

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ



Β' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Α. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ

PNPLA3 rs 738409, ΣΤΕΑΤΩΣΗ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ

ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2: ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ Α. ΜΕΡΙΤΣΗ

ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2022

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ



Β' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ Α. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ

PNPLA3 rs 738409, ΣΤΕΑΤΩΣΗ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ

ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2: ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ Α. ΜΕΡΙΤΣΗ

ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2022

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Ημερομηνία Αίτησης Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 07.03.2016

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 21.06.2016

Ημερομηνία Ορισμού Θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 12.09.2016

Ημερομηνία Τροποποίησης Θέματος: 09.02.2022

Ημερομηνία Καταθέσεως Διδακτορικής Διατριβής: 04.07.2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Αναστασία Θανοπούλου (Επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας - Σακχαρώδη Διαβήτη,

Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Σπήλιος Μανωλακόπουλος

Καθηγητής Παθολογίας - Γαστρεντερολογίας,

Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Δημήτρης Πεκτασίδης

Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας - Ογκολογίας,

Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:

Καθηγητής Γεράσιμος Σιάσιος

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Αναστασία Θανοπούλου (Επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας - Σακχαρώδη Διαβήτη,

Β' Παθολογική Κλινική,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

Σπήλιος Μανωλακόπουλος

Καθηγητής Παθολογίας - Γαστρεντερολογίας,

Β' Παθολογική Κλινική,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

Δημήτρης Πεκτασίδης

Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας - Ογκολογίας,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

Νικόλαος Τεντολούρης

Καθηγητής Παθολογίας,

Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

Αιμιλία Χατζηγιάννη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας,

Β' Παθολογική Κλινική,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

Αθανάσιος Ράπτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας - Σακχαρώδη Διαβήτη,

Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

Ελένη Μπουτάτη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας - Σακχαρώδη Διαβήτη,

Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική,

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

*Στον καρκίνο μου, τη μόνη σταθερά στη ζωή μου που με έμαθε να βλέπω τη ζωή και
τους ανθρώπους αλλιώς.*

*Και σε εκείνους που δεν πίστεψαν ποτέ στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής, που
αν και λίγοι ήταν σημαντικοί...*

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χηρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξιν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χηρὴ ποτε ἐκκαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποίεοντι, καὶ μὴ χηγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	17
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	18
ABSTRACT	20
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....	22
1.1. Εισαγωγή στο Σακχαρώδη Διαβήτη	22
1.2. Ταξινόμηση και κλινική εικόνα του Σακχαρώδη Διαβήτη.....	22
1.3. Επιδημιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη	25
1.4. Διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη	28
1.5. Επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη	29
1.5.1. Οξείες επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη.....	29
1.5.2. Χρόνιες επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη.....	33
1.6. Θεραπεία Σακχαρώδη Διαβήτη.....	36
2. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	40
2.1. Ορισμός και ταξινόμηση	40
2.2. Επιδημιολογία NAFLD	41
2.3. Παθοφυσιολογία NAFLD	46
2.3.1. Η θεωρία των δύο χτυπημάτων	46
2.3.2. Η θεωρία των πολλαπλών και παράλληλων χτυπημάτων	47
2.3.2.1. Μεταβολισμός των λιπιδίων και λιποτοξικότητα	49
2.3.2.2. Αντίσταση στην ινσουλίνη.....	49
2.3.2.3. Οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία	51
2.3.2.4. Φλεγμονή και κυτταρική απόπτωση	53
2.3.3. Εντερική μικροχλωρίδα	53
2.3.4. Ορμόνες λιπώδους ιστού	54
2.3.5. Διατροφικοί παράγοντες.....	54
2.3.6. Γενετικό υπόβαθρο της NAFLD και κύριοι γενετικοί επιβαρυντικοί πολυμορφισμοί	55
2.3.6.1. Κληρονομικότητα	55
2.3.6.2. Γενετικοί πολυμορφισμοί.....	56
2.3.6.2.1. PNPLA3	58

2.3.6.2.2. TM6SF2.....	66
2.4. Ιστολογική Εικόνα NAFLD.....	70
2.4.1. Άλλα ιστολογικά ευρήματα της NAFLD	74
2.5. Ο Ρόλος της Βιοψίας στη NAFLD	75
2.5.1. Επιβεβαίωση Διάγνωσης NAFLD	76
2.6. Εκτίμηση της σοβαρότητας της NAFLD	78
2.7. Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα στη NAFLD	81
2.7.1. Συμπτώματα - Κλινική εξέταση	81
2.7.2. Εργαστηριακός Έλεγχος.....	81
2.8. Ο ρόλος της απεικόνισης στο φάσμα της NAFLD.....	82
2.8.1. Απεικονιστικές μέθοδοι και στεάτωση	83
2.8.1.1. Υπερηχογράφημα.....	83
2.8.1.2. Controlled Attenuation Parameter (CAP)	83
2.8.1.3. Αξονική τομογραφία.....	84
2.8.1.4. MRI-PDFF (Magnetic Resonance Imaging Derived Proton Density Fat Fraction)	84
2.8.1.5. H-MRS (Hepatic Magnetic Resonance Spectroscopy)	85
2.8.2. Απεικονιστικές μέθοδοι και ίνωση.....	85
2.8.2.1. Fibroscan	85
2.8.2.2. pSWE (Point Swear Wave Elastography) ή ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse).....	86
2.8.2.3. 2D-3D SWE (2 Dimensional-3 Dimensional Swear Wave Elastography).....	87
2.8.2.4. MRE (Magnetic Resonance Elastography).....	88
2.9. Ο ρόλος των Βιοδεικτών και των Μαθηματικών αλγορίθμων στη διάγνωση και παρακολούθηση όλου του φάσματος της NAFLD	91
2.9.1. Βιοδείκτες και μαθηματικοί αλγόριθμοι για διάγνωση της NAFLD	91
2.9.1.1. Fatty Liver Index (FLI).....	91
2.9.1.2. Hepatic Steatosis Index (HIS)	91
2.9.1.3. NAFLD Liver Fat Score.....	92
2.9.1.4. SteatoTest.....	92
2.9.1.5. NAFLD Ridge Score	92
2.9.2. Βιοδείκτες και μαθηματικοί αλγόριθμοι για τη διάγνωση της NASH	93
2.9.2.1. Δείκτες απόπτωσης	93
2.9.2.2. Δείκτες φλεγμονής	94

2.9.3. Δείκτες οξειδωτικού stress	94
2.9.4. Δείκτες λυσοσωμικών ενζύμων	95
2.9.5. Αντιποκυτοκίνες και ορμόνες	95
2.9.6. Μαθηματικοί αλγόριθμοι στη διάγνωση της NASH	95
2.10. Βιοδείκτες και μαθηματικοί αλγόριθμοι στη διάγνωση και παρακολούθηση της ίνωσης και κίρρωσης.....	98
2.10.1. Μη κατοχυρωμένοι με πνευματικά δικαιώματα δείκτες και πίνακες	98
2.10.2. Ειδικοί δείκτες και αλγόριθμοι ίνωσης	98
2.11. Διαγνωστική αξία Fibromax στους ασθενείς με ΣΔΤ2 για τη διάγνωση της NAFLD	102
2.12. Φυσική Ιστορία της NAFLD.....	103
2.13. NAFLD και καρδιαγγειακός κίνδυνος	105
2.14. Θεραπεία της NAFLD	106
3. NAFLD και Μεταβολικό Σύνδρομο	109
4. NAFLD και Σακχαρώδης Διαβήτης.....	111
4.1. Κλινική προσέγγιση της NAFLD και του ΣΔΤ2.....	112
4.1.1. Η NAFLD συχνά προηγείται του ΣΔΤ2.....	112
4.1.2. Η παρουσία NAFLD προάγει τη συνεχή εξέλιξη του ΣΔΤ2.....	113
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	114
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	114
2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	114
2.1. Πληθυσμός της μελέτης	114
2.2. Μέθοδοι της μελέτης	115
2.2.1. Υπολογισμός FIBROMAX™, FIB-4 Index, APRI Index, NAFLD Fibrosis score και BARD score	118
2.2.2. Γενετική Ανάλυση	121
2.2.2.1. Απομόνωση Γενετικού Υλικού	121
2.2.2.2. Διαδικασία Απομόνωσης.....	121
2.2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA... ..	123
2.2.2.4. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs738409 στο γονίδιο <i>PNPLA3</i> και rs58542926 στο γονίδιο <i>TMS6FS2</i>	124
2.2.2.4.1. Σχεδιασμός πολυμορφισμού rs738409 στο γονίδιο <i>PNPLA3</i>	124
2.2.2.4.2. Σχεδιασμός πολυμορφισμού rs58542926 στο γονίδιο <i>TMS6FS2</i>	128
2.2.3. Εκτίμηση ηπατικής σκληρότητας με απεικονιστικές μεθόδους.....	132
2.2.4. Ποσοτική Μέτρηση Ηπατικής Στεάτωσης	134

2.3. Στατιστική ανάλυση	135
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	136
3.1. Ηπατική Στεάτωση και σχετικές αναλύσεις	141
3.2. Ηπατική ίνωση, βιοδείκτες και σχετικές αναλύσεις	149
3.3. Συσχετίσεις PNPLA3 rs 738409 και TM6SF2 με κλινικές, εργαστηριακές παραμέτρους ατόμων με ΣΔΤ2, HS και ηπατική ίνωση	158
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	187
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	188
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	194

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Αγγελική Μερίτση

Ημερομηνία γέννησης: 17/06/1975

Τόπος γέννησης: Αθήνα, Αττική

Υπηκοότητα: Ελληνική

ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ

Επιμελήτρια Β' (από 04/07/2019) στη Β' Παθολογική Κλινική του Ν.Ι.Μ.Τ.Σ.

Διευθύντρια: Δρ. Αναστασία Μαυρογιαννάκη

ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

- 10/08/2107 - 29/06/2018: Επιστημονικός συνεργάτης, Διαβητολογικό Κέντρο Β' Παθολογικής Κλινικής, ΓΝΑ Ιπποκράτειο
- 30/03/2015 - 09/08/2017: Ειδικευόμενη Παθολογίας, Β' Παθολογική Κλινική, ΓΝΑ Ιπποκράτειο
- 15/08/2011 - 10/09/2014: Specialty Doctor in Gastroenterology, Ninewells Hospital, Dundee, Scotland, UK
- 05/04/2011 - 02/08/2011: Core Medical Training 2 in Gastroenterology, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
- 02/12/2010 - 04/04/2011: Core Medical Training 2 in Cardiology, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
- 04/08/2010 - 01/12/2010: Core Medical Training 2 in Endocrinology, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
- 06/04/2010 - 03/08/2010: Core Medical Training 1 in Endocrinology, Ayr Hospital, Ayr, Scotland, UK
- 02/12/2009 - 05/04/2010: Core Medical Training 1 in Gastroenterology, Ayr Hospital, Ayr, Scotland, UK
- 05/08/2009 - 01/12/2009: Core Medical Training 1 in Cardiology, Ayr Hospital, Ayr, Scotland, UK

- 01/04/2009 - 04/08/2009: Foundation Year 2 in General Surgery, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
- 03/12/2008 - 31/03/2009: Foundation Year 2 in Emergency Medicine, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
- 06/08/2008 - 02/12/2008: Foundation Year 2 in Geriatrics, Mansionhouse Unit, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
- 02/04/2008 - 05/08/2008: Foundation Year 1 in General Medicine, Aberdeen Royal Infirmary Hospital, Aberdeen, Scotland, UK
- 05/12/2007 - 01/04/2008: Foundation Year 1 in Respiratory and Infectious Diseases, Aberdeen Royal Infirmary Hospital, Aberdeen, Scotland, UK
- 31/07/2007 - 04/12/2007: Foundation Year 1 in General Surgery, Aberdeen Royal Infirmary Hospital, Aberdeen, Scotland, UK
- 12/03/2007 - 22/06/2007: Clinical Attachment at the Professional Medical Unit of the Western Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK

ΠΤΥΧΙΑ - ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

- 01/2018: Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Παθολογίας
- 03/2014: Advanced Life Support (ALS) Certificate
- 06/2013: Certificate of Individual Competency in Endoscopy, Scotland, UK
- 08/2012: MRCP 2, Royal College of Physicians Edinburgh, Scotland, UK
- 06/2011: MRCP 1, Royal College of Physicians Edinburgh, Scotland, UK
- 10/2006: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Γενικός Βαθμός «Λίαν Καλώς», 7)
- 06/1999: Πτυχίο Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, ΤΕΙ Θεσσαλονίκης (Γενικός Βαθμός «Λίαν Καλώς», 8.4, Πρώτη στο Έτος Αποφοίτησης)
- 06/1997: Cambridge Examination in English for Language Teachers (CEELT) 2 - Grade B
- 12/1996: Practical Methodology Teaching Certificate
- 06/1996: Cambridge Certificate of Proficiency in English

ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

- 19/10/2006: Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος, Ελληνική Δημοκρατία, Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, Νομός Θεσσαλονίκης, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Θεσσαλονίκης, Γενική Διεύθυνση Ποιότητας Ζωής, Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας και Υγιεινής, Τμήμα Υπηρεσιών Υγείας

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ - ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 02/12/2021 - 04/12/2021: 19th World Congress on Insulin Resistance, Diabetes & Cardiovascular Disease
- 22/11/2021 - 26/11/2021: Ετήσια Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια για το Σακχαρώδη Διαβήτη «Βάσος Καραμάνος»
- 28/09/2021 - 01/10/2021: EASD Virtual Annual Meeting
- 25/06/2021 - 29/06/2021: American Diabetes Association Virtual 81st Scientific Sessions
- 02/06/2021 - 05/06/2021: 19^o Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα
- 09/2020 - 03/2021: Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στο Σακχαρώδη Διαβήτη (e-learning ΕΚΠΑ)
- 29/01/2021 - 30/01/2021: 11^o Κλινικό Φροντιστήριο Σακχαρώδους Διαβήτη
- 27/07/2020, 05/10/2020, 16/11/2020: Ο Σακχαρώδης Διαβήτης στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας (Webinars on Demand)
- 17/12/2020 - 19/12/2020: Από την Τεκμηριωμένη Γνώση στην Ορθή Κλινική Πράξη, Ελληνικό Κολέγιο Μεταβολικών Νοσημάτων
- 12/12/2020: 16^{os} Δεκάλογος για τις Λοιμώξεις
- 08/12/2020 & 11/12/2020: EASD EGIR-NAAFLD Abstract 2020
- 18/11/2020 - 19/11/2020: EWMA 2020 Virtual Meeting
- 21/09/2020 - 25/09/2020: EASD Virtual Meeting
- 03/09/2020 - 05/09/2020: Στρατηγικές στο Σακχαρώδη Διαβήτη και στους Καρδιομεταβολικούς Παράγοντες 2020
- 03/07/2020 - 04/07/2020: 13^o Θερινό Σχολείο Ελληνικής Εταιρείας Αθροσκήρωσης
- 16/09/2019 - 20/09/2019: EASD Annual Meeting, Barcelona
- 25/11/2019 - 29/11/2019: Ετήσια Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια για το Σακχαρώδη Διαβήτη «Βάσος Καραμάνος»
- 13/03/2019 - 16/03/2019: 17^o Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα
- 09/03/2018 - 12/03/2018: 44^o Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα
- 04/05/2018 - 06/05/2018: 16^o Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα
- 14/03/2018 - 17/03/2018: 16^o Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα
- 08/02/2013: Advance Gastroenterology and Hepatology Course, RCPE, Edinburgh, UK
- 25/01/2013: Colonoscopy Training Course, Ninewells Hospital, Dundee, UK
- 22/02/2012: Basic UGIE Course, Dundee, UK
- 31/07/2010: Spiral Blue Medical Procedures Course, London, UK
- 21/11/2008: Clinical Skills Course, Glasgow, UK
- 03/10/2007: Critical Care Course, Aberdeen, UK

AUDIT

1. 2010: AMT and Social History Documentation in Geriatric Patients in Admission, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
2. 2009: Reducing Regimen for Steroids on Discharge for IBD Patients, Ayr Hospital, Ayr, Scotland, UK
3. 2008: Management of Paracetamol Overdose in A&E, Victoria Infirmary Hospital, Glasgow, Scotland, UK
4. 2007: Fundoscopy in Acute Headache Admissions in AMAU, Aberdeen Royal Infirmary Hospital, Aberdeen, Scotland, UK

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2016 - 2017: Συμμετοχή στο πρόγραμμα εκπαίδευσης στο μάθημα της Ειδικής Νοσολογίας 6^{ου} εξαμήνου του τμήματος Οδοντιατρικής του ΕΚΠΑ
- 2013 - 2014: Επίβλεψη φοιτητών 5^{ου} έτους της Ιατρικής Σχολής του Dundee University για την ολοκλήρωση του project CT colonography vs colonoscopy
- 2011 - 2014: Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα των πρωτοετών και δευτεροετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής του Dundee University δύο φορές την εβδομάδα
- 1997 - 2006: Καθηγήτρια Αγγλικών σε φροντιστήριο Ξένων Γλωσσών, Θεσ/νίκη
- 2001: Συνεργασία με τον εκδοτικό οίκο Burlington

ΒΡΑΒΕΙΑ - ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 19/03/2013: Award for Excellence in Teaching 2013, The Faculty of Medical Educators, University of Dundee, Scotland, UK

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ:

1. **A. Meritsi**, D. Latsou, I. Tsoralis, M. Noutsou, E. Manesis, I. Gatos, I. Theotokas, P. Zoumpoulis, S. Rapti, E. Tsitsopoulos, H. Moshoyianni, S. Manolakopoulos, D. Pektasidis, A. Thanopoulou; Blood based biomarkers as non-invasive screening tools for hepatic steatosis in subjects with Type 2 Diabetes Mellitus, 19th Annual World Congress Insulin Resistance Diabetes & Cardiovascular Disease (19th WCIRDC), Los Angeles, USA, December 2021.

2. **A. Meritsi**, A. Thanopoulou, M. Noutsou, E. Tsitsopoulos, D. Savvidou, P. Koussis, H. Moshoyianni, P. Zoumpoulis, I. Ketikoglou, S. Manolakopoulos, D. Pektasidis, S. Dourakis, E. Manesis; Factors affecting hepatic steatosis in adult Greek subjects with Type2 Diabetes Mellitus (T2DM), 36th International Symposium on Diabetes and Nutrition Study Group (DNSG) of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Opatija, Croatia, June 2018.
3. J. Paterson, C. Shekar, C. Mowat, T. Heron, **A. Meritsi**, M. Groome; Challenging cases; Dealing with active Chron's in pregnancy, ECCO IBD, Copenhagen, Denmark, March 2014.
4. A. Morieux, C. Mowat, N. Reynolds, J. Todd, **A. Meritsi**; Sexual behaviour in patients attending an IBD clinic – should we ask about it?; ECCO IBD, Copenhagen, Denmark, March 2014.

ANAPTHMENEΣ ANAKOINΩΣΕΙΣ:

1. **A. Meritsi**, E. Manesis, M. Noutsou, P. Koussis, S. Rapti, D. Latsou, I. Tsorlalis, E. Tsitsopoulos, H. Moshoyianni, S. Manolakopoulos, D. Pektasidis, A. Thanopoulou; Factors associated with hepatic steatosis in adult Greek subjects with Type 2 Diabetes Mellitus; 19th Annual World Congress Insulin Resistance Diabetes & Cardiovascular Disease (19th WCIRDC), Los Angeles, USA, December 2021.
2. **A. Meritsi**, D. Latsou, E. Manesis, I. Tsorlalis, M. Noutsou, I. Gatos, I. Theotokas, P. Zoumpoulis, S. Rapti, E. Tsitsopoulos, P. Koussis, H. Moshoyianni, S. Manolakopoulos, D. Pektasidis, A. Thanopoulou; Noninvasive blood-based biomarkers as screening tools for hepatic fibrosis in subjects with Type 2 Diabetes, 57th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Virtual Meeting, September 2021.
3. **A. Meritsi**, E. Manesis, P. Koussis, E. Tsitsopoulos, I. Tsorlalis, M. Noutsou, H. Moshoyianni, S. Manolakopoulos, D. Pektasidis, S. Dourakis, A. Thanopoulou; Factors affecting hepatic steatosis in adult Caucasian patients with Type 2 Diabetes, 54th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Barcelona, September 2018.
4. **A. Meritsi**, A. Thanopoulou, M. Noutsou, E. Tsitsopoulos, P. Koussis, H. Moshoyianni, P. Zoumboulis, S. Dourakis, E. Manesis; Factors affecting hepatic steatosis (HS) in patients with Diabetes Mellitus Type 2, American Association for the Study of Liver Disease, San Francisco, CA, USA, November 2018.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ:

1. **A. Μερίτση**, Α. Θανοπούλου, Μ. Νούτσου, Ε. Τσιτσόπουλος, Π. Κούσσης, Δ. Σαββίδου, Χ. Μοσχογιάννη, Π. Ζουμπούλης, Ι. Κετίκογλου, Σ. Μανωλακόπουλος, Σ. Ντουράκης, Ε. Μάνεσης. Στεάτωση του ήπατος και παράγοντες που την επηρεάζουν σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, 44^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, Μάιος 2018.
2. **A. Μερίτση**, Α. Θανοπούλου, Ε. Τσιτσόπουλος, Π. Κούσσης, Χ. Μοσχογιάννη, Π. Ζουμπούλης, Ι. Κετίκογλου, Σ. Μανωλακόπουλος, Σ. Ντουράκης, Ε. Μάνεσης. Παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό ηπατικής στεάτωσης σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2. Επιλεγμένη Ανακοίνωση, 16^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, Μάιος 2018.
3. **A. Μερίτση**, Α. Θανοπούλου, Μ. Νούτσου, Ε. Τσιτσόπουλος, Π. Κούσσης, Δ. Σαββίδου, Χ. Μοσχογιάννη, Π. Ζουμπούλης, Ι. Κετίκογλου, Σ. Μανωλακόπουλος, Σ. Ντουράκης, Ε. Μάνεσης. Η ηπατική στεάτωση σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 και παράγοντες που την επηρεάζουν. 16^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, Μάρτιος 2018.

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ:

1. **A. Μερίτση**, Δ. Λάτσου, Μ. Νούτσου, Ε. Μάνεσης, Η. Γάτος, Ι. Θεοτοκάς, Π. Ζουμπούλης, Σ. Ράπτη, Ε. Τσιτσόπουλος, Π. Κούσσης, Χ. Μοσχογιάννη, Σ. Μανωλακόπουλος, Δ. Πεκτασίδης, Α. Θανοπούλου. Βιοδείκτες ως μη επεμβατικές μέθοδοι εκτίμησης της ηπατικής ίνωσης σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2. 19^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, Ιούνης 2021.

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΕΣ ΟΜΙΛΙΕΣ

1. **A. Μερίτση**. Είναι απαραίτητος ο έλεγχος για λιπώδη νόσο του ήπατος σε όλους τους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη; Ετήσια Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια για το Σακχαρώδη Διαβήτη «Βάσος Καραμάνος», Διαδικτυακή παρακολούθηση, Αθήνα, Ελλάδα, Νοέμβρης 2021.
2. **A. Μερίτση**. Λιπώδης Νόσος του ήπατος. Ετήσια Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια για το Σακχαρώδη Διαβήτη «Βάσος Καραμάνος», Αθήνα, Ελλάδα, 2019.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. PNPLA3 rs 738409 and other nongenetic factors associated with hepatic steatosis estimated by magnetic resonance imaging proton density fat fraction in adult Greek subjects with Type 2 Diabetes Mellitus; **Meritsi A**, Manesis E, Koussis P, Rapti S, Latsou D, Tsitsopoulos E, Moshoyianni H, Manolakopoulos S, Pektasidis D, Thanopoulou A. *Metab Syndr Relat Disord*. 2021 Dec 27.
2. Factors associated with hepatic steatosis in adult Greek subjects with type 2 diabetes mellitus; **Meritsi A**, Manesis E, Noutsou M, Koussis P, Rapti S, Latsou D, Tsorlalis I, Tsitsopoulos E, Moshoyianni H, Manolakopoulos S, Pektasides D, Thanopoulou A. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2022 March, 128:154968. doi:10.1016/j.metabol.2021.154968
3. Blood based biomarkers as non-invasive screening tools for hepatic fibrosis in subjects with Type 2 Diabetes Mellitus; **Meritsi A**, Latsou D, Tsorlalis I, Noutsou M, Manesis E, Gatos I, Theotokas I, Zoumpoulis P, Rapti S, Tsitsopoulos E, Moshoyianni H, Manolakopoulos S, Pektasides D, Thanopoulou A. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2022 March, 128: 154969. doi:10.1016/j.metabol.2021.154969
4. Non-invasive blood-based biomarkers as screening tools for hepatic fibrosis in people with Type 2 Diabetes Mellitus; **Meritsi A**, Latsou D, Manesis E, Gatos I, Theotokas I, Zoumpoulis P, Rapti S, Tsitsopoulos E, Moshoyianni H, Manolakopoulos S, Pektasides D, Thanopoulou A. *Clinical Diabetes*, 2022 March, cd210104. doi:10.2337/cd21-0104
5. Gastroenterology outpatient clinic: rectal pain and discharge associated with a history of receptive anal sex in women. A Morieux, C Mowat, N Reynolds, J Todd, **A Meritsi**, S Allstaff, M Groom; *HIV medicine* 15: 12 - 13, April 2014.
6. Sexual behaviours in patients attending an IBD clinic – should we ask about it? A. Morieux, C Mowat, N Reynolds, J Todd, **A Meritsi**, S Allstaff, M Groom; *Journal of Crohn’s and Colitis* 8: S25, February 2014.
7. Microscopic Colitis in Tayside – Further observations on clinical features and outcome; T Herron, C Mowat, M Groom, S Walsh, S Siddhi, **A Meritsi**; *Gut* 62 (Suppl 1): A258, June 2013.
8. Microscopic Colitis in Tayside – Further observations on clinical features, outcome and endoscopic findings. T Herron, C Mowat, **A Meritsi**, S Siddhi, M Groom, S Walsh; *Gastroenterology* 144 (5): S-483, May 2013.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Ελληνικά: μητρική γλώσσα
- Αγγλικά: άπταιστα

ΓΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

- Microsoft Office
- Windows
- XP Environment
- SPSS

ΜΕΛΟΣ ΣΥΛΛΟΓΩΝ

- Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών
- Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία
- General Medical Council
- Medical and Dental Defense Union of Scotland
- European Association of the Study of Diabetes

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας - Σακχαρώδη Διαβήτη κα Αναστασία Θανοπούλου για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντάς μου την παρούσα Διδακτορική Διατριβή, για την ουσιαστική καθοδήγηση και στήριξη αλλά κυρίως για το ότι δίπλα της έμαθα ότι η αξιοπρέπεια στην επιστήμη είναι μονόδρομος.

Τον Καθηγητή Παθολογίας - Γαστρεντερολογίας κο Σπήλιο Μανωλακόπουλο για την βοήθεια του στην πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Τον Ομότιμο Καθηγητή Παθολογίας - Ογκολογίας κο Δημήτρη Πεκτασίδη για την επιμονή του να ξεκινήσω την παρούσα διατριβή αλλά κυρίως για την ουσιαστική στήριξη και συμπαράσταση όταν όλα έμοιαζαν εξαιρετικά δυσσώιωνα.

Τον Ομότιμο Καθηγητή Παθολογίας - Ηπατολογίας κο Μανώλη Μάνεση για την υπόδειξή του να μελετηθεί ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός του PNPLA3 στα άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 στον ελληνικό πληθυσμό.

Τα μέλη της επταμελούς επιτροπής που δέχτηκαν πρόθυμα να συμμετάσχουν.

Την ομάδα της Βιοϊατρικής Αμπελοκήπων κα Χαρίκλεια Μοσχογιάννη, κο Στάθη Τσιτσόπουλο, κα Ματίνα Ράπτη, κα Δέσποινα Σαββίδου και κο Παναγιώτη Κούσση όπως αντίστοιχα και την ομάδα της Ηχοδιαγνωστικής κο Παύλο Ζουμπούλη, κο Ιωάννη Θεοτοκά και κο Ηλία Γάτο που με την άψογη οργάνωση και συνεργασία τους μου εξασφάλισαν τις ευνοϊκότερες προϋποθέσεις για την εκπόνηση της συγκεκριμένης Διατριβής.

Τη στατιστικολόγο κα Δήμητρα Λάτσου για τις καίριες γνώσεις της και το γεγονός ότι ήταν πάντοτε διαθέσιμη παρά το φόρτο εργασίας της.

Τους φίλους μου Δημήτρη, Νίκο, Βάσω, Ηλιάνα, Χριστόδουλο που με τη συνεχή κι αδιάλειπτη παρουσία τους στη ζωή μου δεν σταμάτησαν να με στηρίζουν και να με παροτρύνουν σε ό,τι κάνω.

Τους γονείς μου και την αδερφή μου, την πιο φανατική «θαυμάστριά» μου, από τότε που θυμάμαι τον εαυτό μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή - Σκοπός

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) αυξάνεται δραματικά παράλληλα με το Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 (ΣΔ2) που έχει πλέον πάρει διαστάσεις πανδημίας. Σκοπός της μελέτης ήταν η ανεύρεση παραγόντων που σχετίζονται με την ηπατική στεάτωση (HS) καθώς επίσης και η αξιολόγηση μη επεμβατικών βιοδεικτών για την εκτίμηση της ηπατικής ίνωσης σε Έλληνες με διαγνωσμένο ΣΔ2.

Μέθοδος

Στη μελέτη συμμετείχαν 120 εν σειρά εξετασθέντες ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΔ2 που παρακολουθούνται στο Διαβητολογικό Κέντρο της Πανεπιστημιακής Κλινικής του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Αθηνών. Έγινε πλήρης καταγραφή των δημογραφικών, κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων των εθελοντών. Η ποσοτική μέτρηση της HS έγινε λαμβάνοντας εγκάρσιες τομές του ήπατος με την ακολουθία των IQ IDEAL, σε μαγνητικό τομογράφο GE Discovery 3.0 Tesla (MRI-Proton Density Fat Fraction; MRI-PDFF) και ορίστηκε ως το πηλίκο του ποσοστού του συνολικού ηπατικού λίπους προς τον όγκο του ήπατος. Τιμή HS>5% θεωρήθηκε παθολογική. Επιπλέον υπολογίστηκε το FIBROMAX™ ένα panel τεσσάρων συστημάτων βαθμονόμησης κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων που περιλαμβάνει το SteatoTest, Acti Test, NashTest2 και FibroTest, για εκτίμηση της ηπατικής στεάτωσης, της φλεγμονώδους δραστηριότητας και των ηπατικών νεκροφλεγμονωδών βλαβών, της στεατοηπατίτιδας και της ηπατικής ίνωσης αντίστοιχα. Ο βαθμός ηπατικής σκληρότητας (LSM) υπολογίστηκε με τη μέθοδο Two Dimensional Shear Wave Elastography (2D SWE) (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France). Επίσης εκτιμήθηκε ο ρόλος του πολυμορφισμού του γονιδίου PNPLA3 (I148M) ως γενετικού παράγοντα συσχετιζόμενου τόσο με την HS όσο και με την LSM χρησιμοποιώντας βασικές γενετικές τεχνικές. Τέλος υπολογίστηκαν για κάθε εθελοντή πέραν του FIBROMAX™ το APRI Index, το NAFLD Fibrosis score, το BARD score και το FIB-4 Index.

Αποτελέσματα

Η μέση ηλικία των εθελοντών που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν περί τα 61,7 έτη, το 46% ήταν γυναίκες με ΣΔ2 περί τα 10 έτη και HbA1c 6,7%. Η μέση τιμή της ηπατικής στεάτωσης ήταν 7,8. Η συχνότητα του πολυμορφισμού του PNPLA3 rs 738409 CC/CG/GG ήταν 54,2%, 35%, και 10,8% αντίστοιχα. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση το PNPLA3 rs 738409 ($\beta=0,425$, $p=0,001$), η περίμετρος μέσης ($\beta=2,448$, $p=0,001$) και

το γυναικείο φύλο ($\beta=0,419$, $p=0,002$) σχετίζονταν ανεξάρτητα με την HS, ενώ φάνηκε ότι η διάρκεια του ΣΔ2 ($\beta=-0,179$, $p=0,011$) είχε αρνητική συσχέτιση με την HS. Επίσης από τους 120 εθελοντές που πήραν μέρος στη μελέτη μόνο 16 (14%) είχαν τιμές LSM>8,0 kPa. Από όλους τους βιοδείκτες (APRI score $p=0,001$, NAFLD Fibrosis score $p=0,408$, FIB-4 Index $p=0,658$, BARD score $p=0,701$, FibroTest $p=0,921$) το FibroTest ήταν διαγνωστικά πιο κοντά στις τιμές της LSM όπως αυτές υπολογίστηκαν με τη SWE. Επίσης η LSM ήταν άμεσα συσχετιζόμενη τόσο με το ActiTest ($r=0,405$, $p\leq 0,001$) όσο και με το NashTest2 ($r=0,299$, $p=0,002$). Σε γραμμική παλινδρόμηση, αύξηση των τιμών του ActiTest και του NashTest2, παρουσίαζε αντίστοιχη αύξηση των τιμών της LSM με τη μέθοδο της SWE κατά 5,632 ($p\leq 0,001$, C.I. 3,213-8,051) και 3,981 ($p\leq 0,001$, C.I. 2,398-5,563) φορές αντίστοιχα.

Συμπεράσματα

Η παρουσία HS στα άτομα με ΣΔ2 είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης ποικίλων παραγόντων, με κυρίαρχους την κεντρικού τύπου παχυσαρκία και τον πολυμορφισμό PNPLA3 rs 738409. Άτομα με ΣΔ2 ίσως χρειάζονται μοντέλα πρόβλεψης ηπατικής ίνωσης αποκλειστικά σχεδιασμένα για αυτά. Γενικεύσεις συμπερασμάτων από μελέτες ατόμων χωρίς ιστορικό ΣΔ2 σε διαβητικό πληθυσμό μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα.

ABSTRACT

Background and Objectives

NAFLD is dramatically increasing in parallel with the pandemic of Type 2 Diabetes Mellitus. We investigated factors associated with Hepatic Steatosis (HS) in adult Greek individuals with established Type 2 Diabetes Mellitus. We also aimed to assess the performance of the most commonly used non-invasive blood-based biomarkers for liver fibrosis in the population above.

Materials and Methods

We investigated 120 consecutive people with Type 2 Diabetes attending the Diabetic Outpatient Clinic at an Academic Hospital in Athens, Greece. All of them had demographic, clinical and biochemical data recorded. HS was estimated by Magnetic Resonance Imaging determined by Proton Density Fat Fraction software (MRI-PDFF) and defined as the percentage of total liver fat divided by the liver volume. HS of >5% was considered abnormal. The PNPLA3 (I148M) variant was evaluated as a genetic factor by standard molecular techniques. FIBROMAX™ including SteatoTest for estimation of hepatic steatosis, ActiTest for estimation of hepatic necroinflammatory activity, NashTest2 for estimation of steatohepatitis and Fibrotest for estimation of hepatic fibrosis was also calculated. Liver Stiffness Measurement (LSM) was estimated by Two-Dimensional Shear Wave Elastography (2D SWE) (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France). Apart from FIBROMAX™, APRI Index, NAFLD Fibrosis score, BARD score, FIB-4 Index, ActiTest and NashTest2 were also calculated.

Results

Of the 120 participants, median age was 61,7, 46% were females, diabetes duration was 10 years and HbA1c was 6,7%. The median value of HS was 7,8. The PNPLA3 rs 738409 CC/CG/GG genotype frequencies were 54,2%, 35% and 10,8% respectively. In multivariate analysis, PNPLA3 rs 738409 ($\beta=0,425$, $p=0,001$), waist circumference ($\beta=2,448$, $p=0,001$) and female sex ($\beta=0,419$, $p=0,002$) had a direct association with hepatic steatosis, while duration of diabetes ($\beta=-0,179$, $p=0,011$) had an inverse association with hepatic steatosis. Only 16 subjects (14%) had LSM >8,0 kPa. Among Fibrosis biomarkers APRI score ($p=0,001$), NAFLD Fibrosis score ($p=0,408$), FIB-4 Index ($p=0,658$), BARD score ($p=0,701$), FibroTest ($p=0,921$), FibroTest was more indicative of the LSM values estimated with SWE. LSM (SWE) was directly correlated with both ActiTest ($r=0.405$, $p\leq 0,001$) and NashTest2 ($r=0,299$, $p=0,002$). According to linear regression, an increase of the ActiTest and NashTest 2 values increases the

LSM values estimated with SWE by 5.632 times ($p \leq 0,001$, C.I. 3,213 – 8,051) and 3,981 times ($p \leq 0.001$, C.I. 2,398 – 5,563) respectively.

Conclusions

HS in Type 2 Diabetes is the sum of interplay of various factors exerting a direct or an inverse association, the most prominent among them being abdominal obesity and PNPLA3 molecular variability. Furthermore, people with Type 2 Diabetes Mellitus may require predictive models for hepatic fibrosis specifically developed for them. Extrapolation of results from non-diabetic population may result in misclassification.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1.1. Εισαγωγή στο Σακχαρώδη Διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) είναι ένα σύνδρομο με ετερογενές και πολυπαραγοντικό υπόστρωμα¹. Χαρακτηρίζεται από μία χρόνια μεταβολική διαταραχή των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, με κύρια έκφραση της την υπεργλυκαιμία και οφείλεται σε ελαττωμένη έκκριση ή δράση της ινσουλίνης ή σε συνδυασμό και των δύο^{1,2}. Η διαταραχή στην έκκριση της ινσουλίνης μπορεί να σημαίνει σχετική ή πλήρης αδυναμία έκκρισης ινσουλίνης, ενώ η διαταραχή στη δράση της ινσουλίνης, η λεγόμενη «αντίσταση στην ινσουλίνη», αφορά την παρεμπόδιση της ινσουλίνης να ασκήσει τη δράση της στους περιφερικούς ιστούς, παρά τα αυξημένα επίπεδα της στο αίμα, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή κάλυψη των αναγκών του μεταβολισμού^{2,3}.

1.2. Ταξινόμηση και κλινική εικόνα του Σακχαρώδη Διαβήτη

Η ταξινόμηση με βάση τις μέχρι τώρα γνωστές αιτίες που προκαλούν τον ΣΔ (αιτιολογική ταξινόμηση) περιλαμβάνει τους παρακάτω τέσσερις τύπους^{2,3}:

1. ΣΔ τύπου 1 (ΣΔ1)
 - Αυτοάνοσος
 - Ιδιοπαθής
2. ΣΔ τύπου 2 (ΣΔ2)
3. ΣΔ της κύησης
4. Άλλοι ειδικοί τύποι ΣΔ
 - ΣΔ προκαλούμενος από γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των β-κυττάρων (έκκριση ινσουλίνης). [Εδώ περιλαμβάνονται τα σύνδρομα μονογονιδιακού διαβήτη, όπως ο νεογνικός ΣΔ και ο διαβήτης MODY (Maturity Onset Diabetes of the Youth)].
 - ΣΔ προκαλούμενος από γενετικές διαταραχές που αφορούν τη δράση της ινσουλίνης.
 - ΣΔ προκαλούμενος από ενδοκρινοπάθειες, λοιμώξεις, νόσους του εξωκρινούς παγκρέατος (όπως η κυστική ίνωση) ή άλλες νόσους.
 - ΣΔ προκαλούμενος από φάρμακα ή χημικές ουσίες.
 - Γενετικά σύνδρομα που συνδυάζονται με ΣΔ.

Ο ΣΔΤ1, που παλαιότερα ήταν γνωστός ως ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης, αφορά μόνο το 5-10% του συνόλου των ατόμων με ΣΔ.⁴ Ο ιδιοπαθής χαρακτηρίζεται από ινσουλινοπενία και πιθανή εμφάνιση κετοξέωσης, χωρίς στοιχεία αυτοανοσίας.⁴ Είναι σπάνια μορφή ΣΔΤ1 και εμφανίζεται σε Αφρικανούς κι Ασιάτες.⁴ Ο αυτοάνοσος είναι ο συνηθέστερος τύπος ΣΔΤ1 και προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος με ταυτόχρονη εμφάνιση σε ποσοστό 85-90% αυτοαντισωμάτων καταστροφής των β-κυττάρων των νησιδίων του Langerhans.⁵ Επιπλέον αυτός ο τύπος ΣΔ παρουσιάζει υψηλές συσχετίσεις με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας HLA και συγκεκριμένα με τα αντιγόνα DQA, DQB και DRB.^{4,5} Η αιτιολογία της εμφάνισης της αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων αποδίδεται σε πολλαπλούς αδιευκρίνιστους προδιαθεσικούς γενετικούς καθώς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.⁶

Για τον ΣΔΤ1 κυριαρχούσε η άποψη ότι αναπτύσσεται κυρίως κατά τη διάρκεια της παιδικής ή εφηβικής ηλικίας. Η άποψη αυτή έχει πλέον εγκαταλειφθεί καθώς η σύγχρονη βιβλιογραφία έχει αναδείξει περιπτώσεις εμφάνισης ΣΔΤ1 ακόμη και μετά την ηλικία των 80 ετών.⁵ Ο ρυθμός της αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων ποικίλει ανάλογα με την ηλικία. Στη νηπιακή και παιδική ηλικία είναι κατά κανόνα σημαντικά ταχύς, οδηγώντας γρήγορα σε κετοξέωση, η οποία αποτελεί σε ποσοστό (20%) συνήθως την πρώτη εκδήλωση της νόσου.⁴ Σε μεγαλύτερες ηλικίες ο αντίστοιχος ρυθμός αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων είναι βραδύτερος και η συμπτωματολογία τους πιο ήπια, καθώς διατηρείται υπολειπόμενη ενδογενής έκκριση ινσουλίνης που μπορεί να φτάσει τα 2-4 έτη.⁵

Επίσης σε μεγαλύτερες ηλικίες παρατηρείται μία υποκατηγορία ΣΔ που ονομάζεται LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults) και θεωρείται είτε μία αργά εξελισσόμενη μορφή ΣΔΤ1 είτε μια ενδιάμεση κατηγορία μόνη της.⁴ Τα άτομα αυτά ενώ εμφανίζουν θετικά αυτοαντισώματα σε ποικίλο τίτλο και γονιδιακό υπόστρωμα κοινό τόσο για ΣΔΤ1 όσο και για ΣΔΤ2 φέρουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΣΔΤ2 και δύνανται να διατηρούν αρχικά μια καλή γλυκαιμική ρύθμιση με από του στόματος αντιδιαβητική αγωγή.⁷ Παρόλα αυτά θα χρειαστούν σύντομα (εντός 6 μηνών-5 ετών) θεραπεία με ινσουλίνη.⁷

Ο ΣΔΤ1 συνήθως αναπτύσσεται και εξελίσσεται ταχέως και μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως πολυδιψία, πολουρία, ενούρηση, έλλειψη ενέργειας, υπερβολική κόπωση, πολυφαγία, αιφνίδια απώλεια βάρους, εμφάνιση λοιμώξεων, θολή όραση, σοβαρή αφυδάτωση καθώς και διαβητική κετοξέωση την πιο ακραία εκδήλωση του ΣΔΤ1 με θνητότητα που κυμαίνεται μεταξύ 5-15%.⁵ Τα συμπτώματα αυτά είναι εντονότερα σε παιδιά κι εφήβους σε σύγκριση με τους ενήλικες.

Τα άτομα με ΣΔΤ1 έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν πιο συχνά από το γενικό πληθυσμό άλλα νοσήματα αυτοάνοσης αρχής όπως είναι η νόσος Graves, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η νόσος Addison, η λεύκη, η κοιλιοκάκη, η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η μυασθένεια Gravis και η κακοήθης αναιμία.⁵

Ο ΣΔΤ2, γνωστός στο παρελθόν ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ, αφορά το 90-95% περίπου του συνολικού πληθυσμού των ατόμων με ΣΔ. Χαρακτηρίζεται κατά κύριο λόγο από σχετική ανεπάρκεια έκκρισης της ινσουλίνης σε συνδυασμό με αντίσταση στη δράση της.¹ Ο ΣΔΤ2 παρατηρείται συχνότερα σε άτομα ηλικίας άνω των 45 ετών, αλλά τα τελευταία χρόνια λόγω των αυξανόμενων επιπέδων παχυσαρκίας, σωματικής αδράνειας και κακής διατροφής, παρατηρείται μια αυξημένη συχνότητα στα παιδιά και στους εφήβους.¹

Τα άτομα με ΣΔΤ2 είναι τις περισσότερες φορές υπέρβαρα ή παχύσαρκα. Η σπλαχνική παχυσαρκία καθώς και η έκτοπη εναπόθεση λίπους, ιδιαίτερα στο ήπαρ, έχει βρεθεί ότι συμβάλλει σημαντικά στην εμφάνιση του φαινομένου της αντίστασης στην ινσουλίνη, αυξάνοντας την υπεργλυκαιμία.⁸ Η πλειονότητα των ασθενών με ΣΔΤ2 ακολουθεί μία συχνά μακροχρόνια υποκλινική διαδρομή, με συνέπεια η διάγνωση, ενίοτε, να προκύπτει στα πλαίσια τυχαίου παρακλινικού ελέγχου, ενώ υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών, ήδη κατά την διάγνωση.^{2,9}

Ο κίνδυνος εμφάνισης του ΣΔΤ2 αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας, την παρουσία παχυσαρκίας και την έλλειψη σωματικής δραστηριότητας.¹ Επίσης, στον ΣΔΤ2 υπάρχει σαφής γενετική προδιάθεση, καθώς προσβάλλει μέλη της ίδιας οικογένειας σε ποσοστό 25-50% και εμφανίζεται συχνά σε γυναίκες που έχουν παρουσιάσει στο παρελθόν ΣΔ κύησης αλλά και σε άτομα με υπέρταση και δυσλιπιδαιμία.^{1,3} Επιπλέον η συχνότητα του ΣΔΤ2 παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις σε διάφορες εθνικότητες και φυλές.¹

Για την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας στον ΣΔΤ2 η παρέμβαση και τροποποίηση του τρόπου ζωής (διατροφή και άσκηση) στα αρχικά στάδια είναι συχνά επαρκής.¹⁰ Με την πάροδο του χρόνου και όσο η δυνατότητα ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης μειώνεται, η χορήγηση αντιδιαβητικών δισκίων, ενέσιμης αντιδιαβητικής αγωγής ή και ινσουλινοθεραπεία είναι αναγκαία για τη διατήρηση της ευγλυκαιμίας.¹⁰

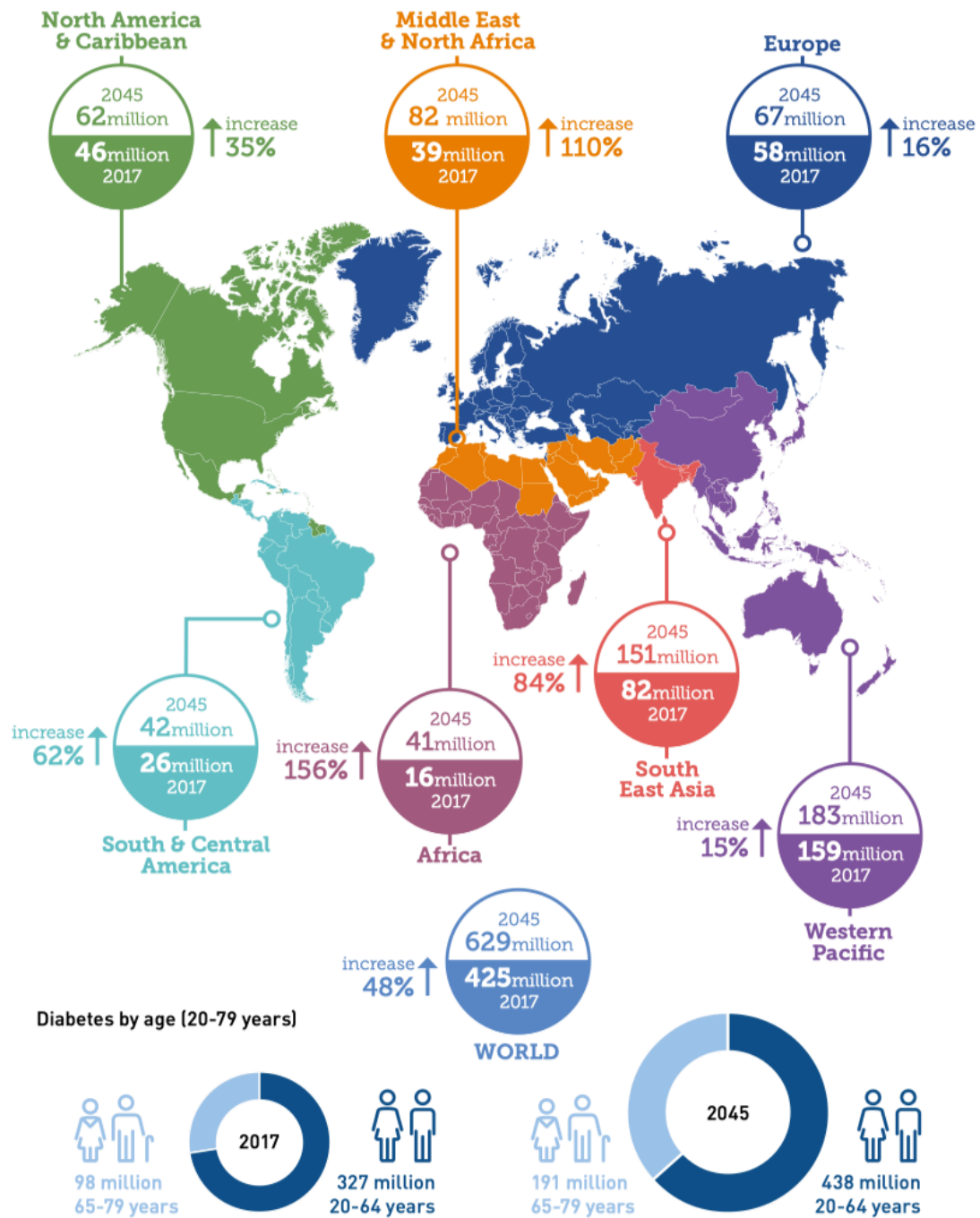
Τέλος, ως Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ) ορίζεται η διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων που διαπιστώνεται για πρώτη φορά στο β' ή στο γ' τρίμηνο της κύησης, υπό την προϋπόθεση ότι κατά την έναρξη της κύησης δεν υπάρχει επίσημη διάγνωση προϋπάρχοντος ΣΔΤ2 ή ΣΔΤ1.³ Η συχνότητα του ΣΔΚ υπολογίζεται στο 18% και η παρουσία του συνδυάζεται με μακροσωμία νεογνού, αυξημένο περιγεννητικό κίνδυνο (θάνατος, δυστοκία ώμων, κατάγματα), πιθανή εμφάνιση παχυσαρκίας και ΣΔΤ2 στο παιδί, προεκλαμψία, ανάγκη καισαρικής τομής και απώτερο κίνδυνο για τη μητέρα.³ Μετά τον τοκετό συνίσταται διερεύνηση της μεταβολικής διαταραχής των γυναικών με ΣΔΚ.³

1.3. Επιδημιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη

Ο ΣΔ έχει λάβει διαστάσεις επιδημίας σε παγκόσμιο επίπεδο παραμένοντας ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία κι ένα αυξανόμενο βάρος στις παγκόσμιες οικονομίες. Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF) 425 εκατομμύρια άτομα έπασχαν από ΣΔ το 2017, ενώ το 2040 υπολογίζεται ότι ο αριθμός θα προσεγγίσει τα 629 εκατομμύρια άτομα (48% αύξηση)¹¹. (Εικόνα 1.1)

Στην Ευρώπη ο επιπολασμός του ΣΔΤ2 κυμαίνεται μεταξύ 2-8%, με εξαίρεση τη Μάλτα και τη Φιλανδία, χώρες στις οποίες φτάνει το 5-10%, ενώ στις ΗΠΑ υπολογίζεται σε 7,8%.¹¹ Στην Ελλάδα τα επιδημιολογικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι το 7-9,5% του πληθυσμού πάσχει από ΣΔ.^{12,13} Ο ΣΔΤ2 στις αναπτυγμένες χώρες εμφανίζει μικρή αύξηση, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες καταγράφεται πολύ μεγάλη αύξηση.¹¹ Έτσι το 2030 εκτιμάται ότι τα ποσοστά της αύξησης του επιπολασμού του ΣΔΤ2 στις μεν αναπτυγμένες χώρες θα κυμαίνονται στο 42%, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες στο 150-200%, με μεγαλύτερες αυξήσεις του επιπολασμού στην Κίνα (55%), στην Ινδία (50%), στη Λατινική Αμερική, στην περιοχή της Καραϊβικής (35%) και στη Μέση Ανατολή (26%).¹¹

Ο επιπολασμός και η επίπτωση του ΣΔΤ1 εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των κρατών και των εθνοτήτων. Υψηλότερο επιπολασμό ΣΔΤ1 εμφανίζει η Φιλανδία (2,6%) ενώ ακολουθούν οι ΗΠΑ (1,7%), η Ελβετία (0,6%), το Ισραήλ (0,2%) και η Ιαπωνία (0,07%).¹⁴ Η επίπτωση του ΣΔΤ1 εμφανίζει εποχική κατανομή. Είναι μεγαλύτερη στην ηλικία 10-13 ετών και στα δύο φύλα, ενώ στο 50% των ατόμων η διάγνωση του ΣΔΤ1 γίνεται πριν την ηλικία των 15 ετών.¹⁵ Σήμερα υπολογίζεται ότι ο αριθμός των παιδιών με ΣΔΤ1 ηλικίας 0-14 ετών είναι περίπου 1,5 εκατομμύριο και η ετήσια αύξηση της επίπτωσης του ΣΔΤ1 είναι 3%.¹⁵ Η Ευρώπη, η Βόρεια Αμερική και η Καραϊβική έχουν το μεγαλύτερο αριθμό παιδιών κι εφήβων με ΣΔΤ1 κάτω των 20 ετών.⁹



Εικόνα 1.1. Ο αριθμός των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και ανά περιοχή το 2017 και το 2045 (20-79 ετών)

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

Περισσότερο από το ένα τέταρτο (28,4%) των παιδιών και εφήβων με ΣΔΤ1 ζει στην Ευρώπη (με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στις Βορειοευρωπαϊκές χώρες και στη Σαρδηνία) και πάνω από το ένα πέμπτο (21,5%) ζει στη Βόρεια Αμερική και στην Καραϊβική.⁹ Οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Ινδία και η Βραζιλία έχουν τη μεγαλύτερη επίπτωση παιδιών με ΣΔΤ1 και στις δύο ηλικιακές ομάδες κάτω των 15 και 20 ετών.⁹

Στην Ελλάδα έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την εκτίμηση του επιπολασμού και της επίπτωσης του ΣΔΤ2 τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1) με τον επιπολασμό να εκτιμάται στο 7-9,5%.

Πίνακας 1.1. Επιπολασμός του Σακχαρώδη Διαβήτη στην Ελλάδα

Μελέτη	Πληθυσμός	Θέση	Έτος	Επιπολασμός
Χριστακόπουλος - Καραμάνος και συν.	Αγροτικός		1973	1,27%
Κατσιλάμπρος και συν.	Αστικός	Αιγάλεω	1975	2,4%
Κατσιλάμπρος και συν.	Αστικός	Αιγάλεω	1993	3,1%
Παπάζογλου και συν.	Ημιαστικός Ηλικιωμένοι	Β. Ελλάδα	1995	29,1%
Λιονής και συν.	Αγροτικός	Κρήτη	1999	6,9%
Τριχόπουλος και συν.	Αστικός	Αθήνα	2000	7%
Πίτσαβος και συν.	Αστικός	Αθήνα	2000	7%
Διαμαντόπουλος - Ράπτης και συν.	Αστικός	Αθήνα	2000	4,1%
Μελιδώνης και συν.	Αγροτικός	Αργολίδα	2002	7,8%
Γκίκας και συν.	Ημιαστικός	Σαλαμίνα	2002	8,2%
Γκίκας και συν.	Ημιαστικός	Σαλαμίνα	2006	9,52%
Σωτηρόπουλος και συν.	Αστικός	Σαλαμίνα	2014	12,2%

1.4. Διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη

Οι δοκιμασίες και τα κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΔ σύμφωνα με την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (ΕΔΕ) συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2.³

Πίνακας 1.2. Κριτήρια διάγνωσης του Σακχαρώδη Διαβήτη

Γλυκόζη πλάσματος νηστείας ≥126 mg/dL*
Γλυκόζη πλάσματος 2 ωρών (κατά τη δοκιμασία φόρτισης με γλυκόζη 75 g) ≥200 mg/dL**
Τυχαία μέτρηση γλυκόζης πλάσματος ≥200 mg/dL σε ασθενή με τυπικά συμπτώματα υπεργλυκαιμίας*** ή υπεργλυκαιμική κρίση

*Γλυκόζη πλάσματος νηστείας (Νηστεία: μη λήψη τροφής για τουλάχιστον 8 ώρες), μέτρηση το πρωί μετά από την έγερση.

**Η δοκιμασία φόρτισης με γλυκόζη πρέπει να διενεργηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, χρησιμοποιώντας διάλυμα άνυδρης γλυκόζης 75 γραμμαρίων διαλυμένο σε νερό σε ενήλικες.

***Ως συμπτώματα υπεργλυκαιμίας θεωρούνται η πολυουρία, η πολυδιψία, η πολυφαγία και η ανεξήγητη απώλεια βάρους.

Η Αμερικάνικη Εταιρεία Διαβήτη (American Diabetes Association, ADA) προτείνει επιπλέον και την τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) ≥6,5% ως μέθοδο διάγνωσης του ΣΔ. Η μέτρηση της HbA1c θα πρέπει να διενεργείται σε πιστοποιημένο για έλεγχο ποιότητας εργαστήριο και η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της θα πρέπει να είναι προτυποποιημένη σύμφωνα με τα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια (π.χ. του Εθνικού Προγράμματος Προτυποποίησης της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης την ΗΠΑ [National Glycohemoglobin Standardization Program – NGSP]). Επίσης βασική προϋπόθεση είναι ο αποκλεισμός καταστάσεων που καθιστούν τη μέτρηση της HbA1c αναξιόπιστη (π.χ. αιμοσφαιρινοπάθειες, νεφρική ανεπάρκεια, αιμολυτική αναιμία, κ.λπ.). Τιμές HbA1c <6,5% δεν αποκλείουν την ύπαρξη ΣΔ. Το ζήτημα αυτό εξακολουθεί να βρίσκεται υπό διερεύνηση.

1.5. Επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη

Οι επιπλοκές του ΣΔ χωρίζονται σε οξείες και χρόνιες.

1.5.1. Οξείες επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη

Η υπογλυκαιμία που ορίζεται ως μείωση της γλυκόζης πλάσματος κάτω από 70 mg/dl με ή χωρίς την παρουσία συμπτωμάτων ή κλινικών σημείων, αποτελεί τη σημαντικότερη και συχνότερη επιπλοκή στη θεραπεία του ΣΔ.¹⁶ Υπογλυκαιμικά επεισόδια παρουσιάζονται κυρίως στους ασθενείς που λαμβάνουν ινσουλίνη ή αγωγή με ινσουλινοεκκριτικά φάρμακα. Αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα στην αντιμετώπιση του ΣΔ καθώς ο φόβος της υπογλυκαιμίας στους ασθενείς με μεγάλη διάρκεια νόσου, αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες που εμποδίζουν την επίτευξη καλής γλυκαιμικής ρύθμισης.¹⁷ Η παρατεταμένη σοβαρή υπογλυκαιμία μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο μέσω κυρίως πρόκλησης κακοήθων καρδιακών αρρυθμιών.¹⁸ Η θνητότητα από υπογλυκαιμία στο ΣΔΤ1 κυμαίνεται μεταξύ 4-10%, ενώ για το ΣΔΤ2 δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία.¹⁸

Στις οξείες επιπλοκές του ΣΔ περιλαμβάνονται και τα διαβητικά κώματα: η διαβητική κετοξέωση (ΔΚΟ) και η υπερωσμωτική υπεργλυκαιμική κατάσταση (ΥΥΚ) που αποτελούν τις δύο ακραίες καταστάσεις της υπεργλυκαιμικής κρίσης. Αν και περιγράφονται σαν διακριτές κλινικές οντότητες, δεν αποκλείεται ορισμένες φορές να συνυπάρχουν καθώς οι ασθενείς στα πλαίσια ενός συνεχούς φάσματος μεταβολικής απορρύθμισης μπορεί να παρουσιάζουν χαρακτηριστικά και των δύο καταστάσεων.

Η ΔΟΚ αποτελεί οξεία, απειλητική για τη ζωή κατάσταση και απαιτεί εισαγωγή στο νοσοκομείο και άμεση αντιμετώπιση.¹⁹ Διακρίνεται σε ήπια, μέτρια και σοβαρή αναλόγως των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος, διττανθρακικών στο φλεβικό αίμα και κετονών ορού ή ούρων.³ Εμφανίζεται κυρίως στο ΣΔΤ1 αλλά και λιγότερο συχνά σε ασθενείς με ΣΔΤ2. Χαρακτηρίζεται από την τριάδα υπεργλυκαιμία- οξέωση-κετοναίμια. Για τους ενήλικους η θνητότητα είναι <1%, αν και μπορεί να υπερβαίνει το 5% σε ηλικιωμένους ή όταν υπάρχουν άλλα νοσήματα.²⁰ Στα παιδιά και τους νέους ενήλικους η ΔΚΟ, παρά τη χαμηλή της θνητότητα, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου.²¹ Στον Πίνακα 1.3 συνοψίζονται τα βασικότερα αίτια ΔΚΟ, ενώ στον Πίνακα 1.4 τα συχνότερα συμπτώματα και σημεία.⁷

Πίνακας 1.3. Παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση ΔΚΟ

<ul style="list-style-type: none">• Λοιμώξεις (Πιο συχνά: πνευμονία, λοιμώξεις ουροποιητικού)
<ul style="list-style-type: none">• Ανεπαρκής δόση ινσουλίνης ή εκούσια διακοπή ινσουλινοθεραπείας<ul style="list-style-type: none">○ Κακή συμμόρφωση○ Ψυχιατρικές καταστάσεις○ Φόβος για αύξηση σωματικού βάρους○ Φόβος για υπογλυκαιμία
<ul style="list-style-type: none">• Καρδιαγγειακή νόσος
<ul style="list-style-type: none">• Σοβαρός τραυματισμός
<ul style="list-style-type: none">• Χειρουργείο
<ul style="list-style-type: none">• Κατάχρηση οινόπνευματων
<ul style="list-style-type: none">• Άλλα σοβαρά νοσήματα (π.χ. παγκρεατίτιδα)
<ul style="list-style-type: none">• Φάρμακα<ul style="list-style-type: none">○ Κορτικοειδή○ Πενταμιδίνη○ Συμπαθητικομιμητικά φάρμακα○ Διουρητικά σε μεγάλες δόσεις○ Ορισμένα αντιψυχωσικά○ SGLT2 αναστολείς (Σχετίζονται με ευγλυκαιμική ΔΚΟ)

Πίνακας 1.4. Κλινική εικόνα ΔΚΟ

<i>Συμπτώματα ΔΚΟ</i>	<i>Σημεία ΔΚΟ</i>
Πολυουρία	Μείωση σπαργής δέρματος
Πολυδιψία	Ξηρότητα βλεννογόνων
Αίσθημα κόπωσης	Ταχυκαρδία
Κράμπες	Ταχύπνοια
Προηγθείσα απώλεια σωματικού βάρους	Μείωση σφαγιτιδικής πίεσης
Ναυτία	Υποθερμία
Έμετοι	Αναπνοή Kussmaul
Κοιλιακό άλγος	Απόπνοια ακετόνης
	Σύγχυση
	Λήθαργος
	Κώμα

Τέλος η ΥΥΚ αποτελεί επίσης οξεία και δυνητικά θανατηφόρα μεταβολική διαταραχή και εμφανίζεται πολύ συχνότερα στον ΣΔΤ2, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις στον ΣΔΤ1. Χαρακτηρίζεται από σοβαρή υπεργλυκαιμία, υπερωσμωτικότητα, αφυδάτωση και απουσία σημαντικής κέτωσης.²² Αποτελεί την πιο σοβαρή οξεία μεταβολική διαταραχή σε ηλικιωμένους ασθενείς με ΣΔΤ2 με συνυπάρχοντα νοσήματα που οδηγούν σε μειωμένη πρόσληψη ύδατος.²² Η θνητότητα αγγίζει το 20%, ποσοστό δεκαπλάσιο από το αντίστοιχο της ΔΚΟ, λόγω της μεγαλύτερης ηλικίας των ασθενών και των συνυπαρχουσών νοσηροτήτων.²² Στον Πίνακα 1.5 συνοψίζονται οι κυριότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες που οδηγούν σε ΥΥΚ ενώ στον Πίνακα 1.6 τα συχνότερα συμπτώματα και σημεία.

