Αξιολόγηση βιομορίων έπειτα από διατροφική παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια (NAFLD)

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αναστασία Π. Διολιντζή

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

ΠΜΣ Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Αθήνα, 2015

Αξιολόγηση βιομορίων έπειτα από διατροφική παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια (NAFLD)

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αναστασία Π. Διολιντζή

Εξεταστική Επιτροπή:

Ανδριάνα Χ. Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Γεώργιος Β.Ζ. Δεδούσης, Καθηγητής

Αλέξανδρος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής

Ευχαριστίες

Τα εφόδια που κερδίζει κανείς μέσα από μια μεταπτυχιακή διατριβή και όντας μέλος μιας ερευνητικής ομάδας εξαρτώνται, όχι μόνο από την προσωπική προσπάθεια και κινητοποίηση, αλλά και από τους ανθρώπους που απαρτίζουν αυτή την ομάδα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω κατά κύριο λόγο την επιβλέπουσά μου, κ. Καλιώρα, για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση, αλλά και την υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια όλου του ερευνητικού έργου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες πρέπει να αποδοθούν στην κ. Γκιοξάρη και τον κ. Κανέλλο για τη βοήθειά τους και την καθοριστική συμβολή τους στη διεξαγωγή της μελέτης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δεδούση για την παροχή μέρους δεδομένων από μελέτη της δικής του ερευνητικής ομάδας, ώστε να χρησιμοποιηθούν για αναλύσεις στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή. Εγκάρδιες ευχαριστίες αποδίδονται και στους γονείς μου για την αμέριστη στήριξή τους στα εγχειρήματά μου.

Η μελέτη η οποία διεξήχθη στα πλαίσια αυτής της διατριβής ήταν αποτέλεσμα συνεργασίας του Εργαστηρίου Χημείας-Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου με την 1^{η} Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Από το Γ.Π.Ν.Α. «Λαϊκό» ευχαριστίες αποδίδονται στον κ. Κόκκινο και τον κ. Τεντολούρη για τη φιλοξενία στην κλινική του νοσοκομείου.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6
1α. Λέξεις-Κλειδιά: 7
ABSTRACT 8
1α. Keywords: 8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 9
ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ NAFLD/NASH 9
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 10
ΔΙΑΓΝΩΣΗ 14
Μη παρεμβατική διάγνωση στεάτωσης και ηπατικής βλάβης 15
Παρεμβατικές μέθοδοι 18
Βαθμολόγηση και σταδιοποίηση της NASH 18
Νέες, μη παρεμβατικές, διαγνωστικές μέθοδοι 19
ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ NAFLD 21
Μεταβολισμός λιπιδίων και NAFLD 23
Φλεγμονή και NAFLD 27
NAFLD και λιποτοξικότητα 32
Γενετικό υπόβαθρο στην NAFLD 34
Μικροβιακή χλωρίδα και NAFLD 36
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ 37
Ο ρόλος της διατροφής στην NAFLD 37
Απώλεια βάρους 50
Φυσική δραστηριότητα 52
Φαρμακοθεραπεία 54
Σκοπός 57
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 58
Στρατολόγηση Ασθενών 58
Χαρακτηρισμός πληθυσμού ασθενών 58
Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά 58
Αξιολόγηση αρτηριακής πίεσης και καρδιακής συχνότητας 59
Ιστορικό διατροφής και άσκησης-Διατροφικές συστάσεις 59
Προετοιμασία δειγμάτων διατροφικής παρέμβασης με Κορινθιακή σταφίδα 59
Εργαστηριακές μετρήσεις 60
Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων 60
Μέτρηση δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες 60

