

# Ekspresija i distribucija kaveolina-1 i transformirajućeg čimbenika rasta beta u hepatocitima bolesnika s nealkoholnom masnom bolešću jetara

---

Gomerčić Palčić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:539274>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Gomerčić Palčić**

**Ekspresija i distribucija kaveolina-1 i  
transformirajućeg čimbenika rasta  
beta u hepatocitima bolesnika s  
nealkoholnom masnom bolešću jetara**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Gomerčić Palčić**

**Ekspresija i distribucija kaveolina-1 i  
transformirajućeg čimbenika rasta  
beta u hepatocitima bolesnika s  
nealkoholnom masnom bolešću jetara**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu

Voditelji rada: prof. dr. sc. Marko Duvnjak i prof. dr.sc. Božo Krušlin

Zahvaljujem se mentorima, prof. dr. sc. Marku Duvnjaku i prof. dr. sc. Boži Krušlinu, na strpljenju, korisnim savjetima i pomoći pri izradi ove disertacije.

Ovaj rad posvećujem kćerki Emi i suprugu Andriji.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. NAFLD - terminologija.....	2
1.2. Epidemiologija NAFLD-a.....	3
1.3. Etiologija NAFLD-a.....	4
1.4. Patogeneza NAFLD-a.....	7
1.5. Kliničke manifestacije i dijagnostika NAFLD-a.....	10
1.5.1. Biokemijski markeri.....	10
1.5.2. Slikovne metode.....	13
1.5.3. Invazivne metode – biopsija jetre.....	14
1.6. Terapijske mogućnosti u liječenju NAFLD-a.....	18
1.7. Kaveole i kaveolini.....	20
1.7.1. Struktura i mehanizam djelovanja cav-1.....	22
1.7.2. Cav-1 i NAFLD.....	23
1.8. Struktura i mehanizam djelovanja TGF- $\beta$ .....	25
1.8.1. TGF- $\beta$ 1 i NAFLD.....	27
2. HIPOTEZA.....	29
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	30
3.1. Opći cilj.....	30
3.2. Specifični ciljevi.....	30
4. BOLESNICI I METODE.....	31
4.1. Ispitanici.....	31
4.2. Metode.....	33
4.3. Statistička analiza.....	35
5. REZULTATI.....	36
5.1. Kliničko-demografske i patohistološke značajke ispitivane skupine bolesnika s NAFLD-om.....	36
5.1.1. Demografske karakteristike bolesnika s NAFLD-om.....	37
5.1.2. Laboratorijske karakteristike bolesnika s NAFLD-om.....	39
5.1.3. Osnovni podaci o učestalosti sastavnica i MS-a u bolesnika s NAFLD-om...	41
5.1.4. Sonografske i patohistološke karakteristike bolesnika s NAFLD-om.....	42
5.2. Ekspresija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre.....	45
5.2.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina pozitivne i negativne ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.....	48
5.3. Distribucija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre.....	54
5.3.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.....	57
5.4. Ekspresija TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre.....	61
5.4.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.....	64

5.5. Distribucija TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre.....	67
5.5.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.....	70
6. RASPRAVA.....	75
7. ZAKLJUČCI.....	82
8. SAŽETAK.....	84
9. SUMMARY.....	86
10. LITERATURA.....	87
11. ŽIVOTOPIS.....	100

# POPIS OZNAKA I KRATICA

NAFLD - nealkoholna masna bolest jetre (engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)

MS – metabolički sindrom

NASH - nealkoholni steatohepatitis (engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*)

NAFL – nealkoholna masna jetra (engl. *Non-alcoholic fatty liver*)

HCC - hepatocelularni karcinom (engl. *hepatocellular carcinoma*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

UZV – ultrazvuk

MR – magnetska rezonanca

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *Computed tomography*)

SMK – slobodne masne kiseline

NCEP ATP III - Nacionalni program SAD-a obrazovanja o kolesterolu, Panel liječenja za odrasle III (engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*)

IDF - Međunarodna federacija za dijabetes (engl. *International Diabetes Federation*)

AHA/NHLBI-a - Američko društvo za srce/Institut za srce, pluća i krv (engl. *American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute*)

HDL - lipoproteini visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*)

BMI - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

RR – relativni rizik

95% CI - 95% interval pouzdanosti (engl. *95% confidence interval*)

TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora alfa

IL – interleukin

FABP - citoplazmatski transportni protein masnih kiselina (engl. *fatty acid-binding protein*)

FATP - transportni protein masnih kiselina (engl. *fatty acid transport protein*)

FAT - translokaza-transportni protein masnih kiselina (engl. *fatty acid translocase*)

SREBP-1c - protein koji veže regulacijski element sterola-1c (engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*)

ChREBP - protein koji veže odgovarajući element karbohidrata (engl. *Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein*)

PPAR $\alpha$  - peroksisomalnim proliferatorom aktivirani receptor alfa (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*)

PGC-1 $\alpha$  - koaktivator 1 alfa peroksisomalnog proliferatorom aktiviranog receptora gama (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

VLDL - lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoproteins*)

TGF- $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta beta

TIMP - tkivni inhibitor metaloproteinaze (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*)

ALT - alanin aminotransferaza

AST - aspartat aminotransferaza

GGT - gama-glutamil transpeptidaza

AF - alkalna fosfataza

CK-18 – citokeratin-18

LDL - lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*)

PIIINP - prokolagen-III-N-peptid

NPV – negativna prediktivna vrijednost

PPV – pozitivna prediktivna vrijednost

AUROC - površina ispod ROC krivulje, koja odražava dijagnostičku točnost ispitivane varijable (engl. *area under receiver operating characteristic curve*)

CAP - kontrolirani atenuirani parametar (engl. *Controlled Attenuation Parameter*)

cav – kaveolin (engl. *caveolin*)

HbA1c - glikozilirani hemoglobin

OGTT - test opterećenja glukozom

HOMA-IR - homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostasis Model Assessment*)



# 1. UVOD

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD, engl. *Non-alcoholic fatty liver disease*), danas se smatra najčešćom kroničnom bolešću jetre u zapadnim zemljama koju karakterizira visoka prevalencija, progresivni tijek, nedovoljno poznata patogeneza te neodgovarajuća farmakoterapija čineći je time globalnim javno-zdravstvenim problemom. Utvrđivanjem prisutnosti rizičnih faktora odnosno metaboličkog sindroma (MS) identificira se populacija s povišenim rizikom za NAFLD, a pravodobnim liječenjem pojedinih sastavnica MS-a prevenira njen razvoj. Upravo skupina bolesnika koja zadovoljava kriterije za MS i NAFLD ima viši rizik od razvoja progresivnih oblika bolesti jetre i viši mortalitet. Definiranje patogeneze ključno je za razvoj novih prijeko potrebnih terapijskih mjera s učinkom već u samim počecima bolesti prevenirajući time razvoj komplikacija te trajna oštećenja parenhima i funkcije jetre. Otkrivanjem novih faktora/markera koji sudjeluju u patogenezi NAFLD-a dodatno bi se pridonijelo razvoju novih neinvazivnih dijagnostičkih testova i/ili metoda koji bi se mogli koristiti samostalno kao markeri bolesti ili u sklopu dijagnostičkih panela. Iako znanstveni i klinički interes kao i broj studija fokusiranih na istraživanje patogeneze NAFLD-a progresivno raste još uvijek nisu razjašnjena velika pitanja; prezentira li se NAFLD s više oblika bolesti ili predstavlja zajednički naziv za skup zasebnih bolesti s različitim patogenetskim mehanizmima, koji faktori uzrokuju progresivni tijek, je li steatoza jetre protektivno stanje te brojna druga. Kontradiktorni rezultati studija na eksperimentalnim modelima i bolesnicima s NAFLD-om posljedica su nedovoljno velikih kohorti, različitosti u karakteristikama ispitanika, korištenim bodovnim sustavima u interpretaciji patohistološkog nalaza i nedovoljno preciznim neinvazivnim testovima koji se koriste kao supstitucija biopsiji jetre u dijagnostici NAFLD-a i određivanju stadija bolesti. Razvojem novih dijagnostičkih i terapijskih mjera, temeljenim na novim saznanjima o samoj patogenezi bolesti, reducirao bi se mortalitet prouzrokovan jetrenom bolesti ali i rizik od kardiovaskularnih bolesti u bolesnika s NAFLD-om.

## 1.1. NAFLD - terminologija

Godine 1980. Ludwig i sur. su prvi koristili naziv nealkoholni steatohepatitis (NASH, engl. *Non-alcoholic steatohepatitis*) za dvadeset bolesnika (90% prekomjerne tjelesne težine) s negativnom anamnezom konzumacije alkohola, patološkim vrijednostima jetrenih enzima i histološkom slikom istovjetnom s alkoholnim steatohepatitisom (1). Iako je kasnije predloženo nekoliko naziva bolesti uključujući pseudoalkoholna bolest jetre, steatonekroza, dijabetički hepatitis i nealkoholna Laennec-ova bolest, 1986. godine predložen je naziv NAFLD kojim su obuhvaćeni svi entiteti ove bolesti (2). NAFLD je dijagnoza isključivanja (anamnestička odsutnost konzumacije alkohola u hepatotoksičnim količinama ili sekundarne steatoze jetre), a definirana je kao steatoza jetrenog parenhima (>5% steatotičnih hepatocita) koja može biti praćena upalom i fibrozom.

Naziv NAFLD obuhvaća nealkoholnu masnu jetru (NAFL, engl. *Non-alcoholic fatty liver*) i NASH. NAFL je najčešći oblik NAFLD-a kojeg karakterizira makro-/mikrovezikularna/miješana masna promjena hepatocita, u pravilu bez znakova upale i/ili fibroze, te moguća progresija u cirozu u 5% bolesnika. Iako naočigled benigna bolest, zbog niskog rizika od progresije bolesti, visoka prevalencija NAFL-a u općoj populaciji čini taj nizak rizik dovoljno velikim brojem bolesnika s progresivnim oblikom bolesti i predstavlja značajni zdravstveni problem. Zabrinjavajuće je da se 10-30% bolesnika s NAFLD-om u trenutku postavljanja dijagnoze prezentira s NASH-om koji je osim steatoze karakteriziran lobularnom i portalnom upalom, hepatocelularnom ozljedom, s ili bez pridružene fibroze, te progresivnim tijekom. Pokazalo se da tijekom 10-godišnjeg razdoblja NASH u 10-15% slučajeva progredira u cirozu te čak u 25-30% ukoliko je uznapredovala fibroza prisutna u trenutku postavljanja dijagnoze (3). Važno je definirati oblik bolesti budući da je preživljenje bolesnika kod kojih je potvrđen NASH sniženo za razliku od bolesnika s NAFL-om. Ujedno se pokazalo da bolesnici s NASH-om nemaju samo povišen mortalitet kao posljedicu jetrene bolesti (2,8% vs 0,2%,  $p=0,040$ ) već i povišen rizik od kardiovaskularne smrti (15,5% vs 7,5%,  $p=0,040$ ) u usporedbi s općom populacijom (4).

Važnost dijagnosticiranja NAFLD-a leži u činjenici da može kod dijela bolesnika rezultirati cirozom, zatajenjem jetre i razvojem hepatocelularnog karcinoma (HCC, engl. *hepatocellular carcinoma*) te da je trenutačno treća po učestalosti indikacija za transplantaciju

jetre u SAD-u (5-7). Ulogu ciroze, steatoze i metaboličkih promjena u karcinogenezi jetre potrebno je još istražiti i dodatno razjasniti. Studije o povezanosti HCC-a i NAFLD-a su rijetke, većinom retrospektivne ili prikazi slučajeva, a razlog leži u dugom i relativno indolentnom tijeku bolesti koji limitira provođenje prospektivnih studija. U studiji na 195 bolesnika s NAFLD-om i potvrđenom cirozom jetre godišnja kumulativna incidencija HCC-a iznosila je 2,6% (8). U zapadnim zemljama, NAFLD se smatra uzrokom čak u 4-22% bolesnika s HCC-om. Bitno je istaknuti da NAFLD može dovesti do HCC-a i u odsutnosti ciroze, ali kada se uspoređuje s drugim kroničnim bolestima jetre ipak ima indolentniji tijek i nižu učestalost HCC-a (7,9,10). Obzirom na potvrđenu poveznicu NAFLD-a sa svim sastavnicama MS-a danas se NAFLD smatra jetrenom manifestacijom MS-a. Također se smatra ranim medijatorom i markerom aterosklerotskih procesa s kojima dijeli iste patogenetske mehanizme (inzulinska rezistencija, oksidativni stres, endotelna disfunkcija i upala) te je čak predloženo da su NASH i ateroskleroza dva aspekta zajedničke bolesti koja uključuje lokalnu aktivaciju makrofaga (3).

## **1.2. Epidemiologija NAFLD-a**

Od 1980. godine, broj pretilih osoba se prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organisation*) na globalnoj razini udvostručio. Naime, 2008. godine prekomjerne težine bilo je više od 1,4 milijarde odraslih i 170 milijuna djece. Ista uzlazna putanja prati se u bolesnika sa šećernom bolešću od koje je 2011. godine bolovalo 366 milijuna odraslih, a predviđen je porast na 552 milijuna do 2030. godine (11). Upravo ovi epidemiološki podaci potkrepljuju činjenicu da prevalencija NAFLD-a raste čineći je time u ovom trenutku najčešćom kroničnom bolešću jetre u odrasloj populaciji posebice u zapadnim zemljama. Epidemiološki podaci o incidenciji NAFLD-a su nedostatni (12). U studiji provedenoj u Engleskoj incidencija NAFLD-a je bila 29 na 100 000 ljudi godišnje (13). Unatoč predloženim brojnim neinvazivnim testovima biopsija jetre još uvijek predstavlja zlatni standard u dijagnostici NAFLD-a, ograničavajući time mogućnost provođenja velikih epidemioloških studija. Mali uzorak ispitanika, brojne dijagnostičke metode i neujednačene karakteristike ispitanika uzrok su odstupanjima u podacima o prevalenciji NAFLD-a koja se procjenjuje na 20-30% u općoj populaciji te 10-35% u SAD-u. Prevalencija NAFLD-a kod zdravih potencijalnih donora jetre i

kadavera varira od 15,8-38,5% (14-17). Obzirom da studije na kadaverima i potencijalnim donorima jetre nisu reprezentativne za opću populaciju, a biopsija jetre je invazivna metoda neprimjenjiva na velikom uzorku zdrave populacije, brojne neinvazivne metode su do sada korištene u procjeni prevalencije NAFLD-a. Od slikovnih metoda daleko najčešće je korišten abdominalni ultrazvuk (UZV) kojim je procijenjena prevalencija NAFLD-a na 17-30% u Aziji (18,19), 25% u Italiji (20) te u Španjolskoj 33% u muškaraca i 20% u žena (21). Iako rjeđe korištenom i skupljom metodom, magnetskom rezonancom (MR) sa spektroskopijom, prevalencija NAFLD-a u američkim studijama iznosila je 31%, a kompjuteriziranom tomografijom (CT) 11% (22-23). Prevalencija ali i progresivniji stadiji NAFLD-a češći su u starijoj životnoj dobi prvenstveno zbog dugog trajanja bolesti. Iako su prvotne studije implicirale prevagu NAFLD-a u ženskog spola novije studije govore suprotno. Primijećena je i razlika između rasa s najvišom prevalencijom NAFLD-a u Hispanaca, zatim bijelaca, a najnižom u Afroamerikanaca, ukazujući time na postojanje genetske predispozicije (24). Promatrajući prevalenciju NAFLD-a u pojedinim skupinama bolesnika može se zaključiti da je najučestalija u osoba s centralnom pretilošću (70-80%) i bolesnika sa šećernom bolešću tip 2 (69%), a posebice ukoliko su prisutna oba rizična faktora (25-28). Procjenjuje se da NASH zahvaća 2-3% opće populacije i 37% morbidno pretilih te da je izrazito zastupljen među NAFLD bolesnicima, a posebice kod onih s povišenim vrijednostima jetrenih enzima iznoseći u nekim studijama čak i do 74% (29-32).

### **1.3. Etiologija NAFLD-a**

Danas se identifikacija populacije s MS-om smatra ključnom u identifikaciji populacije s povišenim rizikom za razvoj NAFLD-a. Brojne studije su ukazale na povezanost NAFLD-a s MS-om i svim njegovim sastavnicama (centralni (abdominalni) tip pretilosti, dislipidemija, poremećena regulacija glikemije i arterijska hipertenzija) (33). MS je povezan i s drugim stanjima kao što je snižena fizička aktivnost, starija dob i hormonska neravnoteža (policistični jajnici ili testosteronska insuficijencija). Nekoliko hipoteza o patogenezi MS-a je trenutačno zastupljeno. Najčešće prihvaćena je o postojanju abnormalne funkcije adipoznog tkiva čija je posljedica oslobađanje adipocitokina i abnormalni metabolizam slobodnih masnih kiselina

(SMK) što u konačnici rezultira inzulinskom rezistencijom (34). Tomu u prilog govori činjenica da 75% bolesnika s šećernom bolešću tip 2 ima MS i da osobe normalne tjelesne težine mogu imati inzulinsku rezistenciju uz ostale sastavnice sindroma (35-37). Nerazjašnjena etiologija i višestruke sastavnice sindroma rezultirali su formiranjem nekoliko definicija MS-a koje su kroz godine modificirane. Koncept udruživanja rizičnih faktora, odnosno sastavnica MS-a, prvi puta je opisao Reaven 1988. godine kada je MS nazvao sindrom X obuhvaćajući time inzulinsku rezistenciju, dislipidemiju, hipertenziju i hiperglikemiju (38). Zbog postojanja kardiološkog sindroma X javila se potreba za promjenom naziva od kojih je jedan bio i MS. Godine 1998. od strane WHO-a donesena je prva formalna definicija MS-a kojom je inzulinska rezistencija postavljena kao obligatorna komponenta uz još najmanje dva dodatna rizična čimbenika (Tablica 1) (39). S obzirom na to da inzulinsku rezistenciju nije lako odrediti u kliničkoj praksi noviji konsenzusi formirani od strane Nacionalnog programa SAD-a obrazovanja o kolesterolu, Panel liječenja za odrasle III 2001. godine (NCEP ATP III, engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) (40) i Međunarodne federacije za dijabetes (IDF, engl. *International Diabetes Federation*) (41) 2005. godine uvrstili su druge kliničke parametre koje je lakše izmjeriti u svakodnevnoj kliničkoj praksi i time postaviti dijagnozu MS-a (Tablica 1). Najnovija definicija, donesena od strane IDF-a i Američkog društva za srce/Instituta za srce, pluća i krv (AHA/NHLBI-a, engl. *American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute*), ne definira niti abdominalnu pretilost niti inzulinsku rezistenciju obveznim rizičnim čimbenikom za dijagnozu MS-a već zahtjeva prisutnost bilo koje tri od niže navedenih sastavnica:

1. Povećan opseg struka (specifično za pojedine populacije)
2. Koncentracija triglicerida  $\geq 1,7$  mmol/L ili uvedena terapija za hipertrigliceridemiju
3. Snižena koncentracija HDL-a (muškarci  $< 1,0$  mmol/L, žene  $< 1,3$  mmol/L)
4. Povišen krvni tlak ( $\geq 130/85$  mmHg) ili uvedena terapija antihipertenzivima
5. Povišena koncentracija glukoze natašte ( $\geq 5,6$  mmol/L) ili liječenje hiperglikemije

Tablica 1. Kriteriji za definiranje MS-a. Preuzeto i modificirano iz Šarić i sur. (42)

Dijagnostički kriteriji	WHO	ATP-III	IDF
Abdominalna pretilost	Struk/bokovi $\geq 0,9$ (M), $\geq 0,85$ (Ž) i/ili BMI $> 30$ kg/m <sup>2</sup>	Opseg struka $\geq 102$ cm (M), $> 88$ cm (Ž)	Prema populacijama Za Europljane: opseg struka $\geq 94$ cm (M) ili $\geq 80$ cm (Ž)
Arterijska hipertenzija	$\geq 140/90$ mmHg	$> 130/85$ mmHg ili uvedena terapija za hipertenziju	$\geq 130/85$ mmHg ili uvedena terapija za hipertenziju
Glukoza natašte	$\geq 6,1$ mmol/L i/ili $\geq 7,8$ mmol/L nakon oralnog testa tolerancije glukoze	$\geq 6,1$ mmol/L	$\geq 5,6$ mmol/L ili prethodno dijagnosticiran dijabetes
Dislipidemija	Trigliceridi $\geq 1,7$ mmol/L HDL $< 0,9$ mmol/L (M), $< 1,0$ mmol/L (Ž)	Trigliceridi $\geq 1,7$ mmol/L HDL $< 1,0$ mmol/L (M), $< 1,3$ mmol/L (Ž)	Trigliceridi $\geq 1,7$ mmol/L ili terapija za hipertrigliceridemiju HDL $< 1,03$ mmol/L (M), HDL $< 1,29$ mmol/L (Ž) ili terapija za niski HDL
Inzulinska rezistencija	Unos glukoze u najnižem kvartilu populacije tijekom hiperinzulinemijske euglikemijske spone		
Ostali čimbenici	Mikroalbuminurija		
<b>Metabolički sindrom</b>	<b>Poremećena tolerancija glukoze ili dijabetes i/ili inzulinska rezistencija + 2 rizična čimbenika</b>	<b>3 od 5 rizičnih čimbenika (trigliceridi i HDL se računaju zasebno)</b>	<b>Centralna pretilost + 2 rizična čimbenika</b>

HDL - lipoproteini visoke gustoće; BMI – indeks tjelesne mase

MS je visoko prevalentan i time rastući globalni zdravstveni problem. Oko 30% odraslih u SAD-u ima MS (43-45) dok je nešto niža prevalencija (14-27%) procijenjena u Latinskoj Americi (46) i Aziji (8-13% u muškaraca i 2-18% u žena) (47-49). U Hrvatskoj prevalencija MS-a prema kriterijima NCEP-ATP-a je slična kao i u zapadnim zemljama, a iznosila je 40% (35% za

muškarce i 42 % za žene) na području Baranje (50) te 26% (32 % za muškarce i 24 % za žene) na području otoka Hvara (51). Pokazalo se da čak 70% bolesnika s NAFLD-om ispunjava kriterije za MS te da njegova prisutnost nosi veći rizik od razvoja NASH-a i uznapredovale fibroze (52-54). Bolesnici s NAFLD-om imaju izrazitu učestalost svih sastavnica MS-a; 67-71% ih ima zastupljenu centralnu pretilost, 12-37% intoleranciju glukoze natašte, 57-68% alterirani lipidogram i 36-70% arterijsku hipertenziju. Ukoliko MS raščlanimo na pojedinačne komponente, šećerna bolest i pretilost pokazali su se najboljim prediktorima težih patohistoloških oblika bolesti koji uključuju NASH i uznapredovalu fibrozu (55-56). Younossi i sur. su pokazali da dijabetičari s dokazanim NAFLD-om imaju izraženije patohistološke promjene, od kojih posebice cirozu (25% vs 10,2%,  $p=0,040$ ), u odnosu na euglikemične bolesnike. Ujedno je skupina sa šećernom bolešću imala znatno viši sveukupni mortalitet (relativni rizik [RR], 3,30; 95% CI, 1,76-6,18;  $p=0.002$ ) i onaj povezan s bolesti jetre (RR, 22,83; 95% CI, 2,97-175,03;  $p=0.003$ ) u odnosu na euglikemične bolesnike (57). Temeljeno rezultatima studija pokazalo se da bolesnici s NAFLD-om i MS-om imaju viši rizik od razvoja progresivnih stadija bolesti jetre i ujedno viši mortalitet. Drugi uzroci steatoze jetre mogu biti posljedica upotrebe lijekova, urođenih poremećaja metabolizma kolesterola i odlaganja glikogena, gladovanja, naglog gubitka na tjelesnoj težini nakon barijatrijske operacije, parenteralne prehrane, abetalipoproteinemije, hipobetalipoproteinemije, lipodistrofije i trudnoće.

## 1.4. Patogeneza NAFLD-a

Nepredvidljiv prirodni tijek bolesti i nezadovoljavajuće terapijske mogućnosti izravna su posljedica nerazjašnjene patogeneze NAFLD-a. Najvažnije pitanje na koje mnogi istraživači pokušavaju naći odgovor je koji su to faktori koji pridonose razvoju progresivnog fenotipa bolesti. Prije 15-ak godina predložena je klasična teorija "dva udarca" koju su iznijeli Day i sur. čime su definirali inzulinsku rezistenciju, odnosno poremećaj u signalizacijskom putu inzulina, ključnim mehanizmom u razvoju oba udarca (58). Klasična teorija implicira da je potreban „prvi udarac“, steatoza jetre, kojim hepatociti postaju vulnerabilni na „drugi udarac“ što vodi ka razvoju NASH-a i/ili fibroze. Danas se uvidjelo da u većine bolesnika obična steatoza ne evoluiru u progresivnije oblike bolesti te da upala može prethoditi steatozi zbog čega se postavlja pitanje

radi li se o dvije različite bolesti s različitim podležućim patogenetskim mehanizmima ili o oblicima jedne bolesti. Naime klasična teorija je do sada višestruko modificirana. Temeljem eksperimentalnih studija pokazalo se da nakupljanje SMK u jetri može dovesti do direktne ozljede hepatocita povećanjem oksidativnog stresa i aktivacijom inflamatornih puteva iz čega proizlazi da je akumulacija triglicerida vjerojatno protektivni mehanizam (59). Predložen je i „treći udarac“ kojim se objašnjava razvoj fibroze/ciroze u kroničnoj ozljedi jetre, a koji je ovisan o efikasnosti proliferacije hepatocita koja je u ovom slučaju snižena. Fibroza se prema navedenoj teoriji smatra posljedicom smrti stanica ali i smanjene proliferacije progenitornih jetrenih stanica posljedično oksidativnom stresu (60). Danas je sve više prihvaćena teorija „višestrukih udarača“, model koji obuhvaća kompleks faktora i njihovih interakcija polazeći od inzulinske rezistencije, disregulacije metabolizma masti, neravnoteže proinflamatornih citokina i adipokina, bakterijskih toksina i oksidativnog stresa vodeći ka steatozi i u nekih bolesnika ka progresivnijim oblicima bolesti, posebice u onih s genetskom predispozicijom. Navedeno potvrđuje činjenica da upala može prethoditi steatozi te da bolesnici s izraženom nekroinflamatornom aktivnosti ne moraju imati komparabilno izraženu steatozu. Upala kao rezultat odgovora hepatocita na stres može dovesti do akumulacije triglicerida. Već samo nakupljanje SMK-a u jetri rezultira stvaranjem ceramida i diacilglicerola koji dodatno pojačavaju jetrenu inzulinsku rezistenciju, progresiju oksidativnog stresa u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu te sintezu proinflamatornih citokina (faktor nekroze tumora (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ ) vodeći do stanja poznatog pod nazivom lipotoksičnost i konačno NASH-a/ciroze.

NAFL je rezultat razlike u ravnoteži između ulaska i sinteze masti s jedne strane te njihove razgradnje i izlaska s druge (61). Hrana bogata mastima i pojačana lipoliza, uzrokovana povećanom aktivacijom hormon-osjetljive lipaze u adipocitima uslijed inzulinske rezistencije, uzrok su povišenim SMK u plazmi. Kaveolini, citoplazmatski transportni protein masnih kiselina (FABP), transportni protein masnih kiselina (FATP) i translokaza-transportni protein masnih kiselina (FAT)/CD36 su proteini koji pospješuju transmembranski prijenos SMK u hepatocite. U prilog tomu govori pozitivna korelacija FABP i FAT/CD36 s količinom triglicerida u jetri bolesnika s NAFLD-om (62), te *cav1*, *FATP2* i *FATP5* na životinjskim modelima s NAFLD-om. Također, u eksperimentalnim uvjetima pokazana je rezistencija na hranom inducirano pretilost i jetrenu akumulaciju triglicerida u slučaju nedostatka ranije navedenih proteina. Osim povećane periferne lipolize, inzulinska rezistencija vodi ka pojačanoj sintezi masnih kiselina i triglicerida u



jetri, što u konačnici rezultira nakupljanjem masti u jetri. Dva su glavna regulatorna transkripcijska faktora koji sudjeluju u lipogenezi, protein koji veže regulacijski element sterola-1c (SREBP-1c, engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) i protein koji veže odgovarajući element karbohidrata (ChREBP, engl. *Carbohydrate-responsive element-binding protein*) (63). Inzulin i SMK potiču ekspresiju SREBP-1c koji regulira enzime ključne u lipogenezi, dok ChREBP stimulira transkripciju piruvat kinaze i time potiče glikolizu, ali potiče i lipogenezu (64). Peroksisomalnim proliferatorom aktivirani receptor alfa (PPAR $\alpha$ ) i njegov koaktivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) pojačavaju ekspresiju enzima koji sudjeluju u  $\beta$ -oksidaciji (karnitin palmitoiltransferaze 1, acil-CoA oksidaze i acil-CoA dehidrogenaza) čija je aktivnost u NAFLD snižena. Izlazak triglicerida u jetri posredovan je lipoproteinima vrlo male gustoće (VLDL) čiji je sastavni dio apolipoprotein B 100. Dugotrajna izloženost jetre SMK promovira oksidativni stres vodeći ka degradaciji apolipoproteina B 100, smanjenju VLDL-a i pogoršanju postojeće steatoze. Iako se ranije jetrena steatoza smatrala otoncem u patogenezi NASH-a danas sve više studija govori u prilog njezine protektivne uloge. Eksperimentalnim pojačanjem ekspresije enzima koji sudjeluju u završnom koraku sinteze triglicerida, diacilglicerol aciltransferaza 1 i 2, u adipocitima i makrofazima pretilih miševa, rezultirala je smanjenom akumulacijom i aktivacijom makrofaga u adipoznom tkivu, sistemnom upalom te inzulinskom rezistencijom, a njihovom inhibicijom do redukcije steatoze i istovremene povišene nekroinflamatorne aktivnosti u hepatocitima (59,65).