Πίνακας 1.5. Προδιαθεσικοί παράγοντες ΥΚΚ

<ul style="list-style-type: none">• Οξεία νόσος<ul style="list-style-type: none">○ Λοίμωξη○ Πνευμονία○ Λοίμωξη ουροποιητικού○ Σήψη○ Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου○ Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο○ Πνευμονική εμβολή○ Θρόμβωση μεσεντερίου○ Ραβδομύλυση○ Οξεία παγκρεατίτιδα○ Οξεία νεφρική ανεπάρκεια○ Περιτοναϊκή κάθαρση○ Θερμοπληξία○ Υποθερμία○ Σοβαρό έγκαυμα
<ul style="list-style-type: none">• Φάρμακα<ul style="list-style-type: none">○ Αναστολείς διαύλων ασβεστίου○ Χλωροπρομαζίνη○ Χλωροθαλιδόνη○ Σιμετιδίνη○ Ολανζαπίνη○ Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες○ Προπρανολόνη○ Ρισπεριδόνη○ Ολική παρεντερική διατροφή○ Α-ασπαραγινάση
<ul style="list-style-type: none">• Μη συμμόρφωση-Κατάχρηση ουσιών<ul style="list-style-type: none">○ Αλκοόλ○ Κοκαΐνη
<ul style="list-style-type: none">• Ενδοκρινολογικά<ul style="list-style-type: none">○ Ακρομεγαλία○ Θυρεοτοξίκωση○ Σύνδρομο Cushing
<ul style="list-style-type: none">• Αδιάγνωστος ΣΔ

Πίνακας 1.6. Κλινική εικόνα ΥΥΚ

<i>Συμπτώματα ΥΥΚ</i>	<i>Σημεία ΥΥΚ</i>
Πολυουρία	Μειωμένη σπαργή δέρματος
Πολυδιψία	Ξηρότητα βλεννογόνων
Απώλεια σωματικού βάρους	Ταχυκαρδία
Αδυναμία	Υπόταση
Μυϊκές κράμπες	Ψυχρά άκρα
Διαταραχές όρασης	Υποθερμία
	Κουλιακή διάταση (γαστροπάρεση)
	Λήθαργος
	Σύγχυση
	Χοριοαθετωσικές κινήσεις
	Εστιακή νευρολογική σημειολογία που μιμείται αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ημιπάρεση, αφασία)

1.5.2. Χρόνιες επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη

Οι χρόνιες επιπλοκές του ΣΔ χωρίζονται σε μικροαγγειακές και μακροαγγειακές. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η διαβητική νεφροπάθεια και η διαβητική νευροπάθεια του αυτόνομου και περιφερικού νευρικού συστήματος αποτελούν τις τρεις εκδηλώσεις μικροαγγειοπάθειας στο ΣΔ. Συγκεκριμένα η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι η συχνότερη επιπλοκή στις αναπτυγμένες χώρες με το ΣΔ να αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης σε ενήλικους πληθυσμούς (ηλικιών 20 - 74 ετών),²³ ενώ ο κίνδυνος τύφλωσης των ασθενών με διαβήτη είναι είκοσι φορές μεγαλύτερος από εκείνον που αντιστοιχεί σε όλες τις αιτίες τύφλωσης στο σύνολο τους.²⁴

Όσον αφορά τη διαβητική νεφροπάθεια αφορά το 30-60% των ασθενών με ΣΔ και χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ).²⁵ Στις μέρες μας φαίνεται να αποτελεί την πιο συχνή αιτία ΧΝΝ τελικού σταδίου σε ολόκληρο το Δυτικό κόσμο με επίπτωση της τάξης του 40-55% του συνόλου των ασθενών στις διάφορες χώρες, με την αγγειακή νεφρική νόσο (υπέρταση και ισχαιμική νεφροπάθεια) να βρίσκεται στη δεύτερη θέση με 20-30%.²⁶

Οι διαβητικές νευροπάθειες εμφανίζονται τόσο σε άτομα με ΣΔΤ1, όσο και στον ΣΔΤ2, αλλά παρουσιάζουν κάποιες διαφορές μεταξύ τους. Η νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος εμφανίζεται πιο συχνά σε ασθενείς με ΣΔΤ1 ενώ οι αναστρέψιμες μονονευροπάθειες είναι πιο συχνές σε ηλικιωμένους άνδρες με ΣΔΤ2.⁷ Οι κλινικές εμφανίσεις και τα ευρήματα της νευροπάθειας μεταξύ των

ασθενών με ΣΔ παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια (Πίνακας 1.7) με την συμμετρική αισθητικοκινητική νευροπάθεια (ή περιφερική νευροπάθεια) να αποτελεί την πιο κοινή μορφή των διαβητικών νευροπαθειών.^{27,28} Η νευροπάθεια του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος (ΑΝΣ) λόγω ΣΔ (συχνότητα εμφάνισης 20% σε διαβητικό πληθυσμό), αποτελεί τη συχνότερη αιτία νευροπάθειας ΑΝΣ στις ανεπτυγμένες κοινωνίες, επηρεάζοντας σε σημαντικό βαθμό την ποιότητα ζωής και τις καθημερινές δραστηριότητες των ασθενών με ΣΔ προκαλώντας μειωμένη κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος με κύρια εκδήλωση τη γαστροπάρεση, σεξουαλική ανικανότητα, μειωμένη αντοχή στην άσκηση, άτονη ουροδόχο κύστη, διαταραχές της κόρης του οφθαλμού και αγγειοκινητικές διαταραχές.²⁹ Η κυριότερη ωστόσο επιπλοκή είναι αυτή του καρδιαγγειακού συστήματος που μπορεί να οδηγήσει σε σιωπηλή ισχαιμία και έμφραγμα του μυοκαρδίου, διαστολική και συστολική σε προχωρημένα στάδια δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, ταχυκαρδία και αιφνίδιο καρδιακό θάνατο.³⁰

Πίνακας 1.7. Κλινικές μορφές νευροπάθειας κατά Boulton και Watkins

<ul style="list-style-type: none"> • Διάχυτη πολλαπλή νευροπάθεια <ul style="list-style-type: none"> ○ Συμμετρική αισθητικοκινητική νευροπάθεια ○ Νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος
<ul style="list-style-type: none"> • Μονονευροπάθειες <ul style="list-style-type: none"> ○ Εγγύς κινητική (μηριαία) νευροπάθεια ○ Ριζιτικά σύνδρομα (ιδίως του κορμού) ○ Παραλύσεις κρνιακών νεύρων
<ul style="list-style-type: none"> • Νευροπάθειες από πίεση <ul style="list-style-type: none"> ○ Σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα ○ Πίεση ωλένιου νεύρου ○ Πίεση στην πλάγια ιγνυακή χώρα (πτώση άκρου πόδα) ○ Σύνδρομο ταρσιαίου σωλήνα
<ul style="list-style-type: none"> • Ειδικά σύνδρομα <ul style="list-style-type: none"> ○ Νευροπάθεια από υπεργλυκαιμία ○ Νευροπάθεια από υπογλυκαιμία ○ Διαβητική νευροπάθεια κεντρικού τύπου

Η μακροαγγειοπάθεια αποτελεί επιπλοκή του ΣΔ, η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση αθηροσκληρυντικών αλλοιώσεων στις μεγάλης διαμέτρου αρτηρίες: στεφανιαίες αρτηρίες, καρωτίδες, εγκεφαλικές αρτηρίες και αρτηρίες των κάτω άκρων και μπορεί να εκδηλωθεί ως στεφανιαία νόσος, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και περιφερική αρτηριακή νόσος.^{31,32}

Η στεφανιαία νόσος είναι η συχνότερη και σοβαρότερη μορφή μακροαγγειοπάθειας και η πρώτη αιτία θανάτου στους ασθενείς με διαβήτη (συχνότητα 40-50%).^{31,32} Σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς είναι 2-4 φορές συχνότερη στους άνδρες με ΣΔ και 5 φορές συχνότερη στις διαβητικές γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση.^{31,32} Οι ασθενείς με ΣΔ έχουν χειρότερη μακροχρόνια πρόγνωση έπειτα από έμφραγμα μυοκαρδίου καθώς και αυξημένο κίνδυνο συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και θανάτου.³¹

Επιπλέον, τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι υπερδιπλάσια σε συχνότητα στους ασθενείς με διαβήτη σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (άνω του 4% σε ασθενείς με ΣΔ έναντι 2% στον γενικό πληθυσμό), ενώ στις ηλικίες κάτω των 50 ετών είναι υπερτετραπλάσιος. Εμφανίζονται με συχνότητα 4% στους άνδρες και 5% στις γυναίκες με διαβήτη.^{32,33} Οι ασθενείς με ΣΔ και ΑΕΕ έχουν σοβαρότερα νευρολογικά ελλείμματα, πτωχότερη μακροχρόνια πρόγνωση και υψηλότερα ποσοστά υποτροπών σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό.³⁴

Τέλος η Περιφερική Αρτηριακή Νόσος (ΠΑΝ) επί ΣΔ εμφανίζεται σε μικρότερη ηλικία, έχει ταχύτερη εξέλιξη, πολυεστιακή εντόπιση με επιπολασμό 2-4 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς ΣΔ.^{32,35} Ο επιπολασμός της ΠΑΝ στους ασθενείς με διαβήτη ηλικίας 40-50 ετών κυμαίνεται περίπου στο 20%, ενώ αυξάνεται στο 30% σε ηλικίες άνω των 50 ετών.^{32,35} Οι ασθενείς με ΠΑΝ είναι 7-15 φορές πιο πιθανό να υποστούν μείζονα ακρωτηριασμό κάτω άκρου σε σχέση με μη διαβητικούς, ενώ ταυτόχρονα μελέτες έχουν δείξει ότι η ΠΑΝ είναι και δείκτης της αθηροσκλήρωσης και θρόμβωσης στα αγγεία της καρδιάς, του εγκεφάλου και των νεφρών.^{32,35}

1.6. Θεραπεία Σακχαρώδη Διαβήτη

Η αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας παραμένει ο βασικός θεραπευτικός στόχος σε ασθενείς με ΣΔ για την πρόληψη μικροαγγειακών και μακροαγγειακών επιπλοκών. Οι εγκεκριμένες σήμερα φαρμακευτικές παρεμβάσεις για την αντιμετώπιση των ασθενών με ΣΔΤ2 διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:⁷

1. Ινσουλινοευαισθητοποιητές (διγουανίδες, γλιταζόνες)
2. Ινσουλινοεκκριταγωγά (σουλφονουλουρίες, γλινίδες)
3. Ινκρετινομιμητικά (αγωνιστές των υποδοχέων του GLP-1, DDP-4 αναστολείς)
4. Γλυκοζουρικά (SGLT2 αναστολείς)
5. Δυσαπορροφητικά (αναστολείς α-γλυκοσιδάσης)
6. Ινσουλίνη.

Οι αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης έχουν γενικά μέτρια αποτελέσματα ως προς τη μείωση της HbA1c, ενώ λόγω του μηχανισμού δράσης τους (αναστέλλουν την α-γλυκοσιδάση του εντέρου καθυστερώντας την απορρόφηση των υδατανθράκων) προκαλούν γαστρεντερικά ενοχλήματα.³⁶ Για το λόγο αυτό η χρήση τους είναι πολύ περιορισμένη. Στους παρακάτω Πίνακες (1.8 - 1.15) παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των παραπάνω φαρμάκων.⁷

Πίνακας 1.8. Βασικά χαρακτηριστικά μετφορμίνης

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Μεγάλη εμπειρία✓ Υψηλή αποτελεσματικότητα✓ Χωρίς κίνδυνο υπογλυκαιμίας✓ Ουδέτερη επίδραση στο βάρος✓ Χαμηλό κόστος✓ Πιθανώς μείωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Γαστρεντερικές διαταραχές❖ Γαλακτική οξέωση (σπάνια)❖ Έλλειψη βιταμίνης B12❖ Αντένδειξη σε eGFR <30 mL/min/1,73m²

Πίνακας 1.9. Βασικά χαρακτηριστικά σουλφονουλουριών

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Υψηλή αποτελεσματικότητα✓ Χαμηλό κόστος
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Αύξηση σωματικού βάρους❖ Μικρή διατηρησιμότητα γλυκαιμικού αποτελέσματος❖ Κίνδυνος υπογλυκαιμίας (μπορεί να απαιτηθεί νοσηλεία)

Πίνακας 1.10. Βασικά χαρακτηριστικά μεγλιτινίδων

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Βελτίωση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας✓ Ευελιξία γευμάτων
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Κίνδυνος υπογλυκαιμίας❖ Αύξηση σωματικού βάρους❖ Αύξηση συχνής χορήγησης

Πίνακας 1.11. Βασικά χαρακτηριστικά πιογλιταζόνης

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Υψηλή αποτελεσματικότητα✓ Χαμηλός κίνδυνος υπογλυκαιμίας✓ Χαμηλό κόστος✓ Πιθανώς μείωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Αύξηση σωματικού βάρους❖ Οιδήματα / καρδιακή ανεπάρκεια❖ Κατάγματα

Πίνακας 1.12. Βασικά χαρακτηριστικά DPP-4 αναστολέων

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Μέτρια αποτελεσματικότητα✓ Ουδέτερη επίδραση στο βάρος✓ Χωρίς κίνδυνο υπογλυκαιμίας
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Υψηλό κόστος❖ Καρδιακή ανεπάρκεια (σαξαγλιπτίνη)

Πίνακας 1.13. Βασικά χαρακτηριστικά αγωνιστών των υποδοχέων GLP-1

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Υψηλή αποτελεσματικότητα✓ Μείωση σωματικού βάρους✓ Χωρίς κίνδυνο υπογλυκαιμίας✓ Μείωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων (λιραγλουτίδη, σεμαγλουτίδη, εξενατίδη LAR)✓ Σταθεροποίηση λευκωματουρίας (λιραγλουτίδη, σεμαγλουτίδη)✓ Μείωση ολικής θνησιμότητας (λιραγλουτίδη, εξενατίδη LAR)
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Ενέσιμα❖ Γαστρεντερικές διαταραχές❖ Υψηλό κόστος

Πίνακας 1.14. Βασικά χαρακτηριστικά SGLT2 αναστολέων

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Υψηλή αποτελεσματικότητα✓ Μείωση σωματικού βάρους✓ Μείωση αρτηριακής πίεσης✓ Χωρίς κίνδυνο υπογλυκαιμίας✓ Μείωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων (εμπαγλιφλοζίνη, καναγλιφλοζίνη)✓ Μείωση νοσηλειών για καρδιακή ανεπάρκεια✓ Σταθεροποίηση της νεφρικής νόσου✓ Μείωση ολικής θνησιμότητας (εμπαγλιφλοζίνη)
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Λοιμώξεις ουροποιητικού❖ Αφυδάτωση❖ Ευγλυκαιμική κετοξέωση❖ Ακρωτηριασμοί κάτω άκρων❖ Υψηλό κόστος

Πίνακας 1.15. Βασικά χαρακτηριστικά ινσουλίνης

<i>Πλεονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Απεριόριστη αποτελεσματικότητα
<i>Μειονεκτήματα</i>
<ul style="list-style-type: none">❖ Κίνδυνος υπογλυκαιμίας❖ Αύξηση σωματικού βάρους❖ Απαιτείται εκπαίδευση❖ Διστακτικότητα κατά την έναρξη

2. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

2.1. Ορισμός και ταξινόμηση

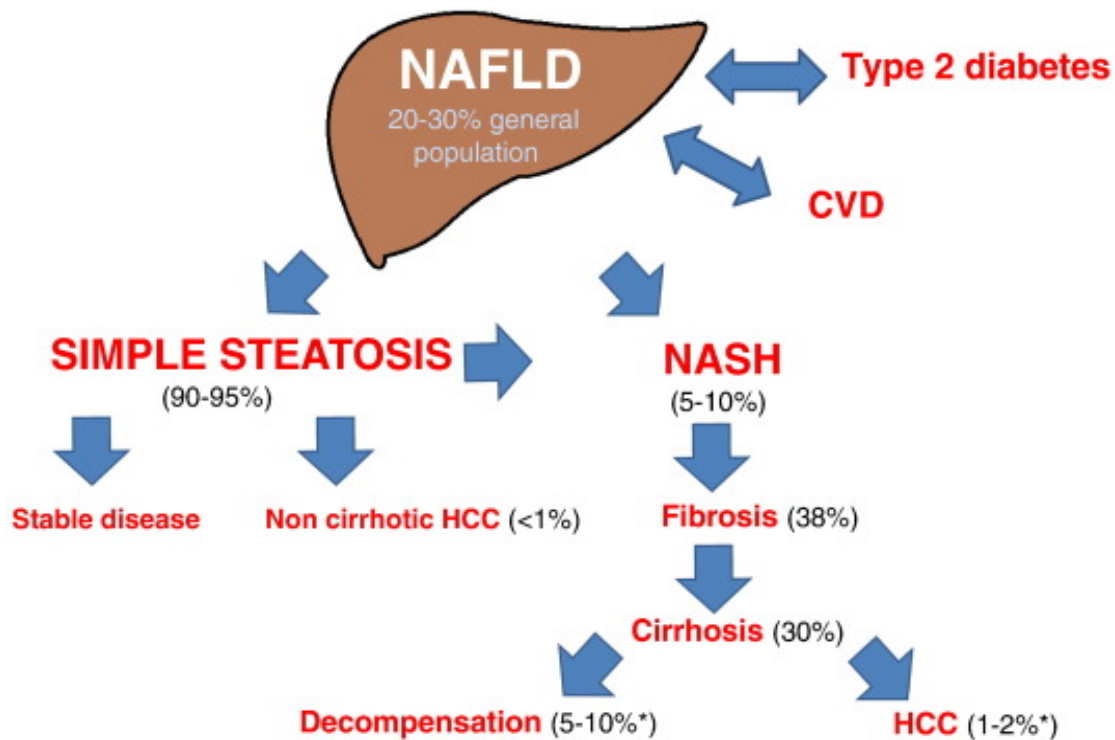
Η Μη Αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) είναι η πιο συχνή αιτία χρόνιας ηπατοπάθειας παγκοσμίως, αποτελώντας ένα σοβαρότατο πρόβλημα δημόσιας υγείας.³⁷ Η απλή στεάτωση, η Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH), καθώς και σχετιζόμενη με τη στεατοηπατίτιδα κίρρωση (NASH-related cirrhosis) αποτελούν διακριτές μορφές της νόσου, η οποία περιλαμβάνει ένα ευρύτατο φάσμα ιστολογικών αλλοιώσεων, που ποικίλουν ως προς τον τύπο και το ποσοστό της ηπατικής στεάτωσης, τη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και την ηπατική ίνωση.^{37,38} Η NAFLD αποτελεί μια χρόνια μορφή ηπατοπάθειας, η οποία προκαλείται από την εναπόθεση και συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 5-10% του βάρους του ήπατος (στεάτωση) χωρίς αυτή να οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ.³⁹ Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Μελέτης Ήπατος (EASL), το ανώτερο όριο κατανάλωσης αλκοόλ για τη διάγνωση της NAFLD, είναι <20 γραμμάρια / ημέρα αιθανόλης για τις γυναίκες και <30 γραμμάρια / ημέρα αιθανόλης για τους άνδρες.⁴⁰ Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος (American Association for the Study of Liver Disease), ο ορισμός της NAFLD απαιτεί: α) την ύπαρξη ηπατικής στεάτωσης είτε απεικονιστικά είτε ιστολογικά και β) την απουσία δευτερογενών αιτιών που μπορούν να προκαλέσουν ηπατική στεάτωση όπως είναι το αλκοόλ, φάρμακα που προκαλούν ηπατική στεάτωση ή κληρονομικές διαταραχές.⁴¹ Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό η NAFLD διακρίνεται σε πρωτοπαθή που συνδέεται αιτιοπαθογενετικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη και αποτελεί μέρος του μεταβολικού συνδρόμου μαζί με την κεντρική παχυσαρκία, τον ΣΔΤ2 και τη δυσλιπιδαιμία⁴² και σε δευτεροπαθή όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Αιτιολογική ταξινόμηση NAFLD⁴⁰

<p>Πρωτοπαθής</p> <ul style="list-style-type: none">• Μεταβολικό σύνδρομο
<p>Δευτεροπαθής</p> <ul style="list-style-type: none">• Μεταβολικά αίτια (γλυκογονιάσεις, τυροσιναιμία, νόσος Wilson, υποθυρεοειδισμός, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών)• Γενετικά αίτια (PNPLA3 variants, α-βήτα-(υπο-βήτα)-λιποπρωτεϊναιμία, νόσος Andersen, λιποδυστροφίες, νόσος Weber Christian)• Φαρμακευτικά αίτια (αμιωδαρόνη, κορτικοστεροειδή, μεθοτρεξάτη, ταμοξιφαίνη, αντί-HIV)• Διαταραχές θρέψης (χειρουργική παράκαμψη του εντέρου, ταχεία / μεγάλη απώλεια βάρους, καχεξία, ολική παρεντερική διατροφή, σύνδρομο επανασίτισης)• Άλλα αίτια (HCV, HIV, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου)• Μεταβολικά παχύσαρκοι με φαινότυπο φυσιολογικού βάρους σώματος

2.2. Επιδημιολογία NAFLD

Η NAFLD αποτελεί τη συχνότερη αιτία διαταραχής της ηπατικής βιοχημείας στις Δυτικές κοινωνίες⁴³ και προβλέπεται να αποτελεί τη συχνότερη ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος μέχρι το 2030.⁴⁴ Ο επιπολασμός της NAFLD είναι 20-30% στους ενήλικες και είναι υψηλότερος στις βιομηχανικές χώρες.⁴⁵ Μέχρι το 2030 στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι θα έχει τριπλασιαστεί το ποσοστό τελικού σταδίου ηπατικής ανεπάρκειας λόγω NAFLD⁴⁶ ενώ ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται ότι αυξάνεται σημαντικά στις χώρες της Μέσης κι Άπω Ανατολής.⁴⁷ Παρά τον υψηλό επιπολασμό της νόσου, μόνο ένα μικρό ποσοστό ατόμων με NAFLD φαίνεται πως έχει NASH με επακόλουθο αυξημένο κίνδυνο ηπατικής ίνωσης, κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου (HCC). (Εικόνα 2.1)



Εικόνα 2.1. Φυσική ιστορία της NAFLD⁴⁸

Ενώ οι ασθενείς με λιπώδες ήπαρ έχουν παρόμοιο προσδόκιμο ζωής στο γενικό πληθυσμό, οι ασθενείς με NASH έχουν μειωμένη επιβίωση, κυρίως λόγω καρδιαγγειακών και ηπατικών αιτιών. Αυτή η έννοια αμφισβητήθηκε πρόσφατα από δύο μελέτες με διαχρονική παρακολούθηση, σύμφωνα με τις οποίες η προχωρημένη ίνωση, αλλά όχι η παρουσία ίνωσης, προέβλεπε συνολική θνητότητα σε ασθενείς με NAFLD.^{37,49} Ωστόσο, η πραγματική επίπτωση και ο επιπολασμός της NAFLD, είναι δύσκολο να καθοριστούν, διότι εμφανίζουν ευρεία διακύμανση ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται και των διαγνωστικών εργαλείων για τη σταδιοποίηση της νόσου.³⁷

Στις μελέτες που χρησιμοποιούν για τη διάγνωση της NAFLD τις αμινοτρανσφεράσες μόνο, χωρίς να υπάρχουν στοιχεία για υπερηχογραφικά ευρήματα ή ιστολογική διάγνωση, το μέγεθος του πληθυσμού είναι συνήθως μεγάλο, το ποσοστό διάγνωσης της NAFLD είναι μικρό 2,8-5,4%.^{50,51} Όταν η διάγνωση γίνεται με βάση ακτινολογικά ευρήματα (υπερηχογράφημα, αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία) το ποσοστό του λιπώδους ήπατος στο γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 3-53% ανάλογα με τη χώρα προέλευσης, με χαμηλότερα ποσοστά να αναφέρονται στις χώρες της Άπω Ανατολής (Ιαπωνία, Κορέα) και υψηλότερα σε χώρες του δυτικού κόσμου. Η καρδιολογική ομάδα του Dallas χρησιμοποιώντας proton MRI spectroscopy διαπίστωσε πως ένας στους τρεις ενήλικες Αμερικάνους έχει ηπατική στεάτωση,⁵² δηλαδή περίπου 70 εκατομμύρια άτομα στις ΗΠΑ

πάσχουν από λιπώδες ήπαρ. Από αυτούς μόνο το 21% είχε παθολογική ηπατική βιοχημεία, γεγονός που αποδεικνύει πως οι μελέτες που χρησιμοποιούν σαν κριτήριο της λιπώδους νόσου τις αμινοτρανσφεράσες υποεκτιμούν τον επιπολασμό της.

Η βιοψία ήπατος αποτελεί την πρότυπη διάγνωση της NAFLD, αλλά ο επεμβατικός της χαρακτήρας την καθιστά δύσκολη στην εφαρμογή της για επιδημιολογικές μελέτες.⁵³ Σύμφωνα με τις μελέτες που βασίζονται στη βιοψία, η ηπατική στεάτωση παρατηρείται σε ποσοστό 16-88% ανάλογα με το είδος του πληθυσμού. Για παράδειγμα σε υλικό από διεγχειρητικές βιοψίες αν προέρχονται από βαριατρικές επεμβάσεις τα ποσοστά είναι πολύ πιο υψηλά σε σχέση με μη βαριατρικές. Άτομα με φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες που υποβάλλονται σε ηπατική βιοψία προκειμένου να γίνουν δότες ηπατικού μοσχεύματος, σε ποσοστό 33-88% έχουν ιστολογική στεάτωση και το ποσοστό της μέτριας και σοβαρής ιστολογικής εικόνας (>30% των ηπατοκυττάρων) κυμαίνεται από 5-41%.^{54,55} (Πίνακας 2.2)

Το 2016 δημοσιεύτηκε μια μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 8.515.431 άτομα από 22 χώρες.⁵⁴ Στην ανάλυση αυτή ο επιπολασμός της NAFLD είναι 25,24% με υψηλότερα ποσοστά στη Μέση Ανατολή και Νότια Αμερική και χαμηλότερα στην Αφρική.

Ενδείξεις υπάρχουν σχετικά και με τη φυλετική κατανομή της NAFLD. Οι διαφορές σε πληθυσμιακές ομάδες αποδίδονται σε γενετικές διαφορές που αφορούν την κατανομή του λιπώδους ιστού ή τον μεταβολισμό, ίσως όμως να παίζουν ρόλο και οι διατροφικές συνήθειες των εν λόγω πληθυσμών.

Πίνακας 2.2.⁵⁴ Επιπολασμός NAFLD με βάση τον πληθυσμό και τη μέθοδο διάγνωσης

Συγγραφέας	Έτος	Υλικό	Μέθοδος	Χώρα	Άτομα	NAFLD (%)	NASH (%)
Browning	2004	Πληθ. Μελέτη	Μαγν. φασματοσκοπία	ΗΠΑ	2287	31	
Bedogni	2005	Πληθ. Μελέτη	Υπέρηχος	Ιταλία	598	23	
Fan	2005	Πληθ. Μελέτη	Υπέρηχος	Κίνα	3175	15	
Nomura	1988	Πληθ. Μελέτη	Υπέρηχος	Ιαπωνία	2574	14	
Clark	2003	Πληθ. Μελέτη	Αμινοτρανσφεράσες	ΗΠΑ	15676	5,4	
Ruhl	2003	Πληθ. Μελέτη	Αμινοτρανσφεράσες	ΗΠΑ	5724	2,8	
Jimba	2005	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Ιαπωνία	1950	29	
Hamagushi	2005	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Ιαπωνία	4401	18	
Park	2006	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	N. Κορέα	6648	16	
Hultcrantz	1986	Εξ. Ασθενείς	Βιοψία ήπατος	Σουηδία	149	39	
Lee	1989	Νοσηλεύόμενοι	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	543		9
Nomomura	1992	Νοσηλεύόμενοι	Βιοψία ήπατος	Ιαπωνία	561		1
Byron	1996	Νοσηλεύόμενοι	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	1226		11
Daniel	1999	Νοσηλεύόμενοι	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	81	51	32
Berasain	2000	Νοσηλεύόμενοι	Βιοψία ήπατος	Ισπανία	1075		16
Hilden	1977	Νεκροτομές	Βιοψία ήπατος	Σουηδία	503	24	
Ground	1982	Νεκροτομές	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	423	16	
Wanless	1990	Νεκροτομές	Βιοψία ήπατος	Καναδάς	207	29	6
El-Hassan	1992	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Σ. Αραβία	1425	10	
Lonardo	1997	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Ιταλία	363	20	
Araujo	1998	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Βραζιλία	217	35,5	
Omagari	2002	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Ιαπωνία	3432	9	
Luyckx	1998	Βαριατρ. Χειρ.	Βιοψία ήπατος	Βέλγιο	528	74	
Silverman	1990	Βαριατρ. Χειρ.	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	100	86	36
Dixon	2001	Βαριατρ. Χειρ.	Βιοψία ήπατος	Αυστραλία	105	71	25
Beymer	2003	Βαριατρ. Χειρ.	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	48	85	33
Spaulding	2003	Βαριατρ. Χειρ.	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	48	88	56
Mathurin	2006	Βαριατρ. Χειρ.	Βιοψία ήπατος	Γαλλία	167		14,4
Franzese	1997	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Ιταλία	72	53	
Tominaga	1995	Εξ. Ασθενείς	Υπέρηχος	Ιαπωνία	810	3	
Schwimmer	2006	Νεκροτομές	Βιοψία ήπατος	ΗΠΑ	742	9,6	3
Younossi	2016	Μετα-ανάλυση		Παγκόσμια	8.515.431	25,24	

Οι μελέτες από την Άπω Ανατολή παρουσιάζουν ποσοστά στεάτωσης στο γενικό πληθυσμό, από 9-29% ενώ από την Ευρώπη σε μη βαριατρικούς ασθενείς από 23-39%, και από τις ΗΠΑ από 16-31%.⁵⁶ Οι Αφρο-αμερικανοί έχουν πολύ μικρή επίπτωση νόσου σε σύγκριση με τους Ισπανόφωνους ή τους Ευρωπαίους.⁵⁶⁻⁵⁸ Διαφορές έχουν παρατηρηθεί και μεταξύ ατόμων που ζουν σε αστικές και σε αγροτικές περιοχές με μεγαλύτερη επίπτωση στις πόλεις. (Πίνακας 2.3.)⁵⁹

Πίνακας 2.3.⁵⁸ Επιπολασμός της NAFLD με βάση τη γεωγραφική κατανομή

Ασία	27,3%
Ευρώπη	23,7%
Μέση Ανατολή	31,7%
Βόρεια Αμερική	24,1%
Νότια Αμερική	30,5%
Σύνολο	25,2%

Η NAFLD γίνεται πιο συχνή σε μεγαλύτερη ηλικία και σε παλαιότερες μελέτες αναφέρεται στο 1% κάτω από την ηλικία των 20 ετών, 18% σε 20-40 έτη και 39% σε ηλικίες άνω των 60.⁶⁰ (Πίνακας 2.4) Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στον αυξημένο ρυθμό ίνωσης προϊούσης της ηλικίας είτε σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους ηλικιωμένους, που προκαλεί ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη και στεάτωση. Στα παιδιά ο επιπολασμός της NAFLD δεν είναι με ακρίβεια γνωστός. Οι υπάρχουσες μελέτες έχουν δείξει ότι κυμαίνεται από 2,6-9,6% ενώ σε παχύσαρκα παιδιά μεταξύ 38-53%.⁶¹ Επίσης ενώ παλιότερα κυριαρχούσε η άποψη πως υπάρχει υπεροχή των γυναικών,^{60,62-64} οι μεταγενέστερες μελέτες δείχνουν παρόμοια συχνότητα στα δύο φύλα,^{65,66} ενώ οι πιο πρόσφατες πως υπάρχει υπεροχή των ανδρών, ειδικά στη λευκή φυλή.⁶⁶ Όμως υπάρχουν ενδείξεις πως οι γυναίκες έχουν κατά τη διάγνωση πιο προχωρημένο στάδιο νόσου, γεγονός που υποδηλώνει επιθετικότερη συμπεριφορά της νόσου.⁶²

Πίνακας 2.4.⁶⁰ Επιπολασμός της NAFLD με βάση την ηλικία

30-39 ετών	22,4%
40-49 ετών	26,5%
50-59 ετών	27,4%
60-69 ετών	28,9%
70-79 ετών	33,9%
Σύνολο	24,2%

2.3. Παθοφυσιολογία NAFLD

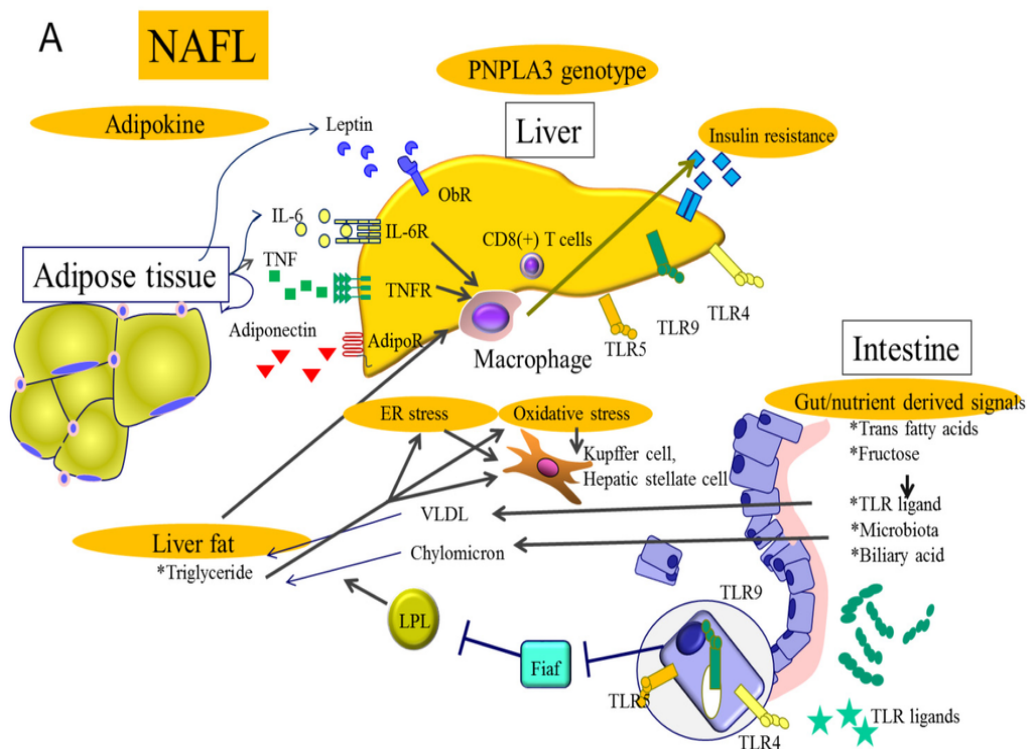
Η NAFLD χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση λιπιδίων στο ήπαρ. Η πρωταρχική διαταραχή είναι η εναπόθεση ελεύθερων λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων. Αυτή ενισχύεται στη συνέχεια από την ενδογενή συστηματική και περιφερική (ηπατική για την ακρίβεια) αντίσταση στην ινσουλίνη.⁶⁷ Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί εμφάνισης κι εξέλιξης της NAFLD είναι πολύπλοκοι και πολυπαραγοντικοί με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικών κατά καιρούς θεωριών στη διεθνή βιβλιογραφία.⁴⁸

2.3.1. Η θεωρία των δύο χτυπημάτων

Η θεωρία των δύο χτυπημάτων περιγράφει την εξέλιξη της NAFLD σε NASH. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η ηπατική συσσώρευση λιπιδίων ως αποτέλεσμα δίαιτας υψηλής σε περιεκτικότητα λιπαρών οξέων, καθιστικής ζωής, παχυσαρκίας κι αντίστασης στην ινσουλίνη, αποτελεί το «πρώτο χτύπημα» ευαισθητοποιώντας το ήπαρ σε περαιτέρω προσβολές που λειτουργούν ως «δεύτερο χτύπημα». Το «δεύτερο χτύπημα» ενεργοποιεί ένα καταρράκτη φλεγμονωδών διεργασιών που καταλήγει στην ινογένεση.⁶⁸ Ωστόσο, έγινε πολύ νωρίς εμφανές ότι η θεωρία αυτή είναι υπερβολικά απλοϊκή για να περιγράψει την ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός νοσήματος στο οποίο εμπλέκονται πολλαπλοί παράλληλοι παράγοντες σε άτομα στα οποία εκτός των άλλων παρουσιάζουν και μία γενετική προδιάθεση.

2.3.2. Η θεωρία των πολλαπλών και παράλληλων χτυπημάτων

Η θεωρία των πολλαπλών και παράλληλων χτυπημάτων αποτελεί την ευρέως γνωστή κι αποδεκτή υπόθεση σχετικά με την κατανόηση της παθογένειας της NAFLD. Σύμφωνα με αυτήν τα «πολλαπλά χτυπήματα» προέρχονται από το έντερο και το λιπώδη ιστό με αποτέλεσμα την πρόκληση φλεγμονής και περαιτέρω βλάβης του ήπατος (Εικόνα 2.2.).⁶⁹ Οι διατροφικές συνήθειες καθώς επίσης και οι περιβαντολογικοί και γενετικοί παράγοντες μπορούν να επιφέρουν ανάπτυξη αντίστασης ινσουλίνης, παχυσαρκία με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων και αλλαγές στην εντερική μικροχλωρίδα.⁴⁸



Εικόνα 2.2. Η θεωρία των πολλαπλών και παράλληλων χτυπημάτων⁴⁸

Λιποτοξικότητα: (1) ήπαρ επιφορτισμένο με λιπίδια που συνίστανται κυρίως σε TG πιθανόν αντικατοπτρίζει μια καλοήγη διεργασία αφού τα TG πιθανόν ασκούν κυρίως προστατευτική επίδραση. Επιπλέον, η υπερλεπτιναιμία οδηγεί σε οξείδωση των ηπατικών λιπιδίων, προστατεύοντας επίσης το όργανο από την λιποτοξικότητα. Όταν η ικανότητα των περιφερικών και κεντρικών οργάνων να αποτοξικοποιούν τα «επιθετικά λιπίδια» περιορίζεται, είναι δυνατόν να ξεκινήσει η λιποτοξική προσβολή του ήπατος. Η φλεγμονή μπορεί να προηγείται της στεάτωσης στη NASH. Σήματα από το πεπτικό σύστημα: πολλά σήματα πέραν της ενδοτοξίνης είναι δυνατόν να επηρεάζουν την ηπατική στεάτωση και φλεγμονή. Πολλά μονοπάτια έχουν αναγνωριστεί σχετικά με το πώς η μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος μπορεί να επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό του ξενιστή: (2) απουσία μικροχλωρίδας σε μη γόνιμα ποντίκια σχετίζεται με αυξημένη δραστικότητα της φωσφοριλιωμένης AMPK στο ήπαρ και τους μύες (δεν εικονίζεται). (3) κάποια από τα

προϊόντα διάσπασης των πολυσακχαριτών μεταβολίζονται σε SCFAs. SCFAs όπως το προπιονικό και η οξική κυτταρίνη είναι προσδέτες για τους υποδοχείς G-πρωτεΐνης Gpr41 και Gpr43. Έλλειψη SCFAs πιθανόν επιτρέπει εξέλιξη γεγονότων συστηματικής φλεγμονής. Τέτοιοι μηχανισμοί συνδυάζουν κομμάτι τη διατροφή, τη μικροχλωρίδα και τα επιθηλιακά κύτταρα ως «διατροφικούς αισθητήρες». (4) η μικροχλωρίδα μειώνει την επιθηλιακή έκφραση του παράγοντα Fiaf, που δρα ως αναστολέας της λιποπρωτεϊνική λιπάση του ορού (LPL) και ως εκ τούτου αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της περιφερικής αποθήκευσης του λίπους. (5) πολλοί TLRs, όπως ο TLR5 ή ο TLR9, μπορούν όχι μόνο να επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα αλλά και να ρυθμίζουν το μεταβολισμό, τη συστηματική φλεγμονή, και την IR, τονίζοντας έτσι το ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος στη μεταβολική φλεγμονή όπως παρατηρείται στη NASH. (6) διάφορα θρεπτικά συστατικά όπως τα trans λιπαρά οξέα (TFAs), φρουκτόζη ή προσδέτες των AhR υποδοχέων όπως η TCDD, πιθανόν οδηγεί άμεσα στη στεάτωση/ηπατική φλεγμονή. Σήματα από το λιπώδη ιστό: τα σήματα που προέρχονται από το λιπώδη ιστό πέρα από τα τοξικά λιπίδια, πιθανόν παίζουν κεντρικό ρόλο στην NAFLD / NASH. (7) εδώ, οι αδιποκίνες όπως η αδιπονεκτίνη και η λεπτίνη, συγκεκριμένες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο TNFα ή IL-6 και άλλες (Fas, PPARc) έχουν θεμελιώδη σημασία. Το περιβάλλον κυτταροκινών / αδιποκινών πιθανόν να είναι κρίσιμο, αφού διαγονιδιακά ποντίκια ob / ob-αδιπονεκτίνη, αν και γίνονται σοβαρά παχύσαρκα, δεν εμφανίζουν αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. Αυτό δείχνει ότι στην ιεραρχία των διεργασιών διαλυτοί μεσολαβητές παίζουν τον κεντρικό ρόλο. Μεσολαβητές που προέρχονται από το λιπώδη ιστό μπορεί πράγματι να επηρεάζουν όργανα στόχους όπως το ήπαρ, αφού τα JNK1 ποντίκια χωρίς λιπώδη ιστό εμφανίζονται προστατευμένα από παχυσαρκία που προκαλείται από τη διατροφή, και πειράματα έχουν αποδείξει ότι αυτό το αποτέλεσμα διαμεσολαβείτε κυρίως από την IL-6, που είναι καθοριστικής σημασίας στην ανθρώπινη παχυσαρκία (Tilg et al., 2010).

2.3.2.1. Μεταβολισμός των λιπιδίων και λιποτοξικότητα

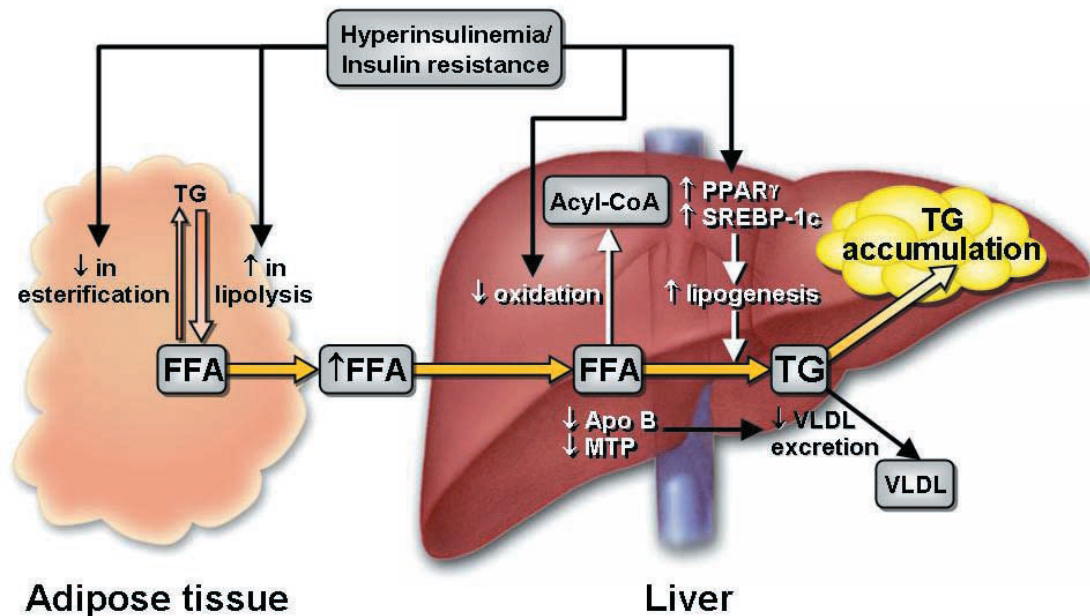
Το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ των ασθενών με NAFLD κυρίως με τη μορφή των τριγλυκεριδίων.⁷⁰ Τα τριγλυκερίδια προέρχονται από την εστεροποίηση της γλυκαιρόλης και των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs), η προέλευση των οποίων είναι είτε η δίαιτα, είτε ο λιπώδης ιστός μέσω λιπόλυσης ή και μέσω ηπατικής de novo λιπογένεσης.⁷¹ Από τη στιγμή που βρίσκονται στα ηπατοκύτταρα τα FFAs, υφίστανται τη δράση της ακυλικής συνθάσης acyl-CoA και σχηματίζουν λιπαρά ακυλο-CoAs, τα οποία με τη σειρά τους θα ακολουθήσουν είτε την οδό της εστεροποίησης είτε την οδό της β-οξειδωσης.⁷¹

Η συσσώρευση τριγλυκεριδίων αυτή καθαυτή δεν είναι ηπατοτοξική και θα μπορούσε να αποτελέσει αμυντικό μηχανισμό στην εξισορρόπηση της περίσσειας των FFAs.⁷² Η αναστολή της ενσωμάτωσης των τριγλυκεριδίων σε λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), προκαλεί εξασθένηση έκκρισης τους και προφανώς περαιτέρω συσσώρευση στο ήπαρ.⁷³ Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η αναστολή της έκφρασης της ακυλοτρανσφεράσης-2 της διακυλογλυκερόλης (DGAT2) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων με επακόλουθη αύξηση της οξειδωσης των FFAs κι επιδείνωση της στεατοηπατίτιδας.⁷⁴ Επομένως η αυξημένη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σαν επιφαινόμενο που συμβαίνει ταυτόχρονα με παραγωγή τοξικών μεταβολιτών, λιποτοξικότητα και ηπατική βλάβη.⁷⁵

Η ηπατική τέλος de novo λιπογένεση μπορεί να αυξηθεί με ενεργοποίηση μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη πρόσδεσης του ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης στην ισομορφή SREBP-1c ρυθμίζει την ενεργοποίηση της de novo λιπογένεσης και διεγείρεται από την ινσουλίνη, ενώ η ισομορφή SREBP-2 εμπλέκεται στην ομοίωση της κυτταρικής χοληστερόλης, επομένως η δυσλειτουργία τους εμπλέκεται στη συσσώρευση των ηπατικών λιπών.⁷⁶ Ομοίως η de novo λιπογένεση αυξάνεται με ενεργοποίηση του υποδοχέα των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων-γ (PPAR-γ) και της πρωτεΐνης πρόσδεσης του στοιχείου απόκρισης σε υδρογονάνθρακα (ChREBP) η οποία ενεργοποιείται από τη γλυκόζη και προάγει ταυτόχρονα και τη σύνθεση τριγλυκεριδίων και FFAs.

2.3.2.2. Αντίσταση στην ινσουλίνη

Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί ένα από τα «πολλαπλά χτυπήματα» που προδιαθέτουν την ανάπτυξη NAFLD και την εξέλιξη της σε NASH, πρωταρχικής σημασίας τόσο για την εδραίωση της λιποτοξικότητας όσο και του οξειδωτικού στρες και της ενεργοποίησης του φλεγμονώδους καταρράκτη (Εικόνα 2.3).⁷⁷



Εικόνα 2.3. Αντίσταση στην ινσουλίνη στη NAFLD⁷⁸

Μεταξύ των υποδοχέων της ινσουλίνης, το υπόστρωμα των υποδοχέων ινσουλίνης-2 (IRIS-2) μπορεί να λειτουργήσει ως ρυθμιστής της SREBP-1c επηρεάζοντας τη de novo λιπογένεση.⁷⁰ Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη το IRS-2 καταστέλλεται επομένως η SREBP-1c υπερεκφράζεται και η de novo λιπογένεση αυξάνεται.⁷⁹ Επιπλέον, σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, η β -οξείδωση των FFAs αναστέλλεται προάγοντας περαιτέρω τη συσσώρευση των ηπατικών λιπιδίων.⁸⁰

Τα FFAs στα ηπατοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα μονοπάτια σηματοδότησης της ινσουλίνης μέσω της ενεργοποίησης σερίνης - κινάσης, συμβάλλοντας έτσι στην κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη.⁸¹ Επιπρόσθετα, η ινσουλίνη έχει ισχυρή δράση στην καταστολή της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό. Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, αυτή η καταστολή διαταράσσεται, με αποτέλεσμα την αυξημένη εκροή των FFAs στο ήπαρ.⁸² Άλλοι μηχανισμοί απομάκρυνσης λίπους, όπως η διαταραχή οξείδωσης των ηπατικών λιπαρών οξέων ή η μειωμένη σύνθεση και έκκριση των VLDL έχουν μικρότερη σημασία στον προσδιορισμό της συσσώρευσης λίπους και της λιποτοξικότητας στη NAFLD.⁸³

Τέλος σε ασθενείς με NAFLD, τόσο οι γενετικοί όσο κι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλοεπιδρούν περαιτέρω με τον καταρράκτη σηματοδότησης της ινσουλίνης και συμβάλλουν έτσι στη διατήρηση κι επιδείνωση της αντίστασης στην ινσουλίνη.⁸⁴ Η φωσφορυλίωση σερίνης του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης μέσω φλεγμονωδών μετατροπέων σηματοδότησης, όπως η κινάση c-jun N-terminal protein kinase-1 ή ο αναστολέας του πυρηνικού παράγοντα nuclear

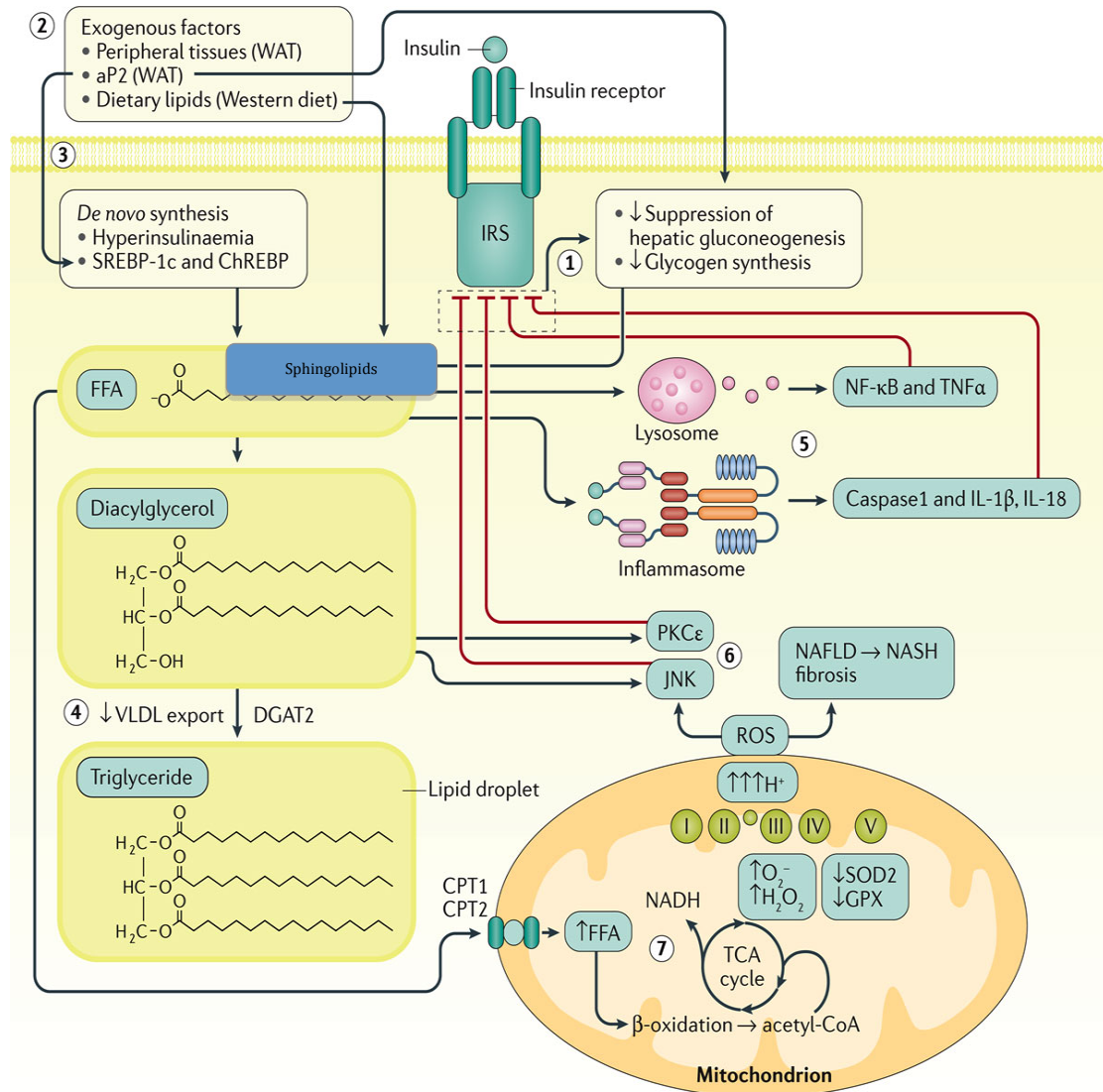
factor- γ B kinase-b (IKKb),⁸⁴ η ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-kB και των αναστολέων σηματοδότησης των κυτοκινών SOCS (suppressors of cytokine signaling),⁸⁵ αποτελούν μόνο κάποιους από τους μηχανισμούς που μπορούν να διαταράξουν τη σηματοδότηση ινσουλίνης σε ασθενείς με NAFLD.

2.3.2.3. Οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Το οξειδωτικό στρες οφείλεται σε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) ή δραστικών μορφών αζώτου (RNS) και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού.⁸⁶ Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων αποτελούν την κύρια πηγή ROS.⁸⁷ Η αυξημένη ηπατική συσσώρευση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, κινητοποιεί την ηπατική οξείδωση των λιπαρών οξέων ως αντιστάθμιση στην υπερβολική αποθήκευση λίπους στο ήπαρ.⁸⁸ Η υπεροξείδωση των λιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών μπορεί να συμβάλλει στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία καθώς και στην αυξημένη παραγωγή ROS.⁸⁸ Το οξειδωτικό στρες επιπλέον ενεργοποιεί φλεγμονώδεις διεργασίες, συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη της NAFLD σε NASH.⁸⁹

Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η NAFLD θα μπορούσε να θεωρηθεί μία μιτοχονδριακή νόσος.⁹⁰ Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμβάλλει στην παθογένεια της NAFLD, δεδομένου ότι επηρεάζει την ηπατική ομοιοστάση των λιπιδίων, προάγει την παραγωγή ROS και την υπεροξείδωση των λιπιδίων, συμβάλλει στην απελευθέρωση κυτοκινών και οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση.⁹¹

Μορφολογικές αλλαγές, εξάντληση του μιτοχondριακού DNA (mtDNA), μειωμένη δραστικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας και διαταραχή της μιτοχondριακής β-οξειδωσης, είναι οι βασικές μιτοχondριακές ανωμαλίες που φαίνονται να σχετίζονται με τη NAFLD (Εικόνα 2.4).⁹² Μιτοχondριακές αλλαγές στα ηπατικά μιτοχόνδρια έχουν επίσης παρατηρηθεί και σε ασθενείς με NASH (Εικόνα 2.5).^{88,92}



Εικόνα 2.4. Μιτοχondριακή δυσλειτουργία στη NAFLD⁶⁹

2.3.2.4. Φλεγμονή και κυτταρική απόπτωση

Τα αυξημένα επίπεδα FFAs και η επακόλουθη λιποτοξικότητα που προκαλούν, η δυσλειτουργία του περιφερικού λιπώδους ιστού και οι εντερικές ενδοτοξίνες, συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και διατήρηση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών, τόσο συστηματικά όσο και σε επίπεδο ήπατος.

Δύο είναι οι κύριες φλεγμονώδεις οδοί που εμπλέκονται αποφασιστικά στην ανάπτυξη της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης στη NAFLD: οι JNK-AP-1 και IKK-NP-κΒ.⁹³ Η επίμονη ενεργοποίηση της οδού NF-κΒ έχει αποδειχτεί τόσο σε ζωικά μοντέλα με NAFLD⁹⁴ όσο και σε ασθενείς με NASH.⁹⁵ Η υπερέκφραση του IKK2 και η συνεχής ενεργοποίηση του NF-κΒ στα ηπατοκυττάρια οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή και αντίσταση στην ινσουλίνη με τη λιπόλυση να μην καταστέλλεται επαρκώς με αποτέλεσμα την αυξημένη προσφορά λιπαρών οξέων στο ήπαρ και συνεπώς στεάτωση.⁹⁴

Ο βασικός ρόλος της ηπατικής παραγωγής κυτοκινών στην εξέλιξη από στεάτωση σε NASH υποστηρίζεται από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, που αποδεικνύουν ότι η ηπατική έκθεση σε αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, οδηγεί σε ιστολογικές μεταβολές συμβατές με NASH όπως η νέκρωση των ηπατοκυττάρων και η απόπτωση, η χημειοταξία των ουδετερόφιλων, η ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων και η παραγωγή σωμάτων Mallory.⁹⁶

Τέλος τα επίπεδα TNF-α στον ορό και στο ήπαρ είναι αυξημένα σε ασθενείς με NASH, επάγοντας την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων και την κυτταρική απόπτωση, αντανακλώντας την ιστολογική σοβαρότητα της ιστολογικής βλάβης.⁹⁷

2.3.3. Εντερική μικροχλωρίδα

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που υποδεικνύουν ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ εντερικής μικροχλωρίδας και ήπατος, κυρίως λόγω της ανατομικής τους σχέσης αφού το 70% της αιματικής παροχής του ήπατος προέρχεται από το έντερο μέσω της πυλαίας φλέβας. Αυτό κάνει αυτόματα το ήπαρ ένα από τα πιο εκτεθειμένα όργανα σε τοξικούς παράγοντες του εντέρου όπως τα βακτήρια και τα βακτηριακά υποπροϊόντα.⁹⁸

Η NAFLD έχει συνδεθεί με μικρή εντερική βακτηριακή υπερανάπτυξη⁹⁸⁻¹⁰⁰ και αυξημένη εντερική διαπερατότητα.¹⁰¹ Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου προκαλούν αύξηση της ενδοτοξίνης LPS (πολυσακχαρίτης), η οποία επάγει τη φλεγμονώδη απόκριση των κυττάρων Kupffer του ήπατος.¹⁰⁰ Η αυξημένη παραγωγή ενδογενούς αιθανόλης από βακτήρια και η ρύθμιση του μεταβολισμού των χολικών οξέων είναι ίσως από τους πιθανούς μηχανισμούς που η μικροχλωρίδα μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη NASH.¹⁰²

2.3.4. Ορμόνες λιπώδους ιστού

Οι ορμόνες του λιπώδους ιστού ή λιποκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της NAFLD.^{103,104} Οι καλύτερα μελετημένες λιποκίνες είναι η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη, με αντίθετη δράση.¹⁰⁴ Η λεπτίνη αποτελεί προφλεγμονώδη κυττοκίνη και τα επίπεδα της αυξάνονται στην παχυσαρκία ενώ η αδιπονεκτίνη αποτελεί ηπατοπροστατευτική ορμόνη με αντιφλεγμονώδη δράση, που βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και ελαττώνεται στην παχυσαρκία.¹⁰⁴ Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο τα ανενεργά όσο και τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα Ob-RL της λεπτίνης, ο οποίος εκφράζεται περαιτέρω στην εξέλιξη της ίνωσης και την κίρρωση.¹⁰⁴ Επιπρόσθετα, η λεπτίνη φαίνεται να δρα άμεσα στα αστεροειδή κύτταρα και θεωρείται απαραίτητος διαμεσολαβητής της ηπατικής ίνωσης.¹⁰⁴ Αντίθετα, σε πλείστα πειραματικά μοντέλα τόσο NAFLD όσο και άλλων μορφών ηπατικής νόσου έχει δείχτει ο ηπατοπροστατευτικός ρόλος της αδιπονεκτίνης, η οποία βελτιώνει την ηπατική στεάτωση, τα επίπεδα τρανσαμινασών αλλά και την οφειλόμενη σε τοξικούς παράγοντες ηπατική βλάβη.¹⁰³ Στη NAFLD, λόγω παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη, παρατηρείται ελάττωση των επιπέδων αδιπονεκτίνης και αύξηση των επιπέδων λεπτίνης με αποτέλεσμα την περαιτέρω επαγωγή της φλεγμονής και της ίνωσης.¹⁰³

2.3.5. Διατροφικοί παράγοντες

Οι διατροφικοί παράγοντες, τόσο από την άποψη της ποσότητας όσο και της πρόσληψης θερμίδων, αλλά και συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, φαίνεται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη NAFLD και NASH. Σε μια μελέτη 18 υγιών ατόμων, ο διπλασιασμός της καθημερινής πρόσληψης θερμίδων με γεύματα τύπου fast food, είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της ALT κι εμφάνιση υψηλών επιπέδων στεάτωσης σε λιγότερο από τέσσερις εβδομάδες.¹⁰⁵

Η φρουκτόζη αποτελεί ένα λιπογόνο, προφλεγμονώδη διατροφικό παράγοντα που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και αύξηση του TNF-α.¹⁰⁶ Μεταβολίζεται από το ήπαρ κατά την πρώτη διέλευση της κατά 90% από συγκεκριμένες ηπατικές κινάσες, ανεξάρτητα από τη δράση της ινσουλίνης, σε 1-φωσφορική φρουκτόζη. Ο μεταβολίτης αυτός μετατρέπεται περαιτέρω σε τριφωσφορικό άλας, το οποίο με τη σειρά του εισέρχεται στο γλυκολυτικό μονοπάτι δημιουργώντας υπόστρωμα για de novo λιπογένεση.¹⁰⁷ Σε ζωικά μοντέλα έχει φανεί ότι η επαγόμενη από φρουκτόζη NAFLD σχετίζεται με βακτηριακή υπερανάπτυξη κι αυξημένη εντερική διαπερατότητα.¹⁰⁸ Επιπλέον η φρουκτόζη σε ζωικά μοντέλα μπορεί να προκαλέσει ανεπάρκεια χαλκού με επακόλουθο NAFLD.¹⁰⁹ Σύμφωνα με μελέτες, σε ασθενείς με NAFLD, η καθημερινή κατάποση βιομηχανικής¹¹⁰ κι όχι φυσικής προέλευσης (φρούτα) φρουκτόζης σχετίζεται με αυξημένη ίνωση¹¹¹ λόγω πιθανής εξάντλησης του ηπατικού ATP.¹¹² Τα γλυκά ποτά που περιέχουν σάκχαρα ο μεταβολισμός των

οποίων σχετίζεται με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη όπως η σακχαρόζη, και το σιρόπι καλαμποκιού, συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεάτωσης και στεατοηπατίτιδας ειδικά σε παχύσαρκα άτομα.¹¹³

Αντίθετα ο καφές, φαίνεται να έχει προστατευτική δράση σε ασθενείς με NAFLD. Η δράση αυτή οφείλεται τόσο στην αντιοξειδωτική δράση του καφέ όσο και στη λιπολυτική δράση της ίδιας της καφεΐνης.^{114,115}

Η μεσογειακή δίαιτα με την πλούσια περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λίπη, φαίνεται ότι παίζει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη NAFLD. Σε μία τυχαίοποιημένη μελέτη έξι εβδομάδων, φάνηκε ότι η μεσογειακή δίαιτα βελτίωσε τα ποσοστά στεάτωσης και την αντίσταση στην ινσουλίνη ακόμη και χωρίς απώλεια βάρους σε ασθενείς με γνωστή αντίσταση στην ινσουλίνη και NAFLD.¹¹⁶

Όσον αφορά το αλκοόλ, έχει προταθεί ότι η μέτρια κατανάλωση του είναι προστατευτική στη NAFLD. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν συγκεκριμένα χαμηλότερα επίπεδα στεάτωσης, ηπατικής φλεγμονής και τρανσαμινασών σε σχέση με τις ομάδες σύγκρισης.¹¹⁷ Στους ανθρώπους, η ελαφριά έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίστηκε με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης NAFLD σε μία ιαπωνική μελέτη 5.000 ατόμων.¹¹⁸ Τέλος σε μία μετα-ανάλυση που περιέλαβε περισσότερα από 40.000 άτομα, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συσχετίστηκε με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης της NAFLD στο γενικό πληθυσμό και της εξέλιξης της NAFLD σε NASH.¹¹⁹ Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν ακόμη ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο του αλκοόλ στην ανάπτυξη κι εξέλιξη της NAFLD και περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να επιβεβαιώσουν τη μεταξύ τους σχέση.

2.3.6. Γενετικό υπόβαθρο της NAFLD και κύριοι γενετικοί επιβαρυντικοί πολυμορφισμοί

2.3.6.1. Κληρονομικότητα

Πέρα από τη συμβολή των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης, η μεταβλητότητα όσον αφορά τη φαινοτυπική διείσδυση και έκφραση σε άτομα με παρόμοιους παράγοντες κινδύνου, υποδηλώνει μια μορφή γενετικής συμβολής στην εκδήλωση της NAFLD. Η ισχυρή κληρονομική προδιάθεση που οδηγεί σε NAFLD υποστηρίζεται βάση συγκλινουσών ενδείξεων από μία σειρά από επιδημιολογικές μελέτες, μελέτες μεταξύ διδύμων και ατόμων της ίδιας οικογένειας και απλών κλινικών περιστατικών.¹²⁰⁻¹²²

Πράγματι υπάρχουν τεράστιες διαφορές μεταξύ των διαφόρων εθνοτήτων που σχετίζονται με τους προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD σε NASH.¹²³ Δύο μεγάλες πολυεθνικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, έδειξαν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης NAFLD σε Ισπανόφωνους σε σχέση με Ευρωπαίους, ενώ οι Αμερικάνοι Αφρικανικής

καταγωγής ανεξαρτήτως συνύπαρξης Σακχαρώδη Διαβήτη, παχυσαρκίας και κοινωνικοοικονομικών παραγόντων παρουσίαζαν χαμηλά ποσοστά εμφάνισης NAFLD γεγονός που ενίσχυσε την άποψη περί γενετικής προδιάθεσης.^{120,124}

Μελέτες οικογενούς συσσωμάτωσης σε υπέρβαρα παιδιά και άτομα με ιστορικό υπερλιπιδαιμίας, έδειξαν ότι τόσο το κλάσμα λίπους ήπατος, όσο και τα επίπεδα διακύμανσης της ALT και η εμφάνιση λιπώδους ήπατος αποτελούν ισχυρά κληρονομικά χαρακτηριστικά.^{122,125} Σε άτομα που δεν κάνουν κατάχρηση αλκοόλ και δεν έχουν ιστορικό προσβολής από ιογενείς ηπατίτιδες, τα επίπεδα της ALT στον ορό αντανakλούν ως επί το πλείστον την εναπόθεση λίπους στο ήπαρ και έχουν χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης σοβαρότητας στεάτωσης. Σε ότι αναφορά τις μελέτες διδύμων, Φινλανδική μελέτη σε μεγάλο δείγμα μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων έδειξε μετά από διόρθωση για φύλο και δείκτη μάζας σώματος, ότι η μεταβλητότητα των επιπέδων της ALT εξηγείται σε ποσοστό 35-60% από γενετικούς παράγοντες, προτείνοντας ότι ο κληρονομικός παράγοντας είναι ισχυρός στην εναπόθεση λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα^{126,127}. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων στον ορό της γ-GT, ενός άλλου ηπατικού ενζύμου τα επίπεδα του οποίου αυξάνονται με τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ, εξηγείται κατά 50% από κληρονομικούς παράγοντες και συγκαταλέγεται στους παράγοντες κινδύνου της NAFLD μαζί με την αντίσταση στην ινσουλίνη, τα επίπεδα λιπιδίων και τις διακυμάνσεις της διαστολικής αρτηριακής πίεσης.¹²⁸

2.3.6.2. Γενετικοί πολυμορφισμοί

Γενετικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων, την εξέλιξη της στεατοηπατίτιδας, την ινογένεση, καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με κίνδυνο μεταβολικού συνδρόμου, έχουν συσχετιστεί με την NAFLD (Πίνακας 2.5).¹²⁹ Οι απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) είναι απλές νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις του DNA που, αν εντοπιστούν σε περιοχή γονιδίου, μπορεί να οδηγήσουν στην αλλαγή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου ή σε αλλαγμένη λειτουργία της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Η NAFLD μπορεί να θεωρηθεί ως μια «πολυγονιακή» νόσος, αφού ο κίνδυνος για ανάπτυξη της νόσου, ως αποτέλεσμα ενός απλού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού, είναι γενικά μικρός, και η φαινοτυπική της έκφραση σχετίζεται με πολλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς.

Πίνακας 2.5.¹²⁹ Γενετικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την εξέλιξη της NAFLD

<i>Variant</i>	<i>Gene</i>	<i>Function</i>	<i>Effect</i>	<i>Impact function</i>	<i>Minor Allele Frequency</i>	<i>Phenotype</i>
rs738409 C>G	PNPLA3	Lipid droplets remodelling	p.I148M	loss	0.267	(+) NAFLD NASH Fibrosis HCC
rs58542926 C>T	TM6SF2	VLDL secretion	p.E167K	loss	0.067	(+) NAFLD NASH Fibrosis
rs12137855 C>T	LYPLAL1	TGL catabolism	?	?	0.0164	(+) NAFLD
rs780094 A>G	GCKR	Regulation of de novo lipogenesis	intronic	?	0.302	(+) NAFLD NASH Fibrosis
rs1260326 C>T	GCKR	Regulation of de novo lipogenesis	p.P446L	loss	0.293	(+) NAFLD NASH Fibrosis
Several	APOB	VLDL secretion	Protein change	loss	<0.0001	(+) NAFLD NASH Fibrosis HCC
Several	MTTP	VLDL secretion	Protein change	loss	<0.0001	(+) NAFLD
rs13412852 C>T	LPIN1	Regulation of lipid metabolism	intronic	?	0.205	(-) NASH Fibrosis
rs4880 C>T	SOD2	Mitochondrial antioxidant	p.A16V	loss	0.411	(+) Fibrosis
rs695366 G>A	UCP2	Mitochondrial lipid metabolism OxPhos	-866 promoter variant	gain	0.264	(-) NASH
rs1044498 A>C	ENPP1	Insulin signalling inh	p.K121Q	gain	0.342	(+) Fibrosis
rs1801278 A>C	IRS1	Insulin signalling	p.G972R	loss	0.053	(+) Fibrosis
rs3750861 G>A	KLF6	Regulation of de novo lipogenesis; Fibrogenesis	Splice variant IVS1-27G	loss	0.068	(-) Fibrosis

Η επιλογή των υποψηφίων προς μελέτη γονιδίων γίνεται βάση του υποτιθέμενου ή γνωστού ρόλου τους στην παθογένεια της NAFLD ή βάση γενωμικών και πρωτεωμικών μελετών. Η μεθοδολογία που εφαρμόζεται στις μελέτες συσχέτισης γονιδίων με τη νόσο συχνά θέτει περιορισμούς. Επιπρόσθετα πολλοί πολυμορφισμοί μπορεί να εμφανίζουν ανισορροπία σύνδεσης με τον πραγματικά λειτουργικό πολυμορφισμό, ενώ οι πολυμορφισμοί μπορεί να εμφανίζουν αλληλεπίδραση. Αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορεί επίσης να προκύπτουν λόγω διαφορετικής εθνικότητας των υπό μελέτη πληθυσμών.

