağırlığına sahip olan hastaları tanımlamak için devreye giren zayıf NAFLD terimi beden kitle indeksi (BMI) $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ olup alkol kullanımı olmaksızın hepatik steatoz varlığını ifade etmektedir (17). Bu hastalarda normal BMI'ye rağmen visceral yağlanmada artış ve karakteristik olarak obez hastalarda görölmeye beklenen metabolik disfonksiyon mevcuttur (17). Obez bireylerin %30'lara varan bölümünde NAFLD da dahil olmak üzere obeziteyle ilişkili herhangi bir metabolik veya kardiyak disfonksiyon kanıtı olmadığına ilişkin yayınlar mevcuttur (59). Bu bireyler için metabolik olarak sağlıklı obezite terminolojisi kullanılmaktadır (59). Bu duruma benzer şekilde normal vücut ağırlığına sahip bireylerin %30'lara varan bölümünde NAFLD görölmeye olup bu bireyler "zayıf NAFLD" veya "metabolik olarak sağlıksız normal tartılı NAFLD" olarak değerlendirilmektedir (60). Zayıf NAFLD olarak değerlendirilen hastalar için Caucasian ırklarında BMI sınırı 25 kg/m^2 olarak kabul edilirken, Asya kaynaklı yayınlarda 23 kg/m^2 olarak kabul edilmektedir (61).

NAFLD tanılı hastaların yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı populasyona göre tüm nedenlere bağlı mortalitesinin daha yüksek olduğu ve yaşam süresinde kısılmanın belirgin olduğu bilinmektedir (5). Kardiyovasküler nedenler NAFLD tanılı hastaların ölüm nedenleri arasında ilk sırada gelmektedir (62). Karaciğer ilişkili ve kanser ilişkili ölümler NAFLD tanılı hastalarda kardiyovasküler ölümlerden sonra gelmektedir (63). Histolojik olarak NASH tanılı hastaların karaciğer ilişkili ölüm oranları daha yüksektir (64). Amerika Birleşik Devletlerinde HCC'nin en sık 3. sebebi olarak NAFLD gösterilmektedir (65). Yine Birleşik Devletlerde yapılan bir çalışmada HCC tanılı hastaların yaklaşık %13'ünün sirotik zeminde olmadığı görölmüş ve diğer faktörlerle beraber NAFLD non-sirotik zeminde HCC ile ilişkili bulunmuştur (66). NAFLD tanılı hastalarda uzun dönem mortalitenin en önemli histolojik belirleyicisi fibrozisdir (67).



Şekil 1. NAFLD tanılı hastaların dağılımı. NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, IR: insülin direnci

5. Tanı ve skora sistemleri

Hastaların çoğu asemptomatiktir veya yorgunluk gibi non spesifik semptomlar bildirmektedir (68). Bazı hastalar sağ üst kadranda ağrısı tarif etmektedir (69). Genellikle farklı bir semptomun araştırılmasında veya tarama amaçlı yapılan görüntüleme yöntemlerinin kullanımının artmasına bağlı olarak hepatik steatoz kanıtlarının görülmesiyle hastalar yönlendirilmektedir. Hastalığa spesifik bir fizik muayene bulgusu olmamakla birlikte abdominal obezite, dorsoservikal lipohipertrofi, akantozis nigrikans, hepatomegali görülebilmektedir (70). Sirozun geliştiği evrelerde ise palmar eritem, *spider* anjioma, jinekomasti, assit, splenomegali, sarılık, *flapping* tremor, *caput medusae* gibi sirozla ilişkili fizik muayene bulguları görülebilmektedir.

Laboratuvar bulguları arasında alanin aminotransferaz (ALT) yüksekliği hastalık progresyonuyla ilişkili olabilirse de biyopsiyle doğrulanmış NASH tanılı hastaların %30-60

kadarında ALT normal aralıkta bulunabilmektedir (71). ALT yüksekliğinin NASH tanısında sensitivitesi %45 ve spesifisitesi %85 olarak bildirilmektedir (72). Fibroz gelişimine bağlı olarak aspartat aminotransferaz (AST) klirensinin azalmasının da katkısıyla AST/ALT oranının 1'in üzerinde olması ilerlemiş fibrozu düşündürmektedir (73).

NAFLD düşünülen hastalar için ileri fibroz riskini değerlendirmek amacıyla klinikte kolayca uygulanabilecek skorlama sistemleri bulunmaktadır. Pratikte en çok kullanılanları NAFLD fibroz skoru, FIB-4 indeksi, BARD skoru ve APRI skorudur. Bu skorlama sistemleri 35 yaş altı ve 65 yaş üzeri hastaların değerlendirilmesi için uygun olmayıp farklı kestirim değerleri ile bu yaşlarda doğruluğun arttığını öne süren çalışmalar mevcuttur (74).

NAFLD fibroz skoru (NFS) NAFLD hastalarında fibroz olasılığını değerlendirmede kullanılmaktadır (75). Hastanın yaşı, BMI değeri, serum glukoz düzeyi, aminotransferaz değerleri, platelet sayısı ve serum albumin değerlerini kullanarak fibroz olasılığı ve prognoz hakkında fikir vermektedir (75). NAFLD fibroz skorunun 0.676'dan yüksek bulunmasının ileri fibroz (F3 ve F4) için %82 pozitif prediktif değere sahip olduğu ve -1.455'den düşük olmasının %88 negatif prediktif değerle ileri fibroz dışatabileceği bildirilmektedir (75).

FIB-4 indeksi orijinal olarak insan immünyetmezlik virusu (HIV) ve hepatit C virus (HCV) koenfeksiyonu olan hastalarda karaciğer fibroz riskini değerlendirme amacıyla geliştirilmiştir (76). Daha sonra NAFLD'da ileri fibroz riskinin değerlendirilmesiyle ilgili çalışmalar yayımlanmıştır (77, 78). FIB-4 indeksinde yaş, ALT, AST ve platelet sayısı değerleri kullanılmaktadır (76). Orijinal makalede FIB-4 indeksinin 1.45'in altında bulunması durumunda %90 negatif prediktif değerle ileri fibrozun dışlanabileceği, 3.25 ve üzerinde olması durumunda %65 pozitif prediktif değerle ileri fibroz riskinin mevcut olduğu belirtilmektedir (76). NAFLD'da yapılan çalışmalarda kestirim değerleri 1.3-2.67 olarak yayımlanmış olup 2.67 ve üzerinde pozitif prediktif değerinin %80 olduğu, 1.3 değerinin altında ise ileri fibroz %83 negatif prediktif değerle dışatabileceği rapor edilmiştir (78).

BARD skoru NAFLD hastalarında fibroz riskini belirleme amacıyla geliştirilmiştir (79). BARD skorunun hesaplanmasında BMI, AST/ALT oranı değerleri ve diabetes mellitus varlığı kullanılmaktadır (79). BARD skoru 0-1 ise ileri fibroz riski düşük, 2-4 ise yüksek olduğu bildirilmiştir (79).

AST/platelet oranı indeksi (APRI) ilk olarak HCV, HCV ve HIV koenfeksiyonu ve alkolik karaciğer hastalığında ileri fibroz riskini değerlendirme amacıyla kullanılmıştır (80-82). APRI skoru 0.5'den düşükse fibroz riskinin düşük olduğu, ancak 1.5 veya daha fazlaysa fibroz riskinin arttığı bildirilmiştir (82). NAFLD'da APRI skorunun fibroz derecesi arttıkça artış gösterme eğiliminde olduğu, bu açıdan kullanışlı olabileceği belirtilmektedir (83). APRI

skorunun negatif prediktif değeri pozitif prediktif değerinden daha yüksek olup düşük değerleri fibrozu dışlamada daha güvenilirken yüksek değerleri sirozu ayırt etmede fazla sensitif değildir (82).

NAFLD’da kullanılabilecek hepatik steatoz varlığını değerlendiren non-invazif skorlama sistemleri de tanımlanmıştır.

Fatty liver index (FLI) bel çevresi, BMI, gama glutamil transferaz (GGT) ve serum trigliserid seviyeleri kullanılarak hesaplanmaktadır (84). FLI değeri 30’dan küçük ise yağlı karaciğer açısından risk düşük, 60 ve üzerinde ise risk yüksek olarak tanımlanmaktadır (84).

Hepatic steatosis index (HSI) cinsiyet, BMI, AST, ALT ve diabetes mellitus varlığı bilgileri kullanılarak hesaplanmaktadır (85). HSI değeri 30’un altında ise NAFLD tanısından büyük ölçüde uzaklaşırken 36 ve üzerindeki değerler yüksek riskli kabul edilmektedir (85).

NAFLD-Liver fat score (NAFLD-LFS), metabolik sendrom varlığı, diabetes mellitus varlığı, açlık serum insülin düzeyi, AST ve ALT kullanılarak hesaplanmaktadır (86). Değerlendirmede -0.640 düzeyinin altındaki değerlerde NAFLD tanısından uzaklaşırken, bu düzeyin üzerindeki skorlar yüksek riskli kabul edilmektedir (86).

NAFLD tanısı için histolojik olarak veya görüntüleme yöntemleriyle hepatik steatozun gösterilmesiyle birlikte karaciğerde yağlanmaya sebep olabilecek sekonder durumların ve alkol kullanımının dışlanması gerekmektedir (24). Erkekler için günde 30 g ve üzeri, kadınlar için 20 g ve üzeri alkol tüketiminin bulunması alkolik karaciğer hastalığı varlığını işaret eder (87). Kabul edilen limitlerin üzerinde alkol kullanımı dışında hepatik steatoza sebep olabilecek sekonder durumlar arasında ilaçlar (tamoksifen, kortikosteroidler, amiodaron, methotreksat, östrojenler, valproik asit, antiretroviral ilaçlar), infeksiyonlar (HCV-özellikle genotip 3-ve HIV gibi), bazı metabolik hastalıklar (Wilson hastalığı, Andersen hastalığı, Weber-Christian hastalığı, lipodistrofiler, hipobetalipoproteinemi, abetalipoproteinemi) gösterilebilmektedir (7).

Karaciğerde steatozun belirlenmesinde kullanılan görüntüleme teknikleri arasında ultrasonografi kolay ulaşılabilen ve ucuz bir modalitedir. Steatoz oranı %33’ün üzerinde olduğunda ultrasonografinin sensitivitesi %93 iken, steatoz oranı %30’un altında olan vakalarda sensitivite düşmektedir (88). Bununla birlikte obez hastalarda ultrasonografinin teknik kısıtlılıkları ve operator bağımlı olması kullanımını sınırlandırmaktadır. Bilgisayarlı tomografi radyasyon içermesi, maliyeti ve sensitivite açısından ultrasonografiye ilave bir katkısı olmamasından dolayı bu endikasyonda tercih edilmemektedir. Magnetik rezonans spektroskopinin steatoz oranı %5.5’in üzerindeki vakalarda sensitivitesi %100’e yakındır ancak ileri validasyon gerektirmesiyle beraber maliyeti yüksektir ve kullanımı sınırlıdır (89).

Magnetik rezonans elastografi karaciğer içinde büyük alanlarda sertlik açısından kantitatif haritalama yaparak fibroza yönelik bilgi veren bir tekniktir; ancak karaciğerde demir depolanmasının arttığı durumlarda teknik açıdan güvenilirliği azalmaktadır (90). Kullanım yaygınlığının az olması ve maliyetinin yüksek olmasına rağmen başarılı sonuçlar sunmaktadır (90).

Transient elastografi karaciğer sertliğini ölçen invazif olmayan, mekanik titreşim kaynağının dokuya uygulanarak dalgaların ultrason dedektörüyle algılanmasına dayanan bir yöntemdir (91). Yatak başında uygulanabilir. Karaciğerde fibrozu artan sertlik derecesiyle korele bir şekilde gösterir (92). İnterkostal aralıklardan akustik pencere bulunan bölgelerde sınırlı derinlikte ölçüm yapması, karaciğerin tamamını değerlendirememesi, obez hastalarda güvenilirliğinin azalması negatif yönleridir (90).

Magnetik rezonans elastografi ve *transient* elastografi karaciğerde sertliği ölçerek hepatik fibrozu yüksek doğruluk oranlarıyla gösterebilen teknikler olmasına rağmen tanısal açıdan standardizasyon ve ileri validasyona ihtiyaç duyan modalitelere (91).

NAFLD tanısı için altın standart yöntem karaciğer biyopsisidir (93). NAFLD'da karaciğer biyopsisi endikasyonları tanıyı doğrulamak veya dışlamak, karaciğerdeki hasarı ve derecesini tespit etmek, karaciğer sirozunu düşündürecek periferik bulgular, splenomegali, sitopenilerin varlığı, hepatik steatoza yol açabilecek diğer etyolojilerin ve kronik karaciğer hastalıklarının biyopsi dışı yöntemlerle dışlanamamış olmasıdır (24).

Karaciğer biyopsisinin en sık komplikasyonu ağrı olup kanama (subkapsüler, intraperitoneal, hemobili), biliyer peritonit, pnömotoraks, plevral effüzyon, pnömoni, sepsis, hemotoraks, arteriovenöz fistül, lokal anesteziye karşı reaksiyon, yakın organların biyopsisi (akciğer, safra kesesi, böbrek, kolon), ölüm komplikasyonları bildirilmiştir (94). Elektif karaciğer biyopsisinde tüm nedenlere bağlı mortalite riski %0.2 olup doğrudan karaciğer ilişkili mortalite riski %0.01 olarak belirtilmektedir (95).

Geniş kalibreli iğnelerle yapılan biyopsilerde ince iğnelere göre daha kaliteli örnekler elde edilir (96). Uzunluk olarak 2 cm'den kısa örneklerin değerlendirilmesi oldukça güçtür (96). Küçük biyopsi materyalleri fibroz derecesinin olduğundan daha düşük olarak değerlendirilmesine yol açabilir (97).

6. Histolojik Bulgular

Histolojik olarak sadece steatoz, hepatosit balonlaşması olmadan lobuler veya portal inflamasyon bulgularına eşlik eden steatoz veya inflamasyon kanıtı olmaksızın hepatositlerde balonlaşmanın eşlik ettiği steatoz kanıtlarından herhangi birinin varlığı NAFL olarak tanımlanmaktadır (98).

NASH tanısının histolojik olarak konulabilmesi için hepatik steatoza hepatosit hasarı bulguları (tipik olarak balonlaşma dejenerasyonu formunda) ve özellikle zon 3'de izlenen hepatik lobuler inflamasyon kanıtlarının birlikte eşlik etmesi gerekmektedir (99). Fibrozun olup olmaması NASH tanısını değiştirmez (98). Hastalık ciddiyeti arttıkça zonal ayırım kaybolabilmektedir (98).

NASH'e eşlik edebilen histolojik bulgular arasında *Mallory-Denk* cisimcikleri (MDB), megamitokondri, asidofil apoptotik cisimcikler, orta dereceli portal inflamasyon bulguları, periportal hepatositlerde glikojenize vakuollü nukleus, periportal hepatositlerde orta dereceli siderozis, portal alanda fibroz, tipik olarak makronoduler veya mikst siroz sayılabilir (100).

a. Steatoz

Hepatosit sitoplazmasındaki lipid damlacıklarının büyüklüğü ve yerleşimine göre hepatik steatoz makroveziküler ve mikroveziküler olmak üzere ikiye ayrılır (101). Makroveziküler steatozun da kendi içerisinde iki ayrı formu mevcuttur (102). Nukleusu periferite iten iri lipid damlacıklarının sitoplazmayı doldurduğu formuna büyük damlacık makroveziküler steatoz ismi verilirken, çeşitli şekillere sahip çok sayıda küçük lipid damlacıklarının sitoplazmayı doldurduğu ancak nukleusun santraldeki yerini koruduğu formuna küçük damlacık makroveziküler steatoz ismi verilmektedir (102). Küçük damlacık makroveziküler steatoz, mikroveziküler steatozla karıştırılmamalıdır. Mikroveziküler steatozda sayısız uniform minik lipid vakuelleri sitoplazmayı doldurarak hepatosite köpüksü bir görünüm vermektedir (102). NAFLD'da gözlenen hepatik steatoz formu temel olarak makroveziküler steatoz olup yamasal tarzda mikroveziküler steatoz odakları içerebilmektedir (102).