Steatotična jetra postaje osjetljiva na „druge udarce“ (neravnoteža adipocitokina/citokina, toksini kao što je lipopolisaharid koji nastaje uslijed bakterijskog prerastanja u tankom crijevu, disfunkcija mitohondrija, oksidativni stres, lipidna peroksidacija, aktivacija Kupfferovih i stelatnih stanica) koji su najvjerojatniji uzroci hepatocelularne ozljede, poticanja upalne aktivnosti, apoptoze i fibroze u bolesnika s progresivnim oblikom bolesti (66). Smatra se da pretilost vodi pojačanoj infiltraciji makrofaga u adipoznom tkivu koji sintetiziraju proinflamatorne citokine, primarno TNF- $\alpha$  i IL-6, uzrokujući kroničnu upalnu aktivnost uključujući i u jetri te diferencijaciju adipocita s promijenjenom sintezom adipocitokina u vidu sniženja protuupalnog adiponektina i povišenja leptina. Leptin i adiponektin inhibiraju signalizacijski put inzulina, a snižena razina adiponektina dodatno još vodi ka statozi jetre, posljedično smanjenju inhibitornog učinka na degradaciju masnih kiselina, progresije upale i oksidativnog stresa u jetri (67). Oksidacijom povišenih SMK u mitohondrijima, peroksisomima i mikrosomima hepatocita dolazi do stvaranja slobodnih kisikovih radikala koji uzrokuju

peroksidaciju lipida, interferiraju sa strukturom mitohondrija i funkcijom respiracijskog lanca, oštećuju plazmatsku membranu te induciraju apoptozu indukcijom Fas-liganda na hepatocitima (68). Destabilizacijom lizosomalne membrane, dolazi do prijenosa katepsina B u citoplazmu i aktivacije transkripcijskog nuklearnog faktora koji stimulira sintezu proinflammatoryh citokina u hepatocitima. Dodatni izvor proupalnih citokina u jetri čine Kupfferove stanice. Proupalni citokini potiču migraciju upalnih stanica te raznim mehanizmima vode do nekroze i programirane smrti hepatocita pojačavajući time upalnu aktivnost u jetri i ujedno potiču aktivaciju jetrenih stelatnih stanica (69). Oksidativni stres kao i fagocitoza apoptotičnih hepatocita dovode do aktivacije jetrenih stelatnih stanica, potiču u njima ekspresiju aktina, njihovu kontraktilnost, diferencijaciju i proliferaciju. Dodatno derivati lipidne peroksidacije potiču ekspresiju mRNA kolagena  $\alpha 1$ , a leptin aktivira jetrene stelatne stanice, potiče otpuštanje transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ ) iz Kupfferovih, stelatnih i endotelnih stanica te stimulira ekspresiju tkivnog inhibitora metaloproteinaze (TIMP)-1 odgađajući time degradaciju ekstracelularnog matriksa.

## **1.5. Kliničke manifestacije i dijagnostika NAFLD-a**

NAFLD je prvenstveno asimptomatska bolest (45-100%) koja se dijagnosticira slučajno na temelju nalaza masne jetre tijekom izvođenja slikovnih metoda, od kojih najčešće UZV abdomena, i/ili alteriranog hepatograma (55-79%). Rjeđe bolesnici navode nelagodu ispod desnog rebrenog luka, mučninu, pojačan umor ili se manifestiraju znakovima zatajenja funkcije jetre tj. ciroze jetre. Bolesnike s urednim jetrenim enzimima i potvrđenom steatozom jetre slikovnim metodama, a isključenim sekundarnim uzrocima, nije potrebno invazivno obrađivati već samo utvrditi postojanje MS-a i prisutne sastavnice liječiti (70).

### **1.5.1. Biokemijski markeri**

Alterirani hepatogram kod bolesnika s NAFLD-om je najčešće karakteriziran blago povišenim transaminazama (alanin aminotransferaza (ALT) > aspartat aminotransferaza (AST))

i/ili gama-glutamil transpeptidazom (GGT), iako se pokazalo da progresijom fibroze u cirozu dolazi do normalizacije vrijednosti ALT-a, a kasnije i povišenja AST-a te se često bolesnici s progresivnim oblicima bolesti previde. Izolirane vrijednosti ALT-a ne mogu se koristiti niti za dijagnozu niti za procjenu težine bolesti. Ako postoji alterirani hepatogram potrebno je učiniti opsežnu obradu radi isključena drugih uzroka kroničnih bolesti jetre kao što su konzumacija alkohola (>21 piće tjedno za muškarce i >14 pića tjedno za žene kroz period od dvije godine prije biopsije jetre), lijekovi, bolesti štitnjače, celijakija, virusni hepatitisi, nasljedne, autoimune i metaboličke bolesti jetre te dokazati steatozu jetre slikovnim ili patohistološkim metodama (71). Povišene vrijednosti feritina uslijed kronične upale i inzulinske rezistencije mogu voditi krivoj dijagnozi no ako je saturacija transferina <45% nema potrebe za daljnjom obradom. Moguć je i povišen titar serumskih antinuklearnih autoantitijela ( $\geq 1:160$ ) i/ili antitijela na glatke mišiće ( $\geq 1:40$ ) uz uredne vrijednosti imunoglobulina G.

Do sada je razvijeno više bodovnih sustava temeljenih na različitim biomarkerima i prisutnosti rizičnih faktora, a radi neinvazivne dijagnostike NAFLD-a: *SteatoTest*, *fatty liver index (FLI)*, *NAFLD liver fat score (LFS)*, *lipid accumulation product (LAP)* i *hepatic steatosis index (HSI)*. Njihova prednost je što se mogu koristiti na velikom broju bolesnika no zbog relativno kratke upotrebe učinkovitost u predikciji NAFLD-a još uvijek nije poznata. Primjerice, NAFLD LFS se pokazao dobrim prediktorom NAFLD-a no nedovoljan za razlikovanje stadija bolesti. U posljednje vrijeme ulažu se značajni napor u pronalasku neinvazivnih metoda kojima bi se mogao razlikovati NASH od NAFL-a, kao i procijeniti stupanj fibroze. Obzirom da je NASH karakteriziran apoptozom hepatocita koja je odsutna u NAFL, serumski marker citokeratin (CK)-18 koji se oslobađa iz hepatocita tijekom apoptoze predložen je kao prediktor NASH-a. Studije su pokazale da M30 antitijelo na CK-18 može identificirati bolesnike s NASH-om te da je njegova povišena serumska vrijednost nezavisni prediktor NASH-a s AUROC (engl. *area under the receiver operated curve*) vrijednosti 0,83, uz osjetljivost 71% i specifičnost 85% za vrijednosti iznad 279 U/L (72-74). Drugi CK-18 test (M65 ELISA) pokazatelj je nekroze i apoptoze hepatocita i pojedini centri su ga već uvrstili u algoritme za dijagnostiku NAFLD-a.

Biološke metode za procjenu jetrene fibroze bazirane su na mjerenju koncentracija pojedinačnih komponenata izvanstaničnog matriksa i dijelova nakupljenog vezivnog tkiva ili pro-/anti-fibrogenih enzima koji aktivno sudjeluju u fibrogenezi te kombiniranju više bioloških sastojaka krvi koji su dovedeni u matematičke odnose i daju vrijednost koja korelira sa stadijem

fibroze. U svrhu procjene jetrene fibroze mogu se mjeriti koncentracije komponenti kolagena (prokolagen-III-N-peptid (PIIINP)), glikoproteini (hijaluronati i dr.) te tkivne metaloproteinaze i njihovi inhibitori. Prednost navedenih testova je primjenjivost u gotovo svih bolesnika, niska cijena i zadovoljavajuća pouzdanost u procjeni stadija jetrene fibroze, a nedostaci tkivna nespecifičnost i stvaranje/oslobađanje kod fibroreparatornih zbivanja u organizmu. Jedan od takvih testova je *Enhanced Liver Fibrosis* (ELF) test koji obuhvaća komercijalni panel markera (TIMP-1, hijaluronska kiselina i PIIINP), a pokazao se boljim u odnosu na NAFLD fibrosis score za dijagnostiku umjerene (AUROC 0,90 vs 0,86) i uznapredovale fibroze (AUROC 0,93 vs 0,89). Kombinacijom dva navedena testa dobiveni su još bolji rezultati (AUROC od 0,93 za umjerenu i 0,98 za uznapredovalu fibrozu) (75). U studiji na 172 bolesnika PIIINP se pokazao dobrim u diferencijaciji steatoze od NASH-a i ujedno dobrim prediktorom bolesnika s NASH-om i izrazitom fibrozom (AUROC 0,85–0,87) (76). Omjer AST/ALT raste s progresijom fibroze, a njegova „cut-off“ vrijednost  $<0,8$  je dijagnostička za isključenje uznapredovale fibroze u bolesnika s NAFLD-om (AUROC 0,83, osjetljivost 74%, specifičnost 78%, negativna prediktivna vrijednost (NPV) 93% i pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) 44%) (77). Točnost AST/ALT omjera se povećava prilikom kombinacije s drugim kliničkim i biokemijskim markerima što je rezultiralo brojnim neinvazivnim skorovima (78). *BARD* (BMI, omjer AST/ALT i prisutnost šećerne bolesti tip 2) zbroj  $<2$  ima izvrsnu NPV od 95–97%, koja pouzdano isključuje uznapredovalu fibrozu (79). Drugi bodovni sustavi za procjenu fibroze su *APRI* (AST/trombociti), *FIB4* (dob, AST i ALT), *NAFLD fibrosis score* (dob, hiperglikemija, BMI, trombociti, albumin i AST/ALT) i *FibroMeter* (dob, težina, glukoza natašte, AST, ALT, feritin i trombociti). Jedini bodovni sustav od svih ranije spomenutih preporučen u smjernicama je *NAFLD fibrosis score* kojim se može pouzdano isključiti (NPV 93%), uz niski cut-off zbroj ( $<-1,455$ ), i potvrditi uznapredovala fibroza (PPV 90%), uz visoki cut-off zbroj ( $>0,676$ ) (80). Studije su pokazale da je *FIB-4* nešto bolji u odnosu na ostale neinvazivne testove u dijagnostici uznapredovale fibroze u bolesnika s NAFLD-om i urednim vrijednostima ALT-a. Navedenim neinvazivnim testovima zajednička je dobra NPV čineći ih time dobrim testom za isključivanje fibroze i identifikaciju bolesnika s blagom bolešću, no niska PPV čini ih neadekvatnim testovima za potvrdu uznapredovale fibroze.

## 1.5.2. Slikovne metode

Najčešće korištena i ujedno metoda prvog izbora koja omogućuje detekciju masne infiltracije jetre (>33% steatotičnih hepatocita) je UZV abdomena. Sonografske karakteristike NAFLD bolesnika uključuju hepatomegaliju, hiperehogen parenhim jetre uz hepatorenalni kontrast i nedovoljno jasan prikaz stijenki intrahepatalnih krvnih žila čiji je lumen sužen. Ultrazvučni prikaz hiperehogene jetre visoko je osjetljiv (>90%) i specifičan (84-95%) za dijagnozu steatoze (81). Najčešće korišten bodovni sustav za detekciju NAFLD-a predstavljen je u studiji Hamaguchi i sur. koji je prikazan u Tablici 2 (82).

Tablica 2. Ultrazvučni bodovni sustav za dijagnostiku NAFLD-a preuzet iz Hamaguchi i sur. (82)

<b>A (ehogenost parenhima jetre i stupanj hepatorenalnog kontrasta)</b>	<b>B (dubina atenuacije)</b>	<b>C (nejasan prikaz stijenki intrahepatalnih krvnih žila)</b>
0: uredna ehogenost parenhima jetre bez hepatorenalnog kontrasta	0: bez atenuacije	0: jasan prikaz stijenki intrahepatalnih krvnih žila
1: blago hiperehogen parenhim jetre ili pozitivan hepatorenalni kontrast	1: vizualizacije dijafragme je oslabljena ali vidljiva	1: prikaz stijenki intrahepatalnih krvnih žila nije dovoljno jasan, lumen intrahepatalnih krvnih žila je uzak
2: umjeren hiperehogen parenhim jetre i pozitivan hepatorenalni kontrast	2: dijafragmu nije moguće vizualizirati	
3: izrazito hiperehogen parenhim jetre i pozitivan hepatorenalni kontrast		
<b>Zbroj 0</b> (ako je A 0)		
<b>NAFLD:</b> zbroj>2 (uz uvjet A>1)		

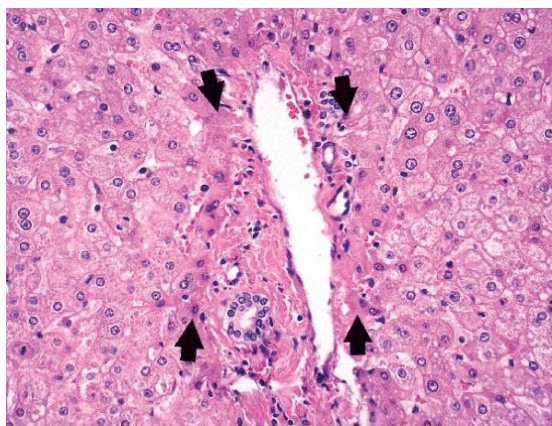
U novije vrijeme u istraživanjima se koristi kontrolirani atenuirani parametar (CAP, engl. *Controlled Attenuation Parameter*), tehnika za mjerenje steatoze bazirana na ultrazvuku i simultanoj procjeni tvrdoće jetre tranzijentnom elastografijom, no još dijagnostičke granice nisu postavljene i samo je nekoliko bolesnika s NAFLD-om bilo uključeno u studije. U slučajevima manje izražene steatoze kao dijagnostičko sredstvo može se koristiti CT i MR koji nisu ograničeni morbidnom pretilosti ali cijena i posebice zračenje su bitni faktori rijetkog korištenja u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Tranzijentna elastografija (FibroScan®) je neinvazivna metoda koja na temelju mjerenja elastičnosti jetre utvrđuje stupanj fibroze. U studiji na 246 bolesnika s biopsijom dokazanim NAFLD-om, Fibroscanom je postignut visok AUROC za detekciju fibroze 2. i 3. stupnja te ciroze (0,84, 0,93 i 0,95), uz visoku NPV (96%) i nisku PPV (52% i 72% ovisno

o uzetim cut-off vrijednostima) za 3. stupanj fibroze (83). Novija elastografska metoda poznata je pod akronimom ARFI (engl. *Acoustic Radiation Force Impulse Imaging*) kojoj se mehanizam djelovanja temelji na principu da UZV sonda stvara pojačani akustični impuls koji se kratkotrajno odašilje u jetru gdje stvara posmične valove, a čija je brzina proporcionalna stupnju fibroze. U studiji na 54 bolesnika s NAFLD-om AUROC za dijagnozu fibroze 3. ili 4. stupnja bio je 0,97 koristeći *ARFI* (84). Ultrazvučna elastografija se pokazala kao dobra metoda u potvrđivanju ciroze i isključenju uznapredovale fibroze, a ograničavajući čimbenici za njezino izvođenje su prekomjerna tjelesna težina i uski međurebreni prostori ispitanika (85). MR elastografija se pokazala dobrom metodom u razlikovanju NAFL-a i NASH-a te potvrdi uznapredovale fibroze jetre (3. i 4. stadij) (86).

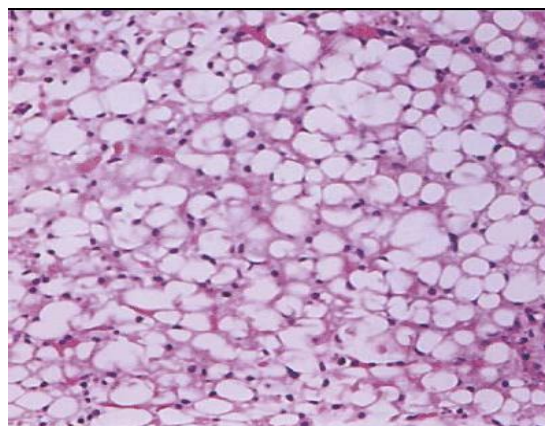
### **1.5.3. Invazivne metode - biopsija jetre**

Biopsija jetre još uvijek predstavlja zlatni standard u dijagnostici NAFLD-a no s obzirom na invazivnost, koju prati određeni mortalitet, i visoku cijenu intenzivno se istražuju neinvazivne metode. Prema trenutno važećim smjernicama izvođenje biopsije jetre treba razmotriti kod bolesnika s NAFLD-om koji će imati najveću korist od postavljanja dijagnoze i shodno tomu terapijskih mogućnosti. To su bolesnici koji imaju povišen rizik za prisutnost NASH-a i uznapredovale fibroze (bolesnici s MS-om i/ili s *NAFLD Fibrosis Score* zbrojem koji implicira prisutnost uznapredovale fibroze) te kod bolesnika sa sumnjom na NAFLD kod kojih drugi mogući uzroci steatoze i/ili kronične jetrene bolesti nisu mogli biti na drugi način isključeni (70). Prisutnost upale u bolesnika s NAFL-om treba shvatiti ozbiljno jer može doći u određenom broju bolesnika do razvoja fibroze, a kod onih s blagom fibrozom pravodobnim terapijskim djelovanjem prevencije progresije u cirozu. Biopsija jetre predstavlja zlatni standard jer je jedina koja omogućuje postavljanje dijagnoze i određivanje stadija NAFLD-a, procjenu stupnja nekroinflamatorne aktivnosti, stadija fibroze te mogućnost potvrde drugih uzroka bolesti jetre kod povišenja jetrenih enzima. Histološki znakovi koji se procjenjuju uključuju steatozu, portalnu i lobularnu upalu, hepatocelularnu ozljedu i fibrozu. Kriterij za histološku dijagnozu NAFLD-a uključuje prisutnost >5% masno promijenjenih hepatocita u odnosu na uredan parenhim jetre (Slika 1). Patohistološki nalaz koji upućuje na NAFL karakteriziraju masno promijenjeni

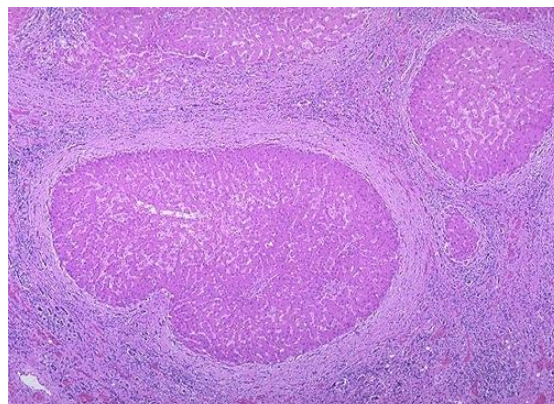
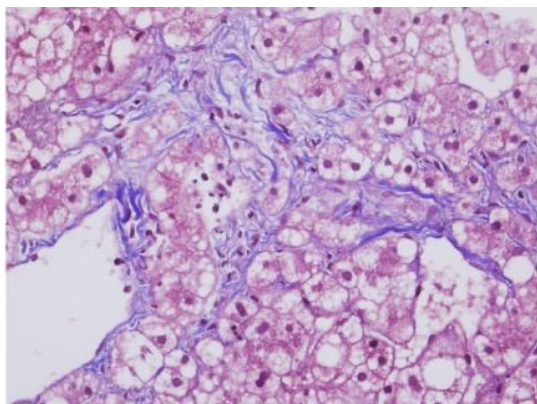
(steatotični) hepatociti uz eventualno prisutnu fokalnu lobularna i blagu portalnu upalu, ali bez vidljivih znakova oštećenja hepatocita i fibroze (Slika 2). Histološki znakovi koji se mogu vidjeti kod NASH-a uključuju steatozu, znakove hepatocelularnog oštećenja (baloniranje hepatocita i apoptotička tjelešca), blagu lobularnu upalu najranije vidljivu u zoni 3 jetrenog acinusa, blagu kroničnu portalnu upalu, perisinusoidalnu fibrozu, portalnu fibrozu bez perisinusoidalne ili pericelularne fibroze, Malloryev hijalin, megamitondrije, glikogenirane jezgre hepatocita, lobularne lipogranulome i nakupljanje željeza u hepatocitima (Slika 3) (87). Steatoza je najčešće makrovezikularna i najranije vidljiva u zoni 3 jetrenog acinusa koja je progresijom vidljiva panacinarno, a rezolucijom postaje nejednako raspoređena odnosno nije zonalna. Za razliku od lobularne upale, koja je izraženija i sastoji se od miješanog upalnog infiltrata, portalnu upalu karakterizira mononuklearni infiltrat. Fibroza je kao i steatoza najranije vidljiva u zoni 3 jetrenog acinusa, u perisinusoidalnim prostorima i oko hepatocita, koja s napredovanjem bolesti postaje izraženija, a dodatno se pojavljuje i u portalnim prostorima što rezultira naposljetku premoštavajućom fibrozom i cirozom (Slika 4). Kako fibroza napreduje prema cirozi steatoza i upala nestaju stoga je očekivano najčešći uzrok kriptogene ciroze NAFLD.



**Slika 1.** Uredan nalaz jetre (žučni kanalići, hepatična arteriola, potralna venula, jasno vidljiva lamina limitans (strelice))



**Slika 2.** NAFL (makrovezikularna steatoza, bez nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze)



**Slika 3.** NASH (steatoza, balonirani hepatociti, portalna upala i fibroza)      **Slika 4.** Ciroza jetre

*Patohistološki sustavi bodovanja*

Na temelju patofizioloških obilježja razvijena su do sada tri sustava bodovanja koja se temelje na zbroju bodova dobivenih semikvantitativnim ocjenjivanjem pojedinih histoloških karakteristika. Prvi koji se počeo koristiti u kliničkoj praksi i studijama predstavljen je 1999. godine od strane Brunt i sur. (Tablica 3) kojim se procjenjuje nekroinflamatorna aktivnost i zasebno stadij fibroze (88).

Tablica 3. Sustav bodovanja prema Brunt i sur. (88)

Nekroinflamatorna aktivnost	Steatoza	Baloniranje hepatocita	Lobularna Upala	Portalna Upala
<b>Stupanj 1 (blaga)</b>	1-2	Minimalno	1-2	0-1
<b>Stupanj 2 (umjerena)</b>	2-3	Prisutno	2	1-2
<b>Stupanj 3 (izražena)</b>	2-3	Izraženo	3	1-2

Stadij fibroze
1: perisinusoidalna/ pericelularna fibroza u zoni 3
2: kao 1 uz dodatnu fokalnu ili proširenu portalnu/periportalnu fibrozu
3: premoštavajuća fibroza
4: ciroza

**Steatoza:** 1: <33%, 2: 33-66%, 3: >66%.

**Lobularna upala:** 0: odsutna, 1: <2, 2: 2-4, 3: > 4 žarišta.

**Portalna upala:** 0: odsutna, 1: blaga, 2: umjerena, 3: izražena.



Kasnije, 2005. godine od strane NASH Clinical Research Network (CRN) predstavljen je novi bodovni sustav koji je osmišljen na način da bude nadopuna ranijoj kliničkoj obradi i pomogne kliničarima u postavljanju definitivne dijagnoze (89). Danas se u kliničkoj praksi, a i u studijama, najčešće koristi upravo taj bodovni sustav (Tablica 4) kojim se određuje NAFLD Activity score (NAS) i zasebno stadij fibroze. NAS predstavlja zbroj semikvantitativno ocijenjenih patohistoloških odrednica koje uključuju steatozu, lobularnu upalu i baloniranje hepatocita.

**Tablica 4.** Sustav bodovanja prema NASH CRN (89)

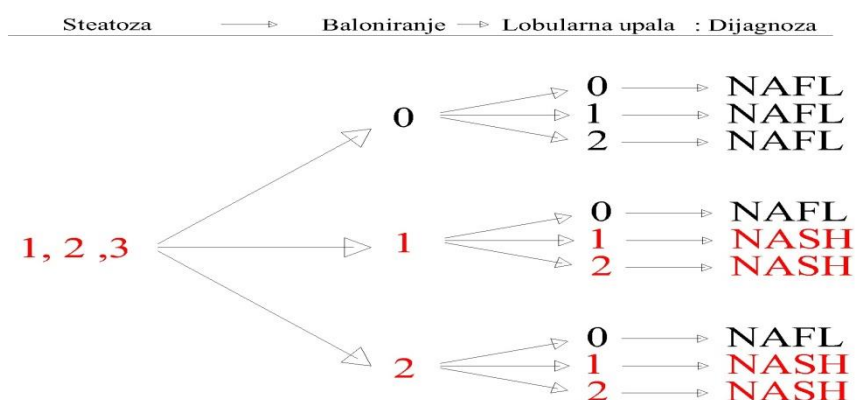
Steatoza	Lobularna upala	Baloniranje hepatocita	NAS: steatoza + lobularna upala + baloniranje hepatocita	Stadij fibroze
0	0	0	<b>1-2: NAFL</b>	0: nema
1	1	1	<b>3-4: graničan nalaz</b>	1a: blaga perisinusoidalna/pericelularna fibroza zone 3
2	2	2	<b>5-8: NASH</b>	1b: umjerena perisinusoidalna/pericelularna fibroza zone 3
3	3			1c: izolirana portalna/periportalna fibroza
				2: perisinusoidalna fibroza zone 3 i portalna/periportalna fibroza
				3: premoštavajuća fibroza
				4: ciroza

**Steatoza:** 0:<5%, 1:5-33%, 2: 34-66%, 3: >66%.  
**Lobularna upala:** 0: odsutna, 1: <2, 2: 2-4, 3: > 4 žarišta.  
**Baloniranje hepatocita:** 0: nema, 1: malo baloniranih hepatocita, 2: mnogo baloniranih hepatocita.

U novije vrijeme sve se više koristi bodovni sustav pod nazivom „SAF“ (Tablica 5) akronim za steatozu (S), upalnu aktivnost (A) i fibrozu (F), koji se pokazao točnijim u identifikaciji NASH-a u odnosu na NAS (90). SAF se razlikuje u odnosu na NAS time što uključuje fibrozu u završnom zbroju, isključuje steatozu iz procjene stupnja upalne aktivnosti i omogućuje dijagnozu NASH-a prema numeričkom zbroju procijenjenom na temelju stupnja steatoze, upalne aktivnosti i fibroze. Navedeni bodovni sustav je predstavljen 2012. godine od strane Bedossa i sur., a temeljen je na nalazima bioptata jetre 600 barijatrijskih bolesnika (90). U Hrvatskoj, navedeni bodovni sustav još uvijek nije ušao u svakodnevnu kliničku praksu, a u većini centara se koristi NAS.

