



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

**NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI OLAN
BİREYLERDE SERUM VASPIN, APELİN-36 VE OBESTATİN
DÜZEYLERİ**

**Dr. BİLGE AKTAŞ
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL, 2010



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

**NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI OLAN
BİREYLERDE SERUM VASPİN, OBESTATİN VE APELİN-36
DÜZEYLERİ**

Dr. BİLGE AKTAŞ
UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. EROL AVŞAR

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract)	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	vi
1. Giriş	1
2. Amaç	4
3. Genel Bilgiler	5
3.1. Epidemiyoloji	8
3.2. Prognoz ve İnsidans	11
3.3. Patogenez	12
3.4. NAFLD Tanısını Koymada Karaciğer Biyopsisinin Rolü	17
3.5. Tedavi	20
3.5.1. Kilo verilmesi	20
3.5.2. Vitamin E ve C	21
3.5.3. Hipoglisemik ajanlar	21
3.5.4. Probukol	22
3.5.5. Betain	22
3.5.6. Ursodeoksikolik Asit	22
3.5.7. Losartan	22
3.5.8. Pentoksifilin	23
3.5.9. Orlistat	23
3.6. NAFLD Tanısında Kullanılması Planlanan Biyobelirteçlerin Özellikleri.....	23
3.7. Klasik Adipokinler ve NAFLD	24
3.8. Yeni Adipokinler ve NAFLD: Tezin Amacı	25
4. Materyal ve Metod	31
4.1. Etik Kurul	31
4.2. Çalışma Popülasyonu	31
4.2.1. Alınma Kriterleri	31
4.2.2. Dışlama Kriterleri	31
4.3. Klinik ve Biyokimyasal Özellikler	32
4.4. Karaciğer Histolojisi	33
4.5. Adipokinlerin Analizi (ELISA)	35
4.6. Data Analizi	36
5. Bulgular	37
6. Tartışma	45
7. Sonuçlar	52
8. Kaynaklar	53

ÖNSÖZ

Tez projemin planlanmasından gerçekleşmesine kadar her aşamasında bana destek olan, bilimsel çalışmanın gerektirdiği düzen ve titizliği öğreten tez danışmanı hocam Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalında görevli Prof. Dr. Erol Avşar'a, Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cem Kalaycı'ya, Gastroenteroloji öğretim üyelerinden Prof. Dr. Neşe İmeryüz'e ve Prof. Dr. Osman Özdoğan'a, Gastroenterolojide yandal uzmanlığını yapmakta olan ve çalışmanın her aşamasında büyük bir özveriyle destek olan Uzm. Dr. Yusuf Yılmaz'a, Uzm. Dr. Oya Yönel'a, deneysel çalışma ve yoğun laboratuvar temposunda birlikte çalıştığımız Dr. Fatih Eren'e, bu projenin gerçekleşmesine katkıda bulunan gastroenterolojinin tüm hemşirelerine, projemin finansal desteğini sağlayan Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu'na, İç Hastalıkları ihtisasım süresince bana rehberlik eden ve öğretimime katkıda bulunan Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Çetin Özener başta olmak üzere tüm hocalarıma, ihtisasım süresince birlikte çalıştığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma, tez projemin sonuçlanmasına kadar geçen süreçte hiçbir desteğini esirgemeyen biricik kardeşim Dr. Birol Aktaş'a, Tıp fakültesine girmemi ve doktor olmamı sağlayan, tüm eğitim hayatım boyunca iyi veya kötü her durumda yanımda bulunan canım ağabeyim İşadamı Cafer Aktaş'a, her zaman sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Bilge Aktaş

01.06.2010

ÖZET

Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Olan Bireylerde Serum Vaspın, Obestatin ve Apelin-36 Düzeyleri

Giriş: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) hepatositlerde trigliserid damlacıklarının birikimiyle karakterize; basit yağlanmadan steatohepatit (NASH)' e, ilerlemiş fibrozis ve siroza kadar geniş bir spektrumu kapsayan ve gelişmiş ülkelerde en sık görülen kronik karaciğer hastalığıdır. Hastalığın patogeneğinde insülin rezistansının önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Giderek artan kanıtlar, yağ dokusu kaynaklı adipokinlerin insülin homeostazisini de etkileyerek NASH patogeneğinde rol alabileceğini düşündürmektedir.

Amaç: Bu çalışmada NAFLD' lı bireylerde yeni adipokinlerden vaspın, obestatin, ve apelin-36' nın serum seviyeleri ile bu moleküllerin hastaların klinik, biyokimyasal ve histolojik özellikleri ile olası ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya karaciğer biyopsisi ile NAFLD tanısı konmuş 91 hasta ve 81 sağlıklı kontrol alındı. Serum vaspın, obestatin ve apelin-36 seviyeleri ELISA ile ölçüldü. Çok değişkenli lineer regresyon modelleri kullanılarak bu adipokinler ile hastaların özellikleri arasındaki ilişki analiz edildi.

Bulgular: Tek değişkenli analiz sonucunda, serum obestatin seviyesinde hasta ve kontroller arasında fark bulunmazken; serum vaspın ve apelin-36 konsantrasyonları, NAFLD olan hastalarda kontrollere göre anlamlı oranda yüksek saptandı. Serum vaspın düzeyleri; C-reactive protein ($r=0.378$, $p < 0.001$) ve karaciğer fibrozis skorları ($r=0.401$, $p<0.001$) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterdi. Apelin-36 seviyeleri ise HOMA-IR ($r=0.204$, $p<0.01$) ile ilişkiliydi. Aşamalı lineer regresyon analizinden sonra, serum vaspın seviyelerinin

hastalardaki karaciğer fibrozis evrelerinin tek bağımsız prediktörü olduğu gösterildi ($\beta=0.37$, $t=3.99$, $p<0.01$).

Sonuç: Bu yeni adipokinlerden özellikle vaspin hastalığın patogenezinde rol alıyor olabilir. Bulgularımız gelecekte yeni adipokinlerden özellikle vaspinle ilişkili ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu desteklemektedir.

ABSTRACT

Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 in patients with nonalcoholic fatty liver disease

Objective: The novel adipokines vaspin, obestatin, and apelin-36 are associated with insulin resistance and the components of the metabolic syndrome. We assayed circulating levels of these molecules and examined their association with clinical, biochemical, and histological phenotypes in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Design: Case-control study.

Patients and methods: Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 were assayed by ELISA in 91 patients with biopsy-proven NAFLD and 81 controls. We analyzed associations between adipokines and the characteristics of patients with NAFLD using multivariable linear regression models.

Results: Univariable analysis showed that concentrations of vaspin and apelin-36 were significantly higher in patients with NAFLD than in controls, while no differences in obestatin levels were found. Serum vaspin levels showed a statistically significant association with C-reactive protein ($r = 0.378$, $P < 0.001$) and liver fibrosis scores ($r = 0.401$, $P < 0.001$), while apelin-36 levels showed a modest association with HOMA-IR ($r = 0.204$, $P < 0.01$). After stepwise linear regression analysis, serum vaspin levels were the only independent predictor of liver fibrosis scores in patients with NAFLD ($\beta = 0.37$; $t = 3.99$, $P < 0.01$).

Conclusion: Serum vaspin levels are raised in patients with NAFLD regardless of potential confounders and represent an independent predictor of liver fibrosis scores. These findings support further investigation of this novel adipokine in metabolic liver diseases.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, nonalkolik steatohepatit, adipositokinler, vaspin, obestatin, apelin-36

SİMGELER VE KISALTMALAR

AASLD	: American Association of the Study of Liver Diseases
ADA	: American Diabetes Association
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ATP III	:Adult treatment panel III
AUC	: Area under curve
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CCl ₄	: Karbon tetraklorür 4
ChAT	: Kolin asetiltransferaz
CRP	: C reaktif protein
Cyp2e1	: Sitokrom P450 2e1
Cyp4a10	: Sitokrom P450 4a10
Cyp4a14	:Sitokrom P450 4a14
DM	: Diabetes mellitus
E	. Erkek
GGT	: Gama glutamil transferaz
HC	: Hepatoselüler Kanser
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HOMA-IR	:Homeostatic Model Assesment-Insulin Resistance
HSCs	: Hepatik stellat hücreler
hsCRP	: Yüksek duyarlıklı C reaktif protein
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-12	: İnterlökin-12
ICAM 1	: İnterselüler adezyon molekülü
irOBS	: Obestatin immunreaktivitesi
K	: Kadın

LDL	: Düşük yoğunluklu protein
MCD	: Metiyonin kolin diyeti
MCP 1	: Monosit kemotaktik protein 1
MR	: Manyetik rezonans
NAFLD	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Nonalkolik steatohepatit
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
NHANES III	: National Health and Nutrition Examination Survey III
NIDDK	: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
OETF sıçanlar	: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty sıçanlar
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
RBP-4	: Retinol bağlayıcı protein-4
SOCS3	: Supressor cytokine signaling 3
SREBP-1	: Sterol regulating binding protein-1
SS	: Standart sapma
TGF-β	: Transforming growth factor-beta
TNF-α	: Tumor necrosis factor-alfa
US	: Ultrasonografi
VCAM 1	: Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YYYS	: Yüksek yağ yüksek sükroz diyeti

1.GİRİŞ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), metabolik sendromun hepatik bir komponenti olarak kabul edilmektedir (1,2). Erişkinlerdeki karaciğer fonksiyon testi anormalliklerinin en sık nedenidir ve genel popülasyondaki prevalansı %10-24 arasında değişmektedir (3-5). Nonalkolik steatohepatit (NASH) prevalansı ise %3-5 arasında değişmektedir (3,6). Ancak daha da önemlisi bazı özel popülasyonlarda örneğin morbid obezlerde NAFLD %75-95, NASH %20-47 arasında görülmektedir (3,6,7). Obezite prevalansı arttıkça NAFLD da giderek artmaktadır ve bu durum global bir halk sağlığı problemi olarak kalacaktır.

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı; basit yağlanmadan steatohepatite (NASH) kadar uzanan, siroz ile komplike olabilen geniş bir spektrumu kapsar. NASH, hastalığın progresif formudur, siroz ve hepatosellüler karsinoma (HCC) ile komplike olabilecek klinik bir durumdur (8).

NASH patofizyolojisi son birkaç yıldır hepatologların ilgi odağı olmasına rağmen tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde kanıtlar, patolojik şekilde gerçekleşen hepatosit apoptozisinin, NASH'in belirgin özellikleri olan inflamasyona ve fibroze yol açtığını göstermektedir. Bu durumun steatozis steatohepatite progresyonundan sorumlu asıl mekanizma olduğu düşünülmektedir (9-11).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının obezite, insülin rezistansı ve tip 2 DM ile güçlü ilişkisi vardır ve günümüzde artık metabolik sendromun önemli bir komponenti olduğu kabul edilmektedir.

NAFLD patogenezinde temelde insülin rezistans sendromu ve oksidatif stres rol oynamaktadır . Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu, nükleer faktör –kB- bağımlı sitokin ekspresyonu ve adipositokinler nedeniyle oluşan oksidatif stres; hepatosellüler hasar, inflamasyon, fibrozis ve progresif karaciğer hastalığına sebep olabilir. Adipositler tarafından üretilen adipositokinler NAFLD patogenezinde rol alan insülin rezistansında, kompleks parakrin ve endokrin mekanizmalarda önemli rol oynayabilir (12, 13). Non- alkolik yağlı karaciğer

hastalığı, karaciğer parankiminde aşırı miktarda trigliserid ve serbest yağ asidi birikimiyle karakterizedir (6,14).

Giderek artan kanıtlar, yağ dokusu kaynaklı adipokinlerin de NASH patogenezinde rolü olduğunu düşündürmektedir (15-19).

Visseral adipoz doku, insülin rezistansının eşlik ettiği bir çok hastalığın (Tip 2 DM, NAFLD, vb.) patogenezinde önemli bir risk faktörüdür (20). Visseral adipoz doku, miktar olarak subkutanöz adipoz dokuya göre çok daha az olmasına rağmen daha zararlı olarak kabul edilmektedir. Diğer yağ dokularından farklı olarak visseral adipoz doku portal vene direne olur, dolayısıyla bu yağ dokusu karaciğerle direkt ilişki halindedir. Ayrıca, visseral yağ dokusundan salınan ürünler (adipositokinler) insülin rezistansı ile seyreden tip 2 DM' nin , NAFLD' in oluşmasında veya önlenmesinde önemli bir role sahip olabilirler. Gerçekten de obez, insülin rezistanslı bireylerden abdominal subkutan yağ dokusunun çıkartılmasının metabolik bir etkisi saptanmadığı halde aynı bireylerde omental bölgedeki yağ dokusunun çıkartılması insülin direncinin düzelmesiyle sonuçlanmıştır (21, 22). Ayrıca çoğu kesitsel çalışmada insülin duyarlılığı ile visseral yağ dokusu arasında subkutan yağ dokusuna göre daha iyi korelasyon saptanmıştır (20).

Daha önce bazı adipokinlerin NASH patogenezindeki rolü araştırılmıştır. Örneğin hipoadinopektininin hepatik yağ birikimine ve insülin rezistansına neden olduğu gösterilmiştir (17, 23, 24). Ayrıca rezistinin insülin rezistansı, obezite ve aterosklerozla ilişkisi saptanmıştır (160-162). Vaspin, obestatin, apelin gibi daha yeni adipositokinlerin ise NAFLD patogenezindeki yeri net değildir.

Vaspin , yakın zamanda keşfedilmiş visseral adipoz dokudan kaynaklanan serin proteaz ailesinden bir serpindir. Obezite, insülin direnci modeli olan Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) sıçanlarda plazma konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (25). Serum vaspin konsantrasyonu artışıyla obezite ve azalmış insülin duyarlılığı arasında insan çalışmalarında da

ilişki bulunmuş, ayrıca sıçanlara vaspin verilmesiyle bozulmuş glukoz toleransının düzeldiği, insülin duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (25, 26).

Obestatin ise sıçan midyesinden izole edilmiş 23 aminoasitli bir peptiddir. Yiyecek alımını, sindirim sistemi motilitesi ve kilo alımını azaltır (27). Yiyecek alımını azaltmasının, beyinde susama hissini inhibe etme özelliğine sekonder olduğu iddia edilmektedir (28, 29).

Apelin ise yeni tanımlanmış bir adipositokindir, önemli miktarda adipoz dokudan salınır (30). Hem insanlarda hem de sıçanlarda obezite ve hiperinsülinemide upregüle olduğu gösterilmiştir (30).

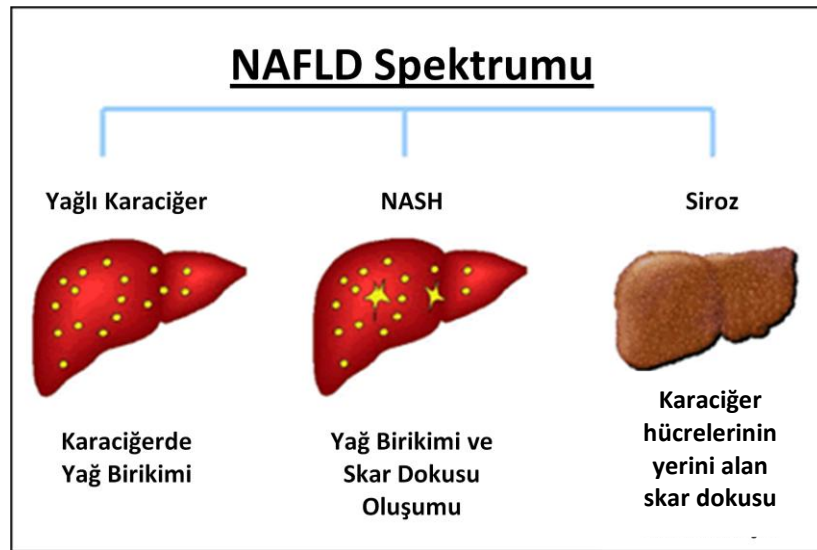
Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı endüstrileşmiş toplumlardaki en yaygın kronik karaciğer hastalığıdır. Önemsiz bir hastalık değildir. NAFLD, basit yağlanmadan steatohepatite kadar uzanan geniş bir spektrumu kapsar, NASH potansiyel olarak fibroze ve siroza yol açabilir (31). NAFLD'ın iki tipi olan basit yağlanma ile NASH' in klinik ayırımı bu açıdan çok önemlidir. Günümüzde NASH tanısı için tek kesin diyagnostik yöntem vardır, o da karaciğer biyopsisidir (32, 33). İnvaziv olması nedeniyle ciddi komplikasyonlara yol açabilir, hastalar tarafından kolay kabullenilmez, hastalığın seyrinin takibinde uygun bir yöntem değildir. Giderek artan kanıtlar, yağ dokusu kaynaklı adipokinlerin de NASH patogeneğinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Şu ana kadar NAFLD' da adı geçen adipositokinlerden obestatin ile ilgili hiçbir çalışma yoktur. Bildiğimiz kadarıyla şu ana kadar biyopsi kanıtlı NAFLD hastalarında, apelinin çalışıldığı tek insan çalışması mevcuttur. Bu çalışmada plazma apelin seviyelerinin, NAFLD olan hastalarda kontrollere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (94). Vaspin'in NAFLD'da insülin duyarlılığı ve inflamatuvar cevapta oynadığı rolle ilişkili olarak literatürde tek çalışma bulunmaktadır, burda adipokin seviyesi ile karaciğer fibrozisinin şiddeti arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (89).

2. AMAÇ

Bu çalışma obezite, insülin rezistansı ve tip 2 DM ile çok yakından ilişkili olan nonalkolik yağlı karaciğer hastalığıyla yeni adipositokinlerin NAFLD patogenezindeki rolü olup olmadığını saptamaya odaklanmıştır. Çalışmanın amacı, nonalkolik yağlı karaciğerli hastalarda serum vaspin, obestatin ve apelin düzeyleri ile hastalığın klinik, biyokimyasal ve histolojik özellikleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

3. GENEL BİLGİLER

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), hastalığın selim formu olan basit yağlanmadan ilerleyici formu olan steatohepatite (NASH) kadar uzanan geniş bir spektrumu kapsar (Şekil 1). Steatohepatite fibrozis eşlik edebilir ve bu durum siroz ve hepatosellüler kanser ile komplike olabilir. Karaciğer transplantasyonu yapılan NASH hastalarının bir kısmında hastalık tekrarlayabilir (106-108).