Hepatositlerin %5'den azını ilgilendiren steatoz klinik olarak anlamlı kabul edilmemektedir (41). Steatotik hepatosit oranı %5-33 arasında ise 1. derece (ılımlı, *grade 1*), %34-66 arasında ise 2. derece (orta, *grade 2*) ve %66'dan fazla ise 3. derece (ciddi, *grade 3*) olarak sınıflandırılmaktadır (41).

NAFLD'da steatoz genellikle santral ven çevresinde (zon 3) bulunur (102). Hastalık ilerledikçe tüm zonları etkileyebilir (102). Zonal dağılım göstermeyen steatoz hastalık regresyonunda veya siroza progresyon aşamasında görülebilir (102).

b. Hepatoselüler hasar

NASH'de izlenen hepatoselüler hasar balonlaşma dejenerasyonu, apoptoz veya litik nekroz formunda olabilir (41). Varlığı en değerli olan hepatoselüler hasar bulgusu özellikle agresif hastalık ve siroz insidansında artışla ilişkili prognostik önemi bulunmasından dolayı balonlaşma dejenerasyonudur (40). Balonlaşmış hepatositler, soluk sitoplazmalı, geniş hiperkromatik nukleus ve belirgin nukleolus içeren büyük hücrelerdir (22). Balonlaşmanın hücrenin şeklini veren hücre iskeleti elemanlarından ara filamanlarda meydana gelen değişiklikler sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (103). Ara filaman proteinlerinin en önemli epitel spesifik alt grubu sitokeratinlerdir. (18). Sitokeratinlerin temel fonksiyonu hücreleri mekanik ve kimyasal streslerin neden olabileceği hücre ölümünden korumak olup ayrıca keratin tipine ve dokuya spesifik olmak üzere hücre sinyalizasyonu, stres cevabı ve apoptozda da görevleri olduğu bilinmektedir (18). Erişkin insan hepatositleri sitokeratin 8/18 eksprese eder ve bu sitokeratinler hepatositi apoptoz ve nekrozdan korur (19). Sitokeratin 8/18 balonlaşma dejenerasyonu gösteren hepatositlerin membranlarında boyanma göstermezken normal hepatositlerde hem membranöz hem sitoplazmik boyanma göstermektedir (22). Balonlaşma dejenerasyonu gösteren hepatositlerin sitoplazmalarında genellikle katlanması bozulmuş hiperfosforile ara filamanlar, übikitin ve übikitin bağlayıcı protein P62'den oluşan eosinofilik iplikli materyal MDB'ler bulunmaktadır (19).

Hastalığın erken evrelerinde balonlaşmış hepatositlerin en yoğun bulunduğu bölge santral ven çevresi olup hastalık ilerledikçe zonal dağılım kaybolabilmektedir (102).

c. Lobuler inflamasyon

NASH'de hepatik lobullerde görülen kronik inflamasyon baskın olarak santral ven çevresinde görülmekte olup özellikle lenfositler, nadir plazma hücrelerinden oluşan yamasal infiltratlardan oluşmaktadır (102).

Lobuler inflamasyonun değerlendirilmesi her 200 büyütme mikroskop alanında görülen inflamatuvar odakların sayısına göre 0 ile 3 arasında derecelendirilerek yapılmaktadır (42). Hiç inflamatuvar odak yoksa 0. derece (*grade 0*), her 200 büyütme mikroskop alanı başına 2

odaktan az ise 1. derece (*grade 1*), 2-4 arası inflamatuvar odak varsa 2. derece (*grade 2*), 4'ten fazla inflamatuvar odak varsa 3. derece (*grade 3*) olarak değerlendirilmektedir (42).

7. Histolojik Skorlama Sistemleri

a. NAFLD aktivite skoru (NAS)

NAS skorlama sistemi NAFLD histolojik bulgularının nitelendirilip kantite edilerek klinik araştırmalara uyarlanması amacıyla geliştirilmiştir (42). Bu sistem steatozis (0-3 puan), lobuler inflamasyon (0-3 puan) ve balonlaşma dejenerasyonunun (0-2 puan) yansıttığı hepatoselüler hasarın ağırlıklandırılmamış bir şekilde toplamda 0 ile 8 arasında puanlandırılmasına dayanmaktadır (42).

Steatozisin değerlendirilmesinde parankimin %5'inden azını ilgilendiren steatozis varlığı 0 puan, %5-33 arasını ilgilendiren steatozis varlığı 1 puan, %33'ten fazla ancak %66'dan azını ilgilendiren steatozis varlığı 2 puan, %66'dan fazla steatozis varlığı 3 puan almaktadır (42).

Lobuler inflamasyonun değerlendirilmesinde her 200 büyütme mikroskop sahasında bulunan inflamatuvar odakların sayısı dikkate alınmaktadır. Hiç odak bulunmaması 0 puan, saha başına 2'den az odak bulunması 1 puan, 2-4 arası odak bulunması 2 puan, 4'ten fazla odak bulunması 3 puan almaktadır (42).

Balonlaşma dejenerasyonunun değerlendirilmesinde hiç balonlaşmış hücre olmaması 0 puan, seyrek balonlaşmış hücreler bulunması 1 puan ve yaygın balonlaşma 2 puan almaktadır (42).

Fibroz hem daha az geriye döndürülebilir olmasından hem de genel olarak hastalık aktivitesinin bir sonucu olarak görülmesinden dolayı aktivite skorlamasına dahil edilmeyip ayrı olarak değerlendirilmektedir (42). NAFLD'da izlenen fibroz santral ven ve zon 3 hepatositlerin çevresinden başlamaktadır (99). Kollajen liflerinin hepatositleri çevreleyip sinüzoidler boyunca yayılmasından dolayı periselüler ve perisinüzoidal fibroz terimleri bu süreci tanımlamak için birbiri yerine kullanılabilir (102). NAS sistemine göre fibroz evrelemesinde fibroz kanıtı olmaması evre 0, perisinüzoidal veya periportal fibroz varlığı evre 1, perisinüzoidal ve periportal fibrozun birlikte bulunması evre 2, köprüleşen fibroz evre 3 ve siroz varlığı evre 4 olarak değerlendirilmektedir (42). Evre 1 fibroz kendi içinde 3 kısma ayrılmaktadır (42). Zon 3'ü ilgilendiren perisinüzoidal ılımlı fibroz varlığı evre 1A,

zon 3'ü ilgilendiren perisinüzoidal orta dereceli fibroz varlığı evre 1B, portal veya periportal fibroz varlığı evre 1C olarak tanımlanmaktadır (42).

NAS sistemi histolojik değerlendirmenin yerine kullanılmak için tasarlanmamış olup tanı koymayı amaçlayan bir algortima değildir ancak yapılan validasyon çalışmalarına göre NAS skoru 0-2 olan vakalar genellikle steatohepatit için tanısız değilken skoru 5 ve üzerinde olan vakaların çoğu steatohepatit tanısı almaktadır (42).

b. Steatozis, Aktivite, Fibroz Skoru (SAF)

SAF sistemi morbid obez hastaların bariyatrik cerrahi sırasında elde edilen karaciğer biyopsileri üzerinde yapılan çalışmalarla geliştirilmiş olan, histolojik değerlendirmenin yerini almayı amaçlamayan ancak patolojiler için karşılaştırmalı olarak lezyonların tanımlanmasını ve dolayısıyla NAFLD tanısını kolaylaştırmayı hedefleyen basitleştirilmiş bir skorlama sistemidir (43).

Steatozis skorunun (S) değerlendirilmesinde büyük ve orta büyüklükteki lipid damlacıklarının parankimdeki oranı 0 ile 3 arasında derecelendirilmektedir (43). Köpüksü mikroveziküller değerlendirmeye alınmamaktadır (43). Tanımlanan steatozis oranı %5'in altında olan vakalar S0, %5-33 arasında olan vakalar S1 (ılımlı), %34-66 arasında olan vakalar S2 (orta dereceli), %67 ve üzerinde olan vakalar S3 (anlamlı) olarak değerlendirilmektedir (43).

Aktivite derecesi (A) hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve lobuler inflamasyonun ağırlıklandırılmamış puanlamasının toplanmasıyla 0 ile 4 arasında değerlendirilmektedir (43). Balonlaşma dejenerasyonu 0-2 arasında derece 0, küboidal şekil ve pembe eosinofilik sitoplazmalı normal hepatositleri; derece 1, genellikle retiküler yapıda solgun sitoplazmalı yuvarlak şekilde ancak normal hepatositlerle eşit büyüklükte olan hepatosit kümeleri varlığını; derece 2 ise 1 ile aynı özellikteki ancak normal hepatositlerin en az 2 katı genişlemiş hepatositlerden oluşan kümelerin varlığını gösterecek şekilde derecelendirilmektedir (43). Lobuler inflamasyon lobul içinde 2 veya daha fazla inflamatuvar hücreden oluşan odaklar olarak tanımlanmaktadır (43). Lobuler inflamasyon 0-2 arasında derece 0, odak bulunmaması; derece 1, her 20 büyütme mikroskop sahasında 2 veya daha az odak bulunması; derece 2, her 20 büyütme mikroskop sahasında 2'den fazla odak bulunmasını tanımlayacak şekilde derecelendirilmektedir (43). Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve lobuler inflamasyon derecelendirilmesinin toplamı olan aktivite derecesi 0-4 arasında puanlanmaktadır (43). Toplam puanı 0 olan vakalar A0 (aktivite yok), puanı 1 olan

vakalar A1 (ılımlı aktivite), puanı 2 olan vakalar A2 (orta dereceli aktivite), puanı 3 veya daha fazla olan vakalar A3 (ciddi aktivite) olarak değerlendirilmektedir (43).

Fibroz evresi (F) belirlenirken histolojik olarak fibroz kanıtı olmaması evre 0 (F0), perisinüzoidal veya periportal fibroz varlığı evre 1 (F1; perisinüzoidal ılımlı fibroz varlığı F1a, perisinüzoidal orta dereceli fibrozun varlığı F1b, portal fibroz varlığı F1c), perisinüzoidal ve periportal fibrozun birlikte bulunup köprüleşme kanıtı olmaması evre 2 (F2), köprüleşen fibroz varlığı evre 3 (F3), ve siroz varlığı evre 4 (F4) olarak değerlendirilmektedir (43).

c. Yağlı Karaciğer Progresyon İnhibisyonu Algoritması (Fatty Liver Inhibition of Progression, FLIP)

FLIP algoritması, FLIP konsorsiyumu tarafından NASH tanısında patoloğlar arasındaki yorum farklılıklarını azaltma ve tanıda güvenilirliği artırma hedefiyle geliştirilen SAF skorunu temel alan basit bir histolojik algoritmadır (104). FLIP algoritması SAF skoruna göre değerlendirilen steatozis, hepatositlerde balonlaşma ve lobuler inflamasyon kanıtlarına dayanmaktadır (104). FLIP algoritmasına göre sınıflandırmada steatozis, algoritmaya giriş kriteridir (104). SAF skoruna göre en az 1. derece steatoz (S1) olarak değerlendirilen biyopsi materyalleri FLIP algoritmasına göre 9 olası yoldan geçerek NASH veya sadece steatoz gruplarından birine dahil edilebilmektedir (104). Steatozis, balonlaşma ve lobuler inflamasyon özelliklerinin her birinden en az 1. derece olmak üzere puan alan vakalar NASH olarak sınıflandırılmaktadır (104). Diğer vakalar ise NASH olmaksızın steatoz olarak değerlendirilmektedir (104).

B- SİTOKERATİNLER

1. Yapı ve Fonksiyon

Hücre iskeleti mikrofilamanlar, mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan, sitoplazmik içeriğin organizasyonu, hücrenin şeklinin korunması, büyüme, bölünme, sekresyon, adezyon, fagositoz, yüzey antijenlerinin lokalizasyonu ve hücre-hücre etkileşimlerinden sorumlu ağı bir yapıdır (105, 106). Sitokeratinler, aktin filamanları ve mikrotübüllerle birlikte epitel hücrelerinde hücre iskeletinin yapıtaşlarını oluşturan dokuya spesifik ara filaman proteinleridir (107).

Sitokeratinler asidik ve bazik yapıda olmalarına göre sırasıyla tip-I ve tip-II olarak ikiye ayrılmaktadır (18). Tip-I (Sitokeratin 9-20) ve tip-II (Sitokeratin 1-8) sitokeratinler polimerik filamanlar halinde organize olarak non-kovalent heteropolimerik tip I/II komplekslerini oluştururlar (108). Alfa helikal yapıdaki korunmuş santral rod, N-terminal baş ve C-terminal kuyruk yapılarından oluşan üç segmentli bir dizilim meydana getirirler (108).

Sitokeratinlerin regülasyonu post-translasyonel modifikasyonlarla meydana gelmektedir (109). Kuyruk ve baş bölümleri sitokeratinler arasında yapısal heterojeniteyi belirleyen fosforilasyon ve glikozilasyonun gerçekleştiği alanlardır (18). Sitokeratinlerde oluşan bir başka post-translasyonel modifikasyon çeşidi kaspaz aracılıklı proteolizdir (109). Tip-I sitokeratinler kaspazların substratıyken, Tip-II sitokeratinler kaspazlara dirençlidir (109).

Sitokeratinlerin temel fonksiyonu hücreleri mekanik ve kimyasal streslerin neden olabileceği hücre ölümünden korumak olup ayrıca keratin tipi ve dokuya spesifik olmak üzere hücre sinyalizasyonu, stres cevabı, hücre polaritesinin korunması, hücreler arası adezyon, konnektif dokuya tutunma, bazı membran proteinlerinin transportu ve apoptozda da görevleri olduğu bilinmektedir (18, 110).

2. Hepatoselüler Patolojilerde Sitokeratinlerin Rolü

Erişkin insan hepatositleri kendilerini apoptoz ve nekrozdan koruyan sitokeratin 8 ve 18 (SK 8/18) eksprese etmektedir (19). Sitokeratin 8 ve 18'i kodlayan KRT 8 ve KRT 18 genlerindeki mutasyonlar karaciğer hastalığına predispozisyon oluşturmaktadır (19). NASH de dahil olmak üzere kronik karaciğer hastalıklarında gözlenen hepatik inklüzyonlar olarak tanımlanan *Mallory-Denk* cisimciklerinin (MDB) oluşumunda SK 8/18 rol almaktadır (19). Bundan başka otoantikörlerin hedefi, hepatoselüler karsinomda marker ve apoptoz markerları olarak da SK 8/18 öne çıkmaktadır (19). SK 8/18, MDB'lerin hem oluşumunun indüklenmesinde etkili olup hem de içeriğinde übikitin ve übikitin bağlayıcı protein p62 ile beraber yer almaktadır (19).