**Tablica 5.** SAF bodovni sustav (90)

<b>S</b> <b>Steatoza</b>	<b>A</b> <b>Aktivnost (lobularna upala + baloniranje hepatocita)</b>		<b>F</b> <b>Fibroza</b>
0: < 5%	0: nema	0: nema	0: nema fibroze
1: 5%-33%	1: 1-2 lobula	1: malo baloniranih stanica	1 a,b,c: perisinusoidalna fibroza
2: 34-66%	2: >2 lobula	2: mnogo baloniranih stanica	2: perisinusoidalna i periportalna fibroza
3: > 66%			3: premoštavajuća fibroza
			4: ciroza



## 1.6. Terapijske mogućnosti u liječenju NAFLD-a

Liječenje i odluka o uvođenju farmakoterapije kod bolesnika s NAFLD-om prvenstveno ovisi o stadiju bolesti implicirajući time važnost točne stratifikacije rizika od razvoja uznapredovale bolesti. Terapijske strategije u svih bolesnika s jedne strane obuhvaćaju promjene životnih navika i liječenje pridruženih sastavnica MS-a, a s druge strane ovisno o stadiju bolesti liječenje same bolesti jetre i jetrenih komplikacija (91). Promjene životnih navika koje podrazumijevaju povećanje fizičke aktivnosti i redukcijsku dijetu, rezultirajući željenim gubitkom na tjelesnoj težini, smatra se ključnim u liječenju NAFLD-a bez obzira na stadij bolesti. Promjene životnih navika vode ka normalizaciji jetrenih enzima, histologije, vrijednosti inzulina u serumu i kvalitete života u bolesnika s NAFLD-om. Optimalna dijeta u svrhu liječenja NAFLD-a još uvijek nije standardizirana. Preporuke su redukcija za 600 Kcal u odnosu na

izračunate dnevne potrebe bolesnika, a sa svrhom gubitka 0,5-1 kg na tjedan dok se ne postigne optimalna težina (93). Brži gubitak na tjelesnoj težini može biti povezan s progresijom osnovne bolesti. Idealno bi bilo da bolesnici izgube >10% od početne tjelesne težine i održe/postignu opseg struka u muškaraca <94 cm, a u žena <80 cm ili BMI <25 kg/m<sup>2</sup>. Regresija patohistoloških promjena ovisi o razmjeru smanjenja težine. Već i minimalan gubitak na tjelesnoj težini reducira steatozu, dok smanjenje težine za ≥7% dodatno dovodi do regresije nekroinflammatorne aktivnosti (92). Meta analiza studija na pretilim bolesnicima koji su nakon barijatrijskih operacija izgubili izrazito na tjelesnoj težini (redukcija 19,11-41,76% od početnog BMI) potvrdila je učinak gubitka na tjelesnoj težini na patohistološke promjene ukazujući na regresiju ili čak rezoluciju steatoze u 91,6%, NASH-a u 81,3% i fibroze u 65% bolesnika s NAFLD-om (94). Savjetovati im se treba izbjegavanje unosa zasićenih masti, jednostavnih ugljikohidrata i zaslađenih pića. ω-3 polinezasićene masne kiseline kao dodatak prehrani pokazale su se efikasnom u vidu redukcije jetrene steatoze, a mediteranska dijeta (bogata mononezasićenim masnim kiselinama) dodatno i u smanjenju inzulinske rezistencije u ne-dijabetičkih bolesnika s NAFLD-om (95). Pokazalo se da su bolesnici s NAFLD-om i prividno zdravi ispitanici s izraženijom steatozom jetre manje fizički aktivni u odnosu na kontrolne skupine (96). Aerobna fizička aktivnost dovodi do poboljšanja inzulinske osjetljivosti, jetrenih enzima i steatoze neovisno o gubitku na tjelesnoj težini (97). Postojeće preporuke su provođenje fizičke aktivnosti 5x tjedno kroz 30 minuta (93). U studiji Promrat i sur. pretili bolesnici s NASH-om, koji su se pridržavali dijete i provodili 200 minuta umjerene fizičke aktivnosti na tjedan u periodu od 48 tjedana, postigli su ukupnu redukciju tjelesne težine za 9,3% te redukciju steatoze i upale na kontrolnoj biopsiji jetre (92). Bolesnici kojima je NASH potvrđen biopsijom, a promjene životnih navika i redukcija tjelesne težine nisu dovele do poboljšanja, potrebno je uvesti farmakoterapiju. Iako su brojni terapijski režimi istraživani samo su se vitamin E i pioglitazon pokazali uspješnim u poboljšanju histološkog nalaza bolesnika. Vitamin E je antioksidans za koji se pokazalo da kod bolesnika s NASH-om, koji nemaju šećernu bolest, do normalizacije jetrenih enzima, redukcije steatoze i nekroinflammatorne aktivnosti uz izostanak djelovanja na stadij fibroze. Rezultati PIVENS studije, s dosad najvećom kohortom ne-dijabetičkih bolesnika s NASH-om, pokazali su da primjena vitamina E kroz 96 tjedana u dozi od 800 IU/dan dovodi do poboljšanja steatohepatitisa u odnosu na placebo (42% vs 19%, p<0.001) (98). Vitamin E nije još istraživan u bolesnika s NASH-om i cirozom jetre i/ili šećernom bolešću te se stoga u smjernicama preporučuje kao farmakoterapija

prvog izbora kod bolesnika s NASH-om potvrđenim biopsijom koji nemaju šećernu bolest. Sveukupno povećanje mortaliteta pri dugotrajnoj dozi većoj od 400 IU/dan te povećan rizik od hemoragijskog moždanog udara i karcinoma prostate limitira upotrebu vitamina E kod određene skupine bolesnika. Iako je više studija i meta analiza ukazalo da primjena pioglitazona značajno smanjuje razinu transaminaza, histološku izraženost steatoze, baloniranja i upale te u manjoj mjeri fibroze jetre u bolesnika s NASH-om, nuspojave kao što su dobivanje na tjelesnoj težini, kongestivno zatajenje srca, karcinom mokraćnog mjehura i osteoporoza limitiraju mu upotrebu (98,99). Međutim, rezultati meta analize koja je uključila 16 390 bolesnika sa šećernom bolešću tip 2 pokazali su da bolesnici liječeni pioglitazonom imaju niži mortalitet, učestalost infarkta miokarda i moždanog inzulta za 18% u odnosu na kontrolnu skupinu (100). Obzirom na navedene rezultate studija današnje preporuke su da se pioglitazon može koristiti u liječenju NASH-a ukoliko promjene životnih navika nisu bile uspješne, ali prije početka terapije potrebno je učiniti ehokardiografiju da se isključi eventualna kardiološka bolest. Inzulinska rezistencija se smatra primarnim događajem u patogenezi NAFLD-a te se stoga intenzivno istraživao učinak metformina kod bolesnika s NAFLD-om. Iako su inicijalne studije pokazale učinak na pad vrijednosti transaminaza kasnije isto nije dokazano, kao i učinak na histologiju jetre (101). Obzirom na visoku prevalenciju NAFLD-a i stoga izrazito veliki interes za razvoj farmakoterapeutika brojni su lijekovi ispitivani i još uvijek se ispituju u studijama na modelima i bolesnicima s NAFLD/NASH-om čiji se rezultati iščekuju. Osim farmakoterapije s primarnim učinkom na histološke značajke jetre u bolesnika s NAFLD/NASH-om bitno je naglasiti da se preporučuje liječiti sve prisutne komponente MS-a.

## **1.7. Kaveole i kaveolini**

Kaveole su 50 do 100 nm invaginacije stanične membrane dobro diferenciranih stanica bogate kolesterolom i sfingolipidima čiji glavni strukturni protein čini kaveolin-1 (cav-1) (102). Dokazane su u više vrsta stanica no predominantna ekspresija je zapažena u adipocitima, mišićnim i endotelnim stanicama. Iako je njena struktura morfološki opisana 1953. godine, funkcija im se još uvijek istražuje. Ove invaginacije u obliku boce sudjeluju u višestrukim procesima uključujući stanični transport, homeostazu masti (kolesterol i masne kiseline),

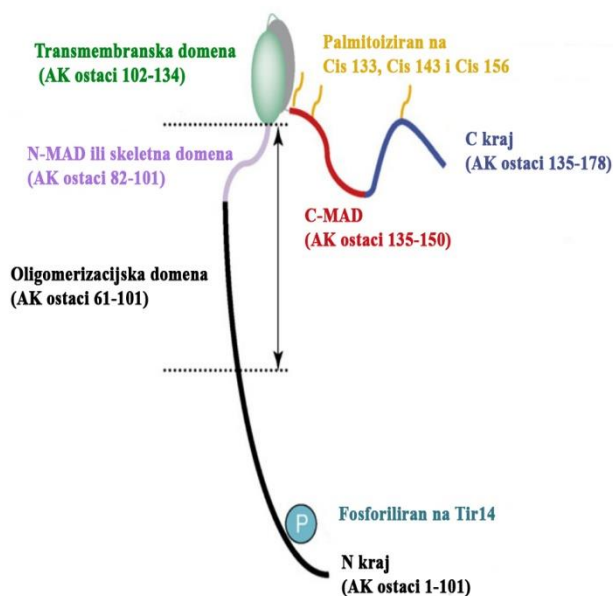
inzulinsku signalizaciju, regulaciju aktivnosti dušikovog oksida, signalizaciju kalcija i srčanu funkciju.

Kaveolin je integralni membranski protein koji se povezuje s unutrašnjim slojem plazmatske membrane čime dolazi do njezina uvijanja kako bi nastala kaveola iz koje će nastati vezikula koja je potrebna za transport ili za prijenos signala. Kaveolini su multiplo acilirani 22-24 kDa proteini integirani u citoplazmatsku stranu stanične membrane, a sadrže intracitoplazmatski C i N terminalni završetak, skeletnu i dugačku hidrofobnu, u obliku pribadače, transmembransku domenu. Kaveolini se prvotno sintetiziraju u membrani endoplazmatskog retikuluma, zatim prenose u Golgijevo tijelo gdje stvaraju homo i hetero oligomerne komplekse koji se endocitozom integriraju u staničnu membranu. Opisani transport kaveolina kroz Golgijevo tijelo u staničnu membranu stimuliran je kolesterolom. Do sada je potvrđena njihova uloga u staničnoj signalizaciji, lipidnoj homeostazi i endocitozi. Kaveolini su obitelj proteina koju čine tri izoforme: kaveolin-1 (cav-1), kaveolin-2 (cav-2), kaveolin-3 (cav-3). Cav-1 je izražen u gotovo svim stanicama, a posebice u adipocitima, fibroblastima, pneumocitima, neuronima, gliji, epitelnim i endotelnim stanicama. Dok su cav-1 i cav-3 predominantno izraženi u staničnoj membrani unutar kaveole, cav-2 je pohranjen u Golgijevom tijelu, a transportira se u staničnu membranu samo kao heterooligomer s cav-1 (103). Cav-3 je izražen isključivo u stanicama muskularne linije gdje je esencijalan za formiranje kaveola, a njegova mutacija rezultira različitim distrofičnim fenotipima. Sva tri kaveolina se ponašaju kao integralni membranski proteini iako je dokazana njihova prisutnost u citosolu i u sekretornom staničnom aparatu. Cav-1 i cav-3 se mogu vezati s vlastitom molekulom i stvarati oligomere, primjerice cav-1 stvara 350 kDa velik kompleks sastavljen od 14-16 monomera cav-1, na način da se C-terminalni završetak cav-1 veže za N- i C-terminalni završetak druge molekule cav-1 (104). Struktura sva tri kaveolina je gotovo ista no ipak male strukturne promjene utječu na njihovu funkciju. Kaveole nastaju oligomerizacijom cav-1 s istovjetnim proteinom i cav-2 te interakcijom s kolesterolom, što ukazuje da je cav-1 esencijalan za stvaranje kaveola. Nedostatak cav-1 uzrokuje izostanak kaveola u mišićnim i nemišićnim stanicama, a nedostatak cav-3 u skeletnom mišićju i miokardu (105,106).

### 1.7.1. Struktura i mehanizam djelovanja cav-1

Cav-1, ranije poznat pod nazivom vezikularni integralni membranski protein (VIP21), je prvi dokazan sastavni protein kaveole (107). Ljudski gen koji kodira cav-1 nalazi se na kromosomu 7q31.1 i povezan je s adipoznim fenotipom.

Intramembranski dio cav-1 sastoji se od kratke transmembranske hidrofobne domene od 32 aminokiseline (AK ostatci 102-134) koja tvori specijalnu pribadači sličnoj omču koja prevenira cav-1 od potpunog ugrađivanja u staničnu membranu. C terminalni kraj je palmitoiziran dok je N kraj na tirozinu fosforiliran - ove dvije posttranslacijske modifikacije omogućuju navedenim krajevima citoplazmatski smještaj. Intramembranski dio nije esencijalan za pripoj membrani već dvije dodatne regije, N-MAD (AK ostaci 82-101) i C-MAD (AK ostaci 135-150), s bočnih strana hidrofobne regije. Skeletna domena ima dvostruku ulogu, sidrište za različite proteine unutar kaveole i istodobno djelujući kao regulatorni element koji inhibira ili stimulira signalnu aktivnost različitih proteina (Slika 5).



**Slika 5.** Struktura kaveolina 1. Preuzeto iz Frühbeck i sur. (108)

Fosforilacija cav-1 na serinskom ostatku (Ser80) omogućuje njegovo vezanje za membranu endoplazmatskog retikuluma i regulira ulazak u sekretorni put, a palmitoilacija na cisteinskom ostatku 133, 143, i 156 omogućuje mu oligomerizaciju. Cav-1 se sintetizira u

endoplazmatskom retikulumu, zatim kao monomer transportira u Golgijevo tijelo i u sekretornom putu prema staničnoj membrani tvori visokomolekularne oligomere. Izlazak cav-1 iz Golgijevo tijela je ubrzan dodavanjem kolesterola. Sposobnost cav-1 da se oligomerizira u visoko molekularne oligomere sastavljene od 14–16 cav-1 je ključni mehanizam za stvaranje kaveole. Uistinu, cav-1 deficijentni miševi pokazuju gubitak kaveola, dok su kaveole prisutne u cav-2 deficijentnim miševim (109). No međutim samo ekspresija cav-1 na staničnoj membrani nije dovoljna za formiranje kaveole već je potrebna i određena količina kolesterola. Interakcija cav-1 s kolesterolom najvjerojatnije je potrebna za reorganizaciju cav-1 oligomera. Kolesterol može regulirati formaciju kaveola i pokazano je da snižen totalni stanični kolesterol korelira sa smanjenom koncentracijom cav-1 proteina. To potvrđuje i činjenica da je razina kolesterola 3-4x viša u stanicama koje pokazuju ekspresiju cav-1 u odnosu na one koje su cav-1 deficijentne (110). Cav-1 sadrži skeletnu domenu koja ima sposobnost vezivanja različitih signalnih proteina kao što je G protein, razni receptori, nerekceptorske tirozin kinaze, eNOS i male GTP-aze (111).

### **1.7.2. Cav-1 i NAFLD**

Nekoliko recentnih *in vitro* i *in vivo* studija ukazalo je na ulogu cav-1 u transportu kolesterola, lipogenezi i lipolizi rezultirajući intenzivnim istraživanjem njegove uloge u aterosklerozi i NAFLD-u (112-114). Eksperimentalno stvoren nedostatak cav-1 u životinjskim modelima, *in vivo* prevenira transcitozu lipoproteina niske gustoće (LDL) u endotelnim stanicama ukazujući na možebitnu ulogu u regulaciji koncentracije LDL-a u plazmi i patogenezi ateroskleroze (115). Uloga cav-1 u lipogenezi potvrđena je u studijama na regenerativnim hepatocitima nakon parcijalne hepatektomije, adipocitima te hepatocitima, *in vitro* i *in vivo*, animalnih modela (116). Tijekom regeneracije cav-1 ima glavnu ulogu u koordinaciji metabolizma masti i povezan je s proliferativnim odgovorom. Cav-1 deficijentni miševi kod kojih je učinjena parcijalna hepatektomija pokazuju sniženu akumulaciju masnih kapljica s posljedičnom smanjenom regeneracijom jetre. U adipocitima inzulinska signalizacija i unos masnih kiselina su regulirani kaveolinom. Cav-1 deficijentni miševi su rezistentni na hranom induciranu pretilost, nemaju mogućnost pohranjivanja triglicerida u adipozno tkivo te su njihovi adipociti manji veličinom i slabije diferencirani (117). Sposobnost cav-1 da pohranjuje

trigliceride u masne kapljice adipocita može reducirati SMK u plazmi i lipotoksičnost u hepatocitima. Povišena koncentracija cav-1 u masnim kapljicama adipocita pozitivno korelira s njihovom veličinom u pretilih miševa i humanim adipocitima (118,119). Studije na HepG2 stanicama su pokazale da pojačana ekspresija cav-1 izrazito povećava apsorpciju oksidiranih LDL-a, a smanjena ekspresija inhibira unos masnih kiselina dugih lanaca (120,121). Kolesterol i LDL, u jetri životinjskih modela i ljudi te u C3A stanicama sličnim ljudskim hepatocitima, dovode do redistribucije LDL receptora u stanične strukture koje sadrže cav-1 odnosno kaveole (122). Uloga cav-1 u metabolizmu lipida vidljiva je indirektno utjecajem na promjene u lipidogramu eksperimentalnih modela. Iako su na životinjskom modelu s pojačanom ekspresijom cav-1 izmjerene povišene koncentracije cirkulirajućeg HDL-kolesterola i dodatno je pokazano da cav-1 inhibira unos kolesterola iz HDL-a u hepatocite, cav-1 deficijentni miševi su također imali povišene vrijednosti HDL-a i dodatno triglicerida u plazmi te snižene vrijednosti VLDL-a u usporedbi s kontrolama (115,123).

Iako uloga cav-1 u patogenezi bolesnika s NAFLD-om nije do sada istraživana relevantne eksperimentalne studije ukazuju na tu mogućnost. Masne kapljice građene su od neutralne lipidne srži okružene jednostrukom membranom od fosfolipida i kolesterola na koju su vezani površinski proteini, između ostalog cav-1. Temeljem dosadašnjih studija predloženo je da ukoliko su hepatociti stimulirani kolesterolom dolazi do translokacije cav-1 iz Golgijevog tijela u plazmatsku membranu, a ukoliko su prepunjeni lipidima, posebice sa SMK, cav-1 se translocira s plazmatske membrane u lipidne kapljice (199,124-128). U istim studijama imunoreaktivnost na cav-1 pozitivno je korelirala sa stupnjem jetrene steatoze. Qiu i sur. su pokazali da je razina mRNA i proteina cav-1 povećana u mišjem NAFLD modelu, a Mastrodonato i sur. da steatotični hepatociti imaju povišenu ekspresiju cav-1 (124,125). Dok je u hepatocitima kontrolne skupine pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 bila vidljiva na staničnoj membrani hepatocita, u steatotičnim hepatocitima je viđena u citoplazmi, vezikulama te u većoj mjeri u mitohondrijima, i lipidnim kapljicama. Autori su zaključili da pojačana intracelularna ekspresija cav-1 u mitohondrijima hepatocita predstavlja kompenzacijski odgovor na promjenu ionskog i molekularnog transporta preko unutarnje membrane mitohondrija, inducirane oksidativnim stresom u jetri. Navedene mitohondrijske promjene se smatraju indirektnim znakom progresije steatoze u agresivniji oblik kao što je steatohepatitis i fibroza/ciroza. Više studija govori u prilog da deficijencija cav-1 rezultira akumulacijom slobodnog kolesterola u mitohondrijskoj membrani



uzrokujući mitohondrijsku disfunkciju i moguću staničnu smrt (129-133). U odsustvu cav-1 slobodni kolesterol se akumulira u mitohondrijalnoj membrani, zgušnjavajući membranu reducira učinkovitost respiracijskog lanca i intrinzičku antioksidativnu obranu. Nakon aktivacije oksidativne fosforilacije, navedene promjene dovode do nakupljanja ROS-a i smrti hepatocita (130). Chen i sur. su pokazali da pojačana ekspresija cav-1 štiti od povišene oksidacije masnih kiselina, poboljšava funkciju mitohondrijskog respiracijskog lanca i štiti od apoptoze (134). Različite dijete i metabolička stanja koja predisponiraju ili inhibiraju jetrenu steatozu mogu utjecati na promjenu intracelularne ekspresije cav-1 u hepatocitima kao i inzulinskoj signalizaciji budući da je inzulinski receptor inkorporiran u kaveolu. Interakcija s proupalnim citokinima također ukazuje na možebitnu ulogu u NASH-u. Citokini, kao što su TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , povećavaju ekspresiju cav-1 mRNA u hepatocitima, a određeni citokinski receptori (TGF- $\beta$  i dr.) su lokalizirani u kaveoli (135). Pokazalo se da pretili bolesnici bez obzira na prisutnost šećerne bolesti imaju povišenu ekspresiju cav-1 u visceralnom i supkutanom adipoznom tkivu u odnosu na bolesnike s normalnom težinom sugerirajući njegovu ulogu u adipozitetu i šećernoj bolesti u ljudi. U istoj studiji nađena je signifikantna korelacija između ekspresije cav-1 u visceralnom adipoznom tkivu i cirkulirajućih upalnih markera implicirajući ulogu cav-1 u kroničnoj upalnoj aktivnosti uslijed pretilosti (136).

## **1.8. Struktura i mehanizam djelovanja TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  je polipeptid, sastavljen od 112 AA, kojeg kodira gen na dugom kraku 19 kromosoma. Uloga TGF- $\beta$  je zabilježena u embriogenezi, staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, apoptozi, adheziji i invaziji. Iako postoji pet TGF- $\beta$  izoformi samo su tri prisutne u ljudi, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3, koje se sintetiziraju u obliku velikih latentnih inaktivnih kompleksa. TGF- $\beta$ 1 je najizraženija izoforma u ljudi, a prisutan je u dominantno u jetri gdje je sintetiziran od strane upalnih, stielatnih i epitelnih stanica (137). TGF- $\beta$ 2 se sintetizira u keratinocitima i stanicama glioma, a TGF- $\beta$ 3 u plućnom parenhimu i embrionalnom srcu. TGF- $\beta$ 1 je multifunkcionalan citokin koji sudjeluje u fetalnom razvoju, kontroli staničnog rasta i diferencijaciji, supresiji upalnog odgovora, angiogenezi, tumorogenezi, fibrogenezi i stvaranju ožiljka. Ovisno o koncentraciji ispoljava svoje učinke; u niskim koncentracijama inhibira rast

glatkih mišićnih stanica, fibroblasta i hondrocita, a u visokim koncentracijama potiče njihov rast. Također, inducira apoptozu jetrenih stanica *in vivo* i *in vitro*, inhibira jetrenu regeneraciju u animalnim modelima i rast hepatocita u zdravoj jetri (138,139). U normalnoj jetri povišena ekspresija TGF- $\beta$  mRNA je nađena u Kupfferovim i umjereno u stelatnim, a na modelu jetrene fibroze dominantno u Kupfferovim, stelatnim i nešto niža u sinusoidalnim stanicama (140). U stanjima ozljede jetre Kupfferove i sinusoidalne stanice su aktivirane i oslobađaju različite citokine i kemokine, između ostalog i TGF- $\beta$ , rezultirajući aktivacijom i proliferacijom jetrenih stelatnih stanica. TGF- $\beta$  ostvaruje svoju aktivnost putem dva neovisna signalna puta. U klasičnom signalizacijskom putu TGF- $\beta$  fosforilacijom aktivira receptor tip II koji zatim stvara heterodimer s TGF- $\beta$  receptorom tip I koji biva transfosforiliran te u takvom obliku potiče fosforilaciju Smad proteina (Smad2 i Smad3), njihovu translokaciju u jezgru gdje tvore komplekse sa Smad4, vežu se za DNA, udružuju s drugim transkripcijskim faktorima i induciraju ekspresiju gena. Istovremeno je inhibitorni Smad protein (Smad7) transkripcijski induciran putem TGF- $\beta$  tvoreći negativnu povratnu inhibiciju i prevenirajući nekontroliranu TGF- $\beta$  signalizaciju. Drugi, alternativni, ne-Smad signalni put uključuje aktivaciju mitogen-aktivirajuću protein kinazu ERK, p38, JNK i fosfatidilinozitol-3-kinaza(PI3K)/AKT signalnih puteva. Stoga je njegova signalizacija rezultat dinamičke kombinacije dva navedena puta. TGF- $\beta$  ostvaruje svoje profibrogeno djelovanje daljnjim poticanjem vlastite sinteze kao i sinteze čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF, engl. *Connective Tissue Growth Factor*) u hepatocitima te stelatnim stanicama, kolagena tip I, inhibicijom sinteze DNA u hepatocitima uzrokujući time prestanak proliferacije regenerativnih stanica, inhibicijom ekspresije metaloproteinaza, negativnom regulacijom upale prevenirajući time upalne stanice da odstrane toksični debris, aktivacijom i stimulacijom jetrenih stelatnih stanica, poticanjem apoptoze aktivacijom PI3K-AKT puta i regulacijom sinteze fibronektina u jetrenim matičnim stanicama koje su važne u jetrenoj fibrozi posredovanoj cAMP i Smad signalnim putem (141). U cav-1 deficijentnim hepatocitima, TGF- $\beta$  signalizacija posredovana Smad proteinima je povišena, a ekspresija antiapoptičkih BCL2 i BCL-xl je snižena što rezultira apoptozom. Iako je jedna studija na jetrenim stanicama dovela do zaključka da je ekspresija TGF- $\beta$ 1 gena povišena u hepatocitima nakon parcijalne hepatektomije druge studije koje su uspoređivale zdravi parenhim jetre i fibroznu jetru u ljudi i animalnim modelima nisu to potvrdile. Trenutno prihvaćeno mišljenje među znanstvenicima i kliničarima je

da hepatociti ne sintetiziraju već apsorbiraju i pohranjuju latentni oblik TGF- $\beta$  koji u slučaju ozljede hepatocita postaje aktivan i ostvaruje svoje funkcije (142).

### 1.8.1. TGF- $\beta$ 1 i NAFLD

Eksperimentalni modeli jetrene fibroze karakterizirani su povećanom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 (143). U studiji na animalnom modelu s NASH-om povišena ekspresija TGF- $\beta$ 1 je opisana već u ranoj fazi progresivnog fibroznog steatohepatitisa (144). Većina humanih studija pokazala je povišenu razinu TGF- $\beta$ 1 u plazmi i jetri kod bolesnika s NASH-om i fibrozom. U studiji na 105 bolesnika s NAFLD-om vrijednosti TGF- $\beta$ 1 u plazmi su bile značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu, posebice u progresivnijim oblicima bolesti, a pozitivno su korelirale s razinom inzulina i homeostatskim modelom procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR, engl. *Homeostasis Model Assessment*) (145). Kod 55 bolesnika s NAFLD-om i različitim stadijima fibroze istraživani su prediktori fibroze. TGF- $\beta$ 1 se pokazao potencijalnim prediktorom fibroze (osjetljivost 100% za 1. i 2. stadij te 97,7% za 3. stadij fibroze, a specifičnost 94,4% za 1. stadij, 93,9% za 2. stadij te 100% za 3. stadij fibroze) (146). Hasegawa i sur. našli su povišene vrijednosti TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s NASH-om u usporedbi s NAFL-om sugerirajući time da bi serumska koncentracija TGF- $\beta$ 1 mogla identificirati bolesnike s NASH-om unutar skupine bolesnika s NAFLD-om (147). No međutim, u studiji na 84 dijabetičara s biopsijom dokazanim NAFLD-om, bolesnici s uznapredovalom fibrozom imali su niže vrijednosti TGF- $\beta$ 1 (170 vs 180 pg/mL;  $p=0,026$ ) u odnosu na one bez ili s blagom fibrozom (148). Kod morbidno pretilih bolesnika koji su godinu dana nakon barijatrijskog liječenja izgubili  $29\pm 5\%$  od inicijalne težine došlo je do sniženja markera fibroze i upale jetre među kojima i TGF- $\beta$ 1 (149). Tarantino i sur. na uzorku od 123 bolesnika s NAFLD-om nisu potvrdili vrijednost TGF- $\beta$ 1 u plazmi kao mogući prediktor NASH-a (150). Koncentracije TGF- $\beta$ 1 su bile povišene kod bolesnika s NAFL-om i NASH-om (129,1 (45,4) vs 116,8 (42,2) ng/mL,  $p=0,200$ ) ne samo u odnosu na kontrole već i na bolesnike s hepatitis C infekcijom (87,5 (39,5) ng/mL,  $p<0.001$ ). Budući da nisu našli korelaciju između povišenih vrijednosti ALT-a i TGF- $\beta$ 1 u bolesnika s NASH-om i kroničnom hepatitis C infekcijom sugerirali su da je TGF- $\beta$ 1 bolji prediktor apoptoze od upalne aktivnosti u bolesnika

s NAFLD-om. Autori su također zaključili da je TGF- $\beta$ 1 bolji marker aktivacije jetrenih stelatnih stanica u odnosu na stadij fibroze jetre te da je pretkazatelj fibroze koja je prisutna no nije vidljiva još na patohistološkom preparatu odnosno biti će vidljiva za određeni vremenski period. Pokazalo se da morbidno pretili bolesnici s NAFLD-om i nasljeđenim polimorfizmom za angiotenzinogen i TGF- $\beta$ 1 imaju značajnije češće uznapredovalu fibrozu dok između pojedinačnih polimorfizama i fibroze takva korelacija nije nađena (151).