Şekil 1: NAFLD olanlarda hastalığın doğal seyri

(www.gi.org/patients/gihealth/fld.asp)

NAFLD, batılı ülkelerdeki karaciğer hastalığının en sık sebebidir (34) ve Türkiye’de hepatoloji polikliniklerine yapılan başvuruların en sık nedenidir. Karaciğer biyopsisi, NASH’in kesin tanısını koymada altın standart olup NASH’i basit yağlanmadan ayırmada en iyi yöntemdir (35). Ne yazık ki invaziv doğası gereği ciddi komplikasyonlara yol açabilen ve bu nedenle hastalar tarafından kolaylıkla kabullenilmeyen bir tanı yöntemidir (36). Karaciğer biyopsisi, her ne kadar NAFLD tanı ve takibinde anahtar rolü oynasa da kısıtlılıkları mevcuttur. Bu sebeple klinisyenlerin NASH ve karaciğer fibrozisi riskini taşıyan hastaları tanımlayabilmek için klinik değerlendirmeye yardımcı olacak ek tanı

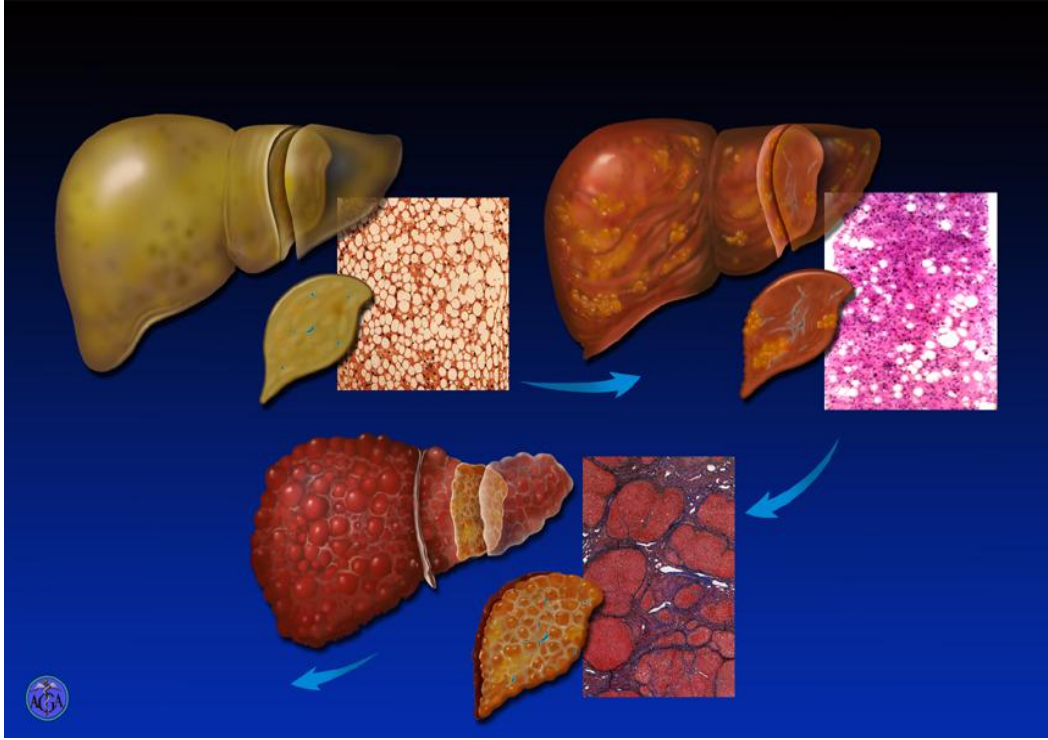
yöntemlerine ihtiyacı vardır. Biyobelirteçler, NAFLD bünyesindeki NASH hastalarını daha iyi tanımlamada kullanılabilecek yöntemler olup bu durumdaki hastaların prognozunu belirlemede etkili olacağına dair ümit vermektedir (37,38).

NASH'li hastaların çoğunluğu asemptomatiktir. Hastaların bir kısmında halsizlik, yorgunluk, sağ üst kadranda huzursuzluk gibi nonspesifik semptomlar olabilir (111). Hastaların en yaygın başvuru şekli rutin laboratuvar incelemelerinde saptanan anormal karaciğer fonksiyon testleridir. Hastaların birçoğunda saptanabilen tek muayene bulgusu hepatomegalidir. Serum AST ve ALT düzeyleri hastaların neredeyse %90'ında yüksektir (111). Transaminazlardaki artış çoğu olguda normalin 1-3 katı arasındadır. AST/ALT oranı NASH'li hastalarda genellikle 1'den düşüktür. Alkolik hepatitli hastalarda ise bu oran genellikle 2'nin üstündedir (112,113). GGT ve alkalin fosfataz düzeyleri olguların yarısından azında normalden yüksek bulunmaktadır, hiperbilirubinemi ise nadirdir (111). Ancak serum aminotransferazlarının normal düzeyde olması, karaciğerin ilerlemiş histolojik özelliklerini dışlamaz. Bir çalışmada yağlı karaciğeri ve normal aminotransferazları olan 51 hastaya biyopsi yapılmış; 12 hastada köprüleşme fibrozisi, 6 hastada ise siroz saptanmıştır (114).

NAFLD, histolojik olarak hepatositlerin en az % 5 inde yağ damlacıklarının bulunması ve karaciğer ağırlığının %5-10'unu yağ damlacıklarının oluşturması şeklinde tanımlanır. Ayrıca, NAFLD tanısı konulan bireylerde, haftalık alkol tüketimi erkeklerde 140 gr, kadınlarda 70 gr'ı geçmemelidir (39). Diğer yandan hepatik sirozda karaciğerde yağ birikimi gözlenmemektedir. Bu sebeple bu tanımlama aslında tartışmalıdır (40). Morfolojik olarak hepatosteatoz ise, hepatositlerin içinde makroveziküler ve mikroveziküler intrastoplazmik yağ damlacıklarının bulunması ile karakterizedir (36). Makroveziküler steatozda, büyük bir yağ vaküölü hepatositlerin stoplazmasını doldurur ve nükleusu periferite iter. Böylece karakteristik taşlı yüzük görüntüsü oluşur. Mikroveziküler steatozda ise çok sayıda küçük yağ damlacıkları hepatositlerin sitoplazmasında dağılırlar ve nükleus periferite itilmez.

Hepatosteatoz, altta yatan nedenin giderilmesi ya da devamlılık göstermesine göre geri dönüşümlü olabilir ya da NASH'e ilerleyebilir (41). Basit yağlanmadan farklı olarak NASH'te steatoz, inflamasyon, fibrozis, hepatositlerde balonlaşma, apoptotik hücreler ve Mallory cisimcikleri görülür (34). İnflamatuvar alanın büyüklüğü oldukça değişken olabilir, ancak her zaman steatozun derecesiyle doğru orantılı değildir. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu; lenfositlerden ve polimorfonükleer lökositlerden oluşmaktadır (36). Apoptotik, balonlaşmış hepatositler ve Mallory cisimciği saptandığında ise NASH'in başladığı inancı yaygındır. Ito hücreleri olarak da bilinen hepatik stellat hücreler (HSC), Disse aralığında (perisinüzoidal aralık, hepatositler ile sinüzoidler arasındaki bölge) bulunan, karaciğer fibrozisinde aktif rol oynayan perisitlerdir. Karaciğerde hücre ölümü ve inflamasyon, stellat hücreleri aktive eder. Bu aktivasyon perisinüzoidal, perivenüler (terminal hepatik venlerin çevresinde) ve perisellüler fibrozisin gelişmesine neden olur. Hepatoselüler proliferasyon kadar hepatik steatoz, inflamasyon ve yoğun fibrogenez de sirozun gelişmesine katkıda bulunur (34-36). NASH'te gözlenen hepatik fibrozis, genellikle tüm karaciğerde gerçekleşen bir hadisedir. Ancak bazı NASH'li hastalarda fibrozis bölgesel veya heterojen olabilir. İşte bu durumda alınan iğne biyopsisi karaciğerin gerçek fibrozis evresini yansıtmayabilir.

NAFLD'in doğal seyrine ait mikroskopik ve makroskopik görünümler Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. NAFLD gelişiminde makroskopik ve mikroskopik görünümler

3.1. Epidemiyoloji

NAFLD, tüm dünyada saptanan en sık karaciğer hastalıklarından biridir (42-44). Hatta, hastalığa yakalananların sayısı giderek artmakta olup epidemik seviyeye ulaşmıştır. Ancak, NAFLD ve NASH'in gerçek prevalansı henüz tam olarak tespit edilememiştir (42). Bildirilen NAFLD prevalansı çalışılan popülasyona ve kullanılan tanı kriterlerine göre değişkenlik göstermektedir (43). Genellikle obez popülasyonda uygulanan toplum tabanlı çalışmalar, genel popülasyondaki NAFLD prevalansını; otopsi çalışmaları, hastane serileri veya çalışmalarına göre daha iyi tahmin etmektedir. Ancak bugüne kadar, bu şekilde bildirilen birkaç çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, toplum tabanlı çalışmalarda NAFLD tanısı genellikle ultrasonografi (US) ile konulmaktadır. Ultrasonografinin katkısı sadece yağlanmanın saptanması değil aynı zamanda derecelendirilmesine de olanak sağlamasıdır, ancak bu klinik derecelendirmenin klinik anlamı henüz belli

değildir ve hastalığın takibi için değer taşıyıp taşımadığı kuşkuludur (104). Derecelendirmede dikkate alınan ölçütler (105):

Grade 1: Hafif diffüz ekojenite artışı mevcuttur, diyafragma ve intrahepatik damarların duvarları normal görünümündedir.

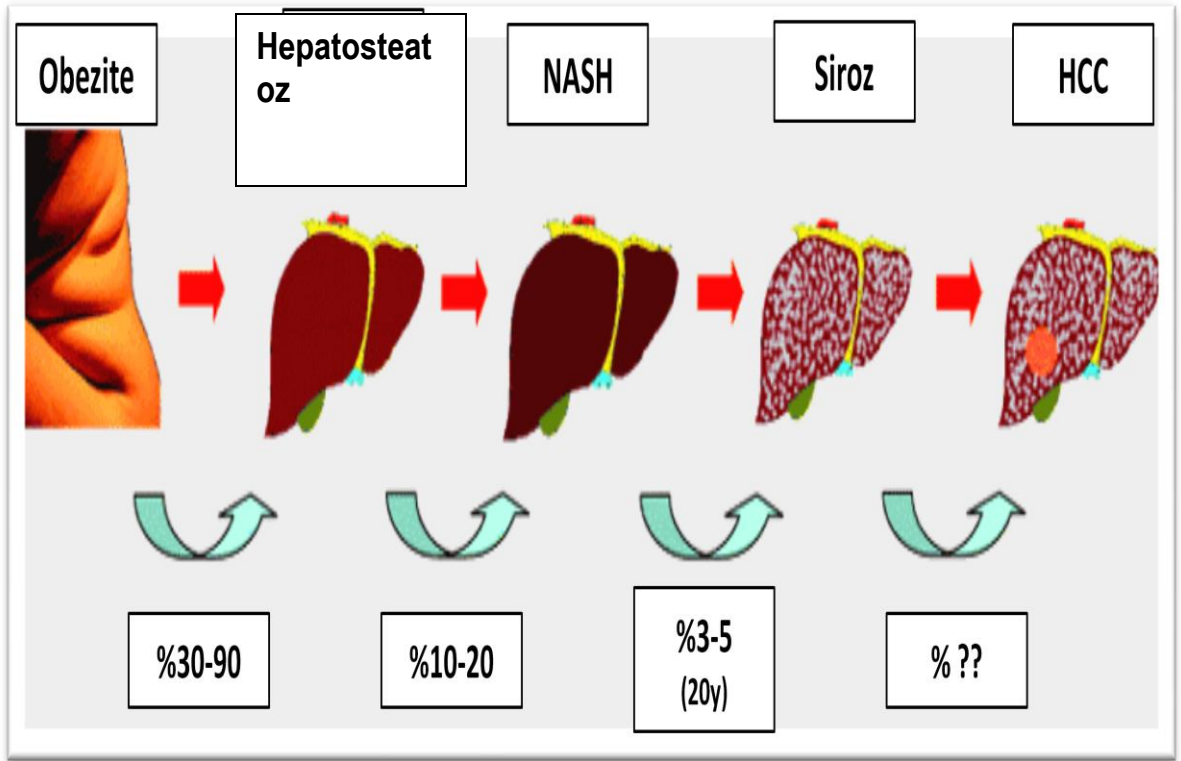
Grade 2: Orta derecede ekojenite artışı, diyafragma ve intrahepatik damar duvarları görüntüsünde hafif silinme mevcuttur.

Grade 3: Belirgin eko artışı, diyafragma, intrahepatik damar duvarları ve sağ lob posterioru görüntüsünde ileri derecede veya tamamen silinme mevcuttur.

US, karaciğer biyopsisinde yağ oranı % 33'ü geçerse iyi bir özgüllük ve duyarlılığa sahiptir. Yani, orta ve ciddi derecede olan steatozu saptamaya imkan vermektedir. Daha duyarlı teknikler olan MRI (Magnetic Resonance Imaging) ve MR spektroskopi ise, pahalı olması ve geniş popülasyonlarda uygulanabilirliğinin zor olması nedeniyle geri planda kalmıştır. NAFLD, AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) tarafından karaciğerdeki yağ birikiminin, karaciğer ağırlığının en az %5-10'u kadar olması şeklinde tanımlanmıştır (42-44). Proton MR spektroskopi ve ¹H-MRS karaciğerdeki yağlanmayı en doğru saptayan noninvaziv yöntemlerdir, fakat hem pratik değildirler hem de geniş kitlelere uygulamak oldukça pahalıdır.

NAFLD, erişkinlerdeki karaciğer test anormalliklerinin en sık nedenidir ve genel popülasyondaki prevalansı %10-24 arasında değişmektedir (36-38). Nonalkolik steatohepatit prevalansı ise %3-5 arasında değişmektedir (36,39). Son zamanlarda yapılmış olan Dallas Heart çalışmasına göre Amerikalı yetişkinlerin %30'unda NAFLD mevcuttur (42). Ayrıca, bu hastalık açısından düşük riskli olarak düşünülen Çin ve Japonya'daki yetişkinlerde sırasıyla %15 ve %14 oranlarında NAFLD saptanması, hastalığın epidemik karaktere sahip olduğunu da göstermektedir (43). Çocuklarda NAFLD prevalansı bilinmemekle birlikte bazı veriler çocukların %2.6-9.6'sında NAFLD olduğu ve obez çocuklarda bu oranın %38-53'e yükseldiğini göstermektedir (42). NAFLD, obezlerde (%75) ve Tip 2 diyabeti olanlarda (%34-74) kontrollere (%16) göre daha sıktır. Morbid

obezlerde NAFLD %75-95, NASH %20-47 arasında görülmektedir (36,39,40). Obezite prevalansı arttıkça NAFLD da giderek artmaktadır ve bu durum global bir halk sağlığı problemi haline almıştır(Şekil 3). Ayrıca Tip 2 diyabeti olan obez hastalarda oldukça yaygın bir bulgudur. NAFLD prevalansı beyaz Amerikalılara göre İspanyollarda daha sık ve Amerikalı zencilerde ise daha az olup yaşla birlikte artış göstermektedir. Tüm bu prevalanslara göre batı topluluklarında en sık kronik karaciğer hastalığı NAFLD'tır (44).



Şekil 3. Obeziteden başlayıp hepatoselüler kansere uzanan NAFLD prevalansı
(<http://ciencia-atual.blogspot.com/2008/06/doena-heptica-gordurosa-no-alcolica.html>)

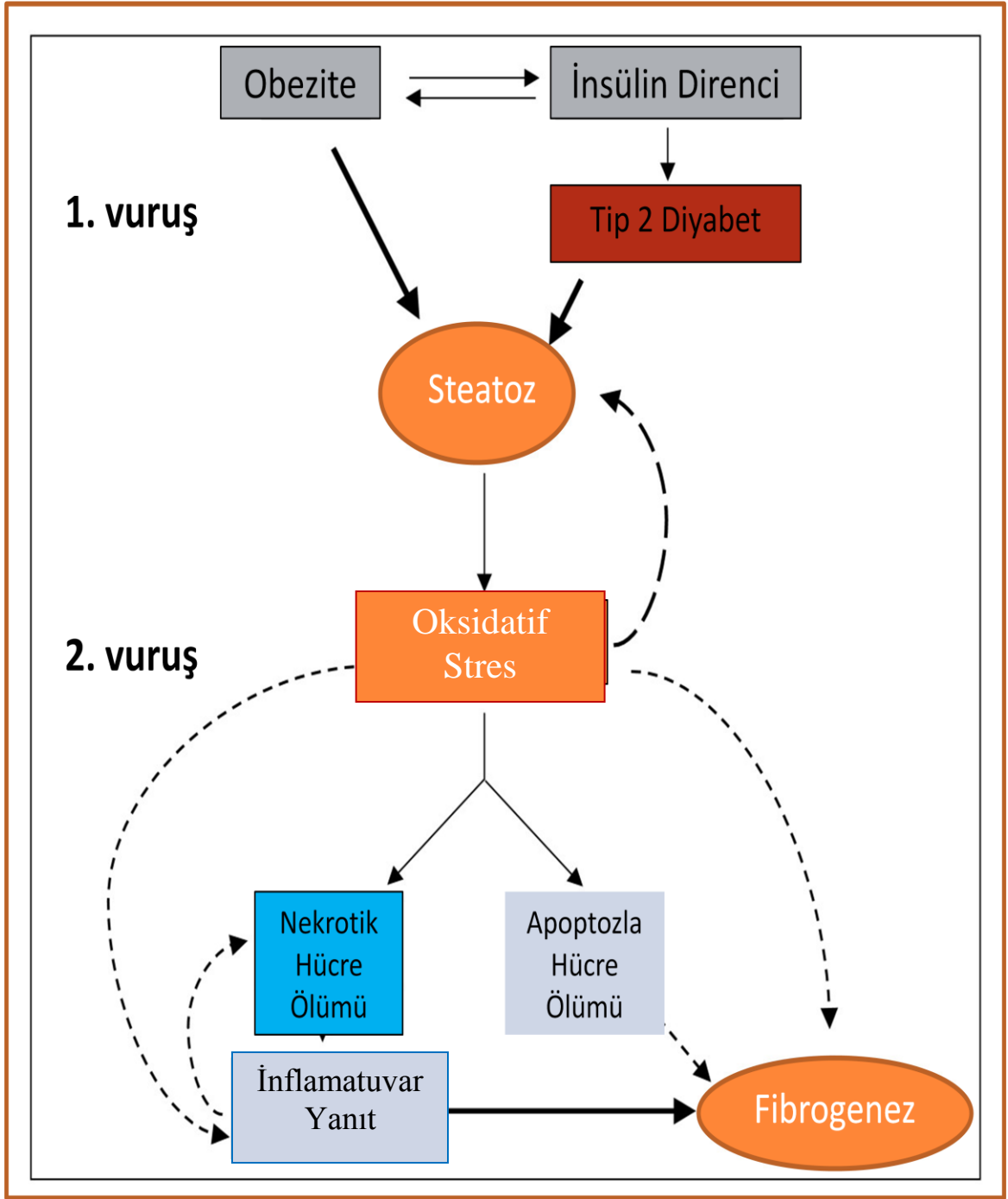
3.2. Prognoz ve İnsidans

NAFLD / NASH'in doğal seyri ve mortalitesine ait literatürde mevcut olan çalışmaların sonuçları çelişkilidir (42-44). NAFLD, uzun yıllar sonra NASH, siroz ve hepatosellüler kansere dönüşebilir. Bu verilerin ışığı altında, hastalığın doğal seyrini kısa bir zaman diliminde saptamak zordur (42). Basit steatozu olan hastalar, daha selim bir prognoza sahip gibi görünmektedir. Danimarka'da Dam-Larsen ve arkadaşları (45) tarafından yapılan bir kohort çalışmada, 109 tane belirgin morbid obezitesi olan hasta yaklaşık 17 yıl izlenmiştir. Siroz insidansının %1'den az olduğu ve yağlı karaciğeri olan hastaların mortalitesinin genel popülasyondan farklı olmadığı saptanmıştır (45). Diğer yandan, NASH'e bağlı kriptojenik sirozu olan hastalar daha kötü bir prognoza sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, 4-10 yıl kadar izlenmiş olan hastaların %9-26 sı ölmüştür ve bu ölümlerin çoğunun sebebi son dönem karaciğer hastalığı ile ilişkilidir (45). Adams ve arkadaşları, toplum tabanlı örneklem kullanarak, NAFLD'ı olan diyabetik hastaların yaşam süresinin sadece diyabeti olan genel popülasyona göre daha az olduğunu saptamıştır (46). Başka bir çalışmada, Ekstedt ve arkadaşları, NAFLD hastalarında, özellikle de NAFLD'ın alt grubu olan NASH hastalarında, kontrollere göre yaşam süresinin kısaldığını bildirmişlerdir (47). Ancak bu çalışmalar genel popülasyonu tam olarak yansıtmamaktadır. Ong ve arkadaşları tarafından yapılan, NHANES III veritabanının kullanıldığı çalışmada ise NAFLD saptanan hastalarda karaciğer ilişkili komplikasyonlar nedeniyle ölüm riskinin NAFLD / karaciğer hastalığı olmayanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (48). Bu risk, obezite ve diyabet varlığından bağımsız olarak tespit edilmiştir. Diyabet varlığında ise karaciğer ilişkili ölümler daha yüksek oranlara ulaşmaktadır. Ancak bu çalışmanın önemli bir kısıtlılığı mevcuttur, o da artmış serum aminotransferazların NAFLD belirteci olarak kullanılmasıdır. Çünkü bu durum, NAFLD'ın gerçek prevalansını, %50'den daha fazla oranda düşük saptamaktadır (48).