Sitokeratin 8/18 varyantlarının NAFLD'da sıklığının arttığına dair veriler (111) bulunmakla beraber, zayıf NAFLD ile zayıf olmayan NAFLD tanılı hastaların karaciğer biyopsilerinde sitokeratin 8/18 ekspresyonu açısından farklılıkları araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada zayıf olan ve olmayan NAFLD tanılı hastaların karaciğer biyopsi materyallerinde sitokeratin 8/18 boyanması açısından farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

IV. MATERYAL VE METOD

A- Hasta Seçimi

Çalışmaya 2003-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı polikliniğinden takipli, 18 yaş ve üzerinde olup takiplerinde karaciğer biyopsisiyle kanıtlanmış NAFLD tanısı konulmuş hastalardan tıbbi verilerinin ve biyopsi materyallerinin çalışma dahilinde kullanılmasını kabul edenler dahil edilmiştir. Karaciğer yağlanmasına neden olabilecek alkol kullanımı (erkekler için günde 30 g ve üzeri, kadınlar için 20 g ve üzeri) ve diğer toksik, metabolik, infeksiyöz etyolojilere sahip hastalar, bilinen malignitesi olan, 18 yaş altındaki ve tıbbi verilerinin ve biyopsi materyallerinin çalışma dahilinde kullanılmasını kabul etmeyen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların biyopsi yapılma tarihinden önceki viral hepatit serolojilerinin negatif olduğu görülmüş, poliklinik dosyalarından biyopsi zamanına ait ayrıntılı tıbbi öyküleri ile ek hastalıkları, aile hikayeleri, kullandıkları ilaçlar, alkol kullanımı ve olası toksik etken maruziyetleri araştırılarak tanıli genetik hastalık, aile anamnezi, steatojenik ilaç ve alkol kullanımı olmadığı belirlenmiştir.

B- Yöntem

Çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan hastaların daha önceki poliklinik takiplerinde endikasyonu konularak yapılan karaciğer biyopsi materyalleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden bulunup çıkarılarak Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trichrome boyalı preparatlar yeniden değerlendirilmiştir. Ayrıca parafin bloklardan 3 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak immunhistokimyasal yöntemle Sitokeratin 8/18 boyası (Cell Marque Antibodies, Cytokeratin 8 & 18 Mouse Monoclonal Antibody, Klon B22.1&B23.1, dilüsyon oranı: 1/100, Sigma-Aldrich Lab & Production Materials, USA) uygulanmıştır. Preparatlarda steatoz yüzdesi, steatoz derecesi, hepatoselüler balonlaşma derecesi, FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon varlığı ve derecesi, NAFLD skorlama sistemine göre lobüler inflamasyon derecesi ve NAFLD skoru, FIB skoru, portal inflamasyon derecesi ve sitokeratin 8/18 boyanması varlığı ve boyanma patternleri açısından incelenmiştir. Histolojik değerlendirme NAFLD için Brunt skorlama

sistemi, NASH-CRN skorlama sistemi ve FLIP algoritmasına göre tek hepatopatolog tarafından yapılmıştır (41, 42). Hepatositlerin %5'den azını ilgilendiren steatoz klinik olarak anlamlı kabul edilmeyip, steatotik hepatosit oranı %5-33 arasında ise 1. derece (ılımlı, *grade 1*), %34-66 arasında ise 2. derece (orta, *grade 2*) ve %66'dan fazla ise 3. derece (ciddi, *grade 3*) olarak sınıflandırılmıştır (41). Karaciğer fibrozunun ileri evrelerinde steatozun kaybolabileceği bilinmektedir (112). Bu nedenle NAFLD ön tanısıyla karaciğer biyopsisi yapıp steatoz olmadan ileri fibroz saptanan hastalar için (n=3 hasta) %5 steatoz oranı varlığı kriteri dikkate alınmamıştır. Lobuler inflamasyonun değerlendirilmesinde her 200 büyütmelik mikroskop sahasında bulunan inflamatuvar odakların sayısı dikkate alınarak hiç odak bulunmaması 0 puan, saha başına 2'den az odak bulunması 1 puan, 2-4 arası odak bulunması 2 puan, 4'ten fazla odak bulunması 3 puan olarak değerlendirilmiştir (42). Balonlaşma dejenerasyonu açısından hiç balonlaşmış hücre olmaması 0 puan, seyrek balonlaşmış hücreler bulunması 1 puan ve yaygın balonlaşma 2 puan olarak değerlendirilmiştir (42). NAS sistemine göre fibroz evrelemesinde fibroz kanıtı olmaması evre 0, perisinüzoidal veya periportal fibroz varlığı evre 1, perisinüzoidal ve periportal fibrozun birlikte bulunması evre 2, köprüleşen fibroz evre 3 ve siroz varlığı evre 4 olarak değerlendirilmiştir (42).

Hastaların poliklinik dosyalarından biyopsi yapılma zamanlarına ait demografik verileri (yaş, cinsiyet, BMI) ile laboratuvar değerleri (glukoz, hemoglobin, hematokrit, lökosit sayısı, trombosit sayısı, BUN, kreatinin, AST, ALT, ALP, GGT, AFP, total bilirubin, direkt bilirubin, albumin, PT, aPTT, INR, total kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol, trigliserid, HbA1c değerleri ile HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV, Anti-HIV göstergeleri) bulunarak verilere eklenmiştir.

Çalışmaya ait etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Etik kurul onay numarası: 2021-227315).

C- İstatistiksel Analiz:

Çalışmanın istatistiksel analizi IBM SPSS v21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistiksel veriler ortalama \pm standard sapma (SD) veya yüzde (sıklık) olarak verilmiştir. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılan veriler için T testi, normal dağılmayan veriler için Mann-Whitney U testi ve kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. Korelasyon analizinde normal dağılan değişkenler için Pearson korelasyon testi, normal dağılmayan değişkenler için Spearman rank testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı “p değeri” 0.05’in altındaki değerler olarak kabul edilmiştir.

V. BULGULAR

Çalışmaya 15 zayıf ve 15 normal kilonun üzerinde toplam 30 NAFLD tanılı hasta dahil edildi. Zayıf NAFLD grubundaki hastalar, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubundaki hastalara göre daha gençti (ortalama yaş zayıf NAFLD grubunda 38.27 ± 13.6 yıl ve normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda 50.73 ± 12.8 yıl, $p=0.016$). Kadın hastaların oranı zayıf NAFLD grubunda %26.7 iken normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda %60 ve erkek hastaların zayıf NAFLD grubundaki oranı %73.3 iken normal kilonun üzerindeki NAFLD grubundaki oranı %40 olarak saptandı ($p=0.126$). Zayıf NAFLD grubunda ortalama beden kitle indeksi (BMI) $23.4 \pm 1.8 \text{ kg.m}^{-2}$ olup normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda $34.7 \pm 4.9 \text{ kg.m}^{-2}$ saptandı ($p=0.001$). (Tablo 1)

Tablo 1. Hasta gruplarının demografik özellikleri

Ortalama \pm SD	Zayıf NAFLD (n:15)	Normal kilonun üzerindeki NAFLD (n:15)	p
Yaş, yıl	38.27 ± 13.6	50.73 ± 12.8	0.016*
Cinsiyet, n (%)			0.126
Kadın	4 (26.7)	9 (60)	
Erkek	11 (73.3)	6 (40)	
BMI, kg.m^{-2}	23.4 ± 1.8	34.7 ± 4.9	0.001*

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, SD: standard sapma, BMI: beden kitle indeksi

Hastaların serum ALT değerleri zayıf NAFLD grubunda, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($101.0 \pm 118.4 \text{ U/L}$ 'ye karşılık $47.6 \pm 32.4 \text{ U/L}$, $p=0.031$). Zayıf NAFLD grubunda AST, ALP, GGT değerleri de normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre daha yüksek olarak saptanmasına karşılık bu değerler

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (AST 52.5 ± 45.9 U/L'ye karşılık 39.8 ± 22.4 U/L $p=0.482$, ALP 115.1 ± 54.4 U/L'ye karşılık 89.0 ± 24.6 U/L $p=0.312$, GGT 82.0 ± 88.9 U/L'ye karşılık 69.2 ± 61.8 U/L $p=0.936$).

Zayıf NAFLD grubunda serum trigliserid düzeyleri, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (131.7 ± 129.9 mg/dL'ye karşılık 171.9 ± 56.2 mg/dL, $p=0.003$). Serum total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri de zayıf NAFLD grubunda, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre daha düşük saptanmasına rağmen bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Serum total kolesterol 174.9 ± 46.6 mg/dL'ye karşılık 207.3 ± 34.6 mg/dL $p=0.053$ ve LDL kolesterol 103.5 ± 44.2 mg/dL'ye karşılık 131.1 ± 26.2 mg/dL $p=0.058$). Serum HDL kolesterol düzeyleri her iki grupta benzer saptandı (zayıf NAFLD grubunda 45.2 ± 15.9 mg/dL'ye karşılık normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda 43.0 ± 14.0 mg/dL, $p=0.674$).

Hastaların serum açlık glukoz ve HbA1c değerleri zayıf NAFLD grubunda, zayıf olmayan NAFLD grubuna göre daha düşük saptanmasına rağmen bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (serum açlık glukoz 87.8 ± 30.9 mg/dL'ye karşılık 107.6 ± 95.2 mg/dL $p=0.174$ ve HbA1c 5.9 ± 0.6 'ya karşılık 6.3 ± 1.2 $p=0.905$).

Hasta gruplarında hemoglobin, hematokrit, total lökosit ve trombosit değerleri benzer olarak saptandı (sırasıyla zayıf NAFLD ve normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda olmak üzere; hemoglobin 14.5 ± 1.3 g/dL'ye karşılık 13.9 ± 1.5 g/dL $p=0.246$, hematokrit 43.5 ± 4.0 'a karşılık 40.7 ± 4.7 $p=0.094$, total lökosit 7.0 ± 2.1 $10^3/\mu\text{l}$ 'ye karşılık 6.8 ± 1.3 $10^3/\mu\text{l}$ $p=0.946$, trombosit 226 ± 69.4 $10^3/\mu\text{l}$ 'ye karşılık 183 ± 34.8 $10^3/\mu\text{l}$ $p=0.164$).

Hasta grupları arasında serum albumin, total bilirubin, direkt bilirubin ve INR değerleri arasında fark yoktu (sırasıyla zayıf NAFLD ve normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda olmak üzere; serum albümin 4.6 ± 0.3 g/dL'ye karşılık 4.3 ± 0.4 g/dL $p=0.091$, total bilirubin 0.7 ± 0.2 mg/dL'ye karşılık 0.5 ± 0.2 mg/dL $p=0.202$, direkt bilirubin 0.2 ± 0.1 mg/dL'ye karşılık 0.2 ± 0.1 mg/dL $p=0.851$, INR 0.9 ± 0.1 'e karşılık 1.0 ± 0.1 $p=0.971$). (Tablo 2)

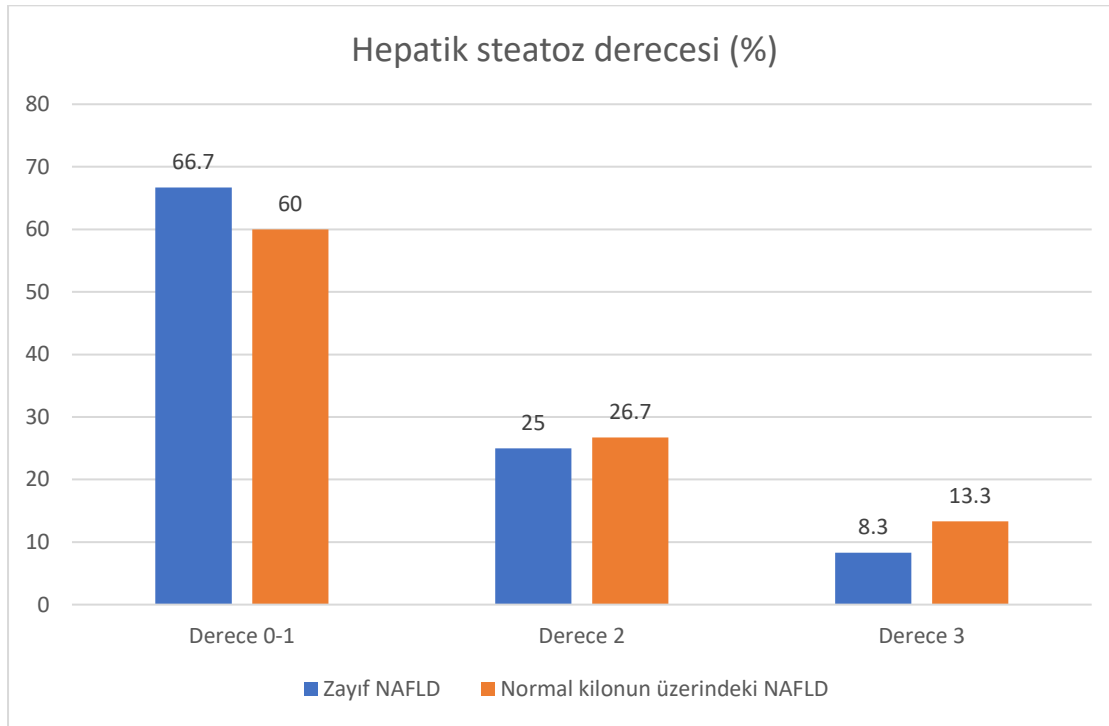
Tablo 2. Hasta gruplarının biyokimyasal özellikleri

Ortalama±SD	Zayıf NAFLD (n:15)	Normal kilonun üzerindeki NAFLD (n:15)	p
Glukoz (mg/dL)	87.8±30.9	107.6±95.2	0.174
Hb (g/dL)	14.5±1.3	13.9±1.5	0.246
Hct (%)	43.5±4.0	40.7±4.7	0.094
WBC (10 ³ /μl)	7.0±2.1	6.8±1.3	0.946
PLT (10 ³ /μl)	226±69.4	183±34.8	0.164
BUN (mg/dL)	15.3±5.2	15.6±10.3	0.401
Kre (mg/dL)	0.7±0.1	0.8±0.1	0.210
AST (U/L)	52.5±45.9	39.8±22.4	0.482
ALT (U/L)	101.0±118.4	47.6±32.4	0.031*
ALP (U/L)	115.1±54.4	89.0±24.6	0.312
GGT (U/L)	82.0±88.9	69.2±61.8	0.936
AFP (ng/mL)	3.0±1.7	3.5±1.5	0.263
TB (mg/dL)	0.7±0.2	0.5±0.2	0.202
DB (mg/dL)	0.2±0.1	0.2±0.1	0.851
Albumin (g/dL)	4.6±0.3	4.3±0.4	0.091
INR	0.9±0.1	1.0±0.1	0.971
Total kol (mg/dL)	174.9±46.6	207.3±34.6	0.053
LDL (mg/dL)	103.5±44.2	131.1±26.2	0.058
HDL (mg/dL)	45.2±15.9	43.0±14.0	0.674
Trigliserid (mg/dL)	131.7±129.9	171.9±56.2	0.003*
HbA1c (%)	5.9±0.6	6.3±1.2	0.905

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, SD: standard sapma, Hb: hemoglobin, Hct: hematokrit, WBC: lökosit, PLT: trombosit, BUN: kan üre azotu, kre: kreatinin, AST: aspartat aminotransferaz, ALT: alanin aminotransferaz, ALP: alkalen fosfataz, GGT: gama glutamil transferaz, AFP: alfa fetoprotein, TB: total bilirubin, DB: direkt bilirubin, INR: uluslararası normalize edilmiş oran, Total kol: total kolesterol, LDL: düşük dansiteli lipoprotein kolesterol, HDL: yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol, HbA1c: hemoglobin A1c

Zayıf NAFLD ve normal kilonun üzerindeki NAFLD grubundaki hastaların karaciğer biyopsi materyalleri karşılaştırıldığında steatoz yüzdesinin iki grupta benzer olduğu görüldü (sırasıyla steatoz yüzdesi %24.17±22.8'e karşılık %33.6±21.4 p=0.217).