Το 2008 πραγματοποιήθηκε η πρώτη μελέτη σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) για το ηπατικό λίπος σε πολυεθνικό πληθυσμό της μελέτης «Dallas Heart Study». Ο πολυμορφισμός rs738409 (I148M) του γονιδίου PNPLA3, ήταν ο μόνος των 9.000 που μελετήθηκαν που εμφάνισε ισχυρή συσχέτιση με τη συγκέντρωση λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα.¹³⁰ Η συσχέτιση αυτή έχει έκτοτε επαληθευτεί και από πολλές άλλες μελέτες, και παρά την πληθώρα των γενετικών συσχετίσεων για NAFLD και NASH που έχουν δει τα μάτια της δημοσιότητας, παραμένει η μόνη ισχυρή και πειστική συσχέτιση μεταξύ ενός SNP και της παρουσίας ηπατικής στεάτωσης.

Ακολουθεί περιγραφή των δεδομένων που έχουμε για τη συσχέτιση των δύο γονιδιακών πολυμορφισμών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας με τη NAFLD και NASH.

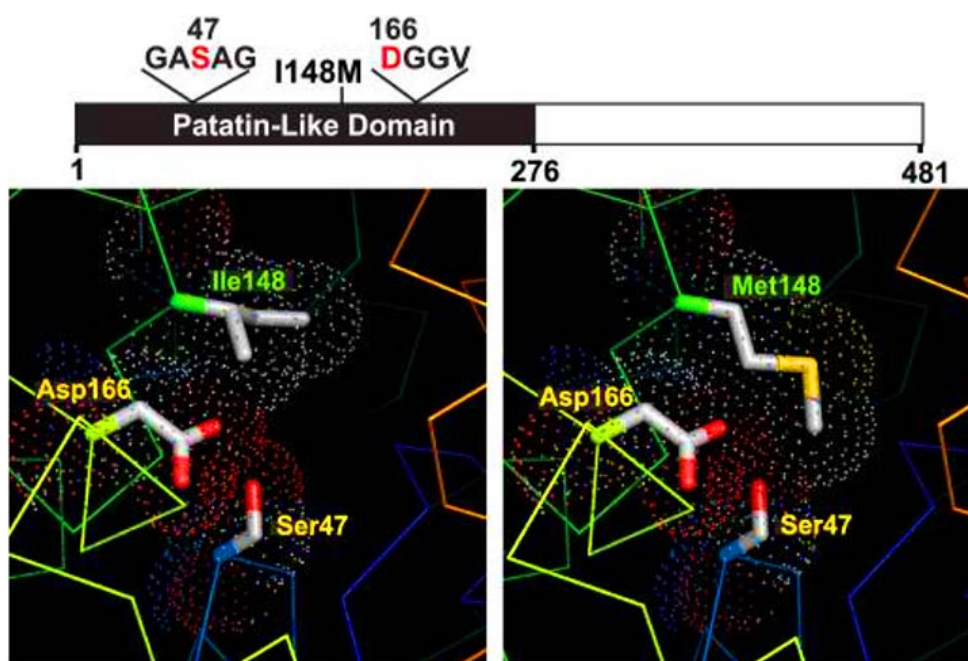
2.3.6.2.1. PNPLA3

Η αδιπονουτρίνη, γνωστή και ως PNPLA3 (Patatin Phospholipase Domain-Containing 3) είναι μία πρωτεΐνη 481 αμινοξέων με ενεργότητα TG λιπάσης, που διαμεσολαβεί την υδρόλυση των TG. Η PNPLA3 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό, όπου απαντάται σε κυτταρικές μεμβράνες και λιπιδικές σταγόνες.¹³¹ Στον άνθρωπο η έκφραση της είναι υψηλότερη στο ήπαρ.¹³² Η δε έκφραση της αυξάνει μεταγευματικά, ενώ παραμένει σε χαμηλά επίπεδα σε κατάσταση νηστείας.¹³²

Το γονίδιο PNPLA3 εδράζεται στη θέση 22q13.31 του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι Romeo et al το 2008¹³⁰ σε GWAS που πραγματοποίησαν με δεδομένα της Dallas Heart Study, διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs738409 C/G του γονιδίου PNPLA3 με την εναπόθεση ηπατικού λίπους και την ηπατική φλεγμονή, χωρίς την παρουσία χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου (ΜΣ). Ο πολυμορφισμός αυτός που εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στους Ισπανούς (49%, έναντι 23% στους Ευρωπαίους - Αμερικάνους και 17% στους Αμερικάνους Αφρικανικής προέλευσης), οδηγεί στην υποκατάσταση της ισολευκίνης από μεθειονίνη στο κωδικόνιο 148 (I148M) (Εικόνα 2.5). Στην ίδια μελέτη ταυτοποιήθηκε και ο πολυμορφισμός rs6006460 G/T του γονιδίου PNPLA3 που οδηγεί σε υποκατάσταση της σερίνης από ισολευκίνη στο κωδικόνιο

453(S453I), ο οποίος σχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα ηπατικού λίπους και ήταν επικρατής στους Αμερικάνους Αφρικανικής προέλευσης. Επίσης σε μελέτη του Sreliotes et al παρατηρήθηκε ότι η επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ήταν υψηλότερη στις γυναίκες με NAFLD αποδεδειγμένη με βιοψία ήπατος από ότι στους άνδρες, υπονοώντας μία πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού με το φύλο.¹³³

Η συσχέτιση του γονιδίου PNPLA3 με τη NAFLD έχει επιβεβαιωθεί ανεξάρτητα από πολλές μεταγενέστερες μελέτες τόσο σε ενήλικες¹³⁴⁻¹³⁷ όσο και σε παιδιατρικούς^{130,135,138} πληθυσμούς ατόμων με NAFLD διαφορετικών εθνικοτήτων, με αποτέλεσμα να έχει χαρακτηριστεί ως ο πιο μελετημένος και αποδεδειγμένα επιβαρυντικός γενετικά παράγοντας της εμφάνισης και εξέλιξης της NAFLD σε NASH και ΗΚΚ. (Πίνακας 2.6)



Εικόνα 2.5. PNPLA3 variant I148M

Helen Hobbs, Nature Genetics, V40, pp1461, 2008

Πίνακας 2.6. Μελέτες αξιολόγησης της συσχέτισης του πολυμορφισμού PNPLA3 I148M και της NAFLD

<i>Ref</i>	<i>Population / Ethnicity country</i>	<i>n</i>	<i>Age</i>	<i>Diagnosis criteria</i>	<i>Key findings</i>
Wang et al ¹³⁹	Asian Tai Wan	879	Adult	US	Increased in TG, ALT, AST
Sookoian et al ¹³⁷	Caucasian Argentina	266	Adult	US Liver biopsy	Increased liver fat, liver injury
Kollerits et al ¹⁴⁰	Italy Austria United States	4290	Adult	NA	Increased in ALT, AST
Xu et al ¹⁴¹	Chinese China	651	Adult	US	Increased ALT, GGT and related to development and progression of NAFLD
Speliotes et al ¹³³	Caucasian United States	1597	Adult	Liver Biopsy	Increased risk of histological NAFLD not associated with metabolic syndrome
Rotman et al ¹³⁸	Caucasian United States	1117	Adult Pediatric	Liver biopsy	Earlier presentation of NAFLD in pediatric patients
Valenti et al ¹⁴²	Caucasian Italian	149	Pediatric	Liver Biopsy	Associated with steatosis, NASH, Fibrosis
Goran et al ¹⁴³	Hispanic United States	327	Pediatric	MRS	Higher liver fat and lower HDL-C

Davis et al ¹⁴⁴	Hispanic United States	153	Pediatric	MRI	Increased liver fat when dietary carbohydrate intake
Lin et al ¹⁴⁵	Asian Tai Wan	520	Pediatric	US	Increased ALT and risk of NAFLD
Vitasalo et al ¹⁴⁶	Caucasian Finland	481	Pediatric	NA	Increase in ALT
Sookoian et al ¹⁴⁷	Meta-analysis				A negative correlation between male sex and the variant on liver fat, and a lack of significance among genotypes for metabolic syndrome
Romeo et al ¹³⁰	Hispanic - European American African - American United States	9229	Adult	H-MRS	Hispanics have a higher frequency of the I148M allele than European Americans and African Americans
Zain et al ¹⁴⁸	Chinese Indian Malay Malaysia	342	Adult	Liver biopsy	No effect of ethnicity on the associations between the variant and NAFLD

Browning et al ¹⁴⁹	White Black Hispanic United States	2287	Adult	H-MRS	Frequency of hepatic steatosis varied with ethnicity and gender
Peterson et al ¹⁵⁰	Caucasian Eastern Asian Asian-Indian- Black Hispanic United States	482	Pediatric Adult	Proton MRS	Asian-Indians have increased liver fat and prevalence of insulin resistance compared with all other ethnic groups
Wagenknecht et al ¹⁵¹	Hispanic - American African - American United States	1214	Adult	Abdominal CT	Hispanic Americans have a higher frequency of the I148M allele than African Americans
Kantartzis et al ¹³⁴	Caucasian Germany	330	Adult	H-MRS MRT	Higher liver fat but not insulin sensitivity, lipids or liver enzymes
Petit et al ¹⁵²	Caucasian France	218	Adult	H-MRS	Not associated with BMI or visceral fat area
Romeo et al ¹⁵³	Caucasian	475	Adult	US	Increased ALT and AST but not glucose tolerance and insulin sensitivity

Υπάρχουν επίσης δεδομένα που υποστηρίζουν τη συσχέτιση του PNPLA3 rs 738409 C/G με τη σοβαρότητα της στεατοηπατίτιδας και την προοδευτική ίνωση. Συγκεκριμένα ο Valenti et al¹⁵⁴ σε μια μελέτη που περιλάμβανε 574 Ιταλούς και Άγγλους ασθενείς με NAFLD έδειξε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός παρουσίαζε σημαντική συσχέτιση με τη NASH, με στεάτωση και ίνωση σταδίου >1 ανεξαρτήτως ηλικίας, BMI και παρουσίας ιστορικού ΣΔΤ2. Ομοίως ο Rotman et al,¹³⁸ σε συσχετίσεις των παθολογοανατομικών ευρημάτων της NAFLD με το PNPLA3 rs 738409, έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού με πυλαία (p=0,00025) και λοβιακή (p=0,005) φλεγμονή, με την παρουσία των Mallory-Denk bodies (p=0,02) και την ίνωση (p=0,0000077). Τέλος μία μετα-ανάλυση¹⁴⁷ έδειξε ότι ο πολυμορφισμός PNPLA3 p.1148M σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λιπώδους διήθησης ήπατος (ομοζυγώτες OR=3,3, ετεροζυγώτες OR=1,9), NASH (ομοζυγώτες OR=3,1-3,3, ετεροζυγώτες OR 2,7) ίνωσης (ομοζυγώτες OR=3,3, ετεροζυγώτες OR=2,1-2,4) και κυρίως ότι η συσχέτιση τόσο με τη φλεγμονή όσο και με την ίνωση είναι ανεξάρτητη της σοβαρότητας της στεατώσεως.

Ωστόσο ο PNPLA3 p.1148M φαίνεται ότι αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα στην εξέλιξη κι άλλων ηπατοπαθειών πέραν της μη αλκοολικής νόσου του ήπατος (Πίνακας 2.7). Συγκεκριμένα η παρουσία του σχετίζεται με αυξημένη φλεγμονή και σοβαρότατη ίνωση και κίρρωση σε ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Ομοίως η παρουσία του παθολογικού αλληλίου αυξάνει τον κίνδυνο αυξημένης στεατώσεως και σοβαρής ίνωσης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και B¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Σε μία μελέτη στην οποία 899 ασθενείς με ιστορικό χρόνιων ηπατοπαθειών υποβλήθηκαν σε ελαστογραφία ήπατος, φάνηκε ισχυρή συσχέτιση του παθολογικού πολυμορφισμού με την ηπατική ίνωση σε ένα μεγάλο εύρος τιμών της τάξης των 12-40 kPa¹⁶², καταδεικνύοντας ότι ο πολυμορφισμός αυτός δεν δρα μόνο στη διαδικασία της ινωδογένεσης αλλά και στην εξέλιξη προς κίρρωση. Πάνω σε αυτό το συμπέρασμα μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσία κίρρωσης σε ασθενείς που φέρουν τον παθολογικό αλληλίο έχουν 2-16 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΗΚΚ.^{157,163-165} (Πίνακας 2.8)

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν μελέτες σχετικά με το ρόλο του PNPLA3 p.1148M μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Ο Finkenstedt et al¹⁶⁶ κατέγραψαν τη συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού τόσο σε δότες όσο και δέκτες ηπατικού μοσχεύματος και διαπίστωσαν ότι οι ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό δέκτες είχαν αυξημένο κίνδυνο μέχρι και 14 φορές να αναπτύξουν στεάτωση στο μόσχευμα ανεξαρτήτως από άλλους παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία, το βάρος και την υποκείμενη ηπατική νόσο¹⁶⁶. Αντιθέτως η παρουσία του παθολογικού αλληλίου στους δότες του ήπατος δεν έδειξε να επηρεάζει την εμφάνιση στεατώσεως στο μόσχευμα.

Οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν παθολογική ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων¹⁶⁷. Ωστόσο, η συσχέτιση του πολυμορφισμού PNPLA3 p.I148M με το μεταβολικό σύνδρομο έχει οδηγήσει σε μία σειρά μελετών με αντιφατικά συμπεράσματα. Μία μελέτη Δανών που περιέλαβε 4000 συμμετέχοντες με φυσιολογική ανοχή γλυκόζης έδειξε μια πιθανή συσχέτιση του παθολογικού αλληλίου με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($p=0,04$) ενώ ταυτόχρονα το ίδιο αλληλίο συσχετιζόταν με χαμηλότερα επίπεδα στον ορό του αίματος τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης σε ασθενής με παθολογική ανοχή στη γλυκόζη.¹⁶⁸ Πάνω σε αυτό το σκεπτικό ακολούθησαν κι άλλες μελέτες υποστηρίζοντας μία πιθανή συσχέτιση του μεταβολισμού της γλυκόζης με τον παθολογικό πολυμορφισμό PNPLA3 p.I148M^{169,170}. Έχει επίσης προταθεί ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός οδηγεί σε μείωση της έκκρισης των VLDL με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ¹⁷¹. Όμως, υπάρχουν πολλές μελέτες που δεν έδειξαν καμία συσχέτιση μεταξύ του παθολογικού αλληλίου με το δείκτη HOMA, τα επίπεδα της γλυκόζης και των λιπιδίων στον ορό του αίματος.^{133,134,142,172} Οι φέροντες του παθολογικού πολυμορφισμού φάνηκε ότι αναπτύσσουν λιπώδη νόσο του ήπατος ανεξαρτήτως BMI^{133,138,154} και αντίστασης στην ινσουλίνη υποδεικνύοντας την πολύπλοκη σχέση μεταξύ στεάτωσης και αντίστασης στην ινσουλίνη¹⁷³. Επίσης η δράση του PNPLA3 p.I148M στις μεταβολικές οδούς της γλυκόζης και των λιπιδίων δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ, αφού οι φέροντες τον παθολογικό πολυμορφισμό μπορεί να εμφανίζουν ηπατική στεάτωση με φυσιολογική ομοιόσταση γλυκόζης και λιπιδίων.

Είναι πλέον βέβαιο ότι το γονίδιο PNPLA3 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια κι εξέλιξη της NAFLD. Ωστόσο είναι λίγα τα δεδομένα που έχουμε σήμερα για το ρόλο της παθολογικής πρωτεΐνης. Μέχρι τώρα οι κύριες προτάσεις σχετικά με το ρόλο του παθολογικού αλληλίου είναι τρεις και σχετίζονται με την υπερέκφραση και εναπόθεση FFA και TG στα ηπατοκύτταρα, με τη διαταραγμένη TG υδρόλυση και τη VLDL σύνθεση και τέλος με τη μείωση της μακράς αλυσίδας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των TG.

Πίνακας 2.7. Ηπατικές νόσοι που σχετίζονται με τον πολυμορφισμό PNPLA3 p.I148M

<i>Νόσοι</i>	<i>Μελέτες</i>	<i>Έτος</i>
Nonalcoholic fatty liver disease	Romeo et al ¹³⁰	2008
Alcoholic liver cirrhosis	Tian et al ¹⁵⁵	2010
	Stickel ¹⁵⁶	2011
Liver fibrosis	Krawczyk et al ¹⁷⁴	2011
HBV steatosis	Vigano et al ¹⁶⁰	2013
HCV steatosis	Cai et al ¹⁵⁹	2011
Alcohol and HCV cirrhosis	Muller et al ¹⁵⁸	2011
HCV cirrhosis	Valenti et al ¹⁷⁵	2011
Hepatocellular cancer	Nischalke et al ¹⁶⁵	2011

Πίνακας 2.8. Μελέτες για τη σχέση του πολυμορφισμού PNPLA3 p.I148M και Ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ)

Μελέτη	Σχεδιασμός Μελέτης	Ασθενείς	Αιτιολογία	N (ΗΚΚ: κίρρωση)	OR	95% CI
Valenti et al ¹⁷⁵	Retrospective	HCV	HCV	50: 275	2,2	1,3-2,6
Ginanni Corradini et al ¹⁶³	Retrospective	Cirrhotic	HCV	90: 131	2,2	1,4-3,5
Nischalke et al ¹⁶⁵	Retrospective	Cirrhotic	HCV Alcohol	80: 80 81: 81	1,7 2,8	0,5-5,3 1,6-6,4
Falletti et al ¹⁷⁶	Retrospective	Cirrhotic	Mixed	141: 342	1,8	1,1-2,9
Trepo et al ¹⁵⁷	Retrospective	Cirrhotic	Alcohol	145: 426	4,7	2,6-8,4
Burza et al ¹⁶³	Prospective	Swedish Obese Subjects Study	Obesity	407	16,0	2,3-11,1
Guyot et al ¹⁷⁷	Prospective	Cirrhotic	HCV Alcohol	93: 160 66: 213	1,0 1,9	0,6-1,9 1,3-2,8
Hassan et al ¹⁶⁴	Case-control	Cirrhotic	Mixed	257: 494	3,2	1,7-6,4

2.3.6.2.2. TM6SF2

Η TM6SF2 (Transmembrane 6 superfamily 2) είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 377 αμινοξέα κι ανιχνεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα σωμάτια του Golgi των ηπατοκυττάρων με ρόλο ρυθμιστή του μεταβολισμού του ηπατικού λίπους ασκώντας ανασταλτική δράση στην έκκριση των TG και στη συγκέντρωση λιποσταγονιδίων στα ηπατικά κύτταρα¹⁷⁸.

Το γονίδιο TM6SF2 εδράζεται στη θέση 19p13.3-p12 του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι Kozlitina et al το 2014 διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs58542926 C/T του συγκεκριμένου γονιδίου με αυξημένη ηπατική στεάτωση, χαμηλά επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα και κυρίως των VLDL¹⁷⁸. Ο πολυμορφισμός αυτός του οποίου η συχνότητα είναι πολύ χαμηλή στο γενικό πληθυσμό, μόλις 7% στους Ευρωπαίους, 4% στους Ισπανούς και 2% στους Αμερικάνους Αφρικανικής προέλευσης οδηγεί στην υποκατάσταση του γλουταμινικού οξέος από λυσίνη στο κωδικόνιο 167 (Glu 167 Lys)¹⁷⁹. Έκτοτε πολλαπλές μελέτες σε διαφορετικής εθνικότητας πληθυσμούς τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά έχουν επιβεβαιώσει την παραπάνω συσχέτιση (Πίνακας 2.9).

Μία μελέτη αξιολόγησης που χρησιμοποίησε πληθυσμό με ιστολογική διάγνωση NAFLD κι αφού χώρισε τον πληθυσμό σε υποομάδες με ήπια ίνωση (F0-F1) και σοβαρή ίνωση (F2-F4) έδειξε ότι το παθολογικό T αλληλίο σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρής ίνωσης ($p=0,0000163$). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζονταν με τη NAFLD και με αυξημένο κίνδυνο προχωρημένης ίνωσης και κίρρωσης¹⁸⁰. Παρόμοια συσχέτιση φάνηκε και σε μελέτη που αφορούσε παιδιατρικούς ασθενείς¹⁸¹. Ωστόσο η συσχέτιση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί σε κάθε μελέτη. Δύο μικρότερες μελέτες αναφέρουν μόνο μία πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ηπατική στεάτωση σε επίπεδο μονοπαραγοντικής ανάλυσης^{182,183}. Επίσης σε αντίθεση με τη μελέτη των Liu et al δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του TM6SF2 rs58542926 με οποιοδήποτε στάδιο ίνωσης. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα οφείλονται στο ότι οι μελέτες αυτές είναι μικρές με χαμηλή στατιστική δύναμη. Από την ανασκόπηση της τρέχουσας βιβλιογραφίας προκύπτει ότι το TM6SF2 παρουσιάζει συσχέτιση με τη σοβαρότητα της NAFLD και την εξέλιξη της σε ίνωση. Οι ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό TM6SF2 rs58542926 μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης, NASH και σοβαρού βαθμού ίνωση αλλά ταυτόχρονα εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα LDL και TG. Σε αντίθεση με αυτούς η παρουσία του φυσιολογικού αλληλίου (Glu167 C allele) ενισχύει την απελευθέρωση τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στην κυκλοφορία προστατεύοντας το ήπαρ με τίμημα δυσλιπιδιμία με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος αθηροσκλήρυνσης και καρδιαγγειακής νόσου¹⁸⁴. Συνοψίζοντας λοιπόν το TM6SF2 φαίνεται να επηρεάζει τα όργανα στόχους του μεταβολικού συνδρόμου, είτε παίζοντας ρόλο στη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα είτε ελευθερώνοντάς τα στην κυκλοφορία επιδρώντας έτσι στο καρδιαγγειακό σύστημα.

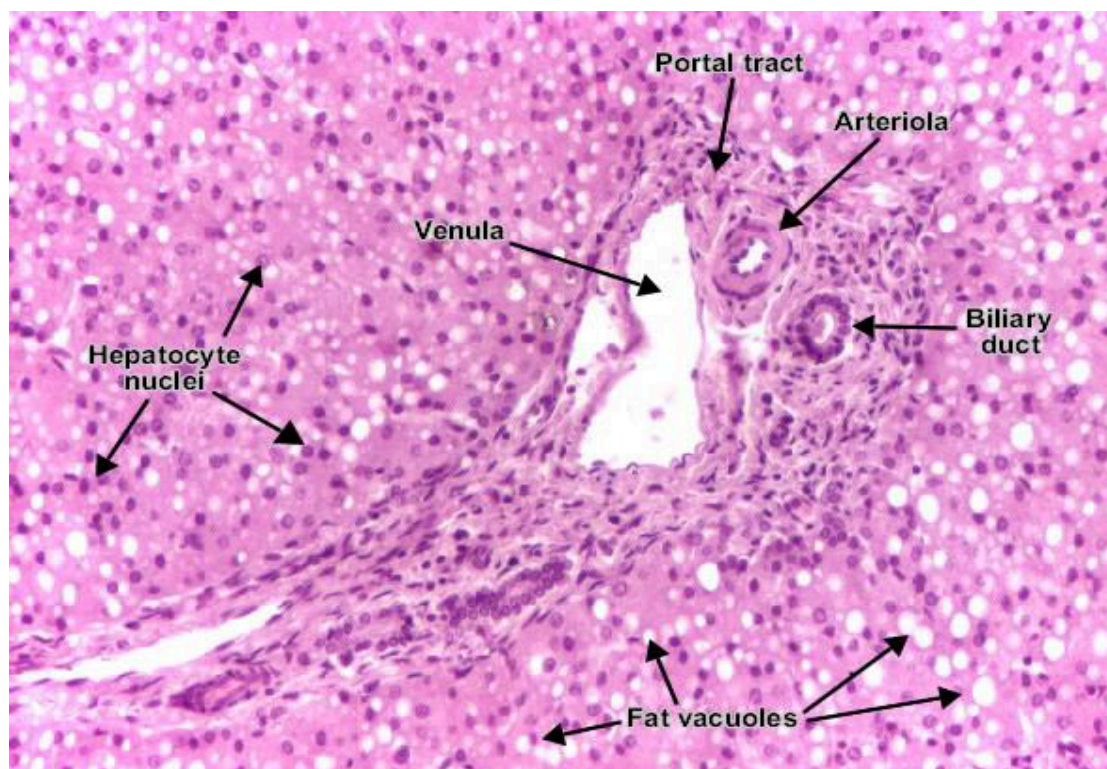
Πίνακας 2.9. Μελέτες κλειδιά για το ρόλο του πολυμορφισμού TM6SF2 Glu167Lys στη NAFLD

<i>Ref</i>	<i>Population / Ethnicity country</i>	<i>n</i>	<i>Age</i>	<i>Diagnosis criteria</i>	<i>Key findings</i>
Kozlitina et al 2014 ¹⁷⁸	European Americans African Americans Hispanics	4587	Adult	MRS	Glu167Lys associated with elevated TG, ALT and low LDL and risk of cardiovascular disease
Liu et al, 2014 ¹⁸⁰	European	1074	Adult	Liver biopsy	Modest association between rs58542926 (T) and degree of steatosis. Significant association with stage of fibrosis (p=0,00000636)
Holmen et al, 2014 ¹⁸⁵	Norwegian	10303	Adult	NA	Glu167Lys variant is associated with changes in levels of total cholesterol (p=1x10 ⁻⁴⁷) LDL(p=2x10 ⁻³⁸) TG(p=9x10 ⁻⁵⁰) Rs58542926(T) carriers protected against cardiovascular disease
Wong et al, 2014 ¹⁸³	Chinese	922	Adult	MRI	Subjects homozygous for the rs58542926(T) had lower levels of total cholesterol and LDL cholesterol and higher levels of fat in the liver

Sookolan et al, 2015 ¹⁸²	Mixed European and Argentinian	361 (135 control)	Adult	US	A weak association with NAFLD (p=0,038), which disappeared once conditioned for the effect of PNPLA3. Significant association between Glu167Lys and disease severity (p=0,027). Significant association with the degree of steatosis (p=0,0299)
Grandone et al, 2015 ¹⁸⁶	Italian	1010	Pediatric	US	Rs58542926(T) showed an association with hepatic steatosis (p<0,0001) and low circulating total cholesterol (p=0,0001) and LDL-cholesterol (p=0,0001). They reported a decreased risk of cardiovascular disease associated with the Glu167Lys mutation
Zhou et al, 2015	Finnish	300	Adult	MRI	Liver fat content was 34% higher in those who were heterozygous at the rs58542926 locus when compared with those who were homozygous for the C allele. Individuals carrying the T allele showed reduced levels of circulating lipids and risk of cardiovascular disease

2.4. Ιστολογική Εικόνα NAFLD

Οι ιστολογικές αλλοιώσεις της NAFLD περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα που κυμαίνεται από την απλή στεάτωση ως τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και μπορεί να οδηγήσουν σε προχωρημένη ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι αλλοιώσεις μοιάζουν με τις βλάβες της αλκοολικής στεατοηπατίτιδας και η διαφορική διάγνωση γίνεται από το ιστορικό του ασθενούς. Αρκετές μελέτες έδειξαν πως η NAFLD είναι η συχνότερη ιστολογική διάγνωση (40-70%) σε ασθενείς με παθολογική ηπατική βιοχημεία και αρνητικό αιματολογικό και απεικονιστικό έλεγχο.¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ Στο 70% των ατόμων με φυσιολογική ηπατική βιοχημεία και μεταβολικό σύνδρομο παρατηρούνται ιστολογικές αλλοιώσεις NAFLD^{191,192}. Η NAFLD είναι πιθανότατα η συχνότερη αιτία της αποκαλούμενης κρυπτογενούς κίρρωσης¹⁹³ στην οποία είναι δυνατόν να μην ανευρίσκονται πλέον οι ιστολογικές αλλοιώσεις της NAFLD.



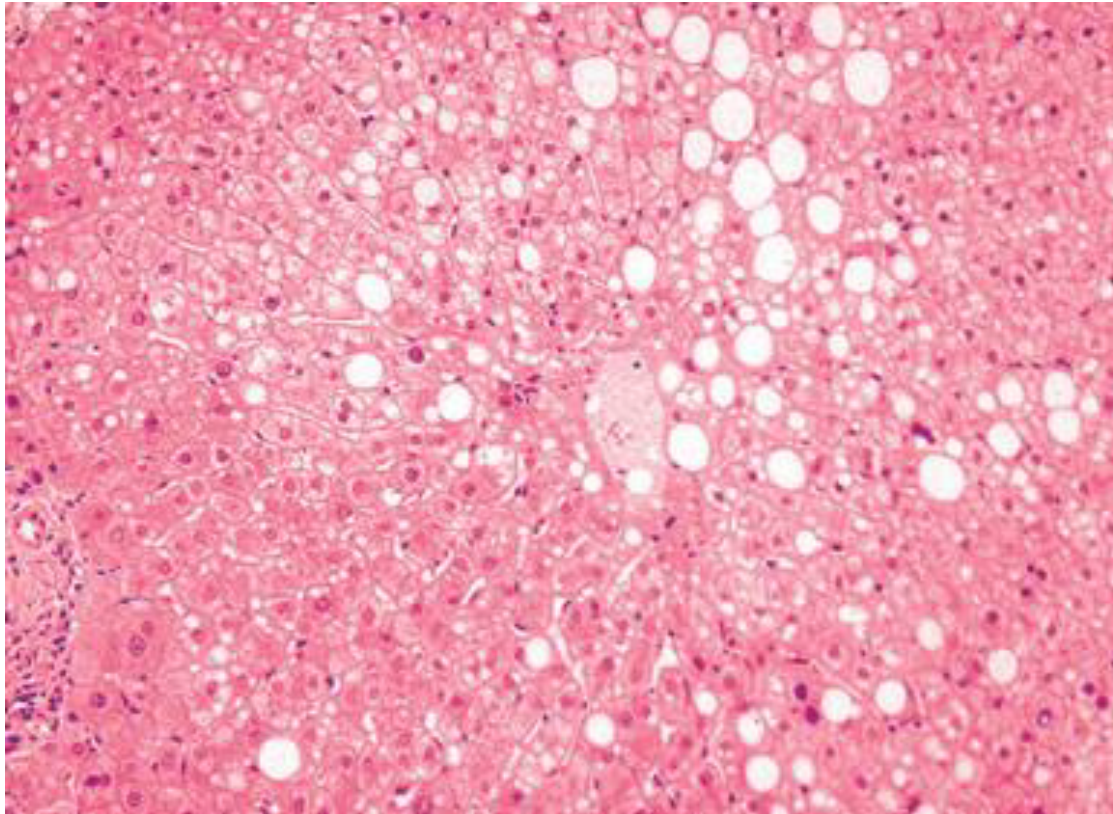
Εικόνα 2.6. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις της NAFLD παρατηρούνται κυρίως στην κεντρολοβιακή περιοχή (acinar zone 3). Όμως όλο και συχνότερα παρατηρείται προσβολή πυλαίων και περιπυλαίων διαστημάτων. (Χρώση αιματοξυλίνης - εωσίνης)

Οι παρεγχυματικές βλάβες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: στην απλή στεάτωση, τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και την κίρρωση. Συχνά υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ αυτών των κατηγοριών, καθώς δεν υπάρχουν απόλυτα όρια που να διαχωρίζουν αυτές τις καταστάσεις. Οι βλάβες αυτές στα αρχικά στάδια μπορούν να είναι αναστρέψιμες, καθώς όμως η ίνωση εξελίσσεται σε κίρρωση η πιθανότητα αυτή σχεδόν μηδενίζεται.

Η στεάτωση είναι κυρίως μακροφουσσαλιδώδης. Η σοβαρότητα της καθορίζεται από τον αριθμό των ηπατοκυττάρων που περιέχουν σταγονίδια λίπους: Ήπια στεάτωση χαρακτηρίζεται όταν έχουν προσβληθεί <33% των ηπατοκυττάρων, μέτρια 33-66%, και σοβαρή >66%¹⁹⁴. Δύο μελέτες πρότειναν χαμηλότερα όρια για το χαρακτηρισμό της βαρύτητας (<10% ήπια, 10-30% μέτρια και >30% σοβαρή) αλλά αυτές οι μελέτες αναφέρονται σε ασθενείς με ηπατίτιδα C και στεάτωση¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Έχει προταθεί πως πολύ μικρά ποσοστά στεάτωσης <5% μπορούν να μην θεωρούνται παθολογικά. Όμως καλό είναι να καθορίζεται το ακριβές ποσοστό προσβεβλημένων ηπατοκυττάρων, ιδίως σε απουσία άλλης παθολογίας στη βιοψία ήπατος. Παρόλο που η λιπώδης αλλαγή συνήθως προσβάλλει τη ζώνη 3, σε σοβαρές περιπτώσεις εκτείνεται και στο υπόλοιπο ηπατικό παρέγχυμα. (Εικόνα 2.7)

Τα ευρήματα της στεατοηπατίτιδας περιλαμβάνουν ηπατοκυτταρική βλάβη, φλεγμονή και ίνωση. Αυτές οι αλλοιώσεις κατανέμονται κυρίως στη ζώνη 3. Η αλλοίωση τύπου ballooning των ηπατοκυττάρων είναι το χαρακτηριστικότερο εύρημα της στεατοηπατίτιδας. Τα σωματίδια Mallory τα οποία χαρακτηρίζουν την αλκοολική νόσο του ήπατος και αποτελούν άθροισμα ινιδίων του κυτταροσκελετού ανευρίσκονται και στη NASH. Είναι συχνά μικρά και ελλειπώς σχηματισμένα με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να ανιχνευτούν στις συνήθεις χρώσεις¹⁹⁷. Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους μπορούν να βρεθούν αντιγόνα που σχετίζονται με υαλίνη Mallory, όπως ubiquitin, p62, και κυτταροκερατίνες 8 και 18^{194,198,199}. Ο θάνατος των ηπατοκυττάρων συμβαίνει με το μηχανισμό της απόπτωσης κυρίως και λιγότερο της νέκρωσης,^{200,201} παρότι αποπτωτικά σωματίδια δεν είναι συνήθως εμφανή ιστολογικά. Η NAFLD σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα Fas. Επιπλέον ο σχηματισμός ROS (reactive oxygen species) σχετίζεται με Fas έκφραση στα ηπατοκύτταρα οδηγώντας σε απόπτωση²⁰².

Στην αλκοολική στεατοηπατίτιδα είναι τυπικά τα μεγα-μιτοχόνδρια, όπως παρατηρούνται και στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα²⁰³⁻²⁰⁵. Μια μελέτη έδειξε πως βλάβες μιτοχονδρίων υπό τη μορφή εγκλείστων υπήρχαν σε NASH άλλα όχι σε απλή στεάτωση²⁰³ υποστηρίζοντας την υπόθεση πως μιτοχονδριακές βλάβες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της προοδευτικής ηπατικής βλάβης στη NAFLD²⁰². Η παρεγχυματική φλεγμονή είναι τυπικά ήπια και αποτελείται από μικτό πληθυσμό που περιλαμβάνει ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα (κυρίως CD3+T κύτταρα) και μακροφάγα / Kupffer κύτταρα²⁰⁶. Τα ουδετερόφιλα τυπικά κυριαρχούν. Κύτταρα φονείς (NK) μπορεί να συμμετέχουν.²⁰⁷



Εικόνα 2.7. Ήπια στεάτωση κυρίως μακροφουσσαλιδώδης με κατανομή κυρίως περικεντρική (Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης)

Η παρεγχυματική ίνωση που συμβαίνει στο λιπώδες ήπαρ έχει τυπικά περικολποειδική και περικυττάρια κατανομή και ένα ποσοστό των ασθενών εξελίσσεται σε κίρρωση. Η κίρρωση έχει κυρίως μικροοζώδη μορφή αλλά μπορεί να σχηματιστούν και μεγαλύτεροι όζοι. Τα τυπικά ευρήματα της στεατοηπατίτιδας μπορούν να γίνουν λιγότερο εμφανή από τη στιγμή που εγκαθίσταται κίρρωση οπότε μπορούν να εξαφανιστούν εντελώς. Αυτός είναι ο λόγος που πολλές περιπτώσεις NAFLD - κίρρωσης χαρακτηρίστηκαν σαν κρυψιγενείς¹⁹³. Οι αγγειακές αλλαγές που παρατηρούνται στην κίρρωση (πυλαιοσυστηματικές αναστομώσεις των κολοποειδών που μπορεί να εμποδίζει τη διακολποειδική διάβαση λιποπρωτεϊνών) έχουν ενοχοποιηθεί σαν πιθανές αιτίες για αυτό το φαινόμενο.²⁰⁸

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα θεωρείται επιπλοκή της κίρρωσης από NAFLD^{208,209}, αν και ο σχετικός κίνδυνος ΗΚΚ σε NASH-κίρρωση σε σχέση με άλλες ηπατοπάθειες είναι μικρότερος^{210,211}. Επιπλέον εκτός από τους καρκινογόνους παράγοντες που σχετίζονται γενικά με την κίρρωση, ίσως υπάρχουν παράγοντες κινδύνου που να σχετίζονται αποκλειστικά με το λιπώδες ήπαρ. Μεταξύ ατόμων με κρυψιγενή κίρρωση η παρουσία της παχυσαρκίας και του ΣΔΤ2 σχετίζονται σημαντικά με την ανάπτυξη ΗΚΚ^{209,212}. Σε μια πληθυσμιακή μελέτη, η παρουσία του ΣΔΤ2 βρέθηκε να σχετίζεται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο ΗΚΚ ανεξάρτητα από άλλους πιθανούς παράγοντες κινδύνου²¹³. Η παρουσία αντίστασης στην ινσουλίνη έχει ενοχοποιηθεί

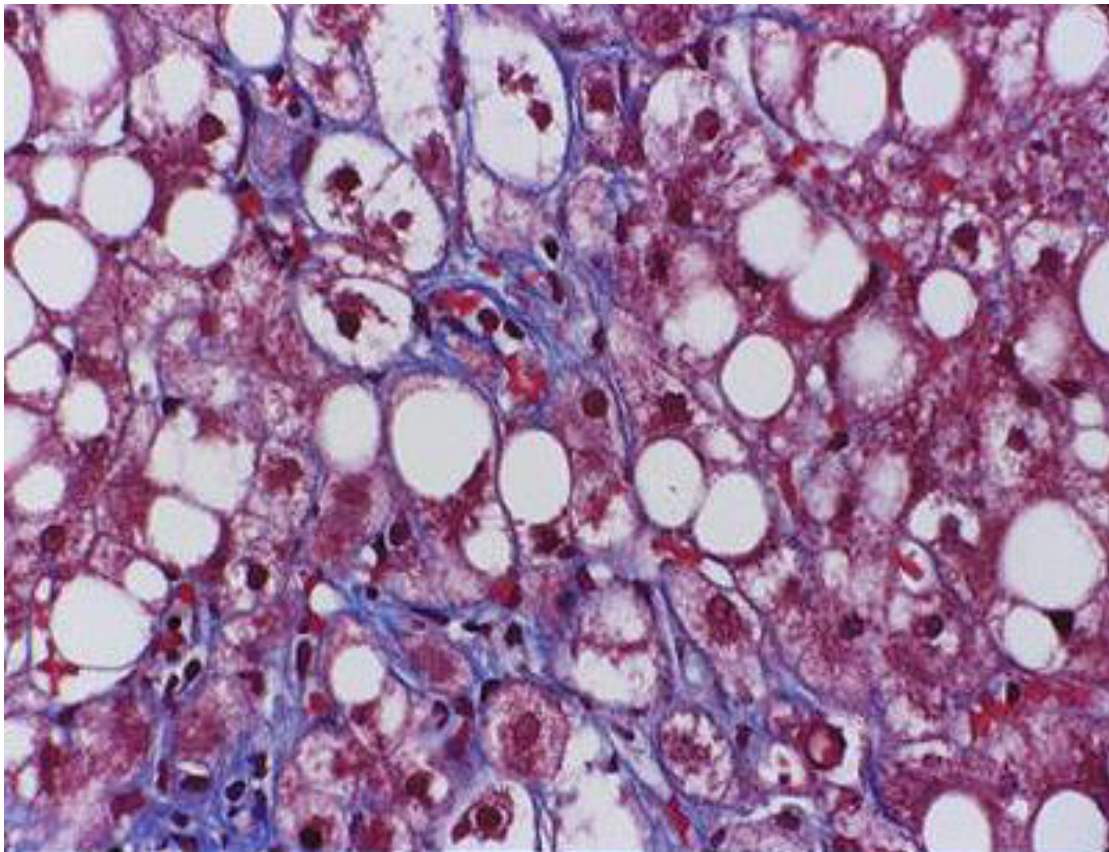
σαν παράγοντας κινδύνου για πολλές κακοήθειες όπως του παχέος εντέρου, μαστού και ενδομητρίου. Η ηπατική στεάτωση σχετίζεται με γήρανση και απόπτωση των ηπατοκυττάρων, ερέθισμα για πολλαπλασιασμό των προγόνων κυττάρων²¹⁴, που έχει αναγνωριστεί σαν πιθανό βήμα ηπατικής καρκινογένεσης^{215,216}. Επιπλέον τα ROS και τα παράγωγα υπεροξειδωσής των λιπιδίων που παράγονται με την εξέλιξη από στεάτωση σε στεατοηπατίτιδα προκαλούν βλάβη στο DNA και μεταλλάξεις γονιδίων.

Συχνά παρατηρείται μικρού βαθμού πυλαία φλεγμονή που σχετίζεται με περιπυλαία επέκταση και περιπυλαία ίνωση. Αυτό είναι ένα εύρημα που παρατηρείται σε διάφορους τύπους χρόνιας ηπατίτιδας^{194,217}. Συνήθως παρατηρείται σε συνδυασμό με τυπικά ευρήματα στο ηπατικό παρέγχυμα της NASH αλλά σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί κι μεμονωμένα²¹⁸⁻²²⁰. Η πυλαία φλεγμονή και ίνωση γίνονται πιο εμφανείς στα προχωρημένα στάδια της NASH. Σε μερικές περιπτώσεις ίσως και να σχετίζονται με άλλες συνυπάρχουσες αιτίες. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν ιδίως όταν η σοβαρότητα της πυλαίας φλεγμονής είναι δυσανάλογη με τα πιο τυπικά ευρήματα της στεατοηπατίτιδας στο ηπατικό λόβιο ή όταν υπάρχουν άτυπα ευρήματα όπως σχηματισμός λεμφοζιδίων (που υποδηλώνουν ηπατίτιδα C), ή επικράτηση πλασματοκυτταρικού πληθυσμού (που υποδηλώνει αυτοάνοση ηπατίτιδα). Αυτοαντισώματα έχουν βρεθεί στο 50% των ατόμων με NAFLD αν και η παθογενετική τους σημασία σε αυτό το σημείο είναι άγνωστη^{221,222}. Αυτοαντισώματα σε χαμηλό τίτλο έχουν βρεθεί και σε άλλες ηπατοπάθειες και θεωρούνται αντιδραστικά στην ηπατική βλάβη²²³. Μία μελέτη έδειξε πως οι ασθενείς με NAFLD και αυτοαντισώματα είχαν πιο προχωρημένο στάδιο ίνωσης και φλεγμονής σε σχέση, με όσους δεν είχαν αντισώματα, υποδηλώνοντας πιθανώς πως ανοσολογικοί παράγοντες συμβάλλουν στην ηπατική βλάβη στη NAFLD²²¹. Όμως σε άλλη μελέτη δεν διαπιστώθηκε τέτοια συσχέτιση²²².

Άλλο ιστολογικό εύρημα είναι η συμμετοχή των χοληφόρων στη φλεγμονή, η οποία μπορεί να μοιάζει με αυτές που παρατηρούνται σε πολλούς τύπους χολικών παθήσεων. Συνήθως είναι μικρού βαθμού αλλά σε προχωρημένα στάδια μπορεί να γίνει σοβαρή²²⁴. Η χολαγγειακή αντίδραση που παρατηρείται στη NAFLD θεωρείται οφειλόμενη σε απάντηση προγονικών κυττάρων που είναι συνέπεια του μειωμένου βαθμού αναγέννησης των ηπατοκυττάρων λόγω της στεάτωσης^{214,225}. Στη στεατοηπατίτιδα που συνοδεύει την ηπατίτιδα C, ο βαθμός της στεάτωσης φαίνεται να σχετίζεται με το βαθμό της χολαγγειακής αντίδρασης²²⁶ και αυτό με τη σειρά του αποτελεί το μηχανισμό δημιουργίας περιπυλαίας ίνωσης²¹⁵. Έχει περιγραφεί μια χολοστατική μορφή της NAFLD με χολαγγεία και φλεγμονή των χολαγγείων²²⁷. Όμως η καταστροφή των χολαγγείων και η χολαγγειοπενία δεν είναι τυπικό εύρημα της NAFLD και η παρουσία τους θα πρέπει να εγείρει την υποψία άλλης χρόνιας

χολαγγειοπάθειας όπως πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης ή σκληρυντικής χολαγγειίτιδας.

Ο όρος μεμονωμένη (isolated) πυλαία ίνωση έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει περιπτώσεις ηπατικής στεάτωσης που αναπτύσσονται ίνωση, χωρίς να υπάρχουν τα τυπικά λοβιακά ευρήματα της στεατοηπατίτιδας²¹⁹. Στους ενήλικους αυτό παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με νοσογόνο παχυσαρκία σε ποσοστό 18-33% των περιπτώσεων^{219,220}. Η στεάτωση είναι τυπικά ήπια ή μέτρια και οι νεκροφλεγμονώδεις αλλοιώσεις περιορίζονται κυρίως στα πυλαία διαστήματα. Η πυλαία ίνωση μπορεί να παραμείνει ακόμη και μετά θεραπεία, παρά τη βελτίωση των άλλων ευρημάτων²¹⁸ υποδηλώνοντας πως διαφορετικοί παθογενετικοί μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα στην εμφάνιση των βλαβών στα πυλαία διαστήματα²²⁸.

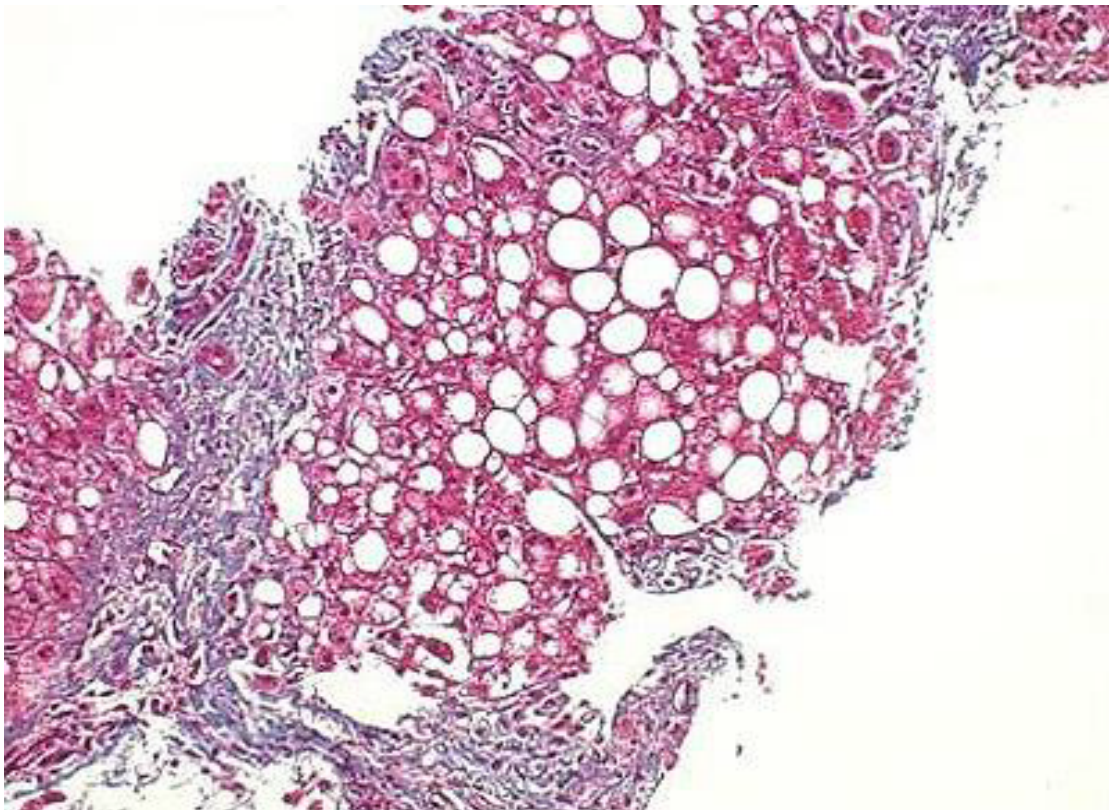


Εικόνα 2.8. Περικυτταρική ίνωση (Χρώση Trichrome Masson). Ο ινώδης ιστός με μπλε περιβάλλει τα ηπατοκύτταρα

2.4.1. Άλλα ιστολογικά ευρήματα της NAFLD

Συχνά παρατηρείται μικρού βαθμού εναπόθεση σιδήρου²²⁹⁻²³¹ στα ηπατοκύτταρα, της οποίας η σημασία είναι άγνωστη και δε θεωρείται μείζονος σημασίας²³²⁻²³⁴. Η παρουσία μεγαλύτερου βαθμού εναπόθεσης σιδήρου θα πρέπει να οδηγεί στη σκέψη άλλων πιθανών αιτιών εκτός της NAFLD.

Η επίπτωση της NAFLD στα παιδιά έχει αυξανόμενη πορεία λόγω της αύξησης της παχυσαρκίας σε αυτούς τους πληθυσμούς^{235,236} και θεωρείται η συχνότερη ηπατοπάθεια στα παιδιά²³⁷. Μεταξύ παχύσαρκων παιδιών, το άρρεν φύλο και η ισπανόφωνη ή ασιατική καταγωγή σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης λιπώδους ήπατος^{235,237,238}. Η στεατοηπατίτιδα στα παιδιά έχει διαφορετικά ευρήματα από τους ενήλικες. Συχνότερα παρατηρούνται βλάβες στα πυλαία διαστήματα και περιπυλαία, ενώ βλάβες του ηπατικού λοβίου όπως ballooning, σωματία Mallory, φλεγμονή και περικυτταρική ίνωση παρατηρούνται σπανιότερα.



Εικόνα 2.9. Στεατοηπατίτιδα με κίρρωση. Ένας όζος ηπατικού παρεγχύματος που περιβάλλεται από ινώδη ιστό (Masson Trichrome)

2.5. Ο Ρόλος της Βιοψίας στη NAFLD

Τρεις είναι οι σημαντικότεροι λόγοι για διενέργεια βιοψίας ήπατος σε ασθενείς με λιπώδες ήπαρ:

- 1) Επιβεβαίωση της διάγνωσης και διάκριση μεταξύ απλής στεάτωσης και στεατοηπατίτιδας
- 2) Αιτιολογική διερεύνηση ιδίως όταν πιθανολογείται και άλλη αιτία ηπατικής διαταραχής
- 3) Εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου και σταδίου της ίνωσης

2.5.1. Επιβεβαίωση Διάγνωσης NAFLD

Παρότι η λιπώδης νόσος του ήπατος φαίνεται να είναι η συχνότερη ηπατοπάθεια σε ασθενείς με μόνιμα αυξημένες τρανσαμινάσες και αρνητικό έλεγχο, σε ποσοστό 20-30% η βιοψία θέτει άλλη διάγνωση^{187,239}. Επιπλέον σε άτομα που δεν έχουν παράγοντες κινδύνου μεταβολικού συνδρόμου, η βιοψία είναι συνήθως απαραίτητη για την επιβεβαίωση της διάγνωσης.

Αν και η διάγνωση της λιπώδους νόσου του ήπατος μπορεί να τεθεί με μη επεμβατικές μεθόδους, η διάκριση μεταξύ στεάτωσης και στεατοηπατίτιδας γίνεται μόνο ιστολογικά^{230,240,241}. Επιπλέον οι μη επεμβατικές μέθοδοι δεν είναι δυνατό να διαγνώσουν την ήπια ίνωση. Έτσι θα μπορούσε να θεωρηθεί πως η βιοψία ήπατος πρέπει να γίνεται σε όλους τους ασθενείς με πιθανή διάγνωση λιπώδους ήπατος. Όμως επειδή η βιοψία ήπατος ενέχει ως επεμβατική μέθοδος κινδύνους για τον ασθενή, η διενέργεια της περιορίζεται σε αυτούς με παράγοντες κινδύνου προχωρημένης ίνωσης. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ηλικία, η παχυσαρκία, η υπέρταση και ο ΣΔΤ2.

Ένα σημαντικό πρόβλημα είναι η έλλειψη γενικά αποδεκτών κριτηρίων για την ιστολογική διάγνωση της στεατοηπατίτιδας²⁴². Μερικές μελέτες έχουν ορίσει τη στεατοηπατίτιδα σαν την παρουσία λιπώδους διήθησης και φλεγμονής οποιασδήποτε μορφής. Αυτή η προσέγγιση στερείται ειδικότητας και μπορεί να παρατηρείται κα σε άλλες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων και συστηματικών παθήσεων που σχετίζονται με μη ειδικού τύπου αντιδραστική ηπατίτιδα που λανθασμένα θεωρείται λιπώδης νόσος²⁴³. Η παρουσία πιο αυστηρών κριτηρίων συμπεριλαμβανομένων των αλλοιώσεων τύπου ballooning με σωματία Mallory και / ή περικυτταρική / περικολποειδική ίνωση αυξάνουν την ειδικότητα αλλά δεν έχουν ευαισθησία να διαγνώσουν περιπτώσεις ήπιας νόσου ή αυτές όπου επικρατούν οι πυλαίες / περιπυλαίες αλλοιώσεις. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα δημιουργήθηκε ένα consensus από την Αμερικάνικη Εταιρεία Μελέτης του ήπατος όπου αναφέρονται τα απαραίτητα και μη απαραίτητα ιστολογικά ευρήματα για τη διάγνωση της NASH²⁴².

Τα ευρήματα αυτά είναι:

- Απαραίτητα
 - 1) Στεάτωση, μακροφυσσαλιδώδης > μικροφυσσαλιδώδης, κυρίως στη ζώνη 3
 - 2) Μικτή ήπια λοβιακή φλεγμονή από πολυμορφοπύρρηνα και μονοπύρρηνα
 - 3) Αλλοιώσεις τύπου ballooning κυρίως κοντά σε κύτταρα που περιέχουν λίπος

- Συνήθη ευρήματα αλλά όχι απαραίτητα για τη διάγνωση
 - 1) Περικολποειδική ίνωση (ζώνη 3)
 - 2) Γλυκογονιωμένοι πυρήνες (ζώνη 10)
 - 3) Λιποκοκκιώματα (συνήθως μικρά)
 - 4) Σποραδικά οξύφιλα (αποπτωτικά) σωμάτια ή acid-Schiff-stained Kupffer cells

- Σπάνια ευρήματα, μη απαραίτητα για τη διάγνωση
 - 1) Σωμάτια Mallory σε ηπατοκύτταρα με ballooning κυρίως στη ζώνη 3
 - 2) Ήπια εναπόθεση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα και / ή στα κολποειδή
 - 3) Μεγαμιτοχόνδρια

- Ασυνήθη ευρήματα στη NASH, που επιβάλλουν διερεύνηση άλλων παθολόγων αιτιών
 - 1) Μακροφυσσαλιδώδης στεάτωση (<30% του παρεγχύματος σε κατανομή non-zonal)
 - 2) Παρουσία αποκλειστικά μικροφυσσαλιδώδους στεάτωσης ή επικράτηση της σκληρυντικής υαλοειδούς νέκρωσης, φλεβοαποφρακτικές αλλοιώσεις, περιφλεβική ίνωση, φλεβοσκλήρυνση
 - 3) Πυλαία φλεγμονή > λοβιακή φλεγμονή, λεμφοκυτταρικές αρθροίσεις, πλασματοκύτταρα
 - 4) Σημαντικός αριθμός ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων στα πυλαία ή το λόβιο, επιθηλιοειδή κοκκιώματα
 - 5) Πυλαία / περιπυλαία ίνωση με απουσία ή μικρότερου βαθμού στη ζώνη 3 περικολποειδική ίνωση
 - 6) Διαταραχή της λοβιακής αρχιτεκτονικής, σημαντική φλεγμονή, συρρέουσες ή γεφυροποιές νεκρώσεις, ενδοθηλίτιδα
 - 7) Οξεία χολόσταση, έμβολα χολής
 - 8) Χρόνια χολόσταση +/- έντονες αλλοιώσεις χολαγγείων, χολαγγειοπενία, υπερπλασία χολαγγειολιών, κοκκία χαλκού σε περιπυλαία ηπατοκύτταρα
 - 9) Σποραδικά σφαιρίδια ανθεκτικά στη χρώση D-PAS σε περιπυλαία ηπατοκύτταρα
 - 10) Σημαντική εναπόθεση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα

Το σημαντικότερο διαγνωστικό κριτήριο για τη διάκριση της στεατοηπατίτιδας από την απλή στεάτωση είναι η παρουσία των αλλοιώσεων τύπου ballooning στα ηπατοκύτταρα. Τα εξοιδημένα ηπατοκύτταρα στο λιπώδες ήπαρ εμφανίζονται με διαυγές κυτταρόπλασμα. Τα ηπατοκύτταρα που έχουν κεντρολοβιακή ή περιφλεβική κατανομή και σχετίζονται στενά με τα άλλα χαρακτηριστικά ευρήματα του λιπώδους ήπατος συμπεριλαμβανομένων της φλεγμονής και της περικυτταρικής ίνωσης. Παρόλα αυτά στις λιγότερο σοβαρές μορφές ηπατοκυτταρικού ballooning μπορεί να απουσιάζουν τα τυπικά σωματίδια Mallory και μπορεί η διάγνωση να μη τίθεται αξιόπιστα. Επίσης μπορεί να είναι δύσκολη η διάκριση από ήπια εξοιδημένα ηπατοκύτταρα που μπορεί να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια της ιστολογικής τεχνικής (artifacts). Έτσι λοιπόν η διάγνωση του ballooning έχει ένα βαθμό υποκειμενικότητας σε σχέση με την παρουσία της στεάτωσης και της ίνωσης²¹⁷. Σε περίπτωση αμφιβολίας για την ύπαρξη ballooning με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους μπορούν να παρατηρηθούν μικρά ποσά υαλίνης Mallory που δεν μπορούν να διαπιστωθούν με τις κοινές χρώσεις.

2.6. Εκτίμηση της σοβαρότητας της NAFLD

Ο επιπολασμός και η φυσική ιστορία της NAFLD είναι δύσκολο να καθοριστούν ακριβώς επειδή πολλοί από αυτούς τους ασθενείς δεν υποβάλλονται σε βιοψία ήπατος και λίγες μελέτες έχουν μελετήσει την εξέλιξη της νόσου με επαναλαμβανόμενες βιοψίες²⁴⁴. Εκτιμάται πως μεταξύ παχύσαρκων / διαβητικών ασθενών περίπου το 50-90% θα έχουν λιπώδη διήθηση, 20% - 30% θα εξελιχθούν σε στεατοηπατίτιδα/ ίνωση και 2-5% θα παρουσιάσουν κίρρωση.^{218,230,242,245}

Η εκτίμηση του βαθμού νεκροφλεγμονωδών αλλοιώσεων (grade) και ίνωσης (stage) είναι βασική και χρησιμοποιείται ευρέως ιδίως στις ιογενείς ηπατίτιδες. Μια παρόμοια προσέγγιση γίνεται και όσον αφορά το λιπώδες ήπαρ. Αξιολογούνται ευρήματα όπως ο βαθμό στεάτωσης, η ηπατοκυτταρική εξοίδηση και η νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα (παρεγχυματική και πυλαία). Η σταδιοποίηση εκτιμά το βαθμό ίνωσης. Ένας αριθμός συστημάτων ταξινόμησης έχει προταθεί για την εκτίμηση της βαρύτητας της λιπώδους νόσου του ήπατος. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είναι το σύστημα της Brunt. (Πίνακες 2.10, 2.11)

Πίνακας 2.10. Νεκροφλεγμονώδεις αλλοιώσεις (grade) της NASH

	<i>Στεάτωση</i>	<i>Ballooning (zone 3)</i>	<i>Φλεγμονή</i>
ήπια	1-2	ελάχιστο	λοβιακή 1-2 πυλαία 0-1
μέτρια	2-3	εμφανές	λοβιακή 2 πυλαία 1-2
σοβαρή	3	έντονο	λοβιακή 3 πυλαία 1-2

Πίνακας 2.11. Ίνωση (stage) της NASH

<i>Στάδιο 1</i>	ζώνη 3 περικεντρική, περικολποειδική ή περικυτταρική ίνωση, εστιακή ή εκτεταμένη
<i>Στάδιο 2</i>	+ εστιακή ή εκτεταμένη πυλαία ίνωση
<i>Στάδιο 3</i>	γεφυροποιός ίνωση εστιακή ή εκτεταμένη
<i>Στάδιο 4</i>	κίρρωση

Αυτό το σύστημα έχει περιορισμούς γιατί τα τρία στοιχεία (στεάτωση, ballooning, φλεγμονή) δεν αυξάνονται παράλληλα οπότε δύσκολα ταξινομείται το grade της νόσου. Για παράδειγμα σε μία βιοψία μπορεί να υπάρχει μεγάλου βαθμού στεάτωση αλλά ήπια φλεγμονή και ballooning.

Άλλος περιορισμός είναι πως έχει εφαρμογή μόνο στη NASH και όχι σε όλο το φάσμα της NAFLD καθώς και σε περιπτώσεις με κλασικά λοβιακά ευρήματα στεατοηπατίτιδας. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ένα νέο σύστημα ταξινόμησης που στηρίζεται στο παλιό αλλά κάθε παράμετρος υπολογίζεται ανεξάρτητα²¹⁷. (Πίνακες 2.12 - 2.14)

Πίνακας 2.12. NAFLD activity score (0-8): το σύνολο των βαθμών στεάτωσης, λοβιακής φλεγμονής και ηπατοκυτταρικού ballooning

Στεάτωση (0-3)	0=< των προσβεβλημένων ηπατοκυττάρων 1=5-33% 2=33-66% 3=>66%
Λοβιακή φλεγμονή (0-3)	0=καθόλου 1=<2 εστίες ανά Χ 200 οπτικό πεδίο 2=2-4 εστίες 3=> 4 εστίες
Ballooning (0-2)	0=καθόλου 1=λίγα εξοιδημένα κύτταρα 2=εμφανή εξοιδημένα κύτταρα

Πίνακας 2.13. Συσχέτιση μεταξύ συνολικού score και ιστολογικής διάγνωσης

>_5	NASH
3-4	Αβέβαιη ή πιθανή NASH
<_2	όχι NASH

Πίνακας 2.14. Στάδιο ίνωσης

I. Περικολποειδική ή περιπυλαία	IA Ήπια περικολποειδική στη ζώνη 3 IB Μέτρια περικολποειδική στη ζώνη 3 IC Πυλαία/ περιπυλαία ίνωση μόνο
II. Περικολποειδική και πυλαία / περιπυλαία ίνωση	
III. Γεφυροποιός ίνωση	
IV. Κίρρωση	

2.7. Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα στη NAFLD

2.7.1. Συμπτώματα - Κλινική εξέταση

Η NAFLD είναι σε μεγάλο ποσοστό ασυμπτωματική και πολλοί ασθενείς διαγιγνώσκονται τυχαία από αυξημένα ηπατικά ένζυμα σε εξετάσεις ρουτίνας ή ανεύρεση στεάτωσης σε απεικονιστικό έλεγχο για άλλα αίτια. Το συχνότερο αναφερόμενο σύμπτωμα είναι ελαφρύ άλγος ή αίσθημα βάρους στο δεξιό υποχόνδριο καθώς επίσης και μη ειδικά συμπτώματα κόπωσης ή αδυναμίας.

Η κλινική εξέταση πιθανόν να αναδείξει ηπατομεγαλία, ενώ χαρακτηριστική είναι σε πολλούς ασθενείς η παχυσαρκία με αυξημένη περίμετρο μέσης και η παρουσία υπέρτασης. Η μελανίζουσα ακάνθωση αποτελεί σπάνιο εύρημα και συνήθως απαντάται σε παχύσαρκους ασθενείς με σοβαρού βαθμού αντίσταση στην ινσουλίνη. Η παρουσία ίκτερου, ηπατικών παλαμών, αραχνοειδών ευρυαγγειών ή ασκίτη υποδηλώνει κίρρωση. Πρέπει να τονιστεί η παρουσία NAFLD σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας με πολυκυστικές ωθήκες σε ποσοστό που μπορεί να φτάσει το 40%, με κοινό υπόβαθρο την αντίσταση στην ινσουλίνη. Επίσης συχνή είναι η συνύπαρξη NAFLD και αποφρακτικής υπνικής άπνοιας με αδιευκρίνιστο παθοφυσιολογικό μηχανισμό²⁴⁶.

2.7.2. Εργαστηριακός Έλεγχος

Από τους βιοχημικούς δείκτες, οι τρανσαμινάσες ορού συχνά είναι ήπια αυξημένες με την ALT να είναι υψηλότερη της AST. Αντίθετο εύρημα υποδηλώνει είτε κίρρωση είτε κατάχρηση αιθυλικής αλκοόλης την οποία αποκρύπτει ο ασθενής. Επίπεδα τρανσαμινασών υψηλότερα από 4 φορές το φυσιολογικό σπανιότατα συναντώνται στη NAFLD και πρέπει να οδηγούν στην αναζήτηση άλλης ηπατικής νόσου. Εντούτοις πρέπει να τονιστεί ότι φυσιολογικά επίπεδα τρανσαμινασών δεν αποκλείουν την ύπαρξη στεάτωσης ή στεατοηπατίτιδας όπως έχει πολλάκις φανεί στη βιβλιογραφία¹⁹¹. Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) και η γGT μπορεί να είναι ελαφρώς αυξημένες μέχρι τρεις φορές πάνω από τα φυσιολογικά όρια, χωρίς όμως αυτό να έχει κλινική σημασία.

Τα λιπίδια ορού είναι συχνά αυξημένα και η μέτρηση τους πρέπει να γίνεται σε κάθε ασθενή. Σε ένα ποσοστό ασθενών με στεάτωση χωρίς παράγοντες κινδύνου για NAFLD και / ή πολύ χαμηλά επίπεδα λιπιδίων ορού, η μέτρηση της απο-B λιποπρωτεΐνης μπορεί να θέσει τη διάγνωση της υποβηταλιποπρωτεϊναιμίας, η οποία αποτελεί σπάνια κληρονομική μορφή της NAFLD.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι συχνά παθολογική και προηγείται κατά πολλά έτη της εμφάνισης του ΣΔΤ2. Ο υπολογισμός της είναι πλέον ευχερής με το δείκτη HOMA-IR, και πρέπει να γίνεται σε κάθε ασθενή με την κλινική υποψία της NAFLD.