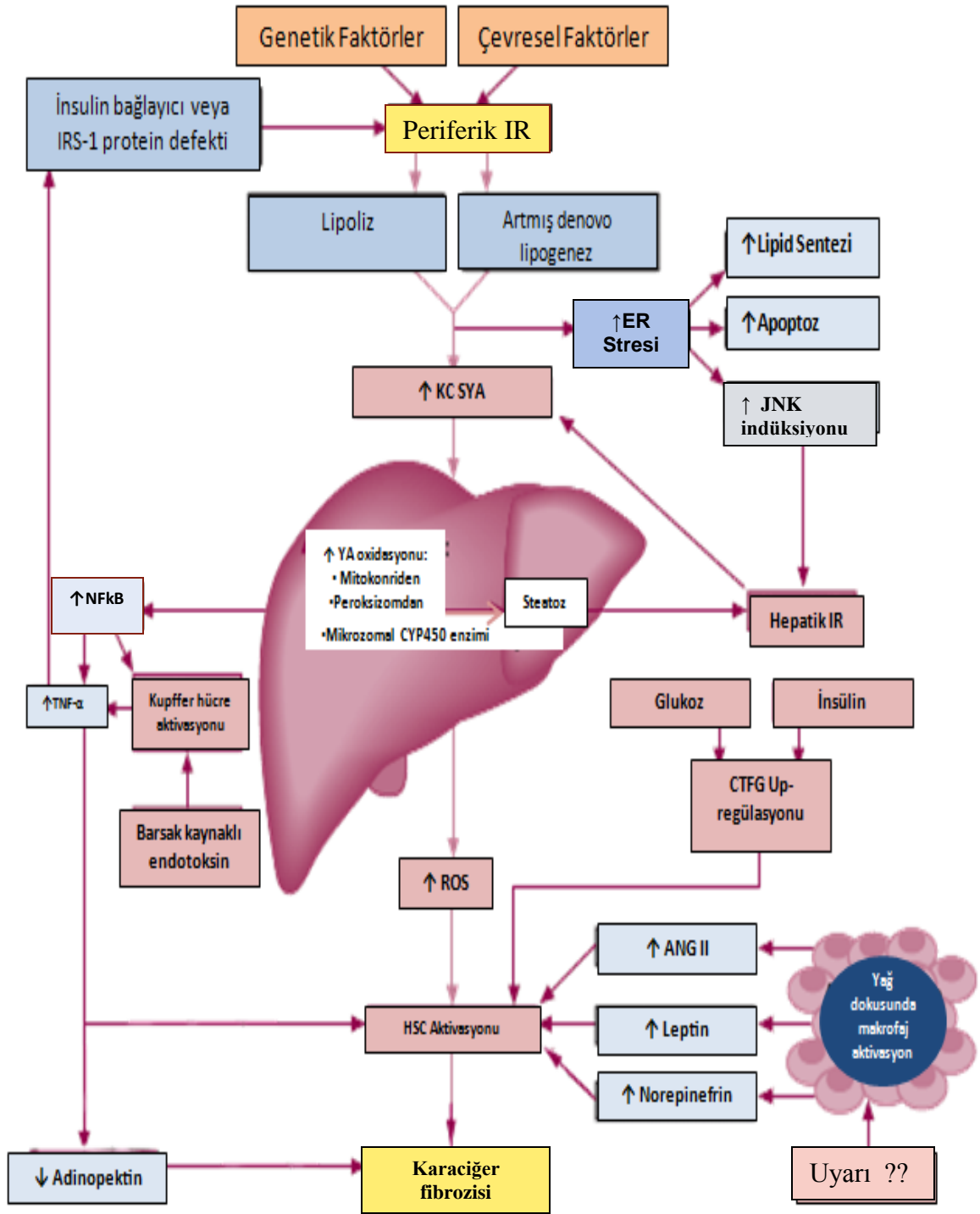
NAFLD hastalarında tüm ölüm nedenleri incelendiğinde, kardiyovasküler hastalıklar ve malignite en önemli sebepler olarak saptanmıştır. Genel popülasyondaki aynı yaş ve cinsiyete sahip bireylerle NAFLD saptanan hastalar karşılaştırıldığında, NAFLD olanlarda daha kısa yaşam süresi beklenmektedir ve bu mortalite oranlarındaki yüksekliğinin ana sebebi kardiyovasküler hastalıklardır (49-51). Hoorn Study, Framingham Heart Study ve Valpolicella Heart Diabetes Study gibi birçok toplum tabanlı çalışmada artmış serum karaciğer enzimleriyle kardiyovasküler hastalık riski arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır. Bu durum geleneksel risk faktörlerinden ve metabolik sendrom komponentlerinden bağımsız olarak bulunmuştur (52,53). Bazı kısa dönem veriler, kriptojenik sirozların önemli bir kısmında altta yatan nedenin NAFLD olduğunu bildirmektedir. Bunların %50-73 kadarında obezite ve diyabet mevcuttur. Ancak, NAFLD'in son dönem karaciğer hastalığına ilerlediğini net olarak gösteren uzun dönem veri yoktur. Ayrıca hastada NAFLD bulunması; kronik hepatit C, alkolik karaciğer hastalığı ve hemokromatoz gibi diğer karaciğer hastalıklarında hastalığın ciddiyeti ve progresyonunu artırmaktadır (42-44).

3.3. Patogenez

Hastalığın basit yağlanmadan NASH'e ilerleyişine ilişkin ilk teoriler, 'çift vuruş' hipotezine dayanır (54). İlk vuruş, karaciğerde trigliserid birikimi veya steatoz olarak tanımlanmıştır. İkinci vuruş, inflamatuvar sitokin / adipokin, mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stres olarak tanımlanmıştır (Şekil 4). Karaciğerin hasarı, ilk vuruş olan hastada ikinci vuruşun gerçekleşmesiyle artmaktadır. Karaciğer hasarı, daha sonra steatohepatit ve/veya fibrozise kadar ilerlemektedir (Şekil 5).



Şekil 4. NAFLD patofizyolojinde yer alan temel hipotezler
(www. fibrogenesis. com)



Şekil 5. NAFLD patogenezi

NFkB: Nükleer faktör kappa B, TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa, CTGF: Bağ dokusu büyüme faktörü, ANGII: Anjiotensin II, IRS-1 protein: İnsülin reseptör substrat-1(İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörlerinden gelen uyarıları hücre içine taşır), IR: İnsülin rezistansı, JNK: c-Jun-N-terminal-kinase (inflamasyon ve sitokin üretiminde yer alır), CYP450: Sitokrom P450, YA: Yağ asidi, SYA: Serbest yağ asidi, HSC: Hepatik stellat hücre, ROS: Reaktif oksijen radikalleri, ER: Endoplazmik retikulum

(<http://ciencia-atual.blogspot.com/2008/06/doena-heptica-gordurosa-no-alcolica.html>)

Son 10 yılda, hem insan çalışmaları ve gözlemler hem de hayvan modellerinde NAFLD etiyojoloji ve patogeneziine ilişkin önemli veriler elde edilmiştir (55-57). NAFLD'ın oluşumunda ekstrahepatik ve intrahepatik olayların birlikte rol oynadığı düşünülmektedir. Karaciğerde yağ depolanmasına zemin hazırlayan faktörler arasında artmış yağ kitlesi ve azalmış fiziksel aktiviteler bulunmaktadır. Aslında bu metabolik ortamın oluşmasında rol oynayan faktörler, proinflamatuvar ve profibrotik özelliğe de sahiptir.

NAFLD ile giderek yaygınlaşan obezite ve tip 2 DM arasında güçlü bir klinik ilişki vardır (34). Patofizyolojisi, NAFLD da oldukça yaygın bir bulgu olan insülin rezistansı ve visseral obeziteyle karakterize metabolik sendromla ilişkilendirilmiştir. İnsülinin ana etkisi; hücre yüzeyindeki glukoz taşıyıcılarının ekspresyonunu indükleyerek hücrelerin glukoz alımını artırmasıdır. İnsülin aynı zamanda adipoz dokuda lipogenezi indükler ve yağ asidi sentezini artırırken lipolizi inhibe eder (109). İnsülin rezistansında ve metabolik sendromda, hiperinsülineminin sonucu olarak serbest yağ asitlerinin hepatik sentezi artar ve kolesterolün dokulara taşınmasında rol oynayan apolipoprotein B-100'ün sentezi azalır. Çoğunlukla visseral yağ dokusunda, lipolizin insülin aracılı inhibisyonunun defektif olmasına yol açar. Böylece insülin rezistansı, hem adipoz dokuda lipolizi hemde hepatositlerde özellikle trigliserid formundaki lipid birikimine yol açan lipogenezi artırır (110).

Başka bir deyişle visseral adipoz doku, insülinin antilipolitik etkisine daha az duyarlıdır ve insülin rezistansı varlığında serbest yağ asitlerinin portal

dolaşım ile karaciğere taşınması artar. Karaciğere taşınan serbest yağ asitleri esterleşerek trigliseridleri oluştururlar ve böylece karaciğerde yağ depolanmasını artırır. Ancak, karaciğere ulaşan serbest yağ asitlerinin çok az bir kısmı visseral/splanknik bölgeden kaynaklanmaktadır. Çoğunluğu insülin rezistansı gelişmesi ve adipoz dokunun lipolizi baskılamaması sonucunda periferik bölgeden gelmektedir.

Her ne kadar insülin rezistansı, insülinin glukoz metabolizmasını düzenleyici etkilerine rezistansla karakterize olsa da karaciğer gibi organlarda insülinin lipojenik etkisi korunmuştur. Son zamanlarda yapılmış olan metabolik çalışmalara göre de NAFLD hastalarında karaciğer yağlanması sadece üçte biri doğuştan olmayıp, yeni oluşan lipogenez ve diyetle alınan serbest yağ asitlerinden oluşmaktadır. Trigliseridlerin çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) şeklinde karaciğerden dışarı atılması da azalır ve bu durum NAFLD da steatozun oluşumuna katkıda bulunur (57). Adiposit kitlesinin büyümesi ve karaciğerin makrofajlar ile infiltre olmasının sonucunda çeşitli sitokinler ve kemokinler salgılanır. Bunların enerji metabolizması, lipid homeostazı, inflamasyon ve yara iyileşmesi üzerine etkileri mevcuttur. Hayvan modellerinde, intrahepatik lipid depolanması ile hepatik steatozdan başlayıp steatohepatit ve karaciğer fibrozuna kadar ilerleme yaygın olarak çalışılmıştır. Hayvan çalışmalarındaki steatohepatit ve fibrozis modellerinden ve insan çalışmalarından elde edilen verileri destekleyen birçok patofizyolojik durum mevcuttur. Bunlar arasında oksidatif stres, pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin salınımı, hepatosellüler apoptoz, aşırı bakteri üremesi, mikrovasküler hasar, mikrozomal, peroksizomal ve mitokondrial hasar bulunmaktadır. Sosyoekonomik düzeyi yüksek olan bireylerin yaklaşık üçte birinde NAFLD görülmektedir, ancak çok az bir kısmı NASH'in inflamatuvar lezyonlarına ilerlemektedir. Bu sebeple NASH gelişimi kişinin genetik özellikleri ve hastalığa karşı duyarlılığıyla da ilişkilidir. Özellikle proinflamatuvar ve sitoprotektif bir dengenin varlığı söz konusudur.

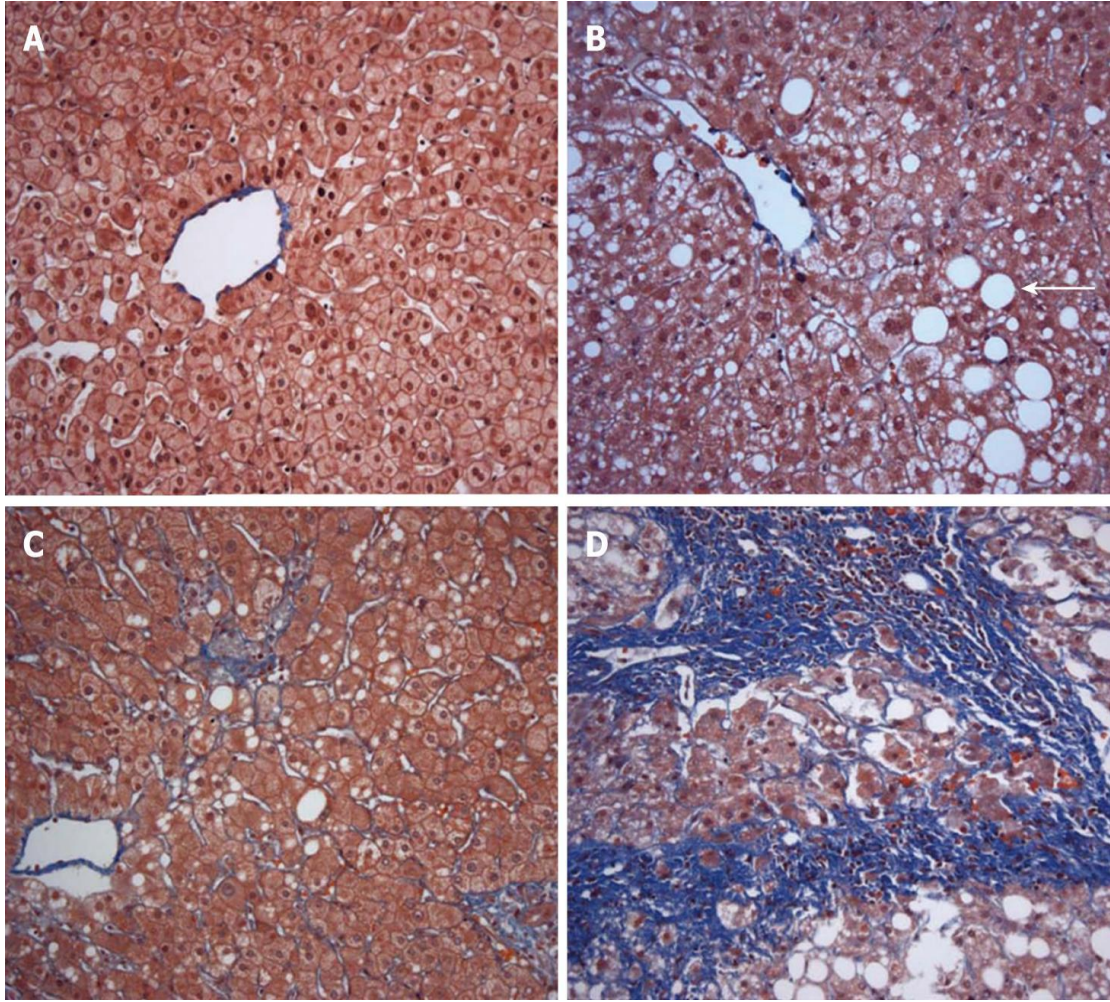
Hepatik steatozisten steatohepatite geçişi en iyi gösteren çalışma modeli, kemirgenlerin metiyonin ve kolin'den fakir, sukroz (%40) ve yağdan (%10)

zengin diyetle (MCD diyeti) beslenmesi esasına dayanır. MCD diyetiyle beslenen sıçan ve fareler kilo kaybetmiş ve karaciğer ağırlıkları azalmıştır. Ciddi steatoz gelişmiş ve sonrasında nekroinflamasyon, serum transaminazlarında artış ve hepatik fibroz oluşmuştur (58,59).

İntrahepatik lipidlerin mikrosomal, peroksizomal ve mitokondriyal yollar aracılığıyla oksidasyonu artar ve lipid peroksidasyon ürünleri ortaya çıkar. Bunlar da oldukça proinflamatuvar karakterde olup hücreye zarar verir. MCD modelinde özellikle Cyp2e1 (insandaki NASH'te de artar), Cyp4a10 ve Cyp4a14 gibi lipid oksidazları, reaktif oksijen radikallerinin üretimine neden olur. Lipid metabolizmasının düzenleyicileri aynı zamanda apoptoza da önayak olur ve bu durum NASH olan bireylerde sık bir bulgudur (60,61). MCD ile beslenen farelerde, IL-6, TNF, TGF- β , ICAM1, VCAM1 ve MCP1'in de içinde bulunduğu çeşitli sitokin, kemokin ve adhezyon molekülleri artmıştır. NASH hastalarının karaciğerinde ise TNF ekspresyonu artmıştır. Ancak dolaşımdaki TNF seviyesi değişmeyebilir. TNF, NF κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin oksidatif strese etkisiyle inflamatuvar hadiseyi düzenler. Ancak insan ve hayvan çalışmalarında saptanan bu verilere göre TNF, NASH gelişimi için şart değildir (55-57).

3.4. NAFLD Tanısını Koymada Karaciğer Biyopsisinin Rolü:

NAFLD, klinik ve patolojik bir tanıdır (62). Bugüne kadar hiçbir klinik test veya görüntüleme yöntemi karaciğer biyopsisinin yerini alamamıştır. Karaciğer biyopsisi; tanı koymada, diğer hastalıkları dışlamada ve steatozis ile steatohepatiti (Şekil 6) ayırt etmede değerli bir yöntemdir. Ayrıca nekroinflamatuvar lezyonların ciddiyetini olduğu kadar fibrozisi ve yapısal değişiklikleri de tayin edebilmektedir. Karaciğer biyopsisi aynı zamanda daha ciddi hastalıklar için risk altında bulunan vakaların tanımlanmasında rol oynamaktadır. Örneğin, steatohepatit ile steatozu ayırır ve fibrozisi saptar (63).



Şekil 6. Normal karaciğerden steatohepatite kadar giden karaciğer histolojisi. A) Normal karaciğer (Bu trikrom boyalı örnekte sitoplasmik yağ damlacıkları hepatositlerde yoktur); B) Steatohepatit olmayan steatoz [Fibrozis olmadan orta derecede sitoplasmik yağ infiltrasyonu (ok yerinde) bulunuyor]; C) Minimal fibrozisli steatohepatit (Bölgesel hepatosit balonlaşması, inflamasyon ve minimal fibrozis-trikrom boyası ile mavi olarak gösterilmiş-mevcuttur) ; D) Fibrozisli steatohepatit. (Trikrom boyası ile gösterilmiş ileri fibrozis ve nodüler görünüm bulunmaktadır).

(World J Gastroenterol. 2008 January 7; 14(1): 22-28. Published online 2008 January 7. doi: 10.3748/wjg.14.22.)