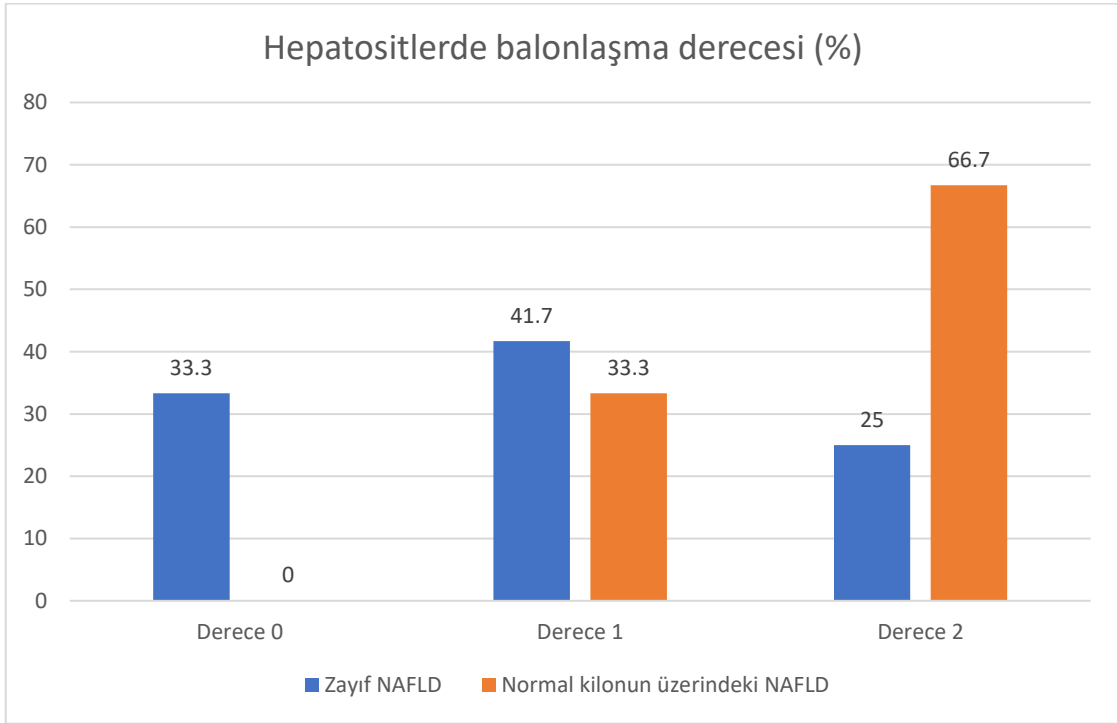
Hastalar hepatik steatoz derecesi açısından karşılaştırıldığında zayıf NAFLD ve normal kilonun üzerindeki NAFLD grubu arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.323). Hasta gruplarının hepatik steatoz dereceleri Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 2. NAFLD gruplarının hepatik steatoz derecesine göre karşılaştırılması

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, biyopsi materyalinde steatotik hepatosit oranı %5-33 arasında ise 1. derece (ılımlı, *grade 1*), %34-66 arasında ise 2. derece (orta, *grade 2*) ve %66'dan fazla ise 3. derece (ciddi, *grade 3*) olarak sınıflandırılmıştır.

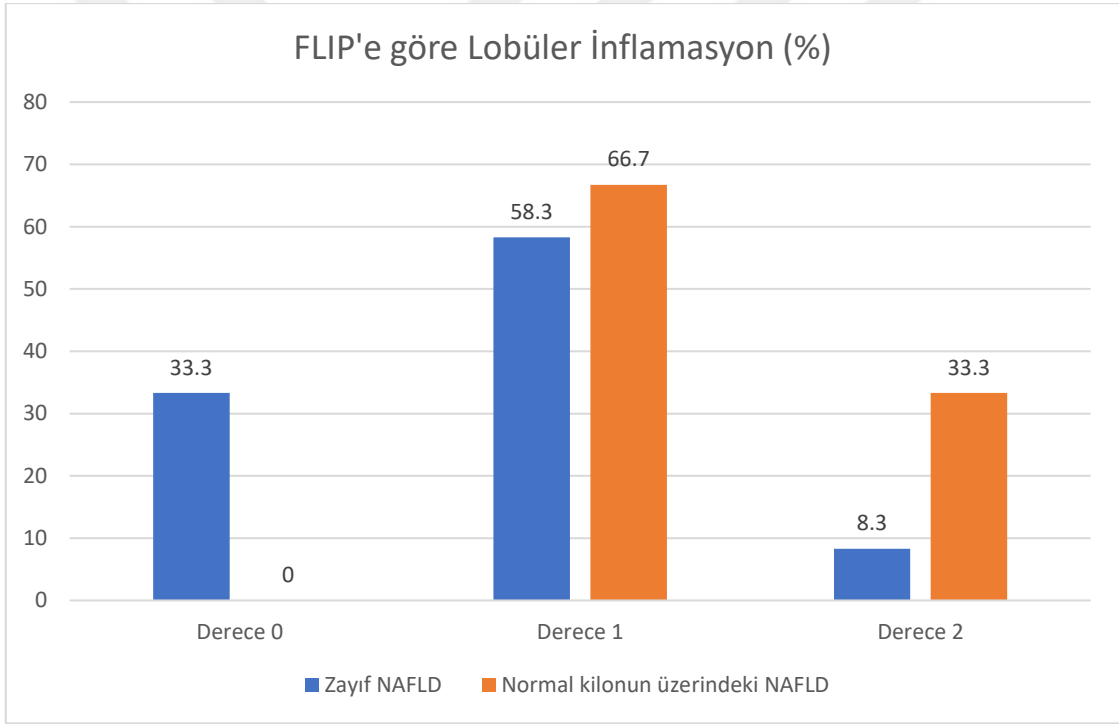
Zayıf NAFLD grubundaki hastaların %66.7'sinde balonlaşma dejenerasyonu saptanırken, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubundaki hastaların %100'ünün biyopsi materyallerinde balonlaşma dejenerasyonu saptandığı görüldü ($p=0.028$). Hastalar hepatositlerde balonlaşma dereceleri açısından karşılaştırıldığında zayıf NAFLD grubundaki hastalarda balonlaşma derecesinin, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubundaki hastalara göre (hepatositlerde derece 2 balonlaşması olan hasta oranı %25'e karşılık %66.7) anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p=0.019$). Hasta gruplarının hepatositlerde balonlaşma dereceleri Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 3. NAFLD gruplarının hepatositlerde balonlaşma derecesine göre karşılaştırılması

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, biyopsi materyalinde derece 0, küboidal şekil ve pembe eosinofilik sitoplazmalı normal hepatositleri; derece 1, genellikle retiküler yapıda solgun sitoplazmalı yuvarlak şekilde ancak normal hepatositlerle eşit büyüklükte olan hepatosit kümeleri varlığını; derece 2 ise 1 ile aynı özellikteki ancak normal hepatositlerin en az 2 katı genişlemiş hepatositlerden oluşan kümelerin varlığını gösterecek şekilde derecelendirilmiştir.

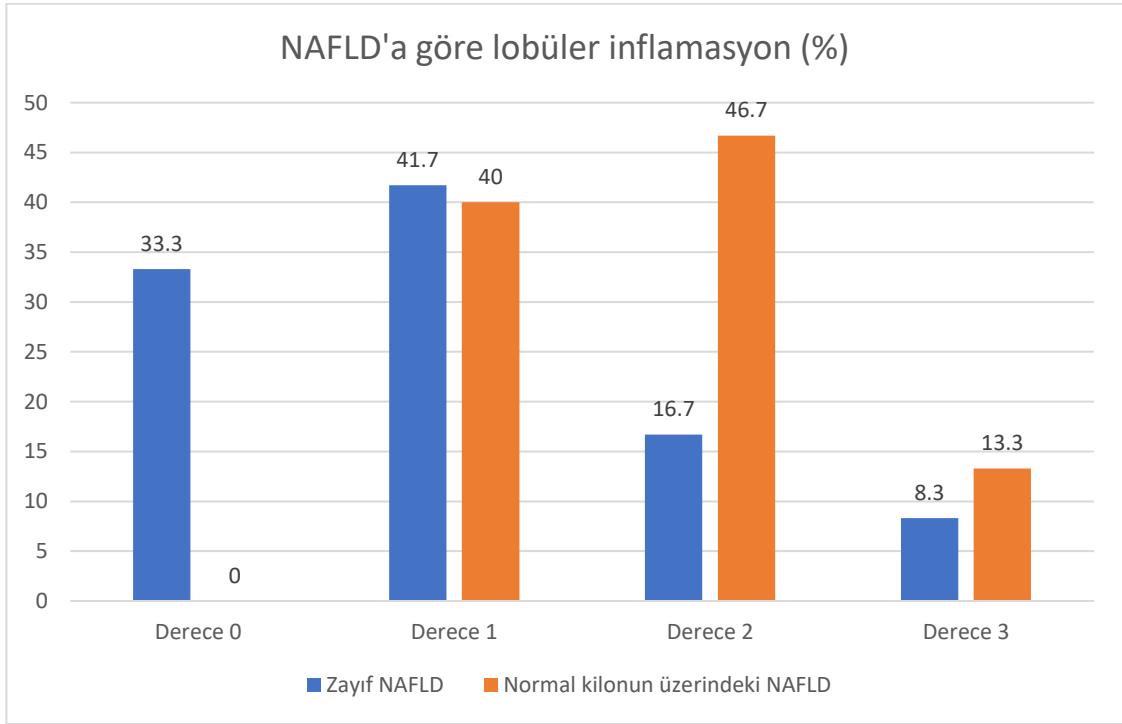
Hasta grupları FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi açısından karşılaştırıldığında zayıf NAFLD grubunda lobüler inflamasyon derecesinin normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre belirgin olarak daha düşük olduğu saptandı ($p=0.037$). Hasta gruplarının FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecelerinin karşılaştırılması Şekil 3’de görülmektedir.



Şekil 4. NAFLD gruplarının FLIP algoritmasına göre hepatositlerde lobüler inflamasyon derecesi açısından karşılaştırılması

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, FLIP algoritması: Yağlı Karaciğer Progresyon İnhibisyonu algoritması (*Fatty Liver Inhibition of Progression*)

Hasta grupları NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecesi açısından karşılaştırıldığında zayıf NAFLD grubunda normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre lobüler inflamasyon derecesinin anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p=0.041$). Hasta gruplarının NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecelerinin karşılaştırılması Şekil 4’de görülmektedir.



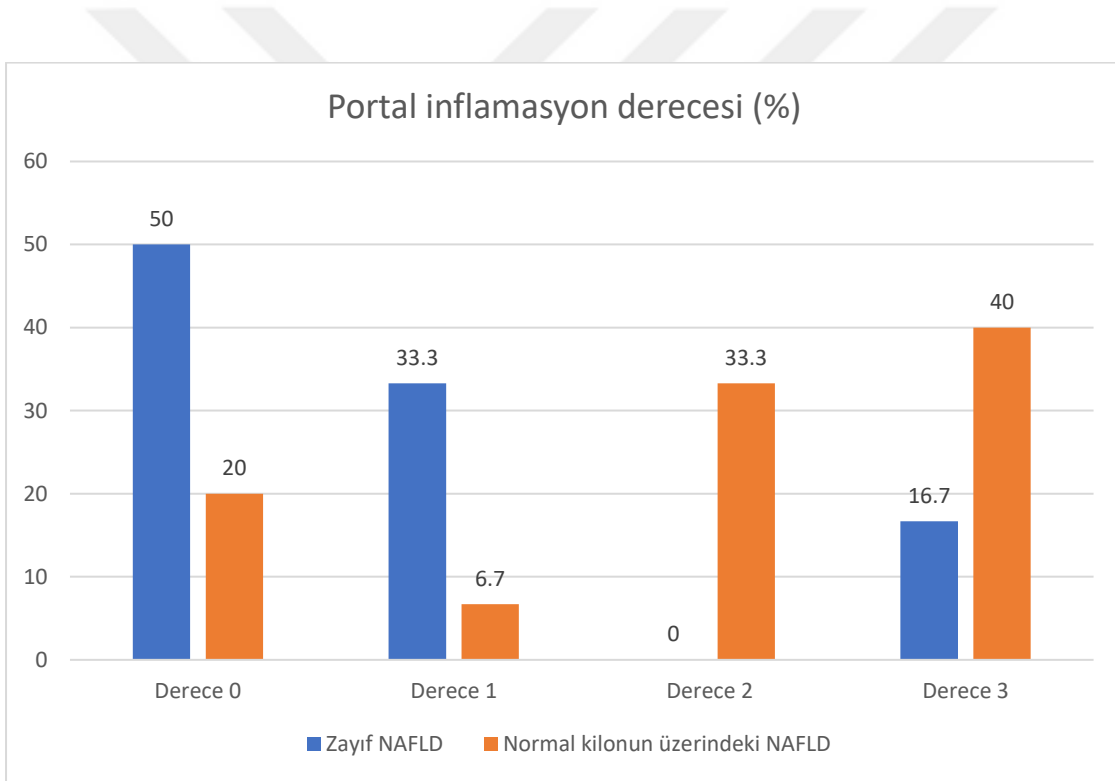
Şekil 5. NAFLD gruplarının NAFLD aktivite skoruna göre hepatositlerde lobüler inflamasyon derecesi açısından karşılaştırılması

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, her 200 büyütme mikroskop sahasında bulunan inflamatuvar odakların sayısı açısından hiç odak bulunmaması derece 0, saha başına 2’den az odak bulunması derece 1, 2-4 arası odak bulunması derece 2, 4’ten fazla odak bulunması derece 3 olarak derecelendirilmiştir.

Hasta gruplarının histolojik aktivite skorlarına göre karşılaştırılmasında zayıf NAFLD grubunun NAFLD aktivite skoru ortalamasının, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu (3.00 ± 2.25 ’e karşılık 4.93 ± 1.28 , $p=0.028$) ve yine zayıf NAFLD grubunun FIB skoru ortalamasının da normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü (0.92 ± 1.37 ’ye karşılık 2.33 ± 1.29 , $p=0.006$)

Hepatositlerde sitokeratin boyanma pozitiflik oranı zayıf NAFLD grubunda %75.0 iken, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda %93.3 olarak saptandı ($p=0.427$). Patolojik sitokeratin boyanma oranı zayıf NAFLD grubunda %33.3 olarak görülürken, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubunda %35.7 olarak saptandı ($p=0.926$).

Hasta grupları portal inflamasyon derecesi açısından karşılaştırıldığında zayıf NAFLD grubundaki hastaların biyopsi materyallerinde portal inflamasyon derecesinin, normal kilonun üzerindeki NAFLD hastalarına göre anlamlı olarak daha düşük saptandığı görüldü ($p=0.037$). Hastaların portal inflamasyon derecelerinin karşılaştırılması Şekil 5’de görülmektedir.