Στατιστική Ανάλυση 65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 67
Χαρακτηρισμός του δείγματος 67
Σύγκριση διαφορών σε κάθε ομάδα στο τέλος της μελέτης 69
Σύγκριση διαφορών μεταξύ της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου κατά την ολοκλήρωση της μελέτης 70
Διαφορές στην απόκριση μεταξύ των ασθενών με τουλάχιστον ένα ή κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό του PNPLA3 στο τέλος της μελέτης 73
Διαφορές των ασθενών που έχασαν βάρος σε κάθε ομάδα στο τέλος της παρέμβασης 75
Σύγκριση διαφορών μεταξύ της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου κατά την ολοκλήρωση της μελέτης στους ασθενείς που έχασαν βάρος 78
Διαφορές στην απόκριση μεταξύ των ασθενών που έχασαν βάρος με τουλάχιστον ένα ή κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό PNPLA3 στο τέλος της μελέτης 82
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια (NAFLD) καλύπτει ένα φάσμα ηπατικής βλάβης επηρεάζοντας περίπου το 50% των διαβητικών ασθενών και το 76% των παχύσαρκων. Καθώς οι τρέχουσες θεραπείες της νόσου είναι περιορισμένες, υπάρχει ανάγκη ανεύρεσης νέων μέσων διαχείρισης της NAFLD. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνητικής ευεργετικής επίδρασης της ενσωμάτωσης αντιοξειδωτικής Κορινθιακής σταφίδας στη διατροφή ασθενών με NAFLD σε δείκτες φλεγμονής, καθώς επίσης και η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 και στην απόκριση στις διατροφικές συστάσεις, όπως αυτή αξιολογήθηκε από πλήθος κλινικό-εργαστηριακών και ανθρωπομετρικών δεικτών. Η παρούσα μελέτη είναι μία πιλοτική τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή στην οποία συμμετείχαν 55 ασθενείς με NAFLD. Οι συμμετέχοντες εντάχθηκαν με τυχαίο τρόπο σε δύο ισοθερμιδικές διατροφικές θεραπείες για 24 εβδομάδες: (α) διατροφική συμβουλευτική στα πλαίσια της Μεσογειακής διατροφής (ομάδα ελέγχου, N=27) και (β) διατροφική συμβουλευτική σύμφωνα με το Μεσογειακό πρότυπο διατροφής στο οποίο περιλαμβανόταν η κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας (2 ισοδύναμα φρούτου, 36g/d) αντικαθιστώντας σνακς παρεμφερούς ενεργειακής αξίας (ομάδα παρέμβασης, N=28). Τόσο πριν όσο και μετά την παρέμβαση διεξήχθησαν ανθρωπομετρήσεις και μετρήσεις αρτηριακής πίεσης, αξιολόγηση του MedDietScore, του NAFLD Fibrosis Score, του απεικονιστικού ελέγχου (υπέρηχος ήπατος, ShearWave ελαστογραφία) και εργαστηριακές δοκιμές (ένζυμα ηπατικής λειτουργίας, λιπιδαιμικό προφίλ, γλυκόζη, ινσουλίνη). Ο HOMA-IR εκτιμήθηκε στην αρχή και στο τέλος της μελέτης. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των επιπέδων δεικτών φλεγμονής (λεπτίνη, βισφατίνη, CRP, TNF-α, IL-6), καθώς επίσης και της συγκέντρωσης δεικτών οξειδωτικού στρες (oxLDL) στον ορό, αλλά και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού πριν και μετά την παρέμβαση. Συνολικά, 50 ασθενείς ολοκλήρωσαν την παρέμβαση. Στην αρχή της μελέτης δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Έξι ασθενείς εξαιρέθηκαν από την ανάλυση λόγω μη συμμόρφωσης. Το σωματικό βάρος μειώθηκε και στις δύο ομάδες, καθώς επίσης και ο βαθμός ίνωσης, αλλά και τα επίπεδα της CRP. Η ομάδα που λάμβανε σταφίδα παρουσίασε σημαντική βελτίωση στα επίπεδα της IL-6. Μετά το διαχωρισμό των ασθενών σε αυτούς που έχασαν βάρος (N=17 ομάδα ελέγχου, N=18 ομάδα παρέμβασης), μόνο στην ομάδα παρέμβασης η μείωση του βαθμού της ίνωσης και της CRP παρέμεινε στατιστικά σημαντική. Επίσης, στατιστικά σημαντική ήταν η βελτίωση της συγκέντρωσης της λεπτίνης και της IL-6 στην ομάδα της σταφίδας. Η IL-6 διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της παρέμβασης. Η γλυκόζη μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα της σταφίδας μετά την παρέμβαση και διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της μελέτης. Το MedDietScore αυξήθηκε σημαντικά και στις δύο ομάδες, αλλά η διαφορά ανάμεσά τους δεν ήταν σημαντική

κατά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου. Επίσης, οι ασθενείς που διέθεταν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 (N=16) βελτίωσαν σημαντικά το ολικό σωματικό λίπος, τη DBP και την ινσουλίνη, σε σχέση με αυτούς που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου (N=28). Η Κορινθιακή σταφίδα αποτελεί ένα αποξηραμένο φρούτο με γνωστές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μέτριο γλυκαιμικό δείκτη, που μπορεί να ενσωματωθεί με ασφάλεια στη διατροφή ασθενών με NAFLD ως μία νέα προσέγγιση στη διατροφική διαχείριση της νόσου.

1α. Λέξεις-Κλειδιά: μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια (NAFLD), κλινική δοκιμή, Κορινθιακή σταφίδα (*Vitis vinifera* L.), βιομόρια, PNPLA3