Αξίζει ακόμη να τονιστεί ότι το 50% των ασθενών έχουν αυξημένα επίπεδα φεριττίνης χωρίς υπερφόρτωση σε σίδηρο, γεγονός που πιθανόν να συνδέεται με τη χαμηλού βαθμού συστηματικής φλεγμονής που είναι παρούσα στη NAFLD και λόγω αυτής ελαττωμένη εψιδίνη. Επίσης χαμηλοί τίτλοι αυτοαντισωμάτων (ANA ή ASMA) ευρίσκονται σε ένα ποσοστό ασθενών που μπορεί να φτάνει το 10% και θεωρούνται επιφαινόμενο χωρίς κλινική σημασία. (Πίνακας 2.15)

Πίνακας 2.15. Συμπτώματα, κλινικά κι εργαστηριακά ευρήματα στη NAFLD

	<i>ΣΥΝΗΘΗ</i>	<i>ΑΣΥΝΗΘΗ</i>
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	Κανένα	Κόπωση Καταβολή Ήπιο άλγος δεξιού υποχονδρίου
ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	Ηπατομεγαλία	Σπληνομεγαλία Αραχνοειδή αιμαγγειώματα Ηπατικές παλάμες Ασκίτης
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	Χ 2-4 αύξηση των τρανσαμινασών AST < ALT ALP ήπια αυξημένη Φυσιολογική χολερυθρίνη, αλβουμίνη, INR Αυξημένη φερριτίνη	<1/320 ANA Αυξημένη τρανσφερίνη Cy282Tyr μετάλλαξη στο HFE γονίδιο

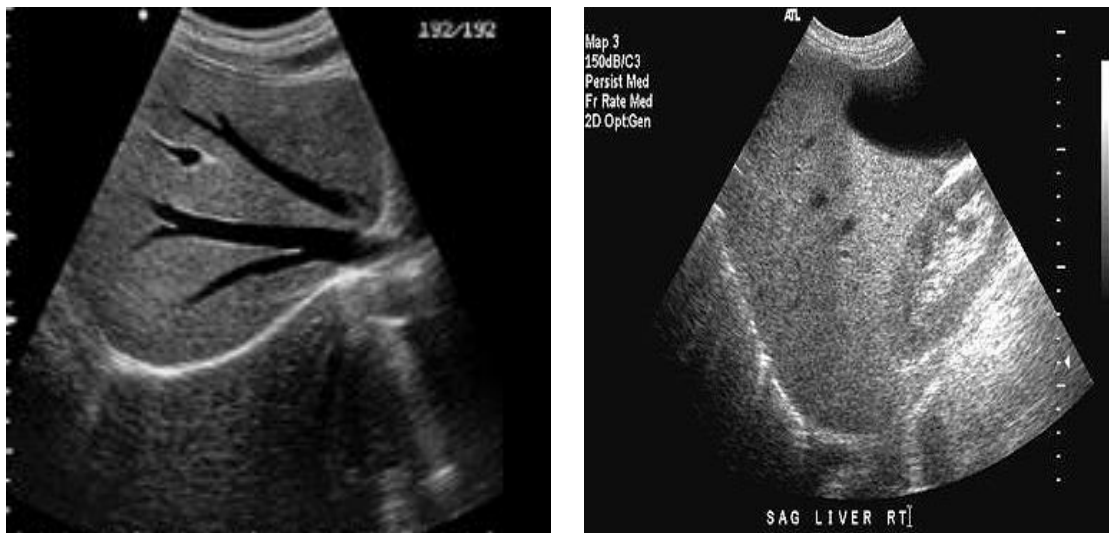
2.8. Ο ρόλος της απεικόνισης στο φάσμα της NAFLD

Οι υπάρχουσες απεικονιστικές εξετάσεις είναι χρήσιμα εργαλεία για τη διάγνωση και παρακολούθηση της NAFLD, εντούτοις παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα. Καταρχήν όλες οι απεικονιστικές μέθοδοι έχουν χαμηλή ευαισθησία σε λίπωση <25%. Επίσης δεν μπορούν να διαφοροδιαγνώσουν την απλή στεάτωση από την στεατοηπατίτιδα και να διακρίνουν τη NAFLD ή τη NASH από άλλα αίτια στεάτωσης ή στεατοηπατίτιδας. Τέλος δεν μπορούν να αποκλείσουν την παρουσία ίνωσης, της οποίας η ανίχνευση είναι ανεπιτυχής σε ποσοστό 25,5% αν BMI>30 kg/m² και 2,6% αν BMI<30 kg/m².

2.8.1. Απεικονιστικές μέθοδοι και στεάτωση

2.8.1.1. Υπερηχογράφημα

Το υπερηχογράφημα είναι η απλούστερη και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη εξέταση, όπου το λιπώδες ήπαρ (bright liver) φαίνεται υπερηχογενές σε σχέση με τα παρακείμενα όργανα (νεφρό ή σπλήνα)²⁴⁷⁻²⁴⁹. Εντούτοις, το υπερηχογράφημα ανιχνεύει τη στεάτωση μόνο αν αυτή υπερβαίνει το 20-30% του ήπατος και συνεπώς θεωρείται αδρή εξέταση ελέγχου. Η ευαισθησία των υπερήχων αυξάνει με το βαθμό της στεάτωσης^{240,249} όμως η υπερηχογραφική εκτίμηση της στεάτωσης δεν ταυτίζεται ακριβώς με την ιστολογική. Πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι το απλό υπερηχογράφημα μπορεί να εντοπίσει μέτρια έως σοβαρή στεάτωση με υψηλή ακρίβεια (AUROC 0,93 με ευαισθησία 60-80% και ειδικότητα 80-100%)²⁵⁰. Η ίνωση απεικονίζεται επίσης υπερηχοϊκή όμως πολλές φορές η ίνωση και η στεάτωση συνυπάρχουν σε κίρρωτικούς ασθενείς²⁴⁸, με αποτέλεσμα σε αυτή τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών η υπερηχογραφία να παρουσιάζει σαφώς χαμηλότερα ποσοστά ευαισθησίας. (Εικόνα 2.10)



Εικόνα 2.10. Υπερηχογράφημα ήπατος

Στην αριστερή εικόνα είναι φυσιολογικό, ενώ στη δεξιά έχει αυξημένη ηχογένεια συγκριτικά με τον παρακείμενο νεφρό. Το εύρημα όμως δεν είναι ειδικό για NASH

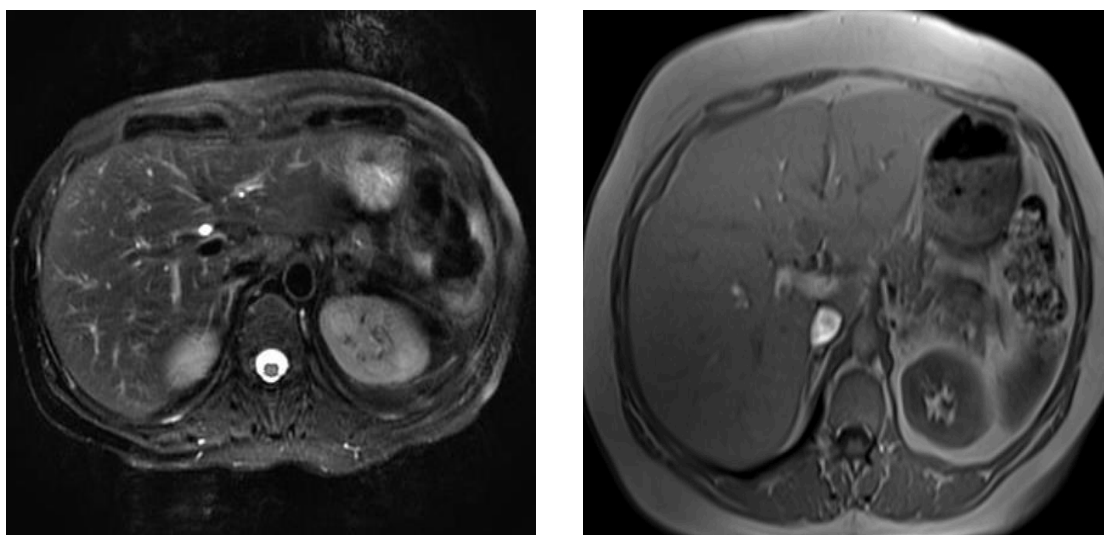
2.8.1.2. Controlled Attenuation Parameter (CAP)

Μια νέα μέθοδος για τη διάγνωση της στεάτωσης είναι η χρήση της κεφαλής CAP του Fibroscan. Αποτελεί μια μέθοδο βαθμονόμησης της στεάτωσης που στηρίζεται στη μέτρηση του βαθμού εξασθένησης των υπερήχων λόγω της παρουσίας ηπατικού λίπους, χρησιμοποιώντας μια διαδικασία που βασίζεται σε ταυτόχρονη παροδική ελαστογραφία. Τα αποτελέσματα μετριοούνται σε dB/m και παρουσιάζουν ένα εύρος 100 - 400 dB/m²⁵¹. Η CAP είναι διαθέσιμη με ηχοβολείς διαφορετικών

διαστάσεων ανάλογα με το BMI των ασθενών για μεγαλύτερης ακρίβειας αποτελέσματα. Σε μία μετα- ανάλυση 2735 ασθενών εκ των οποίων μόνο το 20% είχε NAFLD, οι AUROC ήταν 0,82 για την παρουσία οποιουδήποτε σταδίου στεάτωσης με ευαισθησία 69% και ειδικότητα 82% και 0,87 για στεάτωση βαθμού 2 ή 3 με ευαισθησία αντίστοιχα 77% και ειδικότητα 81%²⁵¹.

2.8.1.3. Αξονική τομογραφία

Η αξονική τομογραφία δεν αποτελεί μέθοδο εκλογής για τη διάγνωση ηπατικής στεάτωσης δεδομένου ότι στην αξονική τομογραφία το ηπατικό παρέγχυμα φαίνεται υπόπυκνο²⁵²⁻²⁵⁴. Σε περιπτώσεις εστιακής στεάτωσης δύναται να τεθεί διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα από ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Σε τέτοιες περιπτώσεις η μαγνητική τομογραφία θέτει τη διάγνωση (Εικόνα 2.11).

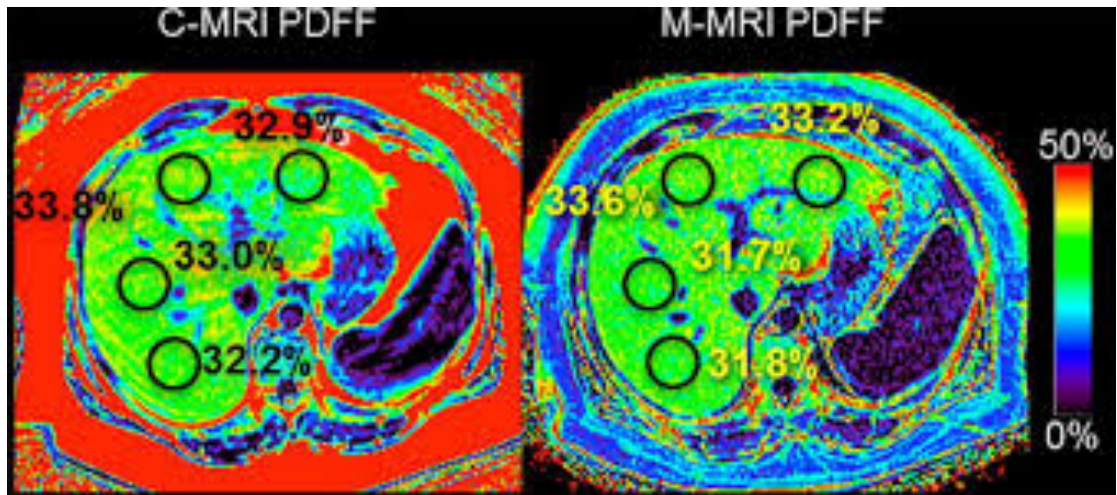


Εικόνα 2.11. Μαγνητική τομογραφία άνω κοιλίας.

Στην εικόνα αριστερά: Λιπώδες ήπαρ. Στην εικόνα δεξιά: Φυσιολογικό ήπαρ.

2.8.1.4. MRI-PDFF (Magnetic Resonance Imaging Derived Proton Density Fat Fraction)

Η MRI-PDFF θεωρείται το “golden standard” απεικονιστικά όσον αφορά τη μέτρηση της ηπατικής στεάτωσης. Έχει το πλεονέκτημα να απεικονίζει την κατανομή του λίπους σε ολόκληρο το ήπαρ μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα μέσω της δημιουργίας χαρτών PDFF για τη μέτρηση % τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (Εικόνα 2.12). Η μέθοδος αυτή είναι πιο ακριβής από την CAP όσον αφορά όλα τα στάδια στεάτωσης σε ασθενείς με NAFLD με AUROC 0,99, ευαισθησία 96% και ειδικότητα 100% (PPV 1,00, NPV 0,70)²⁵⁵. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου προσμετρώνται το κόστος, η χρήση από εξειδικευμένο προσωπικό, η αδυναμία χρήσης σε άτομα με μεταλλικά προθέματα και η αλλοίωση των αποτελεσμάτων επί οξείας ηπατικής φλεγμονής και υπερφόρτωσης του ηπατικού παρεγχύματος με σίδηρο.



Εικόνα 2.12. Παράδειγμα PDFF χάρτη ασθενούς με υπερτριγλυκεριδαίμια και στεάτωση

2.8.1.5. H-MRS (Hepatic Magnetic Resonance Spectroscopy)

Η H-MRS συγκαταλέγεται ομοίως στους απεικονιστικούς δείκτες της ηπατικής στεάτωσης. Στηρίζεται στη μέτρηση της διαφοράς της μαγνητικής αντήχησης (magnetic resonance) μεταξύ πρωτονίων νερού και λιπώδους ιστού. Απαιτεί χρήση ειδικών πηνίων, είναι χρονοβόρα ως εξέταση και εξαιρετικά δύσκολο να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη λόγω των πολύπλοκων λογισμικών που απαιτούνται και την έλλειψη εμπειρογνομόνων στα περισσότερα διαγνωστικά κέντρα. Η χρήση της για την ώρα περιορίζεται σε επίπεδο κλινικών ερευνών. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου για διάγνωση λίπους σε ποσοστό 0-5% του βάρους του ήπατος είναι αντίστοιχα 89% και 92%, για ποσοστό λίπους 10%, 83% και 94% αντίστοιχα και για ποσοστό λίπους πάνω από 30% η αντίστοιχη ευαισθησία της μεθόδου είναι 73% και η ειδικότητα 96%.²⁵⁶

2.8.2. Απεικονιστικές μέθοδοι και ίνωση

2.8.2.1. Fibroscan

Η ελαστογραφία ήπατος αποτελεί μέθοδο με την οποία μετράται η ελαστικότητα του ηπατικού ιστού και ποσοτικοποιείται η ίνωση²⁵⁷. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος και μελετημένος τρόπος διενέργειας ελαστογραφίας ήπατος είναι η παροδική ελαστογραφία (FibroScan®, Echosens, Paris, France). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μέτρηση της ταχύτητας μετάδοσης ενός χαμηλής συχνότητας κύματος (50 Hz) διαμέσω του ηπατικού ιστού. Η ταχύτητα μετάδοσης σχετίζεται άμεσα με τη σκληρότητα του ηπατικού ιστού η οποία εξαρτάται από το βαθμό ίνωσης. Όσο σκληρότερος είναι ο ηπατικός ιστός, άρα σοβαρότερη και η ηπατική ίνωση, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ταχύτητα μετάδοσης του κύματος. Τα

αποτελέσματα εκφράζονται σε Kilopascals με διακύμανση από 1,5-75 kPa και φυσιολογικές τιμές γύρω στα 5kPa.

Είναι πολύ εύκολη εξέταση, ώστε να μπορεί να διενεργηθεί ακόμη και από εκπαιδευμένο νοσηλευτικό προσωπικό και πραγματοποιείται σε λιγότερο από 5 λεπτά. Χρειάζονται τουλάχιστον δέκα μετρήσεις για μια ολοκληρωμένη εξέταση, που για να θεωρηθεί ακριβής θα πρέπει το IQR \leq 30% της μέσης τιμής των 10 μετρήσεων. Η παρουσία ασκίτη, στενών μεσοπλευρίων διαστημάτων και υψηλού BMI θέτουν θέμα διαγνωστικής ακρίβειας. Η AUROC της μεθόδου για τη χρήση κεφαλής M και XL για ασθενείς με υψηλό BMI είναι αντίστοιχα 0,88 και 0,85²⁵⁸. Η χρήση κεφαλής XL σε ασθενείς με υψηλό BMI μειώνει τα μη αξιόπιστα αποτελέσματα από 50% με M κεφαλή σε 25% με XL κεφαλή^{259,260}. Επιπλέον τα αποτελέσματα της εξέτασης μπορούν να επηρεαστούν από την παρουσία ηπατικής φλεγμονής, εξωηπατικής χολόστασης, ηπατικής συμφόρησης, λήψης τροφής (αύξηση των τιμών κατά 25+/-2,6%, $p=0,02$) το πρώτο 2ωρο από τη λήψη τροφής και την υπερκατανάλωση αλκοόλ.

Σχετικά με το ρόλο της στεάτωσης στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της μεθόδου οι απόψεις είναι αντικρουόμενες κατά πόσο τα επηρεάζουν ή όχι. Τέλος ενώ το Fibroscan όπως δείχνουν οι μελέτες έχει εξαιρετική αρνητική προγνωστική αξία ως μέθοδος αποκλεισμού προχωρημένης ίνωσης (NPV 90%), η θετική προγνωστική του αξία όσον αφορά τη διάγνωση προχωρημένης ίνωσης ή κίρρωσης είναι μέτρια (PPV $<$ 65%)²⁶¹⁻²⁶³.

2.8.2.2. pSWE (Point Swear Wave Elastography) ή ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse)

Με τη μέθοδο αυτή ο ηχοβολέας παράγει ένα κύμα εντοπισμένων παλμών, της τάξης των μ s, οι οποίοι επάγουν μια δύναμη γνωστή και ως acoustic radiation force. Η δύναμη αυτή μπορεί να προκαλέσει μια εντοπισμένη παραμόρφωση, της τάξεως των ολίγων μικρών, στον ηπατικό ιστό, η οποία φθίνει σε λίγα ms²⁶⁴. Η παραμόρφωση καταμετράται σε συγκεκριμένο, γνωστό χρόνο, μετά την παύση του παλμού και με κατάλληλο λογισμικό γίνεται επεξεργασία των μετρήσεων και απεικόνιση αυτών ως ελαστογράμμα. Καθώς η ιστική παραμόρφωση στην pSWE προκαλείται από παλμούς που παράγονται από τον ηχοβολέα, είναι λιγότερο εξαρτώμενη από τον εξεταστή. Επίσης τα ελαστογράμματα που παράγονται έχουν καλύτερη ανάλυση, απεικονίζουν με καλύτερη αντίθεση τη διαφορετική ελαστικότητα των διαφόρων περιοχών του μελετώμενου ιστού και επηρεάζονται λιγότερο από κινητικά artifacts και από το βάθος. Οι τιμές της μεθόδου αυτής εκφράζονται σε m/s και κυμαίνονται από 0,5-4,4 m/s ορίζοντας στενά cut offs για κάθε στάδιο ηπατικής ίνωσης.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι για στάδιο F2 ίνωσης η AUROC υπολογίζεται 0,70-0,83 με αντίστοιχα ευαισθησία 56-90% και ειδικότητα 36-90%²⁶⁴⁻²⁶⁶. Για σοβαρότερα στάδια ίνωσης F3, F4, η AUROC υπολογίζεται 0,74-0,97% και 0,78-0,89% αντίστοιχα με ευαισθησία 59-90% και 44-90% και ειδικότητα 63-90% και 67-90% αντίστοιχα. Ωστόσο η ρSWE είναι μία μέθοδος που δεν έχει αξιολογηθεί εκτενώς όπως προκύπτει από την τρέχουσα βιβλιογραφία.

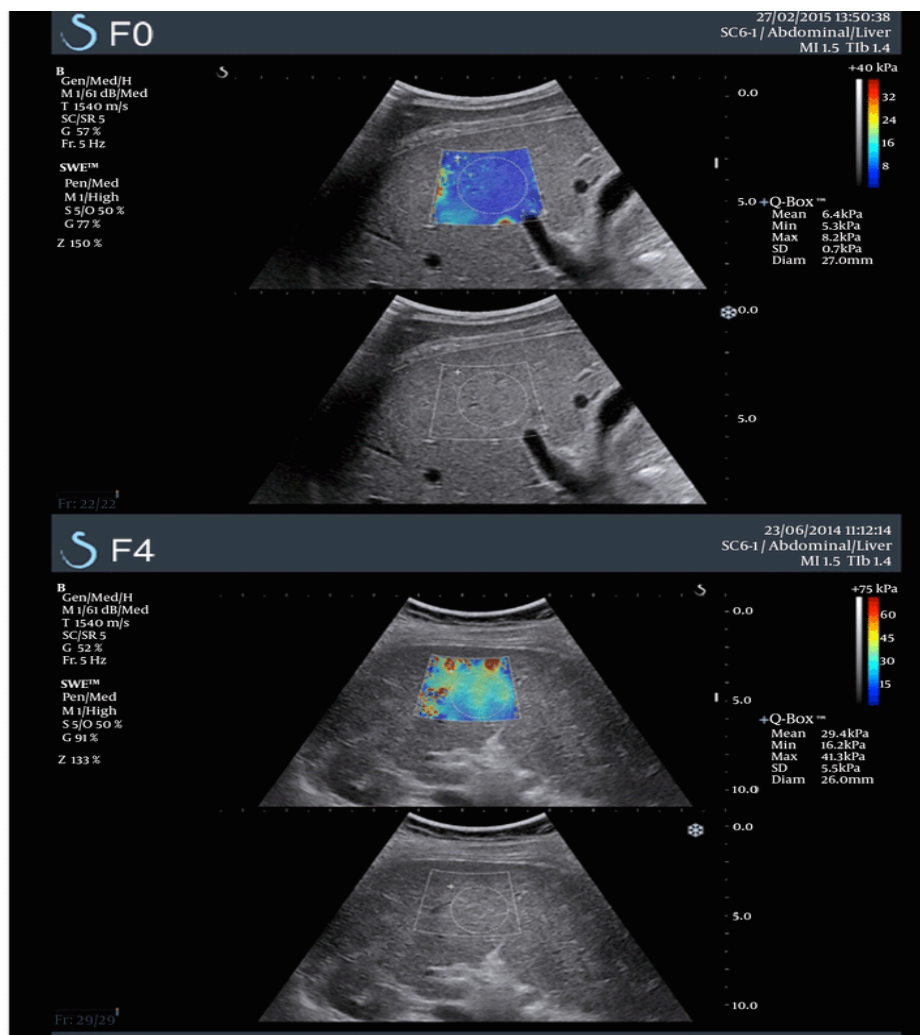
2.8.2.3. 2D-3D SWE (2 Dimensional-3 Dimensional Shear Wave Elastography)

Η 2D ή 3D SWE είναι μία ακόμη υπερηχογραφική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της σκληρότητας του ήπατος (Εικόνα 2.13). Η αρχή λειτουργίας της στηρίζεται σε εναλλακτικό αλγόριθμο βάση της πυκνότητας και της ταχύτητας του διατετημένου κύματος. Ο ασθενής τοποθετείται σε κατακεκλιμένη θέση με το βραχίονα σε κάμψη πίσω από την κεφαλή. Η κεφαλή του ηχοβολέα τοποθετείται παράλληλα προς το μεσοπλεύριο διάστημα ενώ ασκείται ελαφριά πίεση στο δέρμα του ασθενούς. Ο ηχοβολέας παράγει ένα κύμα ακουστικών παλμών οι οποίοι επάγουν τη δημιουργία μίας δύναμης γνωστής ως acoustic radiation force η οποία διαταράσσει τους υποκείμενους ιστούς οι οποίοι αντιδρούν ως ελαστικά μέσα με μία δύναμη επαναφοράς. Η δύναμη επαναφοράς επάγει τη δημιουργία shear waves τα οποία διαδίδονται εγκάρσιως στον ιστό. Τα εγκάρσια αυτά κύματα διαδίδονται τη δυνατότητα μετρώντας την ταχύτητα με την οποία διαδίδονται τα κύματα αυτά στους ιστούς να πάρουμε πληροφορίες σχετικά με την ελαστικότητα των ιστών. Τα αποτελέσματα της μεθόδου μπορούν να περιγραφούν είτε σε m/s είτε σε kilopascals με διακύμανση 2-150 kilopascals.

Η 2D-3D SWE έχει μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια από την ρSWE για στάδιο ίνωσης F2 (AUROC 0,85-0,92 vs AUROC 0,70-0,83)^{265,266}. Για στάδια ίνωσης F3 η AUROC είναι 0,88-0,95 με ευαισθησία 90% και ειδικότητα 92%, PPV 88%, NPV 93% και για F4 αντίστοιχα η AUROC σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες είναι 0,88-0,97 με ευαισθησία 100%, ειδικότητα 86%, PPV 55% και NPV 100%.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η δυνατότητα παράλληλης υπερηχογραφικής κι αγγειακής απεικόνισης του ήπατος με αποτέλεσμα να αποφεύγονται από τις λήψεις οι αγγειακές δομές και να συσχετίζεται με ταυτόχρονη μελέτη και των δύο λοβών του ήπατος η σκληρότητα με την αρχιτεκτονική του ιστού (νέκρωση - λίπωση). Επίσης υπάρχει η δυνατότητα επιλογής του βάθους της μέτρησης και περιοχής ελεύθερης τεχνικών σφαλμάτων εικόνων οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε αγγεία, στην κάψα του Glisson ή άλλες βλάβες. Επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα εκ των υστέρων μετρήσεων σε αποθηκευμένες στο μηχάνημα εικόνες ενώ ο αλγόριθμος των αποτελεσμάτων είναι πλήρως αυτοματοποιημένος κι ανεξάρτητος του χρήστη του μηχανήματος. Παρόλα αυτά η 2D-3D SWE αποτελεί μια νέα τεχνική που χρήζει αξιολόγησης δεδομένου ότι

υπάρχει έλλειψη φυσιολογικής καμπύλης για τον έλεγχο του διαγνωστικού αλγορίθμου, έλλειψη ποιοτικών κριτηρίων βασισμένων σε δημοσιευμένες μελέτες, ενώ παραμένει άγνωστη για την ώρα η επίδραση της φλεγμονής στις μετρήσεις.



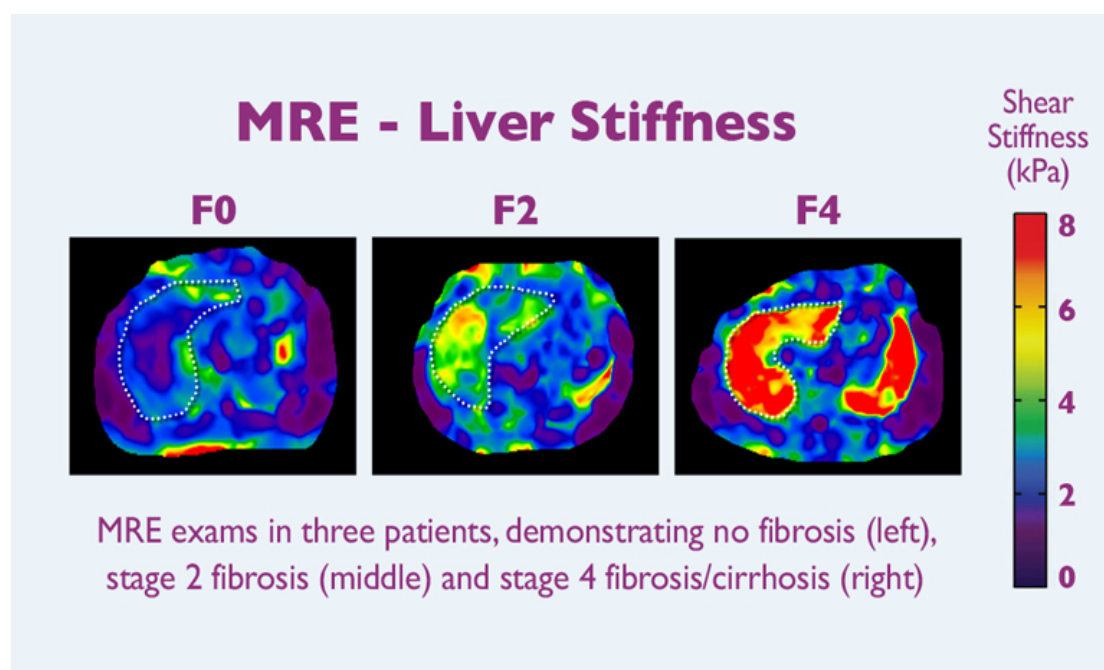
Εικόνα 2.13. Απεικόνιση επάνω φυσιολογικού ηπατικού παρεγχύματος F0 και κάτω ηπατικού παρεγχύματος με ίνωση σταδίου F4

2.8.2.4. MRE (Magnetic Resonance Elastography)

Η MRE είναι μια πρωτοπόρος και εξελισσόμενη τεχνική που στοχεύει στην ποσοτική εκτίμηση των μηχανικών ιδιοτήτων των ιστών²⁶⁷. Η τεχνική περιλαμβάνει τρία βήματα: 1) την παραγωγή εγκάρσιων κυμάτων εντός του ιστού, 2) την απόκτηση εικόνων μαγνητικής τομογραφίας απεικονίζοντας τη διάδοση των εγκάρσιων κυμάτων εντός του ιστού, 3) την κατάλληλη επεξεργασία των εικόνων για δημιουργία χαρτών ελαστικότητας των ιστών, τα αποκαλούμενα ελαστογράμματα. Τα εγκάρσια κύματα είναι της τάξης των 50-500 MHz και στην πράξη παράγονται από αυτόματα ηλεκτρομαγνητική εξωτερική πηγή. Κατά τη διάρκεια της διάδοσης των κυμάτων αυτών στον ιστό πραγματοποιείται συμβατική μαγνητική τομογραφία

και οι εικόνες που αποκτώνται καλούνται wave images. Στη συνέχεια με ποικίλες τεχνικές οι MR εικόνες υφίστανται επεξεργασία και προκύπτει το MR ελαστογράμμα που έχει το 1/3 με 1/5 της ανάλυσης της συμβατικής MR εικόνας και απεικονίζει την ελαστικότητα του ιστού (Εικόνα 2.14). Η κυριότερη και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κλινική εφαρμογή της MRE αφορά τη μελέτη της ελαστικότητας του ηπατικού παρεγχύματος. Παθήσεις όπως η κίρρωση προκαλούν αύξηση της σκληρότητας του ηπατικού παρεγχύματος και η MRE αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη διάγνωση και τον έλεγχο της προόδου της νόσου.

Σε μία μετα-ανάλυση που περιλάμβανε 9 μελέτες με 232 ασθενείς με NAFLD βρέθηκε ότι η MRE διέγνωσε την παρουσία ίνωσης με υψηλό ποσοστό ακρίβειας, ανεξαρτήτως παρουσίας ηπατικής φλεγμονής και BMI (σε αντίθεση με το FibroScan), με AUROC 0,86-0,89 για όλα τα στάδια ίνωσης²⁵¹. Η μέθοδος αυτή είναι πιο ακριβής από το FibroScan στο να ανιχνεύει ίνωση σταδίου F2 (AUROC 0,88-0,89 vs AUROC 0,84) όπως και ίνωση σταδίου F4 (AUROC 0,88-0,97 vs AUROC 0,95)^{255,268}. Παρόλα αυτά το υψηλό κόστος και η διαθεσιμότητα όσον αφορά τον εξοπλισμό αλλά και την τεχνογνωσία εξειδικευμένου προσωπικού καθιστούν την MRE αδύνατη σαν διαγνωστική εξέταση ευρείας χρήσης.



Εικόνα 2.14. Απεικόνιση ηπατικού παρεγχύματος με MRE τριών ασθενών με διαφορετικά στάδια ίνωσης (από αριστερά F0, F2, F4)

Πίνακας 2.16. Διαγνωστική ακρίβεια μεθόδων απεικόνισης της NAFLD

<i>Απεικονιστικές μέθοδοι</i>	<i>AUROC</i>	<i>Ευαισθησία</i>	<i>Ειδικότητα</i>
USG	S0-S3: 0,93	60-80%	80-100%
CAP	<ul style="list-style-type: none"> • S0-S3:0,82 • S2-S3: 0,86 • S3: 0,88 	<ul style="list-style-type: none"> • 69% • 77% • 88% 	<ul style="list-style-type: none"> • 82% • 81% • 78%
MRPDFF	S0-S3: 0,99	96%	100%
MRS <ul style="list-style-type: none"> • 0-5% λίπος • 10% λίπος • >30% λίπος 	N/A	<ul style="list-style-type: none"> • 89% • 83% • 73% 	<ul style="list-style-type: none"> • 92% • 94% • 96%

Πίνακας 2.17. Διαγνωστική ακρίβεια μεθόδων απεικόνισης NASH

<i>Απεικονιστικές μέθοδοι</i>	<i>AUROC</i>	<i>Ευαισθησία</i>	<i>Ειδικότητα</i>
FibroScan	<ul style="list-style-type: none"> • F2 M: 0,84 • F3 M: 0,93 • F4 M: 0,95 • F2 XL: 0,80-0,85 • F3 XL: 0,84-0,90 • F4 XL: 0,91-0,95 	<ul style="list-style-type: none"> • 79% • 91% • 92% • 76% • 75% • 88% 	<ul style="list-style-type: none"> • 76% • 75% • 88% • 65% • 74% • 82%
ρSWE (ARFI)	<ul style="list-style-type: none"> • F2: 0,70-0,83 • F3: 0,74-0,97 • F4: 0,78-0,89 	<ul style="list-style-type: none"> • 56-90% • 59-90% • 44-90% 	<ul style="list-style-type: none"> • 36-90% • 63-90% • 67-90%
2D-3D SWE	<ul style="list-style-type: none"> • F2: 0,85-0,92 • F3: 0,88-0,95 • F4: 0,97 	<ul style="list-style-type: none"> • 85% • 90% • 100% 	<ul style="list-style-type: none"> • 94% • 92% • 86%
MRE	<ul style="list-style-type: none"> • F2: 0,86-0,89 • F3: 0,89-0,96 • F4: 0,88-0,97 	<ul style="list-style-type: none"> • 73% • 86% • 87% 	<ul style="list-style-type: none"> • 89% • 91% • 93%

2.9. Ο ρόλος των Βιοδεικτών και των Μαθηματικών αλγορίθμων στη διάγνωση και παρακολούθηση όλου του φάσματος της NAFLD

Η εξάρτηση από τη βιοψία ήπατος για τη διάκριση της απλής στεάτωσης από τη στεατοηπατίτιδα σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό του πληθυσμού με υπερηχογραφικά ευρήματα λιπώδους διήθησης, έχει οδηγήσει στην εκτενή αναζήτηση μη επεμβατικών ορολογικών δεικτών και προγνωστικών μοντέλων για την αρχική τουλάχιστον εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου. Τα τελευταία είκοσι χρόνια, δημοσιεύτηκαν από διάφορες ομάδες προγνωστικά μοντέλα τα οποία όμως ακόμη δεν έχουν ευρεία χρήση λόγω της ιδιαιτερότητας της διάγνωσης της νόσου (Πίνακας 2.18).

Η προσπάθεια εύρεσης μη επεμβατικών δεικτών μέχρι στιγμής στέφεται από αποτυχία. Κι αυτό γιατί, για να μπορέσει να τεθεί η διάγνωση της στεατοηπατίτιδας, είναι απαραίτητη η διάγνωση του βαθμού στεάτωσης, η αναγνώριση του ballooning και η διάκριση της λοβιακής φλεγμονής καθώς και η εκτίμηση της ίνωσης. Αυτό σημαίνει πως ο δείκτης που θα βρεθεί θα μπορεί να διακρίνει όλα τα παραπάνω στοιχεία ταυτόχρονα. Είναι πολύ σημαντικό επίσης να αναφερθεί πως η συμφωνία μεταξύ των παθολογοανατόμων για τη διάγνωση της ίδιας βιοψίας είναι μέτρια οπότε είναι ακόμη δυσκολότερο να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία του δείκτη.

2.9.1. Βιοδείκτες και μαθηματικοί αλγόριθμοι για διάγνωση της NAFLD

2.9.1.1. Fatty Liver Index (FLI)

Ο FLI αποτελεί δείκτη που χρησιμοποιεί για τη διάγνωση κι εκτίμηση της βαρύτητας της NAFLD, το BMI, την περίμετρο μέσης και τα επίπεδα της γ -GT²⁶⁹ και των τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος. Παρουσιάζει μέτρια διαγνωστική ακρίβεια για τη διάγνωση λιπώδους διήθησης ήπατος σε σύγκριση με το υπερηχογράφημα (AUROC 0,84). Σε μία μελέτη πληθυσμού στην Ιταλία ο FLI παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη και προέβλεψε όλες τις αιτίες ηπατικής θνησιμότητας και καρκίνου.²⁷⁰

2.9.1.2. Hepatic Steatosis Index (HSI)

Ο δείκτης αυτός έχει αξιολογηθεί από μία μεγάλη ομάδα ατόμων (>10.000) που υποβλήθηκαν σε εξετάσεις ρουτίνας²⁷¹. Περιλαμβάνει πέντε παραμέτρους: AST:ALT ratio, BMI, φύλο, και ιστορικό Σακχαρώδη Διαβήτη και παρουσιάζει ομοίως με τον FLI μέτρια διαγνωστική ακρίβεια για τη διάγνωση της λιπώδους διήθησης του ήπατος όπως ορίζεται από το υπερηχογράφημα (AUROC 0,81)²⁷¹.

Ο βασικός περιορισμός και των δύο αυτών δεικτών έγκειται στη χρήση μιας μη βέλτιστης μεθόδου αναφοράς, καθώς το υπερηχογράφημα παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία για ελάχιστα επίπεδα στεάτωσης και είναι μέθοδος υποκειμενική καθώς επηρεάζεται από τις δεξιότητες και την κρίση του χειριστή²⁷².

2.9.1.3. NAFLD Liver Fat Score

Ο αλγόριθμος αυτός περιλαμβάνει την παρουσία του μεταβολικού συνδρόμου, του ΣΔΤ2, τη συγκέντρωση στον ορό του αίματος της ινσουλίνης νηστείας, τα επίπεδα στον ορό του αίματος της AST και το AST: ALT ratio. Σαν μέθοδο αναφοράς για την αξιολόγηση του έχει χρησιμοποιηθεί μια πιο ευαίσθητη και ποσοτική απεικονιστική μέθοδος η H-MRS²⁷³ και παρουσίασε πολύ καλή διαγνωστική ακρίβεια στη διάγνωση της NAFLD, ορίζοντας τη από την παρουσία ηπατικού λίπους >5,56%. Ο περιορισμός στη χρήση του σαν μέθοδος ρουτίνας έχει να κάνει με τη χρήση στον αλγόριθμο των επιπέδων της ινσουλίνης νηστείας στον ορό που δεν αποτελεί εξέταση ρουτίνας.

2.9.1.4. SteatoTest

Το SteatoTest (Biopredictive, Paris, France) αποτελεί ένα μαθηματικό μοντέλο που συνδυάζει μία πληθώρα εργαστηριακών παραμέτρων (επίπεδα στον ορό του αίματος ολικής χοληρυθρίνης, γ-GT, α2-μακροσφαιρίνης, απποσφαιρίνης, ALT και απολιποπρωτεΐνης A1, ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και γλυκόζης προσαρμοσμένα στο φύλο και την ηλικία του ασθενούς) με το BMI²⁷⁴. Παρουσιάζει μέτρια διαγνωστική ακρίβεια για τη διάγνωση ηπατικής στεάτωσης σε σύγκριση με το golden standard την βιοψία ήπατος (AUROC 0,79-0,80). Στα μειονεκτήματα της μεθόδου προστίθεται και το επιπρόσθετο κόστος πέρα των βιοχημικών εξετάσεων αίματος για τη χρήση του ειδικού αλγόριθμου για τον υπολογισμό του score.

2.9.1.5. NAFLD Ridge Score

Το NAFLD ridge score χρησιμοποιεί εξίσου μία σειρά εργαστηριακών παραμέτρων (ALT, HDL χοληστερόλη και τριγλυκερίδια ορού αίματος, HbA1c και απόλυτο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων αίματος) προσθέτοντας σε αυτές και μία κλινική παράμετρο την παρουσία ιστορικού αρτηριακής υπέρτασης²⁷⁵. Χρησιμοποιώντας ως μέθοδο αναφοράς την H-MRS, το συγκεκριμένο score έχει καλή διαγνωστική ακρίβεια (AUROC 0,87) για τη διάγνωση της NAFLD και εξαιρετική αρνητική διαγνωστική αξία (96%) για τον αποκλεισμό της^{275,276}.

Πίνακας 2.18. Διαγνωστική ακρίβεια βιοδεικτών-μαθηματικών αλγορίθμων στη διάγνωση της NAFLD

<i>Βιοδείκτες Μαθηματικοί αλγόριθμοι</i>	<i>AUROC</i>	<i>Ευαισθησία</i>	<i>Ειδικότητα</i>
Fatty Liver Index	0,84	87%	64%
Hepatic Steatosis Index	0,81	93%	92%
NAFLD Liver Fat Score	0,86-0,87	86%	71%
SteatoTest	0,79-0,80	85-100%	83-100%
NAFLD Ridge Score	0,87	92%	90%

2.9.2. Βιοδείκτες και μαθηματικοί αλγόριθμοι για τη διάγνωση της NASH

2.9.2.1. Δείκτες απόπτωσης

Ο ηπατοκυτταρικός θάνατος είτε μέσω διαδικασίας απόπτωσης είτε μέσω νέκρωσης είναι ιδιαίτερα αυξημένος στη NASH σε σύγκριση με την απλή στεατώση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση CK18 από τα ηπατοκύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο. Ο συγκεκριμένος δείκτης απόπτωσης μπορεί να ανιχνευτεί με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων M30 και M65 με τεχνική ELISA, με τα επίπεδα του M30 να αντανακλούν τα επίπεδα της ηπατικής φλεγμονής, του ballooning στους ασθενείς με NAFLD αλλά παράλληλα και την ιστολογική βελτίωση σε μακρός χρόνου²⁷⁷. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική επικάλυψη των επιπέδων CK18 μεταξύ ασθενών με ή χωρίς NASH. Μία μετα-ανάλυση που περιελάμβανε 11 μελέτες έδειξε αντίστοιχα ευαισθησία και ειδικότητα του συγκεκριμένου δείκτη 66% και 82% προτείνοντας ότι δεν αποτελεί αρκετά αξιόπιστο δείκτη για κλινική χρήση²⁷⁸. Για τη βελτίωση της διαγνωστικής του ικανότητας, ο CK18 έχει συνδυαστεί με τα επίπεδα στον ορό ενός άλλου δείκτη απόπτωσης του sFAS, ενός επιφανειακού αντιγόνου που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της εξωγενούς διαδικασίας απόπτωσης στα ηπατοκύτταρα²⁷⁹. Μία μικρή μελέτη έδειξε ότι ο συνδυασμός των επιπέδων του M30 και του sFAS είχε εξαιρετική διαγνωστική ακρίβεια με AUROC 0,79-0,93. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες αξιολόγησης για την επικύρωση του παραπάνω συμπεράσματος²⁷⁹.

2.9.2.2. Δείκτες φλεγμονής

Η παρουσία φλεγμονής αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της ιστολογικής εικόνας της NASH, με αποτέλεσμα να έχουν μελετηθεί μια πληθώρα δεικτών και μεσολαβητών φλεγμονώδους αντίδρασης στον ορό του αίματος όπως CRP, TNF, IL-6, IL-8, IL-1RA και CXCL10. Δεδομένου ότι η NASH σχετίζεται με μία υποκείμενη φλεγμονώδη μεταβολική διαδικασία, αυτοί οι δείκτες ίσως να μην είναι ειδικοί αποκλειστικά για την ηπατική φλεγμονή. Σε μία μελέτη 648 ασθενών²⁸⁰ που είχαν επιβεβαιωμένη με βιοψία NASH ελέγχθηκε η διαγνωστική χρησιμότητα 32 βιοδεικτών πλάσματος μεταξύ των οποίων ήταν και πολλοί φλεγμονώδεις δείκτες. Η μελέτη αυτή ανέδειξε συσχετίσεις της NASH με τα επίπεδα των IL-8, IL-1R1, του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI1 και του ενεργοποιημένου PAI1, aPAI1. Ωστόσο μόνο ο aPAI1 μετά από προσαρμογή σε κλινικούς και μεταβολικούς παράγοντες παρέμεινε ενδεικτικός για παρουσία NASH. Ο δείκτης αυτός είναι αναστολέας της ινωδολύσης και ίσως αποτελεί συνδυαστικό κρίκο με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο μέσω της δράσης του στο μηχανισμό της πήξης. Ερευνητικά δεδομένα πάντως καθιστούν τη διαγνωστική χρήση του δείκτη αυτού μεμονωμένα απίθανη ενώ αναμένονται αποτελέσματα για το συνδυασμό του μέσω αλγορίθμων με άλλους δείκτες για την ακριβή διάγνωση της NASH.

Η φερριτίνη είναι μία πρωτεΐνη οξείας φάσης που είναι συνήθως αυξημένη στους ασθενείς με NAFLD και μεταβολικό σύνδρομο. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τη σχέση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων φερριτίνης με τα προχωρημένα στάδια ίνωσης στους ασθενείς με NAFLD²⁸¹. Η προσθήκη σε διαγνωστικούς αλγόριθμους άλλων εργαστηριακών αλλά και κλινικών παραμέτρων σε διάφορες μελέτες φάνηκε ότι αύξησε τη διαγνωστική αξία της φερριτίνης στη διάγνωση της NASH^{282,283}. Συγκεκριμένα σε μία μελέτη με 405 ασθενείς με NAFLD η προσθήκη στα επίπεδα φερριτίνης στον ορό των AST, BMI, αιμοπεταλίων, ιστορικού ΣΔΤ2 και υπέρτασης αύξησε την AUROC για τη διάγνωση της NASH στο 0,81 από 0,62²⁸⁰. Τέλος η AUROC σε μία δεύτερη μελέτη με συνδυασμό των επιπέδων φερριτίνης στον ορό με ινσουλίνη νηστείας και IV collagen 7S υπολογίστηκε στο 0,78²⁸⁴.

2.9.3. Δείκτες οξειδωτικού stress

Το οξειδωτικό stress αποτελεί έναν από τους κύριους παθογενετικούς μηχανισμούς ηπατικής βλάβης στη NASH και οδηγεί στην οξείδωση των λιπιδίων και την απελευθέρωση μεταβολικών παραγώγων που μπορούν να μετρηθούν με διάφορες μεθόδους²⁸⁴. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα μεταβολικά παράγωγα της οξείδωσης του αραχιδονικού (11-HETE) και του λινολεϊκού οξέος (9,13 HODE) και (9,13 οξο-HODE)^{285,286}. Ο συνδυασμός του λόγου λινοϊκού οξέος: 13- HODE ratio με την ηλικία, το BMI και την AST αποτελούν το oxNASH score το οποίο έχει αξιολογηθεί και επικυρωθεί από μελέτες καθώς η διαγνωστική του αξία για τη διάγνωση της NASH

είναι ικανοποιητική (AUROC 0,74-0,83)²⁸⁶. Παρόλα αυτά το κόστος, ο ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός και η τεχνογνωσία από εξειδικευμένο προσωπικό για την ανάλυση των δειγμάτων περιορίζει τη χρήση των δεικτών οξειδωτικού stress στην καθημερινή κλινική πράξη.

2.9.4. Δείκτες λυσοσωμικών ενζύμων

Τα επίπεδα της καθεψίνης D (CTSD) ενός λυσοσωμικού ενζύμου φάνηκαν σε μία μελέτη παιδιατρικών ασθενών, όταν συνδυάζονται με τα επίπεδα του δείκτη CK18²⁸⁷ να έχουν διαγνωστική ακρίβεια της τάξης του 0,998 για τη NASH. Μια παρόμοια μελέτη σε ενήλικες όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα CTSD στον ορό των ασθενών έδειξε ότι η διαγνωστική ακρίβεια του δείκτη για τη NASH ήταν 84%. Ωστόσο τα επίπεδα του CTSD παρουσίασαν σημαντική πτώση μετά από βαριατρικό χειρουργείο αποδεικνύοντας ότι ο συγκεκριμένος δείκτης επηρεάζεται δυναμικά από τη θεραπεία²⁸⁸. Επίσης τα επίπεδα του CTSD ήταν υψηλά για τους ενήλικες ασθενείς με NASH και ιδιαίτερα χαμηλά σε παιδιατρικούς ασθενείς τονίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες αξιολόγησης.

2.9.5. Αντιποκυτοκίνες και ορμόνες

Μια πληθώρα ορμονών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης όπως οι αντιποκυτοκίνες, η πρωτεΐνη δέσμησης της ρετινόλης (RBP4), η πρωτεΐνη δέσμησης των λιπαρών οξέων (FABP4) αλλά και ορμόνες που εκκρίνονται από το ήπαρ όπως ο αυξητικός παράγοντας 21 των ινοβλαστών²⁸⁹, διαταράσσονται ως προς την έκκριση και τη λειτουργία τους στη NASH. Οι ορμόνες αυτές πιθανόν να εμπλέκονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς της ηπατικής βλάβης. Όμως τα επίπεδα τους στον ορό θα μπορούσαν να αντικατοπτρίζουν και την παθογένεια του μεταβολικού συνδρόμου και να μην είναι ειδικές για τη NASH. Κατά συνέπεια υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τη χρήση των ορμονών αυτών ως διαγνωστικό δείκτη στη NASH^{280,290,291}. Η μετα-ανάλυση του 2017 έδειξε μία συνεχή συσχέτιση μεταξύ επιπέδων FGF21 στον ορό και NASH. Ωστόσο ο δείκτης αυτός παρουσίαζε ευαισθησία 62% και ειδικότητα 78% αντίστοιχα²⁹².

2.9.6. Μαθηματικοί αλγόριθμοι στη διάγνωση της NASH

Λόγω της μέτριας διαγνωστικής ακρίβειας μεμονωμένων δεικτών για τη διάγνωση της NASH, έχουν εξεταστεί διάφοροι συνδυασμοί δεικτών με σκοπό τη βελτίωση της διαγνωστικής τους αξίας. Το NASHTest (Biopredictive) είναι ένας αλγόριθμος που στηρίζεται στο συνδυασμό ηλικίας, φύλου, ύψους, βάρους και επιπέδων στον ορό

του αίματος τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης, α2 απολιποπρωτεΐνης, απτοσφαιρίνης, ολικής χολερυθρίνης, γGT, AST και ALT²⁷⁴. Η διαγνωστική ακρίβεια του NASHTest σε μελέτες αξιολόγησης ήταν 0,69-0,79. Ένας άλλος παρόμοιος αλγόριθμος είναι το NASH Diagnostic Panel που περιλαμβάνει τη διάγνωση ΣΔΤ2, το φύλο, το BMI, και τα επίπεδα στον ορό των τριγλυκεριδίων και της CK18 με AUROC 0,81²⁹³. Και οι δύο αλγόριθμοι όμως χρησιμοποιήθηκαν σε σχετικά μικρό αριθμό ασθενών με παχυσαρκία γι' αυτό και χρήζουν περαιτέρω αξιολόγησης.

Πίνακας 2.19. Βιοδείκτες και Μαθηματικοί αλγόριθμοι στη διάγνωση της NASH

<i>Βιοδείκτες Μαθηματικοί αλγόριθμοι</i>	<i>Πλεονεκτήματα</i>	<i>Μειονεκτήματα</i>
<p>Δείκτες απόπτωσης</p> <ul style="list-style-type: none"> • CK18 • Total cytokeratin • sFAS 	<ul style="list-style-type: none"> • CK18 ο πιο καλά αξιολογήσιμος δείκτης αίματος • Συσχέτιση με ιστολογική βελτίωση • Εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος προσδιορισμού 	<ul style="list-style-type: none"> • Περιορισμένη διαγνωστική αξία κατά τη μεμονωμένη χρήση τους • Optimal cut-offs uncertain • Χαμηλή ευαισθησία
<p>Δείκτες φλεγμονής</p> <ul style="list-style-type: none"> • CRP • TNF • IL-8 • CXCL10 	<ul style="list-style-type: none"> • Συσχέτιση με φλεγμονώδη διαδικασία στη NASH • Εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος προσδιορισμού για τους περισσότερους 	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν έχουν αξιολογηθεί ως διαγνωστικοί δείκτες • Ίσως να επηρεάζονται από τη συστηματική φλεγμονή
<p>Δείκτες οξειδωσης λιπιδίων 11-HETE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9-HODE, 13-HODE • 13-oxo-ODE • LA-13-HODE (oxNASHscore) • 11,12-diHETrE 	<ul style="list-style-type: none"> • Καλή - εξαιρετική διαγνωστική αξία σε μικρές μελέτες 	<ul style="list-style-type: none"> • Απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση από μελέτες • Απαιτεί ο υπολογισμός τους mass spectroscopy

<p>Αδικοκυτοκίνες και ορμόνες</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adiponectin • Leptin • Resistin • Visfatin • RBP4 • FABP4 • FGF21 	<ul style="list-style-type: none"> • Η πλειοψηφία έχει εμπορικά διαθέσιμες μεθόδους προσδιορισμού • FGF21 παρουσιάζει δυναμικές αλλαγές κατά την φυσική πορεία της NAFLD 	<ul style="list-style-type: none"> • Περιορισμένη διαγνωστική αξία κατά την μεμονωμένη χρήση τους • Έχουν αξιολογηθεί κυρίως σε μελέτες με βαριατρικούς ασθενείς
<p>Λυσοσωμικά ένζυμα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cathepsin D 	<ul style="list-style-type: none"> • Εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος προσδιορισμού • Δυναμικές αλλαγές κατά την φυσική πορεία της NAFLD 	<ul style="list-style-type: none"> • Interpretation different in adults and children • Περιορισμένος αριθμός μελετών αξιολόγησης
<p>Μαθηματικοί αλγόριθμοι</p> <ul style="list-style-type: none"> • NASHTest • NASH Diagnostics Panel 	<ul style="list-style-type: none"> • Available commercially • Μέτρια-Υψηλού βαθμού διαγνωστική ακρίβεια • Αξιόπιστα 	<ul style="list-style-type: none"> • Αξιολόγηση διαγνωστικής αξίας κυρίως σε βαριατρικούς ασθενείς • Υψηλό κόστος • Unknown whether dynamic to changes in histology

2.10. Βιοδείκτες και μαθηματικοί αλγόριθμοι στη διάγνωση και παρακολούθηση της ίνωσης και κίρρωσης

2.10.1. Μη κατοχυρωμένοι με πνευματικά δικαιώματα δείκτες και πίνακες

AST: ALT ratio και AST: platelet ratio (APRI) που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως σε μελέτες για τη χρόνια ηπατίτιδα C^{294,295}, είναι εύκολα υπολογίσιμοι αλλά έχουν χαμηλή διαγνωστική ακρίβεια στη διάγνωση σοβαρής ίνωσης και κίρρωση σε ασθενείς με NAFLD (AUROC 0,66-0,74 και AUROC 0,74 για τη διάγνωση ίνωσης σταδίου F3).

Ο δείκτης Fibrosis-4 Index (FIB-4) συνδυάζει ηλικία, επίπεδα στον ορό AST, ALT και αιμοπεταλίων και υπολογίζεται μέσω μιας πιο πολύπλοκης φόρμουλας. Έχει μέτρια διαγνωστική (AUROC 0,83 για διάγνωση ίνωσης σταδίου F3) ακρίβεια, παρόμοια με αυτή του NAFLD Fibrosis Score²⁹⁶.

Το NAFLD Fibrosis score έχει αξιολογηθεί σε ασθενείς με NAFLD αποδεδειγμένη σε βιοψία ήπατος²⁹⁷. Η ειδική διαγνωστική φόρμουλα του συγκεκριμένου αλγορίθμου περιλαμβάνει την ηλικία, το BMI, την παρουσία παθολογικής γλυκόζης νηστείας ή ΣΔΤ2, τον αριθμό των αιμοπεταλίων, τα επίπεδα της αλβουμίνης ορού και το λόγο AST: ALT. Το συγκεκριμένο score έχει AUROC 0,82 για διάγνωση σταδίου ίνωσης F3 κι έχει αξιολογηθεί εκτενέστερα σε σχέση με άλλα διαγνωστικά scores²⁹⁸. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι το NAFLD Fibrosis score μπορεί να προβλέψει ρήξη ηπατικής αντιρρόπησης και θνητότητα σε ασθενείς με NAFLD²⁹⁹.

Τέλος ο Harrison χρησιμοποίησε ένα απλό κλινικό score για την ανίχνευση προχωρημένης ίνωσης, χρησιμοποιώντας τρεις εύκολα προσβάσιμες μεταβλητές : BMI>28kg/m² (1 πόντος), AST/ALT>= 0,8 (2 πόντοι) και παρουσία ΣΔΤ2 (1 πόντος). Το μοντέλο ονομάστηκε BARD score και σύμφωνα με αυτό ασθενείς με score 2-4 έχουν σχετικό κίνδυνο 17 φορές σε σχέση με ασθενείς με score <2 να παρουσιάζουν σοβαρού βαθμού ίνωση. Το score από μελέτες έχει αξιολογηθεί και χαρακτηριστεί ως μέτριας διαγνωστικής αξίας με AUROC 0,69-0,81³⁰⁰.

Παρά το γεγονός ότι τα παραπάνω score είναι λιγότερο ακριβή από τους ειδικούς βιοδείκτες της ίνωσης, είναι εύκολα υπολογίσιμα κι εύχρηστα για τους κλινικούς ιατρούς. Επίσης έχουν υψηλή αρνητική προγνωστική αξία στο να αποκλείουν σοβαρού βαθμού ίνωση και μπορούν ορθά να χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί δείκτες στην κλινική πράξη όταν πιο πολύπλοκοι αλγόριθμοι δεν είναι διαθέσιμοι³⁰¹.

2.10.2. Ειδικοί δείκτες και αλγόριθμοι ίνωσης

Οι ειδικοί δείκτες ίνωσης (Πίνακας 2.20) αντανακλούν την ινογένεση και ή την ινωδόλυση. Αν και συνήθως υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των σταδίων ίνωσης,

κάποιοι διαγνωστικοί αλγόριθμοι (Πίνακας 2.21) όπως το FibroTest και το FibroMeter μπορούν να προβλέψουν το ακριβές στάδιο ίνωσης.

Το FibroTest (Biopredictive, Paris, France) στηρίζεται στη χρήση πέντε παραμέτρων: των επιπέδων στον ορό της γGT, της ολικής χολερυθρίνης, της α2 μακροσφαιρίνης, της απολιποπρωτεΐνης AI και της απτοσφαιρίνης³⁰². Μελέτες έδειξαν ότι είναι διαγνωστικά καλύτερο από το BARD και το FIB-4 στην πρόβλεψη ίνωσης σε ασθενείς με NAFLD (AUROC 0,88 για κάθε στάδιο ίνωσης)³⁰³.

Ομοίως και το FibroMeter (Echosens, Paris, France) είναι δείκτης που συνδυάζει το βάρος σώματος, το δείκτη προθρομβίνης, και τα επίπεδα στον ορό της φεριττίνης, της γλυκόζης νηστείας, της ALT και AST. Σε δύο μελέτες στην Ευρώπη και στην Ασία, το FibroMeter υπερίσχυσε σε διαγνωστική ακρίβεια άλλων αντίστοιχων δεικτών ίνωσης^{304,305}. Επιπρόσθετα ο αλγόριθμος FibroMeter vibration transient elastography που συνδυάζει το FibroMeter με μετρήσεις ελαστικότητας ήπατος απεικονιστικά ίσως βελτιώσει τη διάγνωση σταδίων ίνωσης F3-F4 vs F0-F2³⁰⁵.

Επίσης το Hepascore που συνδυάζει ηλικία, φύλο, επίπεδα στον ορό χολερυθρίνης, γGT, υαλουρονικού οξέος και α2 μακροσφαιρίνης έχει εξίσου καλή διαγνωστική ακρίβεια (AUROC 0,82) για σοβαρά στάδια ίνωσης (F3-F4) σε ασθενείς με NAFLD³⁰⁶. Τα τελευταία χρόνια η γνώση σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο της NAFLD, έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον σε γενετικούς βιοδείκτες. Για την ώρα υπάρχουν μόνο μικρές και περιορισμένου αριθμού μελέτες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αξιολογηθεί αντικειμενικά η χρήση τους.

Πίνακας 2.20. Ειδικοί δείκτες και αλγόριθμοι ίνωσης

<i>Ειδικοί δείκτες Αλγόριθμοι</i>	<i>AUROC</i>	<i>Ευαισθησία</i>	<i>Ειδικότητα</i>	<i>Feasibility</i>	<i>Περιορισμοί</i>
Υαλουρονικό οξύ	F4: 0,99	98%	100%	Σημαντικό ρόλο στα βασικά παθοφυσιολογικά μονοπάτια της ίνωσης, περιλαμβάνεται σε άλλους αλγόριθμους	Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα
PIIINP	NA	NA	NA	Σημαντικό ρόλο στα βασικά παθοφυσιολογικά μονοπάτια της ίνωσης, περιλαμβάνεται σε άλλους αλγόριθμους	Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα
Pro-C3	NA	NA	NA	Ισχυρή συσχέτιση με το NAFLD activity score	Δεν έχει μελετηθεί καλά σε άλλες χρόνιες ηπατικές παθήσεις
TIMP1	NASH: 0,97	97%	100%	Εξαιρετική διαγνωστική ακρίβεια, περιλαμβάνεται σε άλλους αλγόριθμους	Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα σε άλλες χρόνιες ηπατικές παθήσεις εκτός από τη NAFLD

Laminin	NAFLD: 0,87	82%	89%	Σημαντικό ρόλο στα βασικά παθοφυσιολογικά μονοπάτια της ίνωσης	
ELF	F1: 0,92 F2: 0,98 F3: 0,99	88% 94% 100%	81% 93% 98%	Καλός προγνωστικός παράγοντας για κλινικά αποτελέσματα στις χρόνιες ηπατοπάθειες	Χαμηλή ευαισθησία στα αρχικά στάδια ίνωσης, χαμηλά επίπεδα CD4 T cell μπορεί να τον επηρεάσουν
FibroTest	0,88 for any fibrosis	F1: 28% F2: 79% F3: 42% F4: 30%	F1: 79% F2: 56% F3: 94% F4: 99%	Χρήσιμος σε διάφορες χρόνιες ηπατικές νόσους, ακριβής σε υπέρβαρους ή παχύσαρκους ασθενείς	Suboptimal για αρχικά στάδια ίνωσης
FibroMeter NAFLD	F2: 0,76 F3: 0,77	22% 27%	97% 95%	Ακριβής για προχωρημένα στάδια ίνωσης σε διάφορες ηπατοπάθειες	Υψηλό κόστος

2.11. Διαγνωστική αξία Fibromax στους ασθενείς με ΣΔΤ2 για τη διάγνωση της NAFLD

Το Fibromax (Biopredictive, Paris, France) αποτελεί ένα διαγνωστικό εργαλείο που αποτελείται από 4 μη επεμβατικούς διαγνωστικούς αλγορίθμους : το SteatoTest για τη διάγνωση της στεάτωσης, το ActiTest και NASHTest2 για τη διάγνωση της ηπατικής φλεγμονής και νέκρωσης και το FibroTest για τη διάγνωση της ίνωσης. Παρά την ευρεία χρήση και αξιολόγηση των παραπάνω αλγορίθμων σε πολλαπλές μελέτες για τη NAFLD, οι περισσότερες από αυτές περιλάμβαναν όνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών με ΣΔΤ2. Πρόσφατα ο Fernando Bril³⁰⁷ και οι συνεργάτες του σε μία μελέτη που περιλάμβανε 220 ασθενείς με ΣΔΤ2 οι οποίοι υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος έδειξε ότι οι συγκεκριμένοι αλγόριθμοι έχουν χαμηλότερη διαγνωστική ακρίβεια στους ΣΔΤ2 σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς με NAFLD, προτείνοντας ότι τα όποια συμπεράσματα σχετικά με τη χρήση τους δεν θα πρέπει να γενικεύονται στο συγκεκριμένο υποπληθυσμό της NAFLD, προτείνοντας τη δημιουργία στο μέλλον ειδικών διαγνωστικών αλγορίθμων για τους ΣΔΤ2 NAFLD λόγω της ξεχωριστής παθοφυσιολογίας του ΣΔΤ2 (Πίνακας 2.21).

Πίνακας 2.21. Διαγνωστική αξία Fibromax σε ασθενείς με ΣΔΤ2 και NAFLD

Panel	Components	Outcome	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
SteatoTest	α_2 -Macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin, GGT, BMI, cholesterol, triglycerides and fasting glucose	NAFLD (intrahepatic triglyceride content \geq 5.56%)	73% (65-80%)	72% (58-83%)	87% (79-92%)	51% (40-63%)
ActiTest	α_2 -Macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin, GGT, ALT	NASH	74% (64-82%)	62% (53-70%)	60% (50-69%)	75% (66-83%)
NashTest-2	α_2 -Macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin, GGT, AST, cholesterol, and triglycerides	NASH	71% (61-80%)	60% (50-69%)	59% (49-68%)	72% (61-81%)
FibroTest	α_2 -Macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin, GGT	Advanced fibrosis (stage \geq 3)	64% (42-82%)	73% (66-79%)	23% (14-35%)	94% (89-97%)

2.12. Φυσική Ιστορία της NAFLD

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές δημοσιεύσεις σχετικά με την εξέλιξη της στεάτωσης, της στεατοηπατίτιδας και της ίνωσης σε ασθενείς με NAFLD με επαναλαμβανόμενες βιοψίες. Η ομάδα του Wong διενήργησε μια προοπτική μελέτη και βρήκε πως το 39% των ασθενών με απλή στεάτωση ανέπτυξε οριακή NASH και το 23% πλήρη εικόνα NASH³⁰⁸. Σε άλλη μελέτη που είχε συμπεριλάβει 108 ασθενείς (81 με NASH και 27 με NAFLD), το 42% παρουσίασε επιδείνωση της ίνωσης, το 40% δεν είχε καμία μεταβολή και το 18% είχε μείωση της ίνωσης³⁰⁹. Συνολικά αν εκτιμήσουμε τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, φαίνεται πως ενώ το 33% των ασθενών με αλκοολική νόσο του ήπατος θα έχει επιδείνωση της ίνωσης, υπάρχει ένα 20% που μπορεί να έχει βελτίωση. Ο κίνδυνος επιδείνωσης της ίνωσης είναι διπλάσιος σε ασθενείς με NASH σε σχέση με NAFLD, και μερικές φορές η εξέλιξη από μηδενικό στάδιο ίνωσης σε σοβαρή ίνωση μπορεί να είναι ταχεία σε διάστημα λίγων ετών. Το ποσοστό ρήξης της αντιρρόπησης φαίνεται να είναι σε διάστημα 7,6 ετών 3,1%. Η εμφάνιση επιπλοκών, ιδίως πυλαίας υπέρτασης, μετά την εγκατάσταση της κίρρωσης είναι 17% τον πρώτο χρόνο, 23% στα τρία χρόνια και 52% στη δεκαετία³¹⁰. Οι ασθενείς με μη αντιροπούμενη κίρρωση έχουν μέση επιβίωση 2 χρόνια³¹¹.