## 2. HIPOTEZA

Rezultati eksperimentalnih istraživanja ukazali su na ulogu kaveolina-1 u mehanizmima koji koordiniraju metabolizam masti u jetri te da je njegova ekspresija povišena, posebice u zoni 3 jetrenog acinusa, u hepatocitima animalnih NAFLD modela.

Raznim tehnikama mjerenja pokazalo se da su vrijednosti TGF- $\beta$ 1 povišene u bolesnicima/modelima s NAFLD-om, s kontradiktornim rezultatima, ali prevagom u mišljenjima da je marker fibroze i NASH-a.

Na temelju navedenih opažanja hipoteza ovog istraživanja glasi: ekspresija kaveolina-1 i TGF- $\beta$ 1 je povećana, a njihova distribucija promijenjena u hepatocitima bolesnika s metaboličkim sindromom, te koreliraju s progresijom bolesti.

## 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### 3.1. Opći cilj

Opći cilj istraživanja je bio istražiti povezanost ekspresije i distribucije cav-1 i TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om s histološkom slikom, neinvazivnim biokemijskim testovima i slikovnim metodama za procjenu uznapredovalosti NAFLD-a, kao i s pojedinačnim čimbenicima rizika, odnosno sastavnicama metaboličkog sindroma, a radi boljeg upoznavanja patofiziologije i prirodnog tijeka NAFLD-a te mogućeg unapređenja dijagnostike ovog važnog kliničkog entiteta.

### 3.2. Specifični ciljevi

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. Odrediti ekspresiju i distribuciju cav-1 i TGF- $\beta$  unutar hepatocita na uzorcima dobivenim biopsijom jetre kod bolesnika s dijagnozom NAFLD-a te je korelirati s histološkom slikom NAFLD-a (aktivnost i stadij bolesti).
2. Usporediti ekspresiju i distribuciju cav-1 i TGF- $\beta$  unutar hepatocita kod bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika.
3. Ispitati povezanost ekspresije cav-1 i TGF- $\beta$  s inzulinskom rezistencijom, odnosno pojedinim sastavnicama metaboličkog sindroma.
4. Istražiti povezanost ekspresije cav-1 i TGF- $\beta$  te histološke slike NAFLD-a s neinvazivnim pokazateljima jetrene lezije, biokemijskim testovima i slikovnim metodama, odnosno UZV-om abdomena.

## 4. BOLESNICI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U prospektivno istraživanje koje je provedeno od rujna 2008. godine do rujna 2014. godine na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, uključeno je 66 ispitanika. Od ukupnog broja muškog spola je bilo 44 (66,7%), a ženskog spola 22 (33,3%) ispitanika, s prosječnom dobi  $45,2 \pm 10,3$  godina, u rasponu od 23 do 64 godine. Radi se o ispitanicima koji su inicijalno pregledani na Poliklinici Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC „Sestre milosrdnice“ zbog kliničke slike, laboratorijskih i/ili ultrazvučnih nalaza te čimbenika rizika koji upućuju na NAFLD. Uzeta im je detaljna anamneza, uključujući dosadašnje bolesti i navike (podaci o konzumaciji alkohola, uzimanju bilo kakvih lijekova i ljekovitih (biljnih) pripravaka, prehranbenim navikama, provođenju tjelesne aktivnosti) i fizikalni status koji je uključivao podatke o vrijednostima krvnog tlaka, tjelesnoj visini i težini, te opsegu struka i bedara u horizontalnom položaju. BMI je izračunat prema standardnoj formuli  $\text{masa (kg)} / (\text{visina (m)})^2$ . Bolesnicima je učinjena standardna laboratorijska obrada kojom je procijenjena težina jetrene lezije i utvrđeno postojanje sastavnica MS-a. Obrada je uključivala AST, ALT, GGT, alkalna fosfataza (AF), bilirubin, kompletna krvna slika, protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, fibrinogen, C-reaktivni protein, sedimentacija eritrocita, serumski kalij, natrij, klor i kalcij, kreatin-kinaza, laktat dehidrogenaza (LDH), urea, kreatinin, glukoza, razina glikoziliranog hemoglobina (HbA1c), test opterećenja glukozom (OGTT), lipidogram, apolipoprotein A i B, markeri virusnih hepatitisa (serologija na viruse hepatitisa A, B i C, Epstein-Barr virus i citomegalovirus), serumsko željezo i saturacija transferina, feritin, ceruloplazmin, bakar u serumu i 24-h urinu, alfa1-antitripsin u serumu, antinuklearna antitijela, antitijela na glatku muskulaturu, jetra-bubreg mikrosomalna antitijela, antimitohondrijalna antitijela, antineutrofilna citoplazmatska antitijela, antitijela na tkivnu transglutaminazu, ukupni imunoglobulin A, G i M, trijodtironin, tirozin, tiroid stimulirajući hormon, elektroforeza serumskih proteina. Za određivanje prisutnosti pojedinih sastavnica MS-a koristili su se kriteriji

prema IDF-u koji su opisani u Tablici 1. Svim bolesnicima je učinjen UZV abdomena (Siemens Sonoline Antares), a bodovnim sustavom predstavljenim u studiji Hamaguchi i sur. određivana je prisutnost NAFLD-a (82). Potom je bolesnicima s postavljenom sumnjom na NAFLD učinjena biopsija jetre u bolničkim uvjetima i uključeni su samo oni bolesnici kojima je histološki potvrđen NAFLD.

Kontrolnu skupinu činio je arhivski materijal jetara Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ dobiven tijekom resekcije jetre radi bolesti koja nije difuzna lezija jetre, a kod kojih je isključena prisutnost MS-a i anamnestički potus. Svi bolesnici su potpisali suglasnost o sudjelovanju u istraživanju i informirani pristanak. Od ukupno 15 ispitanika u kontrolnoj skupini 10 (66,7%) je bilo muškog spola i 5 (33,3%) ženskog spola, s prosječnom dobi  $43,2 \pm 9,7$  godina, u rasponu od 22 do 62 godine.

U istraživanje su uključeni samo oni bolesnici koji su ispunjavali sljedeće uvjete:

1. bolesnici koji su dobrovoljno uključeni u istraživanje te su potpisali informirani pristanak i suglasnost
2. bolesnici kojima je na temelju anamneze, fizikalnog statusa, laboratorijskih nalaza, ultrazvučnog pregleda i patohistološkog nalaza potvrđen NAFLD
3. bolesnici za koje postoje odgovarajući podaci i zadovoljavajući patohistološki nalaz jetre.



## 4.2. Metode

Svim bolesnicima uključenim u istraživanje učinjena je biopsija jetre interkostalnim putem, a tek nakon preciznog pojašnjenja načina izvođenja, rizika metode, mogućih komplikacija i potpisanog pismenog informiranog pristanka. Biopsija jetre provedena je u bolničkim uvjetima radi nadzora nad bolesnicima i pravovremenog otkrivanja eventualnih komplikacija (bol i upala na mjestu uboda iglom, krvarenje i oštećenje okolnih organa iglom). Zadovoljavajuća duljina jetrenog cilindra bila je 20-25 mm uz nalaz ne manje od 11 kompletnih portalnih prostora (potrebna je zahvaćenost kompletne cirkumferencije portalnog prostora s nalazom najmanje dvije od maksimalno tri strukture koje se mogu naći u portalnom prostoru). Tijekom hospitalizacije ponovljene su laboratorijske pretrage koje su uključivale kompletnu krvnu sliku, AST, ALT, GGT, bilirubin, AF i od slikovnih metoda UZV abdomena (Siemens Sonoline Antares).

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju materijala (tkiva) u 10% puferiranom formalinu koji se nakon procesuiranja tkiva uklapao u parafinske blokove te rezao na debljinu rezova od 5 $\mu$ m, deparafinirao i bojio standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Za imunohistokemijsku analizu korišteno je primarno protutijelo na cav-1 (ABIN371913, razrjeđenje 1:50, Schloss-Rahe-Str. Aachen, Germany) i TGF- $\beta$  (ab66043, razrjeđenje 1:50, Abcam, Cambridge, UK).

Morfološka analiza kojom je postavljena dijagnoza NAFLD-a i određen stadij bolesti uključivala je patohistološke kriterije prema NASH CRN i bodovnom sustavu predstavljenim od strane Brunta i sur. koji su opisani u Tablici 3 i 4.

Imunohistokemijska analiza protutijela vodila se LSAB metodom kao vizualizacijski sistem na Dako TechMate TM Horizon (Dako, Copenhagen, Danska) automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza MSIP protokola za cav-1 i TGF- $\beta$ . Pozitivan test za cav-1 bio je pločasti karcinom pluća, dok je za TGF- $\beta$  bilo tkivo posteljice. U negativnoj kontroli primarno je protutijelo zamijenjeno izotipskim imunoglobulinom.

Obzirom da do sada nisu provedena istraživanja o ekspresiji i distribuciji cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om, ekspresija je procijenjena prema rezultatima studije Mastrodonato i sur. koja je provedena na animalnom modelu (125).

Ekspresija cav-1 u hepatocitima određivana je u dvije kategorije:

0: smanjena ekspresija: pozitivna imunohistokemijska reakcija vidljiva na staničnoj membrani hepatocita;

1: povišena ekspresija: pozitivna imunohistokemijska reakcija vidljiva u citoplazmi hepatocita.

Distribucija cav-1 u hepatocitima određivana je u dvije kategorije:

0: nepromijenjena distribucija – pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u zoni 3 jetrenog acinusa;

1: promijenjena distribucija - imunohistokemijska reakcija na cav-1 periportalno i translobularno.

Imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  u hepatocitima određivana je semikvantitativno prema podjeli koju su opisali Gomaa i sur. na bolesnicima s hepatitis C infekcijom (152).

Intenzitet reakcije (bojenja) označen je kao:

0: odsutna citoplazmatska reakcija;

1: slabo izražena citoplazmatska reakcija;

2: umjereno izražena citoplazmatska reakcija;

3: jako izražena citoplazmatska reakcija.

Postotak imunoreaktivnih stanica određen je kao:

1: za reakciju u <25% stanica;

2: za reakciju u 25% do 50% stanica;

3: za reakciju u >50% stanica.

Konačno je ekspresija TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD određivana u dvije kategorije ovisno o zbroju intenziteta reakcije (bojenja) i postotka imunoreaktivnih stanica:

Zbroj 1-3: smanjena ekspresija;

Zbroj 4-6: povišena ekspresija.

Distribucija TGF- $\beta$  u hepatocitima određivana je u dvije kategorije:

0: nepromijenjena distribucija - imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  u zoni 3 jetrenog acinusa;

1: promijenjena distribucija - imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  periportalno i translobularno.

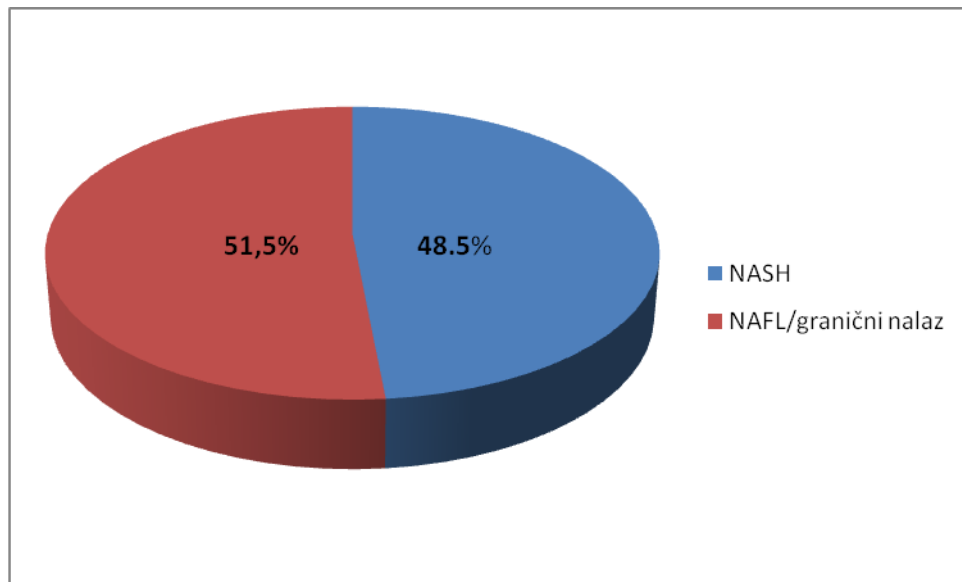
### 4.3. Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički. Smirnov-Kolmogorovljevim testom je analizirana raspodjela podataka te su shodno dobivenim rezultatima primijenjeni odgovarajući neparametrijski testovi. Razlike između ispitanih skupina u kategorijskim varijablama ispitivane su  $\chi^2$  testom, dok su razlike u kvantitativnim varijablama analizirane Mann-Whitney U testom. Izračunati su odgovarajući koeficijenti korelacije između odabranih kliničkih parametara i razine izraženosti cav-1 i TGF- $\beta$ . Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatraju se značajnima. U istraživanju se koristila programska podrška StatSoft, Inc. (2008). STATISTICA (data analysis software system), version 10.0 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Kliničko-demografske i patohistološke značajke ispitivane skupine bolesnika s NAFLD-om

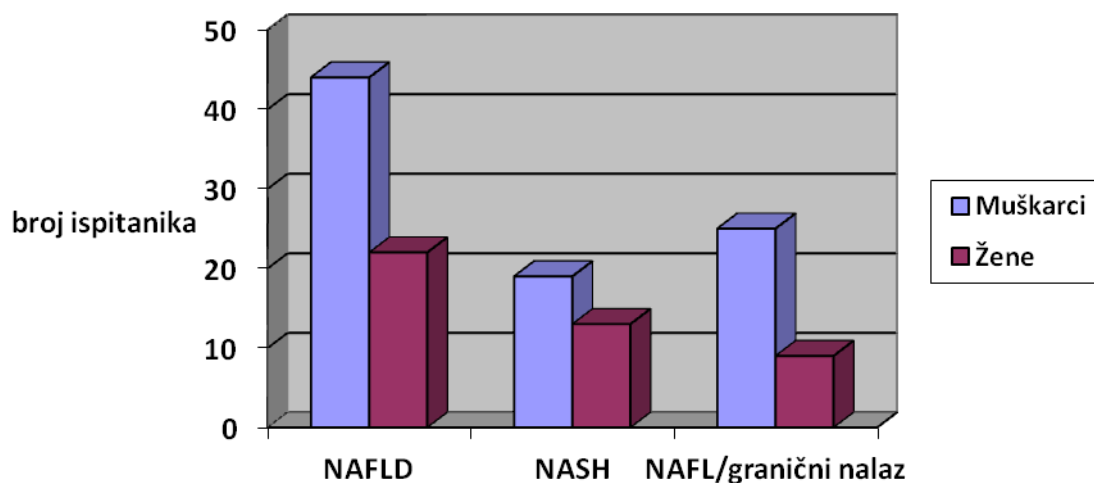
U prospektivno istraživanje uključeno je 66 bolesnika kojima je biopsijom dokazan NAFLD. Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine obzirom na stadij bolesti koji je procijenjen na temelju patohistološkog nalaza bodovanom prema NAS-u; skupina s definitivnim NASH-om koja se odnosi na bolesnike s NAS zbrojem  $\geq 5$  i ostali bolesnici s NAFLD-om kojim su obuhvaćeni NAFL i granični nalazi odnosno NAS $<5$  (89). Ukupno je 32 (48,5%) bolesnika zadovoljilo patohistološke kriterije za dijagnozu NASH-a i 34 (51,5%) za NAFL/granični nalaz (Slika 6).



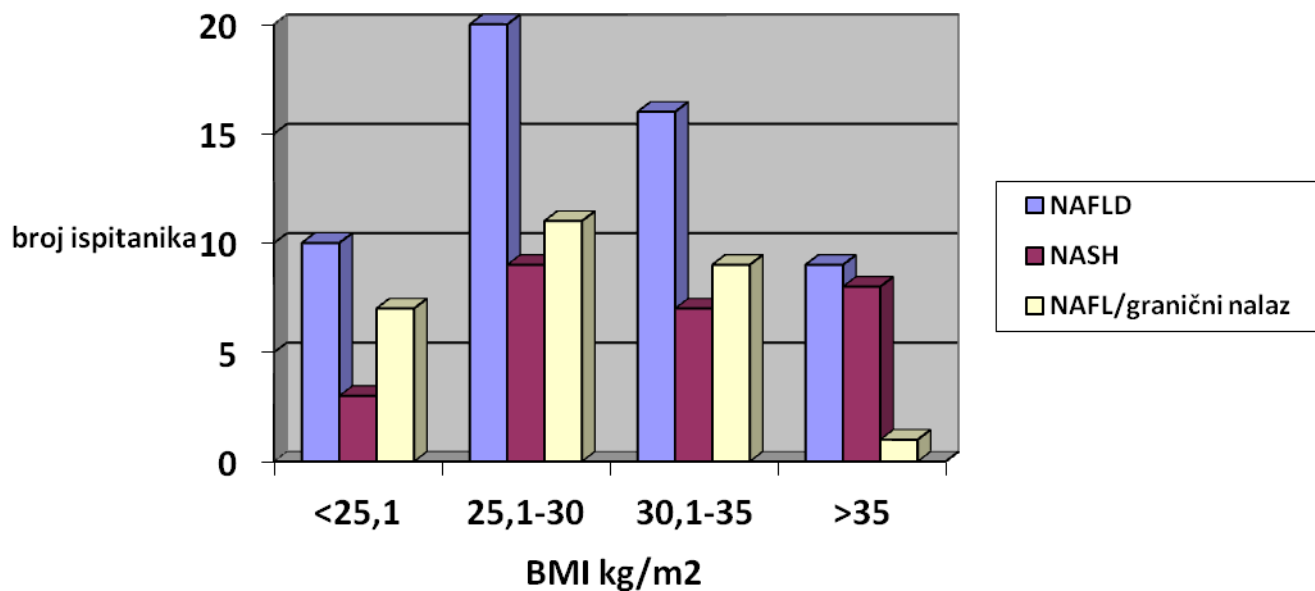
Slika 6. Raspodjela ispitanika unutar skupine s NAFLD-om prema stadiju bolesti koji je određen na temelju patohistološkog nalaza.

### 5.1.1. Demografske karakteristike bolesnika s NAFLD-om

Osnovni demografski podaci ispitivane skupine kao i podskupina prema patohistološkim nalazima prikazani su u Tablici 6. Ispitivana skupina bolesnika s NAFLD-om, ali ujedno i obje podskupine, bile su dominantno muškog spola (NAFLD 66,7%, NASH 59,4%, NAFL/granični nalaz 73,5%) (Slika 7) i srednje životne dobi s medijanom od 44 godine (25.-75. percentila 37-54 godina) (Tablica 6). Ispitivana skupina bolesnika bila je očekivano prekomjerne tjelesne težine čemu u prilog govori iznad prosječna srednja vrijednost struka s medijanom 98 cm (25.-75. percentila 91-111 cm). Najveći udio bolesnika imao je BMI između 25,1 i 30 kg/m<sup>2</sup> (36,4%) (Slika 8) s medijanom 29,5 kg/m<sup>2</sup> (25.-75. percentila 26,6-33,9 kg/m<sup>2</sup>) kod bolesnika s NAFLD-om, nešto viši u bolesnika s NASH-om (30,5 kg/m<sup>2</sup>, 25.-75. percentila 27,8-35,1 kg/m<sup>2</sup>) te nešto niži (28,8 kg/m<sup>2</sup>, 25.-75. percentila 25,5-33,4 kg/m<sup>2</sup>) kod bolesnika koji nemaju definitivni NASH.



Slika 7. Raspodjela po spolu ispitivane skupine s NAFLD-om i njenih podskupina podijeljenim prema NAS-u.



Slika 8. Raspodjela ispitivane skupine bolesnika s NAFLD-om i njenih podskupina obzirom na BMI ispitanika.

Tablica 6. Demografski podaci o skupini bolesnika s NAFLD-om i njenim podskupinama podjeljenim prema NAS-u.

		NAFLD N=66	NASH N=32	NAFL/granični nalaz N=34
Dob	Raspon	23,0 64,0	23,0 64,0	28,0 59,0
	Srednja vrijednost ± SD	45,2 ± 10,3	47,2 ± 11,5	43,2 ± 8,6
	Medijan (25. – 75. percentila)	44,0 (37,0-54,0)	49,0 (38,0-57,5)	44,0 (36,0-50,0)
BMI	Raspon	20,4 43,8	22,9 43,8	20,4 38,0
	Srednja vrijednost ± SD	30,1 ± 5,0	31,5 ± 5,4	28,8 ± 4,3
	Medijan (25. – 75. percentila)	29,5 (26,6-33,9)	30,5 (27,8-35,1)	28,8 (25,5-33,4)
Opseg struka u cm	Raspon	73,0 121,0	90,0 121,0	73,0 111,0
	Srednja vrijednost ± SD	101,6 ± 13,7	104,7 ± 12,4	96,3 ± 15,1
	Medijan (25. – 75. percentila)	98,0 (91,0-111,0)	99,0 (99,5-120,0)	97,0 (86,-111,0)
Opseg bedra u cm	Raspon	43,0 61,0	44,0 58,0	43,0 61,0
	Srednja vrijednost ± SD	51,6 ± 5,5	51,2 ± 4,6	52,4 ± 7,0
	Medijan (25. – 75. percentila)	52,0 (46,0-55,0)	52,5 (46,0-54,0)	52,0 (46,0-61,0)

## 5.1.2. Laboratorijske karakteristike bolesnika s NAFLD-om

Ispitivane laboratorijske karakteristike u skupini bolesnika s NAFLD-om i njenim podskupinama podijeljenim prema NAS-u navedene su u Tablici 7.

Tablica 7. Laboratorijske odrednice skupine bolesnika s NAFLD-om te njenih podskupina podijeljenim na temelju patohistološkog nalaza odnosno NAS-a.

		NAFLD N=66	NASH N=32	NAFL/granični nalaz N=34
<b>Glukoza</b>	Raspon	3,7 20,0	4,4 20,0	3,7 8,5
	Srednja vrijednost ± SD	6,8 ± 3,0	8,0 ± 3,8	5,6 ± 1,1
	Medijan (25. – 75. percentila)	5,8 (5,2 – 6,8)	6,5 (5,7 – 9,8)	5,6 (5,0 - 6,3)
<b>Kolesterol ukupni</b>	Raspon	3,6 11,9	3,7 11,9	3,6 7,9
	Srednja vrijednost ± SD	6,0 ± 1,3	6,2 ± 1,6	5,8 ± 1,0
	Medijan (25. – 75. percentila)	6,0 (5,1 - 6,6)	6,0 (5,3 - 6,8)	5,9 (5,0 - 6,6)
<b>LDL</b>	Raspon	1,6 7,9	2,0 7,9	1,6 5,4
	Srednja vrijednost ± SD	3,9 ± 1,1	4,1 ± 1,2	3,8 ± 0,9
	Medijan (25. – 75. percentila)	3,9 (3,2 - 4,6)	4,1 (3,4 - 4,8)	3,8 (3,1 - 4,5)
<b>HDL</b>	Raspon	0,8 2,7	0,9 2,3	0,8 2,7
	Srednja vrijednost ± SD	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,5
	Medijan (25. – 75. percentila)	1,3 (1,1 - 1,5)	1,3 (1,1 - 1,5)	1,3 (1,1 - 1,6)
<b>Trigliceridi</b>	Raspon	0,5 7,7	0,5 7,7	0,6 4,8
	Srednja vrijednost ± SD	2,2 ± 1,3	2,6 ± 1,4	1,9 ± 1,0
	Medijan (25. – 75. percentila)	1,8 (1,5 - 2,5)	2,4 (1,6 - 2,9)	1,7 (1,1 - 2,1)
<b>AST</b>	Raspon	16,0 94,0	23,0 94,0	16,0 74,0
	Srednja vrijednost ± SD	41,3 ± 18,7	46,7 ± 21,1	36,4 ± 14,9
	Medijan (25. – 75. percentila)	34,0 (28,-51,0)	38,5 (32,0 - 65,0)	30,0 (26,0 - 46,0)
<b>ALT</b>	Raspon	26,0 191,0	28,0 191,0	26,0 137,0
	Srednja vrijednost ± SD	75,0 ± 39,8	83,1 ± 45,7	67,9 ± 32,8
	Medijan (25. – 75. percentila)	60,5 (42,0 – 107,0)	72,0 (51,0 – 124,0)	58,5 (40,0 – 93,0)

<b>GGT</b>	Raspon	17,0 1007,0	29,0 1007,0	17,0 399,0
	Srednja vrijednost ± SD	148,6 ± 170,1	159,7 ± 225,0	139,0 ± 105,8
	Medijan (25. – 75. percentila)	89,0 (63,0 – 153,0)	89,0 (57,0 -124,0)	87,5 (77,0 – 194,0)
<b>AF</b>	Raspon	45,0 211,0	51,0 154,0	45,0 211,0
	Srednja vrijednost ± SD	88,5 ± 34,4	85,9 ± 32,6	90,6 ± 36,1
	Medijan (25. – 75. percentila)	79,0 (63,0 - 108,0)	74,0 (61,0 – 110,0)	79,5 (69,0 – 102,0)
<b>Bilirubin</b>	Raspon	5,0 38,4	5,0 27,0	6,0 38,4
	Srednja vrijednost ± SD	13,8 ± 6,9	10,7 ± 4,3	16,7 ± 7,6
	Medijan (25. – 75. percentila)	12,6 (8,8 – 16,2)	9,4 (8,0 – 13,1)	14,8 (11,6 – 20,0)
<b>LDH</b>	Raspon	139,0 279,0	145,0 279,0	139,0 272,0
	Srednja vrijednost ± SD	188,2 ± 38,4	196,8 ± 37,8	176,3 ± 36,9
	Medijan (25. – 75. percentila)	183,0(157,0–202,0)	191,0(172,0–219,0)	175,5(146,0–186,0)
<b>Željezo</b>	Raspon	2,0 40,0	11,0 35,0	2,0 40,0
	Srednja vrijednost ± SD	19,9 ± 7,7	19,3 ± 6,5	20,5 ± 8,8
	Medijan (25. – 75. percentila)	20,0 (14 -24,0)	18,0 (14,0-23,0)	20,1 (15,9-25,0)
<b>Feritin</b>	Raspon	27,0 584,0	27,0 584,0	38,0 570,0
	Srednja vrijednost ± SD	206,1 ± 166,7	215,9 ± 189,2	196,2 ± 146,5
	Medijan (25. – 75. percentila)	159,0 (68,0-320,0)	191,0 (45,5-332,0)	159,0 (113,0-203,5)
<b>Leukociti</b>	Raspon	3,5 11,6	5,2 11,1	3,5 11,6
	Srednja vrijednost ± SD	7,4 ± 1,7	7,6 ± 1,7	7,2 ± 1,7
	Medijan (25. – 75. percentila)	7,6 (6,0 – 8,3)	7,9 (6,0 – 8,7)	7,2 (6,0 – 7,8)
<b>SE</b>	Raspon	1,0 27,0	3,0 27,0	1,0 25,0
	Srednja vrijednost ± SD	10,2 ± 6,8	13,2 ± 7,2	8,2 ± 5,8
	Medijan (25. – 75. percentila)	8,0 (5,0 – 13,0)	12,0 (8,0 – 20,0)	6,0 (5,0 – 11,0)
<b>CRP</b>	Raspon	0,4 17,4	1,0 17,4	0,4 12,6
	Srednja vrijednost ± SD	4,7 ± 4,6	6,5 ± 5,4	2,9 ± 2,9
	Medijan (25. – 75. percentila)	3,1 (1,4 – 6,1)	5,4 (1,8 – 9,2)	1,9 (0,8 – 4,2)
<b>Fibrinogen</b>	Raspon	2,5 6,0	2,5 5,3	2,8 6,0
	Srednja vrijednost ± SD	4,1 ± 1,0	4,2 ± 1,0	4,0 ± 1,0
	Medijan (25. – 75. percentila)	4,0 (3,2 – 4,9)	4,8 (3,3 – 5,0)	3,6 (3,2 – 4,9)



Očekivano veći udio bolesnika s NAFLD-om te unutar skupine bolesnika s NASH-om je imao povišene vrijednosti glukoze natašte (NAFLD 42/64,6% i NASH 25/80,6%) dok je u grupi bolesnika koji nisu imali NASH udio bio jednak (NAFL/granični nalaz 17/50%). Srednje vrijednosti glukoze natašte su u svim skupinama bile iznad referentnih vrijednosti. Vrijednosti lipidograma su bile višestruko promijenjene. U svim navedenim skupinama vrijednosti slobodnog kolesterola su bile češće povišene (NAFLD 36/60%, NASH 18/64,3%, NAFL/granični nalaz 18/56,3%) kao i triglicerida (NAFLD 36/61,0%, NASH 20/74,1%) osim u skupini NAFL/granični nalaz gdje je bio jednak broj ispitanika (16/50%) s urednim i povišenim vrijednostima triglicerida. Vrijednosti LDL-a su bile povišene samo u ¼ bolesnika (12/23,1%) s NAFLD-om kao i snižene vrijednosti HDL-a (16/26,2%). Vrijednosti jetrenih biokemijskih testova su kod ispitanika pokazali očekivane rezultate odnosno vrijednosti ALT-a i GGT-a su bile povišene u većine bolesnika. Vrijednosti ALT su bile povišene u 47 (71,2%) bolesnika s NAFLD-om, 26 (81,3%) bolesnika s NASH-om i 21 (61,8%) bolesnika s NAFL/granični nalaz, dok je udio bolesnika s povišenim vrijednostima GGT-a bio još izraženiji (NAFLD 56/86,2%, NASH 28/90,3%, NAFL/granični nalaz 28/82,4%). Jednak broj NAFLD ispitanika je imao povišene i uredne vrijednosti AST-a (33/50%), no međutim ako se gleda po podskupinama bolesnici s NASH-om su imali veći udio povišenih vrijednosti AST-a u odnosu na skupinu s NAFL/graničnim nalazom (20/62,5% vs 13/38,2%). Broj leukocita, jedan od biokemijskih parametra upale, bio je povišen samo u pet bolesnika s NAFLD-om, za razliku od vrijednosti CRP-a koje su bile povišene u značajnom broju bolesnika s NASH-om (23/71,9%) dok su u skupini bolesnika s NAFL/granični nalaz vrijednosti CRP-a bile uredne u 31 (91,2%) bolesnika. Prosječne vrijednosti koncentracije željeza u serumu bile su unutar referentnih vrijednosti kod svih ispitivanih skupina, a samo su 4 bolesnika s NAFLD-om, 2 s NASH-om i 2 s NAFL/graničnim nalazom imala povišene vrijednosti željeza u serumu u trenutku postavljanja dijagnoze.