ABSTRACT

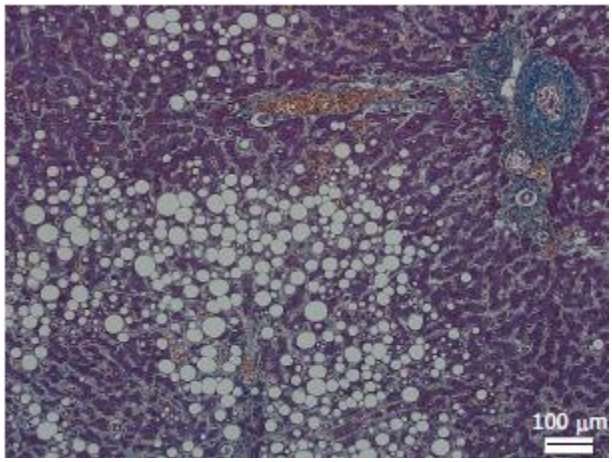
Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) includes a spectrum of liver injury affecting approximately 50% of diabetics and 76% of obese patients. Since current NAFLD treatments are limited, there is the emergence in exploring novel means of managing NAFLD. We aimed at investigating the potential beneficial effects of incorporating antioxidant raisins in diets of patients with NAFLD in inflammatory markers, as well as the potential association between PNPLA3 polymorphism rs738409 and the response in nutritional counseling. This was a pilot randomized parallel arm clinical trial involving 55 patients with NAFLD. The participants were randomly assigned into two isocaloric dietary treatments for 24 weeks (a) nutritional counseling within the Mediterranean dietary pattern (served as the control arm, N=27) (b) nutritional counseling according to the Mediterranean pattern with black currants included (two fruit servings, 36 g/day) substituting snacks of alike caloric content (N=28). Anthropometric and blood pressure measurements, assessment of MedDietScore, NAFLD Fibrosis Score, imaging control (hepatic ultrasound, ShearWave Elastography) and laboratory tests were conducted (function liver enzymes, lipid profile, glucose, insulin) pre- and post-intervention. HOMA-IR was evaluated initially and at endpoint. Evaluation of serum levels of inflammatory indices (leptin, CRP, visfatin, TNF-α and IL-6) and indices of oxidative stress (oxLDL) were conducted, as well as total serum lipoprotein oxidation pre- and post-intervention. A total of 50 patients completed the trial. No significant differences between groups were reported at baseline. Six patients were excluded from analysis due to non compliance. Body weight regulation was reported in both arms, as well as fibrosis stage and CRP levels. After the classification of patients with the criterion of weight loss (N=17 control arm, N=18 raisin arm), only within the intervention arm decrease of fibrosis stage and CRP levels remained significant. Additionally, serum leptin and IL-6 levels significantly decreased in raisin arm. IL-6 levels were significantly different between the two arms post-intervention. Glucose was significantly decreased in raisin arm post-intervention. Blood glucose was significantly different between two arms at the end of the trial. MedDietScore increased significantly in both arms, the difference between them being non significant post-intervention. Furthermore, patients with at least one risk allele for the PNPLA3 SNP rs738409 (N=16) improved significantly their body fat, as well as DBP and insulin levels compared with those lacking PNPLA3 risk allele (N=28). Black currants, a dried fruit with known antioxidant potential and median glycemic index, can be safely integrated into diet of NAFLD patients as a new approach to the nutritional management of the disease.

1α. Keywords: non alcoholic fatty liver disease (NAFLD), clinical trial, Black currants (*Vitis vinifera* L.), biomolecules, PNPLA3

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ NAFLD/NASH

Η πρώτη εμφάνιση του όρου μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (non alcoholic steatohepatitis, NASH) αποδίδεται στον Ludwig *et al.* το 1980, ο οποίος χρησιμοποίησε αυτόν τον όρο για να περιγράψει τα ευρήματα βιοψιών σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα απουσία σημαντικής κατανάλωσης αλκοόλ[1]. Παρόλη τη δυσκολία να οριοθετηθεί σε ποιο σημείο η μη αλκοολική λιπώδης στεατοηπατίτιδα γίνεται εξαρτώμενη από την κατανάλωση αλκοόλ, παραδοσιακά θεωρείται ότι μια πρόσληψη της τάξης των 20-40g/ημέρα για τους άνδρες και 20g/ημέρα για τις γυναίκες φαίνεται να αποτελεί το μέγιστο όριο κατά το οποίο η νόσος παραμένει μη σχετιζόμενη με την κατανάλωση αλκοόλ[2]. Η μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) αποτελεί τη νόσο κατά την οποία υπάρχει έκτοπη αποθήκευση λίπους στο ήπαρ, δηλαδή στεάτωση, η οποία ξεπερνά το 5% του όγκου ή του βάρους του οργάνου και ιστολογικά ορίζεται όταν τουλάχιστον το 5% των ηπατοκυττάρων περιέχουν ορατά ενδοκυτταρικές τριακυλογλυκερόλες (triacylglycerols, TAG), χωρίς την ύπαρξη ιστορικού αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ[3]. Η NAFLD αποτελεί ένα φάσμα ιστολογικών αλλαγών, που ποικίλει από απλή στεάτωση (>5% ηπατική στεάτωση), απουσία σοβαρής φλεγμονής και ηπατοκυτταρικής βλάβης, μέχρι τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη στεάτωσης με φλεγμονή, ηπατοκυτταρική βλάβη και μερικές φορές ίνωση[4]. Η κυτταρική βλάβη στη NASH χαρακτηρίζεται από διογκωμένα ηπατοκύτταρα, τα οποία περιέχουν συνήθως σωμάτια Mallory-Denk, που αποτελούν κατεστραμμένα ενδιάμεσα νημάτια στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων[5]. Άλλες ιστοπαθολογικές ανωμαλίες που είναι πιθανό να παρατηρηθούν στη NASH περιλαμβάνουν γλυκογονωμένους πυρήνες, λιποκοκκιώματα και οξεόφιλα σωμάτια[6]. Η NAFLD μπορεί να είναι προοδευτική και να οδηγήσει σε κίρρωση, η οποία πιθανά να γίνει πιο περίπλοκη με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (hepatocellular carcinoma, HCC) και ηπατικής ανεπάρκειας[3].