Şekil 6. NAFLD gruplarının portal inflamasyon derecesi açısından karşılaştırılması

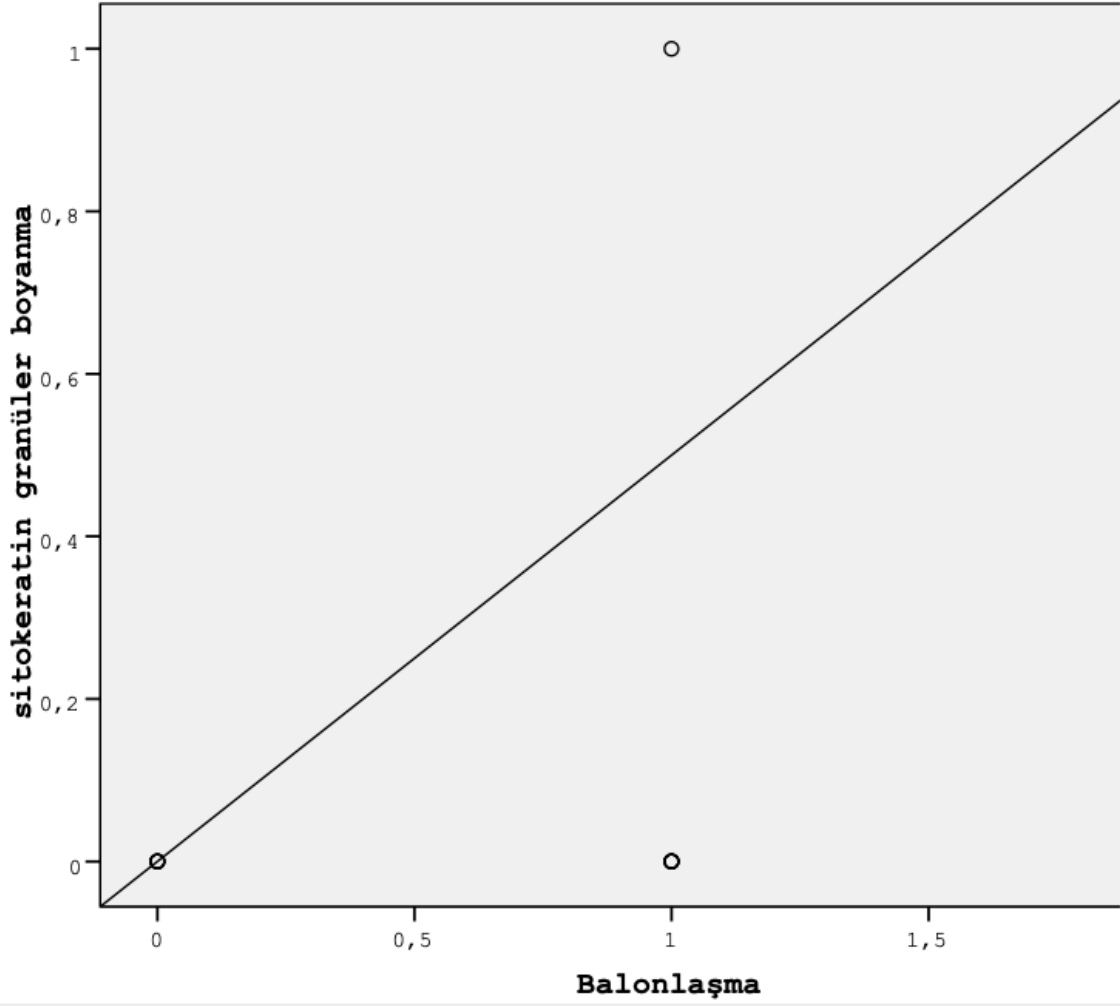
Hasta gruplarının biyopsi materyallerinin sitolojik incelenmesine ilişkin özellikler Tablo 3’de görülmektedir.

Tablo 3. Hasta gruplarının sitolojik özellikleri

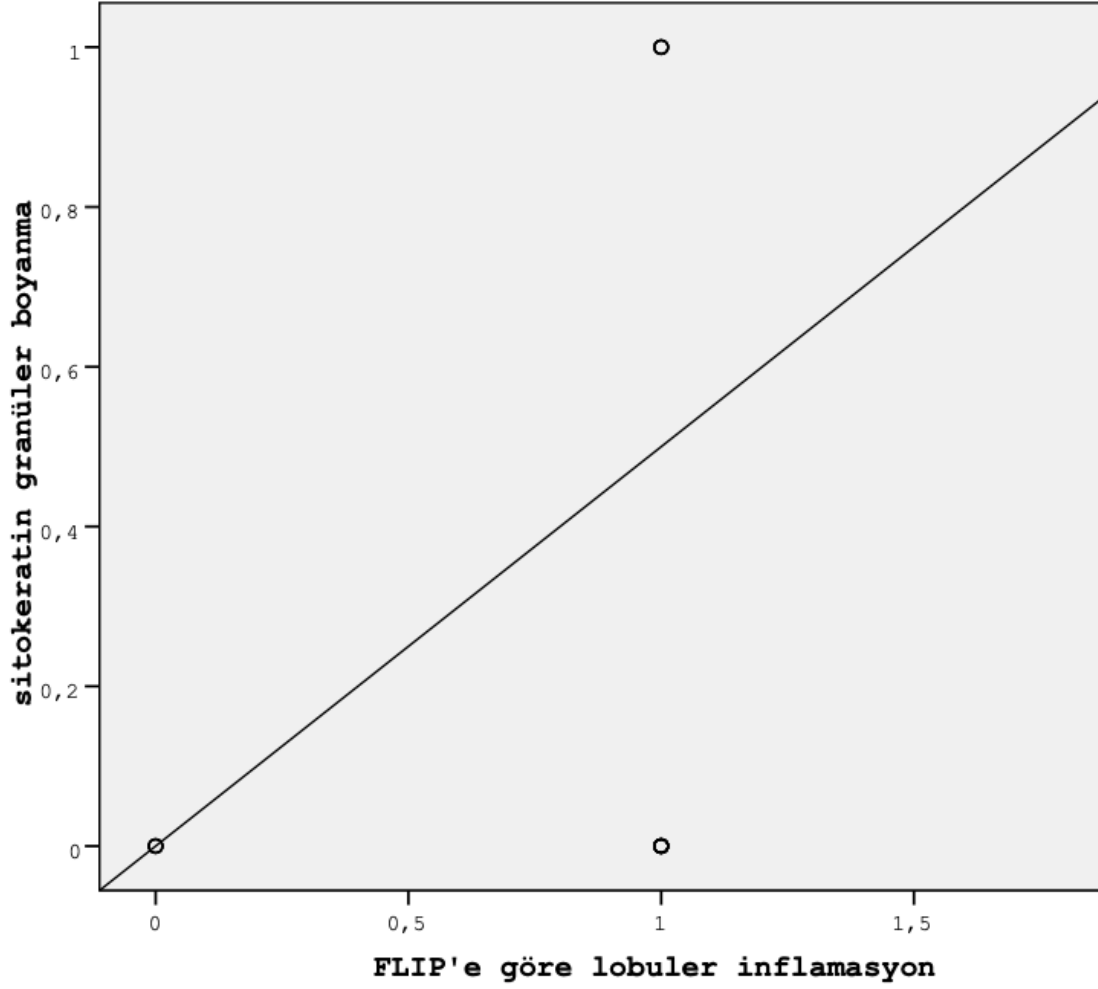
	Zayıf (n:15)	Normal kilo üzerinde (n:15)	P
Steatoz yüzde (%)	24.17±22.8	33.6±21.4	0.217
Steatoz grade (%)			0.323
Grade 0-1	66.7	60.0	
Grade 2	25.0	26.7	
Grade 3	8.3	13.3	
Balonlaşma derecesi (%)			0.019*
Derece 0	33.3	0.0	
Derece 1	41.7	33.3	
Derece 2	25.0	66.7	
FLIP lobüler inflamasyon (%)			0.037*
Derece 0	33.3	0.0	
Derece 1	58.3	66.7	
Derece 2	8.3	33.3	
NAFLD lobüler inflamasyon (%)			0.041*
Derece 0	33.3	0.0	
Derece 1	41.7	40.0	
Derece 2	16.7	46.7	
Derece 3	8.3	13.3	
FLIP tanı (NASH, %)	66.7	100.0	0.152
NAFLD skoru (Mean±SD)	3.00±2.25	4.93±1.28	0.028*
FIB skoru (Mean±SD)	0.92±1.37	2.33±1.29	0.006*
Portal inflamasyon derecesi (%)			0.037*
Derece 0	50.0	20.0	
Derece 1	33.3	6.7	
Derece 2	0.0	33.3	
Derece 3	16.7	40.0	
Sitokeratin boyanma varlığı (%)	75.0	93.3	0.427
Patolojik sitokeratin boyanması (%)	33.3	35.7	0.926
Balonlaşma dejenerasyonu varlığı (%)	66.7	100.0	0.028*

Çalışmaya dahil edilen hasta verileriyle yapılan korelasyon analizinde hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ($r=0.461$, $p=0.027$), FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi ($r=0.461$, $p=0.027$), NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecesi ($r=0.545$, $p=0.007$), NAFLD skoru ($r=0.461$, $p=0.027$), FIB skoru ($r=0.694$, $p<0.001$), portal inflamasyon varlığı ($r=0.525$, $p=0.010$), yaş ($r=0.534$, $p=0.009$), cinsiyet ($r=0.464$, $p=0.026$), serum glukoz değeri ($r=0.537$, $p=0.008$), direkt bilirubin ($r=0.523$, $p=0.022$) ve HbA1c ($r=0.758$, $p=0.029$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon varlığı, hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile hemoglobin ($r=-0.473$, $p=0.030$) ve hematokrit ($r=-0.437$, $p=0.047$) düzeyleri arasında negatif korelasyon varlığı tespit edildi. Steatoz yüzdesi ile hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ($r=0.449$, $p=0.019$), FLIP tanısı ($r=0.517$, $p=0.006$), NAFLD skoru ($r=0.631$, $p<0.001$), AST ($r=0.445$, $p=0.026$), ALT ($r=0.522$, $p=0.007$), ALP ($r=0.467$, $p=0.033$), total bilirubin ($r=0.428$, $p=0.047$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon varlığı, steatoz yüzdesi ile HDL ($r=-0.477$, $p=0.033$) düzeyleri arasında negatif korelasyon varlığı saptandı. Steatoz derecesi ile hepatositlerde balonlaşma ($r=0.542$, $p=0.004$), FLIP tanısı ($r=0.568$, $p=0.002$), NAFLD skoru ($r=0.717$, $p<0.001$), AST ($r=0.459$, $p=0.021$), ALT ($r=0.536$, $p=0.006$), ALP ($r=0.455$, $p=0.038$) ve total bilirubin ($r=0.502$, $p=0.017$) değerleri pozitif korele, steatoz derecesi ile serum total lökosit değeri ($r=-0.418$, $p=0.038$) negatif korele saptandı.

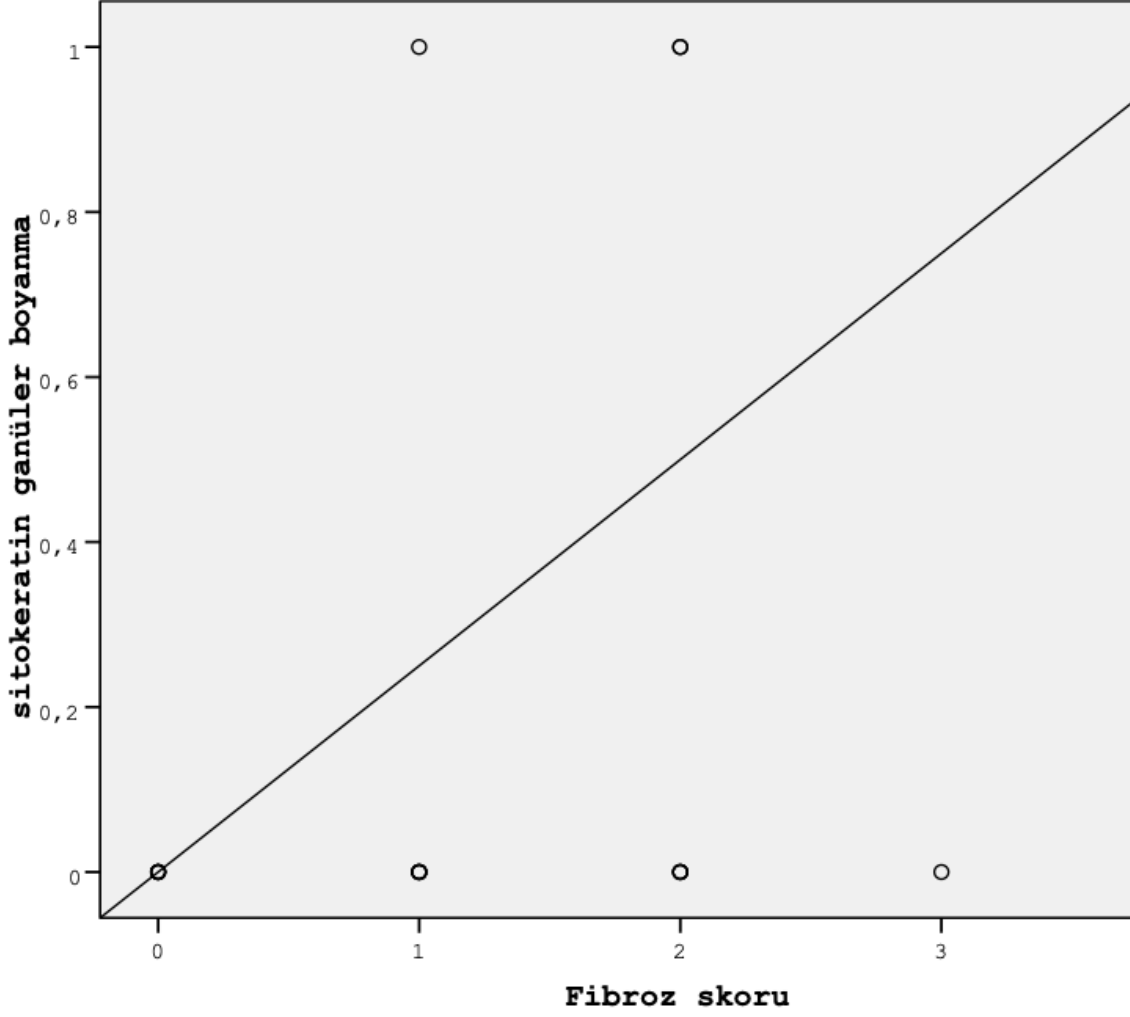
Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ile sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ($r=0.461$, $p=0.027$), hepatositlerde steatoz yüzdesi ($r=0.449$, $p=0.019$), hepatositlerde steatoz derecesi ($r=0.542$, $p=0.004$), FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon ($r=0.795$, $p<0.001$), NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecesi ($r=0.787$, $p<0.001$), FLIP tanısı ($r=0.772$, $p<0.001$), NAFLD skoru ($r=0.927$, $p<0.001$), FIB skoru ($r=0.622$, $p=0.001$), portal inflamasyon derecesi ($r=0.587$, $p=0.001$), yaş ($r=0.472$, $p=0.013$), HbA1c ($r=0.669$, $p=0.049$) ve BMI ($r=0.479$, $p=0.012$) arasında pozitif korelasyon, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ile total lökosit düzeyleri ($r=-0.434$, $p=0.030$) arasında negatif korelasyon tespit edildi. BMI ile hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ($r=0.479$, $p=0.012$), FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi ($r=0.605$, $p=0.001$), NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecesi ($r=0.511$, $p=0.006$), FLIP tanısı ($r=0.469$, $p=0.014$), NAFLD skoru ($r=0.456$, $p=0.017$), FIB skoru ($r=0.484$, $p=0.011$), yaş ($r=0.495$, $p=0.005$), serum glukoz değeri ($r=0.434$, $p=0.017$) ve serum kreatinin ($r=0.458$, $p=0.014$) değerleri arasında pozitif korelasyon tespit edildi.