### **5.1.3. Osnovni podaci o učestalosti sastavnica i MS-a u bolesnika s NAFLD-om**

Učestalost MS-a prema definiciji IDF-a kao i njegovih sastavnica u ispitivanoj skupini prikazana je u Tablici 8. Vidljivo je da je MS očekivano prisutan u većem broju bolesnika s

NAFLD-om, a posebice u bolesnika s NASH-om (80,6%) za razliku od ostalih bolesnika u ispitivanoj grupi u kojoj 58,1% nije zadovoljio kriterije MS-a. Centralna pretilost je bila najčešće prisutna sastavnica, a snižene vrijednosti HDL-a najrjeđa u svim prikazanim skupinama.

Tablica 8. Učestalost MS-a i pojedinih sastavnica u ispitivanoj skupini bolesnika s NAFLD-om i podskupinama određenim prema patohistološkom nalazu odnosno NAS-u.

		NAFLD		NASH		NAFL/granični nalaz	
		N	%	N	%	N	%
Centralna pretilost	Ne	17	27,4%	4	12,9%	13	41,9%
	Da	45	72,6%	27	87,1%	18	58,1%
Arterijska hipertenzija	Ne	32	48,5%	10	31,3%	22	64,7%
	Da	34	51,5%	22	68,8%	12	35,3%
Šećerna bolest tip 2	Ne	47	71,2%	18	56,3%	29	85,3%
	Da	19	28,8%	14	43,8%	5	14,7%
Intolerancija glukoze	Ne	43	66,2%	17	54,8%	26	76,5%
	Da	22	33,8%	14	45,2%	8	23,5%
Povišena glikemija natašte	Ne	23	35,4%	6	19,4%	17	50,0%
	Da	42	64,6%	25	80,6%	17	50,0%
Hipertrigliceridemija	Ne	24	37,5%	7	23,3%	17	50,0%
	Da	40	62,5%	23	76,7%	17	50,0%
Snižen HDL	Ne	45	73,8%	22	75,9%	23	71,9%
	Da	16	26,2%	7	24,1%	9	28,1%
Metabolički sindrom	Ne	24	38,7%	6	19,4%	18	58,1%
	Da	38	61,3%	25	80,6%	13	41,9%

#### 5.1.4. Sonografske i patohistološke karakteristike bolesnika s NAFLD-om

Svim ispitanicama prije uključivanja u istraživanje učinjen je UZV abdomena te potom postavljena sumnja na NAFLD prema bodovnom sustavu predstavljenim u studiji Hamaguchi i sur. (82). U Tablici 9 prikazana je učestalost dvije najvažnije sonografske karakteristike jetre u istraživanim skupinama. Očekivano je u većine bolesnika svih istraživanih skupina, posebice onoj s NASH-om (96,8%), ultrazvučno detektiran hiperehogen parenhim jetre, odnosno steatoza

jetre, dok je hepatomegalija bila izražena u bolesnicima s NASH-om ali ne i u skupini s NAFL/graničnim nalazom.

Tablica 9. Sonografske karakteristike bolesnika s NAFLD-om.

		NAFLD		NASH		NAFL/granični nalaz	
		N	%	N	%	N	%
UZV: uvećana jetra	Ne	26	41,3%	5	16,1%	21	65,6%
	Da	37	58,7%	26	83,9%	11	34,4%
UZV: hiperehogena jetra	Ne	8	12,7%	1	3,2%	7	21,9%
	Da	55	87,3%	30	96,8%	25	78,1%

Gledajući pojedinačne patohistološke značajke bolesnika s NAFLD-om i NASH-om, prema bodovnom sustavu NASH CRN te Brunt i sur. prikazanom u Tablici 10, najveći udio bolesnika s NAFLD-om (39,4%) i NASH-om (65,6%) je u trenutku postavljanja dijagnoze već imao izraženu steatozu (>66%). Ukoliko promatramo nekroinflatornu aktivnost očekivano je 87,9% bolesnika s NAFLD-om imao određeni stupanj baloniranja hepatocita, a 71,9% bolesnika s NASH-om izraženo baloniranje. Obje ranije navedene skupine bolesnika su imale najčešće prisutan 1. i 2. stupanj portalne odnosno lobularne upale u trenutku postavljanja dijagnoze. Prema NASH CRN bodovnom sustavu fibroza je podijeljena u četiri stupnja no radi potrebe statističke obrade podataka u ovom istraživanju su stadijima dodijeljeni brojevi od 0 do 6. Iznenađujuće u našoj kohorti najveći broj bolesnika s NAFLD-om i NASH-om su već imali razvijenu perisinusoidalnu fibrozu zone 3 i portalnu/periportalnu fibrozu. Svi bolesnici s NASH-om su imali vidljivu fibrozu, ali nitko od ispitanika u kohorti nije imao razvijenu cirozu. Najčešći NAFLD Activity Score iznosio je 6/8 (u 28,8% bolesnika) uz srednju vrijednost i medijan 4/8 u skupini bolesnika s NAFLD-om.

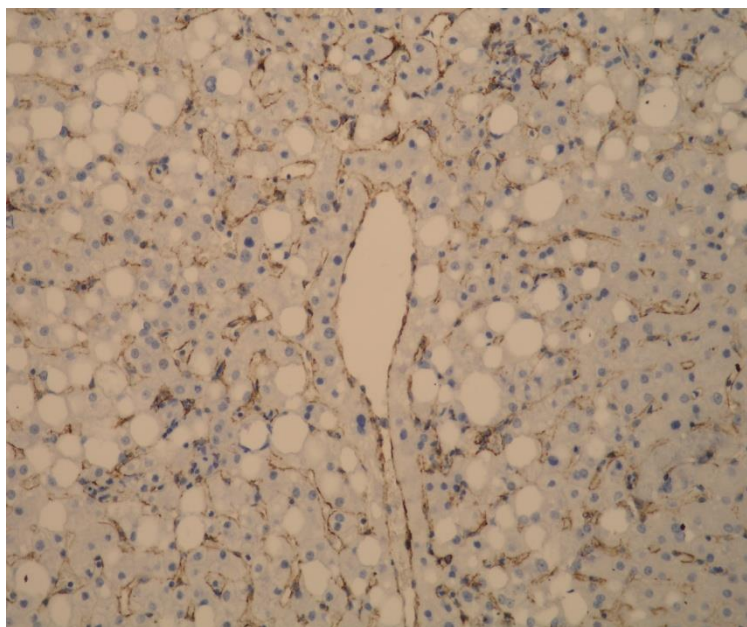
Tablica 10. Patohistološke karakteristike kod ispitivane skupine i podskupina bolesnika s NAFLD-om prema NASH CRN bodovnom sustavu te Bruntu i sur.

Patohistološke karakteristike		NAFLD		NASH	
		N	%	N	%
Steatoza	0	5	7,6%	0	0%
	1	19	28,8%	1	3,1%
	2	16	24,2%	10	31,3%
	3	26	39,4%	21	65,6%
Baloniranje hepatocita	0	8	12,1%	0	0%
	1	33	50,0%	9	28,1%
	2	25	37,9%	23	71,9%
Lobularna upala	0	11	16,7%	0	0%
	1	27	40,9%	8	25,0%
	2	27	40,9%	23	71,9%
	3	1	1,5%	1	3,1%
Portalna upala	0	7	10,6%	1	3,1%
	1	38	57,6%	14	43,8%
	2	20	30,3%	16	50,0%
	3	1	1,5%	1	3,1%
Stadij fibroze prema NASH CRN	0	4	6,1%	0	0%
	1	19	28,8%	6	18,8%
	2	6	9,1%	3	9,4%
	3	7	10,6%	4	12,5%
	4	24	36,4%	14	43,8%
	5	6	9,1%	5	15,6%
	6	0	0%	0	0%
Stadij fibroze prema Brunt i sur.	0	5	7,6%	0	0%
	1	20	30,3%	7	21,9%
	2	35	53,0%	20	62,5%
	3	6	9,1%	5	15,6%
	4	0	0%	0	0%
NAFLD Activity Score (NAS)	0	4	6,1%		
	1	2	3,0%		
	2	4	6,1%		
	3	13	19,7%		
	4	11	16,7%		
	5	6	9,1%	6	18,8%
	6	19	28,8%	19	59,4%
	7	6	9,1%	6	18,8%
8	1	1,5%	1	3,1%	

## 5.2. Ekspresija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre

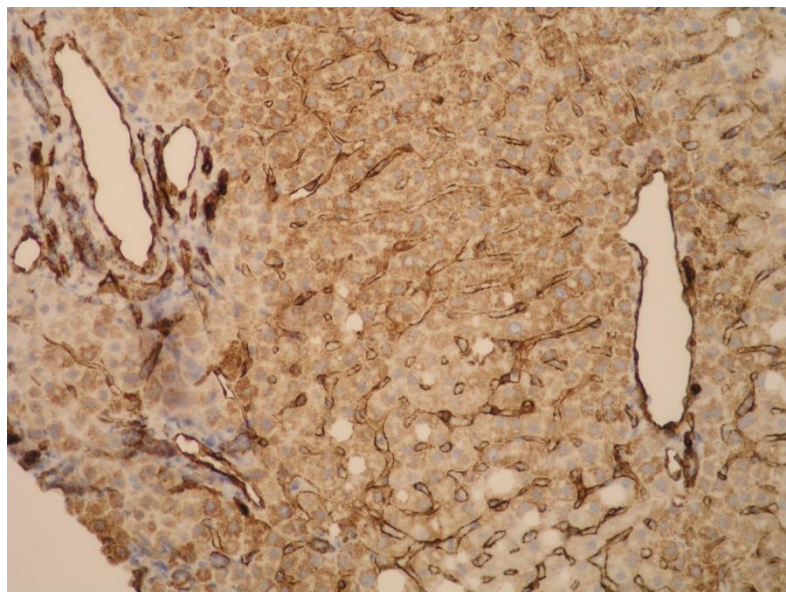
Ekspresija cav-1 nađena je u hepatocitima zdravog parenhima jetre, odnosno kontrolne skupine, kao i u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u hepatocitima kontrolne skupine nalazila se u svih ispitanika (100%) isključivo na staničnoj membrani hepatocita dok je u citoplazmi istih ispitanika ta reakcija izostala (Slika 9) te je označena kao negativna odnosno smanjena ekspresija cav-1.



Slika 9. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 na staničnoj membrani uz izostalu imunohistokemijsku reakciju u citoplazmi hepatocita kontrolne skupine.

Nasuprot kontrolne skupine, hepatociti bolesnika s NAFLD-om pokazali su slabiju pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na cav-1 na staničnoj membrani no ujedno izrazitu pozitivnu reakciju u citoplazmi hepatocita što je okarakterizirano kao pozitivna odnosno povišena ekspresija cav-1 (Slika 10).



Slika 10. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u citoplazmi hepatocita bolesnika s NAFLD-om, u ovom slučaju najizraženija translobularno.

Imunohistokemijska reakcija na cav-1 u citoplazmi bolesnika s NAFLD-om bila je negativna (pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 samo na staničnoj membrani) u 7 (10,6%) bolesnika, a pozitivna u 59 (89,4%) bolesnika. Usporedbom izraženosti cav-1 u bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) (Tablica 11).

Tablica 11. Razlika pozitivne i negativne ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om i kontrolne skupine bolesnika.

		Skupina			
		NAFLD		Zdravi	
		N	%	N	%
ekspresija cav-1 u hepatocitima	Negativna	7	10,6%	15	100,0%
	Pozitivna	59	89,4%	0	0,0%

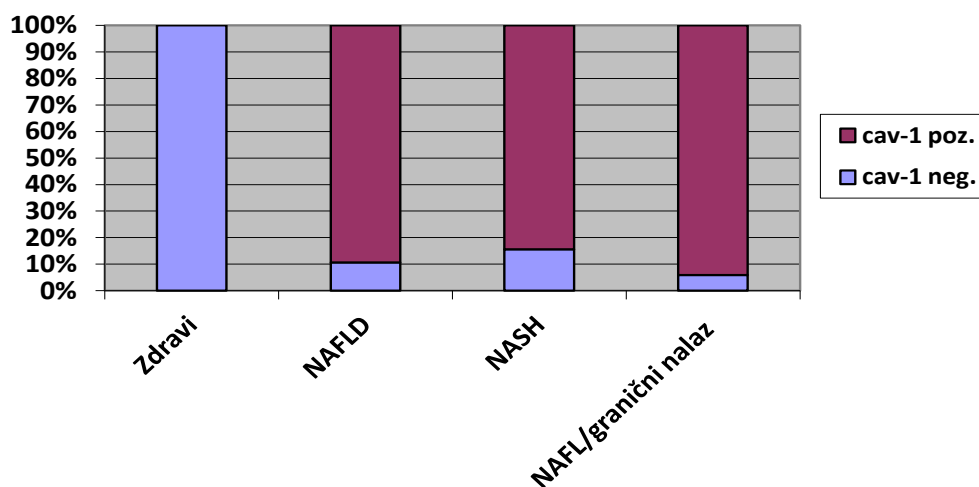
	Vrijednost	df	P
X <sup>2</sup> test	49,370	1	<0,001

Kada je uspoređena ekspresija cav-1 unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om, odnosno bolesnici s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), a u svrhu korelacije cav-1 s progresijom bolesti, nije nađeno statistički značajne razlike ( $p=0,199$ ) (Tablica 12).

Tablica 12. Razlika pozitivne i negativne izraženosti cav-1 u hepatocitima bolesnika s NASH-om i NAFL/granični nalaz.

		Skupina			
		NASH		NAFL/granični nalaz	
		N	%	N	%
ekspresija cav-1 u hepatocitima	Negativna	5	15,6%	2	5,9 %
	Pozitivna	27	84,4%	32	94,1%

	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	1,650	1	0,199



Slika 11. Razlika pozitivne i negativne ekspresije cav-1 u hepatocitima između zdravog parenhima jetre i ispitivane skupine bolesnika s NAFLD-om i njenih podskupina.

### 5.2.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina pozitivne i negativne ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om

Učinjena je usporedba pojedinih demografskih, laboratorijskih, sonografskih i patohistoloških karakteristika u ispitivanim skupinama negativne i pozitivne ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om koji su prikazani u Tablici 13, 14 i 15.

Tablica 13. Razlike u demografskim, laboratorijskim i sonografskim odrednicama bolesnika s NAFLD-om ovisno o ekspresiji cav-1 u hepatocitima.

		cav-1 ekspresija			
		Negativna		Pozitivna	
		N	%	N	%
Spol*	Ženski	5	71,4%	17	28,8%
	Muški	2	28,6%	42	71,2%
BMI skupine	<25	1	14,3%	9	18,8%
	25,1-30	1	14,3%	19	39,6%
	30,1-35	4	57,1%	12	25,0%
	>35	1	14,3%	8	16,7%
Hipertrigliceridemija	Ne	3	50,0%	21	36,2%
	Da	3	50,0%	37	63,8%
Snižen HDL	Ne	4	80,0%	41	73,2%
	Da	1	20,0%	15	26,8%
GUK povišen**	Ne	0	0,0%	23	39,7%
	Da	7	100,0%	35	60,3%
Kolesterol povišen	Ne	2	40,0%	22	40,0%
	Da	3	60,0%	33	60,0%
LDL povišen	Ne	4	100,0%	36	75,0%
	Da	0	0,0%	12	25,0%
HDL snižen	Ne	3	75,0%	31	66,0%
	Da	1	25,0%	16	34,0%
UZV: uvećana jetra	Ne	3	42,9%	23	41,1%
	Da	4	57,1%	33	58,9%
UZV: hiperehogena jetra	Ne	1	14,3%	7	12,5%
	Da	6	85,7%	49	87,5%
AST povišen	Ne	3	42,9%	30	50,8%
	Da	4	57,1%	29	49,2%



ALT povišen	Ne	2	28,6%	17	28,8%
	Da	5	71,4%	42	71,2%
GGT povišen	Ne	0	0,0%	9	15,5%
	Da	7	100,0%	49	84,5%
AF povišen	Ne	7	100,0%	51	89,5%
	Da	0	0,0%	6	10,5%
Bilirubin povišen	Ne	7	100,0%	51	86,4%
	Da	0	0,0%	8	13,6%
Leukociti povišeni	Ne	7	100,0%	54	91,5%
	Da	0	0,0%	5	8,5%
CRP povišen	Ne	2	28,6%	38	64,4%
	Da	5	71,4%	21	35,6%

\*p=0,024

\*\*p=0,038

Tablica 14. Razlike u prisutnosti MS-a i njegovih sastavnica u bolesnika s NAFLD-om ovisno o ekspresiji cav-1 u hepatocitima.

		cav-1 ekspresija			
		Negativna		Pozitivna	
		N	%	N	%
Centralna pretilost	Ne	0	0,0%	17	30,4%
	Da	6	100,0%	39	69,6%
Arterijska hipertenzija	Ne	1	14,3%	31	52,5%
	Da	6	85,7%	28	47,5%
Dijabetes tip 2	Ne	3	42,9%	44	74,6%
	Da	4	57,1%	15	25,4%
Intolerancija glukoze	Ne	3	42,9%	40	69,0%
	Da	4	57,1%	18	31,0%
Povišena glikemija natašte*	Ne	0	0,0%	23	39,7%
	Da	7	100,0%	35	60,3%
Hipertrigliceridemija	Ne	3	50,0%	21	36,2%
	Da	3	50,0%	37	63,8%
Snižen HDL	Ne	4	80,0%	41	73,2%
	Da	1	20,0%	15	26,8%
Metabolički sindrom**	Ne	0	0,0%	24	42,9%
	Da	6	100,0%	32	57,1%

\*p=0,038

\*\*p=0,041

Tablica 15. Korelacija pojedinih patohistoloških varijabli i izraženosti cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.

		<b>cav-1 ekspresija u hepatocitima</b>
Lobularna upala	r	-0,199
	P	0,090
	N	66
Portalna upala	r	0,090
	P	0,451
	N	66
Stadij fibroze prema NASH CRN	r	0,041
	P	0,713
	N	66
Nekroinflamatorni stadij prema Brunt i sur.	r	-0,090
	P	0,450
	N	66
Stadij fibroze prema Brunt i sur.	r	0,022
	P	0,854
	N	66
NAFLD Activity Score	r	-0,065
	P	0,552
	N	66
Stupanj steatoze	r	0
	P	1,000
	N	66

Usporedbom skupina pozitivne i negativne izraženosti cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om nađena je statistički značajna razlika u prosječnoj dobi bolesnika (Mann-Whitney U test,  $p=0,010$ ). Prosječna dob bolesnika s NAFLD-om i pozitivnom ekspresijom cav-1 u hepatocitima je bila niža (medijan 43, 25.-75. percentila 37–53. godina) u odnosu na bolesnike s negativnom ekspresijom cav-1 (medijan 54, 25.-75. percentila 52-59 godina).

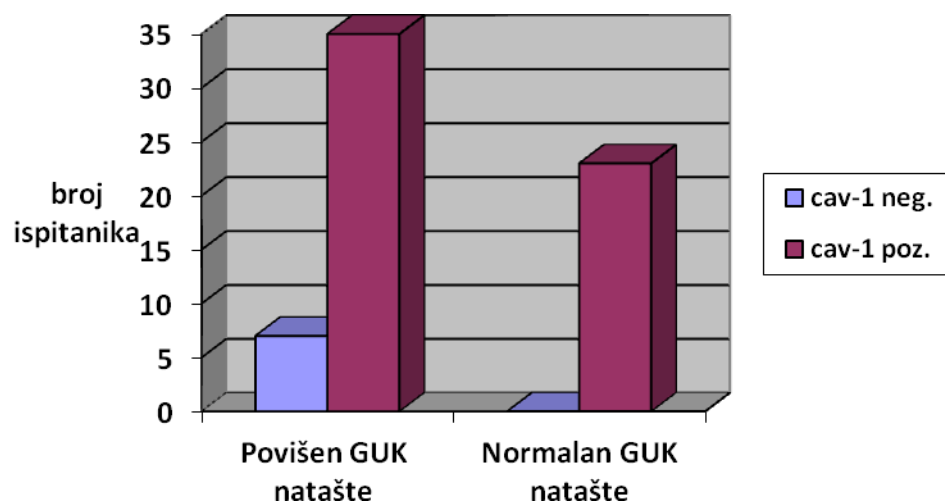
Usporedbom skupina pozitivne i negativne izraženosti cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om nađena je statistički značajna razlika u spolu ( $X^2$ ,  $p=0,024$ ) (Tablica 13). Ispitanici muškog spola su češće imali pozitivnu ekspresiju cav-1 (71,2% vs 28,6%) dok su žene češće

imale negativnu ekspresiju cav-1 (71,4% vs 28,8%). Iz navedenog se može zaključiti da su ispitanici s NAFLD-om i pozitivnom ekspresijom cav-1 u hepatocitima češće muškog spola.

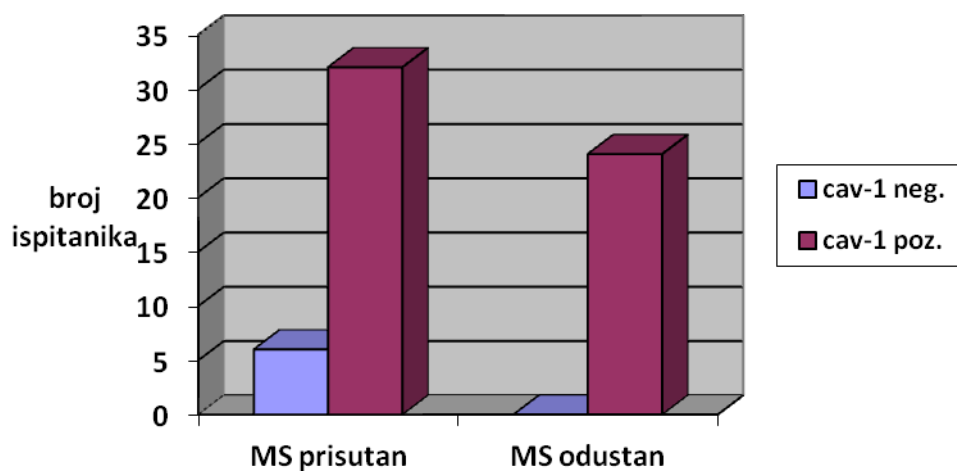
Kada smo promatrali razlike između skupina pozitivne i negativne izraženosti cav-1 i ispitivanih laboratorijskih nalaza jedino su se povišene vrijednosti glukoze natašte pokazale statistički značajne ( $X^2$ ,  $p=0,038$ ). Svi bolesnici (100%), točnije njih sedam, s negativnom ekspresijom cav-1 su imali povišene vrijednosti glukoze, dok je 23 (39,7%) bolesnika s cav-1 pozitivnom ekspresijom bilo normoglikemično, a 35 (60,3%) ih je imalo povišene vrijednosti glikemije natašte. Može se zaključiti da su bolesnici s NAFLD-om i negativnom ekspresijom cav-1 imali značajno češće povišene vrijednosti glukoze natašte (Slika 12).

Značajne razlike između skupina pozitivne i negativne izraženosti cav-1 i prisutnog metaboličkog sindroma te njegovih sastavnica su istraživane (Tablica 14). Statistički značajna razlika u ispitivanim skupinama nađena je za prisutnost MS-a ( $X^2$ ,  $p=0,041$ ) i od sastavnica jedino hiperglikemije natašte ( $X^2$ ,  $p=0,038$ ). Svi bolesnici (100%) s negativnom ekspresijom cav-1 točnije njih 6 je zadovoljio kriterije za MS dok je iste kriterije zadovoljilo 57,1% bolesnika s pozitivnom ekspresijom cav-1. Iz priloženog zaključujemo da bolesnici s NAFLD-om i negativnom ekspresijom cav-1 imaju češće prisutan MS te hiperglikemiju natašte u odnosu na one s pozitivnom ekspresijom cav-1 (Slika 13).

Učinjena je korelacija ekspresije cav-1 s patohistološkim značajkama bolesnika s NAFLD-om prema bodovnim sustavima predstavljenim od Brunt i sur. te NASH CRN no nije nađeno statistički značajnih korelacija (Tablica 15) (88,89).

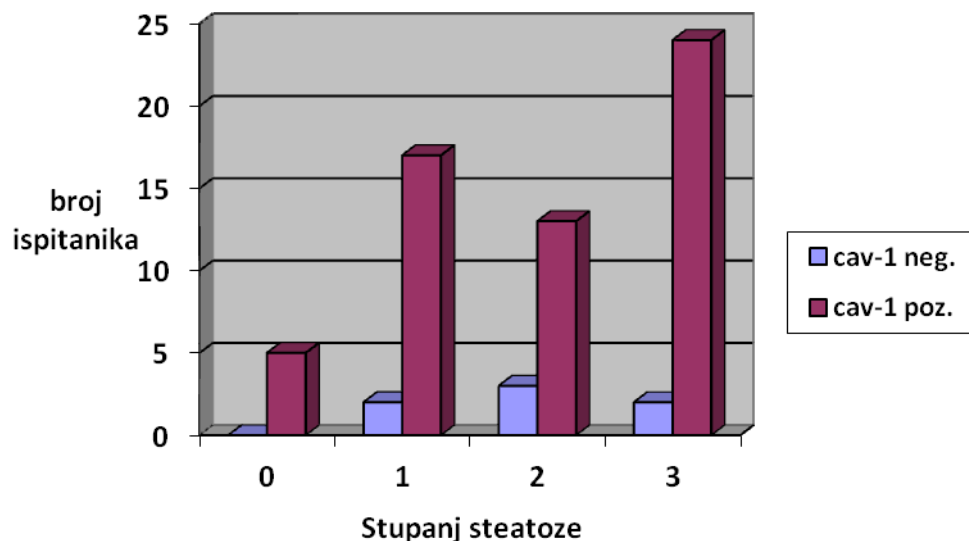


Slika 12. Razlika pozitivne i negativne izraženosti cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na povišene vrijednosti glucoze natašte.



Slika 13. Razlika pozitivne i negativne izraženosti cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na prisutnost MS-a.

Rezultati ranijih animalnih eksperimentalnih studija ukazali su da stupanj steatoze jetre u NAFLD modelima korelira s ekspresijom cav-1 u hepatocitima. Iako korelacija stupnja steatoze i ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u ovom istraživanju nije potvrđena ( $p=1,000$ ) može se vidjeti na Slici 14 da je najveći udio odnosno broj cav-1 pozitivnih bolesnika imao izraženu steatozu (>66%) prema korištenim patohistološkim bodovnim sustavima.