Δύο μελέτες έχουν δείξει πως το άρρεν φύλο, οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι γυναίκες με πρόωρη εμμηνόπαυση έχουν αυξημένη πιθανότητα ταχύτερης εξέλιξης σε ίνωση^{312,313}. Από την άλλη, ενώ οι Ισπανόφωνοι λαοί έχουν αυξημένο επιπολασμό NAFLD, δεν φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης προς ίνωση^{314,315}. Αντίθετα τα Ασιατικά φύλα εμφανίζουν πιο προχωρημένη νόσο³¹⁶. Παρότι η προχωρημένη ηλικία συνδέεται με ανάπτυξη ίνωσης στη NASH, δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο αν αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχουν και άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες ή ευθύνεται μόνο η NASH³¹⁷. Επιπλέον οι διαβητικοί, οι παχύσαρκοι, οι υπερτασικοί ασθενείς και όσοι έχουν αυξημένη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα στη βιοψία έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ίνωσης^{308,309,318-320}.

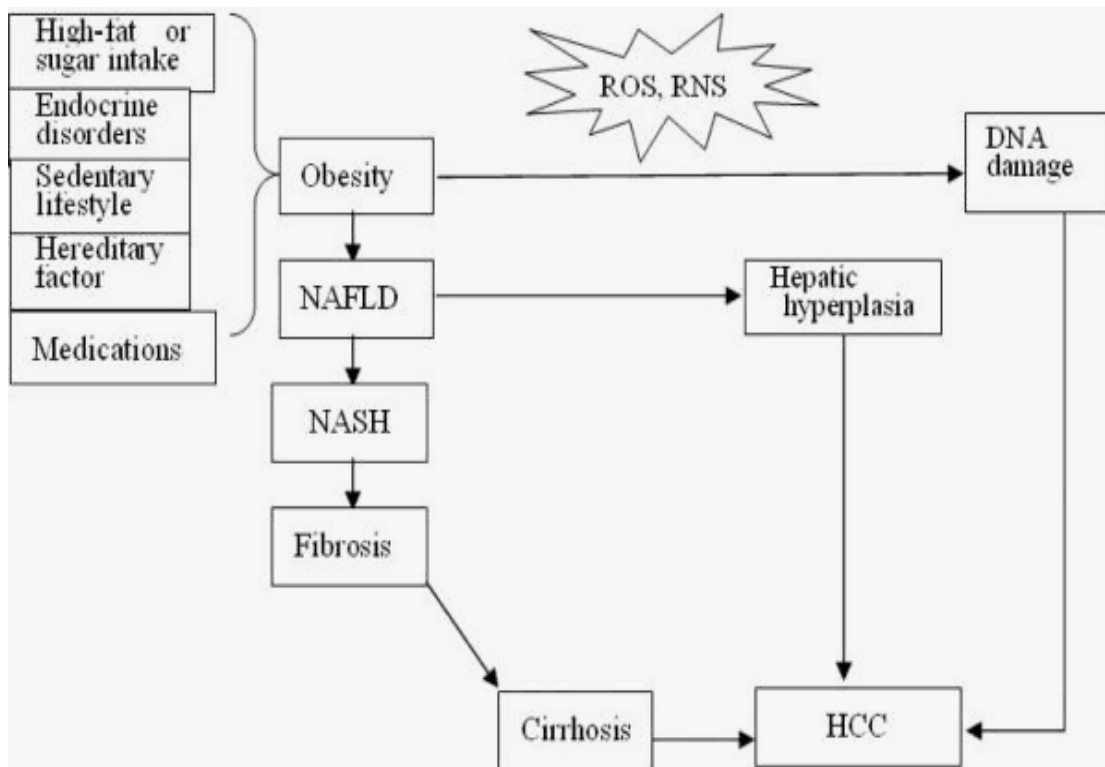
Σε μελέτες ασθενών που υποβλήθηκαν σε βαριατρική επέμβαση και αξιολογήθηκε η ηπατική βιοψία πριν και μετά την απώλεια βάρους, φάνηκε να υπάρχει βελτίωση στα ιστολογικά ευρήματα^{321,322}. Όμως υπάρχει και η πιθανότητα επιδείνωσης της ίνωσης ή της στεάτωσης³²³. Έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία σοβαρότατο περιστατικό στο οποίο παρατηρήθηκε εξέλιξη από ήπια στεάτωση πριν την επέμβαση, σε σοβαρή NASH μετεγχειρητικά, ηπατική ανεπάρκεια και θάνατο. Οι μηχανισμοί που βελτιώνουν την ηπατική ιστολογία μετά την επέμβαση σχετίζονται με την απώλεια βάρους, τη βελτίωση του σακχαρώδη διαβήτη, τη βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη, τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και γενικότερα όλων των παραγόντων του μεταβολικού συνδρόμου³²¹. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί είναι η μεταβολή της απελευθέρωσης των πεπτικών ορμονών λόγω επέμβασης,

μεταβολή της διάθεσης των λιπιδίων και έκκρισης ινσουλίνης, η μεταβολή του μεταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων και η αλλαγή στις λιποκίνες και τις υπόλοιπες κυτταροκίνες³²⁴. Αυτές οι ορμονικές μεταβολές επηρεάζουν το μεταβολισμό υδατανθράκων και λιπών καθώς και την ηπατική απελευθέρωση γλυκόζης³²⁴. Ενδεχομένως να παίζουν σημαντικό ρόλο και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων³²⁵.

Σε μία εργασία που μελέτησε τη βελτίωση της φλεγμονής και της στεάτωσης μετά από απώλεια βάρους φάνηκε πως η NASH υφέθη πλήρως στο 25% ενώ παρατηρήθηκε βελτίωση στο 47%. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της στεάτωσης στο 48% των ασθενών, μείωση του ηπατοκυτταρικού ballooning στο 39% και βελτίωση της λοβιακής φλεγμονής στο 50% των ασθενών. Το 65% δεν είχε μεταβολή της ίνωσης, το 19% είχε βελτίωση ενώ το 16% των ασθενών είχε επιδείνωση. Θεωρείται πως μια μεταβολή του σωματικού βάρους κατά 5% είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της στεάτωσης ενώ μεταβολή του βάρους κατά 10% βελτιώνει τη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα³²⁶.

Γενικά, θεωρείται πως το μεταβολικό σύνδρομο, ο ΣΔΤ2 και η παχυσαρκία σχετίζονται με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ)^{327,328}. (Εικόνα 2.15) Η NAFLD ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι ίνωσης, μπορεί να είναι το έδαφος για την ανάπτυξη ΗΚΚ. Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η στεάτωση μπορεί να προάγουν τη φλεγμονή και οι αντιποκίνες και το οξειδωτικό στρες να συμβάλουν στην καρκινογένεση³²⁷. Μια μελέτη που συμπεριέλαβε 1500 βετεράνους στην Αμερική έδειξε πως η NASH ήταν η τρίτη αιτία ανάπτυξης ΗΚΚ³²⁹. Η εμφάνιση ΗΚΚ σε έδαφος NAFLD είναι μόνο 0,2% μετά από 8 χρόνια. Όμως η ανάπτυξη ΗΚΚ σε NASH κίρρωση κυμαίνεται μεταξύ 2,4% και 12,8% σε 3,2 και 7,2 χρόνια αντίστοιχα^{330,331}. Η επιβίωση ασθενών με ΗΚΚ είναι μικρότερη σε σχέση με ασθενείς με ΗΚΚ σε έδαφος HCV-λοίμωξης³³².

Συμπερασματικά, η φυσική ιστορία της NAFLD εμφανίζει διαφορές από ασθενή σε ασθενή, οι οποίες εξαρτώνται από την ιστολογική βαρύτητα της ηπατικής βλάβης. Η απλή στεάτωση έχει σχετικά καλοήγη πορεία, ενώ η κλινικά σημαντική μορφή της νόσου είναι η στεατοηπατίτιδα, η οποία εξελίσσεται σε κίρρωση σε ποσοστό 15-25%. Η παχυσαρκία και ο ΣΔΤ2 συσχετίζονται με την ανάπτυξη κίρρωσης όπως και η υψηλή νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα στη βιοψία ήπατος. Επίσης οι ασθενείς με NAFLD έχουν υψηλή καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Τέλος δεδομένου ότι αρκετές περιπτώσεις κρυψιγενούς κίρρωσης αντιστοιχούν σε NASH, η σοβαρότητα της πιθανόν να υποεκτιμάται. Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με την αυξημένη επίπτωση της παχυσαρκίας και τις ενδημικές διαστάσεις του ΣΔΤ2, είναι πιθανόν να καταστήσουν τη NAFLD κυρίαρχο πρόβλημα νοσηρότητας και θνησιμότητας για τα επόμενα χρόνια³³³.



Εικόνα 2.15. Μηχανισμοί συσχέτισης NAFLD με ηπατοκαρκινογένεση

2.13. NAFLD και καρδιαγγειακός κίνδυνος

Η καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα συνιστούν από τις βασικότερες παραμέτρους της NAFLD. Φαίνεται πως τα καρδιαγγειακά συμβάματα κι όχι η ίδια η ηπατική νόσος είναι η κύρια αιτία θανάτου στους ασθενείς αυτούς. Σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, οι ασθενείς με NAFLD έχουν αυξημένο πάχος έσω χιτώνα καρωτίδων, αυξημένη επίπτωση αθηροσκλήρυνσης και παρουσία ορολογικών δεικτών ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Επίσης εμφανίζουν σε πρώιμο στάδιο διαταραγμένο καρδιακό ενεργειακό μεταβολισμό και αύξηση ενδο-και εξωπερικαρδιακού λίπους, όπως κατέδειξε μελέτη σε ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 35 έτη και απλή ηπατική στεάτωση³³⁴. Σε μια άλλη μελέτη σε διαβητικούς ασθενείς, η επίπτωση καρδιαγγειακής και περιφερικής αγγειακής νόσου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθενείς με NAFLD, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του μεταβολικού συνδρόμου³³⁵. Τα ευρήματα ήταν παρόμοια και για την παρουσία μικραγγειακής νόσου με τη μορφή αμφιβληστροειδοπάθειας ή νεφροπάθειας³³⁶. Δεν είναι ξεκάθαρο αν η NAFLD σχετίζεται παθογενετικά με την καρδιακή νόσο ή αν αποτελεί απλώς ένα μεταβολικό δείκτη ασθενών με αυξημένο κίνδυνο. Η έκκριση αθηρογόνων προφλεγμονωδών κυτοκινών και προπηκτικών παραγόντων από το στεατωτικό ήπαρ έχουν προταθεί σαν πιθανή εξήγηση της παραπάνω συσχέτισης. Ανεξάρτητα από την ύπαρξη παθογενετικής συσχέτισης, ο καρδιαγγειακός κίνδυνος πρέπει να επισημαίνεται και οι προδιαθεσικοί παράγοντες να αντιμετωπίζονται έγκαιρα σε κάθε ασθενή με NAFLD³³⁷.

2.14. Θεραπεία της NAFLD

Αυτή τη στιγμή δεν υπάρχει διαθέσιμη ειδική θεραπεία για τη NAFLD. Εντούτοις, καθώς αποτελεί εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου, η αρχική τουλάχιστον αντιμετώπιση πρέπει να στοχεύει στην αντιμετώπιση των παραμέτρων του συνδρόμου, με διττό στόχο τη βελτίωση της ηπατικής νόσου και την ελάττωση του καρδιαγγειακού κινδύνου³³⁷. Βασικός στόχος κάθε θεραπευτικής προσπάθειας οφείλει να είναι η απώλεια βάρους, η οποία πρέπει να είναι σταδιακή, με στόχο την απώλεια 7-10% του σωματικού βάρους σε μία περίοδο ενός έτους. Συνιστάται συνδυασμός δίαιτας και άσκησης, με αποφυγή κεκορεσμένων λιπών και τροφών πλούσιων σε φρουκτόζη και καθημερινή αερόβιο δραστηριότητα 30-45 λεπτών. Η άσκηση έχει ιδιαίτερη σημασία ανεξάρτητα από την απώλεια βάρους που προκαλεί.

Το βαριατρικό χειρουργείο συνιστάται σε νοσογόνο παχυσαρκία, με άριστα αποτελέσματα. Η νηστιδοειδική παράκαμψη, που είχε τα αντίθετα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα με επιδείνωση της ηπατικής νόσου μέσω βακτηριακής υπερανάπτυξης, έχει πλέον εγκαταλειφθεί και οι σύγχρονες τεχνικές είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές. Σε μία μετανάλυση που περιελάμβανε 15 δημοσιευμένες μελέτες και 766 ασθενείς με βιοψίες πριν και μετά την επέμβαση, φάνηκε ότι ιστολογική βελτίωση εμφάνισε το 73% των ασθενών και υποχώρηση της στεάτωσης το 93%³³⁸. Η επέμβαση είναι ασφαλής ακόμη και σε κίρρωση, με την προϋπόθεση να είναι αντιρροπούμενη χωρίς πυλαία υπέρταση, και υπάρχουν αναφορές για υποχώρηση της κίρρωσης μετά το χειρουργείο.

Σχετικά με την υπερλιπιδαιμία, αυτή πρέπει να αντιμετωπίζεται είτε με τη χορήγηση φιβράτης είτε στατίνης. Οι φιβράτες δεν βελτιώνουν την ηπατική βιοχημεία ή ιστολογία, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για τις στατίνες. Εντούτοις και τα δύο φάρμακα είναι χρήσιμα για την ελάττωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Πρέπει να τονιστεί ότι ασθενείς με NAFLD μπορούν να λάβουν στατίνες με ασφάλεια, δεδομένου ότι δεν παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ηπατοτοξικότητας ή μυοπάθειας από το γενικό πληθυσμό.

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τη μετφορμίνη και τις θειαζολιδινεδιόνες, οι οποίες είναι αντιδιαβητικά φάρμακα με κύριο μηχανισμό την ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη και δράση στην ηπατική και περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη αντίστοιχα. Σε μια πρόσφατη μετανάλυση, φάνηκε ότι η μετφορμίνη οδηγεί σε ομαλοποίηση των τρανσαμινασών και απεικονιστική βελτίωση της στεάτωσης, ωστόσο η επίδραση της στην ίνωση δεν είναι σαφής³³⁹. Από τις θειαζολιδινεδιόνες, η ροσιγλιταζόνη έχει δοκιμαστεί σε δύο μελέτες και η πιογλιταζόνη σε 5³⁴⁰. Η πιογλιταζόνη βελτιώνει τόσο την ηπατική ιστολογία και κυρίως τη στεάτωση όσο και τις τρανσαμινάσες, ενώ αντίθετα η ροσιγλιταζόνη δε φαίνεται να είναι τόσο αποτελεσματική^{339,340}. Πρέπει να τονιστεί ότι η ευεργετική επίδραση τους παύει να ισχύει μετά τη διακοπή τους, με αποτέλεσμα υποτροπή των ιστολογικών και βιοχημικών ανωμαλιών. Συνεπώς, η χορήγηση τους πρέπει να είναι μακροχρόνια.

Επιπρόσθετα, δεν υπάρχει προς το παρόν επίσημη ένδειξη για χορήγηση των παραπάνω φαρμάκων σε μη διαβητικούς ασθενείς. (Εικόνα 2.16)

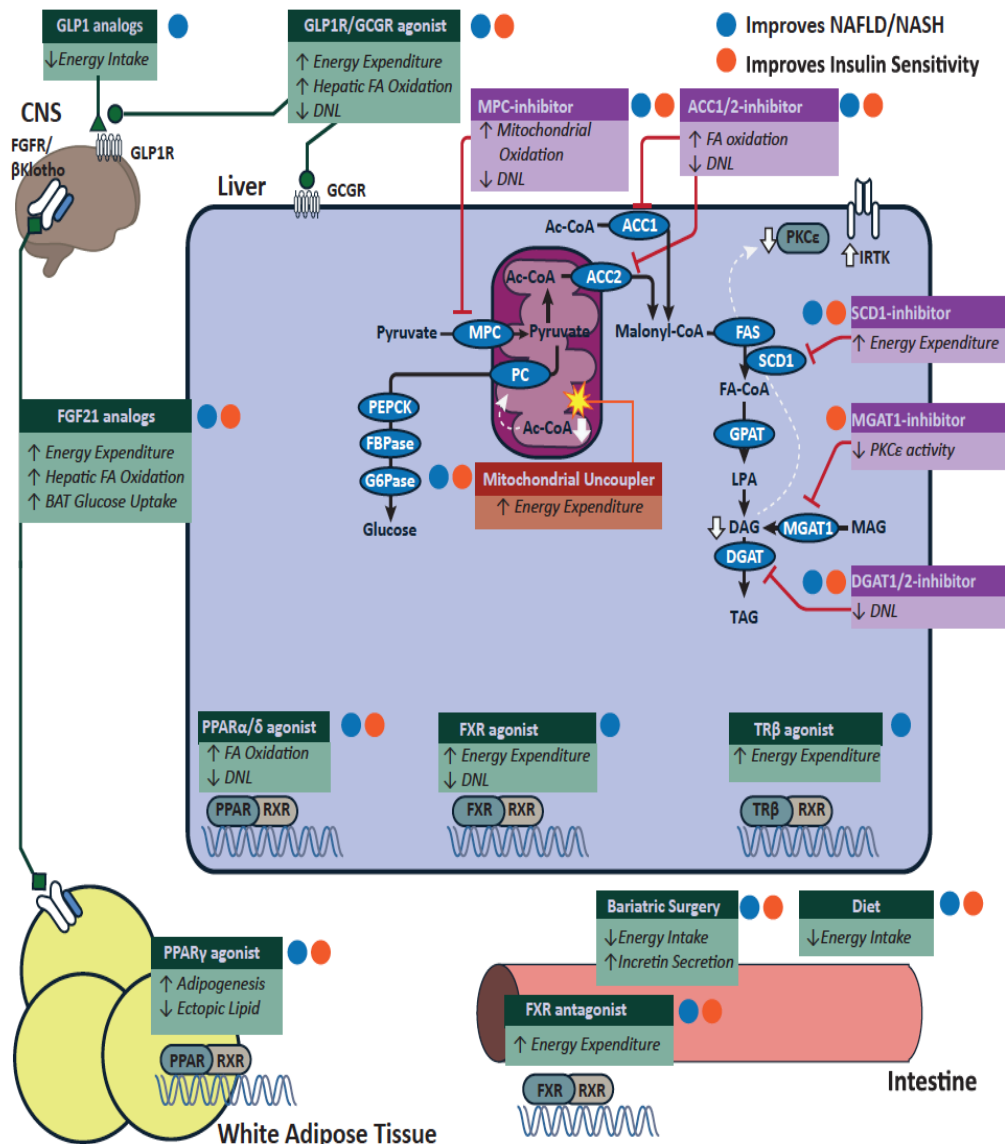
Από τις υπόλοιπες θεραπευτικές προσεγγίσεις, ενθαρρυντικά αποτελέσματα είχε η πιλοτική χορήγηση πεντοξυφυλλίνης, με σημαντικές όμως ανεπιθύμητες ενέργειες από το γαστρεντερικό. Αντίθετα, δεν φάνηκε πλεονέκτημα από τη χρήση βιταμινών E και C και ουρσοδεοξυχολικού οξέος. Αυτή τη στιγμή διεξάγονται μελέτης φάσης III με ικανό αριθμό ασθενών που εξετάζουν διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Εικόνα 2.17). Μέσα στο 2021 αναμένονται τα αποτελέσματα από τις πρώτες τυχαιοποιημένες μελέτες.

Table 1 | Medical treatment modalities in NASH and T2DM

Intervention	Metformin	GLP-1	Thiazolidinediones	SGLT2 inhibitors	DPP4 inhibitors	Sulphonylurea	Insulin
Glucose lowering efficacy	++	++	+ or ++	+ or ++	+	+++	+++
Hypoglycaemia risk	Low	Low	Low	Low	Low	High	High
Effect on body weight	Loss	Loss	Gain	Loss	Neutral	Gain	Gain
Adverse effects	Gastrointestinal	Gastrointestinal	• Oedema • Heart failure • Fractures	• Genitourinary infections • Dehydration	Pancreatic	Hypoglycaemia	Hypoglycaemia
<i>Liver-specific effects</i>							
Steatosis	NE	↓	↓	?	?	NE	↑
Inflammation	NE	↓	↓	?	?	?	?
Hepatocyte ballooning	NE	↓	↓	?	?	?	?
Fibrosis	NE	NE	?	?	?	?	?
RCTs showing effectiveness in NAFLD	NE	Liraglutide	Pioglitazone (Rosiglitazone)	ND	ND	ND	ND

Diet and exercise should be advised for all patients, and continued throughout medical treatments. DPP4, dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, glucagon-like peptide 1; ND, not done; NE, no effect; RCT, randomized controlled trial; SGLT2, sodium glucose co-transporter 2.

Εικόνα 2.16. Θεραπευτικές επιλογές σε ΣΔΤ2 με NAFLD/NASH



Metabolic-endocrine

- Weight reducing “Lifestyle”
- bariatric surgery
- Metformin
- Insulin sens. (PPAR γ , δ)
- Insulin secret. (GLP-1)
- Lipid modulating (Statins, w3-PUFA, PPAR α)
- Antihypertensive (AT2-I)
- Cortisol lowering (11 β HSD-I)

Entero-hepatic

- Anti-oxidative (vit. E)
- Cytoprotective (UDCA)
- Anti-inflammatory (PFX)
- Anti-fibrotic (LOXL-2)
- Anti-/pro-biotic
- Bile acids (FXR)

Εικόνα 2.17. Παθογένεια και στόχοι θεραπείας της NAFLD

No drug has currently been tested in phase III trials and is approved for NASH by regulatory agencies. Therefore, no specific therapy can be firmly

EASL-EASD-EASO guidelines

3. NAFLD και Μεταβολικό Σύνδρομο

Το μεταβολικό σύνδρομο είναι ένα από τα σοβαρότερα σύνδρομα της εποχής μας καθώς λαμβάνει όλο και μεγαλύτερες διαστάσεις. Τα χαρακτηριστικά του είναι η σπλαχνική παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία (υπερτριγλυκεριδαιμία ή χαμηλή συγκέντρωση λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας HDL), η υπεργλυκαιμία και η υπέρταση. Η αύξηση της συχνότητας της παχυσαρκίας λόγω της καθιστικής ζωής και της κακής διατροφής ιδίως στις δυτικές χώρες είναι η βασική αιτία αύξησης της επίπτωσης του μεταβολικού συνδρόμου. Η σοβαρότητα του έγκειται στο ότι οι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, ΣΔΤ2 αλλά και καρκίνου.

Η κλινική διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου γίνεται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια. Ο ασθενής πρέπει να πληροί τα 3 από τα ακόλουθα³⁴¹:

- 1) Σπλαχνικού τύπου παχυσαρκία που ορίζεται ως η περίμετρος μέσης >102 εκ σε άντρες και >88 εκ στις γυναίκες
- 2) Τριγλυκερίδια ορού >150 mg/dl
- 3) HDL χοληστερόλη < 40 mg/dl στους άντρες και < 50 mg/dl στις γυναίκες
- 4) Αρτηριακή πίεση > 130/85 mmHg
- 5) Γλυκόζη νηστείας > 110 mg/dl

Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) έχει λίγο διαφορετικά κριτήρια³⁴². Ο WHO θέτει τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου είτε με τη διαπίστωση υπερινσουλιναϊμίας, ή γλυκόζης νηστείας > 110 mg/dl, ή γλυκόζη μετά από δοκιμασία γλυκόζης (στις 2 ώρες) >200 mg/dl συν δύο από τα ακόλουθα:

- 1) Σπλαχνική παχυσαρκία (περίμετρος μέσης / περίμετρος γοφών > 0,9, δείκτης μάζας σώματος >30 ή περίμετρος μέσης >94 εκ.)
- 2) Δυσλιπιδαιμία (τριγλυκερίδια ορού >150 mg/dl ή HDL χοληστερόλη <35 mg/dl)
- 3) Αρτηριακή πίεση > 140/90 mg/dl ή λήψη αντιυπερτασικής αγωγής

Η αντίσταση στην ινσουλίνη καθορίζεται με τη χρήση του μοντέλου ομοιόστασης ινσουλίνης HOMA-IR το οποίο καθορίζεται από το αποτέλεσμα του γινομένου της ινσουλίνης νηστείας (Mu/mL) επί τη γλυκόζη νηστείας (mmol/L) δια 22,5^{342,343} (HOMA IR=ινσουλίνη νηστείας (Mu/mL) X γλυκόζη νηστείας (mmol/l) / 22,5. Το μεταβολικό σύνδρομο παρατηρείται και στα παιδιά και στους εφήβους αλλά μέχρι στιγμής δεν υπάρχει συμφωνία για τον ορισμό του. Σε μία αναφορά που τροποποιεί τα κριτήρια των ενηλίκων απαιτούνται 3 ή περισσότερα από τα ακόλουθα:

- 1) Τριγλυκερίδια ορού >95th percentile
- 2) HDL χοληστερόλη <5th percentile
- 3) Συστολική ή διαστολική πίεση >95th percentile
- 4) Μειωμένη αντίσταση στην ινσουλίνη³⁴⁴

Σε μια ανασκόπηση (third national health and nutrition examination survey-NHANES III) ο καθορισμός του μεταβολικού συνδρόμου απαιτεί όλα τα ακόλουθα:

- 1) Τριγλυκερίδια ορού >110 mg/dl
- 2) HDL χοληστερόλη < 40 mg/dl
- 3) Σπλαχνική παχυσαρκία (περίμετρος μέσης > 90th percentile
- 4) Γλυκόζη νηστείας > 110 mg/dl
- 5) Αρτηριακή πίεση > 90th percentile³⁴⁵

Η εμφάνιση NAFLD είναι συχνή σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο. Σχεδόν το 90% των ασθενών με NAFLD έχει τουλάχιστον μία συνιστώσα του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ το 33% έχει τρεις ή περισσότερες συνιστώσες. Ωστόσο η σχέση της NAFLD με το μεταβολικό σύνδρομο φαίνεται να είναι ισχυρότερη σε αδύνατα άτομα από ό,τι σε παχύσαρκα, ιδίως στις γυναίκες. Όλα τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου συσχετίζονται με το βαθμό περιεκτικότητας λίπους στο ήπαρ με αποτέλεσμα να είναι σημαντική η κλινική σύσταση και αξιολόγηση εμφάνισης NAFLD σε όλα τα άτομα με οποιαδήποτε συνιστώσα του μεταβολικού συνδρόμου³⁴⁶.

4. NAFLD και Σακχαρώδης Διαβήτης

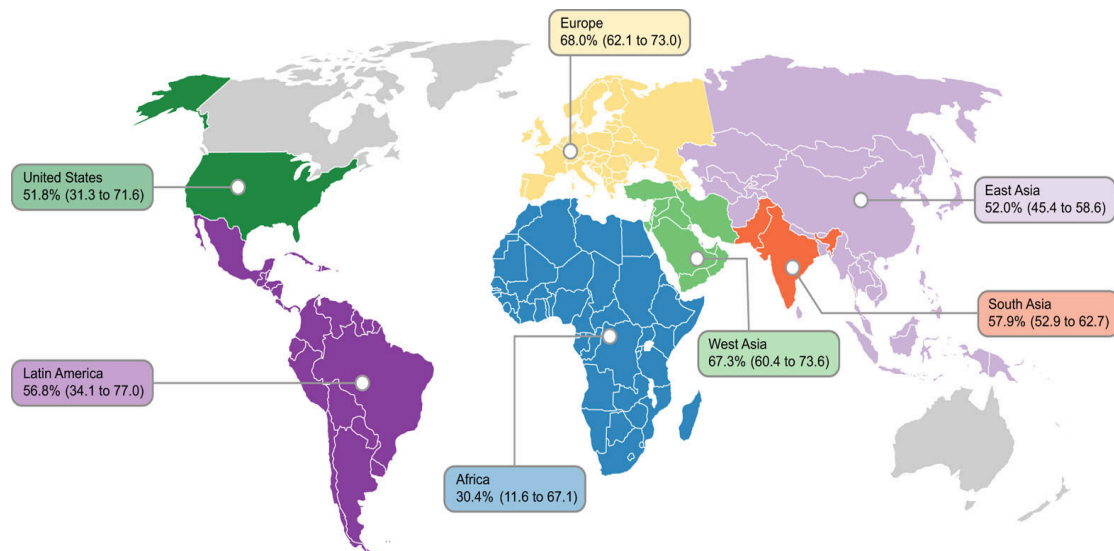
Ο ρόλος του ήπατος δεν περιορίζεται αποκλειστικά στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Το ήπαρ αποτελεί κι ένα βασικό όργανο σηματοδότησης που παράγει ορμόνες (ηπατοκίνες) και λαμβάνει σήματα από άλλους ιστούς. Ωστόσο, μελέτες για το ήπαρ στο ΣΔ επικεντρώνονται κυρίως στο ρόλο που διαδραματίζει στην αλλαγή των ροών της γλυκόζης³⁴⁷. (Εικόνα 3.1)

Αν και η συσχέτιση της NAFLD με την παχυσαρκία και τον ΣΔ2 είναι πολύ καλά τεκμηριωμένη, νέες μελέτες έχουν αναφερθεί και σε άλλες πτυχές του μεταβολισμού του ήπατος, ιδίως αυτή που αφορά τις ροές των λιπιδίων και το ενεργειακό ισοζύγιο.

Είναι γνωστή η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ NAFLD και ΣΔ2, καθώς >70% των διαβητικών ασθενών τύπου 2 έχουν NAFLD^{348,349}. Η επιβάρυνση της NAFLD με κλινικά σημαντική ίνωση που επηρεάζει έως και το 20% των ατόμων με NAFLD και ΣΔ2, φαίνεται να παίρνει τεράστιες διαστάσεις³⁵⁰⁻³⁵², λαμβάνοντας υπόψιν και τον τεράστιο αριθμό των ασθενών με ΣΔ2 παγκοσμίως³⁵³.

Έτσι, όχι μόνο η NAFLD έχει ισχυρή σύνδεση με την αντίσταση στην ινσουλίνη, αλλά και ο ΣΔ2 συνοδεύεται συνήθως από NAFLD, με υψηλό ποσοστό NASH³⁵⁴⁻³⁵⁶. Τόσο η ινσουλινοαντίσταση όσο και η υπερινσουλιναμία αποτελούν τα πιο συχνά εργαστηριακά ευρήματα σε ασθενείς με NAFLD, ακόμα και σε λεπτόσωμα άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη^{357,358}. Σε μελέτη με διαβητικούς ασθενείς τύπου 2 βρέθηκε επιπολασμός της NAFLD ίσος με 69%, έχοντας ως μέθοδο διάγνωσης το υπερηχογράφημα³⁵⁹. Σε μια προοπτική μελέτη 100 ατόμων με ΣΔ2, η συχνότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης ήταν 49%, επιβεβαιώνοντας αυτόν τον ισχυρισμό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τη NAFLD³⁵⁸. Η NAFLD επηρεάζει το 17-46% των ενηλίκων κι εμφανίζεται στην πλειοψηφία των παχύσαρκων ασθενών, από τους οποίους τουλάχιστον το 10% παρουσιάζει NASH³⁴⁶. (Εικόνα 4.1)

Ενώ η ακριβής διάγνωση στεάτωσης μπορεί να γίνει με ποσοτικοποίηση του ηπατικού λίπους με χρήση μαγνητικού συντονισμού φασματοσκοπίας, η κλινική πρακτική εξακολουθεί να βασίζεται σε λιγότερο ακριβείς μεθόδους, όπως το υπερηχογράφημα ή τη μέτρηση των επιπέδων των τρανσαμινασών στον ορό. Για τη διάγνωση της NAFLD στα πλαίσια το ΣΔ χρειάζονται ίσως νέες στρατηγικές προσέγγισης. Πρόσφατα η Hannele-Yki-Jarvinen πρότεινε μια νέα παθογενετική ταξινόμηση για τη NAFLD, που συνδυάζει με δείκτες παχυσαρκίας, μεταβολικούς-γενετικούς παράγοντες και στάδια της νόσου όπου απαιτούνται διαφορετικές διαδικασίες ελέγχου και παρακολούθησης³⁶⁰. Σύμφωνα με τις νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες κλινικής πρακτικής (EASL-EASD-EASO – clinical practice guidelines) για τη διαχείριση της NAFLD προτείνεται ένας διαβαθμισμένος αλγόριθμος διάγνωσης, που απαιτεί συνεργασία διαβητολόγων και ηπατολόγων.³⁴⁶



Global prevalence of NAFLD among T2DM patients 55.5% (95% confidence interval: 47.3-63.7)

Εικόνα 4.1. Παγκόσμιος επιπολασμός της NAFLD στους ασθενείς με ΣΔΤ2

(Zobair M. Younossi et al. *J. Hepatology* 2019,71,793-801)

4.1. Κλινική προσέγγιση της NAFLD και του ΣΔΤ2

4.1.1. Η NAFLD συχνά προηγείται του ΣΔΤ2

Η παχυσαρκία είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση NAFLD, καθώς ο Δείκτης μάζας Σώματος και η περιφέρεια μέσης που όχι μόνο συσχετίζονται θετικά με την παρουσία NAFLD, αλλά και με την πρόοδο της νόσου³⁶¹. Παγκοσμίως οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία με τη σειρά της αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης μεταγενέστερου ΣΔΤ2³⁶². Ωστόσο η αντίσταση στην ινσουλίνη δεν περιορίζεται μόνο στο ήπαρ αλλά παρατηρείται και στον μυϊκό και στο λιπώδη ιστό³⁶³. Μάλιστα η περιεκτικότητα λίπους στο ήπαρ καθορίζεται ουσιαστικά από τη ροή της ATP συνθετάσης και την ευαισθησία ινσουλίνης στον μυϊκό ιστό³⁶⁴.

Ο ορισμός της αντίστασης στην ινσουλίνη σε μη διαβητικούς ασθενείς με NAFLD παραμένει μια πρόκληση. Σε αυτή την ομάδα ασθενών, το ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης HOMA (Homeostatic Model Assessment) είναι η αποδεκτή μέτρηση ινσουλινοαντίστασης³⁶⁵.

4.1.2. Η παρουσία NAFLD προάγει τη συνεχή εξέλιξη του ΣΔΤ2

Μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυξημένα επίπεδα ορού της αμινοτρανσφεράσης, της αλανίνης (ALT) ή/και της γ-γλουταμυλ-τρανσφεράσης (γ-GT) ως βιοδείκτες της NAFLD, είναι ανεξαρτήτως συσχετιζόμενοι με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ΣΔΤ2, ακόμη και μετά από προσαρμογή διαφόρων παραγόντων κινδύνου³⁶⁶⁻³⁶⁹. Ωστόσο, η διαγνωστική αξία των εργαστηριακών αυτών παραμέτρων παραμένει περιορισμένη, κυρίως επειδή ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με εκδήλωση NAFLD έχει κανονικά επίπεδα τρανσαμινασών στον ορό³⁷⁰.

Η NAFLD φάνηκε πως σχετίζεται με διπλάσια έως και πενταπλάσια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ΣΔΤ2 σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκε το υπερηχογράφημα ως διαγνωστικό μέσο και μετά από προσαρμογή σε συνιστώσες που αφορούσαν τον τρόπο ζωής και τις μεταβολικές διαταραχές³⁷¹. Επιπλέον σε μελέτη όπου η NAFLD εκτιμήθηκε με υπερηχογραφία, φάνηκε πως η επιδείνωση του λιπώδους ήπατος σε διάστημα 5 ετών συνεπαγόταν και σημαντική αύξηση στον ΣΔΤ2³⁷².

Ο McPherson και συν., έχουν αποδείξει ότι σε ασθενείς με αντίσταση στην ινσουλίνη ή / και ιστορικό ΣΔ, η ηπατική ίνωση μπορεί να προχωρήσει κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ακόμη και όταν περιγράφεται ιστολογικά απλή στεάτωση χωρίς ηπατοκυτταρική βλάβη³⁷³.

Σε παλαιότερη μελέτη του Pais και συν., κατά την παρακολούθηση δειγμάτων βιοψίας ήπατος, φάνηκε ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με στεάτωση προχωρά προς την κατεύθυνση της NASH και της ίνωσης, με επιδείνωση των παραγόντων μεταβολικού κινδύνου και αυξημένη επικράτηση ΣΔΤ2³⁷⁴.

Επιπλέον, ο Ekstedt και συν., παρακολούθησαν επί έτη 129 διαδοχικά εγγεγραμμένους ασθενείς με NAFLD, διαγνωσμένους με βιοψία ήπατος³⁷⁵. Στη μέση παρακολούθηση των 13,7 ετών, 69 από τους 88 ασθενείς είχαν ΣΔΤ2 ή διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη και οι ασθενείς με προοδευτική ίνωση ήταν περισσότερο ανθεκτικοί στην ινσουλίνη³⁷⁵. Συνεπώς, η επιδείνωση των μεταβολικών παραγόντων κινδύνου κατά την παρακολούθηση είναι δυνατόν να επιτρέπει την ταυτοποίηση ασθενών με NAFLD με κίνδυνο εμφάνισης NASH ή ίνωσης. Έχοντας υπόψιν τον κίνδυνο επικράτησης της αντίστασης στην ινσουλίνη και του ΣΔΤ2 σε ασθενείς με NAFLD, φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η εξέταση ασθενών με NAFLD για διαβήτη με τις καθιερωμένες διαγνωστικές εξετάσεις.

Η επικράτηση της NAFLD αυξάνεται σε άτομα με κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2, όπως αυτή ορίζεται με HbA1c 5,7-6,4%, διαταραγμένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας (5,55-6,94 mmol/L) ή/ και μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη 7,77-11,04 mmol/L στις 2 ώρες κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας με 75 g OGTT^{346,376}.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πρωτεύων στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η παρουσία του πολυμορφισμού I148M του γονιδίου PNPLA3 έχει επίδραση στην ηπατική στεάτωση και ίνωση όπως αυτές μετρούνται με MRI-PDFF, ελαστογραφικές και βιοχημικές μεθόδους, σε ενήλικες με ΣΔΤ2. Δευτερεύων στόχος ήταν να ελεγχθεί η συσχέτιση του πολυμορφισμού Glu167Lys του γονιδίου TM6SF2 με την ηπατική στεάτωση και ίνωση στους παραπάνω ασθενείς. Επίσης αξιολογήθηκαν οι δημογραφικοί, κλινικοί και εργαστηριακοί παράμετροι που σχετίζονται με τους παραπάνω πολυμορφισμούς. Τέλος αξιολογήθηκαν οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι μη επεμβατικοί βιοδείκτες για την εκτίμηση της ηπατικής ίνωσης στον υπό μελέτη πληθυσμό.

2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2.1. Πληθυσμός της μελέτης

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 140 διαδοχικοί ασθενείς και των δύο φύλων με ΣΔΤ2 διαγνωσμένο σύμφωνα με τις οδηγίες της ADA¹⁶, οι οποίοι παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο του Διαβητολογικού Κέντρου της Β' Παν/κης Παθολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Ιπποκράτειο (Ι.Γ.Ν.Α).

Οι συμμετέχοντες ήταν 20-70 ετών υπό οποιαδήποτε αντιδιαβητική αγωγή ή μόνο δίαιτα. Η παρουσία αυξημένων βιοχημικών ηπατικών δεικτών (AST, ALT, ALP, γGT, TSB) εφόσον δεν συνυπήρχε άλλη γνωστή ηπατική νόσος δεν αποτελούσε κριτήριο αποκλεισμού όπως επίσης και το ιστορικό επιπλοκών του ΣΔΤ2 (νεφρικής, στεφανιαίας νόσου, νευροπάθειας ή αμφιβληστροειδοπάθειας). Ο BMI δεν αποτέλεσε κριτήριο ένταξης ή αποκλεισμού στο σχεδιασμό της μελέτης και δεν αποκλείστηκαν ασθενείς με γνωστό ιστορικό NASH, κρυψιγενή κίρρωση ή ΗΚΚ.

Κριτήρια αποκλεισμού αποτελούσαν η προϋπάρχουσα γνωστή χρόνια ηπατική νόσος (εκτός από NAFLD ή NASH) όπως η ηπατίτιδα Β, C, αλκοολική ή αυτοάνοση ηπατίτιδα, PBC, PSC ή αγγειακή θρόμβωση, η τρέχουσα χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων ή χρήση τους τελευταίους έξι μήνες, ασθενείς με HbA1c \geq 8.0%, η κατανάλωση αλκοόλ >30 gr για τους άνδρες και >20 gr για τις γυναίκες, η ταυτόχρονη παρουσία κακοήθους νεοπλασίας σε όργανο εκτός του ήπατος και τέλος η παρουσία χρόνιας αναπνευστικής πνευμονοπάθειας, καρδιακής ή νεφρικής νόσου που δεν οφείλονταν σε επιπλοκή του ΣΔΤ2.

Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου (Γ.Ν.Α Ιπποκράτειο) και όλοι οι εξεταζόμενοι υπέγραψαν το έντυπο συγκατάθεσης πριν τη συμμετοχή τους.

2.2. Μέθοδοι της μελέτης

Η μελέτη περιλάμβανε τρεις επισκέψεις των συμμετεχόντων στο Εξωτερικό Ιατρείο του Διαβητολογικού Κέντρου της Β' Παν/κης Παθολογικής Κλινικής του Ι.Γ.Ν.Α.. Κατά την πρώτη επίσκεψη κάθε ασθενής που πληρούσε κριτήρια ένταξης χωρίς να λαμβάνονται υπόψιν τα κριτήρια αποκλεισμού, θεωρούνταν εντάξιμος (Παράρτημα 1). Για κάθε πιθανό εντάξιμο ασθενή, συμπληρώνονταν Ερωτηματολόγιο Κατανάλωσης Αλκοόλ (Παράρτημα 2). Ασθενείς με κατανάλωση αλκοόλ > 30 gr (άνδρες) ή >20 gr (γυναίκες) αποκλείονταν από τη μελέτη. Οι υπόλοιποι υποβάλλονταν σε αιμοληψία για έλεγχο HbA1c, TSH, HBsAG, Anti-HCV, ANA, SMA, IgG και IGM. Ο ασθενής ελάμβανε νέο ραντεβού συγκεκριμένη μέρα και ώρα με τα αποτελέσματα του εργαστηριακού ελέγχου σε μία εβδομάδα.

Κατά τη δεύτερη επίσκεψη στο Ιατρείο ελέγχονταν οι αιτηθείσες εργαστηριακές εξετάσεις και με βάση τα κριτήρια αποκλεισμού ενημερώνονταν ο ασθενής αν μπορεί να πάρει μέρος στη μελέτη. Ασθενείς με εργαστηριακή ένδειξη λοιμώδους ή αυτοάνοσης ηπατικής παθολογίας ή αντίστοιχα θυρεοειδικής παθολογίας παραπέμπονταν στο αντίστοιχο εξωτερικό ιατρείο του νοσοκομείου μας για περαιτέρω έλεγχο. Στους υπόλοιπους ασθενείς εξηγούνταν αναλυτικά ο σκοπός και τα οφέλη της μελέτης και ζητούνταν η ενυπόγραφη συγκατάθεση τους (Παράρτημα 3).

Οι εντασσόμενοι στη μελέτη ασθενείς καταχωρούνταν με αύξοντα αριθμό στο Παράρτημα 4. Αρχικά ελήφθησαν τα δημογραφικά τους στοιχεία. Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκε η ηλικία των ατόμων, η εργασία τους και η οικογενειακή τους κατάσταση. Επίσης καταγράφηκε το οικογενειακό ιστορικό και πλήρες ατομικό αναμνηστικό σχετικά με την ύπαρξη νόσων, τη διάρκεια τους καθώς και τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής τόσο για το ΣΔΤ2 όσο και για τις υπόλοιπες νοσηρότητες.

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση των σωματομετρικών παραμέτρων (βάρους, ύψος, περίμετρος μέσης, περίμετρος ισχίων). Το σωματικό βάρος μετρήθηκε με τους συμμετέχοντες να έχουν ελαφριά ενδυμασία χωρίς υποδήματα. Ακολουθώντας υπολογίστηκε ο BMI ως το πηλίκο του βάρους δια το τετράγωνο του ύψους. Η μέτρηση της περιφέρειας μέσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας μη εκτατής ταινίας με ανατομικό σημείο την πιο στενή περιοχή της μέσης (μεταξύ τελευταίας πλευράς και λαγόνιας ακρολοφίας). Ο ασθενής στεκόταν όρθιος με την κοιλιά χαλαρή, τα πόδια ενωμένα και τα χέρια στον πλάι. Η ταινία τοποθετούνταν σε παράλληλο επίπεδο και η μέτρηση λάμβανε χώρα στο τέλος μιας φυσιολογικής εκπνοής. Για τη μέτρηση της περιφέρειας ισχίου χρησιμοποιήθηκε μη εκτατή ταινία

με ανατομικό σημείο που εξασφάλιζε πως μετράται η μέγιστη περιφέρεια ισχίου (μεγαλύτερη περιφέρεια στο ύψος των γλουτών). Ο ασθενής στεκόταν όρθιος και ο εξεταστής βρισκόταν στο πλάι ώστε να εξασφαλίσει την παράλληλη με το δάπεδο τοποθέτηση της ταινίας. Από τις δύο μετρήσεις υπολογίστηκε και ο λόγος περιφέρεια μέσης προς περιφέρεια ισχίων.

Η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) έγινε σε καθιστή θέση, τρεις φορές με μεσοδιάστημα ενός λεπτού και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η αρτηριακή υπέρταση ορίστηκε ως λήψη αντιυπερτασικής αγωγής ή η τιμή συστολικής ΑΠ \geq 140 mmHg και / ή διαστολικής ΑΠ \geq 90 mmHg, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες που ίσχυαν κατά την έναρξη της μελέτης³⁷⁷. Ως δυσλιπιδαιμία ορίστηκε η λήψη υπολιπιδαιμικής αγωγής ή η τιμή ολικής χοληστερόλης > 200 mg/dL ή / και τιμή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών χοληστερόλης (LDL-C) $>$ 100 mg/dL (και συγκεκριμένα για τους ασθενείς πολύ υψηλού κινδύνου $>$ 70 mg/dL) ή / και τιμές υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών χοληστερόλης (HDL-C) $<$ 40 mg/dL (για τους άνδρες) και $<$ 50 mg/dL για τις γυναίκες ή / και τριγλυκερίδια νηστείας $>$ 150 mg/dL. Ως στεφανιαία νόσος ορίστηκε η ύπαρξη ιστορικού στηθάγχης ή εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθώς και ιστορικό επέμβασης, όπως διαδερμική αγγειοπλαστική ή αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Η αγγειακή εγκεφαλική νόσος ορίστηκε ως ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ή ως ιστορικό επέμβασης επαναγγείωσης στις καρωτίδες. Η σταδιοποίηση της χρόνιας νεφρικής νόσου έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια που ισχύουν για τα άτομα χωρίς ΣΔ με βάση το eGFR (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Στάδια χρόνιας νεφρικής νόσου με βάση το eGFR

Στάδιο	Περιγραφή	GFR mL/min/1,73 m ² (¹)
G 1	Νεφρική βλάβη ⁽²⁾ με φυσιολογικό GRF	>90
G 2	Νεφρική βλάβη με μικρή μείωση του GFR	60-89
G 3a	Ήπια προς μέτρια μείωση του GFR	45-59
G 3b	Μέτρια προς σημαντική μείωση του GFR	30-44
G 4	Σημαντική μείωση του GFR	15-29
G 5	Νεφρική ανεπάρκεια	<15

(1) Ο υπολογισμός του eGFR έγινε με τους τύπους του MDRD ή CKD-EPI

(2) Παρουσία παθολογοανατομικών ή απεικονιστικών ευρημάτων ή ανεύρεση στα ούρα λευκωματίνης, ερυθρών αιμοσφαιρίων σπειραματικής προέλευσης ή κυλίνδρων για χρονικό διάστημα >3 μηνών

Οι ασθενείς στη συνέχεια κατευθύνονταν με συγκεκριμένα ραντεβού αναγραφόμενα σε ειδικά έντυπα με τον κωδικό της μελέτης, για τη διενέργεια των παρακάτω εργαστηριακών, γενετικών κι απεικονιστικών εξετάσεων χωρίς χρέωση:

- I. Συμπληρωματικές εξετάσεις αίματος στο τμήμα αιμοληψιών του νοσοκομείου μας πρωινές ώρες και μετά από νηστεία 10-12 ωρών (γενική αίματος, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, ολική χολερυθρίνη, γGT, ALT, AST, SAP, Apo A1, απτοσφαιρίνη, α2 μικροσφαιρίνη, γλυκόζη νηστείας, τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη, HDL, LDL, VLDL, TSP, ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων ορού, INR και φερριτίνη
- II. Έλεγχο των πολυμορφισμών των γονιδίων I148M του PNPLA3 και Glu167Lys του TM6SF2 στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Βιοϊατρικής Αμπελοκήπων
- III. Έλεγχο Fibromax™ (Biopredictive) για παρουσία στεάτωσης (SteatoTest), φλεγμονής (ActiTest), μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας – NASH (NASHtest2) και ίνωσης (Fibrotest) στη Βιοϊατρική Αμπελοκήπων
- IV. Ποσοτική μέτρηση ηπατικής στεάτωσης με MRI-PDFF, λογισμικό Ideal IQ:3D Gradient Multi-Echo Acquisition Sequence with 6 echos στο τμήμα Μαγνητικής τομογραφίας της Βιοϊατρικής Αμπελοκήπων

- V. Μέτρηση Ηπατικής σκληρότητας με Shear Wave ελαστογραφία, *Aixplorer, Supersonic Imagine SA, Aix-en-Provence, France*, στο διαγνωστικό κέντρο «Ηχοδιαγνωστική Τομογραφία»

Τα αποτελέσματα των παραπάνω εξετάσεων στέλνονταν ταχυδρομικά στον υπεύθυνο της μελέτης και καταχωρούνταν σε ειδική βάση δεδομένων στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS v25. Οι ασθενείς επανέρχονταν σε δύο εβδομάδες στο ιατρείο όπου ελάμβαναν τα αποτελέσματα των εξετάσεων τους κι ενημερώνονταν αναλυτικά για τα ευρήματα και τις τυχόν επιπτώσεις στην υγεία τους από τον βασικό ερευνητή της μελέτης. Αν εκ των εξετάσεων προέκυπτε ότι ο ασθενής έχει ηπατολογικό πρόβλημα που χρειαζόταν παρακολούθηση, γίνονταν παραπομπή στο Εξωτερικό Ηπατολογικό Ιατρείο του ΙΓΝΑ.

2.2.1. Υπολογισμός FIBROMAX™, FIB-4 Index, APRI Index, NAFLD Fibrosis score και BARD score

Το Fibromax™^{378,379} (BioPredictive, 218 Boulevard Saint-Germain, 75007, Paris, France) αποτελεί ένα πλαίσιο τεσσάρων συστημάτων βαθμονόμησης κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων που περιλαμβάνει το SteatoTest, ActiTest, NashTest2 και Fibrotest.

Συγκεκριμένα το **SteatoTest**³⁷⁸⁻³⁸⁰ αποτελεί σύστημα βαθμονόμησης εννέα παραμέτρων για την εκτίμηση της ηπατικής στεάτωσης. Για τον υπολογισμό του απαιτείται ο υπολογισμός στον ορό του αίματος της ολικής χολερυθρίνης, γGT, α2 μακροσφαιρίνης, απτοσφαιρίνης, ApoA1, γλυκόζης νηστείας, τριγλυκεριδίων, ολικής χοληστερόλης και ALT προσαρμοσμένα στο φύλο, την ηλικία, το ύψος και το βάρος του ασθενούς. Οι ασθενείς με βάση τα αποτελέσματα κατατάχθηκαν στις παρακάτω κατηγορίες:

- I. S0: (0,00-0,30) χωρίς παρουσία στεάτωσης (1% των ηπατοκυττάρων)
- II. S0-S1: (0,31-0,38) χωρίς παρουσία στεάτωσης (1% των ηπατοκυττάρων)
- III. S1: (0,39-0,48) παρουσία ελάχιστης στεάτωσης (1-5% των ηπατοκυττάρων)
- IV. S1- S2: (0,49-0,57) παρουσία ελάχιστης στεάτωσης (1-5% των ηπατοκυττάρων)
- V. S2: (0,58-0,67) σημαντική στεάτωση (6-32% των ηπατοκυττάρων)
- VI. S2-S3: (0,68-0,69) σημαντική στεάτωση (6-32% των ηπατοκυττάρων)
- VII. S3: (0,70-1.00) σοβαρή στεάτωση (>32% των ηπατοκυττάρων)

Το Actitest^{378,379} αποτελεί επίσης σύστημα βαθμονόμησης έξι παραμέτρων για την εκτίμηση της φλεγμονώδους δραστηριότητας και των ηπατικών νεκροφλεγμονωδών βλαβών. Για τον υπολογισμό του απαιτείται ο υπολογισμός στον ορό του αίματος της ολικής χολερυθρίνης, γGT, α2 μακροσφαιρίνη, απτοσφαιρίνη, Apo A1 και ALT. Οι ασθενείς με βάση την ιστολογική κατά METAVIR ταξινόμηση, κατατάχθηκαν στις παρακάτω κατηγορίες:

- I. A0: (0,00-0,17) έλλειψη ηπατικής φλεγμονώδους δραστηριότητας
- II. A1: (0,18-0,52) ήπια ηπατική φλεγμονώδης δραστηριότητα
- III. A2: (0,53-0,62) σημαντική ηπατική φλεγμονώδης δραστηριότητα
- IV. A3: (0,63-1,00) σοβαρή ηπατική φλεγμονώδης δραστηριότητα με νεκρωτικά στοιχεία

Για την εκτίμηση της παρουσίας και της σοβαρότητας μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας χρησιμοποιήθηκε ένα τρίτο σύστημα βαθμονόμησης το **NashTest2**^{378,379} για τον υπολογισμό του οποίου απαιτείται η μέτρηση στον ορό οχτώ παραμέτρων και συγκεκριμένα της γGT, ολικής χολερυθρίνης, απτοσφαιρίνης, α2 μακροσφαιρίνης, ApoA1, AST, ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων προσαρμοσμένα στην ηλικία και στο φύλλο των ασθενών. Οι ασθενείς κατατάχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες:

- I. N0: (0,00-0,25) απουσία NASH
- II. N1: (0,26-0,50) ήπιου βαθμού NASH
- III. N2: (0,51-0,75) μέτριου βαθμού NASH
- IV. N3: (0,76-1,00) σοβαρού βαθμού NASH

Τέλος εκτιμήθηκε ο βαθμός ηπατικής ίνωσης με τον υπολογισμό του **FibroTest**^{378,379,381,382} και FIB-4 Index^{381,383}. Για τον υπολογισμό του FibroTest υπολογίστηκαν στον ορό του αίματος η ολική χολερυθρίνη, η γGT, η Apo A1, η α2 μακροσφαιρίνη και η απτοσφαιρίνη. Οι ασθενείς με βάση την ιστολογική κατά METAVIR ταξινόμηση κατατάχθηκαν στις παρακάτω κατηγορίες:

- I. F0: (0,00-0,21) απουσία ηπατικής ίνωσης
- II. F0-F1: (0,22-0,27) απουσία ηπατικής στεάτωσης
- III. F1: (0,28-0,31) παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων
- IV. F1-F2: (0,32-0,48) παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων
- V. F2: (0,49-0,58) παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με λίγες ινώδεις προβολές
- VI. F3: (0,59-0,72) παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με πολλές ινώδεις προβολές
- VII. F3-F4: (0,73-0,74) παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με πολλές ινώδεις προβολές
- VIII. F4: (0,75-1,00) σοβαρή ίνωση (κίρρωση)

Ο δείκτης ηπατικής ίνωσης **FIB4-Index**^{381,383} υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

Age (years) X AST (U/L) / PLATELETS (10⁹/L) X ALT^{1/2} (U/L) με τους συμμετέχοντες να κατατάσσονται στα παρακάτω στάδια ίνωσης κατά METAVIR:

Στάδια ίνωσης	F0-F2 [mean (95% CI)]	F3-F4 [mean (95%)]
FIB-4 Index	0,97 (0,69-1,37)	1,95 (1,38-3,08)

Ο δείκτης ηπατικής ίνωσης, AST to Platelet Ratio Index (APRI score) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: **APRI= AST (IU/L) / AST upper limit (IU/L) /Platelet count(10⁹/L) x 100**. Ως ανώτερο φυσιολογικό όριο για AST ορίστηκε η τιμή 40 IU/L με τους συμμετέχοντες να κατατάσσονται στα παρακάτω στάδια ίνωσης:

APRI Index	Στάδια ίνωσης
<0,5	παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων
0,5-0,7	παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με ινώδεις προβολές
>1	κίρρωση

Επιπλέον υπολογίστηκε ο δείκτης ηπατικής ίνωσης **NAFLD Fibrosis score** με βάση κλινικών (ιστορικό Διαταραγμένης Γλυκόζης Νηστείας (IFG) ή ΣΔ, BMI, ηλικία) και βιοχημικών παραμέτρων (AST, ALT, Platelet Count, Albumin) όπως φαίνεται από τον τύπο: **NAFLD Fibrosis score= -1,675 + 0,037 x age (years) + 0,094 x BMI (kg/m²) +1,13 x IFG/diabetes (yes = 1, no = 0) + 0,99 x AST/ALT ratio-0,013 x platelet (10⁹/L)-0,66 x albumin (g/dl)** με τους συμμετέχοντες να κατατάσσονται στα παρακάτω στάδια ίνωσης κατά METAVIR:

NAFLD Fibrosis score	Στάδια ίνωσης
<-1,455	F0-F2
-1,455-0,675	ακαθόριστο στάδιο
>0,675	F3-F4

Τέλος υπολογίστηκε και ο δείκτης ηπατικής ίνωσης **BARD score** λαμβάνοντας υπόψη τις παρακάτω παραμέτρους: BMI ≥ 28 No:0, Yes: 1, AST/ALT ratio $\geq 0,8$ No: 0, Yes: 1, Diabetes No: 0, Yes: 1, με βάση τον οποίο οι συμμετέχοντες χαρακτηρίζονταν ως χαμηλού ή υψηλού κινδύνου παρουσίας ηπατικής ίνωσης.

<i>BARD score</i>	<i>Κίνδυνος παρουσίας ίνωσης</i>
0-1	χαμηλός κίνδυνος
2-4	υψηλός κίνδυνος

2.2.2. Γενετική Ανάλυση

2.2.2.1. Απομόνωση Γενετικού Υλικού

Από κάθε ασθενή έγινε λήψη αίματος σε μπουκαλάκι γενικής με EDTA. Η απομόνωση του γενετικού υλικού των ασθενών έγινε από ολικό αίμα, με την χρήση του συστήματος απομόνωσης MagNA Pure LC 2.0 (Roche) και συγκεκριμένα με το αντιδραστήριο MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Blood, Blood Cell) (κωδικός προϊόντος: 03003990001).

Αρχή Μεθόδου

Το σύστημα MagNA Pure LC είναι ένα αυτόματο μηχάνημα απομόνωσης γενετικού που μπορεί να απομονώσει από 1 έως 32 δείγματα.

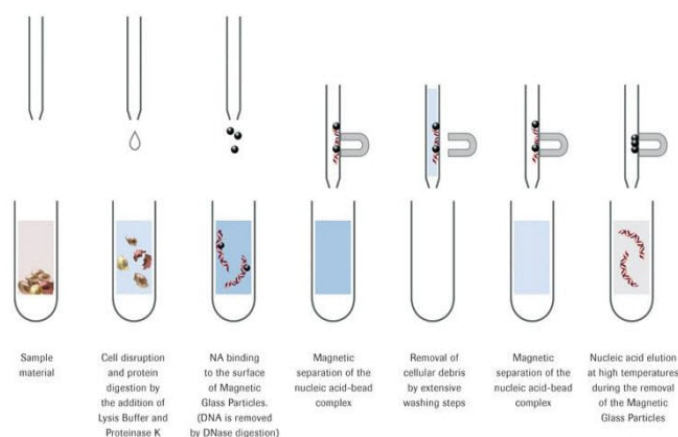
Η διαδικασία απομόνωσης χρησιμοποιεί την τεχνολογία μαγνητικών μικροσφαιριδίων. Η απομόνωση με την χρήση της τεχνολογίας αυτής βασίζεται στην πρόσδεση του γενετικού υλικού πάνω σε μαγνητικά μικροσφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου. Συγκεκριμένα τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια σε συνθήκες χαμηλού pH είναι θετικά φορτισμένα και προσελκύουν το αρνητικό φορτισμένο DNA ή RNA με την εφαρμογή θέρμανσης και με την χρήση ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής αλατότητας το DNA ή RNA αποδεσμεύονται στο διάλυμα.

2.2.2.2. Διαδικασία Απομόνωσης

Για την διαδικασία απομόνωσης υψηλής ποιότητας DNA από ολικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το σετ αντιδραστηρίων MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I και συγκεκριμένα το πρωτόκολλο DNA I Blood_-Cells_High_Performance. Ανοίγοντας το μηχάνημα επιλέγεται το πρωτόκολλο, ο αριθμός των δειγμάτων που θα απομονωθούν, η αρχική ποσότητα δείγματος (200μL) και η τελική ποσότητα

έκλουσης (100μL). Βάση των επιλογών αυτών το μηχάνημα ορίζει τον όγκο των διαφόρων αντιδραστηρίων που απαιτούνται καθώς και τον αριθμό αλλά και την θέση των πλαστικών αναλωσίμων που πρέπει να τοποθετηθούν. Στη συνέχεια στήνεται το μηχάνημα με όλα τα αντιδραστήρια έκτος από την Proteinase K και τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια. Με τη βοήθεια πιπέτας τοποθετούνται 200μL από κάθε δείγμα στην ενδεδειγμένη θέση της ειδικής πλάκας. Τοποθετείται η εν λόγω πλάκα στην ενδεδειγμένη θέση και στην συνέχεια αντιστοίχως και η Proteinase K και τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια, αφού πρώτα αναδευτούν καλά. Αφού ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία ξεκινάει το πρόγραμμα.

Το πρώτο βήμα είναι η λύση των κυττάρων του δείγματος χρησιμοποιώντας ένα ειδικό διάλυμα λύσης το οποίο περιέχει χαστροπικά άλατα και Proteinase K. Μετά την λύση προστίθενται στο διάλυμα του δείγματος τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια και το DNA προσδένεται στην επιφάνεια τους. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις για να γίνει απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων καθώς και διαφόρων άλλων αναστολέων. Στο τέλος τα μικροσφαιρίδια βυθίζονται σε προ-θερμασμένο ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας και το DNA απελευθερώνεται στο διάλυμα.



Η διαδικασία διαρκεί 45 με 90λεπτά ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Στο τέλος στην πλάκα έκλουσης έχουμε το γενετικό υλικό κάθε δείγματος στην ανάλογη θέση. Τα δείγματα μεταφέρονται σε ειδικά σωληνάρια και αποθηκεύονται για 1 εβδομάδα στους 4°C και στην συνέχεια στους -20 °C. Πριν την αποθήκευση τους γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA για κάθε δείγμα στο NanoDrop™ 1000.

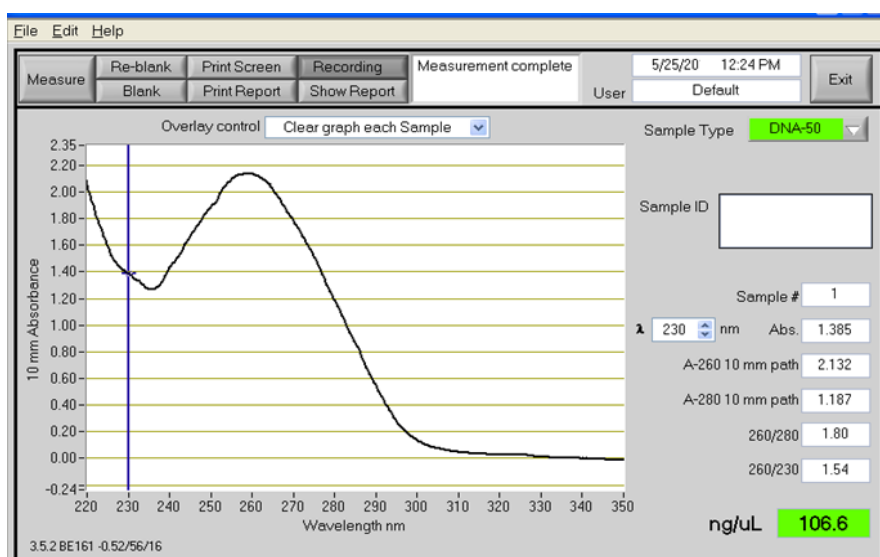
2.2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA

Η μέτρηση της ποσότητας και της καθαρότητας του γενετικού υλικού γίνεται με την χρήση του φασματοφωτομέτρου NanoDrop™ 1000 (ThermoFisher)

Αρχή Μεθόδου

Το σπεκτροφωτόμετρο NanoDrop™ 1000 είναι ένα φασματοφωτόμετρο πλήρους φάσματος (220-750nm) που μετρά δείγματα 1μL με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Χρησιμοποιεί επιφανειακή τάση για να συγκρατεί το δείγμα στην θέση του και να μην χρειάζεται χρήση των δύσχρηστων κυβετών και καθαρίζεται πολύ εύκολα. Επιπλέον δεν χρειάζεται αραιώση του δείγματος για να γίνει η μέτρηση. Το 1μL από το δείγμα τοποθετείται στην ειδική θέση όπου υπάρχει ένα καλώδιο οπτικών ινών. Ένα δεύτερο καλώδιο οπτικών ινών έρχεται σε επαφή με το δείγμα και έτσι κλείνει το κύκλωμα. Στην συνέχεια μια ειδική λάμπα νέον είναι η πηγή φωτός και το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιεί σε γραμμική διάταξη μια CCD για την ανάλυση του φωτός μετά την διέλευσή του από το δείγμα. Το ειδικό λογισμικό καταγράφει το φάσμα και προβάλλεται στην οθόνη η μέτρηση και της συγκέντρωσης καθώς και της καθαρότητα του δείγματος. Η συγκέντρωση αποδίδεται σε ng/μL και η καθαρότητα του δείγματος με τους λόγους 260/280 και 260/230. Ο λόγος 260/280 είναι ενδεικτικός της καθαρότητας του DNA και πρέπει να είναι μεταξύ 1,8-2. Ο λόγος 260/230 σχετίζεται με την ύπαρξη πρωτεϊνών και άλλων οργανικών χημικών ενώσεων και πρέπει να είναι πάνω από 1,5 με την τέλεια αναλογία να είναι γύρω στο 2.

Τα δείγματα μας και γενικά η απόδοση του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση είναι: Συγκέντρωση 50-120ng/μL, 260/280:1,8-2,0 και 260/230: 1,5-2,5.



2.2.2.4. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs738409 στο γονίδιο *PNPLA3* και rs58542926 στο γονίδιο *TMS6FS2*

Αρχή Μεθόδου

Για την ανίχνευση των δύο πολυμορφισμών χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – πολυμορφισμός μήκους περιορισμού. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι μια από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση μοριακών δεικτών, για την γενετική χαρτογράφηση καθώς επίσης και στην εγκληματολογία. Κατά την PCR-RFLP αρχικά γίνεται ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής. Το προϊόν την PCR στην συνέχεια υφίσταται πέψη με την χρήση ειδικής περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Η περιοριστική ενδονουκλεάση επιλέγεται ανάλογα με την υπό μελέτη περιοριστική θέση. Τα προϊόντα της πέψης στην συνέχεια αναλύονται με ηλεκτροφόρηση είτε σε γέλη αγαρόζης η πολυακρυλαμίδης είτε με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή. Ανάλογα με τον σχεδιασμό μπορεί η ύπαρξη ή μη του υπό μελέτη πολυμορφισμού να δημιουργείται ή να χάνεται κάποια θέση κοπής της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Αυτή η αλλαγή βοηθάει στην ταυτοποίηση του γονοτύπου.