Şekil 7. NAFLD tanılı hastalarda hepatositlerde sitokeratin 8/18 immun işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı arasındaki pozitif korelasyon ($r=0.461$, $p=0.027$)

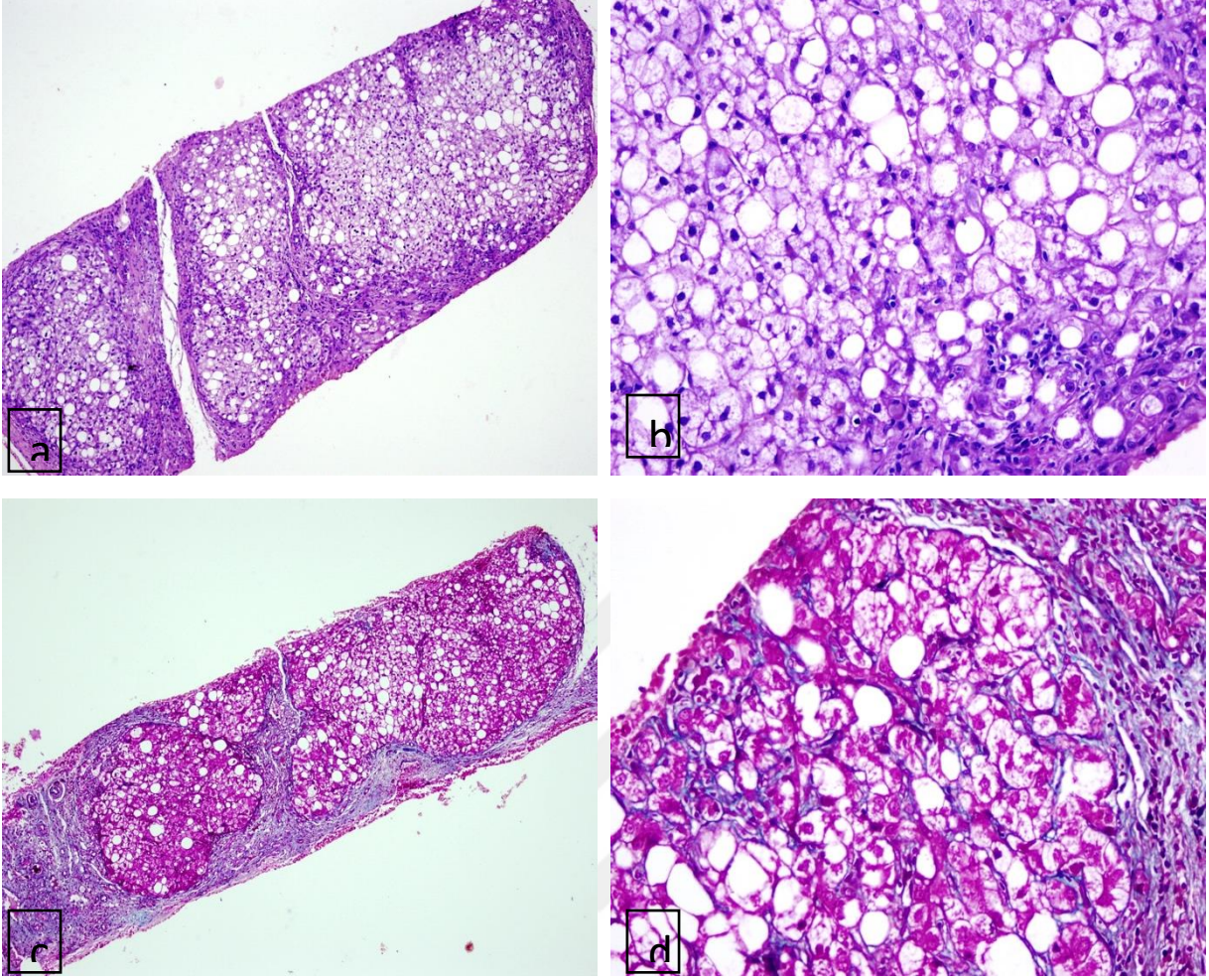


Şekil 8. NAFLD tanılı hastalarda hepatositlerde sitokeratin 8/18 immun işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi arasındaki pozitif korelasyon ($r=0.461$, $p=0.027$)

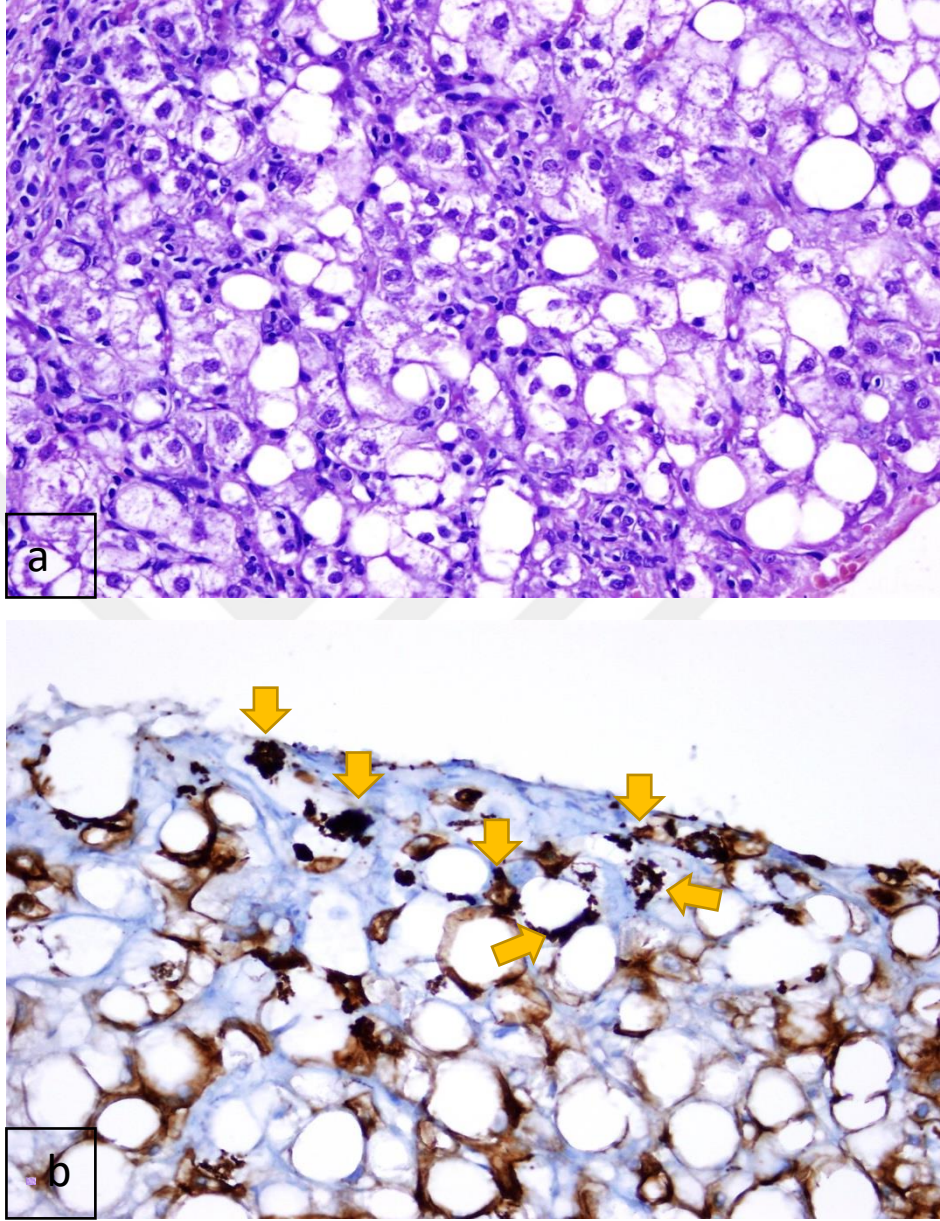


Şekil 9. NAFLD tanılı hastalarda hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle patolojik granüler boyanma varlığı ile FIB skoru arasındaki pozitif korelasyon ($r=0.694$, $p<0.001$)

Hastaların son durum değerlendirmeleri median 4 yıl (3-18 yıl) süre sonunda telefon aracılığıyla yapılmış ve sorgulama sonucunda biyopsi tarihlerinden bu yana karaciğer veya kardiyovasküler sistemle ilgili mortalite veya morbidite gelişmediğine dair bilgi alınmıştır.



Şekil 10. NAFLD tanılı hastaların hepatositlerinde gözlenen histolojik bulgular
a) Makroveziküler steatoz (%35 oranında) ve portal ve lobüler inflamasyon içeren sirotik karaciğer parankimi (H&E x40), b) Lobüler inflamasyon, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve steatoz, yakından görünüm (H&E x400), c) Masson Trikrom boyasında portal portal ve portosantral fibrotik bantlar, sirotik görünüm, d) Masson Trikrom boyasının yakından görünümü, periselüler fibrozis alanları



Şekil 11. NAFLD tanılı hastaların hepatositlerinde gözlenen hepatoselüler hasar bulguları a) Lobüler alanda inflamasyon, makroveziküler steatoz, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve mallory denk cisimleri (H&E x400), b) Sitokeratin 8&18 immünohistokimyasal boyasında hepatositlerde fokal alanlarda kaba granüler boyanma (ok ile işaretli)

VI- TARTIŞMA VE SONUÇ

Zayıf hastalarda gelişen non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında histolojik olarak sitokeratin 8/18 işaretleyicisi ile yaptığımız çalışmamızda zayıf NAFLD grubu ile normal kilonun üzerindeki NAFLD gruplarının karaciğer biyopsi materyalleri arasında sitokeratin 8/18 işaretleyicisi boyanma varlığı veya boyanma patterni açısından anlamlı bir fark saptanmadığı görüldü. Bununla birlikte her iki grubun metabolik parametreleri ve karaciğer hasarının derecesi açısından belirgin farklar saptandı. Zayıf NAFLD grubunda ALT değerleri, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek ve serum trigliserid düzeyleri anlamlı olarak daha düşük bulundu. Yapılan histolojik incelemelerde hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ve derecesi, NAFLD ve FLIP algoritmalarına göre lobüler inflamasyon derecesi, NAFLD aktivite skoru, FIB skoru ve portal inflamasyon derecesi zayıf NAFLD grubunda, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandı.

Hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisinin patolojik granüler boyanma göstermesiyle hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı, FLIP algoritmasına göre lobüler inflamasyon derecesi, NAFLD aktivite skoruna göre lobüler inflamasyon derecesi, NAFLD skoru, FIB skoru, portal inflamasyon varlığı, yaş, cinsiyet, serum glukoz değeri, direkt bilirubin ve HbA1c düzeyleri arasında pozitif korelasyon, sitokeratin 8/18 işaretleyicisinin patolojik granüler boyanma göstermesiyle hemoglobin ve hematokrit düzeyleri arasında negatif korelasyon varlığı tespit edildi.

NAFLD tanılı zayıf ve zayıf olmayan hasta grupları arasında anlamlılık tespit edilmemesine karşın tüm hastaların dahil edildiği analizde sitokeratin 8/18 immün işaretleyicisiyle hepatositlerde patolojik granüler boyanma hastalık progresyonunu işaret eden veriler (inflamasyon, fibroz, balonlaşma dejenerasyonu, yaş, HbA1c) ile pozitif korelasyon olarak tespit edildi. Sitokeratin 8/18 immün işaretleyicisi ile hepatositlerde granüler boyanma varlığı NAFLD tanılı zayıf olan ve zayıf olmayan hastalar (yeni önerilen terminoloji ile metabolik disfonksiyonla ilişkili yağlı karaciğer hastalığı “MAFLD”) arasında farklılık göstermese bile progresyonu işaret etmesi açısından değerli bir gösterge olabilir.

NAFLD çoğu zaman insulin direnci, beslenme alışkanlıklarına bağlı artan yağ dokusu, artmış intestinal geçirgenlik, intestinal mikrobiyotada değişiklik, sistemik inflamasyon ve akut faz yanıtına bağlı olarak proinflamatuvar sitokinlerle birlikte artmış metabolik yüke maruziyet sonucu gelişmektedir (17). Bu faktörlerin kümülatif etkisiyle hepatositlerde stres yolakları aktive olarak inflamatuvar sinyaller oluşmaya başlar ve devam eden inflamasyon karaciğerde remodeling, fibroz ve sirozla sonuçlanabilir (17).

NAFLD tanılı hastalardan zayıf olanlarla obez olanların kalori alımları arasında anlamlı fark olmadığı, zayıf olanların da kalori alımlarının fazla olduğuna ilişkin yayınlar mevcuttur (113).

Beslenme, yaş, cinsiyet, etnisite gibi faktörlerden etkilenen intestinal mikrobiyota zayıf ve normal kilonun üzerinde olan NAFLD hastalarında farklılıklar göstermektedir (114).

BMI hesaplanmasında vücuttaki yağ dağılımı veya total yağ miktarıyla ilgili bir değişken olmadığından bu açılarından yeterli bilgi sağlayamamakta ve toplam vücut yağ dokusu artmasına rağmen sarkopeni gibi sebeplerle normal aralıkta bulunabilmektedir (115). Vücuttaki yağ dokunun temel görevlerinden biri diyetle alınan ihtiyaçtan fazla besin maddelerinden elde edilen fazla enerjinin depolanmasıdır (116). Sağlıklı kişilerde bu görevi yerine getiren subkütan yağ dokusu, obez hastalarda hipertrofiye uğrayarak yeterli fonksiyonu sağlayamadığından ektopik yağ depolanması başlamaktadır (116). Karaciğer, iskelet kası ve visceral yağ doku gibi metabolik homeostazın sağlanmasında görevli olan dokularda meydana gelen ektopik yağ depolanması bu dokuların fonksiyonlarını bozarak insulin direnci ve hepatik steatoz başta olmak üzere birbirini etkileyen bir dizi probleme yol açmaktadır (115). İnsülin direnci varlığında yemek sonrası dolaşımda artan glukoz yükü iskelet kaslarınca tamponlanamadığından karaciğere alınan miktar artarak glukojene dönüştürülmekte veya lipogenez için kullanılmaktadır (117). Sarkopeni durumunda da insulin direncine benzer şekilde bu defa kas kitlesindeki azalmadan dolayı glukozun dolaşımdan dokulara geçişi azalmakta ve yağ kullanımı azalmaktadır (118). Bu mekanizmalara bağlı olarak sarkopeninin NAFLD ve karaciğerde ilerleyici fibrozla birlikteliği üzerinde durulmaktadır (118).