Εικόνα 1 Στεάτωση στη μη αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια. Μακροφυσαλιδώδης στεάτωση, κυρίως κατανεμημένη στη ζώνη 3 (τρίχρωμη χρώση Masson)[6].

Η NAFLD/NASH μπορεί να είναι πρωτογενής ή δευτερογενής ανάλογα με την αιτία εκδήλωσης της νόσου. Η πρωτογενής NAFLD/NASH συσχετίζεται αιτιολογικά τόσο με τη συστημική όσο και με την ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη (insulin resistance, IR) και όλες τις φαινοτυπικές εκδηλώσεις του μεταβολικού συνδρόμου που αυτή συνεπάγεται[7]. Μάλιστα, θεωρείται ότι η εν λόγω νόσος αποτελεί την ηπατική έκφραση του μεταβολικού συνδρόμου. Αντιθέτως, η δευτερογενής εκδήλωση της νόσου είναι σπάνια στους ενήλικες, δεν σχετίζεται με την ινσουλινοαντίσταση, και οφείλεται σε ένα φάσμα ιατρικών και χειρουργικών καταστάσεων και στη λήψη φαρμάκων. Για να διαγνωστεί η νόσος ως πρωτογενής απαιτείται ο αποκλεισμός άλλων παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν ηπατική βλάβη (π.χ. προσβολή από ιό, αυτοάνοση πρόκληση της νόσου, γενετικοί παράγοντες κ.ά.), καθώς επίσης και η κατανάλωση >20g αιθανόλης/ημέρα για τις γυναίκες και 30g για τους άνδρες, αφού για μεγαλύτερα ποσά κατανάλωσης φαίνεται ότι η στεάτωση επάγεται από την κατανάλωση αλκοόλ[4,8].

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια παρατηρείται σε όλες τις εθνικές ομάδες ανά την υφήλιο και στα δύο φύλα. Η πραγματική επίπτωση της νόσου είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθεί εξαιτίας των διαφορετικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωσή της, καθώς επίσης γιατί πολλοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί.

Οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη πρωτογενούς NAFLD περιλαμβάνουν το σακχαρώδη διαβήτη τύπου ΙΙ, την αντίσταση στην ινσουλίνη, την υπερλιπιδαιμία, την παχυσαρκία και ιδιαίτερα την κεντρική, που ορίζεται ως περιφέρεια μέσης μεγαλύτερη από 100 cm για τους άνδρες και 88 cm για τις γυναίκες, την υπέρταση και την υπερουριχαιμία[9]. Δευτερογενή αίτια για την εμφάνιση της νόσου αποτελούν επιπλοκές σχετιζόμενες με τη διατροφή, όπως η ολική παρεντερική σίτιση, η γρήγορη απώλεια βάρους και η χειρουργική επέμβαση εντερικής ειλεονηστιδικής παράκαμψης, καθώς επίσης και η λήψη ορισμένων κατηγοριών φαρμάκων, όπως είναι τα κυτταροτοξικά, τα αντιβιοτικά, τα νουκλεοσιδικά ανάλογα και άλλα[2]. Επιπλέον, στους δευτερογενείς παράγοντες πρόκλησης NAFLD συγκαταλέγονται μεταβολικά σύνδρομα, όπως αυτό του Weber-Christian και η νόσος Wilson, αλλά και η οξεία λιπώδης ηπατοπάθεια που σχετίζεται με την εγκυμοσύνη[2]. Παρόλα αυτά, άτομα με φυσιολογικό BMI είναι πιθανό να αναπτύξουν NAFLD ακόμη και αν δεν εμφανίζουν τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, γεγονός για το οποίο θεωρείται ότι η κύρια ανωμαλία μπορεί να είναι λανθάνουσα ινσουλινοαντίσταση ή κεντρική παχυσαρκία[10]. Κλινικοί προγνωστικοί δείκτες προχωρημένου σταδίου της νόσου περιλαμβάνουν άτομα με διαβήτη, υπερτριγλυκεριδαιμία, ηλικίας άνω των 40 ετών και το ανδρικό φύλο[11],

καθώς φαίνεται ότι τα οιστρογόνα μπορεί να έχουν προστατευτική δράση έναντι της NAFLD στις γυναίκες[12].

Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ο υποθυρεοειδισμός (hypothyroidism), ο υποϋποφυσισμός (hypopituitarism), ο υπογοναδισμός (hypogonadism), το σύνδρομο αποφρακτικής υπνικής άπνοιας (obstructive sleep apnoea syndrome, OSAS) και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (polycystic ovary syndrome, POS) αποτελούν, ανεξάρτητα από την παχυσαρκία, σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση NAFLD[13]. Πολλές είναι και οι μελέτες που αναδεικνύουν το φυλετικό υπόβαθρο ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Για παράδειγμα, σε έναν πληθυσμό με νοσογόνο παχυσαρκία, τόσο η NAFLD όσο και τα υψηλά επίπεδα ηπατικών ενζύμων ήταν πιο κοινά στους ισπανόφωνους και λιγότερο συνηθισμένα στους Αφροαμερικανούς σε σχέση με τους μη ισπανόφωνους λευκούς[14,15]. Επιπλέον, πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD[16-18].

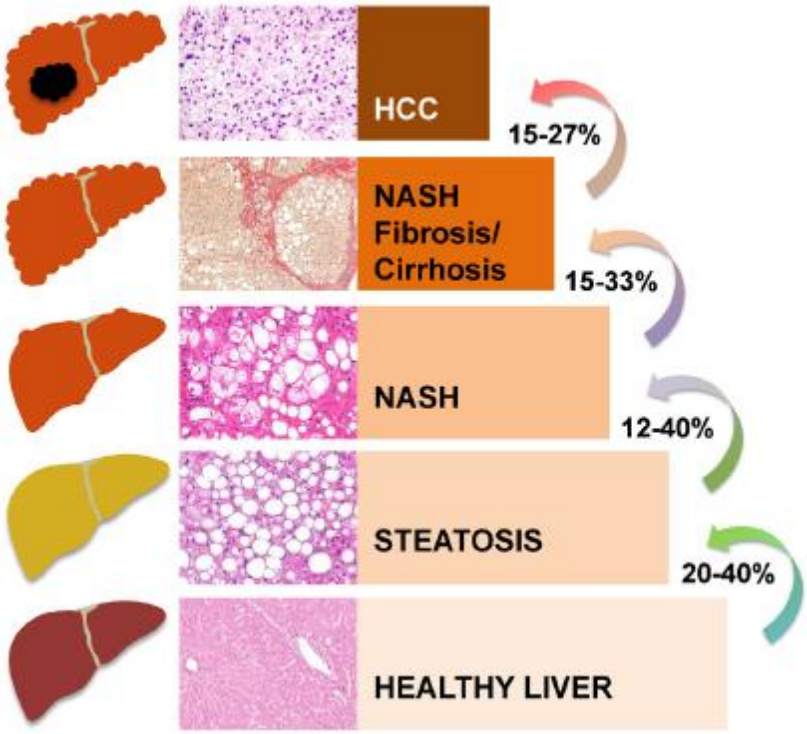
Η μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια αποτελεί μείζονος σημασίας πρόβλημα υγείας στις δυτικές κοινωνίες, αποτελώντας την πιο συνηθισμένη μεταξύ των ηπατικών νόσων, και επηρεάζει το 30% του ενήλικου πληθυσμού και το 60-80% ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και/ή παχυσαρκία[4,19]. Το 2011 στην «Έρευνα των Εθνικών Συστημάτων Υγείας και Διατροφής» (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) αναφέρεται ότι οι ρυθμοί της NAFLD, της παχυσαρκίας και του σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν παράλληλη αύξηση κατά τα έτη 1988-1994[19], υποδεικνύοντας ότι η NAFLD σχετίζεται με την παχυσαρκία και το σακχαρώδη διαβήτη τύπου ΙΙ.

Από την άλλη, ο επιπολασμός της NASH είναι σαφώς μικρότερος, επηρεάζοντας το 18,5% των παχύσαρκων ασθενών[20,21]. Ασθενείς με NAFLD που έχουν μόνο στεάτωση είναι πιθανό να μην αναπτύξουν κίρρωση, αν και η στεάτωση μπορεί να επιταχύνει άλλες μορφές ηπατικής νόσου[22-24]. Σε πληθυσμιακή μελέτη κοορτής αναφέρεται ότι περίπου το 5% των ασθενών με NAFLD αναπτύσσει κίρρωση σε βάθος επταετίας και το 1,7% αυτών πεθαίνει από επιπλοκές που προκύπτουν από την κίρρωση[25]. Σε ασθενείς με NASH αναφέρεται ότι ένα ποσοστό της τάξης του 20-25% αναπτύσσει ηπατική κίρρωση μέσα σε δέκα χρόνια[4], με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα να απαντάται στο 8,6% των κιρρωτικών ασθενών με NASH σε βάθος δωδεκαετίας[26] ή στο 11,3% αυτών σε βάθος πενταετίας, σύμφωνα με άλλη μελέτη[27].