Yetişkin ve çocuklarda ciddi fibrozis varlığını tespit etmeye ve NASH ile steatozis ayırımını yapmaya yönelik olarak klinik değerlendirmeler ve skorlar geliştirilmiştir. Ne bu klinik değerlendirme ve skorlar ne de NASH ile fibrozisin noninvazif belirteçleri ve mevcut görüntüleme yöntemleri, henüz dokuların histolojik incelemesinin yerini alamamıştır. Bu testlerin gelişimi ve validasyonu için halen karaciğer biyopsisine ihtiyaç vardır. Siroz da dahil olmak üzere NAFLD'ın tüm evreleri, normal ALT seviyeleriyle seyredebileceğinden dolayı karaciğer biyopsisi, dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Francanzani ve arkadaşları (64), artmış ALT seviyesi bulunanlarda, steatoz ve nekroinflamasyon derecesinin daha yüksek olabileceğini saptadılar. Ancak yüksek ALT'li bireylerde saptanan fibrozis ile siroz, normal ALT seviyesi bulunanlardan farklı değildir. Bu durum, karaciğer biyopsisinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. 856 tane NAFLD vakasının yer aldığı 9 yayın analiz edilmiş, biyopsili hastalara histolojik değerlendirme sonucuna göre teröpatik uygulama yapılmış ve bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım süresinin, biyopsisi olmayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (65). Karaciğer biyopsisi, karaciğer enzim yüksekliğinin olası diğer sebeplerini histolojik olarak ekarte eder ve NAFLD/NASH tanısını koymada ana yöntemdir. Skelly ve arkadaşları (66), açıklanamayan karaciğer enzim yüksekliği nedeniyle yapılan 354 adet karaciğer biyopsisinin 2/3'ünün steatohepatite bağlı olduğunu saptamışlardır. Karaciğer biyopsisinin de birtakım zorlukları bulunmaktadır (62). Ağrı, en sık komplikasyonudur ama nadiren analjezi gereklidir. Kanama en ciddi komplikasyonudur, ancak nadiren girişim gerektirir ya da ölüme neden olur. Mortalite çoğunlukla malignite veya siroz olan vakalarda bildirilmiştir. Komplikasyonlar, biyopsiyi yapan kişinin tecrübesi ve hasta seçimi ile ilişkilidir. Ancak, kullanılan iğne tipinin komplikasyon oranına etkisi bulunmamaktadır. Ayrıca, karaciğer biyopsisi karaciğerin küçük bir parçasını içerdiğinden dolayı tüm karaciğeri temsil etmeyebilir. Karaciğer biyopsisinin diğer bir kısıtlılığı da, biyopsinin değerlendirilmesinde patologlar arasında bulunan yorum farklılığıdır. Biyopsi boyutlarının küçük olmasına ek olarak, biyopsinin yorumlanmasını etkileyen başka faktörler de vardır. Tecrübeli

bir patoloğun biyopsiyi değerlendirmesi, tanıyı koymada biyopsi materyalinin özelliklerinden (uzunluğu, sayısı) daha önemlidir. Sonuçlar arasındaki değişkenliği belirleyen en önemli faktör patoloğun uzmanlık alanı ve eğitimidir (36).

Noninvaziv metodlar geliştirip hatasız olarak NASH tanısı koymak ve fibrozisi tanımlayabilmek için büyük çaba sarfedilmekte ve girişimler yapılmaktadır (37,62). Ancak bugüne kadar histolojiden elde edilen bilgiyi sağlayabilecek tekli bir noninvaziv yöntem henüz geliştirilememiştir. Ancak minimal ve ciddi fibrozisi ayırmak için, iki noninvaziv belirteç birlikte kullanılarak daha net tahmin yapılabilmektedir (67).

3.5. Tedavi

Her ne kadar obezite, hiperlipidemi ve kontrolsüz diyabetin düzeltilmesi önerilse de günümüzde NASH için kanıtlanmış etkili bir tedavi bulunmamaktadır. NASH tedavisinde bugüne kadar araştırmalara konu oluşturmuş ilaçların sayısı ondan fazladır. Bu ilaçların bazıları aşağıda listelenmiştir. Ancak hemen belirtmek gerekir ki ne ülkemizde ne de dünyada doğrudan bu hastalık için ruhsatlandırılmış herhangi bir ilaç bulunmamaktadır.

3.5.1. Kilo verilmesi

Hızlı kilo verilmesi karaciğer hastalığını kötü etkileyeceğinden dolayı yavaş yavaş verilmesi önerilmektedir (118). Bir çalışmaya göre kilo kaybı haftada 1.6 kg'yu geçmemelidir (118). Kilo verilmesi ve artmış fiziksel aktivite karaciğer enzimleri, histoloji, serum insülin seviyeleri ve hayat kalitesinde düzelmeyi sağlamaktadır (87-89). Bariatrik cerrahi sonrası takiplerde inflamasyon ve fibroziste olmasa da steatozda gerileme saptanmıştır (122).

3.5.2. Vitamin E ve C

Vitamin E'nin oksidatif stresi azaltma etkisine dayanarak NASH hastalarında kullanımı gündemdedir. Çocuklarda yapılan çalışmalarda serum aminotransferazlarında gerileme saptanmıştır (123). Kontrollü bir çalışmada da yine E vitamin ile serum aminotransferazlarında gerileme saptanmıştır, ancak histolojik düzelmeye vitamin E ve pioglitazon ile kombine tedavide gösterilebilmiştir (124). 45 hastanın bulunduğu placebo kontrollü bir çalışmada 6 aylık kombine vitamin E ve C tedavisi sonrasında karaciğer fibrozisinde önemli bir düzelmeye saptanmıştır (125). Ancak vitamin E takviyesi ile ilgili yetersiz kanıtlar bulunması nedeniyle önerilmemektedir.

3.5.3. Hipoglisemik ajanlar:

Metformin: Kontrollü bir çalışmada lipid ve kalorinin kısıtlandığı metformin kullananlar ile kullanmayanlar 6 ay kadar izlenmiştir. Serum aminotransferazlarında, insülin ve C-peptid seviyelerinde düşme her iki grupta da gözlenmiş olup metformin grubunda daha belirgin saptanmıştır. Nekroinflamasyonda düzelmeye metformin grubunda daha fazla gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (125). Aminotransferazlardaki düzelmeye metformin kullananlarda kilo verilmesi ve vitamin E kullanımına göre daha fazla saptanmıştır (126).

Pioglitazon: Bazı çalışmalarda pioglitazon tek başına ya da diyet tedavisi veya vitamin E kombinasyonu ile NASH hastalarında araştırılmıştır (124,127-130). Bunlarda biyokimyasal ve histolojik düzelmeye gözlenirse de ilacı bırakmayla birlikte tekrar hastalığa dönüş olmaktadır. Klinik olarak önemli bir faydasının olup olmadığını anlayabilmek için uzun dönem tedavi gereklidir ancak tiyazolidinedionların kalp hastalıkları riskini artırma ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (129). Ayrıca tedavi kilo alımına sebep olarak NASH'in daha kötüye gitmesine yol açabilir.

Rosiglitazon: Placebo kontrollü bir çalışmada rosiglitazon verilen NASH hastalarında steatoz ve aminotransferaz seviyelerinde daha fazla düzelme gözlenmiştir. Fakat fibrozis gibi diğer histolojik bulgularda değişiklik olmamıştır (131). En önemli yan etkiler kilo alımı ve bacaklarda şişlik olmuştur.

3.5.4. Probukol

Antioksidan özellikleri olan lipid düşürücü bir ilaçtır. Randomize kontrollü bir çalışmada serum transaminazlarında önemli bir düşüş saptanmıştır (132). Karaciğer histolojisine olan etkisi bilinmemektedir.

3.5.5. Betain

Hayvan modellerinde steatoza karşı koruyucu etkisi olan, betain metabolik siklusunun bir parçasıdır. 10 hastalık bir çalışmada 1 yıllık tedavi sonrasında serum aminotransferazları ve karaciğer histolojisinde önemli bir düzelme saptanmıştır (133).

3.5.6. Ursodeoksikolik asit

40 hastalık pilot bir çalışmada (134) faydalı olabileceği saptansa da daha büyük kontrollü bir çalışmada etkisi gösterilememiştir (135).

3.5.7. Losartan

Anjiotensin II hepatik fibrozisin patogeneğinde yer almaktadır ve demir depolanması ve insülin rezistansını artırmaktadır. Anjiotensin II reseptör agonisti olan losartanın 7 hastalık bir pilot çalışmada uygulanmış olup hepatik fibrozis ve serum aminotransferazlarına olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir (136).

3.5.8. Pentoksifilin

NASH'in ilerlemesinden sorumlu olan TNF α 'nın üretimini inhibe etmektedir. Toplamda 38 hastanın olduğu 2 pilot çalışmada biyokimyasal düzelme saptanmıştır (137,138).

3.5.9. Orlistat

Obezite ve tip 2 DM tedavisinde kullanılan gastrointestinal lipaz inhibitörüdür. Randomize kontrollü pilot bir çalışmada NASH hastalarına ultrasonla bakıldığında karaciğer yağlanması önemli gerileme saptanmıştır (139). Orlistat kullanan grupta serum aminotransferaz seviyelerinde azalma görülmüştür.

3.6. NAFLD Tanısında Kullanılması Planlanan Biyobelirteçlerin Özellikleri

NASH ile steatohepatit ayırımı için karaciğer biyopsisi yapmanın gerekli olması nedeniyle steatohepatit tanı ve tedavisine yönelik araştırmalar engellenmektedir (37). Hastanın biyopsi yapmadan tanı ve tedavisinin düzenlenebilmesi için NASH tahminini yapabilecek biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Biyobelirteçler, aslında NAFLD spektrumunu anlama, tarama yapma, tanı koyma, prognozu belirleme ve teröpatik uygulamanın izlenmesi gibi birçok alanda kullanılabilirler. Ancak biyobelirteçlerin klinik kullanımı için analitik metodlarla standardize edilmesi ve maliyetinin değerlendirilmesi de gereklidir (37). Yeni geliştirilen biyobelirtecin klinik değerinin olabilmesi için standarda uygun olarak elde edilebilmesi ve klinisyenler tarafından kolay yorumlanabilmesi gereklidir. Ayrıca NASH'i tanımlamada yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip olmalıdır ve basit yağlanmayı NASH'ten ayırabilmelidir. NAFLD olarak tanımlanan vakaların takibinde NASH ve fibrozise ilerleyebilecekleri değerlendirecek ve prognostik değeri olacak bir biyobelirteç elde etmek oldukça zordur. Çünkü prospektif bir çalışma dizaynına ve seri olarak karaciğer biyopsisi yapılmasına ihtiyaç vardır. Her ne kadar mevcut biyobelirteçler ve bunların kombinasyonları, kesitsel

çalışmalarda NASH olan vakaları olmayanlardan ayırrsa da, hangi hastaların fibrozis ve son dönem karaciğer hastalığı geliştireceğini, hangilerinin geliştirmeyeceğini ayırt edecek biyokimyasal belirteçlerin kullanılmasına yönelik ileri çalışmalara gereksinim vardır. Teknolojik gelişmeler sayesinde birçok belirteçten oluşan profillerin, NASH tanısında altın standart olan karaciğer biyopsisinin yerini alacağı düşünölmektedir (68). NASH ile basit yağlanmayı ayırmaya yönelik giderek artan sayıda biyobelirteçlerin olması aslında yeni biyobelirteçlerin özenli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu sebeple tanıyı doğru koyabilmek için güvenilir istatistiksel metodlarla değerlendirmeye ihtiyaç vardır (37). Uygun istatistiksel tekniklerin uygulanması, biyobelirteçlerin NAFLD spektrumunu değerlendirme potansiyelini ve klinik kullanımını belirlemede son derece önemlidir. Genelde bir biyobelirtecin tanıyı doğru koyabilme özelliği sensitivite ve spesifitesiyle değerlendirilir (37). Sensitivite, biyobelirtecin doğru olarak NASH tanısı koyduklarının gerçekten hastalığı bulunanlara oranıdır. Benzer şekilde spesifite, biyobelirtecin doğru olarak NASH olmadığına dair tanısını koyduklarının gerçekten hastalığı bulunmayanlara oranıdır. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC=area under curve) biyobelirtecin ortalama sensitivitesini ifade eder ve biyobelirtecin performansını gösteren istatistiksel bir özettir. Prediktif değeri olmayan bir biyobelirtecin AUC değeri 0.5'tir. Hastalığı en iyi tahmin eden biyobelirtecin AUC değeri ise 1'dir. Aynı popülasyonda 2 ya da daha fazla sayıda biyobelirteç karşılaştırılıyorsa eşleştirilmiş örnekler için uygun istatistiksel teknikler kullanılmalıdır (69).

3.7. Klasik Adipokinler ve NAFLD

Adipoz doku, enerji deposu olduğu gibi aktif sekresyon yapan endokrin bir organdır (70). Adipokinlerin fonksiyonları giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Bunlardan en iyi tanımlananları leptin, adiponektin ve rezistindir.

Leptin, 167 aminoasitli bir protein olup 1994'te ob geninin pozisyonel klonlanması ile keşfedilmiştir (71). Her ne kadar anoreksijenik hormon olarak

bilinse de etkilerine karşı direnç oluşması nedeniyle obezitede artar (72). Hayvan modellerinde, adipoz doku dışı dokularda lipid birikimini önlemektedir. Özellikle karaciğerde bu etki, SREBP-1 (Sterol Regulating Binding Protein-1) ekspresyonunun azaltılmasıyla gerçekleşir (73). Leptinin, NASH patogenezi açıklayan çift vuruş hipotezinin her iki vuruşunda da rol oynadığı düşünülmektedir (74). Başlangıçta insülin rezistansının gelişimine ve sonrasında da steatoza katkıda bulunur (75). Karaciğer hasarında leptin, proinflamatuvar bir role sahiptir ve karaciğer fibrozisinin önemli bir mediyatörüdür (76). Karbon tetraklorür (CCl₄) kullanılan sıçanlarda, leptin enjeksiyonu sonucunda aktif hepatik stellat hücrelerin (HSCs) belirteci olan prokollojen-I, transforming growth faktör 1 (TGF 1) ve düz kas aktini artmaktadır. Sonuç olarak, karaciğer fibrozisi artmıştır (77). Ayrıca leptin enjeksiyonundan sonra serum TNF α seviyelerinde dramatik bir artış meydana gelmiştir. Bu durum, leptinin inflamasyonu arttırdığını ve fibrozis gelişimini bağımsız olarak etkilediğini düşündürmektedir. Sinuzoidal endotel hücreler ve Kupfer hücreleri leptinin profibrojenik etkisinin ana hedefleri olarak saptanmıştır (77). Diğer yandan leptin dirençli veya leptin bulunmayan fareler, önemli derecede azalmış fibrojen yanıt vermiştir (76). Leptin güçlü mitojen etkiye sahiptir ve apoptozis inhibitörüdür. Bu fibrojenik etki, içinde bulunduğu HSCs üzerinden gerçekleşmektedir. Aktifleşen HSCs, leptin salgılamaya başlar ve karaciğer fibrozinin artmasını tetikler.

Adiponektin adipositler tarafından salgılanan ve anti-inflamatuvar olarak kabul edilen bir adipokindir (78). Vücut yağını azaltır ve karaciğer ile periferde insülin duyarlılığını artırır. Vücut kitle indeksi ve insülin rezistansı ile ters orantılıdır. Karaciğerde, serbest yağ asitlerinin oksidasyonunu artırarak ve/veya hepatositlerden serbest yağ asidi sentezini azaltarak lipid birikimine engel olur (79). Bu etkinin bir kısmı, yağ asidi sentezi düzenlemede anahtar role sahip olan SREBP-1'in reseptör sayısındaki azalma ile gerçekleşir. Adiponektinden yoksun bırakılan fareler, NASH'e sebep olan diyet ile beslendiklerinde doğal (wild) tip farelere göre daha ciddi hepatosteatoz geliştirmektedirler (80). Ayrıca adiponektin, karaciğer inflamasyonu ve fibrozisine karşı koruyucu rol

oynamaktadır. Kamada ve arkadaşları, adiponektin tedavisini uygulamanın CCl₄ ile oluşturulan fare modellerindeki karaciğer fibrozunu azalttığını ve HSCs'nin her iki adiponektin reseptörlerini (AdipoR1 ve AdipoR2) eksprese ettiğini bildirmiştir (80). Masaki ve arkadaşları, KK-Ay tipi obez farelerde endotoksine bağlı akut karaciğer hasarı modeli oluşturmuştur ve sonrasında adiponektinin TNF α sentezi ve / veya salınımını inhibe ederek karaciğer hasarını engellediğini saptamışlardır (81). Ayrıca Xu ve arkadaşları, farelerde yağlı karaciğer hastalığında adiponektinin koruyucu etkisi olduğunu bildirmiştir (82).

Rezistin adipoz doku ve makrofajlardan salgılanan son zamanlarda keşfedilmiş bir adipokindir (83). Bazı kemirgen çalışmalarına göre rezistinin major etkisi karaciğer üzerinedir. Hepatik insülin rezistansına neden olur. İskelet kasları ve adipoz doku üzerinde de etkileri mevcuttur (84). Serbest yağ asitlerinin iskelet kaslarına alınmasını ve metabolizmasını engelleyerek insülin rezistansını artırmaktadır. Ayrıca rezistin tedavisinin, insülin inhibitörü olarak bilinen SOCS3 (supressor of cytokine signalling 3) geninin ekspresyonunu belirgin olarak indüklediğine dair kanıtlar bulunmaktadır (84). Daha da önemlisi rezistinin proinflamatuvar etkileri olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Rezistin bu etkisini, nükleer faktör (NF) – kappa B'ye bağımlı yolak ile makrofajlarda bulunan TNF α ve IL-12'yi uyararak ve IL-6 ile IL-1 salınımını düzenleyerek göstermektedir (85). Yine bir çalışmada rezistinin karaciğer fibrozisinde rol oynadığına dair kanıtlar öne sürülmüştür (86).

3.8. Yeni Adipokinler ve NAFLD : Tezin amacı

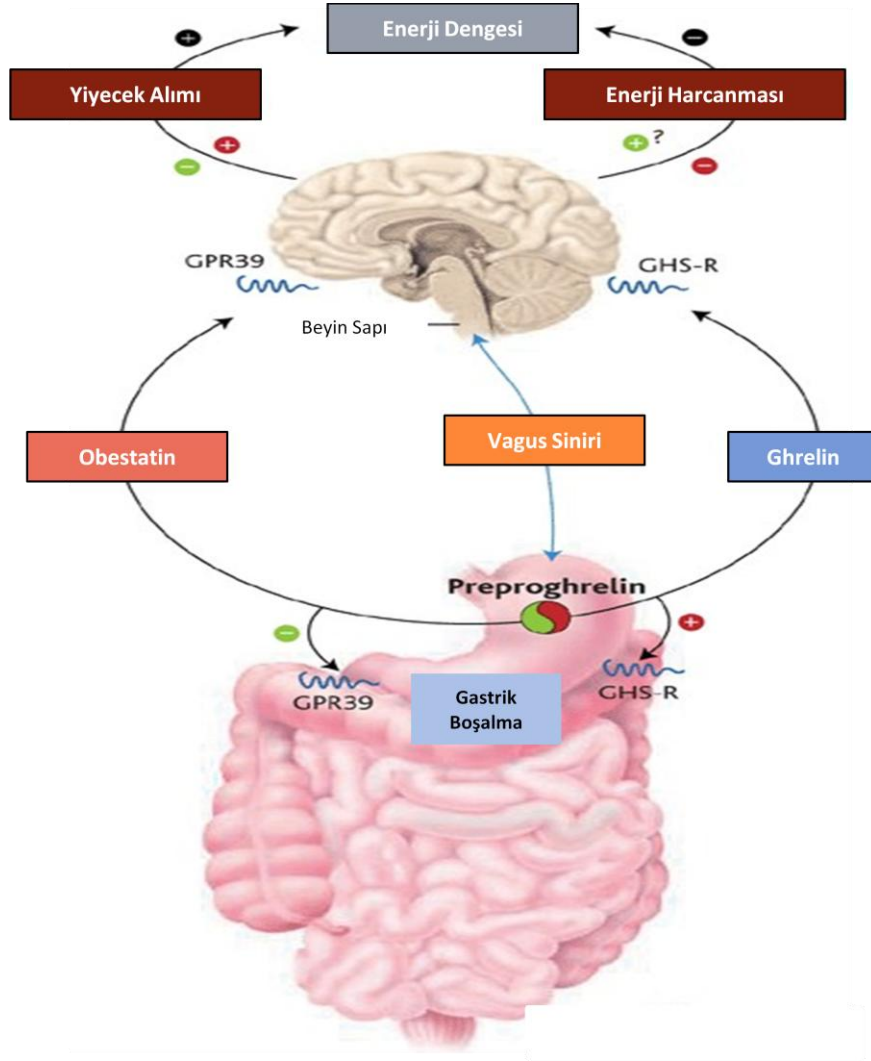
Son zamanlarda önemli metabolik fonksiyonları olan; vaspin, obestatin ve apelinin de içinde yer aldığı bazı yeni adipokinler tanımlanmıştır.