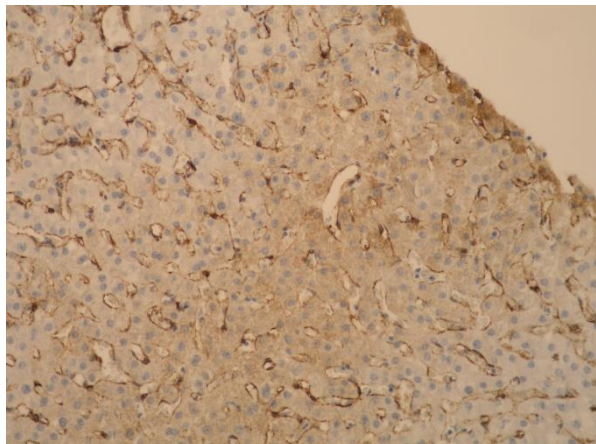


Slika 14. Prikaz odnosa pozitivne i negativne ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na stupanj steatoze.

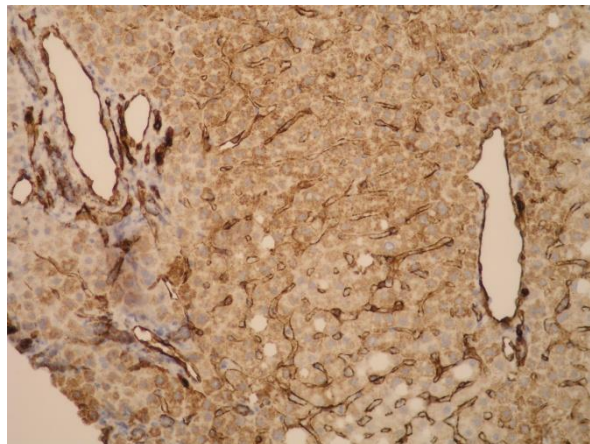
### 5.3. Distribucija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre

Ukoliko se promatra distribucija cav-1 nađena je razlika između hepatocita zdravog parenhima jetre, odnosno kontrolne skupine, i hepatocita bolesnika s NAFLD-om.

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u hepatocitima kontrolne skupine nalazila se zoni 3 jetrenog acinusa u 14 bolesnika (93,3%) (Slika 15A) te samo u jednog bolesnika translobularno (6,7%), dok je gotovo 70% bolesnika s NAFLD-om pokazalo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na cav-1 u hepatocitima zone 3 jetrenog acinusa, translobularno i periportalno (Slika 15B).



Slika 15A. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u zoni 3 jetrenog acinusa.



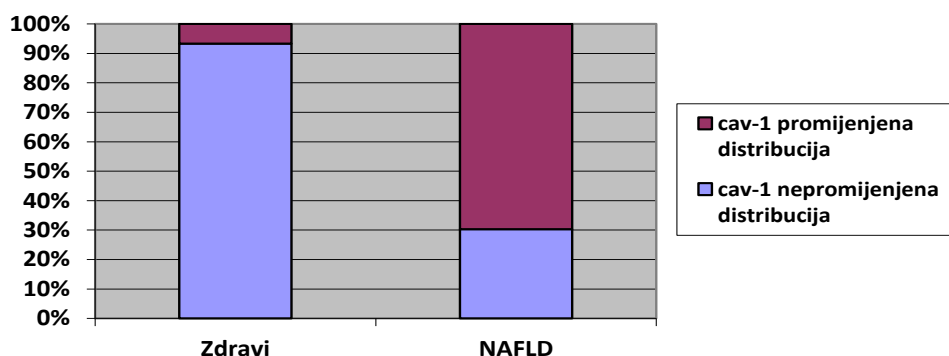
Slika 15 B. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u zoni 3 jetrenog acinusa i translobularno.

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 samo u zoni 3 jetrenog acinusa označena je kao nepromijenjena distribucija cav-1 dok je ista reakcija zabilježena translobularno i periportalno označena kao promijenjena. Usporedbom distribucije cav-1 između hepatocita u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitanu skupinu bolesnika s NAFLD-om nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) (Tablica i Slika 16).

Tablica 16. Razlika promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om i kontrolne skupine bolesnika.

		Skupina			
		NAFLD		Zdravi	
		N	%	N	%
distribucija cav-1 u hepatocitima	Nepromijenjena	20	30,3%	14	93,3%
	Promijenjena	46	69,7%	1	6,7%

	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	19,936	1	<0,001



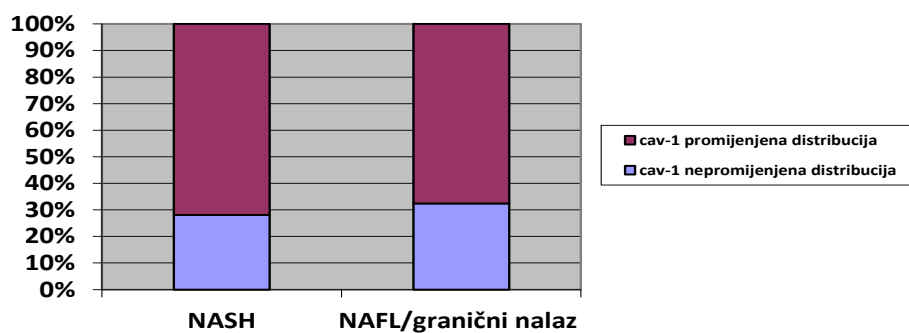
Slika 16. Razlika između distribucije cav-1 u hepatocitima zdravog parenhima jetre i bolesnika s NAFLD-om.

Kada je uspoređena distribucija cav-1 unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om, odnosno bolesnika s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), nije nađeno statistički signifikantne razlike ( $p=0,709$ ) (Tablica i Slika 17). Gotovo je jednak udio bolesnika s NASH-om i onih s  $NAS<5$  imao promijenjenu distribuciju cav-1 (71,9% vs 67,6%).

Tablica 17. Razlika između promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NASH-om i NAFL/granični nalaz.

		Skupina			
		NASH		NAFL/granični nalaz	
		N	%	N	%
distribucija cav-1 u hepatocitima	Nepromijenjena	9	28,1%	11	32,4%
	Promijenjena	23	71,9%	23	67,6%

	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	0,104	1	0,709



Slika 17. Razlika između promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om.



### 5.3.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om

Učinjena je usporedba demografskih, laboratorijskih, sonografskih i patohistoloških karakteristika u ispitivanim skupinama nepromijenjene i promijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om (Tablica 18, 19 i 20).

Tablica 18. Razlike u demografskim, laboratorijskim i sonografskim odrednicama bolesnika s NAFLD-om ovisno o distribuciji cav-1 u hepatocitima.

		cav-1 distribucija			
		Nije promijenjena		Promijenjena	
		N	%	N	%
Spol	Ženski	9	45,0%	13	28,3%
	Muški	11	55,0%	33	71,7%
BMI skupine	<25	4	22,2%	6	16,2%
	25,1-30	5	27,8%	15	40,5%
	30,1-35	8	44,4%	8	21,6%
	>35	1	5,6%	8	21,6%
GUK povišen	Ne	8	40,0%	15	33,3%
	Da	12	60,0%	30	66,7%
Kolesterol povišen	Ne	6	33,3%	18	42,9%
	Da	12	66,7%	24	57,1%
LDL povišen	Ne	13	81,3%	27	75,0%
	Da	3	18,8%	9	25,0%
HDL snižen	Ne	11	73,3%	23	63,9%
	Da	4	26,7%	13	36,1%
Trigliceridi povišeni	Ne	6	35,3%	17	40,5%
	Da	11	64,7%	25	59,5%
UZV: uvećana jetra	Ne	8	44,4%	18	40,0%
	Da	10	55,6%	27	60,0%
UZV: hiperehogena jetra	Ne	1	5,6%	7	15,6%
	Da	17	94,4%	38	84,4%
AST povišen	Ne	12	60,0%	21	45,7%
	Da	8	40,0%	25	54,3%
ALT povišen	Ne	8	40,0%	11	23,9%
	Da	12	60,0%	35	76,1%
GGT povišen	Ne	1	5,0%	8	17,8%
	Da	19	95,0%	37	82,2%

AF povišen	Ne	19	95,0%	39	88,6%
	Da	1	5,0%	5	11,4%
Bilirubin povišen*	Ne	20	100,0%	38	82,6%
	Da	0	0,0%	8	17,4%
LDH povišen	Ne	19	95,0%	42	91,3%
	Da	1	5,0%	4	8,7%
Fe povišeno	Ne	20	100,0%	42	91,3%
	Da	0	0,0%	4	8,7%
Leukociti povišeni	Ne	18	90,0%	43	93,5%
	Da	2	10,0%	3	6,5%
CRP povišen	Ne	11	55,0%	29	63,0%
	Da	9	45,0%	17	37,0%

\*p=0,047

Tablica 19. Razlike u prisutnosti MS-a i njegovih sastavnica u bolesnika s NAFLD-om ovisno o distribuciji cav-1 u hepatocitima.

		cav-1 distribucija			
		Nije promijenjena		Promijenjena	
		N	%	N	%
Arterijska hipertenzija*	Ne	6	30,0%	26	56,5%
	Da	14	70,0%	20	43,5%
Dijabetes tip 2	Ne	14	70,0%	33	71,7%
	Da	6	30,0%	13	28,3%
Intolerancija glukoze	Ne	13	65,0%	30	66,7%
	Da	7	35,0%	15	33,3%
Povišena glikemija natašte	Ne	8	40,0%	15	33,3%
	Da	12	60,0%	30	66,7%
Hipertrigliceridemija	Ne	6	31,6%	18	40,0%
	Da	13	68,4%	27	60,0%
Snižen HDL	Ne	11	64,7%	34	77,3%
	Da	6	35,3%	10	22,7%
Metabolički sindrom	Ne	6	33,3%	18	40,9%
	Da	12	66,7%	26	59,1%

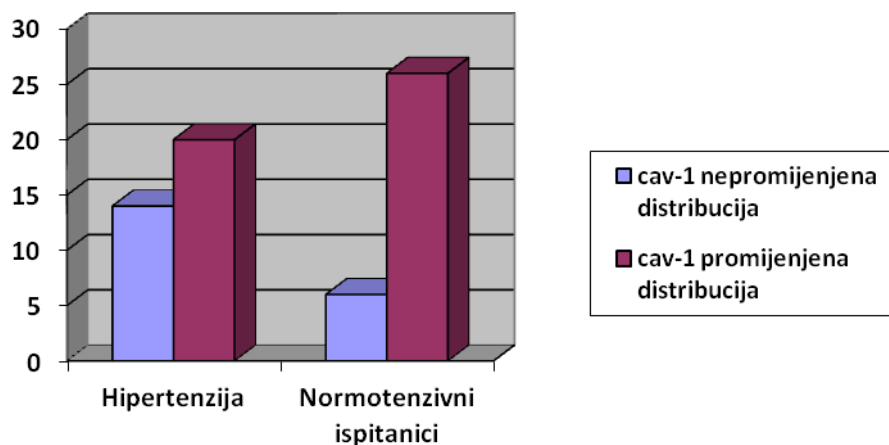
\*p=0,048

Tablica 20. Korelacija pojedinih patohistoloških varijabli i distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.

		<b>cav-1 distribucija</b>
Lobularna upala	r	0,005
	P	0,964
	N	66
Portalna upala	r	0,195
	P	0,102
	N	66
Stadij fibroze prema NASH CRN	r	0,011
	P	0,919
	N	66
Nekroinflamatorni stadij prema Brunt i sur.	r	0,107
	P	0,371
	N	66
Stadij fibroze prema Brunt i sur.	r	0,040
	P	0,735
	N	66
NAFLD Activity Score	r	0,045
	P	0,680
	N	66
Stupanj steatoze	r	0,113
	P	0,328
	N	66

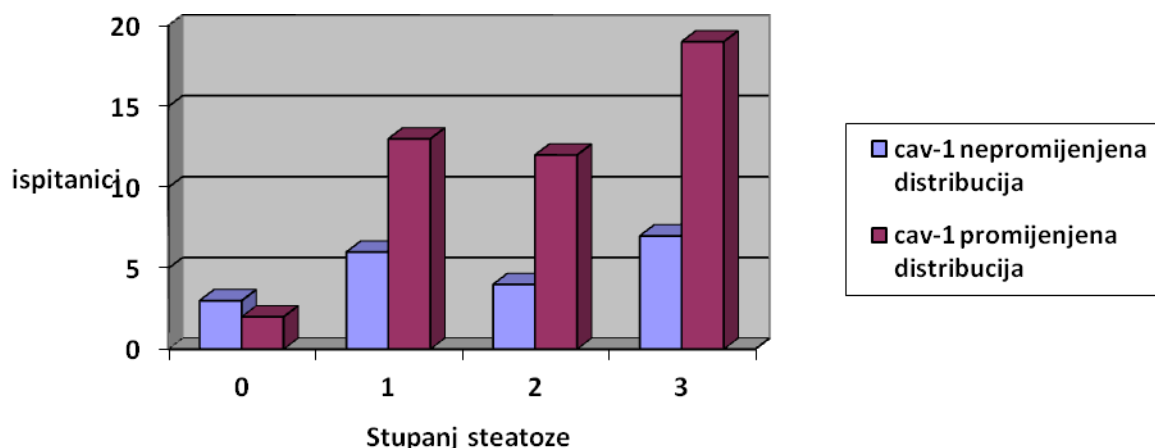
Usporedbom skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om nađena je statistički značajna razlika u prosječnom opsegu struka (Mann-Whitney U test,  $p < 0,001$ ) i opsegu bedara (Mann-Whitney U test,  $p = 0,016$ ). Medijan opsega struka u bolesnika s NAFLD-om i promijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima je iznosio 111 cm (25.-75. percentila 100-120 cm) dok je u bolesnika s nepromijenjenom cav-1 distribucijom medijan iznosio 90,5 cm (25.-75. percentila 86-95,75 cm). Prosječni opseg bedara u bolesnika s NAFLD-om i promijenjenom distribucijom cav-1 bio je 54 cm (25.-75. percentila 52-58 cm) dok je u bolesnika s nepromijenjenom distribucijom cav-1 bio 47,5 cm (25.-75. percentila 44,5-51 cm). Iz navedenog se može zaključiti da su u ovom istraživanju bolesnici s NAFLD-om i promijenjenom distribucijom cav-1 imali značajno veći opseg struka i bedara. Kada smo promatrali razlike između skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije cav-1 i ispitivanih

laboratorijskih nalaza jedino su povišene vrijednosti bilirubina bile statistički značajne ( $X^2$ ,  $p=0,047$ ). Svi ispitanici s NAFLD-om i nepromijenjenom distribucijom cav-1 su imali uredne vrijednosti bilirubina (20/100%) i 38 (82,6%) ispitanika s cav-1 promijenjenom distribucijom dok je 8 (17,4%) ispitanika s promijenjenom distribucijom cav-1 imalo povišene vrijednosti bilirubina. Može se zaključiti da su bolesnici s NAFLD-om i promijenjenom distribucijom cav-1 imali značajno češće povišene vrijednosti bilirubina (Tablica 18). Bolesnici s NAFLD-om i nepromijenjenom distribucijom cav-1 nisu imali značajno češće prisutan MS u odnosu na bolesnike s promijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima ispitanika s NAFLD-om ( $X^2$ ,  $p=0,578$ ). U skupini s promijenjenom distribucijom cav-1 MS je bio prisutan u 59,1% ispitanika, a u grupi ispitanika s nepromijenjenom distribucijom cav-1 u 66,7% (Tablica 19). Statistički značajna razlika između navedene dvije grupe ispitanika u jednoj od sastavnica MS-a, u ovom slučaju arterijskoj hipertenziji, je potvrđena ( $X^2$ ,  $p=0,048$ ). Kod bolesnika s nepromijenjenom distribucijom cav-1 arterijska hipertenzija je bila prisutna u 14 (70%) i odsutna u 6 (30%) ispitanika dok je u skupini bolesnika s promijenjenom distribucijom cav-1 bila prisutna u 20 (43,5%) i odsutna u 26 (56,5%) ispitanika (Slika 18). Iz navedenog se može zaključiti da su bolesnici s NAFLD-om i promijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima imali češće normotenzivne vrijednosti tlaka. Učinjena je korelacija distribucije cav-1 s patohistološkim značajkama ispitanika no nije nađena njihova statistički značajna korelacija (Tablica 20).



Slika 18. Prikaz odnosa nepromijenjene i promijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na anamnestički pozitivnu arterijsku hipertenziju.

Iako korelacija stupnja steatoze i distribucije u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u ovom istraživanju nije potvrđena ( $p=0,328$ ) može se vidjeti na Slici 19 da se rastom stadija steatoze udio i broj bolesnika s promijenjenom distribucijom povećavao, a najveći broj bolesnika se prezentirao 3. stupnjem steatoze (19/41,3%).

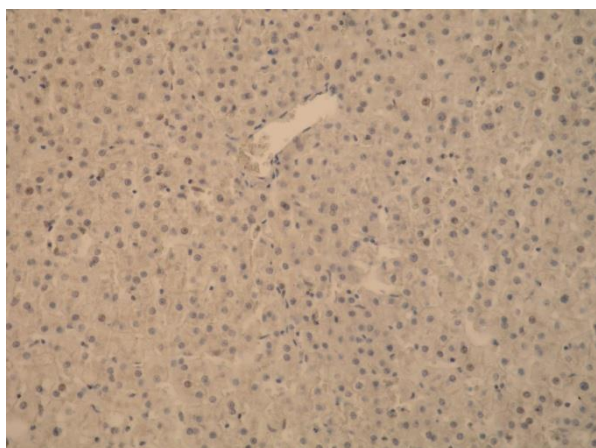


Slika 19. Prikaz odnosa nepromijenjene i promijenjene distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na stupanj steatoze.

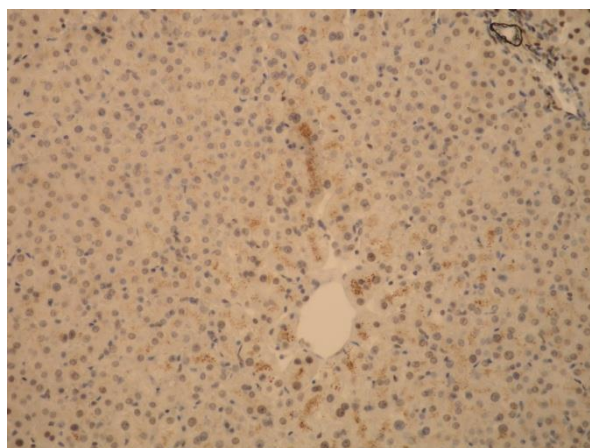
#### 5.4. Ekspresija TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre

Ekspresija TGF- $\beta$  podijeljena je na nisku i visoku izraženost ovisno o zbroju postotka imunoreaktivnih hepatocita i intenzitetu imunohistokemijske reakcije u citoplazmi hepatocita.

Niska ekspresija TGF- $\beta$  u hepatocitima kontrolne skupine detektirana je u 14 (93,3%) ispitanika (Slika 20A), dok je u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om niska ekspresija potvrđena u 26 (39,4%) i visoka u 40 (60,6%) bolesnika (Slika 20B). Usporedbom ekspresije TGF- $\beta$  u bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je statistički značajna razlika ( $p<0,001$ ) (Tablica 21).



Slika 20 A. Niska ekspresija TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika kontrolne skupine u zoni 3 jetrenog acinusa.



Slika 20 B. Visoka ekspresija TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u zoni 3 jetrenog acinusa.

Tablica 21. Razlika niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om i kontrolne skupine bolesnika.

		Skupina			
		NAFLD		Zdravi	
		N	%	N	%
ekspresija TGF- $\beta$ u hepatocitima	Niska	26	39,4%	14	93,3%
	Visoka	40	60,6%	1	6,7%

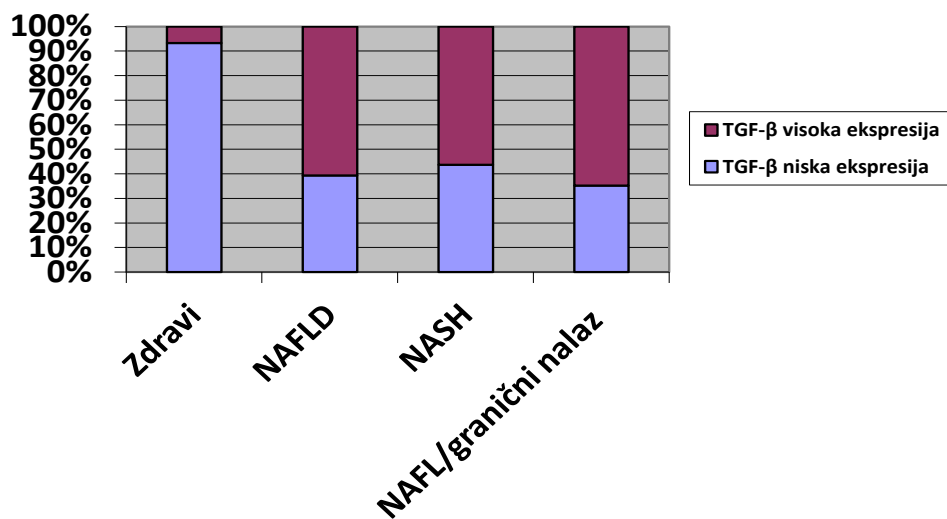
	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	14,226	1	<0,001

Kada su uspoređene niska i visoka ekspresija TGF- $\beta$  unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om (Slika 21), odnosno bolesnici s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), nije nađeno statistički signifikante razlike ( $p=0,482$ ) (Tablica 22).

Tablica 22. Razlika između pozitivne i negativne ekspresije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NASH-om i NAFL/granični nalaz.

		Skupina			
		NASH		NAFL/granični nalaz	
		N	%	N	%
ekspresija TGF- $\beta$ u hepatocitima	Niska	14	43,8%	12	35,3%
	Visoka	18	56,2%	22	64,7%

	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	0,494	1	0,482



Slika 21. Razlika niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$  u hepatocitima kontrole skupine i ostalim ispitivanim skupinama bolesnika.

### 5.4.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om

Učinjena je usporedba demografskih, laboratorijskih, sonografskih i patohistoloških karakteristika u ispitivanim skupinama niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om (Tablica 23, 24 i 25).

Tablica 23. Razlike u demografskim, laboratorijskim i sonografskim odrednicama bolesnika s NAFLD-om ovisno o niskoj i visokoj ekspresiji TGF- $\beta$  u hepatocitima.

		TGF- $\beta$ ekspresija			
		Niska		Visoka	
		N	%	N	%
Spol	Ženski	9	34,6%	13	32,5%
	Muški	17	65,4%	27	67,5%
BMI skupine	<25	4	17,4%	6	18,8%
	25,1-30	5	21,7%	15	46,9%
	30,1-35	11	47,8%	5	15,6%
	>35	3	13,0%	6	18,8%
GUK povišen	Ne	8	32,0%	15	37,5%
	Da	17	68,0%	25	62,5%
Kolesterol povišen	Ne	9	40,9%	15	39,5%
	Da	13	59,1%	23	60,5%
LDL povišen	Ne	16	80,0%	24	75,0%
	Da	4	20,0%	8	25,0%
HDL snižen	Ne	12	60,0%	22	71,0%
	Da	8	40,0%	9	29,0%
Trigliceridi povišeni	Ne	8	36,4%	15	40,5%
	Da	14	63,6%	22	59,5%
UZV uvećana jetra	Ne	8	33,3%	18	46,2%
	Da	16	66,7%	21	53,8%
UZV hiperehogena jetra	Ne	2	8,3%	6	15,4%
	Da	22	91,7%	33	84,6%
AST povišen	Ne	13	50,0%	20	50,0%
	Da	13	50,0%	20	50,0%
ALT povišen	Ne	8	30,8%	11	27,5%
	Da	18	69,2%	29	72,5%
GGT povišen	Ne	5	20,0%	4	10,0%
	Da	20	80,0%	36	90,0%



AF povišen	Ne	21	87,5%	37	92,5%
	Da	3	12,5%	3	7,5%
Bilirubin povišen	Ne	25	96,2%	33	82,5%
	Da	1	3,8%	7	17,5%
LDH povišen	Ne	22	84,6%	39	97,5%
	Da	4	15,4%	1	2,5%
Fe povišeno	Ne	26	100,0%	36	90,0%
	Da	0	0,0%	4	10,0%
Leukociti povišeni	Ne	24	92,3%	37	92,5%
	Da	2	7,7%	3	7,5%
CRP povišen	Ne	15	57,7%	25	62,5%
	Da	11	42,3%	15	37,5%

Tablica 24. Razlike u prisutnosti MS-a i njegovih sastavnica u bolesnika s NAFLD-om ovisno o ekspresiji TGF- $\beta$  u hepatocitima.

		TGF- $\beta$ ekspresija			
		Niska		Visoka	
		N	%	N	%
Centralna pretilost	Ne	5	21,7%	12	30,8%
	Da	18	78,3%	27	69,2%
Hipertenzija	Ne	9	34,6%	23	57,5%
	Da	17	65,4%	17	42,5%
Dijabetes tip 2	Ne	18	69,2%	29	72,5%
	Da	8	30,8%	11	27,5%
Intolerancija glukoze	Ne	16	64,0%	27	67,5%
	Da	9	36,0%	13	32,5%
Povišena glikemija natašte	Ne	8	32,0%	15	37,5%
	Da	17	68,0%	25	62,5%
Hipertrigliceridemija	Ne	8	33,3%	16	40,0%
	Da	16	66,7%	24	60,0%
Snižen HDL	Ne	15	65,2%	30	78,9%
	Da	8	34,8%	8	21,1%
Metabolički sindrom	Ne	8	34,8%	16	41,0%
	Da	15	65,2%	23	59,0%

Tablica 25. Korelacija pojedinih patohistoloških varijabli i izraženosti TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.

		<b>TGF-<math>\beta</math> ekspresija</b>
Lobularna upala	r	0,072
	P	0,543
	N	66
Portalna upala	r	0,213
	P	0,073
	N	66
Stadij fibroze prema NASH CRN	r	0,184
	P	0,100
	N	66
Nekroinflamatorni stadij prema Brunt i sur.	r	-0,006
	P	0,958
	N	66
Stadij fibroze prema Brunt i sur.	r	0,195
	P	0,096
	N	66
NAFLD Activity Score	r	-0,050
	P	0,644
	N	66
Stadij steatoze	r	-0,221
	P	0,055
	N	66

Usporedbom skupina niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om i laboratorijskih karakteristika ispitanika (Tablica 23) nađena je statistički značajna razlika jedino u prosječnim vrijednostima fibrinogena (Mann-Whitney U test,  $p=0,037$ ). Medijan vrijednosti fibrinogena je u populaciji ispitanika s niskom ekspresijom TGF- $\beta$  bio 4,8 g/l (25.-75. percentila 3,6-5,1 g/l), a u bolesnika s visokom ekspresijom 3,4 g/l (25.-75. percentila 3,1-4,3 g/l). Iz navedenog se može zaključiti da bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom TGF- $\beta$  imaju niže vrijednosti fibrinogena.

Usporedbom bolesnika s niskom i visokom ekspresijom TGF- $\beta$  nije nađeno statistički značajne razlike u prisutnosti MS-a (Tablica 24). MS je unutar skupine bolesnika s niskom ekspresijom TGF- $\beta$  bio prisutan u 15 (65,2%) bolesnika, a u bolesnika s povišenom ekspresijom TGF- $\beta$  u 23

(59%) bolesnika. Učinjena je korelacija ekspresije TGF- $\beta$  s patohistološkim značajkama ispitanika no nije nađena njihova statistički značajna korelacija (Tablica 25). Ukoliko se usporede stadiji fibroze u odnosu na ekspresiju TGF- $\beta$  vidljivo je u Tablici 26 da je najveći broj ispitanika s povišenom TGF- $\beta$  ekspresijom imao perisinusoidalnu fibrozu zone 3 i portalnu/periportalnu fibrozu.

Tablica 26. Prikaz niske i visoke ekspresije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om ovisno o stadijima fibroze.

		Stadij fibroze prema Brunt i sur.							
		0		1		2		3	
		N	%	N	%	N	%	N	%
TGF- $\beta$ ekspresija	Niska	2	7,7%	11	42,3%	12	46,2%	1	3,8%
	Visoka	3	7,5%	9	22,5%	23	57,5%	5	12,5%

Nitko od ispitanika nije imao stadij 4 prema bodovnom sustavu Brunt i sur.

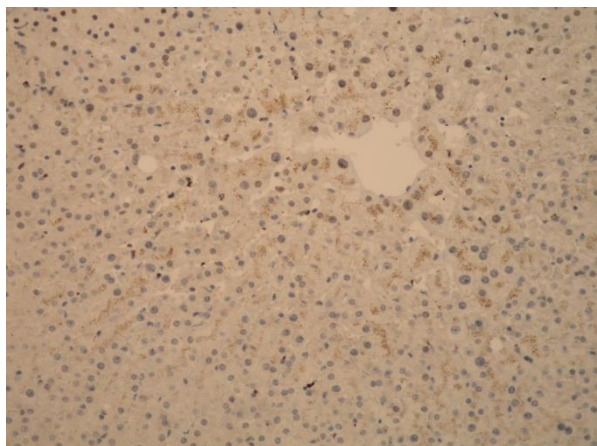
		Stadij fibroze prema NASH CRN											
		0		1		2		3		4		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
TGF- $\beta$ ekspresija	Niska	1	3,8%	10	38,5%	4	15,4%	3	11,5%	7	26,9%	1	3,8%
	Visoka	3	7,5%	9	22,5%	2	5,0%	4	10,0%	17	42,5%	5	12,5%

Nitko od ispitanika nije imao stadij 6 prema NASH CRN bodovnom sustavu.