Έμμεση ένδειξη για τον προοδευτικό χαρακτήρα της NASH βρίσκεται στα χαρακτηριστικά της κρυπτογενούς κίρρωσης που σχετίζεται στενά με την NAFLD[28,29]. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με κρυπτογενή κίρρωση εμφανίζουν υψηλό επιπολασμό μεταβολικών παραγόντων κινδύνου

(σακχαρώδη διαβήτη τύπου ΙΙ, παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο), τα οποία αποτελούν τυπικά γνωρίσματα των NAFLD ασθενών. Επιπλέον, οι ηπατικές τους βιοψίες δείχνουν ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά της NASH και μελέτες έχουν αποδείξει ότι με την ανάπτυξη της κίρρωσης αυτά τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της NASH αρχίζουν να εκλείπουν[28-31].

Σε πρόσφατη μετά-ανάλυση φάνηκε ότι, σε σχέση με τους NAFLD ασθενείς, αυτοί με NASH εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς θνησιμότητας σχετιζόμενης με το ήπαρ. Συγκεκριμένα, η αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio, OR) για τους ασθενείς με NASH είναι 5,71 και για αυτούς με NASH και προχωρημένη ίνωση είναι 10,06[32]. Αυτό μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στον αυξημένο κίνδυνο θανάτου που σχετίζεται με το ήπαρ. Επιπλέον, η NAFLD νοείται ως παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (cardiovascular disease, CVD), δεδομένου ότι αυτοί οι ασθενείς συχνά εμφανίζουν χαρακτηριστικά μεταβολικού συνδρόμου και ινσουλινοαντίστασης[25,33]. Έτσι, λοιπόν, τόσο η ισχαιμική καρδιοπάθεια όσο και οι κακοήθεις όγκοι είναι οι κύριες αιτίες θανάτου σε αυτή την κατηγορία ασθενών. Σε μια προοπτική μελέτη με 129 ασθενείς, οι οποίοι είχαν επιβεβαιωμένη NAFLD μέσω βιοψίας και παρακολουθούνταν κατά μέσο όρο για 13,7 χρόνια, βρέθηκε ότι η θνησιμότητα από τα καρδιαγγειακά συμβάματα ήταν μεγαλύτερη από αυτή που σχετιζόταν με το ήπαρ, καθώς επίσης και ότι η συνολική θνησιμότητα στους ασθενείς με NASH είναι η διπλάσια σε σχέση με τον αντίστοιχο υγιή πληθυσμό[23]. Παρομοίως, μελέτη κοορτής από τη Σουηδία, σε ασθενείς με NAFLD που παρακολουθούνταν για περίπου 28 χρόνια, έδειξε ότι ο κίνδυνος θνησιμότητας ήταν μεγαλύτερος για αυτούς με NAFLD (OR: 1,69) και NASH (OR: 1,86), σε σχέση με το γενικό πληθυσμό της χώρας, και ότι η CVD ήταν η συχνότερη αιτία θανάτου[34]. Μία άλλη προοπτική, ένθετη μελέτη, ασθενών-μαρτύρων σε 2103 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου ΙΙ, χωρίς διαγνωσμένη CVD στην αρχή της μελέτης, που παρακολουθούνταν για περίπου 5 χρόνια, αναφέρει ότι η NAFLD σχετιζόταν σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο για CVD (OR: 1,84) και ότι αυτή η συσχέτιση ήταν ανεξάρτητη των κλασικών παραγόντων κινδύνου[35]. Αναφορικά με τη θνησιμότητα από οποιοδήποτε αίτιο, αυτή αγγίζει το 13% σε άτομα διαγνωσμένα με NAFLD, ενώ για άτομα αντίστοιχης ηλικίας και φύλου το ποσοστό είναι πολύ μικρότερο[25]. Εντούτοις, η ηπατική νόσος είναι η τρίτη πιο κοινή αιτία θανάτου σε αυτή την πληθυσμιακή ομάδα, αγγίζοντας το 13% όλων των περιστατικών θανάτου. Η εικόνα είναι πολύ διαφορετική σε άτομα ελεύθερα της νόσου, στα οποία η θνησιμότητα, που σχετίζεται με το ήπαρ, είναι μικρότερη του 1% στο σύνολο όλων των θανάτων[25].



Εικόνα 2 Η φυσική εξέλιξη της μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας (NAFLD)[36].