Vaspin (visseral adipoz doku kaynaklı serin proteaz inhibitörü), ekspresyonu visseral adipoz dokuyla sınırlı olan bir serpindir (87). Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) sıçanlarında vaspin gen ekspresyonunda artış saptanmıştır (87). Yüksek yağ ve yüksek sukroz diyetiyle (YYYS) beslenenlerde, obezite ve insülin rezistansı gibi birçok metabolik bozukluğu olanlarda vaspin,

belirgin şekilde hücre yüzeyindeki reseptörlerini artırır (88). Tiyazolidinedion uygulanan farelerde serum vaspin düzeylerinde belirgin artış saptanmıştır (87). Vaspin reseptörlerindeki artış, obezite ve insülin rezistansını tersine çevirerek vücutta dengeleyici bir rol oynayabilir. Gerçekten de YYYS diyetiyle beslenen obez farelere uygulanan rekombinan vaspin tedavisi sonrasında glukoz toleransında ve insülin duyarlılığında düzelme gözlenmiştir. Vaspinin adipoz dokuda direkt etki gösterdiği düşünülmektedir. İlginç olarak son çalışmalar, NAFLD saptanan hastalarda serum vaspin seviyesi, hepatositlerde balonlaşma ve aminotransferaz seviyeleriyle pozitif ilişki göstermektedir (89).

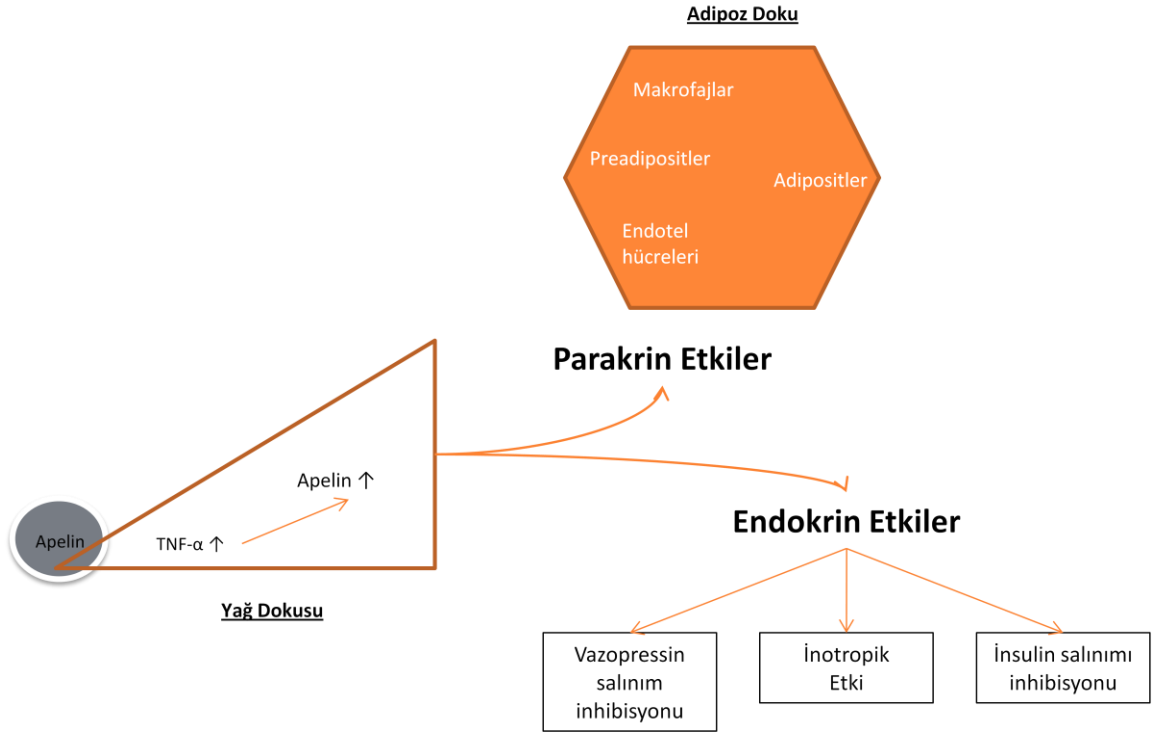
Obestatin, sıçan midesinden izole edilmiş 23 aminoasitli bir peptiddir (90). Yiyecek tüketimini uyarıcı bir peptid olan ghrelin ile aynı prekürsörü paylaşır, ancak ghrelinin aksine yiyecek tüketimi, gastrointestinal sistem motilitesi ve vücut ağırlığını azaltıcı bir etki gösterir (Şekil 7). Fare / sıçanlardaki obestatin karşı antiserum uygulamasıyla Sprague–Dawley sıçanlarının testis Leydig, gastrik mukoza ve miyenterik plexus hücrelerinde obestatin immunreaktivitesi (irOBS) saptanmıştır (90). Miyenterik plexusun, hem obestatin hem de kolin asetiltransferaza (ChAT) karşı kullanılan antiserum ile işaretlenebilir olması, neredeyse tüm irOBS nöronlarının ChAT pozitif olduğunu göstermiştir. Tam tersi de doğrudur. Bu bulgu, obestatin immunreaktivitesinin miyenterik plexusun kolinerjik nöronlarında mevcut olduğunu desteklemektedir (162). Obestatinin biyolojik aktivitesini ölçmek amacıyla sıçanların serebral kortikal nöronlarına eklenen obestatin (100 nM), sitozolde kalsiyum (Ca^{+2}) konsantrasyonlarını arttırmıştır. Bu durum santral sinir sisteminde obestatinin biyolojik olarak aktif olduğunu göstermektedir (162). İntraserebroventriküler obestatin uygulaması, yeterince yiyecek ve su verilen farelerde de verilmeyenlerde de sıvı alımını inhibe etmektedir. Obestatin, yine hayvan deneylerinde anjiyotensin-II ile indüklenen sıvı alımını inhibe etmektedir (90). Obestatinin insülin duyarlılığı ve insülin sekresyonu üzerine etkisi bulunmamaktadır. Obestatin verilen sıçanlarda glukoz ve insülin konsantrasyonları değişmemiştir. Ayrıca obestatin uygulaması ile insuline verilen hipoglisemik yanıt da değişmemiştir. Bu durum obestatinin

glukoz homeostazı ve insülin sekresyonu üzerine direkt etkisi olmadığını göstermektedir (163). Obestatinin sıçanlarda yiyecek tüketimine ilişkin etkisinin, peptidin sıvı alımını inhibe etmesine sekonder olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda obestatin seviyeleri obezitede azalmaktadır. Ayrıca vücut kitle indeksi ve insülin rezistansı indeksiyle ters orantılıdır (91).



Şekil 7. Obestatin ve ghrelinin yiyecek metabolizmasına etkisi

Apelin, 77 aminoasitten oluşan prekürsör bir peptiddir ve farklı dokularda apelin-36, apelin-13 ve apelin-12 gibi aktif moleküler formlarına dönüşür (92). G-proteini bağımlı APJ reseptörünün endojen ligandı olarak etki gösterir. Kalp, akciğer, böbrek, adipoz doku, gastrointestinal sistem, beyin, adrenal bezler, endotel doku ve plazma gibi çeşitli organlarda yaygın olarak bulunmaktadır (92). Parakrin ve endokrin etkileri bulunmaktadır (Şekil 8). Apelin, kan basıncı ve kan akımını düzenler, dolayısıyla kardivasküler sistemin kontrolünde rol oynamaktadır. Kardiyak kontraktilitenin şimdiye kadar tanımlanmış en güçlü uyarıcılarından olup kardiyak dokunun şekillenmesinde rol oynamaktadır (92). Ayrıca apelin, adipoz dokudan da salgılanmaktadır ve obezitede adipoz doku ile dolaşımdaki seviyeleri artar. İnsulin, adipositlerin apelin sekresyonu üzerinde pozitif etki gösterir. Apelin aynı zamanda sıvı homeostazını da düzenler. Yiyecek ve sıvı alımının hipotalamik olarak düzenlenmesinde önemli role sahiptir (93). Son zamanlarda yapılan klinik bir çalışmada, NAFLD hastalarında apelin-12 seviyeleri sağlıklı kontrollere göre yüksek olarak saptanmıştır. Ancak bu farklılık, veriler vücut kitle indeksi ve insülin rezistansına göre düzeltildiğinde kaybolmuştur (94). Ayrıca apelin seviyeleri, NAFLD hastalarında vücut kitle indeksi ve HOMA indeksi ile pozitif korelasyon göstermektedir (94). Ancak NAFLD hastalarında aktif olarak salgılanan en uzun form olan apelin-36 seviyeleri ile ilişkili henüz bir bilgi bulunmamaktadır.



Şekil 8. Apelinin parakrin ve endokrin etkileri

Bu çalışmada, NAFLD olan hastalarda yeni adipokinlerden serum vaspin, obestatin ve apelin-36 seviyeleri ile hastaların klinik, biyokimyasal ve histolojik özelliklerinin olası ilişkisini saptamak amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Etik Kurul

Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı ve çalışmaya katılan tüm bireylerden aydınlatılmış onam alındı.

4.2. Çalışma Populasyonu

Bu çalışma, toplamda 91 adet NAFLD'lı hasta (43 erkek ve 48 kadın, ortalama yaş, 47 ± 9 yaş) ve 81 adet sağlıklı kontrolden (39 erkek ve 42 kadın, ortalama yaş, 46 ± 11 yaş) oluşan bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Çalışmaya alınan hastalar, 01.06.2009 -01.03.2010 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğinden biyopsi ile tanısı kesinleştirilmiş bireyler arasından seçildi. Kontrol grubu ise aynı tarihlerde Gastroenteroloji ve İç Hastalıkları Polikliniğine başvuran tetkikleri yapıp herhangi bir kronik hastalık saptanmayan bireylerden oluşturuldu.

4.2.1. Alınma kriterleri

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

4.2.2. Dışlama kriterleri

1-Erkeklerde 140 gr/hafta, kadınlarda 70gr/haftadan fazla alkol kullanımı olanlar.
2-Viral hepatit, hemokromatoz, Wilson hastalığı, otoimmün hepatit, primer biliyer siroz, sklerozan kolanjit, biliyer darlık, alfa-1 antitripsin eksikliği, iskemik kalp hastalığı veya serebrovasküler hastalık, malignite saptanan hastalar.

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

4-Diyabet için insülin tedavisi almakta olan hastalar

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

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

4.3. Klinik ve Biyokimyasal Özellikler

Tüm vakalara fizik muayene, antropometrik ve biyokimyasal ölçümler yapıldı. Vücut kitle indeksi, boy ve kilo ölçümlerine göre hesaplandı. Diyabetes mellitus tanısı, ADA kriterlerine göre konuldu (95). Metabolik sendrom tanısı, ATP III kriterleri kullanılarak konuldu. İnsulin rezistansının tahmini HOMA-IR indeksi hesaplanarak yapıldı (Tablo 1).

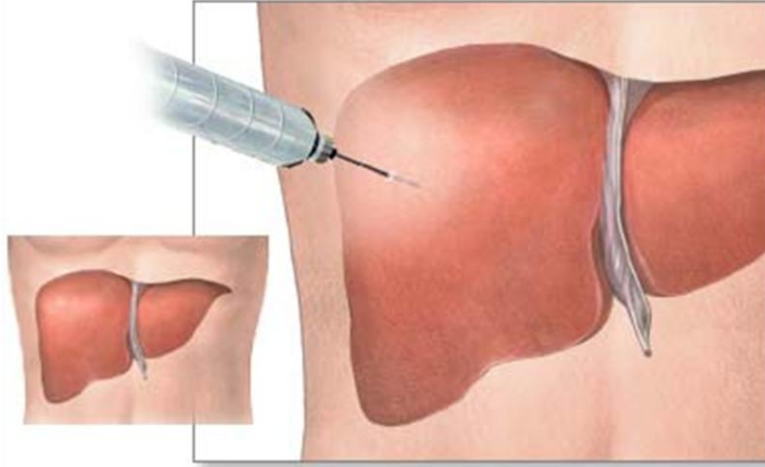
Tablo 1. İnsulin rezistansı formülü

$\text{İnsülin rezistansı} = \frac{\text{Açlık plazma insülini (mikrounit/ml)} \times \text{Açlık plazma glukozu (milimol/lt)}}{22.5}$ <p>(<2. 5 ise normal, ≥2. 5 ise insülin rezistansı mevcut)</p>
--

Sfigmomanometre ile sessiz bir odada, 10 dakikadan fazla dinlenmiş bir şekilde kan basıncı ölçümü yapıldı. Sistolik ve diastolik kan basıncı için sırasıyla Korotkoff 1 ve 5 sesleri kaydedildi. Sigara içme durumları sorgulandı. Rutin kan tetkikleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin laboratuvarlarında çalışıldı. Serum yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein (hs-CRP) düzeyi iki kez, rastgele, kör olarak ve uygun bir metod kullanılarak ölçüldü (Dade Behring, Marburg, Almanya). Yüksek duyarlılıklı CRP için intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla %4.6 ve %6.1'dir ve en düşük ölçüm limiti 0.19 mg/dl'dir.

4.4. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğer biyopsisi, lokal anestezi ile 16-gauge Hepafix iğnesi (Braun Melsungen AG, Melsungen, Almanya) kullanılarak ultrason eşliğinde yapıldı (Şekil 9). Bütün biyopsi örnekleri, % 10'luk formaldehid ile fikse edildi ve sonrasında parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 4 mikron kalınlığında hazırlanan kesitler, Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

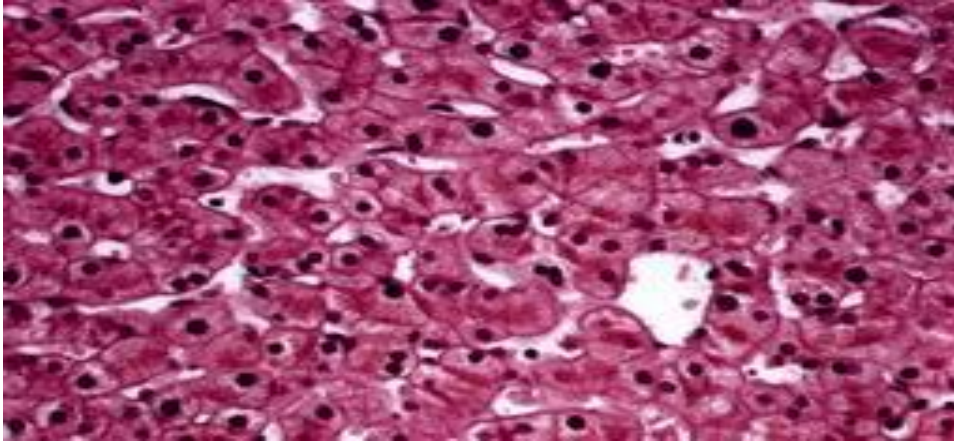


Şekil 9. Karaciğer biyopsi tekniği

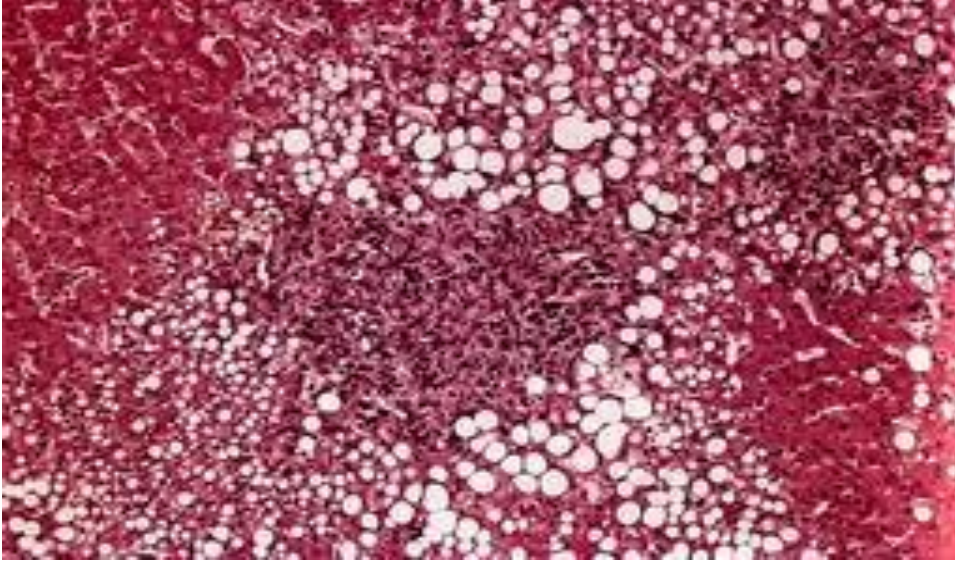
Klinik bilgilerden habersiz, tecrübeli bir patolog, NASH ön tanısı olan hastaların biyopsi materyallerini, NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) NASH Klinik Araştırma Ağı Skorumlama Sistemi'ne göre değerlendirdi (97). Steatoz, 0 dan 3'e kadar 4 derece olarak skorlandı (S0: Steatoz olmaması ya da % 5'ten daha az olması; S1: %5-33; S2: %33-66; S3: >%66 olarak tanımlanmıştır). Lobuler inflamasyon evrelemesi, Evre 0: Odak

yok; Evre 1: her 200× alanda <2 odak; Evre 2: her 200× alanda 2-4 odak; Evre 3: her 200x alanda >4 odak olarak tanımlanmıştır. Balonlaşma değerlendirilirken ise balonlaşmış hücre yoksa 0 puan, birkaç tane varsa 1 puan, çok sayıda varsa veya balonlaşma aşıkâr ise 2 puan alır. Fibrozis evrelemesi, Evre 0: Fibrozis yok; Evre1: perisinuzoidal veya periportal fibrozis; Evre 2: perisinuzoidal ve portal / periportal fibrozis; Evre 3: köprüleşme fibrozisi; Evre 4: siroz olarak tanımlanmıştır. Fibrozisin, hastalık aktivitesinin bir sonucu olduğu ve genellikle geri dönüşümsüz olduğu düşünülür ve aktivite skorunun bir komponenti olarak puanlamaya dahil edilmez. Histolojik NASH skoru, steatoz (0-3), lobuler inflamasyon (0-3) ve balonlaşma (0-2) skorlarının toplanması ile elde edilir. Bu toplama sonucunda 0 ile 8 arasında bir değer saptanır. 0-2 arasında skoru bulunanlar basit yağlanma, 5 ve üstünde skoru bulunanlar ise kesin olarak NASH olarak değerlendirilir. Skoru 3 ve 4 olarak saptanan vakalar ise olası NASH olarak tanımlanır (97).