2.2.2.4.1. Σχεδιασμός πολυμορφισμού rs738409 στο γονίδιο *PNPLA3*

Για το σχεδιασμό της μεθόδου ανίχνευσης της μετάλλαξης NM_025225.2:c.444C>G, NP_079501.2:p.Ile148Met, με rs738409 στο γονίδιο *PNPLA3* χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία της περιοχής στην βάση dbSNP

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs738409)

>gnl|dbSNP|rs738409|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/G'|mol=Genomic|build=151

```
CACACCACCA TGCCCAGCTA ATTTTTGTAT TTTTAGGAGA GACAGAGTTT CACTGTGTG
GCCAGGCTGG TCTCGAACTC CTGACCTCAA GTGATCTGCC TGCTTCAGGC TCCCAAAGTG
CTGGGATTAC AGACATGAGC CACCGCGCCT GGCCAACATC ATATAGTTTA ACTAGATCAC
TGAGAAGCTA TCTGATGCTT AAGGTGCAGA TTAAGTGAAC CAGCCAGTTT
ACCTTACAGA
TAGCCAAATA ATTAATTACA CATGCAGTAA GTTTTGCTGC CCGGGTAGCC
TGAAATAGG
GCCAGCTGTG GCTACTCTGT CTGAAAGGCA GTGAGGCATG GGGCTCCACC
ATGGGACAGA
CCCTGAGGTG CCCGACACCA GTGCCCTGCA GGCAGGAGAT GTGTGAGCAC
ACTTCAGAGG
```

CCCCAGGAC TCAGCGCTAG CAGAGAAAGC CGACTTACCA CGCCTCTGAA
GGAAGGAGGG

ATAAGGCCAC TGTAGAAGGG

S

ATGAAGCAGG AACATACCAA GGCCTGTGAA AGCAAAGGAG AGAGAAGTTA
TAGGCGAGAG

CACCCTTTTA ATTTTCCTGA TCCTTCATAA GCTTTCTCCA AGTGAGCAGG GCAACAACT

TGAAAATGCC CTTTGCACAG AGTAGGTTAA TCCATGGGTC AAAAGAACGG
GGAACTAACA

TACACCCTCG GACTTCAGGC CCATGGGTCT CATCTATTGC ATAATCCCCT TAACAACCCT

GTCAGTGAAC TTCAACTTCC TCTCCTTGCT CCCCATGAGA GTCACACTGG GTCACCACAG

ACAGGACCAA GGGTTGTTGG CTCATGGACT GAAAGGGGCT AGATCGGTGC
TGTTCAAATG

CCGGTATTCA TTAGCATCAC CGGAGAGCCT GTGGAACCAG AGATTCTGCG TCCCTCCCCA

GAATTC CAT GCAGCAGGTC AGAGGTGGGA CCTGAGGGTC TGCCATTCCA
ATAAGCTCAA

AGGAGCTGCT GCTCTGCTGG

Βάση της παραπάνω αλληλουχίας σχεδιάστηκαν εκκινητές γύρω από την περιοχή της μετάλλαξης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>).

<i>Εκκινητής</i>		<i>Μέγεθος προϊόντος</i>	<i>T_m</i>
rs738409_For	CCC TGC TCA CTT GGA GAA AG	227bp	56°C
rs738409_Rev	CTG CAG GCA GGA GAT GTG T		

Οι εκκινητές στην συνέχεια ελέγχθηκαν ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι πιάνουν την συγκεκριμένη περιοχή καθώς και για την αποφυγή παραγωγής μη επιθυμητων προϊόντων κατά την διάρκεια της PCR. Ο έλεγχος αυτός έγινε με την χρήση του προγράμματος primerblast από την βάση NCBI.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NEBcutter V2.0. (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Το πρόγραμμα αυτό βοηθάει στην επιλογή της κατάλληλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης για την γονοτύπηση των δειγμάτων.

Στην περίπτωση του rs738409 επιλέχθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση NlaIII. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο C δεν φέρει θέση κοπής για την περιοριστική ενδονουκλεάση NlaIII ενώ στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο G δημιουργείται θέση κοπής.

Πρότυπο πέψης

Γονότυπος	Μέγεθος προϊόντος πέψης
CC	227bp
CG	227bp + 112bp + 115bp
GG	112bp + 115bp

Πειραματική διαδικασία

Αντίδραση PCR

Για την αρχική PCR έγινε χρήση της πολυμεράσης *Taq* PCR Master mix kit της Qiagen (Cat. No. 201445). Η αντίδραση έγινε στον θερμοκυκλοποιητή BIORAD C1000 Touch.

Μοναδιαία Αντίδραση PCR

2x Qiagen master mix	10μL
ddH ₂ O	6μL
rs738409_For (10ng/μL)	1μL
rs738409_Rev (10ng/μL)	1μL
DNA	2μL

Συνθήκες PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός επαναλήψεων
95°C	5 λεπτά	1
95°C	30 δευτερόλεπτα	40
56°C	45 δευτερόλεπτα	
72°C	30 δευτερόλεπτα	
72°C	7 λεπτά	1
10°C	∞	1

Σε κάθε αντίδραση περιλαμβάνεται πάντα μια αντίδραση χωρίς γενετικό υλικό για τον έλεγχο πιθανής ύπαρξης επιμόλυνσης καθώς και μια αντίδραση με δείγμα control (ετερόζυγο ή ομόζυγο), η οποία ελέγχει την σωστή λειτουργία της PCR καθώς και τις απόδοσης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση NlaIII

Στην συνέχεια μέρος του προϊόντος της αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται για την πέψη.

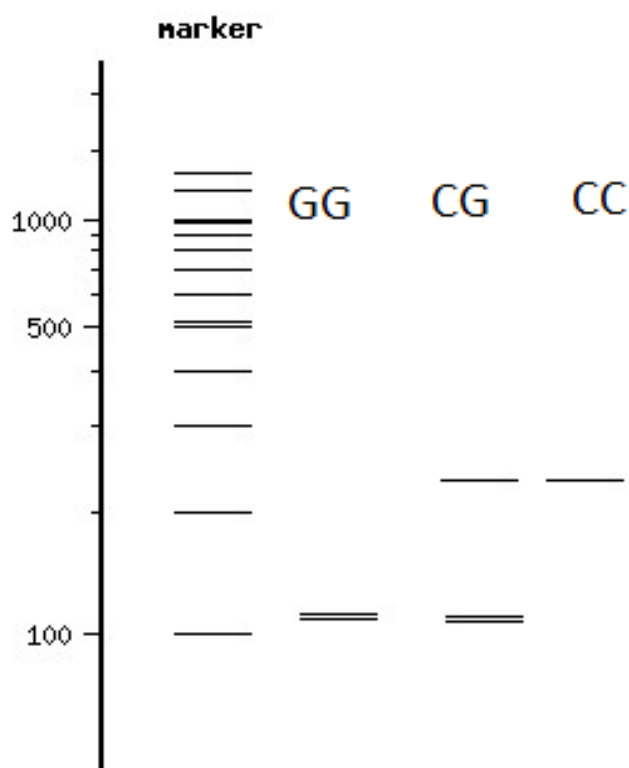
Στοιχειομετρία αντίδρασης πέψης

ddH ₂ O	12.5μL
Buffer	2μL
NlaIII	0,5μL
PCR product	5μL

Επώαση στους 37 °C για τουλάχιστον μια ώρα.

Ανάλυση προϊόντων πέψης

Στην συνέχεια γίνεται ανάλυση των προϊόντων σε γέλη αγαρόζης 3% με το σύστημα ηλεκτροφόρησης και απεικόνισης της BIORAD



Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών γονοτύπων σε 3% gel αγαρόζης για τον πολυμορφισμό rs738409.

2.2.2.4.2. Σχεδιασμός πολυμορφισμού rs58542926 στο γονίδιο *TMS6FS2*

Για τον σχεδιασμό της μεθόδου ανίχνευσης της μετάλλαξης NM_001001524.2:c.499G>A NP_001001524.2:p.Glu167Lys, με rs58542926 στο γονίδιο *TMS6FS2*. Χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία της περιοχής στην βάση dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs58542926).

```
>gnl|dbSNP|rs58542926|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=151
```

```
CTGTTGCCCA GGCTTGAGTG AAGCAGCACA GTCTCAGCTC ACTGCAGCCT TAATCTCCTG  
GGCTCAAGTG ATCCTCCCAC CTCAGCCTCC CGAATAGCTG GGACCACAGG  
CATGCACCAC
```

```
CACATCTGGC TAATTTTTTA ACTTTTTGTA GAGTAAAAA ATCTGGCTGT GTTGCCCAGG
```

```
CTGGTCTCCA ATTCCTGGGC TCAAGCGATC CTCATGCCTT GGCCTCCCAA AATGTTGGGA
```

```
TTACAGGCAT GAGCCACCGC ACCCAGCCCT CCCTTCTTTC TTGTGACAAA GGAGAACCTT
```

```
CCACAGAAAT TAAGTCTTTG ACCAAAAGCA ACTGACACGG GGAAAGTTCA  
GGCACATTGG
```

```
GACAAGGCCT AAGAGGGGTA AGGCACTCAC CATGTTGGCG GTGCAGCGGG  
TTAGCGCCCG
```

```
GGGCTGGCTG AAGACCTTCA TGCCAGCCCA GCATGGCACC AGCAGGTAGG  
GGATGGTGAG
```

```
GAAGAAGGCA GGCCTGATCT
```

Y

```
GGAGCTGTAT TTGCCTTCCA TGGTGCAGGA GAGAGGGCAT CAGCCATGCC  
AGAACCCTGC
```

```
TGGACATCTG TTTGTTTGTT TGGTCTGAGA CAGAGTCTTG CTCTGTCACC CAGGCTGGAG
```

```
TGCAGTGATG CAATCTTGGC TCACTGCAAC CTCTGCCTCC CAGGTTCAAG CAATTCTCTT
```

```
GTCTCAGCCT CTGAGTAGC TGGGATTATA CCTGGCTAAT TTTTGTACTT TTAGTATAGG
```

```
CAGGGTTTCA CCATGCTGCC CAGGCTGATC TTGATCTCCA CGGCTCAAGT GATTGATGAG
```

GCAGGTGGAT TGCTTGAGCC GAGAGTTGGA GACCAGCCTG AGCAACATAA
GGATTACAGG

CATGAGCCAC CACACGTGGC CTCTCTGGCT GGACATCTTG ATTCAGAAAT ACCATCCTCA

TTCAAGCTCC ACCACCTTCC ATGGCTCCCT AGTGCCCAACA GGATGATGTC CATACTCCTT

AGCCTAGCCT GCCTCAATTT

Βάσει της παραπάνω αλληλουχίας σχεδιάστηκαν εκκινητές γύρω από την περιοχή της μετάλλαξης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>).

<i>Εκκινητής</i>		<i>Μέγεθος προϊόντος</i>	<i>T_m</i>
rs58542926_For	ACA GAT GTC CAG CAG GGT TC	218bp	56°C
rs58542926_Rev	CAT TGG GAC AAG GCC TAA GA		

Οι εκκινητές στην συνέχεια ελέγχθηκαν ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι πιάνουν την συγκεκριμένη περιοχή καθώς και για την αποφυγή παραγωγής μη επιθυμητων προϊόντων κατά την διάρκεια της PCR. Ο έλεγχος αυτός έγινε με την χρήση του προγράμματος primerblast από την βάση NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Το πρόγραμμα αυτό βοηθάει στην επιλογή της κατάλληλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης για την γονοτύπηση των δειγμάτων.

Στην περίπτωση του rs58542926 επιλέχθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση Hpy188I. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο G φέρει θέση κοπής για την περιοριστική ενδονουκλεάση Hpy188I ενώ στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο A καταργεί την θέση κοπής.

Πρότυπο πέψης

Γονότυπος	Μέγεθος προϊόντος πέψης
GG	218bp
GA	218bp + 148bp + 70bp
GG	148bp + 70bp

Πειραματική διαδικασία

Αντίδραση PCR

Για την αρχική PCR έγινε χρήση της πολυμεράσης *Taq* PCR Master mix kit της Qiagen (Cat. No. 201445). Η αντίδραση έγινε στον θερμοκυκλοποιητή BIORAD C1000 Touch.

Μοναδιαία Αντίδραση PCR

2x Qiagen master mix	10μL
ddH ₂ O	6μL
rs58542926_For (10ng/μL)	1μL
rs58542926_Rev (10ng/μL)	1μL
DNA	2μL

Συνθήκες PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός επαναλήψεων
95°C	5 λεπτά	1
95°C	30 δευτερόλεπτα	40
56°C	45 δευτερόλεπτα	
72°C	30 δευτερόλεπτα	
72°C	7 λεπτά	1
10°C	∞	1

Σε κάθε αντίδραση περιλαμβάνεται πάντα ένα μια αντίδραση χωρίς γενετικό υλικό για τον έλεγχο πιθανής ύπαρξης επιμόλυνσης καθώς και μια αντίδραση με δείγμα control (ετερόζυγο ή ομόζυγο), η οποία ελέγχει την σωστή λειτουργία της PCR καθώς και τις απόδοσης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση Hpy188I

Στην συνέχεια μέρος του προϊόντος της αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται για την πέψη.

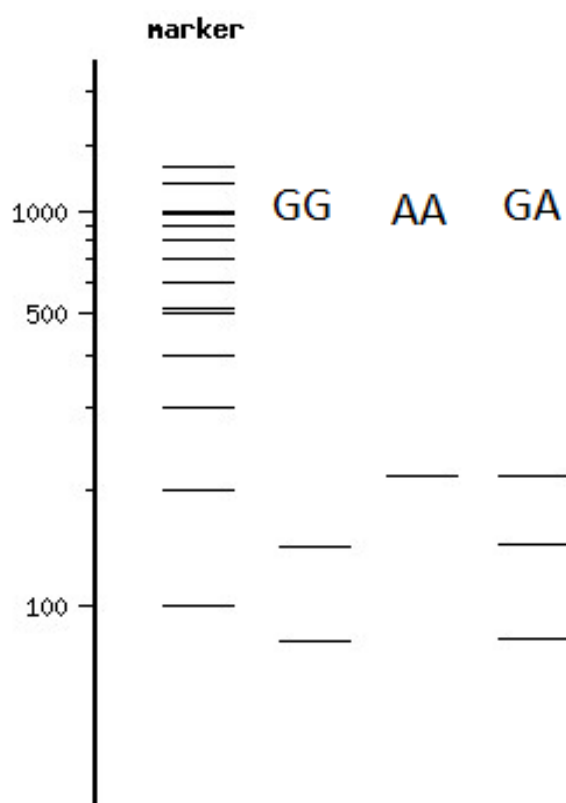
Στοιχειομετρία αντίδρασης πέψης

ddH ₂ O	12.5μL
Buffer	2μL
Hpy188I	0,5μL
PCR product	5μL

Επώαση στους 37 °C για τουλάχιστον μια ώρα.

Ανάλυση προϊόντων πέψης

Στην συνέχεια γίνεται ανάλυση των προϊόντων σε γέλη αγαρόζης 3% με το σύστημα ηλεκτροφόρησης και απεικόνισης της BIORAD



Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών γονοτύπων σε 3% gel αγαρόζης για τον πολυμορφισμό rs58542926.

2.2.3. Εκτίμηση ηπατικής σκληρότητας με απεικονιστικές μεθόδους

Η εκτίμηση της ηπατικής σκληρότητας έγινε με Swear Wave Ελαστογραφία²⁶⁶ (*Aixplorer, Supersonic Imagine SA, Saint-Germain, 75007 Paris, France*) (Εικόνα 2.1). Πρόκειται για μια υπερηχογραφική, μη επεμβατική μέθοδο που συνδυάζει ταυτόχρονα τη χρήση B-Mode, Colour Power Doppler και ελαστογραφία στηριζόμενη σε εναλλακτικό αλγόριθμο βάση της πυκνότητας και της ταχύτητας του διατετημένου κύματος.

Ο ασθενής τοποθετούνταν σε κατακεκλιμένη θέση με το βραχίονα σε κάμψη πίσω από την κεφαλή. Η κεφαλή του ηχοβολέα τοποθετούνταν παράλληλα προς το μεσοπλεύριο διάστημα (Εικόνα 2.1) ενώ ασκούνταν ελαφριά πίεση στο δέρμα. Το ακουστικό παράθυρο τοποθετούνταν 2 εκ κάτω από την κάψα του Glisson μέσα στο ηπατικό παρέγχυμα για να αποφευχθούν τα αγγεία. Ο ακτινολόγος περίμενε 2-3 δευτερόλεπτα για να σταθεροποιηθεί το σήμα και να μπορέσει να παγώσει την εικόνα. Μετρήσεις λαμβάνονταν με τον ασθενή να κρατά ελαφρώς την αναπνοή του, χωρίς να αναπνέει βαθειά. Κατά μέσο όρο λαμβάνονταν 3 μετρήσεις από την ίδια περιοχή του ηπατικού παρεγχύματος. Η ηπατική σκληρότητα κατατάσσονταν με βάση ενός συστήματος βαθμονόμησης παρόμοιο με το METAVIR score στα παρακάτω στάδια:

- I. F0: < 6 kPa απουσία ίνωσης
- II. F1: 6,1-7,9 kPa ήπια ίνωση
- III. F2: 8,0-9,4 kPa σημαντική ίνωση
- IV. F3: 9,5-12,5 kPa σοβαρή ίνωση
- V. F4: >12,5 kPa κίρρωση



Εικόνα 2.1. SuperSonic Imagine's Aixplorer – Single Crystal Curved Array XC6-1

2.2.4. Ποσοτική Μέτρηση Ηπατικής Στεάτωσης

Η ποσοτική μέτρηση της ηπατικής στεάτωσης έγινε λαμβάνοντας εγκάρσιες τομές του ήπατος με την ακολουθία των IQ IDEAL, σε μαγνητικό τομογράφο GE Discovery 3.0 Tesla (MRI- Proton Density Fat Fraction^{384,385}). Η αντιστοιχία του υπολογισμένου με τη μέθοδο του μαγνητικού συντονισμού, κλάσματος λίπους και του βαθμού στεάτωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2

Κλάσμα λίπους (fat fraction) % ηπατικών κυττάρων	0-5	5-33	34-66	>=67
Βαθμός Στεάτωσης (steatosis grade)	0 φυσιολογικός	1 ήπιος	2 μέτριος	3 σοβαρός

Με τη μέθοδο αυτή μετρήθηκε το κλάσμα λίπους στις ανατομικές περιοχές του ήπατος με μετρήσεις περιοχής ενδιαφέροντος (ROI) της τάξης των 0,04 cm² αποφεύγοντας τα μεγάλα αγγεία. Οι μετρήσεις καταγράφονταν σε ειδικό πίνακα (Πίνακας 2.3) ενώ μετρήθηκε με χρήση ειδικού λογισμικού ο όγκος του ήπατος σε ml και εκτιμήθηκε η ολική μάζα του λίπους σε γραμμάρια. Ως ηπατική στεάτωση (HS) για τις συσχετίσεις της μελέτης μας ορίστηκε το πηλίκο **Liver fat MRI x 100/ Liver volume MRI**.

Πίνακας 2.3

Ηπατικό τμήμα	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Κλάσμα λίπους % ηπατικών κυττάρων								

2.3. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τους ασθενείς εισήχθησαν στο στατιστικό πακέτο S.P.S.S. 25 (Statistical Package for Social Sciences), με σκοπό να γίνει ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων και στην συνέχεια να εξαχθούν τα αποτελέσματα της έρευνας. Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν καταχωρήθηκαν σε μια νέα βάση δεδομένων του στατιστικού πακέτου και πραγματοποιήθηκε μια γρήγορη στατιστική ανάλυση προκειμένου να ερευνηθούν τυχόν λάθη στην εισαγωγή των δεδομένων και άμεση διόρθωση αυτών. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05.

Για την περιγραφή του δείγματος πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική με τη χρήση απόλυτων αριθμών (N), ποσοστιαίων κατανομών (%), μέσων τιμών, τυπικών αποκλίσεων και διαμέσων αναλόγως την προς επεξεργασία μεταβλητή.

Το τεστ Kolmogorov - Smirnov χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η κανονικότητα της κατανομής για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. Οι μεταβλητές δεν κατανεμήθηκαν κανονικά και επιλέχθηκαν μη παραμετρικές δοκιμές (non parametric tests). Ειδικότερα, για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann Whitney, ενώ για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ περισσότερων από δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kruskal Wallis. Επιπλέον, όταν τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ποσοστιαίων κατανομών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Pearson's chi-squared test (χ^2 test). Για την αξιολόγηση ύπαρξης συσχέτισης πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης με τη χρήση του συντελεστή Spearman. Για την ερμηνεία του συντελεστή χρησιμοποιήθηκαν οι οδηγίες του Cohen (Cohen 1998)¹, οι οποίες επισημαίνουν πως η συσχέτιση 0,10 είναι μικρή, 0,30 είναι μέτρια και 0,50 μεγάλη.

Τέλος, στοχεύοντας στην διερεύνηση α) εάν οι βιοδείκτες μπορούσαν να προσδιορίσουν τα άτομα που μπορεί να ωφεληθούν από την εκτίμηση LSM με το SWE και β) των παραγόντων που σχετίζονται με την ηπατική στεάτωση, πραγματοποιήθηκαν μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Backward. Όλες οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν στα μοντέλα μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 140 εθελοντές. Από αυτούς συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη οι 120. Τέσσερις από αυτούς δεν εμφανίστηκαν στο ραντεβού τους για SWE και λήψη αίματος για υπολογισμό Fibromax™. Είκοσι άτομα που δεν υποβλήθηκαν σε MRI-PDFF αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Οκτώ άτομα (6,66%) ήταν σε δίαιτα διαβήτη και 31 (25,83%) σε συνδυασμό δισκίων με ινσουλίνη. Εκατόν δώδεκα άτομα (93,33%) έπαιρναν μετφορμίνη ενώ ο πιο δημοφιλής θεραπευτικός συνδυασμός ήταν μετφορμίνη με DDP4 αναστολείς (42 άτομα, 35,00%). Το ποσοστό των εθελοντών που έπαιρνε στατίνες ήταν 62,50% (n=75) ενώ 10,00% (n=12) έπαιρνε στατίνες και φιβράτες. Επίσης εβδομήντα άτομα (53%) ήταν σε αντιυπερτασική αγωγή με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE inhibitors). Δύο συμμετέχοντες (1,7%) παρουσίαζαν μακροαγγειακές επιπλοκές και μόνο ένας μικροαγγειοπάθεια (0,8%). Η κατανομή των πολυμορφισμών του PNPLA3 rs 738409 CC/CG/GG στους συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν αντίστοιχα 54,16% (n=65), 35,00% (n=42) και 10,83% (n=13) αντίστοιχα. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων της μελέτης καθώς επίσης και οι εργαστηριακοί τους παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Ομοίως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 3.2 όπου η ταξινόμηση των ατόμων έχει γίνει με βάση τη σταδιοποίηση στεάτωσης όπως αυτή υπολογίστηκε με τη μέθοδο MRI-PDFF. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μόνο 6 συμμετέχοντες (5%) είχαν AST > 40 IU/L και 22 (18,3%) ALT >38 IU/L.

Πίνακας 3.1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά, εργαστηριακές παράμετροι συμμετεχόντων στη μελέτη

Παράμετροι		Mean +/- SD or N (%)
N		120
Ηλικία		60,60 +/- 7,50
Φύλο	Άνδρες	74 (61,7%)
	Γυναίκες	46 (38,3%)
Διάρκεια ΣΔ (έτη)		10,55 +/- 7,15
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)		30,79 +/- 4,54
Περίμετρος Μέσης (cm)	Άνδρες	107,50 +/- 10,30
	Γυναίκες	102,00 +/- 11,30

Συστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)		126,50 +/- 11,08
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)		61,80 +/- 10,08
HbA1c (%)		6,72 +/- 0,64
Γλυκόζη Αίματος νηστείας (mg/dl)		127,98 +/- 34,79
AST (U/L)		21,46 +/- 9,27
ALT (U/L)		27,79 +/- 18,21
TSH (mg/dl)		1,69 +/- 1,02
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)		156,97 +/- 37,06
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	Άνδρες	43,73 +/- 10,30
	Γυναίκες	49,73 +/- 11,30
LDL χοληστερόλη (mg/dl)		89,76 +/- 29,88
VLDL χοληστερόλη (mg/dl)		29,18 +/- 16,14
Παρουσία ηπατικού λίπους σε >5% ηπατοκύτταρα (MRI PDFF)		97 (80,8%)
Τριγλυκερίδια (mg/dl)		137,63 +/- 72,28
SWE (LSM) < 6.0 kPa (stage F0)		62 (53,45%)
SWE (LSM) 6.1-7.9 kPa (stage F1)		38 (32,76%)
SWE (LSM) 8.0- 9.4 kPa (stage F2)		7 (6,03%)
SWE (LSM) 9.5-12.4 kPa (stage F3)		7 (6,03%)
SWE (LSM) >12.5 kPa (stage F4)		2 (1,73%)
SteatoTest σταδιοποίηση	S0	25 (21,55%)
	S0-S1	13 (11,20%)
	S1	16 (13,79%)
	S1-S2	24 (20,69%)

	S2	14 (12,07%)
	S2-S3	5 (4,31%)
	S3	19 (16,38%)
NashTest2 σταδιοποίηση	N0	19 (16,38%)
	N1	48 (41,38%)
	N2	33 (28,45%)
	N3	6 (13,79%)
ActiTest σταδιοποίηση	A0	89 (76,7%)
	A1	24 (20,7%)
	A2	1 (0,9%)
	A3	2 (1,7%)
FibroTest σταδιοποίηση	F0	48 (41,4%)
	F0-F1	15 (12,9%)
	F1	9 (7,8%)
	F1-F2	25 (21,6%)
	F2	4 (3,4%)
	F3	11 (9,5%)
	F3-F4	2 (1,7%)
	F4	2 (1,7%)

Πίνακας 3.2. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά, εργαστηριακοί παράμετροι συμμετεχόντων στη μελέτη με βάση τη σταδιοποίηση στεάτωσης όπως αυτή υπολογίστηκε με τη μέθοδο MRI-PDFF

Παράμετροι	Median (IQR) or N (%)			
	≤5%	5-33%	34-66%	>66%
N	23	64	19	14
Ηλικία	63 (61-67,24)	61,16 (56,80-65,64)	64,36 (55,16-68,27)	59,07 (50,61-61,85)
Φύλο				
• Άνδρες	18 (78,3%)	36 (56,3%)	13 (68,4%)	7 (50%)
• Γυναίκες	5 (21,70%)	28 (43,8%)	6 (31,6%)	7 (50%)
Διάρκεια ΣΔΤ2 (έτη)	12 (6-19)	10 (5 -17)	8 (3-10)	8 (1,75-10,5)
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)	26,6 (25-30,80)	30,9 (27,87-34,77)	31 (28,75-32)	33 (29,24-38,65)
Περίμετρος Μέσης (cm)				
• Άνδρες	95 (90-109,25)	109,5 (98-115,5)	111 (103-121)	120 (108-127)
• Γυναίκες	95 (82,5 -103)	102 (96-107,25)	97 (96-100,25)	103 (100-104)
Συστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)	120 (110-130)	130 (120 -130)	125 (120-130)	120 (120-130)
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)	65 (60-70)	60 (60-70)	60 (60-80)	60 (58,75-70)
HbA1c (%)	6,6 (6,20-7,23)	6,6 (6,2-7,3)	6,8 (6,3-7,3)	6,79 (6,24-6,93)
Γλυκόζη Αίματος (mg/dl)	122 (108,75- 147,75)	121 (102,5-142,75)	127 (106-144)	128 (107,75- 143,75)
AST (U/L)	17 (14-20)	18 (15-23)	20 (16-23)	31 (21,75-40)
ALT (U/L)	14,5 (12-19,25)	20 (17-29)	24 (19-38)	48,5 (32,5-70,75)
TSH (mg/dl)	1,57 (1,09-18,6)	1,41 (10,7-2,19)	1,2 (0,8-1,99)	2 (1,12-2,77)
Total Χοληστερόλη (mg/dl)	147,5 (129,25- 167,75)	157 (136,25-174,5)	153 (132-169)	177,5 (126-189,5)

HDL Χοληστερόλη (mg/dl) • Άνδρες • Γυναίκες	48 (37-53,75) 65 (50-75,5)	41,5 (35,2-49) 51 (43,2 -57,5)	40 (35-49,5) 43 (38,75-55)	41 (35 -46) 44 (39-50)
LDL Χοληστερόλη (mg/dl)	85 (71-97)	90,5 (76,5-108)	82 (62-94)	91,5 (63,5-114,25)
VLDL Χοληστερόλη (mg/dl)	21 (15-33)	24 (18-32,75)	24 (17-48)	32,5 (19,7-41,5)
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	106 (74-127)	116 (92,5-161,75)	109 (97-193)	141 (117,75-218)
SteatoTest σταδιοποίηση • S0 • S0-S1 • S1 • S1-S2 • S2 • S2-S3 • S3	8 (40%) 6 (30%) 2 (10%) 1 (5%) 2 (10%) 0 0	14 (22,2%) 3 (4,8%) 12 (19%) 14 (22,2%) 9 (14,3%) 3 (4,8%) 8 (12,7%)	2 (10,5%) 4 (21,1%) 2 (10,5%) 4 (21,1%) 2 (10,5%) 1 (5,3%) 4 (21,1%)	1 (7,1%) 0 0 5 (35,7%) 1 (7,1%) 1 (7,1%) 6 (42,9%)
NashTest2 σταδιοποίηση • N0 • N1 • N2 • N3	8 (44,4%) 5(27,8%) 5 (27,8%) 0	9 (15,5%) 29 (50%) 18 (31%) 2 (3,4%)	2 (11,8%) 9 (52,9%) 5 (29,4%) 1 (5,9%)	0 5 (38,5%) 5 (38,5%) 3 (23,1%)
ActiTest σταδιοποίηση • A0 • A1 • A2 • A3	18 (78,3%) 2 (8,7%) 0 0	53 (84,1%) 8 (12,7%) 0 2 (3,2%)	14 (73,7%) 5 (26,3%) 0 0	4 (28,6%) 9 (64,3%) 1 (7,1%) 0
FibroTest σταδιοποίηση • F0 • F0-F1 • F1 • F1-F2 • F2 • F3 • F3-F4 • F4	5 (25%) 5 (25%) 2 (10%) 8 (40%) 0 0 0 0	29 (46%) 7 (11,1%) 2 (3,2%) 13 (20,6%) 3 (4,8%) 6 (9,5%) 2 (3,2%) 1 (1,6%)	7 (36,8%) 2 (10,5%) 3 (15,8%) 3 (15,8%) 0 3 (15,8%) 0 1 (5,3%)	7 (50%) 1 (7,1%) 2 (14,3%) 1 (7,1%) 1 (7,1%) 2 (14,3%) 0 0

3.1. Ηπατική Στεάτωση και σχετικές αναλύσεις

Η διάμεση τιμή HS όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MRI-PDFF ήταν 7,80% (4,10-14,50%). Σύμφωνα με την παραπάνω απεικονιστική μέθοδο (Πίνακας 3.2) μόνο 23 (19,16%) συμμετέχοντες είχαν λίπος σε <5% των ηπατικών τους κυττάρων και χαρακτηρίστηκαν ως στάδιο S0 στεάτωσης, ενώ 97 συμμετέχοντες (80,83%) είχαν παθολογικά επίπεδα στεάτωσης. Από αυτούς οι 64 (53,33%) χαρακτηρίστηκαν ως στάδιο S1 στεάτωσης (λίπος σε 5-33% ηπατοκύτταρα), 19 (15,83%) ως στάδιο S2 στεάτωσης (λίπος σε 34-66% ηπατοκύτταρα) και 14 (11,67%) ως στάδιο S3 στεάτωσης (λίπος σε >66% ηπατοκύτταρα).

Προκειμένου να προσδιοριστεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της MRI PDFF και του SteatoTest, οι συμμετέχοντες με SteatoTest S0-S1 (Πίνακας 3.3.) ομαδοποιήθηκαν, ενώ για την MRI PDFF το 0 ορίστηκε ως < 5% των ηπατοκυττάρων με στεάτωση (LBx). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της MRI PDFF Grading Steatosis και του SteatoTest Grading Steatosis ($p=0,077$). Ο συντελεστής ομοφωνίας Cohen's kappa ήταν 0,062 ($p>0,05$).

Πίνακας 3.3. FIBROMAX™ (BioPredictive, France)

<i>SteatoTest</i>		
<i>Score (s)</i>	<i>Σταδιοποίηση</i>	<i>Ερμηνεία</i>
0,00 < s < 0,30	S0	Απουσία στεάτωσης(<1%)
0,31 < s < 0,38	S0-S1	Απουσία στεάτωσης (<1%)
0,39 < s < 0,48	S1	Ελάχιστη στεάτωση (1-5%)
0,49 < s < 0,57	S1-S2	Ελάχιστη στεάτωση (1-5%)
0,58 < s < 0,67	S2	Σημαντική στεάτωση (6-32%)
0,68 < s < 0,69	S2-S3	Σημαντική στεάτωση (6-32%)
0,70 < s < 1,00	S3	Σοβαρή στεάτωση (>32%)
<i>ActiTest</i>		
<i>Score (a)</i>	<i>Σταδιοποίηση</i>	<i>Ερμηνεία</i>
0,00 < a < 0,17	A0	Έλλειψη ηπατικής φλεγμονώδους δραστηριότητας

$0,18 < a < 0,52$	A1	Ήπια ηπατική φλεγμονώδης δραστηριότητα
$0,53 < a < 0,62$	A2	Σημαντική φλεγμονώδης δραστηριότητα
$0,63 < a < 1,00$	A3	Σοβαρή φλεγμονώδης δραστηριότητα με νεκρωτικά στοιχεία
<i>NashTest 2</i>		
<i>Score (n)</i>	<i>Σταδιοποίηση</i>	<i>Ερμηνεία</i>
$0,00 < n < 0,25$	N0	Απουσία NASH
$0,26 < n < 0,50$	N1	Ήπιου βαθμού NASH
$0,51 < n < 0,75$	N2	Μέτριου βαθμού NASH
$0,76 < n < 1,00$	N3	Σοβαρού βαθμού NASH
<i>FibroTest</i>		
<i>Score (f)</i>	<i>Σταδιοποίηση</i>	<i>Ερμηνεία</i>
$0,00 < f < 0,21$	F0	Απουσία ηπατικής ίνωσης
$0,22 < f < 0,27$	F0-F1	Απουσία ηπατικής ίνωσης
$0,28 < f < 0,31$	F1	Παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων
$0,32 < f < 0,48$	F1-F2	Παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων
$0,49 < f < 0,58$	F2	Παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με λίγες ινώδεις προβολές
$0,59 < f < 0,72$	F3	Παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με πολλές ινώδεις προβολές
$0,73 < f < 0,74$	F3-F4	Παρουσία ίνωσης πυλαίων διαστημάτων με πολλές ινώδεις προβολές
$0,75 < f < 1,00$	F4	Σοβαρή ίνωση (κίρρωση)

Επίσης όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.1, 39 (33,62%) συμμετέχοντες παρουσίαζαν μέτριου προς σοβαρού βαθμού στεατοηπατίτιδα (στάδια N2-N3) και μόνο τρεις σοβαρού βαθμού φλεγμονώδη δραστηριότητα με νεκρωτικά στοιχεία (στάδιο A2 κατά ActiTest).

Σε μονοπαραγοντική ανάλυση φάνηκε ότι η HS συσχετίζονταν με το ActiTest ($r=0,507$, $p<0,001$), NashTest2 ($r=0,532$, $p<0,001$), VLDL χοληστερόλη ($r=0,219$, $p=0,016$) και με τα τριγλυκερίδια ($r=0,262$, $p=0,004$). Επίσης άμεση συσχέτιση παρατηρήθηκε με το BMI ($r=0,379$, $p<0,001$), την περίμετρο μέσης ($r=0,290$, $p<0,001$), το μεταβολικό σύνδρομο ($r=0,199$, $p=0,029$), AST ($r=0,377$, $p<0,001$), ALT ($r=0,594$, $p<0,001$), GGT ($r=0,449$, $p<0,001$) και το G αλληλίο του PNPLA3 RS 738409 (CC vs CG/GG $p=0,001$). Αρνητική αλλά στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ HS και ηλικίας ($r=-0,286$, $p=0,002$) όπως και διάρκειας ΣΔ2 ($r=-0,277$, $p=0,002$). Επιπρόσθετα, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ HS και φύλου ($p=0,008$) με μέση τιμή HS για τους άντρες 9,1% και για τις γυναίκες 7,2%.

Η ίδια ανάλυση δεν ανέδειξε συσχέτιση μεταξύ HS με FibroTest ($p=0,878$), HDL χοληστερόλη ($p=0,099$), LDL χοληστερόλη ($p=0,614$), ολική χοληστερόλη ($p=0,390$), ApoA1 ($p=0,861$), HbA1c ($p=0,781$) και ουρικό οξύ ($p=0,575$).

Πίνακας 3.4. Συσχετίσεις HS με βιοδείκτες, εργαστηριακές και ανθρωπομετρικές παραμέτρους

		HS
Actitest	Correlation Coefficient	,507**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	116
Nashtest	Correlation Coefficient	,532**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	116
VLDL cholesterol (mg/dL)	Correlation Coefficient	,219*
	Sig. (2-tailed)	,016
	N	120
Serum triglycerides (mg/dL)	Correlation Coefficient	,262**
	Sig. (2-tailed)	,004
	N	120

Body Mass Index = weight (kg)/height (meters)	Correlation Coefficient	,379**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	120
Patient's waist circumference (cm)	Correlation Coefficient	,290**
	Sig. (2-tailed)	,001
	N	120
Metabolic syndrome	Correlation Coefficient	,199*
	Sig. (2-tailed)	,029
	N	120
Serum AST UNL < 40 IU/L	Correlation Coefficient	,377**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	119
Serum ALT UNL < 38 IU/L	Correlation Coefficient	,594**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	119
Serum GGT UNL 63 IU/L (males), 35 IU/L (females)	Correlation Coefficient	,449**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	119
Patients' age at the time of examination	Correlation Coefficient	-,286**
	Sig. (2-tailed)	,002
	N	120
Onset of diabetes mellitus (years)	Correlation Coefficient	-,277**
	Sig. (2-tailed)	,002
	N	120

LDL cholesterol (mg/dL)	Correlation Coefficient	,047
	Sig. (2-tailed)	,614
	N	120
HDL cholesterol (mg/dL)	Correlation Coefficient	-,151
	Sig. (2-tailed)	,099
	N	120
Fibrotest	Correlation Coefficient	-,014
	Sig. (2-tailed)	,878
	N	116
Serum cholesterol (mg/dL)	Correlation Coefficient	,079
	Sig. (2-tailed)	,390
	N	119
Serum ApoA1 (g/L)	Correlation Coefficient	-,016
	Sig. (2-tailed)	,861
	N	119
Serum uric acid (mg/dL)	Correlation Coefficient	-,052
	Sig. (2-tailed)	,575
	N	120
Glycozylated A1c hemoglobin (%)	Correlation Coefficient	,026
	Sig. (2-tailed)	,781
	N	120

***.* Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed).

***. Correlation is significant at the 0,05 level (2-tailed).

Σε πολυπαραγοντική ανάλυση όπως φαίνεται παρακάτω στον Πίνακα 3.5, η ΗΣ σχετίστηκε ανεξάρτητα με τον πολυμορφισμό του γονιδίου PNPLA3 rs 738409, την περίμετρο μέσης, το γυναικείο φύλο και τη διάρκεια του ΣΔ2.

Πίνακας 3.5. Συσχέτιση των υπό μελέτη μεταβλητών με την ΗΣ στους συμμετέχοντες με την πολυπαραγοντική ανάλυση

Μεταβλητές	<i>beta coefficient</i>	<i>95% confidence interval (CI)</i>	<i>P value</i>	<i>Correlations</i>		
				<i>Zero-order</i>	<i>Partial</i>	<i>Part</i>
PNPLA3 rs738409 (CG/GG)	0,425	0,182 - 0,667	0,001	0,328	0,308	0,267
Περίμετρος μέσης (cm)	2,448	1,334 - 3,563	0,001	0,267	0,235	0,218
Γυναικείο Φύλο	0,419	0,164 - 0,674	0,002	0,266	0,310	0,269
Διάρκεια ΣΔ2 (έτη)	(-) 0,179	(-) 0,316 - (-) 0,042	0,011	(-) 0,311	(-) 0,281	(-) 0,242

Συζήτηση

Υπάρχει μια πολύπλοκη συσχέτιση μεταξύ NAFLD και ΣΔ2, με κάθε μία οντότητα να επηρεάζει αρνητικά την άλλη³⁸⁶. Συγκεκριμένα, όχι μόνο η παρουσία της NAFLD σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2³⁸⁷⁻³⁸⁹, αλλά έχει φανεί από μελέτες ότι η συνύπαρξη ΣΔ2 και NAFLD αποτελεί παράγοντα κινδύνου ταχείας εξέλιξης της NAFLD σε προχωρημένη ίνωση, κίρρωση ή ακόμη και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο³⁹⁰⁻³⁹⁴. Πρόσφατα άλλωστε παρατηρήθηκε από βιοψίες ήπατος σε άτομα με ΣΔ2 ότι η στεατοηπατίτιδα (NASH) μπορεί να αποτελεί και το μοναδικό εύρημα ηπατικής βλάβης σε αυτόν τον πληθυσμό, υποδηλώνοντας ότι η NASH μπορεί να αποτελεί μία από τις πρώιμες επιπλοκές του ΣΔ2 λόγω της παθοφυσιολογικής της συσχέτισης με την αντίσταση στην ινσουλίνη³⁹⁵.

Τα ευρήματα της μελέτης μας καταρχήν επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση των παραμέτρων που συνθέτουν το λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών μας και συγκεκριμένα των τριγλυκεριδίων ορού και της VLDL χοληστερόλης με τη HS όπως άλλωστε έχει φανεί και σε προηγούμενες μελέτες³⁸⁹.

Ωστόσο, στη μελέτη μας οι προγνωστικές μεταβλητές για την εμφάνιση HS σχετίζονταν κυρίως με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μας. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία κυρίαρχη συσχέτιση μεταξύ του γυναικείου φύλου και της HS. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση το γεγονός ότι τα επίπεδα των οιστρογόνων που παίζουν βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων είναι διαφορετικά στα δύο φύλα³⁹⁶.

Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έχουν αναλύσει τη σχέση μεταξύ περιμέτρου μέσης κι αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης λιπώδους ήπατος. Οι Alireza Ghaemi et al³⁹¹ έδειξαν ότι η περίμετρος μέσης αποτελεί δείκτη του διατροφικού πρότυπου της NAFLD. Ομοίως, σε μια μελέτη μετα-ανάλυσης, οι Qing Pang et al. βασισμένοι σε είκοσι συνολικά μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η περίμετρος μέσης είναι η ισχυρότερη ανθρωπομετρική μεταβλητή για την πρόβλεψη NAFLD (OR = 3,14, 95% CI: 2,07 - 4,77), ακόμη πιο ισχυρή και από το δείκτη μάζας σώματος (BMI), όπως φάνηκε και στη δική μας μελέτη. Η ίδια μελέτη έδειξε υπεροχή της περιμέτρου μέσης έναντι του BMI στην πρόβλεψη λιπώδους ήπατος, κάτι που επιβεβαιώθηκε και στη δική μας μελέτη. Είναι γνωστό άλλωστε ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη στη NAFLD είναι συνδεδεμένη περισσότερο με την περίμετρο μέσης παρά με τον BMI και κυρίως ότι η λιπώδης διήθηση του ήπατος αποτελεί την ηπατική εκδήλωση του ευρέου φάσματος του μεταβολικού συνδρόμου³⁹². Επίσης, ο BMI είναι μια σύνθετη μεταβλητή, που αποτελείται από δύο παραμέτρους (βάρος και ύψος²), οι τιμές του οποίου θα μπορούσαν εύκολα να ποικίλουν με τις μεταβολές του βάρους, καθιστώντας τον έτσι λιγότερο ακριβή στην πρόβλεψη της NAFLD.

Στη μονοπαραγοντική ανάλυση της μελέτης μας φάνηκε ότι οι συμμετέχοντες με σίγουρη ηπατική στεάτωση με βάση τα αποτελέσματα του MRI-PDFF ήταν νεότεροι

κι είχαν μικρότερη διάρκεια ΣΔ2. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση η διάρκεια του ΣΔ2 αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος μάλιστα προγνωστικός παράγοντας HS. Αν και οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός της NAFLD αυξάνεται με την ηλικία, δεν βρήκαμε να ισχύει κάτι τέτοιο στον πληθυσμό μας. Τα ευρήματά μας παρά ταύτα έρχονται σε συμφωνία με μία μελέτη των Williamson et al³⁹⁷. Καταρχήν, είναι πιθανό ο επιπολασμός της NAFLD στον πληθυσμό της μελέτης μας να είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τον γενικό διαβητικό πληθυσμό. Επίσης τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών μπορεί να είναι λιγότερο εφαρμόσιμα σε άλλες χώρες στις οποίες ο επιπολασμός άλλων αιτιών ηπατικής νόσου όπως το αλκοόλ και οι ιογενείς ηπατίτιδες είναι σημαντικά διαφορετικός.

Δεύτερον, στη μελέτη μας δείξαμε ότι η ηλικία συσχετίζεται αρνητικά αλλά στατιστικά σημαντικά με τον BMI ($p=-0,029$). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι όσο μεγαλώνουν οι συμμετέχοντες μας μειώνουν την πρόσληψη θερμίδων, με αποτέλεσμα να χάνουν βάρος που αποτελεί τον βασικό παράγοντα κινδύνου τόσο για την εμφάνιση του ΣΔΤ2 όσο και της NAFLD. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι το 93.33% των ατόμων που πήραν μέρος στη μελέτη λάμβαναν μετφορμίνη, η οποία ως γνωστό από προηγούμενες μελέτες³⁹³ έχει θετική ή ουδέτερη επίδραση στην απώλεια βάρους.

Όσον αφορά τη συσχέτιση της βραχύτερης διάρκειας του ΣΔΤ2 και της ηπατικής νόσου, αυτή έχει ήδη περιγραφεί λεπτομερώς στο παρελθόν³⁹⁸. Η επικρατέστερη εξήγηση είναι ότι το σημαντικά αυξημένο επίπεδο υπερινσουλιαιμίας στον πρώιμο ΣΔΤ2 οδηγεί στην πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων από τα ηπατοκύτταρα.

Τα ευρήματα της μελέτης μας επίσης επιβεβαιώνουν μία ακόμη συσχέτιση, αυτή του PNPLA3 rs 738409 με την περιεκτικότητα σε λίπος των ηπατοκυττάρων. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν εξετάσει τη σχέση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού του γονιδίου με την HS, βρήκαμε ότι η παρουσία του αλληλίου G ενέχει τον κίνδυνο για αυξημένη εναπόθεση λίπους στο ήπαρ³⁹⁹. Ο πολυμορφισμός αυτός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό ατόμων που χρειάζονται συγκεκριμένες στρατηγικές τόσο για την πρόληψη όσο και για την ανίχνευση της ηπατικής ίνωσης και των σοβαρών επιπλοκών της, δεδομένου ότι τα επίπεδα των τρανσαμινασών υποτιμούν την παρουσία NAFLD σε άτομα με ΣΔΤ2^{394,400} (στη μελέτη μας τα επίπεδα των τρανσαμινασών στον πληθυσμό μας δεν ήταν ούτε διπλάσια των ανώτερων φυσιολογικών ορίων όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1).

Οστόσο πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετοί περιορισμοί της τρέχουσας μελέτης. Πρώτον αποτελεί μια συγχρονική μελέτη παρατήρησης που μπορεί να παρέχει δεδομένα για πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της HS και των υπό μελέτη μεταβλητών, αλλά δεν μπορεί να εξηγήσει την υποκείμενη παθοφυσιολογία. Επίσης ο αριθμός των συμμετεχόντων στη μελέτη ήταν μικρός, επομένως τα αποτελέσματά μας θα

πρέπει να επιβεβαιωθούν με μεταγενέστερες μελέτες που θα περιλάβουν μεγαλύτερες σειρές ατόμων.

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήσαμε το Fibromax™ ως διαγνωστικό εργαλείο, που αποτελείται από τον συνδυασμό τεσσάρων μη επεμβατικών βιοδεικτών για τη διάγνωση της στεατώσεως (SteatoTest), ηπατικής φλεγμονής και νέκρωσης (ActiTest - NashTest2) και ίνωσης (FibroTest). Όλοι αυτοί οι βιοδείκτες να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σε πληθυσμούς με διαφορετικές ηπατικές παθήσεις (αλκοολική ηπατική νόσος, ηπατίτιδα Β, C)^{401,402} αλλά η χρήση τους έχει επικυρωθεί με μελέτες και στη NAFLD³⁸⁸. Ωστόσο, αυτές οι μελέτες περιλάμβαναν άτομα με ΣΔΤ2 μόνο σε ένα ποσοστό 30% κι επιπλέον οι συγκεκριμένοι βιοδείκτες δεν αξιολογήθηκαν για τη συγκεκριμένη πληθυσμιακή υποομάδα. Οι Fernando Bril et al⁴⁰⁰. σε μια πρόσφατη μελέτη έδειξαν ότι οι συγκεκριμένοι βιοδείκτες είχαν χαμηλή διαγνωστική αξία όταν εφαρμόστηκαν σε μία μεγάλη πληθυσμιακή ομάδα ατόμων με ΣΔΤ2.

Τέλος λόγω έλλειψης βιοψιών ήπατος, γνωρίζουμε ότι τα αποτελέσματά μας θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή και να επιβεβαιωθούν με μελέτες που θα περιλαμβάνουν ιστολογική αξιολόγηση στο μέλλον.

3.2. Ηπατική ίνωση, βιοδείκτες και σχετικές αναλύσεις

Μόλις 16 συμμετέχοντες (13,33%) παρουσίαζαν ηπατική ίνωση σταδίων F2-F4 (LSM >8,0 kPa) όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Τα άτομα αυτά σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό της μελέτης, είχαν υψηλότερες τιμές HbA1c (6,99% vs 6,65%) και τιμές ALT > 38 IU/ L (47,1% vs 14,1%) και ήταν κυρίως ετεροζυγώτες όσον αφορά την παρουσία του παθολογικού αλληλίου G του PNPLA3 rs 738409 (58,8% vs 29,3%). Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 16 αυτών ατόμων της μελέτης με τιμές LSM >8,0 kPa καθώς επίσης και οι εργαστηριακές τους παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6.

Πίνακας 3.6. Δημογραφικά, κλινικά χαρακτηριστικά κι εργαστηριακές παράμετροι συμμετεχόντων στη μελέτη με LSM >8,0 kPa

Παράμετροι		Mean +/- SD or N (%)
N		16
Ηλικία		59,60 +/- 10,28
Φύλο	Άνδρες	7 (43,8%)
	Γυναίκες	9 (56,3%)
Διάρκεια ΣΔΤ2 (έτη)		13,25 +/- 7,87
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)		33,25 +/- 2,60
Περίμετρος Μέσης (cm)	Άνδρες	111,71 +/- 12,47
	Γυναίκες	106,88 +/- 8,76
Συστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)		128,44 +/- 8,31
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)		68,44 +/- 13,50
HbA1c (%)		6,83 +/- 0,62
Γλυκόζη Αίματος (mg/dl)		125,06 +/- 19,12
AST (U/L)		30,44 +/- 13,21
ALT (U/L)		42,25 +/- 24,53
TSH (mg/dl)		1,64 +/- 1,26
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)		153,13 +/- 23,34
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	Άνδρες	38,71 +/- 9,58
	Γυναίκες	47,66 +/- 9,93
LDL χοληστερόλη (mg/dl)		93,70 +/- 27,16
VLDL χοληστερόλη (mg/dl)		35,37 +/- 15,13
Παρουσία Ηπατικού Λίπους σε >5% ηπατοκύτταρα (MRI PDFF)		16 (100%)
Τριγλυκερίδια (mg/dl)		140,81 +/- 65,63
NashTest2 σταδιοποίηση	N0	3 (18,75%)
	N1	3 (18,75%)
	N2	6 (37,50%)
	N3	4 (25,00%)
ActiTest σταδιοποίηση	A0	6 (37,5%)
	A1	8 (50,0%)

	A2	1 (6,3%)
	A3	1 (6,3%)
FibroTest σταδιοποίηση	F0	5 (31,3%)
	F0-F1	1 (6,3%)
	F1	2 (12,5%)
	F1-F2	2 (12,5%)
	F2	1 (6,3%)
	F3	3 (18,8%)
	F3-F4	1 (6,3%)
	F4	1 (6,3%)
Genotype PNPLA3	CC	5 (31,3%)
	CG	7 (43,8%)
	GG	4 (25%)

Παρά το γεγονός ότι το παθολογικό αλληλίο G του πολυμορφισμού του PNPLA3 rs 738409 σχετίζονταν άμεσα με την HS (CC vs CG/GG, $p=0,001$), δεν φάνηκε παρόμοια συσχέτιση με την ηπατική ίνωση όπως αυτή υπολογίστηκε τόσο απεικονιστικά μέσω της τιμής της LSM με SWE ($r=0,0064$, $p=0,504$), όσο και μη επεμβατικά μέσω του FibroTest ($r=0,081$, $p=0,388$).

Το 90,2% των συμμετεχόντων στη μελέτη με φυσιολογική SWE δεν είχαν ενδείξεις νεκροφλεγμονώδους δραστηριότητας (στάδιο A0). Ήπια ηπατική φλεγμονώδη δραστηριότητα (στάδιο A1) παρουσίαζαν όλοι οι συμμετέχοντες με στάδιο ηπατικής ίνωσης F4. Ωστόσο, το 14,3% του πληθυσμού μας με στάδιο ίνωσης F3 παρουσίαζε σημαντική νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα (στάδιο A2). Τέλος μόνο το 1,6% των συμμετεχόντων με φυσιολογική SWE παρουσίαζαν σοβαρή νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα (στάδιο A3). (Πίνακας 3.7)

Πίνακας 3.7. Σύγκριση LSM (SWE) με ActiTest

Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver		ActiTest			
		A0: 0,00-0,17	A1: 0,18-0,52	A2: 0,53-0,62	A3:0,63-1,00
Normal: <6 kPa	Number	55	5	0	1
	%	90,2%	8,2%	0,0%	1,6%
F1: 6,1-7,9 kPa	Number	24	10	0	0
	%	70,6%	29,4%	0,0%	0,0%
F2: 8,0-9,4 kPa	Number	2	4	0	1
	%	28,6%	57,1%	0,0%	14,3%
F3: 9,5-12,4 kPa	Number	4	2	1	0
	%	57,1%	28,6%	14,3%	0,0%
F4: >12,5 kPa	Number	0	2	0	0
	%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%

Pearson Chi-Square=43,922; p value =0,001

Όσον αφορά την παρουσία στεατοηπατίτιδας (NASH) στους συμμετέχοντες με φυσιολογική SWE, μόνο το 1,8% είχε σοβαρή NASH (στάδιο N2). Ομοίως το 80% του πληθυσμού μας με ίνωση σταδίου F2, είχαν μέτριου προς σοβαρού σταδίου NASH (στάδια N2-N3). Τέλος μεταξύ των συμμετεχόντων με το πιο σοβαρό στάδιο ίνωσης με τη μέθοδο της SWE, το 50% είχε NASH σταδίου N2 και το υπόλοιπο 50% NASH σταδίου N3. (Πίνακας 3.8)

Πίνακας 3.8. Σύγκριση LSM (SWE) με NashTest 2

Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver		NashN			
		N0: 0,00-0,25	N1: 0,26-0,50	N2: 0,51-0,75	N3:0,76-1,00
Normal: <6 kPa	Count	14	26	16	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	24,6%	45,6%	28,1%	1,8%
F1: 6,1-7,9 kPa	Count	4	17	9	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	12,9%	54,8%	29,0%	3,2%
F2: 8,0-9,4 kPa	Count	0	1	2	2
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	0,0%	20,0%	40,0%	40,0%
F3: 9,5-12,4 kPa	Count	0	2	3	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	0,0%	33,3%	50,0%	16,7%
F4: >12,5 kPa	Count	0	0	1	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	0,0%	0,0%	50,0%	50,0%

Pearson Chi-Square= 27,398, p value =0,007

Ο Πίνακας 3.9. δείχνει τη σύγκριση της SWE και των πλέον χρησιμοποιούμενων βαθμομετρημένων συστημάτων και βιοδεικτών (του APRI Index, NAFLD Fibrosis score, BARD score, Fib-4 Index και Fibrotest) για την πρόβλεψη και σταδιοποίηση της ηπατικής ίνωσης.

Πίνακας 3.9. 2D SWE vs APRI Index, NAFLD Fibrosis score, BARD score, Fib-4 Index και FibroTest ως διαγνωστικές μέθοδοι ηπατικής ίνωσης

		LSM(2D SWE)				<i>P value</i>
		F0-F1	F2	F3	F4	
APRI Index						
<0,5 no fibrosis	N	96	5	7	1	0,001
	%	88,1%	4,6%	6,4%	0,9%	
0,5-0,7 some liver damage	N	1	1	0	0	
	%	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%	
0,7-1 significant fibrosis	N	0	1	0	1	
	%	0,0%	50,0%	0,0%	50,0%	
NAFLD Fibrosis score						
F0-F2: <-1,455	N	23	3	2	0	0,408
	%	82,1%	10,7%	7,1%	0,0%	
F2-F3: -1,455 - 0,675	N	63	4	5	1	
	%	86,3%	5,5%	6,8%	1,4%	
F3-F4: >0,675	N	11	0	0	1	
	%	91,7%	0,0%	0,0%	8,3%	
Fib-4 Index						
Normal: <0,68	N	20	2	1	0	0,658
	%	87,0%	8,7%	4,3%	0,0%	
F0-F2: 0,97 (0,69-1,37)	N	55	2	5	1	
	%	87,3%	3,2%	7,9%	1,6%	
F3-F4: 1,95 (1,38-3,08)	N	21	3	1	1	
	%	80,8%	11,5%	3,8%	3,8%	
BARD score						
Low risk (0-1)	N	8	0	0	0	0,701
	%	100,0 %	0,0%	0,0%	0,0%	

High risk (2-4)	N	89	7	7	2	0,921	
	%	84,8%	6,7%	6,7%	1,9%		
FibroTest							
F0-F1/F2	N	78	6	5	2		
	%	85,7%	6,6%	5,5%	2,2%		
F2-F4	N	17	1	1	0		
	%	89,5%	5,3%	5,3%	0,0%		

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι το FibroTest ήταν το πιο αξιόπιστο συγκριτικά με τους άλλους βιοδείκτες ($p=0,921$).

Ενδιαφέρον παρουσίασε όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10. και η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της LSM(SWE) μεταβλητής με το ActiTest ($r=0,405$, $p\leq 0,001$) και το NashTest2 ($r=0,299$, $p=0,002$).

Πίνακας 3.10. Συσχέτιση LSM (SWE) με ActiTest και NashTest2

		<i>Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver</i>
ActiTest	Correlation Coefficient	,405**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	111
NashN	Correlation Coefficient	,299**
	Sig. (2-tailed)	,002
	N	101

***. Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed).*

Σε γραμμική παλινδρόμηση φάνηκε ότι αύξηση των τιμών των δύο παραπάνω μεταβλητών αυξάνει τις τιμές της LSM(SWE) κατά 5,632 φορές ($p\leq 0,001$ CI 3,213-8,051) και 3,981 φορές ($p\leq 0,001$, CI 2,398-5,563) αντίστοιχα.

Συζήτηση

Η διαδερμική βιοψία ήπατος παραμένει το *gold standard* τόσο για τη διάγνωση της NASH όσο και για την επιβεβαίωση του σταδίου της ηπατικής ίνωσης. Ωστόσο, συχνά αποφεύγεται στην κλινική πράξη για διάφορους λόγους⁴⁰³ όπως το υψηλό κόστος και η έλλειψη αποδοχής τόσο από τους ασθενείς λόγω της επεμβατικής της φύσης και των πιθανών επιπλοκών όσο και από τους κλινικούς ιατρούς λόγω της έλλειψης εγκεκριμένης φαρμακευτικής αντιμετώπισης της NASH. Επιπλέον μία βιοψία είναι γνωστό ότι αντιπροσωπεύει το 1/50.000 του ηπατικού παρεγχύματος με αποτέλεσμα να είναι συχνή η υποεκτίμηση της σοβαρότητας της ηπατικής νόσου⁴⁰⁴. Για τους παραπάνω λόγους, στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί και αξιολογηθεί για τη διαγνωστική τους ακρίβεια μία σειρά από μη επεμβατικά μοντέλα ή βιοδείκτες προκειμένου να αντικατασταθεί η βιοψία ήπατος για τη διάγνωση της NASH και σταδιοποίηση της ηπατικής ίνωσης.

Με την παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε τη διαγνωστική αξία πέντε ευρέως χρησιμοποιούμενων βιοδεικτών των FibroTest, APRI Index, Fib-4 Index, NAFLD Fibrosis score και BARD score όσον αφορά την παρουσία ηπατικής ίνωσης σε σύγκριση με τη μέθοδο της Two Dimensional Shear Wave Elastography (2D SWE). Η 2D SWE αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική απεικόνισης που μελέτες έχουν δείξει ότι ομοίως με το FibroScan παρουσιάζει μέτρια έως υψηλή ακρίβεια στη διάγνωση προχωρημένης ίνωσης ή κίρρωσης (AROC 0,85-0,92 για στάδιο ίνωσης F2, AROC 0,88 - 0,95 για στάδιο ίνωσης F3, AROC 0,97 για στάδιο ίνωσης F4)⁴⁰⁵. Το FibroTest φάνηκε να είναι διαγνωστικά το πιο αξιόπιστο σε σχέση με τους άλλους βιοδείκτες στην πρόβλεψη της σοβαρότητας της ηπατικής ίνωσης ($p=0,921$, Πίνακας 3.9)

Διάφοροι λόγοι θα μπορούσαν να εξηγήσουν τη σχετικά χαμηλή διαγνωστική απόδοση των υπολοίπων βιοδεικτών στον πληθυσμό μας που αποτελείται αποκλειστικά από άτομα με ΣΔΤ2. Καταρχήν οι παθογενετικοί μηχανισμοί που προάγουν την εμφάνιση κι εξέλιξη της NASH σε άτομα με ΣΔΤ2 ενδέχεται να είναι μεταβολικά και βιοχημικά διαφορετικοί σε σύγκριση με το μη διαβητικό πληθυσμό που εμφανίζει NAFLD. Επιπλέον, πολλές παράμετροι που χρησιμοποιούνται στους παραπάνω βιοδείκτες όπως για παράδειγμα η ALT, η λιπιδαιμική εικόνα ή ακόμη και η γλυκόζη πλάσματος νηστείας, μπορούν να επηρεαστούν από τη διακύμανση του γλυκαιμικού ελέγχου που εξαρτάται από τις διατροφικές συνήθειες των ατόμων με ΣΔ, τη χρήση αντιδιαβητικής αγωγής, όπως επίσης και από τη χρήση φαρμάκων για τη ρύθμιση των λιπιδίων και της αρτηριακής υπέρτασης. Επίσης πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με ΣΔΤ2 ενδεχομένως να ανταποκρίνονται διαφορετικά στις φαρμακευτικές θεραπευτικές επιλογές (πχ πιογλιταζόνη) σε σύγκριση με άτομα με προδιαβήτη⁴⁰⁶. Τέλος το NAFLD Fibrosis score όπως και το BARD score χρησιμοποιούν ως παραμέτρους βαθμονόμησης την παρουσία ιστορικού ΣΔΤ2 ή υπεργλυκαιμίας για τον εντοπισμό ατόμων υψηλού κινδύνου

ανάπτυξης ηπατικής ίνωσης στο γενικό πληθυσμό. Είναι αμφίβολο λοιπόν αν θα μπορούσαμε να βασιστούμε σε αυτές τις παραμέτρους όταν τις χρησιμοποιούμε αποκλειστικά για άτομα με ΣΔΤ2. Το FibroTest έχει το πλεονέκτημα ότι δεν περιλαμβάνει γλυκαιμικές παραμέτρους κι αυτός ίσως να είναι ο λόγος υπεροχής του έναντι των άλλων διαγνωστικών βιοδεικτών.

Στη μελέτη μας ακόμη δείξαμε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της LSM(SWE) τόσο με το ActiTest ($r=0,405$, $p\leq 0,001$) όσο και με το NashTest2 ($r=0,299$, $p=0,002$). Ο συνδυασμός των δύο αυτών βιοδεικτών με το FibroTest ίσως να αποτελεί μία καλή επιλογή για τη βελτίωση συνολικά της διαγνωστικής ακρίβειας για τη διάγνωση της NASH αν αναλογιστεί κανείς τους πολύπλοκους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που τη χαρακτηρίζουν. Αξίζει στο σημείο αυτό όμως να σημειωθεί ότι το ActiTest και το NashTest2 έχουν σχεδιαστεί κι αξιολογηθεί κυρίως για ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C που παρουσιάζουν μεγαλύτερο φάσμα ιστολογικά επιβεβαιωμένης ηπατικής ίνωσης και σοβαρότερη νεκρωτική και φλεγμονώδη δραστηριότητα, σε σύγκριση πάντα με τα άτομα με ΣΔΤ2. Ωστόσο είναι πιθανό ο επιπολασμός της NAFLD στον πληθυσμό μας να είναι μεγαλύτερος από το γενικό διαβητικό πληθυσμό. Επίσης, ο πληθυσμός μας μπορεί να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε σύγκριση με άλλες εθνότητες όσον αφορά τη συσσώρευση ηπατικού λίπους. Το πιο ανησυχητικό παρά ταύτα εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι σχεδόν το 14% των συμμετεχόντων είχε ήδη μέτρια ως σημαντική ίνωση (F2-F4) χωρίς εμφανή κλινική ή εργαστηριακή ένδειξη, όπως άλλωστε φάνηκε και σε μία πρόσφατη μελέτη των Romina Lomonaco et al⁴⁰⁷.

Ωστόσο πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετοί περιορισμοί της τρέχουσας μελέτης. Πρώτον αποτελεί μια συγχρονική μελέτη παρατήρησης που μπορεί να παρέχει δεδομένα για πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της ηπατικής ίνωσης και των υπό μελέτη μεταβλητών, αλλά δεν μπορεί να εξηγήσει την υποκείμενη παθοφυσιολογία. Επίσης ο αριθμός των συμμετεχόντων στη μελέτη ήταν μικρός, επομένως τα αποτελέσματά μας θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με μεταγενέστερες μελέτες που θα περιλάβουν μεγαλύτερες σειρές ατόμων.