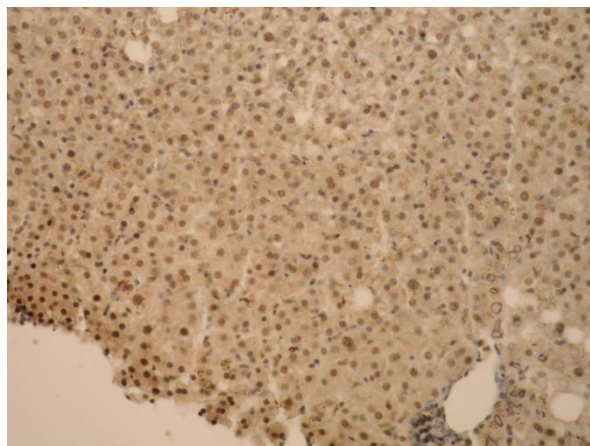
## 5.5. Distribucija TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u usporedbi sa zdravim tkivom jetre

U ovom istraživanju nađena je razlika u distribuciji TGF- $\beta$  između hepatocita zdravog parenhima jetre, odnosno kontrolne skupine, i hepatocita bolesnika s NAFLD-om.

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  u hepatocitima kontrolne skupine nalazila se zoni 3 jetrenog acinusa u 13 (86,7%) bolesnika (Slika 22 A) te samo u dva bolesnika translobularno (13,3%), dok je 42 (63,6%) bolesnika s NAFLD-om imalo promjenjenu distribuciju TGF- $\beta$  u hepatocitima, odnosno pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na TGF- $\beta$  u hepatocitima translobularno i periportalno (Slika 22 B).



Slika 22 A. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  u zoni 3 jetrenog acinusa.



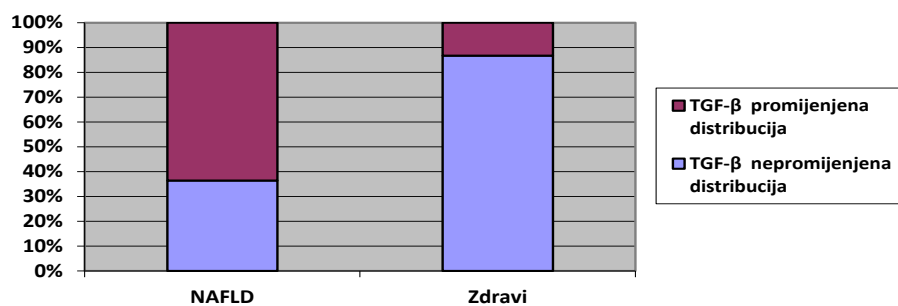
Slika 22 B. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  u zoni 3 jetrenog acinusa i translobularno.

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  samo u zoni 3 jetrenog acinusa označena je kao nepromijenjena distribucija TGF- $\beta$  dok ukoliko je ista reakcija viđena translobularno i periportalno označena je kao promijenjena. Usporedbom distribucije TGF- $\beta$  između hepatocita u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitanu skupinu bolesnika s NAFLD-om nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) (Tablica 27) (Slika 23).

Tablica 27. Razlika promijenjene i nepromijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om i kontrolne skupine bolesnika.

		Skupina			
		NAFLD		Zdravi	
		N	%	N	%
distribucija TGF- $\beta$ u hepatocitima	Nepromijenjena	24	36,4%	13	86,7%
	Promijenjena	42	63,6%	2	13,3%

	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	12,464	1	<0,001



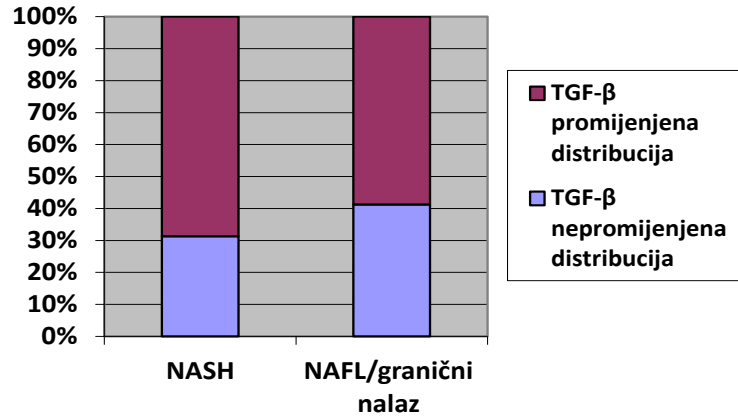
Slika 23. Razlika nepromijenjene i promijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima zdravog parenhima jetre i bolesnika s NAFLD-om.

Kada je uspoređena distribucija TGF- $\beta$  unutar podskupina NAFLD bolesnika, odnosno bolesnika s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), nije nađeno statistički signifikantne razlike ( $p=0,402$ ) (Tablica 28) (Slika 24).

Tablica 28. Razlika nepromijenjene i promijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NASH-om i NAFL/granični nalaz.

		Skupina			
		NASH		NAFL/granični nalaz	
		N	%	N	%
distribucija TGF- $\beta$ u hepatocitima	Nepromijenjena	10	31,2%	14	41,2%
	Promijenjena	22	68,8%	20	58,8%

	Vrijednost	Df	P
X <sup>2</sup> test	0,702	1	0,402



Slika 24. Razlika nepromijenjene i promijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima podskupina bolesnika s NAFLD-om.

### **5.5.1. Razlike u kliničko-demografskim i patohistološkim značajkama ispitivanih skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije TGF- $\beta$ u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om**

Učinjena je usporedba demografskih, laboratorijskih, sonografskih i patohistoloških karakteristika u ispitivanim skupinama nepromijenjene i promijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om (Tablica 29, 30 i 31).

Tablica 29. Razlike u demografskim, laboratorijskim i sonografskim odrednicama bolesnika s NAFLD-om ovisno o distribuciji TGF- $\beta$  u hepatocitima.

		TGF- $\beta$ distribucija			
		Nije promijenjena		Promijenjena	
		N	%	N	%
Spol	Ženski	9	37,5%	13	31,0%
	Muški	15	62,5%	29	69,0%
BMI skupine	<25	6	28,6%	4	11,8%
	25,1-30	9	42,9%	11	32,4%
	30,1-35	5	23,8%	11	32,4%
	>35	1	4,8%	8	23,5%
GUK povišen	Ne	6	26,1%	17	40,5%
	Da	17	73,9%	25	59,5%
Kolesterol povišen	Ne	6	28,6%	18	46,2%
	Da	15	71,4%	21	53,8%
LDL povišen	Ne	15	78,9%	25	75,8%
	Da	4	21,1%	8	24,2%
HDL snižen	Ne	13	72,2%	21	63,6%
	Da	5	27,8%	12	36,4%
Trigliceridi povišeni	Ne	9	42,9%	14	36,8%
	Da	12	57,1%	24	63,2%
UZV uvećana jetra	Ne	10	47,6%	16	38,1%
	Da	11	52,4%	26	61,9%
UZV hiperehogena jetra	Ne	5	23,8%	3	7,1%
	Da	16	76,2%	39	92,9%
AST povišen	Ne	13	54,2%	20	47,6%
	Da	11	45,8%	22	52,4%
ALT povišen	Ne	5	20,8%	14	33,3%
	Da	19	79,2%	28	66,7%
GGT povišen	Ne	4	16,7%	5	12,2%
	Da	20	83,3%	36	87,8%
AF povišen	Ne	20	87,0%	38	92,7%
	Da	3	13,0%	3	7,3%
Bilirubin povišen	Ne	23	95,8%	35	83,3%
	Da	1	4,2%	7	16,7%
LDH povišen	Ne	23	95,8%	38	90,5%
	Da	1	4,2%	4	9,5%
Leukociti povišeni	Ne	21	87,5%	40	95,2%
	Da	3	12,5%	2	4,8%
CRP povišen	Ne	17	70,8%	23	54,8%
	Da	7	29,2%	19	45,2%

Tablica 30. Razlike u prisutnosti MS-a i njegovih sastavnica u bolesnika s NAFLD-om ovisno o distribuciji TGF- $\beta$  u hepatocitima.

		TGF- $\beta$ distribucija			
		Nije promijenjena		Promijenjena	
		N	%	N	%
Centralna pretilost	Ne	6	28,6%	11	26,8%
	Da	15	71,4%	30	73,2%
Hipertenzija	Ne	11	45,8%	21	50,0%
	Da	13	54,2%	21	50,0%
Dijabetes tip 2	Ne	19	79,2%	28	66,7%
	Da	5	20,8%	14	33,3%
Intolerancija glukoze	Ne	16	69,6%	27	64,3%
	Da	7	30,4%	15	35,7%
Povišena glikemija natašte	Ne	6	26,1%	17	40,5%
	Da	17	73,9%	25	59,5%
Hipertrigliceridemija	Ne	9	40,9%	15	35,7%
	Da	13	59,1%	27	64,3%
Snižen HDL	Ne	14	66,7%	31	77,5%
	Da	7	33,3%	9	22,5%
Metabolički sindrom	Ne	8	38,1%	16	39,0%
	Da	13	61,9%	25	61,0%

Usporedbom skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika sa NAFLD-om i laboratorijskih karakteristika ispitanika (Tablica 29) nije nađeno statistički značajnih razlika između ispitivanih skupina. Usporedbom skupina promijenjene i nepromijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika sa NAFLD-om i prisutnosti MS-a (Tablica 30) nije nađeno statistički značajnih razlika između ispitivanih skupina. MS je unutar skupine bolesnika s promijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  bio prisutan u 25 (61,0%) bolesnika, a u bolesnika s nepromijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  u 13 (61,9%) bolesnika.

Učinjena je korelacija između distribucije TGF- $\beta$  s patohistološkim značajkama ispitanika no nije nađena njihova statistički značajna korelacija (Tablica 31). Najveći udio bolesnika s promijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  je imao perisinusoidalnu fibrozu zone 3 i portalnu/periportalnu fibrozu (Tablica 32).



Tablica 31. Korelacija pojedinih patohistoloških varijabli i distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.

		<b>TGF-<math>\beta</math> distribucija</b>
Lobularna upala	r	0,085
	P	0,472
	N	66
Portalna upala	r	0,203
	P	0,088
	N	66
Stadij fibroze prema NASH CRN	r	-0,018
	P	0,873
	N	66
Nekroinflamatorni stadij prema Bruntu i sur	r	0,083
	P	0,487
	N	66
Stadij fibroze prema Bruntu i sur.	r	0,053
	P	0,649
	N	66
NAFLD Activity Score	r	0,063
	P	0,564
	N	66
Stupanj steatoze	r	0,027
	P	0,817
	N	66

Tablica 32. Prikaz nepromijenjene i promijenjene distribucije TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om ovisno o stadijima fibroze.

	<b>Stadij fibroze prema Brunt i sur.</b>							
	<b>0</b>		<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
TGF- $\beta$ distribucija								
Nije promijenjena	2	8,3%	8	33,3%	12	50,0%	2	8,3%
Promijenjena	3	7,1%	12	28,6%	23	54,8%	4	9,5%

Nitko od ispitanika nije imao stadij 4 prema bodovnom sustavu Brunt i sur.

		Stadij fibroze prema NASH CRN											
		0		1		2		3		4		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
TGF- $\beta$	Nije promijenjena	1	4,2%	6	25,0%	5	20,8%	1	4,2%	9	37,5%	2	8,3%
distribucija	Promijenjena	3	7,1%	13	31,0%	1	2,4%	6	14,3%	15	35,7%	4	9,5%

Nitko od ispitanika nije imao stadij 6 prema bodovnom sustavu NASH CRN.

## 6. RASPRAVA

NAFLD, najčešća kronična bolest jetre u svijetu i značajan javno zdravstveni problem, karakterizirana je nerazjašnjenom patogenezom i nezadovoljavajućom neinvazivnom dijagnostikom što je uzrok empirijskim terapijskim mjerama temeljenim većinom na promjeni životnih navika. Budući da obuhvaća široki spektar jetrene ozljede u obliku blage do izražene steatoze, od jednostavne steatoze do izražene upale, fibroze i HCC-a, brojna istraživanja provode se u svrhu definiranja patogeneze bolesti, a sve radi razvoja prijeko potrebnih neinvazivnih dijagnostičkih metoda i adekvatne farmakoterapije. Još uvijek postoje podijeljena mišljenja da li su NAFL i NASH zasebne bolesti s vlastitim patogenetskim mehanizmima ili oblici iste bolesti te ako jesu koji faktor uvjetuje razvoj progresivnog oblika bolesti. Od velike koristi bi posebice značilo otkriće faktora koji sudjeluju u početnim fazama bolesti budući da bi njihova modifikacija mogla prevenirati ne samo razvoj progresivnih oblika NAFLD-a već i komplikacije bolesti jetre.

Temeljem eksperimentalnih studija jedan od faktora koji se pokazao da bi mogao imati ulogu u početnim fazama razvoja NAFLD-a je cav-1. Iako je njegova uloga u metabolizmu masti, šećernoj bolesti i proliferaciji hepatocita ekstenzivnije istraživana, postoji samo nekoliko eksperimentalnih studija koje su istraživale moguću ulogu u NAFLD-u (124,125,153,154). Mastrodonato i sur. su prvi pokazali, a kasnije i Qui i sur. da hepatociti u kontrolnim animalnim modelima pokazuju pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na cav-1 u staničnim membranama hepatocita dok je u steatotičnim hepatocitima ta reakcija vidljiva dodatno u citoplazmi hepatocita i lipidnim kapljicama (124,125). Pretpostavlja se da je povećana ekspresija cav-1 u citoplazmi posljedica povećane ekspresije u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. Budući da nije viđeno strukturnih promjena mitohondrija steatotičnih hepatocita Mastrodonato i sur. su mišljenja da se radi o povišenoj ekspresiji cav-1 na unutarnjoj membrani mitohondrija kao kompenzatornom odgovoru na funkcionalne promjene najvjerojatnije u njegovom ionskom i molekularnom transportu uslijed oksidativnog stresa (125). Ovo je prvo istraživanje do sada u kojem se ispitala ekspresija i distribucija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om, njihova korelacija s progresijom bolesti, MS-om, demografskim, sonografskim i laboratorijskim karakteristikama ispitanika. U našem istraživanju pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u hepatocitima kontrolne skupine nalazila se u svih ispitanika (100%) isključivo na staničnoj

membrani hepatocita dok je u citoplazmi hepatocita svih kontrolnih ispitanika ta reakcija izostala. U 59 (89,4%) bolesnika s NAFLD-om potvrđena je pozitivna imunohistokemijska reakcija na cav-1 u citoplazmi hepatocita dok je u ostalih 7 (10,6%) ispitanika izostala. Usporedbom ekspresije cav-1 u bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ). Naši rezultati odgovaraju rezultatima ranijih eksperimentalnih istraživanja potvrđujući time da je ekspresija cav-1 povišena u citoplazmi hepatocita bolesnika s NAFLD-om. Steatotični hepatociti u eksperimentalnim, a i naših ispitanika s NAFLD-om, su karakterizirani akumuliranim masnim kiselinama koje najvjerojatnije stimuliraju translokaciju cav-1 iz stanične membrane u intracitoplazmatske organele i masne kapljice zbog čega je njegova ekspresija u citoplazmi povišena (119). Oh i sur. su pokazali da orhidektomirani JYD miševi, koji inače starenjem razviju šećernu bolest tip 2, imaju bolju inzulinsku osjetljivost, niže vrijednosti glikemije te povećanu ekspresiju cav-1 i signalnih molekula inzulina u adipoznom tkivu i skeletnom mišićju sugerirajući time da muški spolni hormoni mogu utjecati na ekspresiju cav-1 u perifernom tkivu i razvoju inzulinske rezistencije odnosno šećerne bolesti tip 2 (155). U našoj kohorti bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom cav-1 su bili značajno češće muškog spola u odnosu na skupinu sa sniženom ekspresijom cav-1 u citoplazmi hepatocita ( $X^2$ ,  $p = 0,024$ ). Da li je to samo rezultat općenito povišene prevalencije NAFLD-a među muškim spolom, što je bio slučaj i u našem istraživanju, ili spol doista ima utjecaj na ekspresiju cav-1 potrebno je istražiti na većem uzorku. Zanimljivo je da su bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom cav-1 bili prosječno mlađi u odnosu na one sa sniženom ekspresijom cav-1 što je bilo i statistički značajno (Mann-Whitney U test,  $p = 0,010$ ).

Kriterije za metabolički sindrom, prema definiciji IDF-a, u našoj kohorti zadovoljilo je 38 (61,3%) bolesnika s NAFLD-om. Izraziti udio (80,6%) je bio zapažen u skupini bolesnika s NASH-om potvrđujući time dosadašnje rezultate istraživanja koji su ukazali na povezanost MS-a i izraženijih patohistoloških karakteristika, odnosno težih oblika bolesti, misleći pritom na NASH i fibrozu (54,156). Svi (100%) su bolesnici s NAFLD-om i negativnom ekspresijom cav-1 zadovoljili kriterije za MS za razliku od samo 57,1% bolesnika s pozitivnom ekspresijom cav-1. Naši rezultati ukazuju da bolesnici s NAFLD-om i sniženom ekspresijom cav-1 imaju značajno češće prisutan MS ( $p = 0,041$ ) u odnosu na one s povišenom ekspresijom cav-1. Od sastavnica MS-a jedino je razlika u povišenoj glikemiji natašte bila statistički značajna kada su uspoređene grupe s povišenom i sniženom ekspresijom cav-1 ( $p = 0,038$ ). Bolesnici s NAFLD-om i sniženom

ekspresijom cav-1 imali su značajno češće hiperglikemiju natašte u odnosu na bolesnike s povišenom ekspresijom cav-1. *In vitro*, mišji cav-1 deficijenti 3T3-L1 adipociti su karakterizirani sniženim transportom glukoze posredovanim inzulinom, premještanjem GLUT-4 iz citoplazme na staničnu membranu i aktivacijom inzulinskog receptora zajedno rezultirajući inzulinskom rezistencijom. Pokazalo se da interakcija cav-1 i inzulina, koji se veže direktno za skafoidnu domenu cav-1, pojačava inzulinom posredovanu fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora 1 i da je integritet kaveola prijeko potreban za inzulinsku signalizaciju u adipocitima (157). Međutim, uloga cav-1 u inzulinskoj signalizaciji u hepatocitima se pokazala drugačijom. *In vivo*, mišji modeli hranjeni hranom bogatom kolesterolom pokazali su značajno povišenu ekspresiju cav-1 (66%,  $p < 0,05$ ) i cav-2 (55%  $p < 0,05$ ) u kaveolama hepatocita kao i 25%-tno povišenje lokalizacije inzulinskog receptora u kaveolama u odnosu na nekaveolarnu lokalizaciju. Iako je aktivacija inzulinom posredovanog inzulinskog receptora bila povišena u kaveolama daljnje molekule u signalizacijskom lancu (IRS-1 i Akt) su pokazale sniženu aktivaciju i time stanje inzulinske rezistencije u jetri (158). Inzulin nije doveo do fosforilacije cav-1 u ispitivanim animalnim modelima. Naši rezultati ukazuju da su indirektni znakovi inzulinske rezistencije, MS i hiperglikemija natašte, bili češće prisutni u bolesnika s NAFLD-om i sniženom ekspresijom cav-1.

Kada je uspoređena izraženost cav-1 unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om, odnosno bolesnici s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), nije nađeno statistički signifikantne razlike ( $p = 0,199$ ). U obje podgrupe (NASH 84,4%, NAFL/granični nalaz 94,1%) povišena ekspresija cav-1 je bila gotovo u svih bolesnika što i nije iznenađujuće jer je pretpostavljeno da ekspresija cav-1 raste sa stupanjem steatoze, jednom od odrednica progresije NAFLD-a, koja može biti visokog stupnja u obje podskupine. Iako korelacija stupnja steatoze i ekspresije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u ovom istraživanju nije bila statistički značajna ( $p = 1,000$ ), uspoređujući bolesnike ovisno o ekspresiji cav-1 i stupnju steatoze pokazalo se da rastom stupnja steatoze raste i broj bolesnika s povišenom ekspresijom cav-1. Najveći broj bolesnika (40,7%) s povišenom ekspresijom cav-1 prezentirao se u trenutku dijagnoze s 3. stupnjem steatoze (>66% steatotičnih hepatocita). Ovi rezultati su u suglasnosti s ranijim studijama u kojima je raznim tehnikama mjerenja razina proteina cav-1 bila više od dvostruko povećana u steatotičnoj jetri u odnosu na kontrolni uzorak (124,125).

Temeljeno poznatim da je steatoza u jetri najranije vidljiva u zoni 3 jetrenog acinusa (perivenularno), da su Mastrodonato i sur. pokazali na animalnom modelu da je imunoreaktivnost na cav-1 veća u zoni 3 u odnosu na zonu 1 i 2 te da do sada nije ispitivana distribucija cav-1 u jetri eksperimentalnih modela i bolesnika s NAFLD-om, imunohistokemijska reakcija na cav-1 u zoni 3 jetrenog acinusa definirana je kao normalna distribucija (125). U slučaju vidljive pozitivne imunohistokemijske reakcije na cav-1 u hepatocitima periportalno i translobularno nalaz je definiran kao promijenjena distribucija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om. Samo je jedan ispitanik u kontrolnoj skupini imao promijenjenu distribuciju cav-1 (6,7%) za razliku od bolesnika u skupini s NAFLD-om od kojih je 69,7% (46 bolesnika) imalo promijenjenu distribuciju što se pokazalo i statistički značajno ( $p < 0,001$ ) potvrđujući time jedan dio hipoteze ovog istraživanja, odnosno da je distribucija cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om promijenjena.

Iako su NAFLD bolesnici s nepromijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima u odnosu na bolesnike s promijenjenom distribucijom imali češće prisutan MS statistički značajna razlika nije nađena ( $p = 0,578$ ). Ukoliko se promatraju pojedine sastavnice MS-a, sve su bile učestalije u bolesnika s nepromijenjenom distribucijom cav-1, no samo je razlika u arterijskoj hipertenziji bila statistički značajna ( $p = 0,048$ ). U našem istraživanju bolesnici s nepromijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima imali su značajno češće arterijsku hipertenziju u odnosu na bolesnike s promijenjenom distribucijom cav-1. Centralna pretilost je determinirana opsegom bedara i struka čija je vrijednost u bolesnika s promijenjenom distribucijom cav-1 bila značajno veća, s medijanom 111 cm (25.-75. percentila 100-120 cm) u odnosu na bolesnike s nepromijenjenom distribucijom cav-1 u kojih je medijan bio 90,5 cm (25.-75. percentila 86-95,75 cm) ( $p < 0,001$ ). Opseg bedara je također bio značajno veći u bolesnika s promijenjenom distribucijom (medijan 54 cm, 25.-75. percentila 52-58 cm) u odnosu na bolesnike s nepromijenjenom distribucijom cav-1 (medijan 47,5 cm, 25.-75. percentila 44,5-51 cm) ( $p = 0,016$ ). Ovi rezultati odgovaraju dosadašnjim rezultatima eksperimentalnih studija koje ukazuju da su cav-1 deficijentni miševi rezistentni na hranom uzrokovanu pretilost te da su njihovi adipociti manji veličinom i slabije diferencirani (117,119). Od svih istraživanih laboratorijskih znakova lezije jetre jedino se bilirubin pokazao statistički značajnim ( $p = 0,047$ ) obzirom na distribuciju cav-1. Naime, bolesnici s NAFLD-om i promijenjenom distribucijom cav-1 imali su značajno češće povišene vrijednosti bilirubina. Mora se napomenuti da je u kohorti

samo 8 bolesnika imalo hiperbilirubinemiju te je za definitivne zaključke potrebno provesti istraživanje na većem broju. Uzrok hiperbilirubinemije nije se razjašnjavao što je i previše zahtjevno posebice u zajednicama kao što je Hrvatska u kojima su Mb. Gilbert i talasemija minor izuzetno česta i preklapajuća kazuistika.

Kada je uspoređena distribucija cav-1 unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om, odnosno bolesnika s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), nije nađeno statistički signifikantne razlike ( $p=0,709$ ). Iako korelacija stupnja steatoze i distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u ovom istraživanju nije bila statistički značajna ( $p=0,328$ ), promatrajući izraženost steatoze i udio bolesnika s promijenjenom distribucijom cav-1 može se vidjeti da je udio bolesnika pozitivno korelirao sa stupnjem steatoze, a najveći broj bolesnika s promijenjenom distribucijom cav-1 se upravo prezentirao 3. stupnjem steatoze (19 bolesnika/41,3%) u trenutku dijagnoze. Zaključno se može reći da bolesnike s NAFLD-om karakterizira ne samo povećana već i promijenjena intracelularna ekspresija te distribucija cav-1 u hepatocitima. Obzirom na naše pivotalne rezultate o ekspresiji i distribuciji cav-1 u bolesnicima s NAFLD-om te da prehrana bogata kolesterolom, *in vitro* i *in vivo*, vodi ka povećanju ekspresije cav-1 u kaveolama staničnih membrana hepatocita koji se smatra protektivnim mehanizmom od akumulacije kolesterola u hepatocitima, i promijenjenoj aktivnosti inzulinom induciranih inzulinskih receptora, nameću se razmišljanja da li određena prehrana ili lijekovi mogu promijeniti ekspresiju i distribuciju cav-1 i time prevenirati steatozu jetre. Budući da NAFLD karakterizira steatoza jetre i oksidativni stres možda bi terapija s ciljem redukcije oksidativnog stresa ujedno dovela do intracelularne redistribucije cav-1 i redukcije steatoze.

Budući da postoje rezultati studija koji ukazuju da bi TGF- $\beta$ 1 mogao biti potencijalni prediktor fibroze ali i NASH-a te da njegove serumske vrijednosti koreliraju s razinom inzulina u serumu i HOMA-IR-om hipoteza ovog istraživanja je da bolesnici s NAFLD-om i MS-om imaju povećanu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 i promijenjenu distribuciju u hepatocitima te da ekspresija i distribucija koreliraju s progresijom bolesti (145-147). U ovom istraživanju korištena su antitijela na TGF- $\beta$  koja pokazuju imunohistokemijsku reakciju na TGF- $\beta$ 1 koja je promatrana prvenstveno u hepatocitima. S obzirom na to da su dosadašnje studije na bolesnicima s NAFLD-om bile bazirane na mjerenju koncentracije TGF- $\beta$ 1 u serumu u svrhu korištenja ovog biomarkera kao neinvazivnu metodu za predikciju NASH-a i fibroze, a s kontradiktornim rezultatima, svrha našeg istraživanja bila je istražiti ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u jetrenom parenhimu, odnosno

hepatocitima. Budući da prema našim saznanjima nije provedeno istraživanje kojim se procjenjivala imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$ 1 u hepatocitima eksperimentalnih modela i bolesnika s NAFLD-om ekspresija je određivana prema onoj korištenoj u studiji u Goma i sur. na bolesnicima s hepatitis C infekcijom dok je distribucija određivana sukladno poznatom načinu progresije fibroze u jetrenom parenhimu (152).

Snižena ekspresija TGF- $\beta$  u hepatocitima kontrolne skupine zapažena je u 14 (93,3%) ispitanika, dok je u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om snižena ekspresija nađena u 26 (39,4%), a povišena u 40 (60,6%) bolesnika. Usporedbom izraženosti TGF- $\beta$  u navedene dvije skupine nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) i time potvrđen dio hipoteze da je ekspresija TGF- $\beta$  povišena u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om. No međutim kada je uspoređena snižena i povišena ekspresija TGF- $\beta$  unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om nije nađena statistički signifikantna razlika ( $p = 0,482$ ) između bolesnika s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz). Također je učinjena i korelacija ekspresije TGF- $\beta$  s patohistološkim značajkama ispitanika no nije nađena njihova statistički značajna korelacija (Tablica 25). Naši rezultati sukladni su rezultatima ranijih studija koji su ukazivali da su vrijednosti TGF- $\beta$ 1 povišene u bolesnika s NAFLD-om ali ne i u serumu bolesnika s NASH/fibrozo u odnosu na bolesnike s jednostavnom steatozom (148,150). Dvije su mogućnosti koje mogu opravdati navedeno. TGF- $\beta$  je najvjerojatnije pokazatelj apoptoze, a ne upalne aktivnosti u sklopu NASH-a te je indirektni pretkazatelj aktivacije stelatnih stanica koja je povišena već u inicijalnim stadijima fibroze koja još nije vidljiva u patohistološkom nalazu. Ukoliko se usporede stadiji fibroze vidljivo da je najveći broj ispitanika s povišenom TGF- $\beta$  ekspresijom imao perisinusoidalnu fibrozu zone 3 i portalnu/periportalnu fibrozu. MS je unutar skupine bolesnika s niskom ekspresijom TGF- $\beta$  bio prisutan u 15 (65,2%) bolesnika, a u bolesnika s povišenom ekspresijom TGF- $\beta$  u 23 (59%) bolesnika ( $p = 0,626$ ).