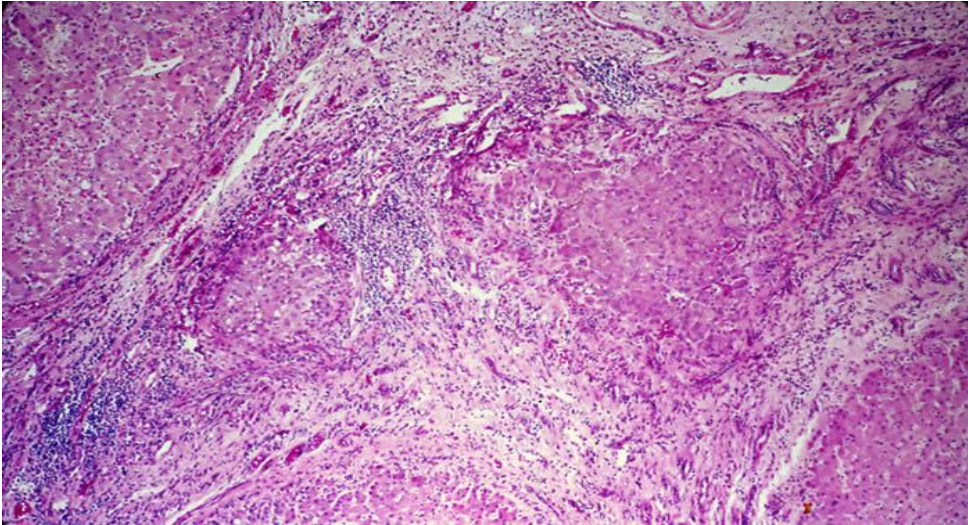
Normal karaciğer, nonalkolik steatohepatit ve siroz gelişen karaciğerin histolojisi Şekil 10,11 ve 12'de gösterilmiştir.



Şekil 10. Normal karaciğer histolojisi



Şekil 11. Nonalkolik steatohepatit histolojisi



Şekil 12. Siroz histolojisi

4.5. Adipokinlerin Analizi (ELISA)

Çalışmaya katılan bütün bireylerden sabah saat 8:00 – 9:00 arasında antekubital venden, tüm gece aç bırakılarak kan numuneleri alındı ve hemen

2500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar -80°C'de inceleme öncesine kadar dondurularak saklandı ve inceleme için sadece bir defa çözüldü. Bütün serum örnekleri, klinik bilgilerden habersiz şekilde analiz edildi. Serum vaspin seviyelerinin ölçümü için ticari olarak elde edilebilen EIA kit (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA) kullanıldı. Üreticinin protokülüne uygun bir şekilde ölçüm yapıldı. Minimum tanımlanan değer, 0. 012 ng/ml idi. Serum obestatin düzeyi kantitatif bir EIA kit (Yanaihara Institute Inc., Fujinomiya-SHI Shizuoka, Japan) kullanılarak değerlendirildi. Minimum tanımlanan değer, 0. 412 ng/ml idi. Serum apelin seviyeleri, apelin-36 ELISA kiti (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) kullanılarak üreticinin protokolüne uygun olarak ölçüldü. Minimum saptanabilen konsantrasyon 0. 17 ng/ml idi. Tüm ölçümler iki kez yapıldı ve ortalama bir sonuca göre değerlendirildi. Tüm kitler için intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla <%9 ve <%12 idi.

4.6. Verilerin Analizi

Sürekli verilerin dağılımı tek örnekli Kolmogorov-Smirnov testi ile araştırıldı. Normal dağılan değişkenler ortalama \pm standart sapma (SS) şeklinde tanımlandılar. Normal dağılım göstermeyenler ise ortanca ve çeyrek değerler genişliği olarak bildirildi. Kategorik değişkenler ise sayılarla tanımlandılar. Normal olarak dağılan sürekli değişkenlerin bulunduğu iki çalışma grubu arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Student's t-test kullanıldı. Normal dağılım sağlanamadıysa Mann-Whitney U testi kullanıldı. Dağılımı yığılım gösteren veriler logaritmik transformasyon uygulandıktan sonra değerlendirildi. Çalışmadaki değişkenler arasındaki korelasyon Spearman's korelasyon katsayısı ile test edildi. NAFLD hastalarında fibrozis skorunun prediktörleri çok aşamalı lineer regresyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Tablo 1'de yeralan tüm değişkenler potansiyel prediktörler olarak tanımlandı. Tüm istatistiksel analizler Windows (SPSS Inc. , Chicago, IL, USA) SPSS 11. 0 versiyonu kullanıldı. Tip 1 hatanın olasılığını düşürmek amacıyla $p < 0. 01$ (iki yönlü) istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi (98).

5. BULGULAR

Çalışmaya Haziran 2009 ile Mart 2010 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji ve İç Hastalıkları polikliniğine başvuran biyopsi kanıtlı 91 adet NAFLD hastası (43 erkek ve 48 kadın, ortalama yaş, 47 ± 9 yaş) ve 81 adet sağlıklı kontrol (39 erkek ve 42 kadın, ortalama yaş, 46 ± 11 yaş) dahil edildi. Serum vaspin , apelin ve obestatin düzeyleri ile nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerin klinik, biyokimyasal ve histolojik özellikleri arasındaki ilişki değerlendirildi.

Çalışma popülasyonunun genel özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir. Her iki çalışma grubu yaş, cinsiyet, sistolik ve diyastolik kan basıncı, sigara içme hikayesi ve HDL kolesterol açısından farklılık göstermemekteydi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, biyopsili NAFLD grubunda vücut kitle indeksi, HOMA-IR, AST, ALT, total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid ölçümleri kontrol grubundan farklı olarak saptandı. Diyabet ve metabolik sendrom prevalansı NAFLD grubunda kontrollere göre daha yüksekti.

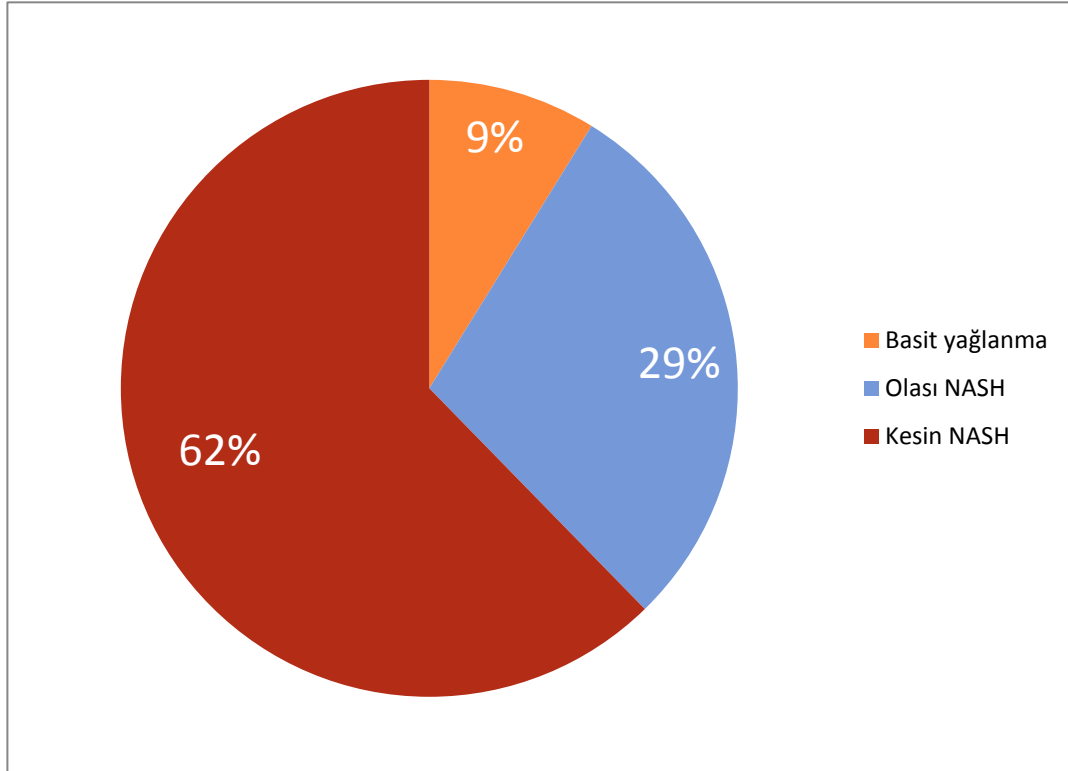
Tablo 2. Grupların genel özellikleri

	NAFLD (n = 91)	Kontrol (n = 81)	P değeri
Cinsiyet (E/K)	43/48	39/42	anlamsız
Yaş (yıl)	47 ± 9	46 ± 11	anlamsız
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	31.3 ± 5.1	26.5 ± 3.4	<.001
Diyabetes mellitus (evet/hayır)	22/69	0/81	<.001
Metabolik sendrom	33/58	0/81	<.001
HOMA-IR	3.5 (2.5-5.2)	1.6 (0.5-2.7)	<.001
Sistolik kan basıncı (mmHg)	131 ± 19	125 ± 17	anlamsız
Diastolik kan basıncı(mmHg)	84 ± 11	81 ± 11	anlamsız
Sigara kullanımı, (hiç/önceden/kullanmakta)	58/19/14	55/11/15	anlamsız
AST (IU/L)	44 ± 19	24 ± 9	<.001
ALT (IU/L)	67 ± 33	21 ± 13	<.001
Total kolesterol (mg/dL)	222 ± 51	183 ± 6	<.001
HDL kolesterol (mg/dL)	47 ± 12	46 ± 10	anlamsız
LDL kolesterol (mg/dL)	139 ± 46	122 ± 36	<.001
Trigliseridler (mg/dL)	180 ± 87	137 ± 71	<.001
hs-CRP (mg/dL)	3.2 (2.9-5.6)	-	-
Histolojik steatozis	2 (1-3)	-	-
Lobuler inflamasyon	2 (1-3)	-	-
Balonlaşma	2 (1-2)	-	-
NASH skoru	5 (4-7)	-	-
Fibrozis	1 (0-2)	-	-

HOMA-IR: Homeostasis model assesment-insülin resistansı; AST: Aspartat aminotransferaz; ALT: Alanin aminotransferaz; HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein; hs-CRP: Yüksek duyarlıklı C-reaktif protein; NASH: nonalkolik steatohepatit.

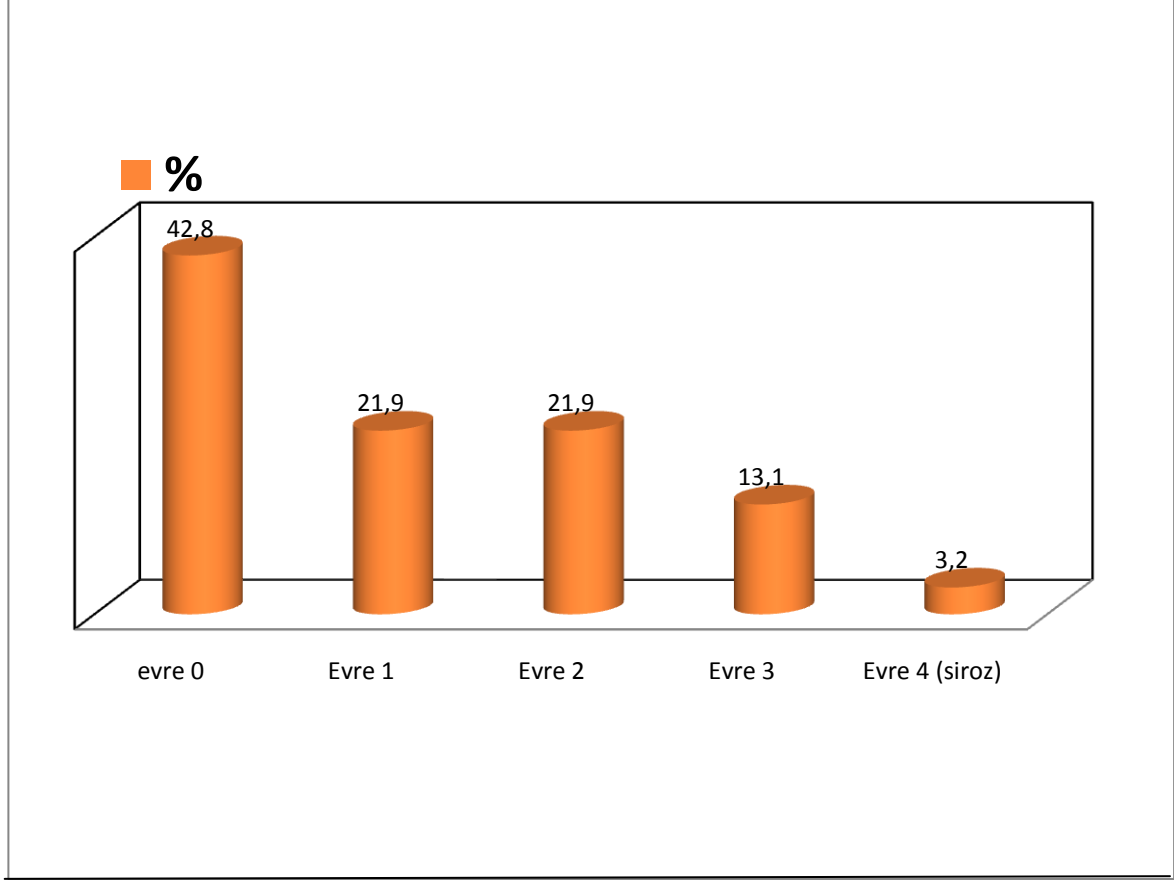
Veriler uygun şekilde ortalama ve standart sapma veya ortanca ve çeyrek değerler genişliği olarak hesaplanmıştır.

NAFLD tanılı hastaların (n=91), %8.7'sinde basit yağlanma (n=8), %28.5'inde olası steatohepatit (n=26), %61.5'inde kesin NASH (n=56) saptandı (Şekil 13).



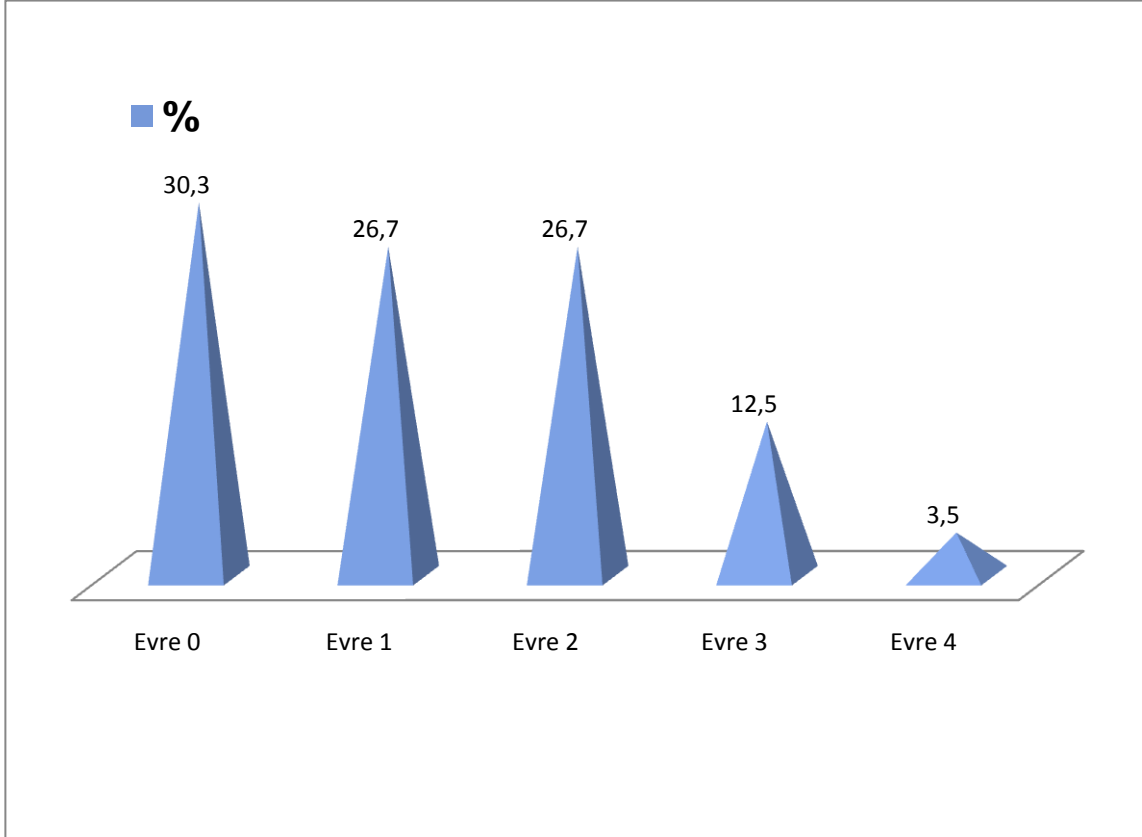
Şekil 13. Hastalarının NASH skoruna göre dağılımı

Fibrozis, NAFLD (n=91) hastalarının %57.14'ünde (n=52) gözlemlendi. Hastaların %42.8'inde evre 0 fibrozis (n=39), %21.9'unda evre 1 fibrozis (n=20), %21.9'unda evre 2 fibrozis (n=20), %13.1 evre 3 fibrozis (n=9) ve %3.2'sinde evre 4 fibrozis (siroz) (n=3) saptandı (Şekil 14).



Şekil 14. NAFLD hastalarında fibrozis evre oranları

Kesin NASH tanısı konan hastaların (n=56) %30.3'ünde evre 0, %26.7'sinde evre 1, %26.7'sinde evre 2, %12.5'inde evre 3, %3.5'inde evre 4 fibrozis saptanmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. Kesin NASH tanısı konan hastalarda fibrozis evre oranları

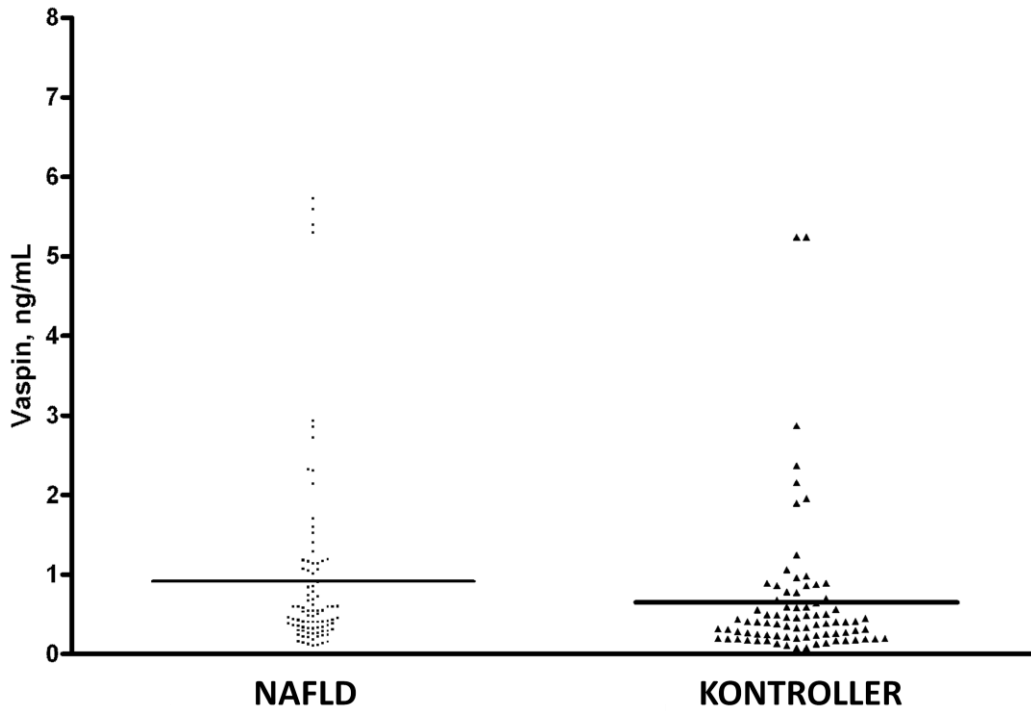
NASH ön tanılı hastaların tümü ultrasonda çeşitli derecede yağlanma saptananlar arasından seçilmişti. NASH tanısı kesinleşen hastaların tamamında çeşitli derecede yağlanma mevcuttu.