Επιπλέον όλοι οι διαγνωστικοί αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν (FibroTest, APRI Index, NAFLD Fibrosis score, BARD score, Fib-4 Index) έχουν χρησιμοποιηθεί κι αξιολογηθεί σε προηγούμενες μελέτες αρχικά σε πληθυσμούς με διάφορες ηπατικές παθήσεις όπως η αλκοολική στεατοηπατίτιδα και οι ιογενείς ηπατίτιδες Β και C⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ και μεταγενέστερα στη NAFLD⁴¹¹. Ωστόσο σε αυτές τις μελέτες μόνο το 30% του υπό μελέτη πληθυσμού είχαν διάγνωση ΣΔΤ2 και δεν μελετήθηκε η διαγνωστική αξία τους στην συγκεκριμένη υποομάδα των συμμετεχόντων. Οι Fernando Bril et al⁴¹². σε μια πρόσφατη μελέτη έδειξαν ότι οι παραπάνω διαγνωστικοί αλγόριθμοι / βιοδείκτες είχαν πολύ χαμηλή διαγνωστική ακρίβεια όταν εφαρμόστηκαν σε μεγάλο πληθυσμό ατόμων με ΣΔΤ2. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός όσον αφορά μέτριου έως σοβαρού σταδίου ηπατικής

ίνωσης σε άτομα με ΣΔΤ2 ήταν μικρότερος χρησιμοποιώντας αλγορίθμους με αιματολογικές παραμέτρους⁴¹³⁻⁴¹⁶ σε σύγκριση με αντίστοιχες μελέτες στον ίδιο πληθυσμό που χρησιμοποίησαν μεθόδους ελαστογραφίας τόσο στην Ευρώπη⁴¹⁴⁻⁴¹⁷ όσο και στην Ασία^{418,419}. Οι Romina Lomonaco et al⁴⁰⁷.σε μια πρόσφατη μελέτη υποστήριξαν την διαγνωστική εγκυρότητα μιας συνδυαστικής προσέγγισης χρησιμοποίησης αλγορίθμων με αιματολογικές παραμέτρους και ελαστογραφίας σε επίπεδο πρωτοβάθμιας υγείας.

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε η 2D Shear Wave Elastography (2D SWE) για την εκτίμηση της ηπατικής ίνωσης. Αν και πρόσφατη έρευνα έχει δείξει την ελάχιστη υπεροχή της έναντι του FibroScan στη διάγνωση διαφορετικών σταδίων ηπατικής ίνωσης⁴⁰⁵, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα κι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες επικύρωσης για να καθοριστεί με ακρίβεια πόσο οι κατά σειρά μετρήσεις αντικατοπτρίζουν την εξέλιξη της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Τέλος λόγω έλλειψης βιοψιών ήπατος, γνωρίζουμε ότι τα αποτελέσματά μας θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή και να επιβεβαιωθούν με μελέτες που θα περιλαμβάνουν ιστολογική αξιολόγηση στο μέλλον.

3.3. Συσχετίσεις PNPLA3 rs 738409 και TM6SF2 με κλινικές, εργαστηριακές παραμέτρους ατόμων με ΣΔΤ2, HS και ηπατική ίνωση

Οι τρανσαμινάσες AST και ALT όπως επίσης και η GGT και η ηπατική στεάτωση απέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών γονότυπων (Genotype) του PNPLA3 (Πίνακας 3.11). Ειδικότερα, τα άτομα με CC είχαν τις χαμηλότερες τιμές στους προαναφερόμενους δείκτες, σε σύγκριση με τα άτομα με CG και GG, όπου οι τιμές ήταν αυξημένες.

Πίνακας 3.11. Σύγκριση HS, κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων συμμετεχόντων στη μελέτη με Genotype PNPLA3 (CC; CG; GG)

		Genotype PNPLA3			Kruskal -Wallis H	P value
		CC	CG	GG		
Body Mass Index= weight(kg)/ height(m)	Median	102	104	104,0	2,782	0,249
	Mean (SD)	104,2 (13,3)	105,2 (107)	104,5 (8,6)		
Patient's waist circumference (cm)	Median	30,1	30,6	31,9	0,510	0,775
	Mean (SD)	30,4 (5,1)	30,6 (3,4)	32,8 (4,8)		

Patient's weight (kg)	Median	86	87,5	84,0	0,242	0,886
	Mean (SD)	87,9 (17,9)	87,8 (11,1)	89,2 (15,4)		
Platelets (x1000)	Median	250	252,0	237,0	0,354	0,838
	Mean (SD)	261,1 (78,8)	254,2 (54,1)	243,5 (65,4)		
Serum AST UNL <40 IU/L	Median	18	19,0	27,0	6,903	0,032
	Mean (SD)	19,6 (7,2)	22,0 (9,4)	29,4 (13,6)		
Serum ALT UNL <38 IU/L	Median	19	24,0	36,0	9,750	0,008
	Mean (SD)	24,5 (16,1)	29,4 (19,7)	39,2 (19,3)		
Serum SAP UNL 92 IU/L	Median	62	66,0	66,0	2,540	0,281
	Mean (SD)	66,9 (28,9)	71,5 (23,3)	67,2 (11,2)		
Serum GGT UNL 63 IU/L (males), 35 IU/L (females)	Median	22	25,0	30,0	7,288	0,026
	Mean (SD)	28,2 (24,3)	43,1 (81)	51,3 (41,4)		
Serum glucose (mg/dL)	Median	121	124,0	125,0	0,081	0,960
	Mean (SD)	129,2 (39,9)	127,6 (29,8)	123,0 (20,7)		
Serum cholesterol (mg/dL)	Median	155	161,0	148,0	0,026	0,987
	Mean (SD)	159,8 (42,6)	154,5 (29,9)	155,8 (27,5)		
HDL cholesterol (mg/dL)	Median	46	43,2	46,0	0,049	0,976
	Mean (SD)	46,2 (12,6)	45,3 (9,8)	45,6 (6,8)		
LDL cholesterol (mg/dL)	Median	87	87,5	88,0	0,075	0,963
	Mean (SD)	91,9 (34,8)	87,5 (22,9)	87,5(22)		
VLDL cholesterol (mg/dL)	Median	24	24,0	24,0	0,434	0,805
	Mean (SD)	30,9 (18,9)	27,9 (12,8)	24,7 (9,1)		

Serum triglycerides (mg/dL)	Median	121	118,0	108,0	0,756	0,685
	Mean (SD)	145 (83,4)	133,2 (61)	115,1 (32,6)		
Serum ApoA1 (g/L)	Median	143	131,0	135,0	0,975	0,614
	Mean (SD)	140,6 (26,7)	136,5 (21,8)	142,0 (25,8)		
Glycosylated A1c hemoglobin (%)	Median	6,6	6,6	6,9	4,318	0,115
	Mean (SD)	6,7 (0,7)	6,7 (0,6)	7,1 (0,5)		
Serum albumins (g/dL)	Median	4,4	4,5	4,3	1,404	0,496
	Mean (SD)	4,4 (0,3)	4,4 (0,2)	4,4 (0,3)		
Total serum proteins (g/dL)	Median	7,2	7,3	7,3	3,059	0,217
	Mean (SD)	7,2 (0,5)	8,8 (9,7)	7,2 (0,4)		
International normalization ratio	Median	1,0	1,0	1,0	0,152	0,927
	Mean (SD)	1 (0,1)	1,1 (0,4)	1,0 (0,1)		
Serum haptoglobin (g/L)	Median	151	142,0	189,0	2,477	0,290
	Mean (SD)	171,4 (124,7)	155,4 (85,9)	182,6 (61,9)		
Serum ferritin (g/dL)	Median	60,7	61,3	68,0	0,159	0,924
	Mean (SD)	343,6 (1702,1)	362,6 (1866,9)	81,7 (67)		
HS	Median	5,03	11,69	14,88	13,227	0,001
	Mean (SD)	7,87 (5,45)	11,83 (8,14)	14,11 (7,40)		

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα εάν ομαδοποιηθούν οι γονότυποι CC & CG (Πίνακας 3.12). Τα άτομα με GG είχαν υψηλότερες μέσες τιμές όπως και διάμεσο AST, ALT, GGT και HS. Επιπλέον, η HbA1c (%) αποδείχθηκε υψηλότερη στα άτομα με γονότυπο GG σε σύγκριση με τα άτομα με γονότυπους CC & CG.

Πίνακας 3.12. Σύγκριση HS, κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων συμμετεχόντων στη μελέτη με Genotype PNPLA3 (CC & CG; GG)

		<i>Genotype PNPLA3</i>		<i>Mann-Whitney U</i>	<i>P value</i>
		CC & CG	GG		
Body Mass Index = weight(kg)/height(m)	Median	30,30	31,90	508,0	0,113
	Mean (SD)	30,48 (4,51)	32,76 (4,83)		
Patient's waist circumference (cm)	Median	103,00	104,00	684,5	0,926
	Mean (SD)	104,63 (12,27)	104,54 (8,5)		
Patient's weight (kg)	Median	87,00	84,00	669,0	0,823
	Mean (SD)	87,84 (15,55)	89,23 (15,43)		
Platelets (x1000)	Median	250,00	237,00	625,0	0,552
	Mean (SD)	258,38 (69,93)	243,54 (65,37)		
Serum AST UNL < 40 IU/L	Median	18,50	27,00	416,0	0,020
	Mean (SD)	20,48 (8,17)	29,38 (13,63)		
Serum ALT UNL < 38 IU/L	Median	20,00	36,00	408,0	0,017
	Mean (SD)	26,40 (17,67)	39,15 (19,34)		
Serum SAP UNL 92 IU/L	Median	63,00	66,00	625,5	0,554
	Mean (SD)	68,70 (26,84)	67,15 (11,19)		
Serum GGT UNL 63 IU/L (males), 35 IU/L (females)	Median	24,00	30,00	452,0	0,043
	Mean (SD)	33,99 (53,95)	51,31 (41,93)		
Serum glucose (mg/dL)	Median	121,00	125,00	656,5	0,782
	Mean (SD)	128,59 (36,17)	123,00 (20,72)		
Serum cholesterol (mg/dL)	Median	156,50	148,00	670,0	0,871
	Mean (SD)	157,76 (38,11)	155,85 (27,47)		

HDL cholesterol (mg/dL)	Median	44,00	46,00	672,0	0,843
	Mean (SD)	45,84 (11,53)	45,62 (6,84)		
LDL cholesterol (mg/dL)	Median	87,00	88,00	685,0	0,929
	Mean (SD)	90,16 (30,65)	87,46 (22,03)		
VLDL cholesterol (mg/dL)	Median	24,00	24,00	622,5	0,537
	Mean (SD)	29,73 (16,75)	24,69 (9,13)		
Serum triglycerides (mg/dL)	Median	120,00	108,00	594,5	0,394
	Mean (SD)	140,37 (75,33)	115,08 (32,60)		
Serum ApoA1 (g/L)	Median	136,50	135,00	658,5	0,795
	Mean (SD)	138,98 (24,91)	142,00 (25,83)		
Glycosylated A1c hemoglobin (%)	Median	6,62	6,93	449,5	0,038
	Mean (SD)	6,67 (0,66)	7,07 (0,51)		
Serum albumins (g/dL)	Median	4,50	4,30	636,0	0,612
	Mean (SD)	4,41 (0,29)	4,38 (0,31)		
Total serum proteins (g/dL)	Median	7,30	7,26	624,0	0,545
	Mean (SD)	7,83 (6,08)	7,16 (0,45)		
International normalization ratio	Median	1,00	1,00	687,0	0,940
	Mean (SD)	1,02 (0,26)	0,97 (0,10)		
Serum haptoglobin (g/L)	Median	148,00	189,00	517,5	0,144
	Mean (SD)	165,19 (111,17)	182,55 (61,88)		
Serum ferritin (g/dL)	Median	60,77	68,00	681,0	0,903
	Mean (SD)	351,05 (175,98)	81,68 (66,95)		
HS	Median	7	14,88	404,0	0,014
	Mean (SD)	9,42 (6,89)	14,11 (7,40)		

Σε παρόμοιες συσχετίσεις με τις παραπάνω δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονότυπων (Genotype) TM6SF2 (GG; GA; AA) της HS και των κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων των συμμετεχόντων στη μελέτη.

Πίνακας 3.13. Σύγκριση HS, κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων συμμετεχόντων στη μελέτη με Genotype TM6SF2 (GG;GA;AA)

		<i>Genotype TM6SF2</i>			<i>Kruskal-Wallis H</i>	<i>P value</i>
		GG	GA	AA		
Body Mass Index = weight (kg)/height (m)	Median	30,51	30,70	27,60	1,287	0,525
	Mean (SD)	30,81 (4,71)	30,55 (3,78)	27,60 (2,26)		
Patient's waist circumference (cm)	Median	103,00	110,00	94,50	2,638	0,267
	Mean (SD)	104,68 (12,07)	105,69 (11,06)	94,50 (2,12)		
Patient's weight (kg)	Median	87,00	92,00	87,00	0,002	0,999
	Mean (SD)	88,22 (15,43)	86,31 (16,87)	87,00 (16,97)		
Platelets (x1000)	Median	250,00	231,00	334,50	2,872	0,238
	Mean (SD)	256,50 (66,29)	247,00 (89,22)	334,50 (79,90)		
Serum AST UNL < 40 IU/L	Median	19,00	20,00	22,00	0,458	0,795
	Mean (SD)	21,36 (8,94)	22,15 (12,59)	22,00 (4,24)		
Serum ALT UNL < 38 IU/L	Median	22,00	17,00	29,00	1,496	0,473
	Mean (SD)	28,16 (18,28)	24,62 (18,71)	29,00 (19,80)		
Serum SAP UNL 92 IU/L	Median	64,00	60,00	59,00	0,525	0,769
	Mean (SD)	69,03 (26,14)	66,00 (23,27)	59,00 (2,83)		
Serum GGT UNL 63 IU/L (males), 35 IU/L (females)	Median	24,50	26,00	20,50	0,489	0,783
	Mean (SD)	37,48 (56,24)	25,46 (11,25)	20,50 (12,02)		

Serum glucose (mg/dL)	Median	124,50	117,00	173,00	5,053	0,080
	Mean (SD)	128,15 (34,47)	119,69 (35,30)	173,00 (24,04)		
Serum cholesterol (mg/dL)	Median	155,00	158,00	137,50	1,428	0,490
	Mean (SD)	158,89 (37,35)	149,92 (36,41)	137,50 (16,26)		
HDL cholesterol (mg/dL)	Median	46,00	42,00	47,50	0,115	0,944
	Mean (SD)	45,92 (10,69)	44,77 (14,35)	47,50 (16,26)		
LDL cholesterol (mg/dL)	Median	88,00	85,00	70,00	1,537	0,464
	Mean (SD)	90,94 (30,62)	84,23 (22,70)	70,00 (21,21)		
VLDL cholesterol (mg/dL)	Median	24,00	25,00	24,50	0,365	0,833
	Mean (SD)	29,11 (16,37)	30,46 (15,47)	24,50 (14,85)		
Serum triglycerides (mg/dL)	Median	116,00	130,00	136,00	0,205	0,902
	Mean (SD)	137,27 (72,94)	140,85 (73,60)	136,00 (56,57)		
Serum ApoA1 (g/L)	Median	138,00	122,00	134,50	1,257	0,533
	Mean (SD)	140,22 (23,58)	132,77 (35,01)	134,50 (24,75)		
Glycosylated A1c hemoglobin (%)	Median	6,67	6,76	7,57	3,264	0,196
	Mean (SD)	6,70 (0,66)	6,72 (0,57)	7,57 (0,38)		
Serum albumins (g/dL)	Median	4,40	4,50	4,70	2,216	0,330
	Mean (SD)	4,41 (0,27)	4,31 (0,40)	4,70 (0,28)		

Total serum proteins (g/dL)	Median	7,30	7,30	7,45	1,460	0,482
	Mean (SD)	7,85 (6,14)	7,06 (0,45)	7,45 (0,35)		
International normalization ratio	Median	1,00	0,90	0,97	1,823	0,402
	Mean (SD)	1,02 (0,27)	0,94 (0,07)	0,97 (0,04)		
Serum haptoglobin (g/L)	Median	148,00	189,00	136,60	1,695	0,428
	Mean (SD)	158,93 (75,65)	237,08 (236,51)	136,60 (117,95)		
Serum ferritin (g/dL)	Median	60,70	78,30	43,31	1,138	0,566
	Mean (SD)	357,99 (1776,20)	73,03 (46,12)	43,31 (45,69)		
HS	Median	8,02	5	12,35	0,926	0,629
	Mean (SD)	10,10 (7,08)	8,15 (6,18)	12,35 (14,78)		

Η συσχέτιση της ταυτόχρονης παρουσίας των PNPLA3 & TM6SF2 με την HS και των κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων των ατόμων που πήραν μέρος στη μελέτη ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στον δείκτη AST και στην HS (Πίνακας 3.14). Οι συμμετέχοντες με φυσιολογικό γονότυπο (Normal Genotype) για PNPLA3 ή TM6SF2 και ετεροζυγωτία (Heterozygosity) ως προς την παρουσία παθολογικού αλληλίου για το ένα ή το άλλο γονίδιο αντίστοιχα, αξιολογήθηκαν με 18 και 19 διάμεσο αντίστοιχα στον δείκτη AST, ενώ οι συμμετέχοντες με ομοζυγωτία (Homozygosity) ως προς το παθολογικό αλληλίο για το ένα ή το άλλο γονίδιο αξιολογήθηκαν με διάμεσο 25.

Ομοίως, διαφορά βρέθηκε και στην ηπατική στεάτωση, όπου τα άτομα με φυσιολογικούς γονότυπους PNPLA3 ή TM6SF2 και ετεροζυγωτία ως προς το ένα ή το άλλο παθολογικό αλληλίο για κάθε γονίδιο αξιολογήθηκαν με 6,12 και 10,20 διάμεσο αντίστοιχα, ενώ τα άτομα με ομοζυγωτία ως προς το παθολογικό αλληλίο για κάθε γονίδιο αξιολογήθηκαν με διάμεσο 12,74.

Πίνακας 3.14. Σύγκριση HS, κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων συμμετεχόντων στη μελέτη με PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Heterozygosity; Homozygosity)

		<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>			<i>Kruskal-Wallis H</i>	<i>P value</i>
		Normal PNPLA3 or TM6SF2	Heterozygosity of either genos	Homozygosity of either genos		
Body Mass Index = weight (kg)/height (m)	Median	102,00	104,00	103,50	1,248	0,536
	Mean (SD)	104,65 (13,45)	104,96 (11,38)	103,61 (8,01)		
Patient's waist circumference (cm)	Median	30,10	30,80	30,21	0,284	0,867
	Mean (SD)	30,46 (5,25)	30,64 (3,75)	31,75 (4,48)		
Patient's weight (kg)	Median	85,00	88,00	83,50	0,200	0,905
	Mean (SD)	88,22 (17,82)	87,70 (13,14)	88,06 (14,17)		
Platelets (x1000)	Median	251,00	246,00	251,50	0,190	0,910
	Mean (SD)	260,16 (74,35)	255,45 (63,62)	249,89 (71,10)		
Serum AST UNL < 40 IU/L	Median	18,00	19,00	25,00	7,033	0,030
	Mean (SD)	19,33 (7,55)	21,25 (6,91)	28,50 (14,93)		
Serum ALT UNL < 38 IU/L	Median	19,00	22,00	35,50	5,895	0,052
	Mean (SD)	24,95 (16,76)	27,39 (17,63)	37,50 (21,48)		
Serum SAP UNL 92 IU/L	Median	63,00	64,00	66,00	1,444	0,486
	Mean (SD)	67,62 (30,18)	69,49 (23,50)	68,83 (13,69)		

Serum GGT UNL 63 IU/L (males), 35 IU/L (females)	Median	22,00	25,50	29,50	4,124	0,127
	Mean (SD)	29,49 (25,96)	40,39 (76,77)	43,89 (37,29)		
Serum glucose (mg/dL)	Median	121,00	122,50	126,00	0,107	0,948
	Mean (SD)	128,58 (39,26)	127,28 (32,73)	127,94 (25,72)		
Serum cholesterol (mg/dL)	Median	155,00	159,50	148,50	0,238	0,888
	Mean (SD)	161,16 (44,16)	154,91 (30,36)	153,28 (28,10)		
HDL cholesterol (mg/dL)	Median	46,00	43,30	46,00	0,022	0,989
	Mean (SD)	46,22 (12,04)	45,67 (11,01)	45,00 (8,43)		
LDL cholesterol (mg/dL)	Median	91,00	86,00	86,50	0,565	0,754
	Mean (SD)	93,58 (37,09)	86,85 (21,07)	86,39 (23,50)		
VLDL cholesterol (mg/dL)	Median	24,00	24,00	24,50	0,337	0,845
	Mean (SD)	31,05 (19,41)	28,55 (13,75)	25,11 (9,29)		
Serum triglycerides (mg/dL)	Median	116,00	120,00	112,50	0,408	0,815
	Mean (SD)	143,75 (84,38)	137,74 (67,63)	118,67 (32,82)		
Serum ApoA1 (g/L)	Median	143,00	132,00	134,50	0,789	0,674
	Mean (SD)	141,20 (24,58)	137,17 (25,52)	139,00 (25,34)		
Glycosylated A1c hemoglobin (%)	Median	6,51	6,66	7,11	5,191	0,075
	Mean (SD)	6,64 (0,73)	6,68 (0,55)	7,04 (0,60)		

Serum albumins (g/dL)	Median	4,40	4,50	4,40	0,628	0,730
	Mean (SD)	4,40 (0,28)	4,41 (0,30)	4,41 (0,30)		
Total serum proteins (g/dL)	Median	7,20	7,30	7,23	2,437	0,296
	Mean (SD)	7,22 (0,52)	8,61 (9,16)	7,18 (0,42)		
International normalization ratio	Median	1,00	1,00	0,97	1,152	0,562
	Mean (SD)	1,01 (0,15)	1,04 (0,37)	0,97 (0,08)		
Serum haptoglobin (g/L)	Median	146,00	150,00	166,50	1,223	0,543
	Mean (SD)	154,24 (67,44)	181,57 (150,09)	169,36 (63,71)		
Serum ferritin (g/dL)	Median	60,70	59,12	71,81	0,972	0,615
	Mean (SD)	394,11 (1848,36)	331,19 (1764,10)	76,82 (58,93)		
HS	Median	6,12	10,20	12,74	8,439	0,015
	Mean (SD)	7,90 (5,22)	11,03 (7,87)	13,26 (8,20)		

Διαφορά παρατηρήθηκε στον δείκτη AST και στην ηπατική στεάτωση όταν ο υπό μελέτη πληθυσμός κατηγοριοποιηθεί ως προς τα γονίδια PNPLA3 & TM6SF2 σε φυσιολογικούς, ετερόζυγους ή ομόζυγους για τα αντίστοιχα παθολογικά αλληλία γονότυπους (Πίνακας 3.15). Οι συμμετέχοντες με φυσιολογικά αλληλία αξιολογήθηκαν με διάμεσο 18 στον δείκτη AST, ενώ οι αντίστοιχοι με ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία για τα παθολογικά αλληλία αξιολογήθηκαν με διάμεσο 20. Επίσης, τα άτομα με φυσιολογικούς γονότυπους αξιολογήθηκαν με διάμεσο 6,39 στην ηπατική στεάτωση, σε αντίθεση με τα άτομα με ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία ως προς την παρουσία παθολογικού αλληλίου που αξιολογήθηκαν με διάμεσο 10,40.

Πίνακας 3.15. Σύγκριση HS, κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων συμμετεχόντων στη μελέτη με PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Homozygosity or Heterozygosity)

		<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Mann-Whitney U</i>	<i>P value</i>
		Normal condition	Homozygosity or heterozygosity for either PNPLA3 or TM6SF2		
Body Mass Index = weight (kg)/height (m)	Median	102,50	104,00	1681,5	0,541
	Mean (SD)	105,14 (13,40)	104,13 (10,38)		
Patient's waist circumference (cm)	Median	30,20	30,61	1762,0	0,850
	Mean (SD)	30,58 (5,18)	30,86 (3,98)		
Patient's weight (kg)	Median	85,50	87,50	1781,0	0,929
	Mean (SD)	88,53 (17,65)	87,48 (13,26)		
Platelets (x1000)	Median	250,50	250,00	1783,5	0,939
	Mean (SD)	258,12 (73,28)	255,52 (66,03)		
Serum AST UNL < 40 IU/L	Median	18,00	20,00	1388,5	0,043
	Mean (SD)	19,53 (7,46)	23,28 (10,47)		
Serum ALT UNL < 38 IU/L	Median	19,00	23,00	1455,0	0,095
	Mean (SD)	25,28 (16,41)	30,18 (19,61)		
Serum SAP UNL 92 IU/L	Median	63,00	64,00	1679,5	0,534
	Mean (SD)	68,71 (30,24)	68,37 (20,55)		

Serum GGT UNL 63 IU/L (males), 35 IU/L (females)	Median	23,00	26,00	1505,0	0,160
	Mean (SD)	29,62 (25,30)	41,84 (69,36)		
Serum glucose (mg/dL)	Median	121,00	125,00	1716,5	0,780
	Mean (SD)	128,26 (38,53)	127,72 (31,15)		
Serum cholesterol (mg/dL)	Median	155,00	156,00	1748,0	0,911
	Mean (SD)	160,29 (43,25)	154,95 (30,03)		
HDL cholesterol (mg/dL)	Median	46,00	43,65	1751,5	0,807
	Mean (SD)	46,36 (11,79)	45,31 (10,46)		
LDL cholesterol (mg/dL)	Median	90,00	86,50	1731,5	0,727
	Mean (SD)	92,59 (36,46)	87,32 (21,77)		
VLDL cholesterol (mg/dL)	Median	24,00	24,00	1754,0	0,817
	Mean (SD)	30,67 (18,99)	27,79 (12,94)		
Serum triglycerides (mg/dL)	Median	114,50	121,00	1763,0	0,854
	Mean (SD)	141,57 (82,70)	133,95 (61,43)		
Serum ApoA1 (g/L)	Median	142,50	133,00	1646,0	0,513
	Mean (SD)	140,66 (24,50)	138,03 (25,44)		
Glycosylated A1c hemoglobin (%)	Median	6,53	6,78	1540,5	0,176
	Mean (SD)	6,64 (0,73)	6,78 (0,56)		

Serum albumins (g/dL)	Median	4,40	4,50	1671,0	0,501
	Mean (SD)	4,40 (0,27)	4,41 (0,30)		
Total serum proteins (g/dL)	Median	7,23	7,30	1634,0	0,388
	Mean (SD)	7,23 (0,51)	8,25 (7,98)		
International normalization ratio	Median	1,00	1,00	1609,5	0,298
	Mean (SD)	1,00 (0,14)	1,02 (0,32)		
Serum haptoglobin (g/L)	Median	148,50	150,00	1642,0	0,500
	Mean (SD)	155,66 (66,23)	177,96 (134,31)		
Serum ferritin (g/dL)	Median	60,77	61,34	1589,0	0,272
	Mean (SD)	377,62 (1800,47)	269,72 (1537,02)		
HS	Median	6,39	10,40	1362,0	0,022
	Mean (SD)	8,30 (5,65)	11,46 (7,93)		

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του γονιδίου PNPLA3 (CC;CG;GG) και του μεταβολικού συνδρόμου ($p=0,432$) (Πίνακας 3.16) ακόμη κι όταν οι συμμετέχοντες στη μελέτη ομαδοποιηθούν σε φυσιολογικούς και έχοντες ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία ως προς το παθολογικό αλληλίο ($p=0,619$) (Πίνακας 3.17).

Πίνακας 3.16. Σύγκριση του PNPLA3 με το μεταβολικό σύνδρομο

<i>Genotype PNPLA3</i>		<i>Metabolic syndrome</i>	
		<i>Absent</i>	<i>Present</i>
CC	Count	2	63
	% within Genotype PNPLA3	3,1%	96,9%
	% within Metabolic syndrome	100,0%	53,4%
CG	Count	0	42
	% within Genotype PNPLA3	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	35,6%
GG	Count	0	13
	% within Genotype PNPLA3	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	11,0%

Pearson Chi-Square=1,721; p value=0,423 (>0,05)

Πίνακας 3.17. Σύγκριση του PNPLA3 (CC & CG ; GG) με το μεταβολικό σύνδρομο

<i>PNPLA3</i>		<i>Metabolic syndrome</i>	
		<i>Absent</i>	<i>Present</i>
CC+CG	Count	2	105
	% within pnpla3.2cat	1,9%	98,1%
	% within Metabolic syndrome	100,0%	89,0%
GG	Count	0	13
	% within pnpla3.2cat	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	11,0%

Pearson Chi-Square =0,247; p value=0,619 (>0,05)

Ομοίως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του γονιδίου TM6SF2 (GG;GA;AA) και του μεταβολικού συνδρόμου ($p=0,865$) (Πίνακας 3.18.).

Πίνακας 3.18. Σύγκριση του TM6SF2 με το μεταβολικό σύνδρομο

<i>Genotype TM6SF2</i>		<i>Metabolic syndrome</i>	
		<i>Absent</i>	<i>Present</i>
GG	Count	2	103
	% within Genotype TM6SF2	1,9%	98,1%
	% within Metabolic syndrome	100,0%	87,3%
GA	Count	0	13
	% within Genotype TM6SF2	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	11,0%
AA	Count	0	2
	% within Genotype TM6SF2	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	1,7%

Pearson Chi-Square =0,291; p value = 0,865 (>0,05)

Επίσης όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.19. δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, ακόμη κι αν ομαδοποιηθούν οι συμμετέχοντες στη μελέτη με βάση την παρουσία και των δύο γονιδίων σε φυσιολογική, ετερόζυγη ή ομόζυγη μορφή ως προς την παρουσία παθολογικών αλληλίων για το ένα ή το άλλο γονίδιο, μεταξύ των PNPLA3 & TM6SF2 και του μεταβολικού συνδρόμου ($p=0,301$).

Πίνακας 3.19. Σύγκριση PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Heterozygosity; Homozygosity) με το μεταβολικό σύνδρομο

<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Metabolic syndrome</i>	
		<i>Absent</i>	<i>Present</i>
Normal PNPLA3 or TM6SF2	Count	2	53
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	3,6%	96,4%
	% within Metabolic syndrome	100,0%	44,9%
Heterozygosity of either genos	Count	0	47
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	39,8%
Homozygosity of either genos	Count	0	18
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	15,3%

Pearson Chi-Square =2,404; p value = 0,301 (>0,05)

Επίσης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονιδίων PNPLA3 & TM6SF2, ακόμη και όταν οι συμμετέχοντες ομαδοποιηθούν σε δύο υποκατηγορίες φυσιολογικοί κι ομόζυγοι ή ετερόζυγοι ως προς την παρουσία παθολογικού αλληλίου για το ένα ή το άλλο αντίστοιχα γονίδιο, και του μεταβολικού συνδρόμου ($p=0,140$) (Πίνακας 3.20).

Πίνακας 3.20. Σύγκριση PNPLA3 & TM6SF2 (Normal ; Homozygosity or Heterozygosity) με το μεταβολικό σύνδρομο

<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Metabolic syndrome</i>	
		<i>Absent</i>	<i>Present</i>
Normal condition	Count	2	56
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	3,4%	96,6%
	% within Metabolic syndrome	100,0%	47,5%
Homozygosity or heterozygosity for either PNPLA3 or TM6SF2	Count	0	62
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	0,0%	100,0%
	% within Metabolic syndrome	0,0%	52,5%

Pearson Chi-Square = 2,174; p value = 0,140 (>0,05)

Ομοίως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του φύλου και του γονιδίου PNPLA3 (CC; CG; GG) ($p=0,172$) (Πίνακας 3.21.) ακόμη κι αν οι συμμετέχοντες στη μελέτη ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες CC & CG; GG ($p=0,068$) (Πίνακας 3.22).

Πίνακας 3.21. Σύγκριση PNPLA3 (CC; CG; GG) με το φύλο

Genotype PNPLA3		Patient's sex	
		Male	Female
CC	Count	43	22
	% within Genotype PNPLA3	66,2%	33,8%
	% within Patient's sex	58,1%	47,8%
CG	Count	26	16
	% within Genotype PNPLA3	61,9%	38,1%
	% within Patient's sex	35,1%	34,8%
GG	Count	5	8
	% within Genotype PNPLA3	38,5%	61,5%
	% within Patient's sex	6,8%	17,4%

Pearson Chi-Square = 3,516; p value = 0,172 (>0,05)

Πίνακας 3.22. Σύγκριση PNPLA3 (CC& CG; GG) με το φύλο

PNPLA3		Patient's sex	
		Male	Female
CC+CG	Count	69	38
	% within pnpla3.2cat	64,5%	35,5%
	% within Patient's sex	93,2%	82,6%
GG	Count	5	8
	% within pnpla3.2cat	38,5%	61,5%
	% within Patient's sex	6,8%	17,4%

Pearson Chi-Square =3,321; **p value = 0,068** (>0,05)

Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του φύλου και του γονιδίου TM6SF2 ($p=0,943$) όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.23.

Πίνακας 3.23. Σύγκριση TM6SF2 με το φύλο

Genotype TM6SF2		Patient's sex	
		Male	Female
GG	Count	65	40
	% within Genotype TM6SF2	61,9%	38,1%
	% within Patient's sex	87,8%	87,0%
GA	Count	8	5
	% within Genotype TM6SF2	61,5%	38,5%
	% within Patient's sex	10,8%	10,9%
AA	Count	1	1
	% within Genotype TM6SF2	50,0%	50,0%
	% within Patient's sex	1,4%	2,2%

Pearson Chi-Square =0,118; **p value = 0,943** (>0,05)

Ομοίως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του φύλου και της ταυτόχρονης συσχέτισης και με τα δύο γονίδια PNPLA3 & TM6SF2 είτε οι συμμετέχοντες χωριστούν σε τρεις υποομάδες (Normal; Heterozygosity; Homozygosity) (Πίνακας 3.24) ($p=0,092$) είτε σε δύο (Normal; Heterozygosity / Homozygosity) (Πίνακας 3.25) ($p=0,224$) με βάση τους γενοτύπους των δύο γονιδίων και την παρουσία παθολογικού αλληλίου για το κάθε γονίδιο.

Πίνακας 3.24. Σύγκριση PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Heterozygosity; Homozygosity) με το φύλο

<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Patient's sex</i>	
		<i>Male</i>	<i>Female</i>
Normal PNPLA3 or TM6SF2	Count	37	18
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	67,3%	32,7%
	% within Patient's sex	50,0%	39,1%
Heterozygosity of either genos	Count	30	17
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	63,8%	36,2%
	% within Patient's sex	40,5%	37,0%
Homozygosity of either genos	Count	7	11
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	38,9%	61,1%
	% within Patient's sex	9,5%	23,9%

Pearson Chi-Square =4,775; p value =0,092 (>0,05)

Πίνακας 3.25. Σύγκριση PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Homozygosity / Heterozygosity) με το φύλο

<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Patient's sex</i>	
		<i>Male</i>	<i>Female</i>
Normal condition	Count	39	19
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	67,2%	32,8%
	% within Patient's sex	52,7%	41,3%
Homozygosity or heterozygosity for either PNPLA3 or TM6SF2	Count	35	27
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	56,5%	43,5%
	% within Patient's sex	47,3%	58,7%

Pearson Chi-Square =1,476; p value = 0,224 (>0,05)

Τέλος όπως φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των γονιδίων PNPLA3, TM6SF2 με την ηπατική ίνωση όπως αυτή ορίστηκε στη μελέτη τόσο με το βιοδείκτη FibroTest όσο και με την LSM (SWE).

Πίνακας 3.26. Σύγκριση TM6SF2 (GG; GA; AA) με FibroTest και LSM (SWE)

<i>Genotype TM6SF2</i>		<i>Fibrotest</i>	<i>Liver stiffness measurement (kPa)</i>
GG	Mean	0,30	6,75
	N	102,00	97,00
	Std. Deviation	0,20	2,03
	Median	0,24	6,40
GA	Mean	0,26	6,08
	N	12,00	13,00
	Std. Deviation	0,18	1,19
	Median	0,26	5,80
AA	Mean	0,45	4,95
	N	2,00	2,00
	Std. Deviation	0,11	0,92
	Median	0,45	4,95
p value		0,346	0,232

Πίνακας 3.27. Σύγκριση PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Heterozygosity; Homozygosity) με FibroTest και LSM (SWE)

<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Fibrotest</i>	<i>Liver stiffness measurement (kPa)</i>
Normal PNPLA3 or TM6SF2	Mean	0,28	6,48
	N	55,00	51,00
	Std. Deviation	0,17	1,70
	Median	0,24	6,20
Heterozygosity of either genos	Mean	0,29	6,70
	N	43,00	43,00
	Std. Deviation	0,23	1,96
	Median	0,21	6,70
Homozygosity of either genos	Mean	0,35	6,92
	N	18,00	18,00
	Std. Deviation	0,18	2,61
	Median	0,32	5,95
p value		0,205	0,928

Πίνακας 3.28. Σύγκριση PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Homozygosity/Heterozygosity) με FibroTest και LSM (SWE)

<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		<i>Fibrotest</i>	<i>Liver stiffness measurement (kPa)</i>
Normal condition	Mean	0,27	6,45
	N	58,00	54,00
	Std. Deviation	0,17	1,67
	Median	0,24	6,15
Homozygosity or heterozygosity for either PNPLA3 or TM6SF2	Mean	0,31	6,81
	N	58,00	58,00
	Std. Deviation	0,22	2,19
	Median	0,25	6,60
p value		0,623	0,562

Ομοίως παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν κι οι παρακάτω αναλύσεις, με τους συμμετέχοντες στη μελέτη να ταξινομούνται στις υποκατηγορίες ίνωσης από F0: 0,00-0,21 έως F4: 0,75-1,00 κατά FibroTest.

Πίνακας 3.29. Σύγκριση FibroTest με TM6SF2 (GG; GA; AA)

<i>FibroTest</i>		<i>Genotype TM6SF2</i>		
		<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>
F0: 0,00-0,21	Count	43	5	0
	% within FibroTest	89,6%	10,4%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	42,2%	41,7%	0,0%
F0-F1: 0,22-0,27	Count	14	1	0
	% within FibroTest	93,3%	6,7%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	13,7%	8,3%	0,0%
F1: 0,28-0,31	Count	7	2	0
	% within FibroTest	77,8%	22,2%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	6,9%	16,7%	0,0%
F1-F2: 0,32-0,48	Count	21	3	1
	% within FibroTest	84,0%	12,0%	4,0%
	% within Genotype TM6SF2	20,6%	25,0%	50,0%
F2: 0,49-0,58	Count	3	0	1
	% within FibroTest	75,0%	0,0%	25,0%
	% within Genotype TM6SF2	2,9%	0,0%	50,0%
F3: 0,59-0,72	Count	10	1	0
	% within FibroTest	90,9%	9,1%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	9,8%	8,3%	0,0%
F3-F4: 0,73-0,74	Count	2	0	0
	% within FibroTest	100,0%	0,0%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	2,0%	0,0%	0,0%
F4: 0,75-1,00	Count	2	0	0
	% within FibroTest	100,0%	0,0%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	2,0%	0,0%	0,0%

Pearson Chi-Square = 17,522; p value = 0,229 (>0,05)

Πίνακας 3.30. Σύγκριση FibroTest με PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Heterozygosity; Homozygosity)

<i>FibroTest</i>		<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		
		<i>Normal PNPLA3 or TM6SF2</i>	<i>Heterozygosity of either genos</i>	<i>Homozygosity of either genos</i>
F0: 0,00-0,21	Count	24	21	3
	% within FibroTest	50,0%	43,8%	6,3%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	43,6%	48,8%	16,7%
F0-F1: 0,22-0,27	Count	7	3	5
	% within FibroTest	46,7%	20,0%	33,3%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	12,7%	7,0%	27,8%
F1: 0,28-0,31	Count	4	4	1
	% within FibroTest	44,4%	44,4%	11,1%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	7,3%	9,3%	5,6%
F1-F2: 0,32-0,48	Count	14	6	5
	% within FibroTest	56,0%	24,0%	20,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	25,5%	14,0%	27,8%
F2: 0,49-0,58	Count	3	0	1
	% within FibroTest	75,0%	0,0%	25,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	5,5%	0,0%	5,6%
F3: 0,59-0,72	Count	1	7	3
	% within FibroTest	9,1%	63,6%	27,3%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,8%	16,3%	16,7%
F3-F4: 0,73-0,74	Count	1	1	0
	% within FibroTest	50,0%	50,0%	0,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,8%	2,3%	0,0%
F4: 0,75-1,00	Count	1	1	0
	% within FibroTest	50,0%	50,0%	0,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,8%	2,3%	0,0%

Pearson Chi-Square =19,322; p value = 0,153 (>0,05)

Πίνακας 3.31. Σύγκριση FibroTest με PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Homozygosity / Heterozygosity)

<i>FibroTest</i>		<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>	
		<i>Normal condition</i>	<i>Homozygosity or heterozygosity for either PNPLA3 or TM6SF2</i>
F0: 0,00-0,21	Count	25	23
	% within FibroTest	52,1%	47,9%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	43,1%	39,7%
F0-F1: 0,22-0,27	Count	8	7
	% within FibroTest	53,3%	46,7%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	13,8%	12,1%
F1: 0,28-0,31	Count	4	5
	% within FibroTest	44,4%	55,6%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	6,9%	8,6%
F1-F2: 0,32-0,48	Count	15	10
	% within FibroTest	60,0%	40,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	25,9%	17,2%
F2: 0,49-0,58	Count	3	1
	% within FibroTest	75,0%	25,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	5,2%	1,7%
F3: 0,59-0,72	Count	1	10
	% within FibroTest	9,1%	90,9%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,7%	17,2%
F3-F4: 0,73-0,74	Count	1	1
	% within FibroTest	50,0%	50,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,7%	1,7%
F4: 0,75-1,00	Count	1	1
	% within FibroTest	50,0%	50,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,7%	1,7%

Pearson Chi-Square = 9,625; p value = 0,211 (>0,05)

Πίνακας 3.32. Σύγκριση LSM (SWE) με TM6SF2 (GG; GA; AA)

Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver		Genotype TM6SF2		
		GG	GA	AA
Normal: <6 kPa	Count	52	8	2
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	83,9%	12,9%	3,2%
	% within Genotype TM6SF2	52,5%	61,5%	100,0%
F1: 6,1-7,9 kPa	Count	31	5	0
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	86,1%	13,9%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	31,3%	38,5%	0,0%
F2: 8,0-9,4 kPa	Count	7	0	0
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	100,0%	0,0%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	7,1%	0,0%	0,0%
F3: 9,5-12,4 kPa	Count	7	0	0
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	100,0%	0,0%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	7,1%	0,0%	0,0%
F4: >12,5 kPa	Count	2	0	0
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	100,0%	0,0%	0,0%
	% within Genotype TM6SF2	2,0%	0,0%	0,0%

Pearson Chi-Square =4,203; **p value = 0,838** (>0,05)

Πίνακας 3.33. Σύγκριση LSM (SWE) με PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Heterozygosity; Homozygosity)

<i>Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver</i>		<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>		
		<i>Normal PNPLA3 or TM6SF2</i>	<i>Heterozygosity of either genos</i>	<i>Homozygosity of either genos</i>
Normal: <6 kPa	Count	30	22	10
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	48,4%	35,5%	16,1%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	58,8%	48,9%	55,6%
F1: 6,1-7,9 kPa	Count	16	16	4
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	44,4%	44,4%	11,1%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	31,4%	35,6%	22,2%
F2: 8,0-9,4 kPa	Count	2	3	2
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	28,6%	42,9%	28,6%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	3,9%	6,7%	11,1%
F3: 9,5-12,4 kPa	Count	2	4	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	28,6%	57,1%	14,3%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	3,9%	8,9%	5,6%
F4: >12,5 kPa	Count	1	0	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	50,0%	0,0%	50,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	2,0%	0,0%	5,6%

Pearson Chi-Square = 5.575; p value = 0,695 (>0,05)

Πίνακας 3.34. Σύγκριση LSM (SWE) με PNPLA3 & TM6SF2 (Normal; Homozygosity / Heterozygosity)

<i>Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver</i>		<i>Both PNPLA3 & TM6SF2</i>	
		<i>Normal condition</i>	<i>Homozygosity or heterozygosity for either PNPLA3 or TM6SF2</i>
Normal: <6 kPa	Count	32	30
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	51,6%	48,4%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	59,3%	50,0%
F1: 6,1-7,9 kPa	Count	17	19
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	47,2%	52,8%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	31,5%	31,7%
F2: 8,0-9,4 kPa	Count	2	5
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	28,6%	71,4%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	3,7%	8,3%
F3: 9,5-12,4 kPa	Count	2	5
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	28,6%	71,4%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	3,7%	8,3%
F4: >12,5 kPa	Count	1	1
	% within Corresponding F0-F4 value of SWE measurement of the liver	50,0%	50,0%
	% within Both PNPLA3 & TM6SF2	1,9%	1,7%

Pearson Chi-Square = 2,438; p value = 0,656 (>0,05)

Συζήτηση

Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων PNPLA3 rs738409 και TM6SF2 rs58542926 έχουν συσχετιστεί όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 2.3.6.2. εκτεταμένα με την εξέλιξη της NAFLD^{129,420}.

Τα ευρήματα της μελέτης μας επιβεβαιώνουν καταρχήν τη συσχέτιση του PNPLA3 rs738409 με την HS ανεξαρτήτως παρουσίας μεταβολικού συνδρόμου όπως άλλωστε έχει φανεί και στη μελέτη των Romeo et al το 2008¹³⁰ σε GWAS που πραγματοποίησαν με δεδομένα της Dallas Heart Study. Επιπρόσθετα στη μελέτη μας βρήκαμε ότι η παρουσία του παθολογικού αλληλίου του συγκεκριμένου γονιδίου σχετίζεται με διαταραγμένη ηπατική βιοχημεία εύρημα που έχει περιγραφεί και σε προγενέστερες μελέτες^{421,422} ως αποτέλεσμα συσχέτισής του τόσο με τη φλεγμονή όσο και με την ίνωση ανεξαρτήτως της σοβαρότητας της στεάτωσης¹⁴⁷.

Οι Kozlitina et al¹⁷⁸ το 2014 διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού TM6SF2 rs58542926 με αυξημένη ηπατική στεάτωση και χαμηλά επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα και κυρίως των VLDL. Ομοίως οι Liu et al¹⁸⁰ σε μελέτη τους το 2014 έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζεται όχι μόνο με τη NAFLD αλλά και με αυξημένο κίνδυνο προχωρημένης ίνωσης και κίρρωσης. Παρά το γεγονός ότι στον υπό μελέτη πληθυσμό μας ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός ανευρέθη σε ποσοστό 12,5% (15/120) (7% στο γενικό πληθυσμό στους Ευρωπαίους¹⁷⁹) δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση τόσο με τη στεάτωση όσο και με την ίνωση. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και η μελέτη των Lisboa et al⁴²³ σε πληθυσμό αντίστοιχα της Βραζιλίας που παρακολουθούνταν στο ηπατολογικό ιατρείο και πληρούσαν υπερηχογραφικά κριτήρια NAFLD ανεξαρτήτως ιστορικού ΣΔ2 όπως και οι μελέτες των SS et al¹⁸² το 2015 και των Wong et al¹⁸³ το 2014 αντίστοιχα. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα ίσως να οφείλονται στο ότι οι μελέτες αυτές είναι μικρές με χαμηλή στατιστική δύναμη και ανταποκρίνονται σε διαφορετικούς φυλετικούς πληθυσμούς. Επίσης δεν υπάρχει μελέτη στη βιβλιογραφία της επίδρασης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού του TM6SF2 σε πληθυσμούς αποκλειστικά με ιστορικό ΣΔ2.

Τέλος ομοίως με τη μελέτη των Min Xu et al⁴²⁴ το 2018 στη μελέτη μας φάνηκε ότι η συνύπαρξη των παθολογικών αλληλίων των PNPLA3 I148M και TM6SF2 E167K σχετίζονταν με την HS σε ασθενείς με NAFLD.

Δεδομένου του μικρού αριθμού των συμμετεχόντων στη μελέτη μας και της έλλειψης βιοψιών ήπατος, τα αποτελέσματα μας θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή και να επιβεβαιωθούν με μεταγενέστερες μελέτες.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε η σχέση της λιπιδαιμικής εικόνας των ατόμων με ΣΔΤ2 με τον κίνδυνο ανάπτυξης HS (VLDL χοληστερόλη $r = 0,219$, $p = 0,016$, τριγλυκερίδια ορού $r = 0,262$, $p = 0,004$). Παρά ταύτα, ως ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης HS στο συγκεκριμένο πληθυσμό ήταν η περίμετρος μέσης, το γυναικείο φύλο και η διάρκεια του διαβήτη με τον πολυμορφισμό PNPLA3 rs 738409 να αποτελεί επίσης καθοριστικό επιβαρυντικό παράγοντα. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να αναπαραγάγουν, να εξηγήσουν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα και να επιβεβαιώσουν τον κίνδυνο εξέλιξης των ατόμων με ΣΔΤ2 και NAFLD σε ηπατική ίνωση, ώστε να καθιερωθεί ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός ως χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στον προσυμπτωματικό έλεγχο του εν λόγω πληθυσμού.

Επιπρόσθετα στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι το FibroTest παρουσίαζε τη μεγαλύτερη διαγνωστική αξιοπιστία σε σύγκριση με άλλους βιοδείκτες (APRI Index, NAFLD Fibrosis score, BARD score, Fib-4 Index) στη διάγνωση ηπατικής ίνωσης. Επίσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ LSM (SWE) και ActiTest ($r = 0,405$, $p \leq 0,001$) και NashTest2 ($r = 0,299$, $p = 0,002$). Σε γραμμική παλινδρόμηση συγκεκριμένα φάνηκε ότι αύξηση των τιμών των δύο παραπάνω μεταβλητών αυξάνει τις τιμές της LSM(SWE) κατά 5,632 φορές ($p \leq 0,001$, CI 3,213 - 8,051) και 3,981 φορές ($p \leq 0,001$, CI 2,398 - 5,563) αντίστοιχα.

Παρόλα αυτά, αν κι υπάρχουν μελέτες με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για τη χρήση μη επεμβατικών βιοδεικτών ή μαθηματικών αλγορίθμων για τη διάγνωση και πρόβλεψη της βαρύτητας της NASH, τα άτομα με ΣΔΤ2 ίσως χρήζουν εξειδικευμένων προγνωστικών μοντέλων ειδικά σχεδιασμένων για αυτά, καθώς η γενίκευση συμπερασμάτων από έρευνες με συμμετέχοντες άτομα χωρίς διαβήτη σε πληθυσμούς ατόμων με διαβήτη ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Έχοντας υπόψιν μας τους πολύπλοκους παθογενετικούς μηχανισμούς και τη δυναμική της NASH, ο συνδυασμός πολλών διαφορετικών μη επεμβατικών βιοδεικτών ίσως αποτελεί μια καλή επιλογή για τη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας στην πρόβλεψη ηπατικής ίνωσης στα άτομα με διαβήτη πληθυσμό και την ελαχιστοποίηση της ανάγκης βιοψιών ήπατος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

<p>Ημερομηνία .../.../.....</p>

Παράρτημα #1

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ

ΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕΛΕΤΗΣ ΡΝΡΛΑ3

Φύλο (0: Άνδρας, 1: Γυναίκα):.....

Ηλικία >70 ή <18 ετών (1: Ναι, 0: Όχι):.....

Χρήση Ινσουλίνης; (Τελευτ. 6-μηνο 1: Ναι, 0: Όχι):.....**Ανοσο/τικών;** (Τελευτ. 6-μηνο 1: Ναι, 0: Όχι):.....

Τρέχουσα Κατανάλωση Αλκοόλ; (Βάσει Συνημμένου Ερωτηματολογίου: >30g/d άνδρες & >20g/d γυναίκες) (1: Ναι, 0: Όχι):..... (g/d).

Τρέχον μη-Ηπατικό Κακόηθες Νεόπλασμα (1: Ναι, 0: Όχι).....,

Παρουσία Επιπλοκών μη-Οφειλόμενων στον Σακχαρώδη Διαβήτη Κυκλώστε τον αντίστοιχο αριθμό (1: από Πνεύμονες, 2: από Καρδιά, 3: από Περιφερικά Αγγεία, 4: από Νεφρούς, 5: από ΚΝΣ, 6: από Περιφερικό ΝΣ, 7: Ψυχιατρικό Νόσημα).

Εργαστηριακά: HBsAg (1: θετικό, 0: αρνητικό)....., anti-HBs (1: θετικό, 0: αρνητικό)....., anti-HBc (1: θετ., 0: αρν.)....., anti-HBe (1: θετ., 0: αρν.)....., anti-HCV (1: θετ., 0: αρν.)....., ANA (1: θετικό, 0: αρνητικό)....., SMA (1: θετικό, 0: αρνητικό)..... serum IgG.....(mg/dL), IgA..... (mg/dL), IgM..... (mg/dL), Τρέχουσα HbA_{1c}.....(%).

Αν, μετά την συμπλήρωση όλων των ανωτέρω στοιχείων δεν προκύπτει λόγος αποκλεισμού του ασθενούς, τότε προχωρούμε στην συμπλήρωση του επόμενου φύλλου.

Παράρτημα #2

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΛΚΟΟΛ

ΑΣΘΕΝΗΣ.....ΚΩΔΙΚΟΣ.....ΗΜ/ΝΙΑ...../...../.....

1. ΜΠΥΡΑ

Πόσο συχνά πίνετε μύρα;

- i. Κάθε μέρα.....
- ii. 4-6 φορές την εβδομάδα, αλλά όχι κάθε μέρα.....
- iii. 2-3 φορές την εβδομάδα.....
- iv. Λιγότερο από 1-2 φορές την εβδομάδα.....
- v. Δεν πίνει καθόλου μύρα.....

	Πόσα ποτήρια (ή ποσότητα) πίνετε κάθε φορά;	Από πόσα χρόνια πίνετε έτσι;

Μέση Ημερήσια Κατανάλωση Αιθυλικής Αλκοόλης από Μύρα:.....g/d

2. ΚΡΑΣΙ

Πόσο συχνά πίνετε κρασί;

- i. Κάθε μέρα.....
- ii. 4-6 φορές την εβδομάδα, αλλά όχι κάθε μέρα.....
- iii. 2-3 φορές την εβδομάδα.....
- iv. Λιγότερο από 1-2 φορές την εβδομάδα.....
- v. Δεν πίνει καθόλου κρασί.....

Μέση Ημερήσια Κατανάλωση Αιθυλικής Αλκοόλης από Κρασί:.....g/d

3. ΒΑΡΕΙΑ ΟΙΝΟΠΝΕΥΜΑΤΩΔΗ ΠΟΤΑ(ουίски, τζιν, βότκα, τσίπουρο, ούζο κλπ.)

Πόσο συχνά πίνετε ένα τέτοιο ποτό;

- i. Κάθε μέρα.....
- ii. 4-6 φορές την εβδομάδα, αλλά όχι κάθε μέρα.....
- iii. 2-3 φορές την εβδομάδα.....
- iv. Λιγότερο από 1-2 φορές την εβδομάδα.....
- v. Δεν πίνει καθόλου.....

Μέση Ημερήσια Κατανάλωση Αιθυλικής Αλκοόλης από "Βαρεία Ποτά":.....g/d

Συνολική Ημερήσια

Κατανάλωση Αλκοόλ.....:.....g/d

Σημείωση:

Μύρα: 5% αλκοόλ, Κρασί: ~12% αλκοόλ, "Βαρεία ποτά": 40% αλκοόλ

Κρασί: 1 ποτήρι: 80mL, 1 φιάλη: 750mL

Μύρα: 1 ποτήρι 250mL, 1 φιάλη μύρας: 500mL, 1 μικρό κουτί: 330mL, 1 μεγάλο κουτί: 330mL

Ούζο, Τσίπουρο: 1 σφηνάκι 30mL, 1 καραφάκι 120mL, 1 φιάλη 750mL

Ούισκυ, Τζιν, Βότκα: 1 ποτήρι 50mL, 1 φιάλη 750mL.

Παράρτημα #3

ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ & ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Όνοματεπώνυμο Ασθενούς:.....Ημερομηνία:.....

Τίτλος Μελέτης: ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΕΛΑΣΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ Ή ΧΩΡΙΣ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ I148M ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PNPLA3.

Κύριοι Ερευνητές: Σπήλιος Μανωλακόπουλος, *Γαστρεντερολόγος, Επίκουρος Καθηγητής Παν/μίου Αθηνών*, Αναστασία Θανοπούλου, *Διαβητολόγος, Επίκουρος Καθηγήτρια, Παν/μίου Αθηνών*, Μαρίνα Νούτσου, *Διαβητολόγος, Διευθύντρια ΕΣΥ*.

Γενικά Ενημερωτικά Στοιχεία για την Μελέτη: Οι παραπάνω αναφερόμενοι ερευνητές, είμαστε γιατροί, της Β' Παν/κής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών. Η μελέτη πρόκειται να ερευνήσει την επίδραση που έχει στο συκώτι σας μια τροποποιημένη μορφή (μετάλλαξη) του γονιδίου PNPLA3. Το γονίδιο αυτό, στην κανονική του μορφή (την ονομάζουμε CC) φροντίζει για την σωστή μεταφορά του λίπους έξω από το συκώτι και αποθήκευσή του κάτω από το δέρμα (υποδόριο λιπώδη ιστό). Όταν το γονίδιο είναι μεταλλαγμένο ("πολυμορφισμός I148M"), τότε δεν λειτουργεί σωστά. Η τροποποιημένη μορφή του γονιδίου, ονομάζεται μορφή G και τα άτομα που την έχουν χαρακτηρίζονται σαν CG ή GG. Τα άτομα με το τροποποιημένο γονίδιο PNPLA3 δυσκολεύονται πολύ να ξεφορτώσουν το συκώτι τους από το λίπος των τροφών. Το συκώτι τότε διογκώνεται, γεμίζει λίπος και γίνεται σταδιακά περισσότερο και περισσότερο σκληρό, γιατί μέσα του δημιουργείται ουλώδης συνδετικός ιστός. Η κατάσταση αυτή μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση, δημιουργώντας έτσι πολλά προβλήματα στον άρρωστο. Ασθενείς με διαβήτη, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αποκτήσουν λιπώδες συκώτι. Στη μελέτη αυτή θέλουμε να δούμε, αν οι άρρωστοι με διαβήτη που τυχόν έχουν και την κακή μετάλλαξη I148M του γονιδίου PNPLA3, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα για σκληρό συκώτι, σε σύγκριση με εκείνους που δεν την έχουν. Η διαφορά στη σκληρότητα θα ελεγχθεί με "μεθόδους ελαστογραφίας ήπατος" δηλαδή με Fibroscan και Shear Wave ελαστογραφία.

Τι Εξετάσεις θα Χρειασθεί να Γίνουν: Οι περισσότερες είναι απλές εξετάσεις αίματος. Όσες σχετίζονται με τον διαβήτη, από τον οποίο πάσχετε, θα γίνονται με την συνταγογράφηση του ΕΟΠΥΥ. Η μελέτη του γονιδίου PNPLA3 θα γίνεται δωρεάν στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Βιοϊατρικής. Η ελαστικότητα (σκληρότητα) του συκωτιού σας θα μελετηθεί στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Αθηνών (με Fibroscan) και στην Ηχοδιαγνωστική Τομογραφία (ιδιωτικό Εργαστήριο στην Κηφισιά) με Ελαστογραφία Shear Wave, επίσης χωρίς καμιά χρέωση. Γενικά φροντίζουμε να μην υπάρξει οικονομική επιβάρυνσή σας σε ότι αφορά την

συγκεκριμένη μελέτη. Η συγκεκριμένη μελέτη δεν περιλαμβάνει χορήγηση φαρμάκων, εκτός από αυτά που ήδη παίρνετε. Οι εξετάσεις δεν θα επαναληφθούν.

Τι Όφελος θα Έχετε από την Συμμετοχή σας στη Μελέτη;: Σύμφωνα με διεθνείς μελέτες που έως σήμερα, η παρουσία της μετάλλαξης I148 στο γονίδιο PNPLA3 προδιαθέτει γενετικά σε βαρύτερη στεάτωση, δηλαδή συνάθροιση λίπους στο συκώτι σας και όπως έχει ήδη αναφερθεί, προδιαθέτει επίσης, σε ταχύτερη ηπατική ίνωση και πρόοδο προς κίρρωση. Όσοι είναι φορείς CG ή GG πρέπει να καταβάλουν μεγαλύτερη προσπάθεια στη μείωση του σωματικού τους βάρους, να προσέξουν περισσότερο την διαίτα τους και την φαρμακευτική θεραπεία του διαβήτη. Εκτός από την διαβητολογική θα πρέπει να έχουν συγχρόνως και ηπατολογική παρακολούθηση.

Εμπιστευτικότητα Αποτελεσμάτων: Τα δεδομένα της μελέτης αυτής καλύπτονται από την εμπιστευτικότητα ιατρικών πράξεων. Δεν πρόκειται σε καμιά περίπτωση να δημοσιοποιηθούν ονομαστικά. Θα υποβληθούν σε στατιστική επεξεργασία αθροιστικά και ανώνυμα και τα αποτελέσματα θα δημοσιευθούν σε ιατρικά επιστημονικά περιοδικά.

Δικαίωμα Άρνησης Συμμετοχής: Η συμμετοχή σας στην έρευνα αυτή δεν είναι υποχρεωτική. Εάν δεν το θέλετε δεν χρειάζεται να λάβετε μέρος. Η άρνησή σας δεν θα επηρεάσει καθόλου τη συνέχιση της θεραπείας σας στο Διαβητολογικό Ιατρείο. Επίσης, μπορείτε να διακόψετε τη συμμετοχή σας στην έρευνα, όποτε επιθυμείτε, χωρίς να χάσετε κανένα από τα δικαιώματά σας ως ασθενή εδώ. Η θεραπεία σας στο Διαβητολογικό Εξωτερικό Ιατρείο δεν θα επηρεαστεί από τυχόν άρνηση συμμετοχής σας στη μελέτη αυτή.

Απάντηση σε Τυχόν Απορίες: Αν το επιθυμείτε, μπορείτε να μου υποβάλετε όποιες ερωτήσεις θέλετε σχετικά με μελέτη αυτή. Έχετε κάποιες απορίες;

Πρωτόκολλο Αποδοχής Συμμετοχής: Εγώ που υπογράφω, έχω διαβάσει και κατανοήσει τις παραπάνω πληροφορίες, (ή ο ιατρός:.....τις διάβασε σε μένα). Είχα την ευκαιρία να υποβάλω ερωτήσεις σχετικά με την επιστημονική αυτή έρευνα και τυχόν ζητήματα στα οποία ζήτησα διευκρίνιση, έχουν απαντηθεί ικανοποιητικά. Συμφωνώ να συμμετάσχω εθελοντικά σε αυτή την έρευνα.

Ονοματεπώνυμο Ασθενούς:.....Ημερομηνία:.....

Ημέρα. Μήνας. Χρόνος

Υπογραφή Ασθενούς:.....

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Ιατρού:.....

A/A Κάρτας-Ημερομηνία

.....-...../...../.....

Παράρτημα #4

ΚΑΡΤΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΜΕΛΕΤΗ: "Μεταβολές Ηπατικής Ελαστογραφίας Διαβητικών Ασθενών με ή χωρίς Πολυμορφισμό I148m του Γονιδίου PNPLA3"

Έγινε Ενημέρωση Ασθενούς; (1: *Ναι*, 0: *Όχι*):....., **Υπεγράφη Συγκατάθεση;** (1: *Ναι*, 0: *Όχι*):.....

Όνομα/νυμο:.....**Ημερ/νία Γέννησης:**...../...../..... **Φύλο**
(0: *Άρρεν* 1: *Θήλυ*):..... **Διεύθυνση:**.....**Εργασία:**.....

Τηλέφωνο (κινητό):..... **Τηλέφωνο(σταθερό):**.....

Οικογενειακή Κατάσταση (1: *Παντρεμένος*, 2: *Ανύπανδρος*, 3: *Χήρος*, 4: *Διαζευγμένος*):.....

Οικογ/ακό Ιστορικό (1: *Σακχ. Διαβήτης*, 2: *Παχυσαρκία*, 3: *Υπερχολ/μια*, 4: *Υπέρταση*, 5: *Στεφανιαία νόσος*).

Ατομικό Αναμνηστικό (1: *Υπέρταση?*, 2: *Στεφανιαία Νόσος?*, 3: *ΧΝΑ?*, 4: *Δυσλιπιδαιμία?*, 5: *ΑΕΕ?*, 6: *Κίρρωση ήπατος?* 7: *ΗΚΚ?*, 8: *Καρκίνος άλλου οργάνου?*). **Σακχαρώδης Διαβήτης:** (1: *Ναι*, 2: *Όχι*):..... **Αν "Ναι" πότε άρχισε?**.....(έτη).

Τρέχουσα Κατανάλωση Αλκοόλ (Να Συμπληρωθεί το Συνημμένο Φύλλο):.....(g/d).

Τρέχουσα Θεραπεία (Σκεύασμα, Ημερ/σία Δόση, Διάρκεια): **1^ο:**....., **2^ο:**.....

3^ο:....., **4^ο:**....., **5^ο:**....., **6^ο:**....., **7^ο:**....., **8^ο:**.....

Σημερινή Φυσική Εξέταση: **Ύψος**.....(cm). **Βάρος**.....(kg). **Βάρος προ ~5 ετών**..... (kg).

Αρτηριακή Πίεση (3^η Μέτρηση!):...../.....(mmHg). **Περίμετρος Μέσης:**.....(cm). **BMI:**.....

Σημειώσεις:.....
.....
.....

Εργαστηριακά Ευρήματα: **Ht**.....(%), **Hb**.....(g/dL), **Αιμοπετάλια**.....(mm³), **Λευκά**.....(mm³), **Ουρία**..... (mg/dL), **Κρεατινίνη**..... (mg/dL), **Σάκχαρο**..... (mg/dL),

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. At K. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*, 2015;6(6):850-67.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2014;37:S81–90.
3. Hellenic Diabetes Association. Guidelines for Diabetes Mellitus, 2022nd ed, Athens; page 1.
4. A K, S G, A R, D D, E B, Bj A, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primer* , 2017;3:17016.
5. Ma A. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* , 2012;2:a007641–a007641.
6. K S, D B, D D. Genetic and Epigenetic Factors in Etiology of Diabetes Mellitus Type 1, 2013;132:1112–22.
7. Hellenic Diabetes Association. Guidelines for Diabetes Mellitus, 2020 nd ed, Athens; page 4.
8. Textbook of Diabetes. fifth. Willey Blackwell Publishing; 2017.
9. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.
10. Association AD. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes, *Diabetes Care* , 2019;42:S90–102.
11. Dr W, L G, C W, J S. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* , 2011;94:311–21.
12. A T, I E, K A, J K, Di T, P G, et al. Prevalence of diabetes mellitus as well as cardiac and other main comorbidities in a representative sample of the adult Greek population in comparison with the general population. *Hell J Cardiol HJC Hell Kardiologike Epitheorese*, 2020;61(1):15-22.
13. S L, Ge D, C K, A P, P L, Pp S, et al. The prevalence and treatment patterns of diabetes in the Greek population based on real-world data from the nationwide prescription database. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;118:162–7.
14. A N, A W, S E, M K, R H, Mb R. Diabetes incidence in children of different nationalities: an epidemiological approach to the pathogenesis of diabetes: *Diabetologia*, 2001;44:B21–6.
15. A G, Eam G, Cc P. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE study. *The Lancet*, 1992; 339:905–9.

16. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2018*. *Diabetes Care*, 2018;41:S13–27.
17. Pe C. Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes. *Diabetologia*. 2002;45:937–48.
18. Pe C. Death during intensive glycaemic therapy of diabetes: mechanisms and implications. *Am J Med*. 2011;124:993–6.
19. Lm D, B W, M R, A R. Diabetic Ketoacidosis at Diagnosis of Type 1 Diabetes Predicts Poor Long-term Glycemic Control. *Diabetes Care*. 2017;40:1249–55.
20. MI M, V G, Js G. Characteristics of diabetic ketoacidosis in older versus younger adults. *J Am Geriatr Soc*. 1992;40:1100–4.
21. K Y, H T, M Y, N Y. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes: response to Kitabchi et al. *Diabetes Care*. 2009;32:e157; author reply e158.
22. A S. Hyperosmolar hyperglycaemic syndrome. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2006;23 Suppl 3:22–4.
23. Mm N. Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 2015;6:489.
24. Sd S, E C, Ej D, L S, Jk S, BL V, et al. Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2017;40:412–8.
25. E R, X-X Z, I R. Clinical Manifestation and Natural History of Diabetic Nephropathy. In: Lai KN, Tang SCW, editors. *Contributions to Nephrology*, Basel: KARGER; 2011, p. 19–27.
26. Kr T, Gl B, Rw B, JI C, Ih DB, J E-F, et al. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* , 2014;37:2864–83.
27. Aj B, Jd W. Diabetic neuropathies and pain. *Clin Endocrinol Metab*. 1986;15:917–31.
28. Pj W. Clinical observations and experiments in diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 1992;35:2–11.
29. P V, J P, Jr A. French Group for Research and Study of Diabetic Neuropathy. Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications--the French multicenter study. *Metabolism*. 2003;52:815–20.
30. Ali V, Re M, Bd M, R F. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003;26:1553–79.
31. K M, S Y, Hc G, J B, F Z, D H, et al. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results

- of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry. *Circulation*. 2000;102:1014–9.
32. Sm H, S L, T R, K P, M L. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339:229–34.
 33. Rd A, Jd C, Bl R, Kh M, Js P, Gw R, et al. Age-related changes in risk factor effects on the incidence of thromboembolic and hemorrhagic stroke. *J Clin Epidemiol*. 2003;56:479–86.
 34. S-E M, C M, D M, G C, Osseby G-V, Tilling K, et al. Association between diabetes and stroke subtype on survival and functional outcome 3 months after stroke: data from the European BIOMED Stroke Project. *Stroke*. 2003;34:688–94.
 35. Eb J, So E, N C, Aj B. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*. 2001;24:1433–7.
 36. M H, Rg M, J-L. C. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: response to van de Laar et al. *Diabetes Care*. 2005;28:1840; author reply 1841.
 37. S W, E H, K I, H U, M O, Y S, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol*, 2015;50:364–77.
 38. S L, H Y-J. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016;30:385–95.
 39. H Y-J. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Diabetologia*, 2016;59:1104–11.
 40. V R, S B, H C-P, C D, G M. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010;53:372–84.
 41. N C, Z Y, Je L, M C, K C, M R, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases: *Hepatology*, Vol. XX, No. X, 2017. *Hepatology*, 2018;67:328–57.
 42. G M, M B, G B, S T, E B, M L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001;50:1844–50.
 43. Jm C, Fl B, Am D. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:960–7.

44. Zm Y, P G, L dA, Jm P, M S, N F, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*, 2019;71:793–801.
45. Z Y, Qm A, M M, T H, L H, M E, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* , 2018;15:11–20.
46. L P, H C-P, F N, E C, Jv L, L W, et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol*, 2018;69:718–35.
47. Aj S. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019;16:377–86.
48. E B, M P, Ea T. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 2016;65:1038–48.
49. P A, De K, S D-L, La A, Es B, P C, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 2015;149:389-397.e10.
50. Jm C, Fl B, Am D. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;122:1649–57.
51. Ce R, Je E. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*. 2003;124:71–9.
52. M S, L F, C S. Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:S90–102.
53. G V, A B, Zm Y. 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.
54. Y Z, R P, M M, M B, L L, Jm F. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425–32.
55. Ma G-U, R-D C, E G M, C R J, I G G, C S L, et al. Hepatic steatosis in liver transplant donors: common feature of donor population? *World J Surg*. 1998;22:837–44.
56. Jd B, Ls S, R D, P N, Jd H, Jc C, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatol Baltim Md*. 2004;40:1387–95.
57. Sh C, Dm H, Jt P, Ee H. Is NASH underdiagnosed among African Americans? *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1496–500.

58. Sr W, W L, R M, Nm B, Bp B, Mm M, et al. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepato Baltim Md.* 2005;41:372–9.
59. Y-J Z, Y-Y L, Y-Q N, J-X M, L-G L, S-L S, et al. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol.* 2007;13:6419–24.
60. P A, Jc K, Kp B, Kd L. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepato Baltim Md.* 1999;30:1356–62.
61. V N, A A, L V, L M, Ae F, N A. NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019;16:517–30.
62. Rg L. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol.* 1989;20:594–8.
63. Ca M, Zm Y, T G, N B, Y-C L, Aj M. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999;116:1413–9.
64. Ee P, Wg C, R H, J S, JW H, Lw P. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepato Baltim Md.* 1990;11:74–80.
65. Dk G, S G, Ga M, Ll C, Ni W, Pj W, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology.* 1998;114:311–8.
66. Hl B, Q J, K T, P LC, J C, Rw L, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 1999;31:421–9.
67. Sa T, Pn N. Non-alcoholic fatty liver disease in 2016. *Br Med Bull* , 2016;119:143–56.
68. W P, Lw P, R S. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2014;15:8591–638.
69. H T, Ar M. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepato Baltim Md.* 2010;52:1836–46.
70. Mm J-S, Ej P. Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25:213–20.
71. A F, V Z. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1746–55.

72. Sk K, Rs S, M M, I C, L C, K T, et al. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J Clin Invest*. 2010;120:756–67.
73. W L, T-Y H, S-G Y, Ra D. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res*. 2003;44:978–85.
74. K Y, L Y, S M, J H, X-X Y, Sk P, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007;45:1366–74.
75. Ba N-T. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52:774–88.
76. Jr S, H T, A L, Jj R, Jc M, L L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:2831–8.
77. Cp D, Of J. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? *Gastroenterology*. 1998;114:842–5.
78. K C. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009;13:545–63.
79. N S, K K, H-U H. Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocr Rev*. 2008;29:939–60.
80. C P, J G. 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.
81. Se S, J L, Ab G. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793–801.
82. Gf L, A C, K A, A G. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23:201–29.
83. C B, F M. The role of adipokines in liver fibrosis. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol*. 2008;15:91–101.
84. G S, M D, A M, Z Z, J-Y J, H-J K, et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*. 2008;322:1539–43.
85. Cm T, B E, Cr K. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:85–96.
86. R M, S V, N S, G M, Vb T, K V, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*. 2011;16:300–9.

87. G P, V P, Fm R, G P. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:14205–18.
88. Aj S, C C-S, F M, Wb R, Mj C, Rk S, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 2001;120:1183–92.
89. Ap R, Js T, Cm P. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:59–69.
90. F N, Rs R, Gm H, Ja I. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. :16.
91. K B, A I, D P, B F. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion.* 2006;6:1–28.
92. Sh C, Rh S, Em K, Jc I, Ee H, Jk P, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 1999;31:430–4.
93. Gs H. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444:860–7.
94. D C, M Y, Df F, Pa M, L H, J L, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005;11:183–90.
95. Ps R, H C-P, S S, Re C, Rm R, A B et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1708–17.
96. K T, G T, S A, K O, T C, A M, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut.* 2006;55:415–24.
97. J C, A C, P F-G, M H-G, M M, A D-D, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatol Baltim Md.* 2001;34:1158–63.
98. Aj W, Ic R-T, Rb D, Pj M, Rh G, Ag C. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2001;48:206–11.
99. A S, M M, Wk S, R J, S S, Cu N. Ciprofloxacin suppresses bacterial overgrowth, increases fasting insulin but does not correct low acylated ghrelin concentration in non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:291–9.
100. J-M S, P-J, F H, C M, S M, M G, et al. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis. *Obes Surg.* 2008;18:371–7.

101. L M, V V, G L-T, M M, G C, R R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2009;49:1877–87.
102. D C, P C, A R, Om N, S DM, MC, et al. Gut–liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2012;22:471–6.
103. AG, Jv V, VP, Mp C. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:367–77.
104. L L, M L. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol*, 2016;231:R77–99.
105. S K, A E, O D, P L, T L, Fh L, et al. Fast-food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects. *Gut*. 2008;57:649–54.
106. I B, SW, M Vos, SK, V V, S K, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol*. 2008;48:983–92.
107. Jb M, Pj G, Ba F. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2014;6:5679–703.
108. A S, G K, S W, S H, Sc B, I B. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* Baltim Md. 2009;50:1094–104.
109. M S, Da S, Z Z, T C, Wm P, R W, et al. High fructose feeding induces copper deficiency in Sprague-Dawley rats: a novel mechanism for obesity related fatty liver. *J Hepatol*. 2012;56:433–40.
110. Mf A, A S, C G, A U-A, R C, Rj J, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2010;51:1961–71.
111. S P, G M, L C, Fs M, C C, S C, et al. Industrial, not fruit fructose intake is associated with the severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2013;59:1169–76.
112. Mf A, M L, A H, S B, Ew L, A B, et al. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology* Baltim Md. 2012;56:952–60.
113. L M, Cs F, Pf J, Ek S, U H, Ce S, et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *J Hepatol*. 2015;63:462–9.

114. P V, F M, G M, Dc A, Mt R, A R, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology* Baltim Md. 2010;52:1652–61.
115. Oa G, B L, K R, M S, R W, Am G. Pharmacological application of caffeine inhibits TGF-beta-stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPARgamma and SMAD2/3-dependent pathways. *J Hepatol*. 2008;49:758–67.
116. Mc R, C I, T T, G W, N T, S H, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2013;59:138–43.
117. G K, M L, J P, A S, M L, D Z, et al. Moderate alcohol consumption diminishes the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in ob/ob mice. *Eur J Nutr*, 2016;55:1153–64.
118. A M, Y I, S O, E K, T M, H T, et al. Roles of alcohol consumption in fatty liver: a longitudinal study. *J Hepatol*. 2015;62:921–7.
119. S S, G-O C, Cj P. Modest alcohol consumption decreases the risk of non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of 43 175 individuals. *Gut*. 2014;63:530–2.
120. R G, Gl V, Sm G, Jd B. Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology* Baltim Md. 2009;49:791–801.
121. Ir W, B W, Sr P, A R, J M, Ca R. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2957–61.
122. Jb S, Ma C, Je L, R S, N C, Nj S, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136:1585–92.
123. Y M, S T, S K, H S, T T, H I, et al. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E1140-1149.
124. R K, Hp S, M T, Ad M, M P-H. Effects of iron overload in a rat nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2006;26:1258–67.
125. Ae F, A C, P A, M T, Li B, Kd L, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2003;125:437–43.
126. J M, Kh P, A R, J K, H Y-K. Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol*. 2009;50:1035–42.

127. T T, T T, T S, Eb R, L H, M J, et al. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology*. 2004;127:1189–97.
128. R L, F R, L Z, S K, Mg Z, Da B, et al. Genetic covariance between gamma-glutamyl transpeptidase and fatty liver risk factors: role of beta2-adrenergic receptor genetic variation in twins. *Gastroenterology*. 2010;139:836–45, 845.e1.
129. P D, L V. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 2016;65:1026–37.
130. S R, J K, C X, A P, D C, La P, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40:1461–5.
131. S H, C M, L-Z L, R G, L K, Nv G, et al. A Sequence Variation (I148M) in PNPLA3 Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Disrupts Triglyceride Hydrolysis. *J Biol Chem*, 2010;285:6706–15.
132. Y H, S H, JI L, Y-K S, Tf O, Jc C, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci*, 2010;107:7892–7.
133. Ek S, JI B, Cd P, Bf B. PNPLA3 Variants Specifically Confer Increased Risk for Histologic Nonalcoholic Fatty Liver Disease but Not Metabolic Disease, Vol. 52, *Hepatology* (Baltimore, Md.). *Hepatology*, 2010;52(3):904-12
134. K K, A P, F M, J M, S W, I K, et al. Dissociation Between Fatty Liver and Insulin Resistance in Humans Carrying a Variant of the Patatin-Like Phospholipase 3 Gene. *Diabetes*, 2009;58:2616–23.
135. Lvc V, Ga B. Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 2018 Update. *Curr Pharm Des*, 2018;24:4566–73.
136. H K, H H, H O, K H, T F, T K, et al. Influence of the rs738409 polymorphism in patatin-like phospholipase 3 on the treatment efficacy of non-alcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes mellitus: *PNPLA3* SNP affect the treatment of NAFLD with DM. *Hepatol Res*, 2016;46:E146–53.
137. S S. PNPLA3, the triacylglycerol synthesis/hydrolysis/storage dilemma, and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2012;18:6018.
138. Y R, C K, Jm Z, Dec K, Tj L The Association of Genetic Variability in Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 (PNPLA3) With Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Hepatology*, 2010;52(3):894-903.
139. C-W W , H-Y L, S-J S, M-L Y, Z-Y L, C-Y D, et al. The PNPLA3 I148M Polymorphism Is Associated With Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Normoglycaemic Population. Vol. 31, *Liver international* :

- official journal of the International Association for the Study of the Liver. *Liver Int*, 2011; 1(9):1326-31.
140. B K, S C, S K, Sc , B P, J W, et al. A Common Variant in the Adiponutrin Gene Influences Liver Enzyme Values. Vol. 47, *Journal of medical genetics. J Med Genet*, 2010;47(2):116-9.
 141. J X, Y-N X, W-H L, Z-H L, D-D Z, M Z, et al. Polymorphism rs738409 in PNPLA3 Is Associated With Inherited Susceptibility to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 21, *Zhonghua gan zang bing za zhi, Chinese journal of hepatology. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2013; 21(8):619-23.
 142. L V, Ai A, E G, A B, A M, et al. I148M Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing 3 Gene Variant and Severity of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 52, *Hepatology (Baltimore, Md.)*. *Hepatology*, 2010; 52(4):1274-80.
 143. Mi G, R W, Ka L, S M, S V, Jn D , et al. Effects of PNPLA3 on Liver Fat and Metabolic Profile in Hispanic Children and Adolescents . Vol. 59, *Diabetes. Diabetes*, 2010; 59(12):3127-30.
 144. Jn D, Ka L, Rw W, S V, Ds M, Mj W, et al. Increased Hepatic Fat in Overweight Hispanic Youth Influenced by Interaction Between Genetic Variation in PNPLA3 and High Dietary Carbohydrate and Sugar Consumption. Vol. 92, *The American journal of clinical nutrition. Am J Clin Nutr*, 2010; 92(6):1522-7.
 145. Y-C L, P-F C, F-C H, W-S Y, M-H C, Y-H C. A Common Variant in the PNPLA3 Gene Is a Risk Factor for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Taiwanese Children. Vol. 158, *The Journal of pediatrics. J Pediatr*, 2011; 158(5):740-4.
 146. A V, J P, V L, M A, D K, R J, et al. Associations of I148M Variant in PNPLA3 Gene With Plasma ALT Levels During 2-year Follow-Up in Normal Weight and Overweight Children: The PANIC Study. Vol. 10, *Pediatric obesity. Pediatr Obes*, 2015; 10(2):84-90.
 147. S S, Pirola C. 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. Vol. 53, *Hepatology (Baltimore, Md.)*. *Hepatology*, 2011; 53(6):1883-94.
 148. Mz S, M R, M S, Lc P, R S, Cb R et al. A Multi-Ethnic Study of a PNPLA3 Gene Variant and Its Association With Disease Severity in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 131, *Human genetics. Hum Genet*, 2012;131(7):1145-52.
 149. Jd B, Ls S, R D, P N, Jd H, Jc C, et al. Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the United States: Impact of Ethnicity. Vol. 40, *Hepatology (Baltimore, Md.)*. *Hepatology*, 2004; 40(6):1387-95.

150. Kf P, S D, J F, D B, J D, Cd M et al. Increased Prevalence of Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Asian-Indian Men. Vol. 103, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006; 103(48):18273-7.
151. Le W, N P, Dw P, Ji R, Jm N, J Z, et al. Association of PNPLA3 With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Minority Cohort: The Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. Vol. 31, Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int, 2011; 31(3):412-6.
152. Jm P, B G, D M, L D, V J, P B, et al. PNPLA3 polymorphism influences liver fibrosis in unselected patients with type 2 diabetes: Liver fibrosis and adiponutrin polymorphism in patients with type 2 diabetes. Liver Int, 2011;31:1332-6.
153. S R, F S, Vm S, M I, T C, V M, et al. The 148M Allele of the PNPLA3 Gene Is Associated With Indices of Liver Damage Early in Life. Vol. 53, Journal of hepatology. J Hepatol, 2010; 53(2):335-8.
154. L V, Aa S, Ak D, E G, R R, P D, et al. Homozygosity for the Patatin-Like phospholipase-3/adiponutrin I148M Polymorphism Influences Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 51, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2010; 51(4):1209-17.
155. C T, R S, D K, Dg B, Da H. Variant in PNPLA3 Is Associated With Alcoholic Liver Disease. Vol. 42, Nature genetics. Nat Genet, 2010;42(1):21-3.
156. H S, S B, K L, Hm S, T B, M R, et al. Genetic Variation in the PNPLA3 Gene Is Associated With Alcoholic Liver Injury in Caucasians. Vol. 53, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2011; 53(1):86-95.
157. E T, E G, N C, D D, T G, D F, et al. PNPLA3 (rs738409 C>G) Is a Common Risk Variant Associated With Hepatocellular Carcinoma in Alcoholic Cirrhosis. Vol. 55, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2012;55(4):1307-8.
158. T M, S B, T B, J H, F S. Distinct, Alcohol-Modulated Effects of PNPLA3 Genotype on Progression of Chronic Hepatitis C. Vol. 55, Journal of hepatology. J Hepatol, 2011; 55(3):732-733.
159. T C, Jf D, B M, T G, M H, D M, et al. Viral Genotype-Specific Role of PNPLA3, PPARG, MTTP, and IL28B in Hepatitis C Virus-Associated Steatosis. Vol. 55, Journal of hepatology. J Hepatol, 2011; 55(3):529-535.
160. M V, L V, P L, F F, Bm M, R DA, et al. Patatin-like Phospholipase Domain-Containing 3 I148M Affects Liver Steatosis in Patients With Chronic Hepatitis B. Vol. 58, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2013; 58(4):1245-52.

161. E T, P P, A P, Y M, E Q, T G, et al. Impact of Patatin-Like phospholipase-3 (rs738409 C>G) Polymorphism on Fibrosis Progression and Steatosis in Chronic Hepatitis C. Vol. 54, *Hepatology* (Baltimore, Md.). *Hepatology*, 2011; 54(1):60-9.
162. M K, F G, V Z, F L. Variant Adiponutrin (PNPLA3) Represents a Common Fibrosis Risk Gene: Non-Invasive Elastography-Based Study in Chronic Liver Disease. Vol. 55, *Journal of hepatology. J Hepatol*, 2011; 55(2):299-306.
163. Ma B, C P, C M, K S, Rm M, Pa S et al. PNPLA3 I148M (rs738409) Genetic Variant Is Associated With Hepatocellular Carcinoma in Obese Individuals. Vol. 44, *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. Dig Liver Dis*, 2012; 44(12):1037-41.
164. Mm S, A K, Cj E, H E-S, M-R S, P C, et al. Genetic variation in the *PNPLA3* gene and hepatocellular carcinoma in USA: Risk and prognosis prediction: *PNPLA3* GENETIC VARIATION AND RISK OF HCC. *Mol Carcinog*, 2013; 52 Suppl 1(0):E139-47.
165. Hd N, C B, C L, T B, T M, F G, et al. The PNPLA3 rs738409 148M/M Genotype Is a Risk Factor for Liver Cancer in Alcoholic Cirrhosis but Shows No or Weak Association in Hepatitis C Cirrhosis. Vol. 6, *PLoS one. PLoS One*, 2011;6(11):e27087.
166. A F, C A, B G, U P, H S, et al. Patatin-like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 rs738409-G in Recipients of Liver Transplants Is a Risk Factor for Graft Steatosis. Vol. 11, *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013;11(12):1667-72.
167. G P, A M, V P, I G, P P. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in the Metabolic Syndrome . Vol. 13, *Current pharmaceutical design. Curr Pharm Des*, 2007; 13(21):2193-8.
168. Nt K, N G, K B, M F, K F, Ch S, et al. The PNPLA3 rs738409 G-allele Associates With Reduced Fasting Serum Triglyceride and Serum Cholesterol in Danes With Impaired Glucose Regulation. Vol. 7, *PLoS one. PLoS One*, 2012;7(7):e40376.
169. K R, C M, M L, Pb C, M F, N L, et al. PNPLA 3 I148M Genetic Variant Associates With Insulin Resistance and Baseline Viral Load in HCV Genotype 2 but Not in Genotype 3 Infection. Vol. 13, *BMC medical genetics. BMC Med Genet*, 2012; 14:13:82.
170. Cn P, C M, C P, Ma B, M A, L B, et al. Paradoxical Lower Serum Triglyceride Levels and Higher Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility in Obese Individuals With the PNPLA3 148M Variant. Vol. 7, *PLoS one. PLoS One*, 2012; 7(6):e39362.

171. C P, M A, Ma B, Rm M, M L, M S, et al. Patatin-like Phospholipase Domain-Containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) Affects Hepatic VLDL Secretion in Humans and in Vitro. Vol. 57, Journal of hepatology. J Hepatol, 2012; 57(6):1276-82.
172. Ek S, Lm Y-A, J W, R H, Lj K, Cd P, et al. Genome-wide Association Analysis Identifies Variants Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits. Vol. 7, PLoS genetics. PLoS Genet, 2011; 7(3):e1001324.
173. Rv F, R Z, Cb N, Tc W. The Problem of Establishing Relationships Between Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance. Vol. 15, Cell metabolism. Cell Metab, 2012; 2;15(5):570-3.
174. Krawczyk M, Portincasa P, Lammert F. PNPLA3-Associated Steatohepatitis: Toward a Gene-Based Classification of Fatty Liver Disease. Semin Liver Dis, 2013; 33(4):369-79.
175. L V, M R, E G, A A, B DM, S DN, et al. Patatin-like Phospholipase Domain-Containing 3 I148M Polymorphism, Steatosis, and Liver Damage in Chronic Hepatitis C. Vol. 53, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2011; 53(3):791-9.
176. E F, C F, S C, A C, D B, E F, et al. PNPLA3 rs738409C/G Polymorphism in Cirrhosis: Relationship With the Aetiology of Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma Occurrence. Vol. 31, Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int, 2011; 31(8):1137-43.
177. E G, A S, P R, C L, A M, R M, et al. PNPLA3 rs738409, Hepatocellular Carcinoma Occurrence and Risk Model Prediction in Patients With Cirrhosis. Vol. 58, Journal of hepatology. J Hepatol, 2013; 58(2):312-8.
178. J K, E S, S S, Bg N, Hh Z, A T-H, et al. Exome-wide Association Study Identifies a TM6SF2 Variant That Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 46, Nature genetics. Nat Genet, 2014 ; 46(4):352-6.
179. Nd P, Sk M, Lm Y-A, Fs F, Lf B, R H, et al. Characterization of european ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of african and hispanic descent: Hepatology, Vol. 00, No. X, 2013. Hepatology, 2013; 58(3):966-75.
180. Y-L L, Hl R, Ad B, D T, S M, Jbs L, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Nat Commun. 2014;5:4309.
181. M G, S C, Ae F, E D, Mm S, B P, et al. Role of TM6SF2 rs58542926 in the Pathogenesis of Nonalcoholic Pediatric Fatty Liver Disease: A Multiethnic Study. Vol. 63, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2016; 63(1):117-25.

182. S S, Go C, R S, P M, T FG, Al B, et al. Genetic Variation in Transmembrane 6 Superfamily Member 2 and the Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Histological Disease Severity. Vol. 61, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2015; 61(2):515-25.
183. VW-S W, GL-H W, C-H T, HL-Y C. Prevalence of the TM6SF2 variant and non-alcoholic fatty liver disease in Chinese. J Hepatol, 2014;61:708–9.
184. B K, Yl L, Ak D, Cp D, Qm A, Ek S. TM6SF2: catch-22 in the Fight Against Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease?. Vol. 148, Gastroenterology. Gastroenterology, 2015; 148(4):679-84.
185. Ol H, H Z, Y F, Dh H, Em S, W Z, et al. Systematic Evaluation of Coding Variation Identifies a Candidate Causal Variant in TM6SF2 Influencing Total Cholesterol and Myocardial Infarction Risk. Vol. 46, Nature genetics. Nat Genet, 2014;46(4):345-51.
186. A G, D C, P M, G C, A DS, L R, et al. TM6SF2 Glu167Lys Polymorphism Is Associated With Low Levels of LDL-cholesterol and Increased Liver Injury in Obese Children. Vol. 11, Pediatric obesity. Pediatr Obes, 2016; 11(2):115-9.
187. Mm S, Pd J, Sd R. Findings on Liver Biopsy to Investigate Abnormal Liver Function Tests in the Absence of Diagnostic Serology. Vol. 35, Journal of hepatology. J Hepatol, 2001; 35(2):195-9.
188. V de L, M C, H T, M W, M A, A de M, et al. Should a Liver Biopsy Be Done in Patients With Subclinical Chronically Elevated Transaminases?. Vol. 16, European journal of gastroenterology & hepatology. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004; 16(9):879-83.
189. K M, Y B, Sk P, S D, S H, Jk J, et al. Role of Polymerase Chain Reaction and Liver Biopsy in the Evaluation of Patients With Asymptomatic Transaminitis: Implications in Diagnostic Approach. Vol. 19, Journal of gastroenterology and hepatology. J Gastroenterol Hepatol, 2004; 19(11):1291-9.
190. Ma T-F, Va A, Ca N, Hs F, E S. Clinical Significance of Elevated Alanine Aminotransferase in Blood Donors: A Follow-Up Study. Vol. 24, Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int, 2004; 24(6):575-81.
191. P M, Mj C, M H, C S, Ra F, Va L, et al. Clinical and Histologic Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated With Normal ALT Values. Vol. 37, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2003;37(6):1286-92.
192. P S, G T, P C, A P, Ml T, R V, et al. Silent Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-A Clinical-Histological Study. Vol. 41, Journal of hepatology. J Hepatol, 2004; 41(5):751-7.

193. A P, Sp N, Pj T. Prevalence of Obesity and Diabetes in Patients With Cryptogenic Cirrhosis: A Case-Control Study. Vol. 32, *Hepatology* (Baltimore, Md.). *Hepatology*, 2000; 32(4 Pt 1):689-92.
194. Ba N-T, Em B, Kr W, D O, Br B. Improved Nonalcoholic Steatohepatitis After 48 Weeks of Treatment With the PPAR-gamma Ligand Rosiglitazone. Vol. 38, *Hepatology* (Baltimore, Md.). *Hepatology*, 2003;34(8);
195. L F, O C, D W, R P, L S. Impact of Steatosis on Progression of Fibrosis in Patients With Mild Hepatitis C. Vol. 41, *Hepatology* (Baltimore, Md.). *Hepatology*, 2005;41(1):82-7.
196. La A, P A. Recent Concepts in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 22, *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. *Diabet Med*, 2005; 22(9):1129-33.
197. A N, Y E, M T, T T, T K, T Y, et al. Clinical and Pathological Features of Non-Alcoholic Steatohepatitis . Vol. 33, *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. *Hepatol Res*, 2005;33(2):116-21.
198. K Z, C S, A F, H H, M S, L K, et al. p62 Is a Common Component of Cytoplasmic Inclusions in Protein Aggregation Diseases. Vol. 160, *The American journal of pathology*. *Am J Pathol*, 2002; 160(1):255-63.
199. Bf B, L S, J Z, K T, Hl B. Ubiquitin as a Marker of Cell Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis . Vol. 114, *American journal of clinical pathology*. *Am J Clin Pathol*, 2000;114(6):860-6.
200. Me G, Gj G. Apoptosis: A Mechanism of Acute and Chronic Liver Injury. Vol. 54, *Gut*. *Gut*, 2005; 54(7):1024-33.
201. Ae F, A C, P A, M T, Lj B, Kd L, et al. Hepatocyte Apoptosis and Fas Expression Are Prominent Features of Human Nonalcoholic Steatohepatitis. Vol. 125, *Gastroenterology*. *Gastroenterology*, 2003; 125(2):437-43.
202. D P, B F. NASH: A Mitochondrial Disease. Vol. 42, *Journal of hepatology*. *J Hepatol*, 2005;42(6):928-40.
203. Aj S, C C-S, F M, Wb R, Mj C, Rk S, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: Association of Insulin Resistance and Mitochondrial Abnormalities. Vol. 120, *Gastroenterology*. *Gastroenterology*, 2001; 120(5):1183-92.
204. Sh C, Rh S, Em K, Jc I, Ee H, Jk P, et al. Mitochondrial Abnormalities in Non-Alcoholic Steatohepatitis. Vol. 31, *Journal of hepatology*. *J Hepatol*, 1999;31(3):430-4.
205. Th L, Sh C, Ja R, Bl S, Ca D, Ko A, et al. The Zonal Distribution of Megamitochondria With Crystalline Inclusions in Nonalcoholic Steatohepatitis. Vol. 39, *Hepatology* (Baltimore, Md.). *Hepatology*, 2004;39(5):1423-9.

206. Jh L, Jh H, N R. Kupffer Cell Aggregation and Perivenular Distribution in Steatohepatitis. Vol. 15, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. Mod Pathol*, 2002; 15(7):699-704.
207. Am D, Zp L, Hz L, Sq Y. Cytokines and the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. Vol. 54, *Gut*. *Gut*, 2005; 54(2):303-6.
208. Sh C, Dm C. The Spectrum Expanded: Cryptogenic Cirrhosis and the Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 40, *Journal of hepatology. J Hepatol*, 2004; 40(4):578-84.
209. E B, N L, E V, G M, F B, P C, et al. Expanding the Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Cryptogenic Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma. Vol. 123, *Gastroenterology. Gastroenterology*, 2002; 123(1):134-40.
210. A S, A G. Epidemic of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. Vol. 8, *World journal of clinical oncology. World J Clin Oncol*, 2017; 8(6):429-36.
211. S M, Hb E-S. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: Consider the Population. Vol. 47 Suppl, *Journal of clinical gastroenterology. J Clin Gastroenterol*, 2013;47 Suppl(0):S2-6.
212. V R, L B, V DM, F C, L C, Mh S-T, et al. Survival, Liver Failure, and Hepatocellular Carcinoma in Obesity-Related Cryptogenic Cirrhosis. Vol. 35, *Hepatology (Baltimore, Md.)*. *Hepatology*, 2002; 35(6):1485-93.
213. Ja D, Ro M, Y S, Ka M, Hb E-S. Diabetes Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma in the United States: A Population Based Case Control Study. Vol. 54, *Gut*. *Gut*, 2005;54(4):533-9.
214. S Y, A K, H L, J H, T R, V D, et al. Oval Cells Compensate for Damage and Replicative Senescence of Mature Hepatocytes in Mice With Fatty Liver Disease. Vol. 39, *Hepatology (Baltimore, Md.)*. *Hepatology*, 2004;39(2):403-11.
215. L L, V D, B VD, T R. The Immunohistochemical Phenotype of Dysplastic Foci in Human Liver: Correlation With Putative Progenitor Cells. Vol. 33, *Journal of hepatology. J Hepatol*, 2000;33(1):76-84.
216. L L, V D, T R. Preneoplastic Lesions in Human Hepatocarcinogenesis . Vol. 25, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int*, 2005; 25(1):16-27.
217. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005; 41(6):1313-21.

218. Jb D, Ps B, Pe O. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. Vol. 121, Gastroenterology. Gastroenterology, 2001; 121(1):91-100.
219. Jb D, Ps B, Nr H, Pe O. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Improvement in Liver Histological Analysis With Weight Loss. Vol. 39, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2004;39(6):1647-54.
220. Ga A, Ss K, Aj L, Rh C. Portal Fibrosis and Hepatic Steatosis in Morbidly Obese Subjects: A Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 40, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2004; 40(2):475-83.
221. La A, Kd L, P A. The Prevalence of Autoantibodies and Autoimmune Hepatitis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 99, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2004; 99(7):1316-20.
222. Sj C, K K, A K, Dm J, S J. Prevalence and Significance of Autoantibodies in Patients With Non-Alcoholic Steatohepatitis. Vol. 38, Journal of clinical gastroenterology. J Clin Gastroenterol, 2004;38(9):801-4.
223. Aj C, Ha H. Autoantibodies in Liver Disease . Vol. 120, Gastroenterology. Gastroenterology, 2001; 120(1):239-49.
224. G A, Fd G, Wd L, E P, Jj P, Rl J, et al. Cryptogenic Cirrhosis: Clinicopathologic Findings at and After Liver Transplantation. Vol. 33, Human pathology. Hum Pathol, 2002; 33(11):1098-104.
225. T R, Sq Y, A K, A D, R D, X H, et al. Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans With Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 163, The American journal of pathology. Am J Pathol, 2003; 163(4):1301-11.
226. Ad C, Ee P, Mj W, Mm R, Aj D, Jr J. Fibrosis Correlates With a Ductular Reaction in Hepatitis C: Roles of Impaired Replication, Progenitor Cells and Steatosis. Vol. 41, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2005;41(4):809-18.
227. P S, G T, A P, P M, O P, P C. A Clinical-Morphological Study on Cholestatic Presentation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 50, Digestive diseases and sciences. Dig Dis Sci, 2005;50(6):1130-5.
228. T G, De K, Aj M, Ca M, N B, Zm Y. Pathologic Features Associated With Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 35, Human pathology. Hum Pathol, 2004;35(2):196-9.
229. S C, M W, Gc F, D M, J K, C L, et al. HFE Mutations, Hepatic Iron, and Fibrosis: Ethnic-Specific Association of NASH With C282Y but Not With Fibrotic Severity. Vol. 36, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2002; 36(1):142-9.
230. Ae R. Nonalcoholic Steatohepatitis . Vol. 121, Gastroenterology. Gastroenterology, 2001; 121(3):710-23.

231. Zm Y, T G, Br B, Ca M, N B, R O, et al. Hepatic Iron and Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 30, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 1999; 30(4):847-50.
232. E B, P M, S D, E V, F L, N L, et al. Relative Contribution of Iron Burden, HFE Mutations, and Insulin Resistance to Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver. Vol. 39, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2004; 39(6):1748.
233. S C, J G. Interaction of Iron, Insulin Resistance, and Nonalcoholic Steatohepatitis. Vol. 5, Current gastroenterology reports. Curr Gastroenterol Rep, 2003; 5(1):18-25.
234. Dk G, S G, Ga M, Li C, Ni W, Pj W, et al. Increased Hepatic Iron Concentration in Nonalcoholic Steatohepatitis Is Associated With Increased Fibrosis . Vol. 114, Gastroenterology. Gastroenterology, 1998;10:2306-18.
235. Ea R. Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Children . Vol. 10, Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. Front Biosci, 2005; 10:2306-18.
236. Aw M, Aj B, A D. Fatty Liver Disease in Children. Vol. 89, Archives of disease in childhood. Arch Dis Child, 2004;89(7):648-52.
237. Je L, Jb S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Pediatric Population. Vol. 8, Clinics in liver disease. Clin Liver Dis, 2004;8(3):549-58.
238. K N. Non-alcoholic Steatohepatitis in Children. Vol. 8, Pediatric transplantation. Pediatr Transplant, 2004; 8(6):613-8.
239. D S, Db M, JI T, Tm T, J H, Kd L. An Assessment of the Role of Liver Biopsies in Asymptomatic Patients With Chronic Liver Test Abnormalities . Vol. 95, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2000; 95(11):3206-10.
240. D J, Vr T, Bb S. Diagnosis of Fatty Liver Disease: Is Biopsy Necessary?. Vol. 15, European journal of gastroenterology & hepatology. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003;15(5):539-43.
241. S R, Aj S. Evaluation and Management of Non-Alcoholic Steatohepatitis. Vol. 42 Suppl, Journal of hepatology. J Hepatol, 2005; 42 Suppl(1):S2-12.
242. Ba N-T, Sh C. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. Vol. 37, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2003;37(5):1202-19.
243. Rg L. Nonalcoholic Steatohepatitis: Tightening the Morphological Screws on a Hepatic Rambler. Vol. 21, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 1995; 21(6):1742-3.
244. V R, T P. NASH: A Hidden and Silent Fibroser Finally Revealed? . Vol. 42, Journal of hepatology. J Hepatol, 2005;42(1):12-4.

245. A G, Ca M, Js P, Mj B, Sk R. Hepatic Steatosis in Chronic Hepatitis B and C: Predictors, Distribution and Effect on Fibrosis. Vol. 43, Journal of hepatology. J Hepatol, 2005; 43(1):38-44.
246. Nm de A, Cp D. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: The Mist Gradually Clears . Vol. 48 Suppl 1, Journal of hepatology. J Hepatol, 2008; 48 Suppl 1:S104-12.
247. Sf Q, Bb G. Characteristic Sonographic Signs of Hepatic Fatty Infiltration. Vol. 145, AJR. American journal of roentgenology. AJR Am J Roentgenol, 1985;145(4):753-5.
248. Ae J, Sh S, S al-S, Mg C, Jd M. Comparison of Liver Histology With Ultrasonography in Assessing Diffuse Parenchymal Liver Disease. Vol. 43, Clinical radiology. Clin Radiol, 1991; 43(1):26-31.
249. C V, R I, E A, T M, M H, R P, et al. Fat in the Liver: Diagnosis and Characterization . Vol. 16, European radiology. Eur Radiol, 2006;16(10):2292-308.
250. R H, M L, S B, I K, Fl B, E G, et al. Diagnostic Accuracy and Reliability of Ultrasonography for the Detection of Fatty Liver: A Meta-Analysis . Vol. 54, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2011; 54(3):1082-1090.
251. S S, Sk V, Z W, Fh M, U M, Rn L, et al. Diagnostic Performance of Magnetic Resonance Elastography in Staging Liver Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Participant Data . Vol. 13, Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015; 13(3):440-451.e6.
252. R K, K S, T K, S S, H D, Y N. Quantitative Evaluation of Fatty Liver by Computed Tomography in Rabbits . Vol. 142, AJR. American journal of roentgenology. AJR Am J Roentgenol, 1984;142(4):741-6.
253. Gm B, L K, Rw C, D H, S S, L B. Accuracy of Computed Tomography in Diagnosis of Fatty Liver . Vol. 281, British medical journal. Br Med J, 1980; 281(6247):1042.
254. M I, Y T, M H, S M, H H, Y M, et al. Noninvasive Evaluation of Graft Steatosis in Living Donor Liver Transplantation . Vol. 78, Transplantation. Transplantation, 2004; 78(10):1501-5.
255. Cc P, P N, C H, R B, K R, L F, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease Vol. 152, Gastroenterology. Gastroenterology, 2017; 152(3):598-607.e2.
256. M N, J L, Mr P, M M, G H, Ta L, et al. Utility of Magnetic Resonance Imaging Versus Histology for Quantifying Changes in Liver Fat in Nonalcoholic Fatty

- Liver Disease Trials . Vol. 58, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2013; 58(6):1930-40.
257. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive Tests for Evaluation of Liver Disease Severity and Prognosis . Vol. 63, Journal of hepatology. J Hepatol, 2015; 63(1):237-64.
 258. G X, S Z, X X, L Y, J Y, G W. Comparison of Laboratory Tests, Ultrasound, or Magnetic Resonance Elastography to Detect Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. Vol. 66, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2017; 66(5):1486-1501.
 259. Vw W, J V, Gl W, J F, Hl C, B LB, et al. Diagnosis of Fibrosis and Cirrhosis Using Liver Stiffness Measurement in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 51, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2010; 51(2):454-62.
 260. Vw W, J V, Gl W, J F, Aw C, F C, et al. Liver Stiffness Measurement Using XL Probe in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 107, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2012; 107(12):1862-71.
 261. S P, E V, E B, V DM, C C, D C, et al. The Combination of Liver Stiffness Measurement and NAFLD Fibrosis Score Improves the Noninvasive Diagnostic Accuracy for Severe Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 35, Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int, 2015; 35(5):1566-73.
 262. Eb T, N S, Mg H, Nh A, M L. Cost-Effective Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease With NAFLD Fibrosis Score and Vibration Controlled Transient Elastography. Vol. 110, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2015; 110(9):1298-304.
 263. Wk C, Nr NM, S M. A Novel 2-step Approach Combining the NAFLD Fibrosis Score and Liver Stiffness Measurement for Predicting Advanced Fibrosis. Vol. 9, Hepatology international. Hepatol Int, 2015; 9(4):594-602.
 264. J B, D C, Cf D, J F, J B, F C, et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 1: Basic Principles and Technology. Vol. 34, Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980). Ultraschall Med, 2013; 34(2):169-84.
 265. C C, J B, V de L, J L, B L, P C, et al. Liver Stiffness in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Comparison of Supersonic Shear Imaging, FibroScan, and ARFI With Liver Biopsy . Vol. 63, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2016; 63(6):1817-27.
 266. G F, C T, B DB, M Z, G F, C F. Accuracy of Real-Time Shear Wave Elastography for Assessing Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C: A Pilot Study . Vol. 56, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2012; 56(6):2125-33.

267. Ps D, Cb S, R L. MRI and MRE for Non-Invasive Quantitative Assessment of Hepatic Steatosis and Fibrosis in NAFLD and NASH: Clinical Trials to Clinical Practice . Vol. 65, Journal of hepatology. J Hepatol, 2016;65(5):1006-1016.
268. K I, T K, Y H, W T, Y O, H M, et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. Vol. 150, Gastroenterology. Gastroenterology, 2016; 150(3):626-637.e7.
269. G B, S B, L M, F M, M P, A C, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. BMC Gastroenterol, 2006;6:33.
270. G C, G L, F R, Mp G, P C, M V, et al. Fatty Liver Index and Mortality: The Cremona Study in the 15th Year of Follow-Up . Vol. 54, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2011; 54(1):145-52.
271. Jh L, D K, Hj K, Ch L, Ji Y, W K, et al. Hepatic Steatosis Index: A Simple Screening Tool Reflecting Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 42, Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. Dig Liver Dis, 2010; 42(7):503-8.
272. S S, Zm Y, Em R, T G, Jp O, M H, et al. The Utility of Radiological Imaging in Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 123, Gastroenterology. Gastroenterology, 2002; 123(3):745-50.
273. A K, M P, A H, K S, R B, Lm J, et al. Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Liver Fat Using Metabolic and Genetic Factors . Vol. 137, Gastroenterology. Gastroenterology, 2009; 137(3):865-72.
274. T P, V R, S N, D T, F C, D M, et al. The Diagnostic Value of Biomarkers (SteatoTest) for the Prediction of Liver Steatosis. Vol. 4, Comparative hepatology. Comp Hepatol, 2005; 4:10.
275. Tc Y, Aj M, Vw W, Yk T, Hl C, Pc Y, et al. Laboratory Parameter-Based Machine Learning Model for Excluding Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in the General Population. Vol. 46, Alimentary pharmacology & therapeutics. Aliment Pharmacol Ther, 2017; 46(4):447-456.
276. Se K, Hm P, Ij H, Sr G, Mp W, Js C, et al. NAFLD in Clinical Practice: Can Simple Blood and Anthropometric Markers Be Used to Detect Change in Liver Fat Measured by ¹H-MRS?. Vol. 37, Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int, 2017; 37(12):1907-1915.
277. R V, Ak J, R D, K Y, M C, Hc M, et al. Relationship Between Changes in Serum Levels of Keratin 18 and Changes in Liver Histology in Children and Adults With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 12, Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American

- Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014; 12(12):2121-30.e1-2.
278. R K, Yk T, Gl W, Y H, Au L, Mc N, et al. Systematic Review With Meta-Analysis: Non-Invasive Assessment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease--The Role of Transient Elastography and Plasma cytokeratin-18 Fragments. Vol. 39, Alimentary pharmacology & therapeutics. Aliment Pharmacol Ther, 2014;39(3):254-69.
 279. Ti T, Hm E, N A, Lm Y, Mp B, R L, et al. An Apoptosis Panel for Nonalcoholic Steatohepatitis Diagnosis. Vol. 54, Journal of hepatology. J Hepatol,2011; 54(6):1224-9.
 280. V A, Er P, Nm B, Na T, Kp Y, R G, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology , 2017;65:65–77.
 281. Kv K, P B, La W, M-M Y, Ba N-T, N C, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology , 2012;55:77–85.
 282. Gb G, D I, R L, S D, J D, R S, et al. The Development of a Non-Invasive Model to Predict the Presence of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 31, Journal of gastroenterology and hepatology. J Gastroenterol Hepatol, 2016; 31(5):995-1000.
 283. Y S, M Y, H H, K Y, M O, H F, et al. A Simple Clinical Scoring System Using Ferritin, Fasting Insulin, and Type IV Collagen 7S for Predicting Steatohepatitis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 46, Journal of gastroenterology. J Gastroenterol, 2011; 46(2):257-68.
 284. T R, Sq Y, A K, A D, R D, X H, et al. Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans With Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 163, The American journal of pathology. Am J Pathol, 2003; 163(4):1301-11.
 285. P P, Mm W, O C, F M, C S, H-K M, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology, 2009; 50:1827–38.
 286. Ae F, R L, Ta T, L Y, Ym C, M B, et al. Mass Spectrometric Profiling of Oxidized Lipid Products in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis . Vol. 51, Journal of lipid research. J Lipid Res, 2010; 51(10):3046-54.
 287. Sm W, T H, T H, Ml J, Pj van G, Ac V, et al. Plasma Cathepsin D Levels: A Novel Tool to Predict Pediatric Hepatic Inflammation. Vol. 110, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2015;110(3):462-70.

288. Sm W, T H, Ss R, V B, T H, Pj van G, et al. Plasma Cathepsin D Correlates With Histological Classifications of Fatty Liver Disease in Adults and Responds to Intervention. Vol. 6, Scientific reports. Sci Rep, 2016;6:38278.
289. Mh J, A B, R C, B R, M S, C B, et al. Adipokines and Cytokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 27, Alimentary pharmacology & therapeutics. Aliment Pharmacol Ther, 2008;27(5):412-21.
290. J S, Hl C, Gl W, Pc C, Aw C, Hy C, et al. Non-invasive Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis by Combined Serum Biomarkers . Vol. 56, Journal of hepatology. J Hepatol, 2012; 56(6):1363-70.
291. Sa P, J K, Cs M. Adipokines in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 65, Metabolism: clinical and experimental. Metabolism, 2016; 65(8):1062-79.
292. L H, L D, Q Z, J G, J Z, W S, et al. Diagnostic Value of CK-18, FGF-21, and Related Biomarker Panel in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 2017, BioMed research international. Biomed Res Int, 2017; 2017:9929107.
293. Zm Y, M J, C N, M R, M A, M S, et al. A Novel Diagnostic Biomarker Panel for Obesity-Related Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) . Vol. 18, Obesity surgery. Obes Surg, 2008;18(11):1430-7.
294. Sg S, Sl F, Fd G, S C. AST/ALT Ratio Predicts Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. Vol. 93, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 1998; 93(1):44-8.
295. Aa S, Rp M. Diagnostic Accuracy of the Aspartate Aminotransferase-To-Platelet Ratio Index for the Prediction of Hepatitis C-related Fibrosis: A Systematic Review. Vol. 46, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2007;46(3):912-21.
296. Rk S, E L, N C, R S, Mc C, J M, et al. Development of a Simple Noninvasive Index to Predict Significant Fibrosis in Patients With HIV/HCV Coinfection. Vol. 43, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2006;43(6):1317-25.
297. P A, Jm H, G M, E B, J G, Gc F, et al. The NAFLD Fibrosis Score: A Noninvasive System That Identifies Liver Fibrosis in Patients With NAFLD . Vol. 45, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2007;45(4):846-54.
298. Vw W, Gl W, Am C, Am T, Sw T, Ay H, et al. Validation of the NAFLD Fibrosis Score in a Chinese Population With Low Prevalence of Advanced Fibrosis . Vol. 103, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2008; 103(7):1682-8.
299. P A, E B, Es B, P C, Pr M, F B, et al. Simple Noninvasive Systems Predict Long-Term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 145, Gastroenterology. Gastroenterology, 2013; 145(4):782-9.e4.

300. Sa H, D O, HI A, S G, Ba N-T. Development and Validation of a Simple NAFLD Clinical Scoring System for Identifying Patients Without Advanced Disease . Vol. 57, Gut. Gut, 2008;57(10):1441-7.
301. A U-A, Ce R. Liver Fibrosis Scores Predict Liver Disease Mortality in the United States Population. Vol. 66, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2017; 66(1):84-95.
302. F I-B, V R, L P, F C, Y B, T P. Biochemical Markers of Liver Fibrosis in Patients With Hepatitis C Virus Infection: A Prospective Study . Vol. 357, Lancet (London, England). Lancet, 2001; 357(9262):1069-75.
303. M M, D T, Q A, F C, G M, E B, et al. Diagnostic Performance of FibroTest, SteatoTest and ActiTest in Patients With NAFLD Using the SAF Score as Histological Reference . Vol. 44, Alimentary pharmacology & therapeutics. Aliment Pharmacol Ther, 2016; 44(8):877-89.
304. J B, V de L, V L, R A, S F, D S, et al. A Stepwise Algorithm Using an At-A-Glance First-Line Test for the Non-Invasive Diagnosis of Advanced Liver Fibrosis and Cirrhosis. Vol. 66, Journal of hepatology. J Hepatol, 2017; 66(6):1158-65.
305. Tc L, JI W, Jc L, GI W, Ss S, Am C, et al. Application of the Combined FibroMeter Vibration-Controlled Transient Elastography Algorithm in Chinese Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 32, Journal of gastroenterology and hepatology. J Gastroenterol Hepatol, 2017;32(7):1363-69.
306. J B, J V, A G, Jb H, A L, B LB, et al. Diagnostic Accuracy and Prognostic Significance of Blood Fibrosis Tests and Liver Stiffness Measurement by FibroScan in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 65, Journal of hepatology. J Hepatol, 2016; 65(3):570-8.
307. F B, Mj M , Mp C, J-M C, T P, C S-P, et al. Performance of the SteatoTest, ActiTest, NashTest and FibroTest in a multiethnic cohort of patients with type 2 diabetes mellitus. J Investig Med, 2019; 67(2):303-311.
308. Vw W, GI W, Pc C, Aw C, Mk L, Hy C, et al. Disease Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Prospective Study With Paired Liver Biopsies at 3 Years. Vol. 59, Gut. Gut, 2010;59(7):969-74.
309. R P, F C, L F, P B, P L, T P, et al. A Systematic Review of Follow-Up Biopsies Reveals Disease Progression in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver. Vol. 59, Journal of hepatology. J Hepatol, 2013;59(3):550-6.
310. Ak S, P G, B H, Yf K, H S, Rh W. Evolving Frequency and Outcomes of Liver Transplantation Based on Etiology of Liver Disease . Vol. 95, Transplantation. Transplantation, 2013; 95(5):755-60.

311. Vg A, Fm K, Jc H, M W, C H, A R, et al. Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis: The New Epidemic . Vol. 256, *Annals of surgery. Ann Surg*, 2012; 256(4):624-33.
312. Jd Y, Mf A, H P, Cd G, Ad S, Am D, et al. Gender and Menopause Impact Severity of Fibrosis Among Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. Vol. 59, *Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology*, 2014;59(4):1406-14.
313. Js K, Jd Y, Mf A, Cd G, Rm G, K Y, et al. A Longer Duration of Estrogen Deficiency Increases Fibrosis Risk Among Postmenopausal Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 64, *Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology*, 2016;64(1):85-91.
314. R L, C O-L, B O, J F, A W, F B, et al. Role of Ethnicity in Overweight and Obese Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. Vol. 54, *Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology*, 2011; 54(3):837-45.
315. K B, P B, M A, La W, M P, L F, et al. Ethnicity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 55, *Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology*, 2012; 55(3):769-80.
316. Sr M, Tn T, D H, Bl O, Dm J, J H. Influence of Ethnicity on Histological Differences in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 50, *Journal of hepatology. J Hepatol*, 2009;50(4):797-804.
317. N H, A A, M S, F N, M S, N R, et al. Independent Predictors of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 7, *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009; 7(11):1224-9.
318. S S, Am A, Z W, Lj P, Mh M, R L. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Paired-Biopsy Studies . Vol. 13, *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015; 13(4):643-54.e1-9; quiz e39-40.
319. La A, S S, Kd L, P A. The Histological Course of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Longitudinal Study of 103 Patients With Sequential Liver Biopsies . Vol. 42, *Journal of hepatology. J Hepatol*, 2005;42(1):132-8.
320. S M, T H, E H, Ad B, Cp D, Qm A. Evidence of NAFLD Progression From Steatosis to Fibrosing-Steatohepatitis Using Paired Biopsies: Implications for Prognosis and Clinical Management . Vol. 62, *Journal of hepatology. J Hepatol*, 2015; 62(5):1148-55.
321. Ac de F, Ac C, Jc C. The Impact of Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 11, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008; 11(3):267-74.

322. Ec V, Pd B. Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Obesity and Fatty Liver: Impact of Bariatric Surgery . Vol. 28, Seminars in liver disease. Semin Liver Dis, 2008;28(4):407-26.
323. P M, A H, L A, D B, E L, R C, et al. Prospective Study of the Long-Term Effects of Bariatric Surgery on Liver Injury in Patients Without Advanced Disease. Vol. 137, Gastroenterology. Gastroenterology, 2009;137(2):532-40.
324. C R, Gm C. The Impact of Bariatric Surgery on Nonalcoholic Steatohepatitis . Vol. 32, Seminars in liver disease. Semin Liver Dis, 2012; 32(1):80-91.
325. V W, Te A, B E, P M, Ar M, H T. Weight Loss Induced by Bariatric Surgery Restores Adipose Tissue PNPLA3 Expression . Vol. 37, Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. Liver Int, 2017;37(2):299-306.
326. Dm Y, Cg V, L P, Bj P. Weight Loss Outcomes After Liver Biopsy in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 46, Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. Dig Liver Dis, 2014; 46(12):1136-7.
327. Ej P, Jh L, Gy Y, G H, Sr A, Rg H, et al. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. Vol. 140, Cell. Cell, 2010; 140(2):197-208.
328. J D, B J, D C, R L, J G, D D, et al. Hepatocellular Cancer: The Impact of Obesity, Type 2 Diabetes and a Multidisciplinary Team . Vol. 60, Journal of hepatology. J Hepatol,2014; 60(1):110-7.
329. S M, Yh S, Hb E-S, F K, Z D, S T, et al. Temporal Trends of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Related Hepatocellular Carcinoma in the Veteran Affairs Population. Vol. 13, Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015;13(3):594-601.e1.
330. S Y, E H, M T, M T, K T, K S. Clinical Features and Outcomes of Cirrhosis Due to Non-Alcoholic Steatohepatitis Compared With Cirrhosis Caused by Chronic Hepatitis C. Vol. 24, Journal of gastroenterology and hepatology. J Gastroenterol Hepatol, 2009;24(2):248-54.
331. Y K, Y A, K I, Y S, N I, T H, et al. Large-scale Long-Term Follow-Up Study of Japanese Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease for the Onset of Hepatocellular Carcinoma. Vol. 107, The American journal of gastroenterology. Am J Gastroenterol, 2012;107(2):253-61.
332. G G, Em B, Lm P, G C, Tj L, Sj C. Does Nonalcoholic Fatty Liver Disease Predispose Patients to Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis? . Vol. 132, Archives of pathology & laboratory medicine. Arch Pathol Lab Med, 2008;132(11):1761-6.

333. V R, T P. Assessing the Outcome of Nonalcoholic Steatohepatitis? It's Time to Get Serious . Vol. 44, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2006; 44(4):802-5.
334. G P, G L, F DC, A E, E B, G N, et al. Increased Mediastinal Fat and Impaired Left Ventricular Energy Metabolism in Young Men With Newly Found Fatty Liver . Vol. 47, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2008;47(1):51:8.
335. G T, M C, L B, S R, L Z, G L, et al. Increased Risk of CKD Among Type 2 Diabetics With Nonalcoholic Fatty Liver Disease . Vol. 19, Journal of the American Society of Nephrology : JASN. J Am Soc Nephrol, 2008;19(8):1564-70.
336. G T, L B, S R, G Z, G L, C D, et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Is Independently Associated With an Increased Prevalence of Chronic Kidney Disease and Proliferative/Laser-Treated Retinopathy in Type 2 Diabetic Patients . Vol. 51, Diabetologia. Diabetologia, 2008;51(3):444-50.
337. R V, N C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Selected Practical Issues in Their Evaluation and Management. Vol. 49, Hepatology (Baltimore, Md.). Hepatology, 2009;49(1):306-17.
338. Rr M, Ks K, S C, Gk S. Effect of Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis . Vol. 6, Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008; 6(12):1396-402.
339. F A, M B, C A, M DB, F L. Drugs Improving Insulin Resistance for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and/or Non-Alcoholic Steatohepatitis . The Cochrane database of systematic reviews. Cochrane Database Syst Rev, 2007; (1):CD005166.
340. V R, P G, S J, F C, A H-H, L S, et al. Rosiglitazone for Nonalcoholic Steatohepatitis: One-Year Results of the Randomized Placebo-Controlled Fatty Liver Improvement With Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial . Vol. 135, Gastroenterology. Gastroenterology, 2008;135(1):100-10.
341. Rh E, Sm G, Pz Z. The Metabolic Syndrome . Vol. 365, Lancet (London, England). Lancet, 2005;365(9468):1415-28.
342. Kg A, Pz Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation . Vol. 15, Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. Diabet Med, 1998;15(7):539-53.
343. Dr M, Jp H, As R, Ba N, Df T, Rc T. Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Beta-Cell Function From Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man. Vol. 28, Diabetologia. Diabetologia, 1985;28(7):412-9

344. R W, J D, Ts B, Wv T, Se T, Cw Y, et al. Obesity and the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents . Vol. 350, The New England journal of medicine. N Engl J Med, 2004;350(23):2362-74
345. S C, M W, P A, M N, Wh D. Prevalence of a Metabolic Syndrome Phenotype in Adolescents: Findings From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994 . Vol. 157, Archives of pediatrics & adolescent medicine. Arch Pediatr Adolesc Med, 2003;157(8):821-7.
346. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol. 2016;64:1388–402.
347. M R. The liver in focus. Diabetologia. 2016;59:1095–7.
348. R L, M A, A U, L W, J L, E D, et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. Hepatol Baltim Md. 2012;56:943–51.
349. Cd W, J S, Mi A, Dm T, J S, M C, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. Gastroenterology. 2011;140:124–31.
350. I D, N P, M P, R L. Prognostic implication of liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease in diabetes. J Diabetes Complications. 2013;27:293–300.
351. R K, K-C C, GL-H W, Y Z, HL-Y C, AO-Y L, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. Gut. 2016;65:1359–68.
352. Em K, Epc P, Jnl S, Be H, Sm D, P T, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. Hepatol Baltim Md. 2016;63:138–47.
353. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. Lancet Lond Engl. 2016;387:1513–30.
354. H Y-J Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014;2:901–10.
355. Qm A, G T, Cp D. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013;10:330–44.

356. A L, S B, G M, P A, P L. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2015;47:181–90.
357. Zt B. Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*. 2004;27:824–30.
358. P G, D A, S A, R B, P K, S P, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:854–8.
359. Nc L, Gf S, Ale A, Ca V-N, Crl C. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2009;29:113–9.
360. H Y-J. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Diabetologia*. 2016;59:1104–11.
361. P A. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346:1221–31.
362. G M, M B, Am M-L, G B, E B, Aj M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*. 1999;107:450–5.
363. M G, M M, E B, Ra D, E B, A G. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5:1544–60.
364. J S, K K, L K, K S, Aj S, M C, et al. Lower fasting muscle mitochondrial activity relates to hepatic steatosis in humans. *Diabetes Care*. 2014;37:468–74.
365. Dr M, Jp H, As R, Ba N, Df T, Rc T. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–9.
366. D-H L, M-H H, J-H K, Dc C, Md G, M S, et al. Gamma-glutamyltransferase and diabetes--a 4 year follow-up study. *Diabetologia*. 2003;46:359–64.
367. Ajg H, K W, A F, Le W, Rb DA, Sm H. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2005;54:3140–7.
368. W G, Jm M, Rs V, Rb DA, Rc E, Cs F. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology*. 2008;135:1935–44, 1944.e1.
369. A F, R H, N S, S E, G D-S, Da L. Alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, and incident diabetes: the British Women's Heart and Health Study and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2009;32:741–50.

370. Al F, L V, E B, M A, A C, E V, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*. 2008;48:792–8.
371. Mj A, La A, A C, W-K S. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59:1174–97.
372. K-C S, Sh W, Cd B. Resolution of fatty liver and risk of incident diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:3637–43.
373. S M, T H, E H, Ad B, Cp D, Qm A. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol*. 2015;62:1148–55.
374. R P, F C, L F, P B, P L, T P, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol*. 2013;59:550–6.
375. M E, Le F, UI M, L T, M H, G B, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44:865–73.
376. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2016;64:1388–402.
377. G M, R F, K N, J R, A Z, M B, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 2013;31:1281–357.
378. R M, M M, F I-B, D M, V R, T P. FibroMAX: towards a new universal biomarker of liver disease? *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7:481–90.
379. M M, V R, R M, D M, F I-B, T P. Noninvasive biomarkers for the screening of fibrosis, steatosis and steatohepatitis in patients with metabolic risk factors: FibroTest-FibroMax experience. *J Gastrointest Liver Dis JGLD*. 2008;17:187–91.
380. L F, F N, R P, F C, C H, V R et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40:1209–22.
381. C S, S M. Non-invasive assessment of liver fibrosis: Between prediction/prevention of outcomes and cost-effectiveness. *World J Gastroenterol*. 2016;22:1711–20.
382. V dL, J V, C G, J F, E M, L C, et al. Screening for liver fibrosis by using FibroScan(®) and FibroTest in patients with diabetes. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2012;44:413–8.
383. Castera L. Noninvasive Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2015;35:291–303.

384. Sb R, I C, G H, Cb S. Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Magn Reson Imaging*, 2011 ;34:spcone-spcone.
385. Is I, H A, R I, G K, B S, A E, et al. Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy. *Radiology*. 2013;267:767–75.
386. La A, S H, JI St S, P C, Fb E, T T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1567–73.
387. R de M, F L, G Z, G V, E B, M M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1999;22:756–61.
388. P A, Jc K, Kp B, Kd L. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356–62.
389. Fgs T, Ad S, De K. Influence of hepatic steatosis (fatty liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:1845–50.
390. L-Z C, Y-N X, N G, M J, D-D Z, S-Y X. *PNPLA3* I148M variant in nonalcoholic fatty liver disease: Demographic and ethnic characteristics and the role of the variant in nonalcoholic fatty liver fibrosis. *World J Gastroenterol*, 2015;21:794.
391. A G, N H, S O, Mm N, A D, E E, et al. Waist circumference is a mediator of dietary pattern in Non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2018;8:4788.
392. Q P, J-Y Z, S-D S, K Q, X-S X, S-S L, et al. Central obesity and nonalcoholic fatty liver disease risk after adjusting for body mass index. *World J Gastroenterol*. 2015;21:1650–62.
393. E B, E G, R M, S N, E V, N V, et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1082–90.
394. A K, L J, A H, J W, A C, R B, et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2008;31:165–9.
395. M M, V R, T B, et al. Liver Biopsy in type 2 diabetes mellitus: Steatohepatitis represents the sole feature of liver damage. *PLoS One*. 2017 Jun 1;12(6):e0178473.
396. L-Z C, Y-N X, N G, et al. *PNPLA3* I148M variant in nonalcoholic fatty liver disease: Demographic and ethnic characteristics and the role of the variant in nonalcoholic fatty liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2015;21:794.

397. Rm W, Jf P, S G, E P, Ld N, Pc H, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2011;34:1139–44.
398. Gf L, A C, K A, et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes, *Endocrine Reviews*. 2002; 23:201-299.
399. S R, J K, C X, A P, D C, La P, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40:1461–5.
400. F B, Mj M, Mp C, J-M C, T P, C S-P, et al. Performance of the SteatoTest, ActiTest, NashTest and FibroTest in a multiethnic cohort of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. 2019;67:303–11.
401. S N, G G, A A, H A, A A, N B-O, et al. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatol Baltim Md*. 2009;49:97–105.
402. V R, J M, F C, D M, F I-B, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:6.
403. Db M, J R, Ar Z, Bja O. A 21-year experience with major haemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology*1990;99:1396-1400.
404. V R, F C, A H, et al. Sampling variability of liver biopsy in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005;128:1898-1906.
405. V-W W, La A, V dL, G-L W, S S. Non invasive biomarkers in NAFLD and NASH-current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 August;15(8):461-478.
406. F B, S K, Vc C, et al. Response to Pioglitazone in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With vs Without Type 2 Diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018;16:558–66.
407. R L, Eg L, F B, et al. Advanced Liver Fibrosis Is Common in Patients With Type 2 Diabetes in the Outpatient Setting: The Need for Systemic Screening, *Diabetes Care* 2021 Feb; 44(2):399-406.
408. S N, G G, A A, et al Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatol Baltim Md*. 2009;49:97–105.
409. Rp M, Mh T, V R, et al. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39:222–30.

410. V R, J M, F C, et al. Diagnostic value of biochemical markers FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:6.
411. P A, Jc K, Kp B, Kd L. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356–62.
412. F B, Mj M, Mp C, et al. Performance of the SteatoTest, ActiTest, NashTest and FibroTest in a multiethnic cohort of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* 2019;67:303–11.
413. E R, D B, M S, S S, K C High prevalence of NAFLD in patients with obesity and type 2 diabetes. Abstract A-19-1455- EASD. Poster presentation at the 55th Annual Meeting of EASD, 16-20 September 2019, Barcelona, Spain.
414. Em K, Ep P, Jn S, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: the Rotterdam Study. *Hepatology* 2016; 63:138-147.
415. I S, R M, A P, et al. Screening for liver fibrosis and steatosis in a large cohort of patients with type 2 diabetes using vibration controlled attenuation parameter in a single-centre real-life experience. *J Clin Med* 2020;9:1032.
416. Jr M, Ja F, In G, et al.; Edinburgh Type 2 Diabetes Study investigators. Using non-invasive biomarkers to identify hepatic Fibrosis in people with type 2 diabetes mellitus: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *J Hepatol* 2014;60:384-391.
417. A M, T T, Mg L, et al. Screening for non-alcoholic fatty liver disease using liver stiffness measurement and its association with chronic kidney disease and cardiovascular complications in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2020;46:296-303.
418. Ll L,Wni W-Y, Sr V, Nr N-M, S M, Wk C. Screening for non-alcoholic fatty liver disease in patients with Type 2 diabetes mellitus using transient elastography. *J Gastroenterol Hepatol* 2019;34:1396-1403.
419. K C, Wk S, Jh Q, et al. Clinical spectrum of non-alcoholic fatty liver disease in patients with diabetes mellitus. *PLoS One* 2020; 15:e0236977.
420. S R, J K, C X, A P, D C, La P, et al. Genetic Variation in PNPLA3 Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Vol. 40, *Nature genetics.* *Nat Genet*, 2008; 40(12):1461-5.
421. Q L, H-Q Q, Ar A, Ml G, S M, Y L, Cl H, Mb F, E B, Sp F-H, Jb M. PNPLA3 polymorphisms and liver aminotransferase levels in a Mexican American population. *Clin. Invest. Med*, 2012;35(4):E237-45.

422. Jd R , La G , Yc K, Dk C. Association of PNPLA3 I148M with Liver Disease Biomarkers in Latinos. *Hum.Hered*, 2021;86(1-4):21-27.
423. Qc L, Mj N, Pp D'A, Dm M, Sn R , Rsn C, Ca V, Pvt V, De Abreu Ferrari Tc De AF. PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 2020;12(10):792-806.
424. M X, Y L, S Z, X Z, J S, S Z. Interaction of TM6SF2 E167K and PNPLA3 I148M variants in NAFLD in northeast China. *Ann Hepatol*, 2019;18:456–60.