Younossi ve arkadaşları Birleşik Devletlerde yaşayan bir hasta popülasyonunda yaptıkları çalışmada ALT ve AST düzeylerinin NAFLD tanılı zayıf hastalarda, NAFLD tanılı obez hastalara göre belirgin olarak düşük bulunduğunu bildirmiştir (119). Weinberg ve arkadaşları Birleşik Devletlerde yaşayan hastaları dahil ettikleri çalışmalarında NAFLD tanılı zayıf hastalarda ALT, AST, ALP düzeylerinin zayıf olmayanlara göre daha düşük olduğunu ve yine zayıf grupta siroz, kardiyovasküler hastalık ve metabolik hastalık riskinin daha düşük

olduğunu bildirmiştir (120). Birleşik Devletlerde yaşayan değişik etnik grupların dahil edildiği diğer bir çalışmada ortalama BMI değerinin 26.1 kg/m^2 ile en düşük olduğu Asya kökenli hasta grubunda serum ALT değerleri ortalamasının 70 U/L ile hasta grupları arasında en yüksek saptandığı bildirilmiştir (121). Bizim çalışmamızda zayıf NAFLD grubunda ALT değerlerinin, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Akyüz ve arkadaşlarının yaptıkları prospektif çalışmada ortaya koydukları gibi NAFLD tanılı hastalarda hepatik transaminazlar zaman içinde dalgalanmalar göstermektedir (122). Çalışmamızda poliklinik takiplerinde hepatik transaminaz yüksekliğinin devam etmesi ve diğer toksik, metabolik, enfeksiyöz etyolojilerin ekarte edilmesiyle NAFLD ön tanısıyla karaciğer biyopsisi endikasyonu konulan ve Brunt histolojik sınıflaması, NASH-CRN skorlama sistemi ve FLIP algoritmasına göre NAFLD tanısı konulmuş zayıf hastalarda ALT değerlerinin normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre daha yüksek bulunma nedeni dalgalanma gösteren transaminazların yüksek devam ettiği dönemde biyopsi yapılmış olması olabilir. Çalışmamızdaki zayıf NAFLD grubunda saptanan ALT yüksekliğini destekleyen bir başka çalışma olan Iritani ve arkadaşlarının biyopsiyle doğrulanmış NAFLD tanılı zayıf hastalarla yaptıkları çalışmada fibroz derecesi 0-2 olan zayıf NAFLD tanılı hastaların ortalama ALT değerinin, fibroz derecesi 3-4 olan zayıf NAFLD tanılı hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (123). Iritani ve arkadaşlarının çalışmasında aynı zamanda NAFLD tanılı zayıf hastalarda başlangıçta ileri fibroz prevalansının düşük olmasına rağmen izlemde ciddi karaciğer hastalığı riskinin daha yüksek bulunmasının zayıf hastalarda, zayıf olmayanlara göre karaciğer fibrozu progresyonunun daha hızlı olduğuna bağlanabileceği ileri sürülmüştür (123). ALT yüksekliği inflamasyonun devam ettiğinin bir göstergesi olarak prognozun önemli belirleyicilerinden biri olabilir. Bu konuda hasta gruplarının uzun süreli izlemine dayanan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gelişmekte olan ülkelerde bireylerin fazla kaloriye erişimi çoğunlukla uzun süreli çocukluk çağı malnütriyonunu takiben gerçekleşmekteyken gelişmiş ülkelerde beslenmeyle ilişkili obezite ve fazla kalori alımı çocukluk çağından başlamaktadır (124). Bu durumun zayıf ve obez NAFLD hastalarında adiposit fonksiyonları, dağılımı, insulin duyarlılığı ve yağ dokuda inflamasyon ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (124). Gelişmekte olan ülkelerle gelişmiş ülkeler arasında olduğu düşünülen bu farkı kültürler, yetiştirilme tarzı ve yemek yeme alışkanlıkları olarak genişletecek olursak bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla beraber enzim düzeyleri arasındaki fark için açıklayıcı bir mekanizma olabileceği belirtilebilir. Ayrıca yine beslenmeye bağlı faktörler tarafından yakından etkilendiği bilinen intestinal mikrobiyotanın NAFLD gelişimine katkıda bulunduğu ve zayıf NAFLD tanılı

hastalarda hakim mikrobiyota üyeleri ile normal kilonun üzerindeki NAFLD tanılı hastalarda hakim mikrobiyota üyelerinin kalitatif ve kantitatif olarak değişkenlik gösterdiği Chen ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür (17).

Akyüz ve arkadaşları NAFLD tanılı zayıf hastalarda, normal kilonun üzerindeki hastalara göre hemogloblin değerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve hepatik fibrozun anlamlı olarak daha az görüldüğünü rapor etmiştir (125). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı ve derecesi, NAFLD ve FLIP algoritmalarına göre lobüler inflamasyon derecesi, NAFLD aktivite skoru, FIB skoru, portal inflamasyon derecesinin zayıf NAFLD grubunda, normal kilonun üzerindeki NAFLD grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandığı, ancak hemogloblin düzeylerinin NAFLD tanılı zayıf hastalarda, normal kilonun üzerindeki NAFLD tanılı hastalara göre daha yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşamadığı görülmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisinin patolojik granüler boyanma göstermesiyle hemogloblin düzeyleri arasında negatif korelasyon varlığı görülmektedir.

Literatürde karaciğer biyopsilerinde sitokeratin 8/18 boyanması ve serum sitokeratin 18 düzeylerinin NAFLD ile ilişkisine dair yayınlar mevcuttur ancak NAFLD tanılı zayıf hastaların karaciğer biyopsilerinde sitokeratin 8/18 boyanması varlığı, boyanma patterni ve dağılımı ile zayıf olmayan NAFLD tanılı hastalara ait biyopsi materyalleriyle karşılaştırılmasına ait veri bulunmamaktadır. Sağlıklı hepatositlerde hücre iskeletinin yapıtaşını oluşturan en önemli ara filaman olan sitokeratin 8/18 homojen ve koyu olarak boyanmaktadır (126). Hepatositlerde endoplazmik retikulum (ER) stresi ve bozulmuş protein yapım-yıkım döngüsünün bir sonucu olarak oluşan Mallory-Denk cisimlerinin en önemli komponenti übikitinlenmiş sitokeratin 8/18 fragmanlarıdır (126). İnsülin direnci ve ER stresinin ilişkili olduğu bilinmektedir (127). ER içinde katlanmamış proteinlerin çeşitli nedenlere bağlı olarak birikmesi ER stresine yol açmakta, ER stresi de insülin proreseptörlerinin proteolitik matürasyonlarını engelleyerek hücre içinde yeni sentezlenmiş insülin reseptörlerinin ER'den hücre membranına transferini inhibe etmekte ve insülin direncine neden olmaktadır (127). Obezite ER stresine neden olan durumların başında gelmektedir (128). Hayvan modellerinde deneysel olarak ER stresi oluşturulduğunda insülin direncinin arttığı ve ER stresini düşürecek girişimler uygulandığında insülin direncinin azaldığı gözlemlenmiştir (128, 129).

Balonlaşma dejenerasyonuna uğramış hepatositler, hücre iskeletindeki bozulma sonucu sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle boyanma özelliklerini kaybetmektedir. Balonlaşma

dejenerasyonu steatohepatitin önemli bir belirleyicisi olmasına rağmen henüz balonlaşmamış hücrelerde de steatohepatit etkilerini görmek mümkündür. Balonlaşma dejenerasyonuna henüz uğramamış hücrelerde de hücre iskeleti değişiklikleri başlamakta, ancak konvansiyonel Hematoksilen-Eozin boyamasıyla hücresel düzeyde ayırt edilmesi mümkün olmayan bu değişiklikler, hücrelerin sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle boyanma özelliklerini kaybetmesinden dolayı ayırt edilebilmektedir (22). Bizim çalışmamızda zayıf NAFLD grubu ile normal kilonun üzerindeki NAFLD gruplarının karaciğer biyopsi materyalleri arasında sitokeratin 8/18 işaretleyicisi boyanma varlığı veya boyanma patterni açısından anlamlı bir fark saptanmamasının olası nedeni bu mekanizmayla hepatosit hasarı başladıktan sonra immunhistokimyasal yöntemin düşük derecelerdeki hasarı bile tespit edebilmekteki hassasiyetinden kaynaklanıyor olabilir. Guy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hepatosit hasarının sitokeratin 8/18 işaretleyicisiyle immunhistokimyasal olarak gösterilmesinin, Hematoksilen-Eozin boyamasına göre hepatik fibroz ile daha güvenilir korelasyon gösterdiği gibi araştırmacılar arasında hepatosit hasarının ciddiyeti açısından fikir birliğini arttırdığı da öne sürülmektedir (126).

Wong ve arkadaşlarının proton magnetik rezonans spektroskopisi ile yaptıkları prospektif kohort çalışmada başlangıçta zayıf olan bireyler arasında izlem sonunda hepatik steatoz gelişenlerin %8 kadar bir bölümünde BMI artışı olmakla birlikte BMI değerlerinin yine de normal aralıkta bulunduğu görülmüştür (130). NAFLD progresyonu ve regresyonu üzerine etkili faktörlerle ilgili Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BMI değişimi diğer faktörlerden bağımsız olarak NAFLD tanılı hem zayıf hem de obez hastalarda NAFLD progresyonu ve regresyonu ile ilişkili bulunmuştur (131). NAFLD tanılı zayıf hastalarda da zayıf olmayanlarda olduğu gibi kilo kaybının NAFLD'da regresyonla birlikte olduğu bilinmektedir (131). Bu durum gelecekte NAFLD tanılı hastaları zayıf ve zayıf olmayan olarak nitelendirmek yerine belirli bir zaman periyodundaki BMI artışına göre nitelendirmenin patofizyolojik açıdan daha anlamlı olacağına işaret edebilir. Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz zayıf NAFLD tanılı hastaların tıbbi öykülerinde BMI'lerinin geçmişte de $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ olduğu bilinmekle beraber yakın geçmişteki kilo değişimleri hakkında veri mevcut değildi. Bununla beraber Younes ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NAFLD tanılı zayıf hastalardan uzun dönemde karaciğer veya kardiyovasküler sistemle ilişkili olumsuz sonuçlarla karşılaşılacak hastaların büyük çoğunluğunda BMI değişiminin olmadığını ileri sürmüştür (112). Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

NAFLD tanılı hastaların klinik yönetiminde obezlerde olduğu gibi zayıf olan hastalarda da günümüzde en etkili olduğu gösterilen yaklaşım kilo kaybıdır (132). Vücut ağırlığında %5

azalma NAFLD tanılı zayıf hastalarda hepatik steatozda anlamlı derecede azalmayla birlikte olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (133). NAFLD tanılı zayıf hastaların beslenme alışkanlıklarıyla ilgili yapılan az sayıda çalışmada bu hastaların günlük total kalori alımının NAFLD tanılı obez hastalara yakın olduğu, ancak diyetlerindeki kolesterol oranının obez hastalardan daha yüksek ve poliansatüre yağ asidi içeriğinin obez hastalara göre daha düşük olduğu öne sürülmüştür (134, 135). Diyet regülasyonu, kilo kaybı, fiziksel aktivite ve seçilmiş hastalarda farmakoterapi (pioglitazon ve E vitamini) NAFLD tanılı hem obez hem de zayıf hastalarda günümüzde önerilen yaklaşımlardır (132).

Çalışmamızın NAFLD tanılı zayıf hastaların karaciğer biyopsilerinde sitokeratin 8/18 boyanması varlığı, boyanma patterni ve dağılımı ile zayıf olmayan NAFLD tanılı hastalara ait biyopsi materyalleriyle karşılaştırılmasına ait literatürdeki ilk çalışma olması, histolojik ve metabolik parametreleri birlikte değerlendirmesi güçlü yönleri olarak sıralanabilir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları hasta sayısının azlığı, sağlıklı kontrol grubunun olmayışı ve çalışmaya dahil edilen hastaların birbirinden farklı zamanlarda yapılmış biyopsilerine ait materyallerin geçmişe dönük olarak arşivden çıkarılarak yeniden incelenmesi, biyopsilerin zamansal olarak homojen olmayışı, zayıf hasta grubunda metabolik ve genetik hastalıkların dışlanması için özgeçmiş ve aile hikayesine ek olarak metabolik ve genetik ileri tanı testlerinin yapılmamış olması olarak sıralanabilir. Çalışmamıza biyopsi ile doğrulanmış zayıf ve zayıf olmayan NAFLD tanılı hasta grubu dahil edildiğinden ve biyopsi invazif bir işlem olduğundan sağlıklı zayıf ve obez gönüllülerin dahil edilmesi uygun görülmemiştir. NAFLD tanılı zayıf hasta oranı, fazla kilolu ve obez hasta oranına göre daha düşük olduğundan dolayı tek merkezdeki çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan biyopsiyle doğrulanmış hasta sayısının düşük olmasına neden olmuş olabilir.

Son dönemde NAFLD hasta grubunun çeşitliliği nedeniyle yeni bir terminoloji olarak metabolik disfonksiyonla ilişkili yağlı karaciğer hastalığı (MAFLD) gündeme gelmiştir (136). Ancak bu tanımlama NAFLD şemsiyesi altındaki metabolik komponenti barındıran grubu temsil etmektedir (136). Halbuki bizim hasta grubumuzda olduğu gibi metabolik komponenti bulunmayan ve zayıf olan NAFLD tanılı küçük bir hasta grubu da mevcuttur. Bu hastalar için sınıflama genetik analizler ile mümkün olabilir.

Geniş hasta gruplarında hastaların BMI haricinde bel çevresi, birim zamanda vücut ağırlıklarındaki değişim, kas ve yağ kitlesi gibi değişkenlerin ve genetik analizlerin de eklenerek prospektif olarak hastaların bu parametreler açısından takip edilebileceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Özetle, hepatositlerde sitokeratin 8/18 işaretleyicisinin patolojik granüler boyanma göstermesiyle hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu varlığı, portal ve lobüler inflamasyon varlığı, yaş, cinsiyet, serum glukoz değeri, hemoglobin, hematokrit, direkt bilirubin ve HbA1c düzeyleri arasında anlamlı pozitif yönde bir ilişki mevcuttur, ancak zayıf NAFLD grubu ile normal kilonun üzerindeki NAFLD gruplarının karaciğer biyopsi materyalleri arasında sitokeratin 8/18 işaretleyicisi boyanma varlığı veya boyanma patterni açısından anlamlı bir fark gösterilememekle beraber zayıf NAFLD grubunda karaciğer hasarı zayıf olmayan gruba göre daha ılımlı, serum trigliserid düzeyleri daha düşük ve ALT değerleri daha yüksektir.

Sonuç olarak, hepatositlerde sitokeratin 8/18 immün işaretleyicisi ile boyanma varlığının zayıf olan ve olmayan yağlı karaciğer hastalığı ayırıcı tanısında rolü olmamakla birlikte, granüler boyanma varlığı progresyonun bir göstergesi olabilir.