Çalışma grubundaki adipokin seviyeleri Tablo 3 ve Şekil 16-18'de gösterilmiştir. Obestatin seviyeleri hastalar ve kontroller arasında farklılık göstermemektedir. Ancak hem vaspin hem de apelin-36 seviyeleri biyopsili NAFLD hastalarında, kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksekti (Mann-Whitney *U* test, $P < 0.001$).

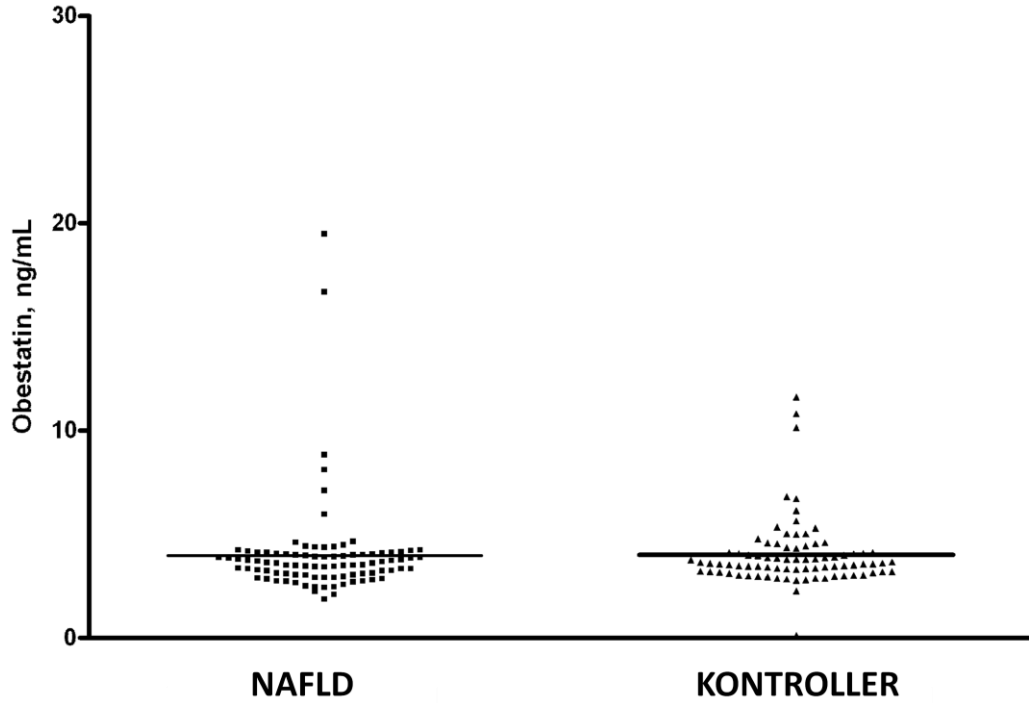
Tablo 3. Çalışma gruplarında plazma adipokin seviyeleri

	NAFLD (n = 91)	Kontrol (n = 81)	P değeri
Vaspin, ng/mL	0.6 (0.3-1.1)	0.4 (0.2-0.7)	< 0.01
Obestatin, ng/mL	3.6 (3.0-4.1)	3.6 (3.2-4.2)	Anlamsız
Apelin-36, ng/mL	1.4 (0.9-2.1)	1.1 (0.8-1.5)	< 0.01

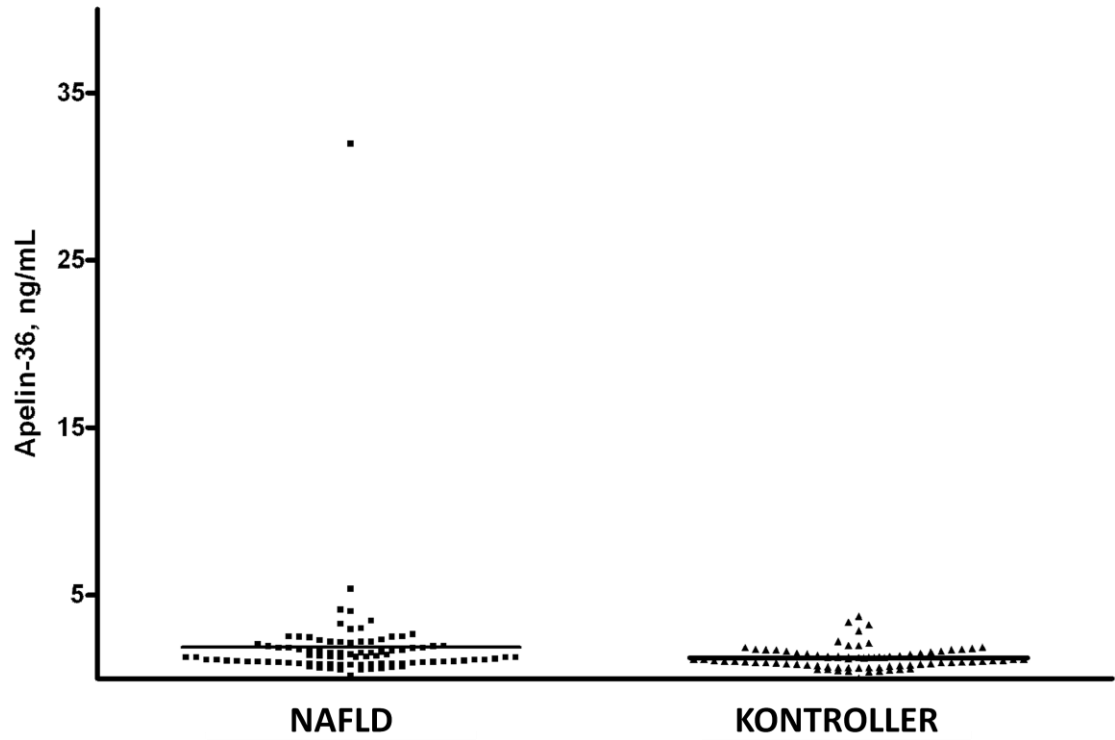
Veriler ortanca ve çeyrek değerler genişliği olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 16. Hastalarda ve kontrollerde serum vaspin seviyeleri



Şekil 17. Hastalarda ve kontrollerde serum obestatin seviyeleri



Şekil 18. Hastalarda ve kontrollerde serum apelin-36 seviyeleri

Bu çalışmada, serum adipokinleri ile NAFLD saptanan hastaların klinik, biyokimyasal ve histolojik özellikleri arasındaki ilişki incelendi. Serum vaspin seviyeleri, CRP ($r = 0.378$, $P < 0.001$) ve karaciğer fibrozisi ($r = 0.401$, $P < 0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı. Ayrıca çalışmada CRP ve HOMA-IR arasında ilişki saptanmıştır ($r=0.222$, $P < 0.036$). Ancak CRP ile NASH skoru ve fibrozis evreleri arasında bir ilişki saptanamamıştır ($p > 0.05$). Serum apelin-36 seviyeleri ise HOMA-IR ile ilişkili olarak saptandı ($r = 0.204$, $P < 0.01$). Potansiyel karıştırıcılar dikkate alındıktan sonra yapılan analizlerde bu ilişki gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Ayrıca serum obestatin seviyeleri ile çalışmanın herhangi bir değişkeni arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($P > 0.05$). NASH skoru ile seçilen adipokinler arasında ilişki bulunmadı ($P > 0.05$). Ayrıca bu moleküller, basit yağlanma ile NASH ayırımını yapamamaktadır ($P > 0.05$). Aşamalı lineer regresyon analizlerinden sonra NAFLD hastalarında, yalnız serum vaspin seviyeleri, karaciğer fibrozis skorlarının bağımsız bir prediktörü olarak saptandı ($\beta = 0.37$; $t = 3.99$, $P < 0.01$).

6. TARTIŞMA

NAFLD anormal karaciğer fonksiyonu testlerinin en yaygın nedenidir. NAFLD karaciğer hasarı oluşturmak için yeterli düzeyde alkol tüketmeyen hastalardaki karaciğer steatozu olarak tanımlanır (153, 154). Steatozis; obez, hiperlipidemili ve diyabetli hastalarda sıklıkla oluşur ve bu üç hastalık, metabolik sendromun temel kriterlerindedir (155,156). NAFLD tanısının doğrulanması görüntüleme yöntemleri ile yapılabilir ancak, hastalığın kesin tanısı ve evrelendirilmesi karaciğer biyopsisini gerektirmektedir. NAFLD, hastaların az bir kısmında siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi artmış ölüm riskine yol açan komplikasyonlara neden olur. Ayrıca artmış ölüm riski muhtemelen vasküler hastalık gibi insülin rezistansına ait komplikasyonlara bağlıdır. Daha önceden 'kriptojenik siroz' tanısı konmuş hastalarda NAFLD'ın önemli bir rolü olduğu artık bilinmektedir (157).

NASH ve basit steatoz arasındaki klinik ayrım önemlidir. Çünkü NASH, siroz ve hepatoselüler karsinomu da içeren ciddi karaciğer hastalıklarının en önde gelenidir. Sirozun NASH'li hastalarda gelişmesi sadece steatozu olanlara nazaran daha muhtemeldir. Ayrıca, NASH tanısı atlanabilen bir hastalıktır. Tip 2 diyabetli hastalar ve obez hastalar arasında insidansı özellikle yüksektir. Steatoziden NASH'e geçişin tam sınırının net olarak çizilememiş olmasına rağmen, inflamasyon ve/veya fibrozis temel farktır.

NAFLD tanımlanmasının üzerinden 20 yıldan fazla zaman geçmiştir ve patofizyolojik mekanizmasının anlaşılması açısından pek çok gelişme kaydedilmiştir. İnsülin direnci, hepatosellüler yağ birikimi için önemli bir faktördür. Aşırı miktardaki intrasellüler yağ asitleri, oksidatif stres, adenosin trifosfat (ATP) azalması ve mitokondriyal disfonksiyon yağlanmış karaciğerde hepatosellüler hasarın önemli sebepleridir (154). Mitokondriyal disfonksiyon orijini ne olursa olsun NASH'de anahtar bir rol oynar. Mitokondriyal disfonksiyon yalnızca yağ birikimine katkıda bulunmaz ayrıca reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşmasına sebep olur. Sonuçta çeşitli kısır döngüler; lipid peroksidasyonu, mitokondriyal

hasar, ROS oluşumu, anti-oksidanların azalması ve sitokin salınımının neden olduğu oksidatif stres genetik olarak yatkın bireylerde nekroinflamasyon ve fibrogenezise sebep olabilir (154). Bütün bunların sonucunda hepatosit nekrozu veya apoptozis meydana gelir (9,158). Hücre ölümünün mekanizması henüz açıklanmamıştır. İnflamatuvar ve immünolojik faktörlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin belirgin etkisi muhtemeldir (159). Ancak aynı metabolik bozuklukları taşıyor olmalarına rağmen bazı hastalarda sadece yağlanma, bazılarında ise steatohepatit gelişmesi, yağlı karaciğer hastalığının tüm formlarının sadece bu patogenez süreci içerisinde açıklanmasını olanaksız kılmaktadır (115). NASH patogenezindeki temel hasar insülin rezistansı sonucu gelişen karaciğerdeki trigliserid birikimidir (116).

Son 10 yılda adipoz doku; adipokin denilen metabolik ürünleri ile lokal, periferik ve santral etkiler göstererek enerji homeostazında anahtar rol oynayan endokrin bir doku olarak tanımlanmıştır (74). Obezitenin patofizyolojisinde adipoz doku ve hormonlar rol oynamaktadır. Ayrıca obezite, sistemik hafif bir inflamasyon olarak kabul edilmektedir (117). Hipertrofiye uğrayan adipositler kemokinleri salgırlar ve makrofajları toplarlar. Makrofajlardan; inflamatuvar adipokinleri uyaran, anti-inflamatuvar adipokinleri ise baskılayan inflamatuvar sitokinler salınır (80). Karaciğer hasarında ise çoğu adipokin hepatositler tarafından üretilir ve salgılanır. Literatürde yaygın olarak bilinenleri leptin, adiponektin, rezistin, TNF-alfa, IL-6 (interleukin-6) olup son dönemlerde keşfedilenleri ise visfatin ve RBP-4 (retinol binding protein-4) tür. Bu adipositokinlerin NAFLD'taki rolleri Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Farklı adipokinlerin NAFLD'taki rolleri (42)

Sitokin	Deneysel Modeller	Klinik Çalışmalar
Leptin	Proinflamatuvar HSC aktivasyonu	NAFLD/NASH'te artmaz Histolojide bağlantı yok
Adiponektin	Anti-inflamatuvar Hepatoprotektif	NAFLD'ta kontrollere göre ↓ Fibrozis ile ters orantılı
Rezistin	Proinflamatuvar	NASH'te artar Fibrozis ile muhtemelen ilişkili
TNFα	Proinflamatuvar Lipojenik	NAFLD/NASH'te ↑ Fibrozis ile ilişkili
IL-6	Belirsiz	Yetersiz veri
Visfatin	Belirsiz	Yetersiz veri
RBP-4	Belirsiz	Yetersiz veri

Bu çalışmada, NAFLD hastalarında yeni adipositokinlerden serum vaspin ve apelin-36 seviyeleri kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır. Ancak serum obestatin seviyelerinde farklılık bulunamamıştır. Ayrıca serum vaspin seviyeleri, metabolik parametreler de dahil olmak üzere potansiyel karıştırıcılardan bağımsız olarak karaciğer fibrozisinin prediktörü olarak saptanmıştır.

Apelin yeni tanılanmış bir adipokin olup kan basıncı, vasküler tonus, kardiyak kontraktile, kalp hızı ve yiyecek alımının düzenlenmesinde ve anterior pituitar sistem, anjiogenez, apoptoz, inflamasyon gibi birçok sistemde görevi vardır. Adipositokin olarak ele alındığında plazma apelin seviyeleri obez hayvanlarda ve insanlarda yüksek olarak saptanmıştır (125). Bu çalışmada NAFLD hastalarında apelin-36 seviyelerinde saptanan yükselme, Erçin ve

arkadaşlarının (94) apelin-12 ile elde ettikleri sonuçları desteklemektedir. Erçin ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmaya sadece erkek hastalar alınmıştır. Ancak bizim çalışmamız daha yüksek hasta sayısı ve her iki cinsiyeti içeren popülasyonla yapılmıştır. Daha önceden yapılan bir çalışmada insülin sekresyonu ile apelin arasında güçlü bir ilişki bildirilmiştir (125). Boucher ve arkadaşları, adipoz dokudan apelin sentez ve sekresyonlarının insülin aracılığıyla arttığını bildirmişlerdir (96). Ayrıca plazma apelin seviyelerinin vücut yağ kitlesi ve hiperinsülinemi ile paralel olarak artış gösterdiğini saptamışlardır. Bizim çalışmamız, daha önceden apelin ve HOMA-IR kullanarak değerlendirilen insülin rezistansı ile NAFLD arasındaki ilişkiyi de doğrulamaktadır (94). Ancak potansiyel karıştırıcılar dikkate alındıktan sonra yapılan analizlerde bu ilişki gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Tüm bu sonuçlara göre apelinin, NAFLD patofizyolojisinde majör rol oynamadığı düşünülebilir. Apelinin insülin rezistansı ve glukoz homeostazının regülasyonundaki rolü tartışmalıdır. Örneğin, insülin rezistan farelere dışardan apelin uygulaması yapılırsa glukoz kullanımı artış göstermektedir (99). Diğer bir çalışmada apelin geni silinmiş fareler, doğal (wild) tip fareler ile karşılaştırıldıklarında anlamlı derecede daha fazla insülin rezistan olarak saptanmışlardır. Yine bu farelerdeki insülin rezistansı apelin verildiğinde kaybolmuştur (100). Her ne kadar hayvan modellerinde insülin sensitivitesi üzerinde apelinin olumlu etkisi olduğu gösterilse de, Li ve arkadaşları serum apelin seviyelerinin tip 2 diyabeti olan hastalarda sağlıklı kontrollere göre artmış olduğunu saptamışlardır (101). Son yıllarda Principe ve arkadaşları, karaciğer fibrozisi olan vakalarda serum apelin düzeylerinde sağlıklı kontrollere göre belirgin yükselme saptamışlardır (145). Ancak bu çalışmada, Erçin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da olduğu gibi metabolik karaciğer hastalığı ile apelin arasında bağımsız majör bir ilişki bulunamamıştır (94). Benzer şekilde, obestatin seviyeleri NAFLD'da değişmemektedir ve hastaların klinik, histolojik ve biyokimyasal özellikleriyle korelasyon saptanmamıştır.