Ο επιπολασμός της NAFLD στα παιδιά και στους εφήβους, φαίνεται ότι αυξάνεται και έχει φτάσει στο 10%[37-40]. Παρά το γεγονός ότι στην έναρξη της παιδιατρικής NAFLD[40,41] εμπλέκονται γενετικοί παράγοντες, ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου στα παιδιά, όπως και στους ενήλικες, είναι το υπερβάλλον βάρος, με τον επιπολασμό της νόσου υψηλότερο στα παχύσαρκα παιδιά σε σχέση με τα μη παχύσαρκα[37,42-44]. Επίσης, η NASH έχει διαγνωστεί στο 3% παιδιών και εφήβων[39]. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της παιδιατρικής NAFLD/NASH διαφέρουν από αυτά που παρατηρούνται στους ενήλικες νοσούντες. Ειδικότερα, η στεάτωση και η πυλαία φλεγμονή είναι πιο σοβαρές στην παιδιατρική NAFLD, ενώ η ενδολοβιακή φλεγμονή και η περιημιτονοειδής ίνωση εμφανίζονται ηπιότερες[6].

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η θεραπεία ασθενών με NAFLD θα έπρεπε να στοχεύει στον προσδιορισμό και τη θεραπεία σχετιζόμενων μεταβολικών παραγόντων, όπως είναι η παχυσαρκία, η διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη, η δυσλιπιδαιμία και η υπέρταση. Επιπλέον, θα έπρεπε να δίνεται θεραπεία που να στοχεύει στην παρεμπόδιση της εξέλιξης της ηπατικής βλάβης σε αυτούς που βρίσκονται σε κίνδυνο. Ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία είναι παράγοντες κινδύνου για την προοδευτική ηπατική ίνωση[45,46], με τον πρώτο να αποτελεί, επίσης, παράγοντα κινδύνου για θάνατο σε ασθενείς με NAFLD[25,47]. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να βοηθήσουν στη στρωματοποίηση που διατρέχει κάθε ασθενής για προοδευτική ηπατοπάθεια. Η αξιολόγηση του σταδίου της ίνωσης είναι χρήσιμη, επίσης, στη διάγνωση του κινδύνου για ανάπτυξη νοσηρότητας σχετιζόμενης με το ήπαρ, με τους ασθενείς που έχουν

προχωρημένη ίνωση, που βρίσκονται δηλαδή στο όριο ίνωσης και κίρρωσης, να διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο. Παρόλο, που αυτά τα χαρακτηριστικά βοηθούν στη στρωματοποίηση των ασθενών που βρίσκονται σε κίνδυνο, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών είναι πιθανό να έχει όλους αυτούς τους δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες αλλά να μην αναπτύξει νοσηρότητα ή θνησιμότητα σχετιζόμενη με το ήπαρ. Έτσι, η ακριβής πρόγνωση των νοσούντων που μπορούν να επωφεληθούν από τη θεραπεία είναι δύσκολη.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της NAFLD απαιτεί (α) την ύπαρξη ηπατικής στεάτωσης μέσω ιστολογικής ή απεικονιστικής αξιολόγησης, (β) την απουσία σημαντικής κατανάλωσης αλκοόλ, (γ) την απουσία ανταγωνιστικών αιτιολογιών για την εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης και (δ) την απουσία συνυπαρχουσών αιτιών για χρόνια ηπατοπάθεια[48].

Άλλα κοινά αίτια για την ύπαρξη ηπατικής στεάτωσης είναι η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η ηπατίτιδα C, ορισμένα φάρμακα, η παρεντερική σίτιση, η νόσος Wilson και ο σοβαρός υποσιτισμός[49]. Όταν ένας ασθενής αξιολογείται για την ύπαρξη της νόσου, είναι σημαντικό να απορρίπτονται άλλες συνυπάρχουσες αιτιολογίες χρόνιας ηπατοπάθειας συμπεριλαμβανομένων της αιμοχρωμάτωσης, της αυτοάνοσης ηπατοπάθειας, της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας και της νόσου Wilson[13]. Η μετρίως αυξημένη φερριτίνη ορού είναι κοινή σε ασθενείς με NAFLD και δεν αποτελεί απαραίτητα ένδειξη αυξημένων αποθηκών σιδήρου[13,50]. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης ορού και κορεσμού τρανσφερίνης σε ασθενείς με υποψία για NAFLD θα ήταν καλό να ελέγχονται περαιτέρω για την ύπαρξη γενετικής αιμοχρωμάτωσης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο HFE (*High* Iron *Fe*), που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της αιμοχρωμάτωσης στους ανθρώπους, συναντώνται με ποικίλη συχνότητα στους ασθενείς με NAFLD, αλλά η κλινική τους σημασία παραμένει ασαφής[49]. Στην περίπτωση ασθενούς με υποψία για NAFLD, αυξημένα επίπεδα φερριτίνης ορού και ομοζυγώτη ή ετεροζυγώτη για τη μετάλλαξη C282Y στο γονίδιο HFE, η βιοψία ήπατος θα μπορούσε να διαλευκάνει αν πρόκειται για υψηλή συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ ή για σοβαρή ηπατική βλάβη και ίνωση[50]. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα αυτό-αντισωμάτων στον ορό είναι συνηθισμένα σε ασθενείς με NAFLD και θεωρούνται, εν γένει, ως ένα επιφαινόμενο[13]. Σε μια μεγάλη μελέτη του «Δικτύου για την Κλινική Έρευνα της Μη Αλκοολικής Στεατοηπατίτιδας» (Non-Alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, NASH CRN), η ύπαρξη αυτό-αντισωμάτων στον ορό, που ορίστηκε ως ANA (Anti Nuclear Antibody)>1:160 ή ASMA (Anti Smooth Muscle Antibody)>1:40, ήταν παρούσα στο 21% των ασθενών που παρουσίαζαν όλα τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της NAFLD και δε συσχετίστηκε με ιστολογικά γνωρίσματα προχωρημένης νόσου[51].