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  u hepatocitima kontrolne skupine nalazila se zoni 3 jetrenog acinusa u 13 (86,7%) bolesnika te samo u dva bolesnika translobularno (13,3%), dok je 42 (63,6%) bolesnika s NAFLD-om imalo promijenjenu distribuciju TGF- $\beta$  u hepatocitima, odnosno pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na TGF- $\beta$  translobularno i periportalno. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na TGF- $\beta$  samo u zoni 3 jetrenog acinusa označena je kao nepromijenjena distribucija TGF- $\beta$  dok ukoliko je ista reakcija viđena translobularno i periportalno označena je kao promijenjena. Usporedbom distribucije TGF- $\beta$



između hepatocita u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitivanu skupinu s NAFLD-om nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ). Kada je uspoređena distribucija TGF- $\beta$  unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om, odnosno bolesnika s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz), nije nađeno statistički signifikantne razlike ( $p = 0,402$ ). Također nije nađeno statistički značajne razlike u pristnosti MS-a u bolesnika s NAFLD-om između ispitivanih skupina promijenjene i nepromijenjene ekspresije TGF- $\beta$ . MS je unutar skupine bolesnika s promijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  bio prisutan u 25 (61,0%) bolesnika, a u bolesnika s nepromijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  u 13 (61,9%) bolesnika. Učinjena je korelacija distribucije TGF- $\beta$  s patohistološkim značajkama ispitanika no nije nađena njihova statistički značajna korelacija. Najveći udio bolesnika s promijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  je imao perisinusoidalnu fibrozu zone 3 i portalnu/perportalnu fibrozu.

## 7. ZAKLJUČCI

1. U trenutku dijagnoze, najveći udio bolesnika s NAFLD-om u našoj kohorti bio je karakteriziran izraženom steatozom, značajnom nekroinflamatornom aktivnošću te već minimalno razvijenom blagom perisinusoidalnom/pericelularnom fibrozom zone 3 jetrenog acinusa dok nitko od ispitanika nije imao razvijenu cirozu.
2. Niti jedan ispitanik iz kontrolne skupine nije imao povišenu ekspresiju cav-1 u hepatocitima koja je bila vidljiva u 59 (89,4%) bolesnika s NAFLD-om. Samo je jedan ispitanik u kontrolnoj skupini imao promijenjenu distribuciju cav-1 (6,7%) za razliku od bolesnika u skupini s NAFLD-om od kojih je 69,7% (46 bolesnika) imalo promijenjenu distribuciju cav-1. Usporedbom ekspresije i distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) čime smo potvrdili da je ekspresija cav-1 povišena, a distribucija promijenjena u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.
3. U obje podgrupe (NASH 84,4%, NAFL/granični nalaz 94,1%) je gotovo u svih bolesnika bila povišena ekspresija cav-1 dok je promijenjenu distribuciju cav-1 u grupi s NASH-om imalo 23 (71,9%), a u NAFL/granični nalaz 23 (67,6%) bolesnika. Kada su uspoređene ekspresija ( $p = 0,199$ ) i distribucija ( $p = 0,709$ ) cav-1 unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om nije nađeno statistički značajne razlike. Najveći broj bolesnika (40,7%) s povišenom ekspresijom i promijenjenom distribucijom cav-1 (41,3%) prezentirao se u trenutku dijagnoze s 3. stupnjem steatoze, a njihov udio je rastao sa stupnjem steatoze. Korelacija stupnja steatoze s ekspresijom i distribucijom cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u ovom istraživanju nije bila statistički značajna. Zaključno se može reći da cav-1 nije prediktor nealkoholnog steatohepatitisa.
4. Bolesnici s NAFLD-om i sniženom ekspresijom cav-1 imali su značajno češće prisutan MS ( $p = 0,041$ ) i hiperglikemiju natašte ( $p = 0,038$ ) u odnosu na bolesnike s pozitivnom ekspresijom cav-1. Iako su bolesnici s NAFLD-om i nepromijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima imali češće prisutan MS u odnosu na bolesnike s promijenjenom distribucijom, statistički značajna razlika nije nađena ( $p = 0,578$ ). No međutim opseg struka ( $p < 0,001$ ) i bedara ( $p = 0,016$ ) koji determiniraju centralnu pretilost, koja je obligatorna sastavnica MS-a prema IDF kriterijima, su bili značajno veći u bolesnika s

promijenjenom distribucijom cav-1. Bolesnici s promijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima imali su češće normotenzivne vrijednosti tlaka ( $p=0,048$ ).

5. Bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom cav-1 bili su značajno češće muškog spola u odnosu na skupinu sa sniženom ekspresijom cav-1 ( $X^2$ ,  $p=0,024$ ).
6. Bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom cav-1 bili su prosječno mlađi u odnosu na one sa sniženom ekspresijom cav-1 što je bilo i statistički značajno (Mann-Whitney U test,  $p=0,010$ ).
7. Ekspresija TGF- $\beta$  je značajno češće povišena ( $p<0,001$ ), a distribucija promijenjena ( $p<0,001$ ) u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om.
8. Povišena ekspresija TGF- $\beta$  ( $p=0,482$ ) i promijenjena distribucija TGF- $\beta$  ( $p=0,402$ ) nisu se značajno razlikovale u bolesnika s NASH-om u odnosu na ostale (NAFL/granični nalaz). U ovom istraživanju TGF- $\beta$  se nije pokazao kao mogući prediktor NASH-a niti fibroze.
9. Bolesnici s NAFLD-om koji su imali povišenu ekspresiju ( $p=0,626$ ) i promijenjenu distribuciju TGF- $\beta$  ( $p=0,943$ ) nisu imali značajno češće prisutan MS.

## 8. SAŽETAK

NAFLD zbog svoje visoke prevalencije i mogućih teških posljedica predstavlja značajan klinički problem, a naše spoznaje o patofiziologiji su još uvijek nedostatne i samim time dijagnostičke i terapijske mogućnosti. Ciljevi ovog istraživanja su bili ispitati ekspresiju i distribuciju cav-1 i TGF- $\beta$  u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om te ih usporediti s patohistološkom slikom, korelirati sa stadijem bolesti, prisustvom MS-a i njegovih sastavnica, biokemijskim markerima bolesti jetre i sonografskim karakteristikama. U ovo prospektivno istraživanje uključeno je 66 bolesnika s NAFLD-om i 15 kontrolnih ispitanika. Bioptati jetre su dobiveni u skupini s NAFLD-om slijepom biopsijom jetre, a u kontrolnoj resekcijom zbog fokalne lezije jetre. Učinjena je patohistološka analiza svih bioptata jetre i dodatno analizirana imunohistokemijska reakcija u hepatocitima na cav-1 i TGF- $\beta$ . U našem istraživanju niti jedan ispitanik iz kontrolne skupine nije imao povišenu ekspresiju cav-1 u hepatocitima dok je ista bila vidljiva u 59 (89,4%) bolesnika s NAFLD-om. Značajno češće su bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom cav-1 u hepatocitima bili mlađi (Mann-Whitney U test,  $p=0,010$ ) muškarci ( $X^2$ ,  $p=0,024$ ). Promijenjenu distribuciju cav-1 u hepatocitima imao je samo jedan ispitanik u kontrolnoj skupini (6,7%) za razliku od 46 (69,7%) bolesnika s NAFLD-om. Usporedbom ekspresije i distribucije cav-1 u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je statistički značajna razlika ( $p<0,001$ ). Unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om (NASH i NAFL/granični nalaz) nije nađeno statistički značajne razlike u ekspresiji ( $p=0,199$ ) i distribuciji ( $p=0,709$ ) cav-1 u hepatocitima. Najveći broj bolesnika s povišenom ekspresijom (40,7%) i promijenjenom distribucijom (41,3%) cav-1 se prezentirao u trenutku dijagnoze 3. stupnjem steatoze, a njihov udio rastao je sa izraženošću steatoze. Bolesnici s NAFLD-om i sniženom ekspresijom cav-1 imali su značajno češće prisutan MS ( $p=0,041$ ) i hiperglikemiju natašte ( $p=0,038$ ) u odnosu na bolesnike s povišenom ekspresijom cav-1. Iako su bolesnici s NAFLD-om i nepromijenjenom distribucijom cav-1 u hepatocitima imali češće MS u odnosu na bolesnike s promijenjenom distribucijom, statistički značajna razlika nije nađena ( $p=0,578$ ). Opseg struka ( $p<0,001$ ) i bedara ( $p=0,016$ ) koji determiniraju centralnu pretilost su bili značajno veći u bolesnika s promijenjenom distribucijom cav-1 dok su bolesnici s nepromijenjenom distribucijom cav-1 imali značajno češće arterijsku hipertenziju ( $p=0,048$ ). Ekspresija TGF- $\beta$  je bila češće povišena ( $p<0,001$ ), a distribucija promijenjena ( $p<0,001$ ) u

hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Bolesnici s NAFLD-om i povišenom ekspresijom ( $p=0,626$ ) te promijenjenom distribucijom TGF- $\beta$  ( $p=0,943$ ) nisu imali značajno češće prisutan MS. Unutar podskupina bolesnika s NAFLD-om (NASH i NAFL/granični nalaz) nije nađeno statistički značajne razlike u ekspresiji ( $p=0,482$ ) i distribuciji ( $p=0,402$ ) TGF- $\beta$  u hepatocitima.

Zaključno se može reći da je ovo prva studija na ljudima koja je potvrdila da je ekspresija cav-1 i TGF- $\beta$  povišena, a distribucija promijenjena u hepatocitima bolesnika s NAFLD-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Niti jedan biomarker se nije pokazao kao mogući prediktor NASH-a niti fibroze. Cav-1 je mogući novi marker steatoze i potencijalni terapijski cilj čijom bi se modifikacijom mogla prevenirati progresija NAFLD-a.

## 9. SUMMARY

### **Expression and distribution of caveolin-1 and transforming growth factor beta in hepatocytes of patients with nonalcoholic fatty liver disease**

NAFLD represents an emerging health problem because of its increasing prevalence, unresolved pathogenesis, inadequate diagnostic as well as therapeutic options. Cav-1 and TGF- $\beta$  are two biomarkers that were investigated in this study in order to determine their expression and distribution in hepatocytes of NAFLD patients, as well as their relations to pathohistological changes, presence of MS, levels of liver enzymes and ultrasound characteristics. We included 66 biopsy proven NAFLD patients and 15 controls that underwent liver resection due to non-diffuse liver disease. Pathohistological analysis of collected liver specimens was performed as well as additional immunohistochemical analysis of cav-1 and TGF- $\beta$  expression and distribution in hepatocytes. In NAFLD patients, cav-1 expression was positive in 59 (89.4%) cases while all controls had negative expression of cav-1 in cytoplasm of hepatocytes ( $X^2$ ,  $p < 0.001$ ). Patients with positive cav-1 expression were more likely younger (Mann-Whitney U test,  $p = 0.010$ ) and male ( $X^2$ ,  $p = 0.024$ ). Almost 70% of NAFLD patients had altered cav-1 distribution in comparison to the control group (6.7%), what was statistically significant ( $X^2$ ,  $p < 0.001$ ). NASH and NAFL/borderline groups had similar expression ( $p = 0.199$ ) and distribution ( $p = 0.709$ ) of cav-1 in hepatocytes. Proportion of patients with cav-1 positive expression and altered distribution positively correlated with severity of the liver steatosis. Patients that had negative cav-1 expression had more common MS ( $p = 0.041$ ) and detected fasting hyperglycemia ( $p = 0.038$ ). Ones with altered cav-1 distribution had larger waist ( $p < 0.001$ ) and thighs ( $p = 0.016$ ) circumference and more common normal blood pressure ( $X^2$ ,  $p = 0.048$ ). TGF- $\beta$  expression was higher ( $X^2$ ,  $p < 0.001$ ) and distribution altered ( $X^2$ ,  $p < 0.001$ ) in hepatocytes of NAFLD patients. Patients with NASH and NAFL/borderline group had similar expression ( $X^2$ ,  $p = 0.482$ ) and distribution ( $X^2$ ,  $p = 0.402$ ) of TGF- $\beta$  in hepatocytes. This is the first study that showed high expression of cav-1 and TGF- $\beta$  as well as their altered distribution in NAFLD patients compared to controls. Neither of these two biomarkers were shown as a possible predictor of NASH. Cav-1 is new and promising marker of liver steatosis and possible therapeutic target.

**Marija Gomerčić Palčić, Zagreb, 2015.**

## 10. LITERATURA

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
2. Schaffner F, Thaler H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* 1986;8:283-98.
3. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. Nonalcoholic fatty liver disease: multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:272-84.
4. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL i sur. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-73.
5. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
6. Bugianesi E, Leone N, Vanni E i sur. Expanding the Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Cryptogenic Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134-40.
7. Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C i sur. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006;43:682-9.
8. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972-8.
9. De Minicis S, Marzioni M, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. New insights in hepatocellular carcinoma: from bench to bedside. *Ann Transl Med* 2013;1:15.
10. Bhala N, Angulo P, van der Poorten D i sur. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis. An International Collaborative Study. *Hepatology* 2011;54:1208-16.
11. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011;94:311-21.
12. Suzuki A, Angulo P, Lymp J i sur. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology* 2005;41:64-71.

13. Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med* 2007;7:119-24.
14. Lee JY, Kim KM, Lee SG i sur. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007;47:239–44.
15. Zois CD, Baltayiannis GH, Bekiari A i sur. Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World J Gastroenterol* 2010;16:3944–9.
16. Amarapurkar A, Ghansar T. Fatty liver: experience from western India. *Ann Hepatol* 2007;6:37–40.
17. Yamamoto K, Takada Y, Fujimoto Y i sur. Nonalcoholic steatohepatitis in donors for living donor liver transplantation. *Transplantation* 2007;83:257–62.
18. Zhou YJ, Li YY, Nie YQ i sur. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol* 2007;13:6419–24.
19. Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol* 2003;38:954-61.
20. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44–52.
21. Caballería L, Pera G, Auladell MA i sur. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:24–32.
22. Williams CD, Stengel J, Asike MI i sur. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124–31.
23. Church TS, Kuk JL, Ross R, Priest EL, Biltoft E, Blair SN. Association of cardiorespiratory fitness, body mass index, and waist circumference to nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006;130:2023-30.
24. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011;53:1883–94.



25. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009;29:113-9.
26. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274-85.
27. Ong JP, Elariny H, Collantes R i sur. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2005;15:310–5.
28. Boza C, Riquelme A, Ibañez L i sur. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg* 2005;15:1148–53.
29. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
30. Reha JL, Lee S, Hofmann LJ. Prevalence and predictors of nonalcoholic steatohepatitis in obese patients undergoing bariatric surgery: a Department of Defense experience. *Am Surg* 2014;80:595-9.
31. Torres DM, Harrison SA. NAFLD: Predictive value of ALT levels for NASH and advanced fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:510-1.
32. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E i sur. 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.
33. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol* 2014;5:211-8.
34. Dodson MV, Mir PS, Hausman GJ i sur. Obesity, metabolic syndrome, and adipocytes. *J Lipids* 2011;2011:721686.
35. Anderson PJ, Critchley JA, Chan JC i sur. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1782–8.
36. Sadashiv, Tiwari S, Paul BN i sur. Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance. *World J Diabetes* 2012;3:135–41.
37. Indulekha K, Surendar J, Mohan V. High sensitivity C-reactive protein, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and vascular cell adhesion molecule-1 levels in Asian Indians with metabolic syndrome and insulin resistance (CURES-105). *J Diabetes Sci Technol* 2011;5:982–8.

38. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
39. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
40. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002;106:3143-421.
41. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469-80.
42. Šarić M, Škunca M, Ortner Hadžiabdić M, Božikov V. Metabolički sindrom - novi pristup u definiranju i liječenju. *Farmaceutski glasnik* 2013;5:333-45.
43. Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2010;2:180-93.
44. Martínez MA, Puig JG, Mora M i sur. Metabolic syndrome: prevalence, associated factors, and C-reactive protein: the MADRIC (MADrid RIEsgo Cardiovascular) Study. *Metabolism* 2008;57:1232-40.
45. Zanchetti A, Hennig M, Baurecht H i sur. Prevalence and incidence of the metabolic syndrome in the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA) and its relation with carotid intima-media thickness. *J Hypertens* 2007;25:2463-70.
46. Escobedo J, Schargrotsky H, Champagne B i sur. Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8:52.
47. Shen J, Goyal A, Sperling L. The emerging epidemic of obesity, diabetes, and the metabolic syndrome in china. *Cardiol Res Pract* 2012;2012:178675.
48. Lee J, Heng D, Ma S, Chew SK, Hughes K, Tai ES. The metabolic syndrome and mortality: the Singapore Cardiovascular Cohort Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:225-30.
49. Park HS, Kim SM, Lee JS i sur. Prevalence and trends of metabolic syndrome in Korea: Korean National Health and Nutrition Survey 1998-2001. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:50-8.

50. Tucak-Zorić S, Bilić Čurčić I, Mihalj H i sur. Prevalence of Metabolic Syndrome in the Interior of Croatia: The Baranja Region. *Coll Antropol* 2008;32:659–65.
51. Deka R, Narančić NS, Xip H i sur. Metabolic Syndrome in the Island Population of the Eastern Adriatic Coast of Croatia. *Coll Antropol* 2008;32:85–91.
52. Haukeland JW, Konopski Z, Linnestad P i sur. Abnormal glucose tolerance is a predictor of steatohepatitis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1469-77.
53. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G i sur. Non-alcoholic steatohepatitis in patients cared in metabolic units. *Diabetes Res Clin Pract* 2004;63:143-51.
54. Ryan MC, Wilson AM, Slavin J i sur. Associations between liver histology and severity of the metabolic syndrome in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2005;28:1222-4.
55. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.
56. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM i sur. NASH Clinical Research Network. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:913-24.
57. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:262-5.
58. Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;114: 842-5.
59. Yamaguchi K, Yang L, McCall S i sur. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-74.
60. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010;103:71-83.
61. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 2013;19:210-5.
62. Makowski L, Hotamisligil GS. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:543-8.
63. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829-38.

64. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006;4:107-10.
65. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52:1836-46.
66. Duvnjak M, Lerotić I, Baršić N, Tomašić V, Virović Jukić L, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:4539-50.
67. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004;8:445-54.
68. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F i sur. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-92.
69. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos Ch. The multi-hit process and the antagonistic roles of tumor necrosis factor-alpha and adiponectin in non alcoholic fatty liver disease. *Hippokratia* 2009;13:127.
70. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE i sur.; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology; American Gastroenterological Association. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol* 2012;107:811-26.
71. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE i sur. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011;54:344-53.
72. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:27-33.
73. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009;50:1072-8.
74. Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhouri N i sur. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 2011;54:1224-9.
75. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R i sur. European Liver Fibrosis Group. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-13.

76. Tanwar S, Trembling PM, Guha IN i sur. Validation of terminal peptide of procollagen III for the detection and assessment of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;57:103-11.
77. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010;59:1265-9.
78. Williams AL, Hoofnagle JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology* 1988;95:734-9.
79. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* 2008;57:1441-7.
80. Angulo P, Hui J, Marchesini G i sur. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007;45:846-54.
81. Palmentieri B, de Sio I, La Mura V i sur. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Dig Liver Dis* 2006;38:485–9.
82. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y i sur. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2708-15.
83. Wong VW, Vergniol J, Wong GL i sur. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:454-62.
84. Yoneda M, Suzuki K, Kato S i sur. Nonalcoholic fatty liver disease: US-based acoustic radiation force impulse elastography. *Radiology* 2010;256:640–7.
85. Tsochatzis EA, Gurusamy KS, Ntaoula S, Cholongitas E, Davidson BR, Burroughs AK. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol* 2011;54:650-9.
86. Loomba R, Wolfson T, Ang B i sur. Magnetic resonance elastography predicts advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a prospective study. *Hepatology* 2014;60:1920-8.
87. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:643-50.

88. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
89. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M i sur. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
90. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N i sur. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012;56:1751-9.
91. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterol* 2014;5:277-86.
92. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM i sur. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:121-9.
93. NICE. NICE Clinical guidelines. CG43 Obesity: the prevention, identification, assessment and management of overweight and obesity in adults and children. In: *Care NifHaCEaNCCfP*, ed., 2006.
94. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1396-402.
95. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012;56:944-51.
96. Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F i sur. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care* 2007;30:683-8.
97. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol* 2012;56:255-66.
98. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV i sur. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-85.
99. Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV i sur. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:1176-84.

100. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2007;298:1180-8.
101. Uygun A, Kadayifci A, Isik AT i sur. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537-44.
102. Shvets E, Ludwig A, Nichols BJ. News from the caves: update on the structure and function of caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:99-106.
103. Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 2010;20:177-86.
104. Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci* 2006;119:787-96.
105. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T i sur. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996;271:2255-61.
106. Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 1996;378:108-12.
107. Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG i sur. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 1992;118:1003-14.
108. Frühbeck G, López M, Diéguez C. Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:177-82.
109. Drab M, Verkade P, Elger M i sur. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;293:2449-52.
110. Smart EJ, Ying Ys, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996;271:29427-35.
111. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:185-94.
112. Hu Q, Zhang XJ, Liu CX, Wang XP, Zhang Y. PPARgamma1-induced caveolin-1 enhances cholesterol efflux and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res* 2010;47:69-79.
113. Trigatti BL, Anderson RG, Gerber GE. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:34-39.

114. Le Lay S, Blouin CM, Hajduch E, Dugail I. Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:514-8.
115. Frank PG, Pavlides S, Cheung MW, Daumer K, Lisanti MP. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:242-8.
116. Mayoral R, Fernandez-Martinez A, Roy R, Bosca L, Martin-Sanz P. Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology* 2007;46:813-22.
117. Razani B, Combs TP, Wang XB i sur. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002;277:8635-47.
118. Cohen AW, Razani B, Schubert W i sur. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 2004;53:1261-70.
119. Blouin CM, Le Lay S, Eberl A i sur. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res* 2010;51:945-56.
120. Truong TQ, Brodeur MR, Falstraalt L, Rhainds D, Brissette L. Expression of caveolin-1 in hepatic cells increases oxidized LDL uptake and preserves the expression of lipoprotein receptors. *J Cell Biochem* 2009;108:906-15.
121. Pohl J, Ring A, Stremmel W. Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J Lipid Res* 2002;43:1390-9.
122. Ivaturi S, Wooten CJ, Nguyen MD, Ness GC, Lopez D. Distribution of the LDL receptor within clathrin-coated pits and caveolae in rat and human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;445:422-7.
123. Frank PG, Pedraza A, Cohen DE, Lisanti MP. Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increases plasma high-density lipoprotein levels. *Biochemistry* 2001;40:10892-900.
124. Qiu Y, Liu S, Chen HT i sur. Upregulation of caveolin-1 and SR-B1 in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013;12:630-6.
125. Mastrodonato M, Calamita G, Rossi R i sur. Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis. *Eur J Clin Invest* 2011;41:642-51.



126. Truong TQ, Aubin D, Falstra L, Brodeur MR, Brissette L. SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells. *Cell Biochem Funct* 2010;28:480-9.
127. Wang L, Meng X, Zhang F. Raspberry ketone protects rats fed high-fat diets against nonalcoholic steatohepatitis. *J Med Food* 2012;15:495-503.
128. Pol A, Martin S, Fernandez MA i sur. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell* 2004;15:99-110.
129. Frank PG, Galbiati F, Volonte D i sur. Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1204-14.
130. Bosch M, Marí M, Herms A i sur. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol* 2011;21:681-6.
131. Bosch M, Marí M, Gross SP, Fernández-Checa JC, Pol A. Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease. *Traffic* 2012;12: 1483-9.
132. Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 2004;36:584-95.
133. Frank PG. Endothelial Caveolae and Caveolin-1 as Key Regulators of Atherosclerosis. *Am J Pathol* 2010;177:544-6.
134. Chen YH, Lin WW, Liu CS, Hsu LS, Lin YM, Su SL. Caveolin-1 provides palliation for adverse hepatic reactions in hypercholesterolemic rabbits. *PLoS One* 2014;9:e71862.
135. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* 2001;276:6727-38.
136. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A i sur. Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:213-9.
137. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996;7:363-74.
138. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807.
139. Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K i sur. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. *Hepatology* 2001;34:918-25.

140. De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor- $\beta$  gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997;26:886-93.
141. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:727-35.
142. Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- $\beta$  in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3:386-406.
143. Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:808-26.
144. Stärkel P, Sempoux C, Leclercq I i sur. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor- $\beta$  up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol* 2003;39:538-46.
145. Das SK, Balakrishnan V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. *Indian J Clin Biochem* 2011;26:202-9.
146. Mahmoud AA, Bakir AS, Shabana SS. Serum TGF- $\beta$ , Serum MMP-1, and HOMA-IR as non-invasive predictors of fibrosis in Egyptian patients with NAFLD. *Saudi J Gastroenterol* 2012;18:327-33.
147. Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1667-72.
148. Leite NC, Salles GF, Cardoso CR, Villela-Nogueira CA. Serum biomarkers in type 2 diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. *Hepatol Res* 2013;43:508-15.
149. Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC i sur. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006;130:1564-72.
150. Tarantino G, Conca P, Riccio A i sur. Enhanced serum concentrations of transforming growth factor-beta1 in simple fatty liver: is it really benign? *J Transl Med* 2008;6:72.
151. Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol* 2003;39:967-71.

152. Goma WM, Ibrahim MA, Shatat ME. Overexpression of cyclooxygenase-2 and transforming growth factor-beta 1 is an independent predictor of poor virological response to interferon therapy in chronic HCV genotype 4 patients. *Saudi J Gastroenterol* 2014;20:59-65.
153. Zhang Q, Liu J, Liu J, et al. oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1. *J Mol Endocrinol* 2014;53:281-93.
154. Stremmel W, Staffer S, Wannhoff A, Pathil A, Chamulitrat W. Plasma membrane phospholipase A2 controls hepatocellular fatty acid uptake and is responsive to pharmacological modulation: implications for nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J* 2014;28:3159-70.
155. Oh YS, Lee TS, Cheon GJ, Jang IS, Jun HS, Park SC. Modulation of insulin sensitivity and caveolin-1 expression by orchidectomy in a nonobese type 2 diabetes animal model. *Mol Med* 2011;17:4-11.
156. Kang H, Greenson JK, Omo JT et al. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2247-53.
157. González-Muñoz E, López-Iglesias C, Calvo M, Palacín M, Zorzano A, Camps M. Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 2009;150:3493-502.
158. Hahn-Obercyger M, Graeve L, Madar Z. A high-cholesterol diet increases the association between caveolae and insulin receptors in rat liver. *J Lipid Res* 2009;50:98-107.

## 11. ŽIVOTOPIS

Marija Gomerčić Palčić je rođena 24.7.1983. godine u Otočcu gdje je završila osnovnu školu.

Nakon završetka VII. Gimnazije u Zagrebu, 2001. godine je upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija obavljala je dužnost demonstratora na Katedri za patologiju. Diplomirala je 2007. godine, a nakon studija i obaveznog pripravničkog staža, 2008. godine položila je državni ispit.

Od 2008. godine zaposlena je kao znanstveni novak-asistent na projektu „Istraživanje nealkoholne masne bolesti jetre u sklopu metaboličkog sindroma“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Godine 2009. upisala je znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kojeg je uspješno završila 2013. godine.

U siječnju 2010. godine započela je s programom specijalizacije iz interne medicine na Klinici za unutarnje bolesti KBC „Sestre milosrdnice“ te u prosincu 2014. godine položila specijalistički ispit.

Bila je u organizacijskom odboru stručnih simpozija te u dva navrata dobitnik nagrade za sažetak u obliku postera na međunarodnim kongresima. Prisustvovala je na više međunarodnih stručnih i znanstvenih skupova vezanih uz područje gastroenterologije i hepatologije.

Autor je ili koautor 8 znanstvenih članaka objavljenih u indeksiranim časopisima (od toga 6 u časopisima indeksiranim u Current Contents), poglavlja u dvije stručne knjige i više kongresnih priopćenja.

Udata je i majka jedne kćeri.