VII- KAYNAKLAR

1. Ge X, Zheng L, Wang M, Du Y, Jiang J. Prevalence trends in non-alcoholic fatty liver disease at the global, regional and national levels, 1990–2017: a population-based observational study. *BMJ open*. 2020;10(8):e036663.
2. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Translational gastroenterology and hepatology*. 2020;5.
3. Armstrong MJ, Houlihan DD, Bentham L, Shaw JC, Cramb R, Olliff S, et al. Presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in a large prospective primary care cohort. *Journal of hepatology*. 2012;56(1):234-40.
4. Oh RC, Husted TR, Ali SM, Pantsari MW. Mildly elevated liver transaminase levels: causes and evaluation. *American family physician*. 2017;96(11):709-15.
5. Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005;129(1):113-21.
6. Arrese M, Feldstein AE. NASH-related cirrhosis: An occult liver disease burden. *Wiley Online Library*; 2017.
7. Puri P, Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: definitions, risk factors, and workup. *Clinical Liver Disease*. 2012;1(4):99.
8. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline gastroenterology*. 2014;5(3):211-8.
9. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865-73.
10. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*. 1995;22(6):1714-9.
11. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *Journal of hepatology*. 2005;42(1):132-8.
12. Wong VW-S, Wong GL-H, Choi PC-L, Chan AW-H, Li MK-P, Chan H-Y, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010;59(7):969-74.
13. Bhatt HB, Smith RJ. Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2015;4(2):101.
14. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-31.
15. Williamson RM, Price JF, Glancy S, Perry E, Nee LD, Hayes PC, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic fatty liver disease in people with

- type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes care*. 2011;34(5):1139-44.
16. Lonardo A, Bellentani S, Argo CK, Ballestri S, Byrne CD, Caldwell SH, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Digestive and Liver Disease*. 2015;47(12):997-1006.
 17. Chen F, Esmaili S, Rogers GB, Bugianesi E, Petta S, Marchesini G, et al. Lean NAFLD: a distinct entity shaped by differential metabolic adaptation. *Hepatology*. 2020;71(4):1213-27.
 18. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(1):110-22.
 19. Omary MB, Ku N-O, Strnad P, Hanada S. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(7):1794-805.
 20. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World journal of hepatology*. 2017;9(16):715.
 21. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1998;11(6):560-5.
 22. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *Journal of hepatology*. 2008;48(5):821-8.
 23. Kopec KL, Burns D. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy. *Nutrition in Clinical Practice*. 2011;26(5):565-76.
 24. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.
 25. Addison T. Observations on fatty degeneration of the liver. *Guys Hosp Rep*. 1836;1(476):485.
 26. Rokitansky C. Skizze der Größen und Formabweichungen der Leber. *Bruchstück Med Jahrb des kaisl, königl Österr Staates*. 1839.
 27. Pepper W. Saccharine diabetes. *Med Rec*. 1884;25:9-12.
 28. Pepper W, Starr L. A system of practical medicine by American authors. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1885;180:550-62.
 29. Mallory F. Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1911;22:69-75.
 30. Connor CL. Fatty infiltration of the liver and the development of cirrhosis in diabetes and chronic alcoholism. *The American journal of pathology*. 1938;14(3):347.
 31. Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Burt AD. Fatty liver disease: alcoholic and nonalcoholic. *MacSween's Pathology of the Liver*, 6th ed.; Burt, AD, Portmann, B., Ferrell, L., Eds. 2011:293-359.
 32. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh B. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 1980. 434-8.

33. Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *American Journal of Gastroenterology (Springer Nature)*. 1983;78(6).
34. Schaffner F, Thaler H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Progress in liver diseases*. 1986;8:283-98.
35. Diehl A, Goodman Z, Ishak K. Alcohollike liver disease in nonalcoholics: a clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology*. 1988;95(4):1056-62.
36. Thaler H. 10 Fatty change. *Bailliere's clinical gastroenterology*. 1988;2(2):453-62.
37. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107(4):1103-9.
38. Lonardo A, Bellini M, Tondelli E, Frazzoni M, Grisendi A, Pulvirenti M, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and the "bright liver syndrome": should a recently expanded clinical entity be further expanded? *The American journal of gastroenterology*. 1995;90(11):2072-4.
39. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology*. 1998;27(6):1463-6.
40. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-9.
41. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(9):2467-74.
42. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
43. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
44. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *Journal of hepatology*. 2020;73(1):202-9.
45. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology*. 2019;70(1):151-71.
46. Organization WH. *Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019*. World Health Organization. 2020.
47. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
48. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
49. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(10):1929-34.

50. Du T, Sun X, Yu X. Non-HDL cholesterol and LDL cholesterol in the dyslipidemic classification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in health and disease*. 2017;16(1):1-7.
51. Wu K-T, Kuo P-L, Su S-B, Chen Y-Y, Yeh M-L, Huang C-I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease severity is associated with the ratios of total cholesterol and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol. *Journal of clinical lipidology*. 2016;10(2):420-5. e1.
52. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver international*. 2009;29(1):113-9.
53. Subichin M, Clanton J, Makuszewski M, Bohon A, Zografakis JG, Dan A. Liver disease in the morbidly obese: a review of 1000 consecutive patients undergoing weight loss surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 2015;11(1):137-41.
54. Le MH, Devaki P, Ha NB, Jun DW, Te HS, Cheung RC, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and risk factors for advanced fibrosis and mortality in the United States. *PloS one*. 2017;12(3):e0173499.
55. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011;53(6):1883-94.
56. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: clinical impact. *Journal of hepatology*. 2018;68(2):268-79.
57. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS genetics*. 2011;7(3):e1001324.
58. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European descent. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1219-30. e6.
59. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Archives of internal medicine*. 2008;168(15):1617-24.
60. Das K, Chowdhury A. Lean NASH: distinctiveness and clinical implication. *Hepatology international*. 2013;7(2):806-13.
61. Younes R, Bugianesi E. NASH in lean individuals. *Seminars in liver disease*, 2019. Thieme Medical Publishers: 086-95.
62. Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical medicine*. 2018;18(3):245.
63. Younossi Z, Henry L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1778-85.
64. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clinics in liver disease*. 2016;20(2):205-14.

65. Mohamad B, Shah V, Onyshchenko M, Elshamy M, Aucejo F, Lopez R, et al. Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis. *Hepatology international*. 2016;10(4):632-9.
66. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in United States veterans is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2016;14(1):124-31. e1.
67. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97. e10.
68. Newton JL. Systemic symptoms in non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases*. 2010;28(1):214-9.
69. Sweet PH, Khoo T, Nguyen S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Primary care. 2017;44(4):599-607.
70. Cheung O, Kapoor A, Puri P, Sistrun S, Luketic VA, Sargeant CC, et al. The impact of fat distribution on the severity of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hepatology*. 2007;46(4):1091-100.
71. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37(6):1286-92.
72. Maximos M, Bril F, Portillo Sanchez P, Lomonaco R, Orsak B, Biernacki D, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2015;61(1):153-60.
73. Shimada M, Hashimoto E, Kaneda H, Noguchi S, Hayashi N. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors for liver fibrosis. *Hepatology research*. 2002;24(4):429-38.
74. McPherson S, Hardy T, Dufour J-F, Petta S, Romero-Gomez M, Allison M, et al. Age as a confounding factor for the accurate non-invasive diagnosis of advanced NAFLD fibrosis. *The American journal of gastroenterology*. 2017;112(5):740.
75. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.
76. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317-25.
77. Angulo P, Bugianesi E, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Barrera F, et al. Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2013;145(4):782-9. e4.
78. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2009;7(10):1104-12.
79. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut*. 2008;57(10):1441-7.

80. Lieber CS, Weiss DG, Morgan TR, Paronetto F. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index in patients with alcoholic liver fibrosis. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2006;101(7):1500-8.
81. Singal A, Thomassen L, Gretch D, Shuhart M. Use of the AST to platelet ratio index in HCV/HIV co-infected patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;33(5):566-77.
82. Wai C-T, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-26.
83. Loaeza-del-Castillo A, Paz-Pineda F, Oviedo-Cárdenas E, Sánchez-Avila F, Vargas-Voráčková F. AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis. *Annals of hepatology*. 2008;7(4):350-7.
84. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC gastroenterology*. 2006;6(1):1-7.
85. Lee J-H, Kim D, Kim HJ, Lee C-H, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 2010;42(7):503-8.
86. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*. 2009;137(3):865-72.
87. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of hepatology*. 2010;53(2):372-84.
88. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *Journal of hepatology*. 2009;51(6):1061-7.
89. Reeder SB, Cruite I, Hamilton G, Sirlin CB. Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Journal of magnetic resonance imaging*. 2011;34(4):729-49.
90. Venkatesh SK, Yin M, Ehman RL. Magnetic resonance elastography of liver: technique, analysis, and clinical applications. *Journal of magnetic resonance imaging*. 2013;37(3):544-55.
91. Bonekamp S, Kamel I, Solga S, Clark J. Can imaging modalities diagnose and stage hepatic fibrosis and cirrhosis accurately? *Journal of hepatology*. 2009;50(1):17-35.
92. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;128(2):343-50.
93. Tsai E, Lee T-P. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis, including noninvasive biomarkers and transient elastography. *Clinics in liver disease*. 2018;22(1):73-92.
94. Machado NO. Complications of liver biopsy-risk factors, management and recommendations. *Liver biopsy: IntechOpen*; 2011.
95. West J, Card TR. Reduced mortality rates following elective percutaneous liver biopsies. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1230-7.

96. Schiano TD, Azeem S, Bodian CA, Bodenheimer Jr HC, Merati S, Thung SN, et al. Importance of specimen size in accurate needle liver biopsy evaluation of patients with chronic hepatitis C. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005;3(9):930-5.
97. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *Journal of hepatology*. 2003;39(2):239-44.
98. Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Seminars in liver disease*, 2012. Thieme Medical Publishers: 003-13.
99. Liver EAftSoT, Diabetes EAftSo. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obesity facts*. 2016;9(2):65-90.
100. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;16(42):5286.
101. Kristiansen MN, Veidal SS, Christoffersen C, Jelsing J, Rigbolt KT. Molecular characterization of microvesicular and macrovesicular steatosis shows widespread differences in metabolic pathways. *Lipids*. 2019;54(1):109-15.
102. Mostafa M, Abdelkader A, Evans JJ, Hagen CE, Hartley CP. Fatty liver disease: a practical approach. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2020;144(1):62-70.
103. Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, et al. From Mallory to Mallory–Denk bodies: what, how and why? *Experimental cell research*. 2007;313(10):2033-49.
104. Bedossa P, Consortium FP. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565-75.
105. Ku N-O, Zhou X, Toivola DM, Omary MB. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999;277(6):G1108-G37.
106. Sundström B. Human cytokeratins: their use as targets in cancer management. Umeå universitet; 1990.
107. Haines RL, Lane EB. Keratins and disease at a glance. *Journal of cell science*. 2012;125(17):3923-8.
108. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual review of biochemistry*. 1994;63(1):345-82.
109. Ku NO, Strnad P, Zhong BH, Tao GZ, Omary MB. Keratins let liver live: mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology*. 2007;46(5):1639-49.
110. Chougule P, Sumitran-Holgersson S. Cytokeratins of the liver and intestine epithelial cells during development and disease. *Cytokeratins-Tools in Oncology*. Croatia: InTech. 2012:15-32.
111. Li R, Liao X-H, Ye J-Z, Li M-R, Wu Y-Q, Hu X, et al. Association of keratin 8/18 variants with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance in Chinese patients: A case-control study. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(22):4047.
112. Younes R, Govaere O, Petta S, Miele L, Tiniakos D, Burt A, et al. Caucasian lean subjects with non-alcoholic fatty liver disease share long-term prognosis of non-lean: time for reappraisal of BMI-driven approach? *Gut*. 2021.

113. Sharp KP, Schultz M, Coppel KJ. Is non-alcoholic fatty liver disease a reflection of what we eat or simply how much we eat? *JGH Open*. 2018;2(2):59-74.
114. Duarte S, Stefano J, Miele L, Ponziani F, Souza-Basqueira M, Okada L, et al. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: a prospective pilot study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2018;28(4):369-84.
115. Goossens GH. The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function. *Obesity facts*. 2017;10(3):207-15.
116. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior*. 2008;94(2):206-18.
117. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive physiology*. 2014;4(1):177.
118. Lee Yh, Kim SU, Song K, Park JY, Kim DY, Ahn SH, et al. Sarcopenia is associated with significant liver fibrosis independently of obesity and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: nationwide surveys (KNHANES 2008-2011). *Hepatology*. 2016;63(3):776-86.
119. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine*. 2012;91(6):319-27.
120. Weinberg EM, Trinh HN, Firpi RJ, Bhamidimarri KR, Klein S, Durlam J, et al. Lean Americans with nonalcoholic fatty liver disease have lower rates of cirrhosis and comorbid diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2021;19(5):996-1008. e6.
121. Tabibian JH, Lazo M, Durazo FA, Yeh HC, Tong MJ, Clark JM. Nonalcoholic fatty liver disease across ethno-racial groups: Do Asian-American adults represent a new at-risk population? *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26(3):501-9.
122. Akyüz F, Demir K, Özdil S, Aksoy N, Poturoğlu Ş, İbrişim D, et al. The effects of rosiglitazone, metformin, and diet with exercise in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases and sciences*. 2007;52(9):2359-67.
123. Iritani S, Akuta N, Kawamura Y, Kajiwara A, Kasuya K, Fujiyama S, et al. Non-invasive predictors of prognosis of Asian patients with histopathologically-confirmed lean nonalcoholic fatty liver disease. *BMC gastroenterology*. 2020;20(1):1-11.
124. Albhaisi S, Chowdhury A, Sanyal AJ. Non-alcoholic fatty liver disease in lean individuals. *JHEP Reports*. 2019;1(4):329-41.
125. Akyuz U, Yesil A, Yilmaz Y. Characterization of lean patients with nonalcoholic fatty liver disease: potential role of high hemoglobin levels. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015;50(3):341-6.
126. Guy CD, Suzuki A, Burchette JL, Brunt EM, Abdelmalek MF, Cardona D, et al. Costaining for keratins 8/18 plus ubiquitin improves detection of hepatocyte injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Human pathology*. 2012;43(6):790-800.
127. Brown M, Dainty S, Strudwick N, Mihai AD, Watson JN, Dendooven R, et al. Endoplasmic reticulum stress causes insulin resistance by inhibiting delivery of newly synthesized insulin receptors to the cell surface. *Molecular biology of the cell*. 2020;31(23):2597-629.
128. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.

129. Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka T-A, Kasami R, Kohno K, Iwawaki T, et al. Pioglitazone reduces ER stress in the liver: direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocrine journal*. 2009;0909180336-.
130. Wong VW-S, Wong GL-H, Yeung DK-W, Lau TK-T, Chan CK-M, Chim AM-L, et al. Incidence of non-alcoholic fatty liver disease in Hong Kong: a population study with paired proton-magnetic resonance spectroscopy. *Journal of hepatology*. 2015;62(1):182-9.
131. Kim NH, Kim JH, Kim YJ, Yoo HJ, Kim HY, Seo JA, et al. Clinical and metabolic factors associated with development and regression of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese subjects. *Liver International*. 2014;34(4):604-11.
132. Chrysavgis L, Ztriva E, Protopapas A, Tziomalos K, Cholongitas E. Nonalcoholic fatty liver disease in lean subjects: Prognosis, outcomes and management. *World Journal of Gastroenterology*. 2020;26(42):6514.
133. Hamurcu Varol P, Kaya E, Alphan E, Yilmaz Y. Role of intensive dietary and lifestyle interventions in the treatment of lean nonalcoholic fatty liver disease patients. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2020;32(10):1352-7.
134. Li C, Guo P, Okekunle AP, Ji X, Huang M, Qi J, et al. Lean non-alcoholic fatty liver disease patients had comparable total caloric, carbohydrate, protein, fat, iron, sleep duration and overtime work as obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2019;34(1):256-62.
135. Yasutake K, Nakamuta M, Shima Y, Ohyama A, Masuda K, Haruta N, et al. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2009;44(4):471-7.
136. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014. e1.