Bu çalışmanın ana bulgusu, vaspin seviyelerinin NAFLD hastalarında kontrollere göre anlamlı oranda artmış olduğu ve bu durumun karaciğer fibrozisi

ile bağımsız olarak biyokimyasal korelasyon gösterdiğiidir. Son zamanlarda Kukla ve arkadaşları, 41 kişiden oluşan NAFLD hasta grubunda, serum vaspin seviyesini yüksek olarak saptamışlardır (89). Serum vaspin seviyesindeki bu yükselme, hepatositlerdeki balonlaşma ile pozitif korelasyon göstermektedir. Aynı yazarlar, yüksek serum vaspin seviyelerinin kronik hepatit C'si olan hastalarda karaciğer fibrozis skoruyla ilişkilendirilebileceğini bildirmişlerdir (102). Vaspin seviyeleri ve karaciğer fibrozisi arasında saptanan pozitif korelasyonda rol oynayan faktörler mevcut verilerden elde edilememektedir. Ancak vaspin, insülin duyarlılığını artıran etkileri olduğu düşünülen yeni bir serpindir. Serpinlerin yapısal ve/veya sekresyonlarında meydana gelen değişiklikler, fonksiyonel özelliklerini değiştirebilir. Bu durum karaciğer sirozu da dahil olmak üzere bazı hastalıklara sebep olabilir (103). İleri çalışmalar karaciğer fibrozisinin patogeneğinde ana rol oynayan TGF-beta 1 (transforming growth factor-beta1) ve vaspin arasındaki ilişkiyi saptamaya yönelik olmalıdır. Çalışmanın bulguları, önemli klinik anlamlar taşımaktadır. İlk olarak serum vaspin seviyesi ölçümü NASH tanısı gözden kaçmış hastaların sayısını azaltabilir. Ayrıca NASH'in tanısı için karaciğer biyopsisinin gerekliliği akılda tutulmalıdır. NASH'i tespit etmede yeni tanısal serum belirteçlerine veya invaziv olmayan işlemlere ihtiyaç duyulduğu aşikârdır. NAFLD ile bağlantılı ciddi riskler bulunduğundan dolayı, serum vaspin düzeyi hastalığın progresyonunu izlemede ve yüksek riskli hastaları belirlemede yeni bir izlem parametresi olarak görülebilir. Ancak örneklem büyüklüğü daha geniş olan başka çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmada serum vaspin seviyesi ile korelasyon gösteren CRP bir akut faz reaktanıdır (141). Ulaşımı kolay, ucuz, sıkça kullanılan, güvenilir bir serum belirteci olup yaygın bir şekilde bazı hastalıklarda tanı ve takip için kullanılmaktadır (141,142). CRP'nin ana sentez yeri karaciğerdir. Serum CRP seviyelerinin metabolik sendrom ve diyabette arttığı bildirilmiştir (143). CRP aynı zamanda metabolik sendromu olan hastalarda kardiyovasküler olayların prediktörü olarak kabul edilmektedir (143,144). Son zamanlarda Oruç ve arkadaşları, CRP değerlerini NAFLD hastalarında kontrollere göre daha yüksek

olarak saptamış ve CRP'nin NAFLD hastalarının tanısında tüm klinik ve laboratuvar bilgileri sağlandıktan sonra ek bir belirteç olarak ve hastalığın takibinde kullanılabileceğini belirtilmişlerdir (146). Ancak steatohepatit ile basit yağlanmayı ayıramadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ise NASH hastalarında serum vaspin düzeyleri kontrollere göre anlamlı olarak yüksek saptandı. Serum vaspin seviyeleri ile CRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu gözlemlendi ($r = 0.378$, $P < 0.001$). Hem karaciğer hem de adipoz dokudan IL-6 aracılığıyla CRP salgılanmaktadır. Obezitede her iki dokudan da CRP salınımı artmaktadır. CRP inflamasyonun nonspesifik bir göstergesidir (147). Nonalkolik steatohepatitin patofizyolojisinde inflamasyonun bulunması ve CRP'nin inflamasyonun bir göstergesi olması, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında yükselen vaspin düzeyi ile CRP'nin korelasyon göstermesini açıklayabilir. Bu patofizyolojiden yola çıkarak yapılan bazı çalışmalarda CRP ile fibrozis derecesi arasında ilişki saptanmıştır ve CRP'nin basit yağlanmayı NASH'ten ayırabileceği bildirilmiştir (148-149). Ancak bu konuda çelişkili sonuçlar mevcuttur (146,152). CRP obezite, metabolik sendrom ve tip 2 DM'te artış göstermektedir (147). Bizim çalışmamızda da CRP ve HOMA-IR arasında ilişki saptanmıştır ($r=0.222$, $P < 0.036$). Ancak CRP ile NASH skoru ve fibrozis evreleri arasında bir ilişki saptanamamıştır ($P > 0.05$). Endotel disfonksiyonuna ve insülin rezistansına NASH'li hastalarda sıklıkla rastlanmaktadır. Proinflamatuvar adipokinler ve CRP endotel disfonksiyonu ve insülin rezistansını tetikleyebilmektedir (150-151). Bu durum serum vaspin düzeyindeki artışın CRP yükselmesiyle birlikte olmasının açıklanmasına katkıda bulunabilir.

Çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, bu çalışma bir vaka-kontrol çalışmasıdır ve serum vaspin, NAFLD ve fibrozis arasında nedensel bir ilişki saptanamamaktadır. Bu nedenle, serum vaspin seviyeleri ile karaciğer fibrozisi arasındaki nedensel ilişkileri irdelenmek adına longitudinal çalışmalara ihtiyaç vardır. İkincisi, çalışmada nispeten küçük örneklem kullanılması sonuçların genellenmesini engellemektedir. Ancak bu çalışma literatürde en fazla sayıda vaka içeren örnekleme sahip çalışmalardan

biridir. Üçüncüsü, çalışma tek merkezli olup sadece Türk ırkı üzerinde yapıldığından dolayı, çalışmanın sonuçları farklı etnik grupların özelliklerini yansıtmaz. Fakat hem kadın hem de erkeklerde yapılan bir çalışma olması nedeniyle daha önce sadece erkekler üzerinde yapılan çalışmaya göre (94) toplumu daha iyi yansıttığı düşünülebilir. Dördüncü olarak HOMA formülü kullanımı basit ve noninvaziv bir yöntem olsa da insülin sensitivitesini kesin bildirmemekte, yalnızca gerçeğe yakın olarak tahmin edebilmektedir. Buna karşın tüm NAFLD hastalarının karaciğer biyopsisi ile tanı almış olması çalışmayı güçlü kılan en önemli faktördür.

7. SONUÇLAR

Sonuç olarak bulgular, serum vaspin seviyelerinin NAFLD hastalarında potansiyel karıştırıcılardan bağımsız olarak yükseldiğini ve karaciğer fibrozis skorlarının bağımsız bir prediktörü olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlar, yeni adipokinler ile metabolik karaciğer hastalıkları arasındaki ilişkinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu yeni adipokinlerden özellikle vaspin hastalığın patogenezinde rol alıyor olabilir. Bu çalışma, NAFLD hastalarında serum vaspin seviyesindeki artışın prognostik önemini değerlendirememektedir. Bunun için ileri çalışmalara gereksinim vardır. Bu çalışma, giderek artan literatürün ışığında yeni adipokinlerin NAFLD patofizyolojisi ve kliniğindeki yerini açıklamaya katkıda bulunabilir. Ayrıca gelecekte karaciğer hastalıklarında vaspinin teröpatik kullanımı ile ilgili araştırmalara yön verebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Collantes RS, Ong JP, Younossi ZM. The metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Panminerva Med* 2006; 48: 41–8.
2. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: S5–10.
3. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 1–16.
4. Pendino GM, Mariano A, Surace P, et al. Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology* 2005; 41: 1151–9.
5. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology* 2005; 41: 64–71.
6. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. *Hepatology* 2002; 35: 746–52.
7. Ong JP, Elariny H, Collantes R, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2005; 15: 310–5.
8. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004;24:3-2.
9. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1323-30,
10. Susca M, Grassi A, Zauli D, Volta U, Lenzi M, Marchesini G, et al. Liver inflammatory cells, apoptosis, regeneration and stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis* 2001; 33:768-777.
11. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125: 437-443.

12. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009;9:299-314.
13. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009;49:306-17.
14. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 17–26.
15. McCullough AJ. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 75–104.
16. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1136–43.
17. Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, et al. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16:1118–25.
18. Lutchman G, Promrat K, Kleiner DE, et al. Changes in serum adipokine levels during pioglitazone treatment for nonalcoholicsteatohepatitis: relationship to histological improvement. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1048–52.
19. Musso G, Gambino R, Biroli G, et al. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438–46.
20. Wajchenberg BL Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21:697–738
21. Klein S, Fontana L, Young VL, et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004 ;350:2549–2557

22. Thorne A, Lonnqvist F, Apelman J, et al. A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002 ;26:193–199
23. Musso G, Gambino R, Durazzo M, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175–83.
24. Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, et al.. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237–42.
25. Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10610 –10615, 2005
26. Youn BS, Klötting N, Kratzsch J, et al. Serum Vaspin Concentrations in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2008; 57:372–377
27. Zhang JV, Ren PG et al: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996-999, 2005
28. Dun SL, Brailoiu GC et al: Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *J Endocrinol* 191:1–10, 2006
29. Samson WK, White MM et al: Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am Physiol: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292 (1): R637-643, 2007; Epub 2006 Aug 24
30. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146:1764–1771.
31. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116:1413–9.
32. Sebastiani G, Albert A. Non invasive fibrosis biomarkers to reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3682–94.

33. Bondini S, Kleiner DE, Goodman ZD, Gramlich T, Younossi ZM. Pathologic assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 17–23.
34. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S412-6.
35. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005; 50:171-80.
36. Brunt EM. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2009; 13:533-44.
37. Yilmaz Y, Kedrah AE, Ozdogan O. Cytokeratin-18 fragments and biomarkers of the metabolic syndrome in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15:4387-91.
38. Yilmaz Y, Dolar E. Biomarkers for noninvasive biochemical diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis: tools or decorations? *World J Gastroenterol* 2009; 15:4346-7.
39. Almeda-Valdés P, Cuevas-Ramos D, Aguilar-Salinas CA. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1:S18-24.
40. Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116:539-64.
41. Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med* 2008; 75:721-8.
42. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1:S4-8.
43. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009; 13:511-31.
44. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11:1-16.

45. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann MB, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44:1236-43.
46. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Increases Risk of Death Among Patients With Diabetes: A Community-Based Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 2010; doi:10. 1038/ajg. 2010. 18
47. 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; 44:865-73.
48. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008; 49:608-12.
49. Lizardi-Cervera J, Aguilar-Zapata D. Nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease. *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1:S40-3.
50. Schindhelm RK, Diamant M, Heine RJ. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease risk. *Curr Diab Rep* 2007; 7:181-7.
51. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; 191:235-40.
52. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22:437-43.
53. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:2729-35.
54. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial character of the second hit. *Hippokratia* 2009; 13:128.

55. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2010; 5:145-71.
56. Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulcier AM, Naveau S. Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3:458-69.
57. Ariz U, Mato JM, Lu SC, Martínez Chantar ML. Nonalcoholic steatohepatitis, animal models, and biomarkers: what is new? *Methods Mol Biol* 2010; 593:109-36.
58. Takitani K, Miyazaki H, Yoden A, Tamai H. Children's toxicology from bench to bed--Liver Injury (2): Mechanism of antioxidant therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *J Toxicol Sci* 2009; 34 Suppl 2:SP223-8.
59. Lickteig AJ, Fisher CD, Augustine LM, Cherrington NJ. Genes of the antioxidant response undergo upregulation in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Biochem Mol Toxicol* 2007; 21:216-20.
60. Syn WK, Choi SS, Diehl AM. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009; 13:565-80.
61. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M, et al. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13:837-44.
62. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* 2008; 28:386-95.
63. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:503-22.
64. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008; 48:792-8.
65. Gaidos JK, Hillner BE, Sanyal AJ. A decision analysis study of the value of a liver biopsy in nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2008; 28:650-8.

66. Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J Hepatol* 2001; 35:195-9.
67. Myers RP. Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1:S25-33.
68. Yilmaz Y, Ulukaya E, Dolar E. A "biomarker biopsy" for the diagnosis of NASH: promises from CK-18 fragments. *Obes Surg* 2008; 18:1507-8.
69. Steyerberg EW, Vickers AJ, Cook NR, Gerds T, Gonen M, Obuchowski N, et al. Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures. *Epidemiology* 2010; 21:128-38.
70. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Diag Dis Sci* 2009; 54:1847-56.
71. Moran O, Phillip M. Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects--a review. *Pediatr Diabetes* 2003; 4:101-9.
72. Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10:973-93.
73. Blüher S, Mantzoros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:991S-997S.
74. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:2629-40.
75. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009; 2009:831670.
76. Wang J, Brymora J, George J. Roles of adipokines in liver injury and fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2:47-57.
77. Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4822-6.

78. Chiarugi P, Fiaschi T. Adiponectin in health and diseases: from metabolic syndrome to tissue regeneration. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14:193-206.
79. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med*. 2009; 9:299-314.
80. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 2008; 43:811-22.
81. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40:177-84.
82. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:91-100.
83. Barnes KM, Miner JL. Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr Protein Pept Sci* 2009; 10:96-107.
84. McTernan PG, Kusminski CM, Kumar S. Resistin. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17:170-5.
85. Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004; 255:439-47.
86. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43:1128-36.
87. Wada J. Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17:327-33.
88. Seeger J, Ziegelmeier M, Bachmann A, Lössner U, Kratzsch J, Blüher M, et al. Serum levels of the adipokine vaspin in relation to metabolic and renal parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:247-51.

89. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Hartleb M, Waluga M, Chwist A, Kajor M, et al. Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45:235-42.
90. Ren AJ, Guo ZF, Wang YK, Lin L, Zheng X, Yuan WJ. Obestatin, obesity and diabetes. *Peptides* 2009; 30:439-44.
91. Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Scognamiglio P, Maj M. Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:4418-21.
92. Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005; 107:198-211.
93. Rayalam S, Della-Fera MA, Krieg PA, Cox CM, Robins A, Baile CA. A putative role for apelin in the etiology of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368:815-9.
94. Ercin CN, Dogru T, Tapan S, Kara M, Haymana C, Karadurmus N, et al. Plasma apelin levels in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2009 doi:10. 1016/j. metabol. 2009. 10. 019
95. ACE/ADA Task Force on Inpatient Diabetes. American College of Endocrinology and American Diabetes Association Consensus statement on inpatient diabetes and glycemic control. *Diabetes Care* 2006; 29:1955-62.
96. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association and National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-38.
97. 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; 41:1313-21.

98. Minorette P, Falcone C, Calcagnino M, Emanuele E, Buzzi MP, Coen E, et al. Prognostic significance of plasma osteopontin levels in patients with chronic stable angina. *Eur Heart J* 2006; 27:802-7.
99. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buléon M, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metabolism* 2008; 8:437-45.
100. Yue P, Jin H, Aillaud-Manzanera M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, et al. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 doi:10.1152/ajpendo.00385.2009
101. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H, Li K. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114:544-8.
102. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, Waluga M, Warakomska I, Berdowska A, et al. Visfatin serum levels in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2009 doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01174.x
103. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535:221-35.
104. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic Fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113.
105. Polat SA. Yatarak tedavi gören psikiyatri hastalarında hepatit B ve hepatit C seroprevalansı. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2002;24(1):15-20.
106. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003;37:1286.
107. Van Ness MM, Diehl AM. Is liver biopsy useful in the evaluation of patients with chronically elevated liver enzymes? *Ann Intern Med* 1989; 111:473.

108. Zobair SS, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745-750.
109. R. N. Bergman, "New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis," *Recent Progress in Hormone Research*, vol. 52, pp. 359–385, 1997.
110. E. Bugianesi, A. J. McCullough, and G. Marchesini, "Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease," *Hepatology*, vol. 42, no. 5, pp. 987–1000, 2005.
111. Bacon BR, Faravash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: An expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103.
112. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917.
113. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: A study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594.
114. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123:745.
115. Sonsuz A. Nonalkolik Steatohepatit. *Endoskopi* 2006;16(9):55-62.
116. G. C. Farrell and C. Z. Larter, "Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis," *Hepatology*, vol. 43, no. 2, supplement 1, pp. S99–S112, 2006.
117. A. S. Greenberg and M. S. Obin, "Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 83, no. 2, pp. 461S–465S, 2006.
118. Andersen, T, Gluud, C, Franzmann, MB, Christoffersen, P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991; 12:224.
119. Hickman, IJ, Jonsson, JR, Prins, JB, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in

- sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004; 53:413.
120. Dixon, JB, Bhathal, PS, Hughes, NR, O'Brien, PE. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004; 39:1647.
 121. Petersen, KF, Dufour, S, Befroy, D, et al. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:603.
 122. Klein, S, Mittendorfer, B, Eagon, JC, et al. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006; 130:1564.
 123. Lavine, JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *J Pediatr* 2000; 136:734.
 124. Sanyal, AJ, Mofrad, PS, Contos, MJ, et al. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:1107.
 125. Uygun, A, Kadayifci, A, Isik, AT, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19:537.
 126. Bugianesi, E, Gentilcore, E, Manini, R, et al. A Randomized Controlled Trial of Metformin versus Vitamin E or Prescriptive Diet in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1082.
 127. Promrat, K, Lutchman, G, Uwaifo, GI, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39:188.
 128. Belfort, R, Harrison, SA, Brown, K, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355:2297.

129. Lutchman, G, Modi, A, Kleiner, DE, et al. The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 46:424.
130. Aithal, GP, Thomas, JA, Kaye, PV, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 135:1176.
131. Ratziu, V, Giral, P, Jacqueminet, S, et al. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 2008; 135:100.
132. Merat, S, Malekzadeh, R, Sohrabi, MR, et al. Probuocol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol* 2003; 38:414.
133. Abdelmalek, MF, Angulo, P, Jorgensen, RA, et al. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2711.
134. Laurin, J, Lindor, KD, Crippin, JS, et al. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Hepatology* 1996; 23:1464.
135. Lindor, KD, Kowdley, KV, Heathcote, EJ, et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Results of a randomized trial. *Hepatology* 2004; 39:770.
136. Yokohama, S, Yoneda, M, Haneda, M, et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 40:1222.
137. Adams, LA, Zein, CO, Angulo, P, Lindor, KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2365.

138. Satapathy, SK, Garg, S, Chauhan, R, et al. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1946.
139. Zelber-Sagi, S, Kessler, A, Brazowsky, E, et al. A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:639.
140. Massaro KS, Costa SF, Leone C, Chamone DA. Procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) as severe systemic infection markers in febrile neutropenic adults. *BMC Infect Dis.* 2007;**22**:137. doi: 10.1186/1471-2334-7-137.
141. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;**19**:972–978.
142. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ.* 2000;**321**:199–204. doi: 10.1136/bmj.321.7255.199.
143. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;**342**:836–843. doi: 10.1056/NEJM200003233421202.
144. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, et al. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* 2008;48:1193-201.
145. Nevin Oruc, Omer Ozutemiz, Gul Yuce, Ulus S Akarca, Galip Ersoz, Fulya Gunsar, and Yucel Batur. Serum procalcitonin and CRP levels in non-

- alcoholic fatty liver disease: a case control study. *BMC Gastroenterology* 2009, **9**:16 doi:10.1186/1471-230X-9-16
146. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, Amor IB, Staccini-Myx A, Huet PM, Gugenheim J, Sadoul JL, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol*. 2006 Aug;101(8):1824-33. Epub 2006 Jun 22.
147. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. Division of Gastroenterology, Yokohama City University Hospital, 3-9 Fuku-ura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol*. 2007 Jul;42(7):573-82. Epub 2007 Jul 25.
148. Uchihara M, Izumi N. [High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP): a promising biomarker for the screening of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)] *Nippon Rinsho*. 2006 Jun;64(6):1133-8
149. Verma David C. W. Lau, Bikramjit Dhillon, Hongyun Yan, Paul E. Szmitko and Subodh. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:2031-2041, 2005. First published Jan 14, 2005; doi:10.1152/ajpheart.01058.2004
150. Buckley CD, Rainger GE, Nash GB, Raza K. Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Jul;44(7):860-3. Epub 2005 Jan 11.
151. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846–54.

152. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(suppl1) :35-46.
153. Adinolfi LE, Utili R, Ruggiero G. Body composition and hepatic steatosis as precursors of fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 1999;30:1530-31.
154. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: A follow up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11:74.
155. Propst A, Propst T, Judmaie G, Vogel W. Prognosis in nonalcoholic steatohepatitis (letter). *Gastroenterology* 1995; 108:1607.
156. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123(1):134-40.
157. Susca M, Grassi A, Zauli D, Volta U, Lenzi M, Marchesini G, et al. Liver inflammatory cells, apoptosis, regeneration and stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis* 2001; 33:768-777.
158. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
159. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006 Mar;17(1):4-12.
160. Stofkova A. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. *Endocr Regul.* 2010 Jan;44(1):25-36.
161. Wang H, Chen DY, Cao J, He ZY, Zhu BP, Long M. High serum resistin level may be an indicator of the severity of coronary disease in acute coronary syndrome. *Chin Med Sci J.* 2009 Sep;24(3):161-6.
162. Dun SL, Brailoiu GC, Brailoiu E, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *J Endocrinology.* 2006 Nov; 191(2):481-9.

163. Green BD, Irwin N, Flatt PR. Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides*. 2007 May;28(5):981-7. Epub 2007 Feb12.
164. Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2007;35:661-4.