Μη παρεμβατική διάγνωση στεάτωσης και ηπατικής βλάβης

Βιοδείκτες στον ορό

Οι περισσότεροι ασθενείς με NAFLD είναι ασυμπτωματικοί ή εμφανίζουν μη ειδικά συμπτώματα, όπως είναι η κούραση, η αδιαθεσία ή ο πόνος στο άνω δεξί τεταρτημόριο. Στην πληθώρα των περιπτώσεων, υπάρχει υποψία για τη διάγνωση όταν είναι παρόντες απαραίτητοι παράγοντες κινδύνου και συμπτωματική αύξηση του επιπέδου των τρανσαμινασών. Τα επίπεδα της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού (aspartate aminotransferase, AST) και της αλανίνης (alanine aminotranferase, ALT) παρουσιάζονται μετρίως αυξημένα, παρόλο που ο λόγος AST:ALT είναι μικρότερος της μονάδας, διαχωρίζοντας τους ασθενείς με NAFLD από αυτούς με ηπατική νόσο επαγόμενη από την κατανάλωση αλκοόλ[52]. Εντούτοις, ο βαθμός της αύξησης των τρανσαμινασών δεν αντικατοπτρίζει τη σοβαρότητα της νόσου. Ασθενείς με φυσιολογικές τιμές ALT μπορούν, επίσης, να βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο NAFLD. Σε ασθενείς με αποδεδειγμένη παρουσία της νόσου μέσω βιοψίας έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί η τιμή της ALT που θα μπορούσε να προβλέψει με ακρίβεια την ύπαρξη NASH και προχωρημένης ίνωσης. Φάνηκε ότι δεν υπήρχε διαφορά στο ρυθμό εμφάνισης NASH και προχωρημένης ίνωσης μεταξύ ασθενών με φυσιολογικά και υψηλά επίπεδα ALT. Παρόλα αυτά, η ομάδα με φυσιολογικά επίπεδα ALT παρουσίασε σημαντικά μικρότερο ποσοστό εμφάνισης NASH σε σχέση με την ομάδα υψηλών επίπεδων ALT. Επιπλέον, οι υψηλότερες τιμές ALT συσχετίστηκαν με μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά μικρότερη ευαισθησία τόσο με την ύπαρξη NASH όσο και προχωρημένης ίνωσης. Γίνεται φανερό, λοιπόν, ότι δεν υπάρχει βέλτιστο επίπεδο ALT ικανό να προβλέψει τη NASH και την προχωρημένη ίνωση[53]. Προκειμένου να γίνει η επιλογή των ασθενών για επιβεβαίωση αυτών των δύο καταστάσεων μέσω βιοψίας θα πρέπει να συνεκτιμώνται και άλλοι μεταβολικοί παράγοντες κινδύνου.

Οι Poynard *et al.* πρότειναν το SteatoTest, το οποίο αποτελεί συνδυασμό του FibroTest, του ActiTest, καθώς επίσης και του BMI, της χοληστερόλης του ορού, των TAG και της γλυκόζης, προσαρμοσμένων για την ηλικία και το φύλο[54]. Η εγκυρότητα του FibroTest είχε ελεγχθεί ως δείκτης ίνωσης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και C και στην αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια. Όσον αφορά στο ActiTest, αποτελεί δείκτη της νέκρωσης των ηπατοκυττάρων στη χρόνια ηπατίτιδα C και B. Η εγκυρότητα του SteatoTest έχει ελεγχθεί με επιτυχία στη διάγνωση της NASH και της ίνωσης σε πληθυσμό ασθενών με κίνδυνο ανάπτυξης μεταβολικού συνδρόμου, αλλά και στη διάγνωση προχωρημένης στεάτωσης μεταξύ ασθενών με νοσογόνο παχυσαρκία[55].

Άλλο σύνθετο αλγόριθμο για τη μη παρεμβατική διάγνωση της ηπατικής στεάτωσης και ίνωσης, αποτελεί ο δείκτης λιπώδους ήπατος (fatty liver index, FLI), που βασίζεται σε τέσσερις απλές

παραμέτρους ρουτίνας, όπως είναι ο BMI, η περιφέρεια μέσης, οι TAG και η γ-γλουταμυλο-τρανσφεράση (γ-glutamyl-transferase, γ-GT)[56]. Αυτός ο δείκτης οδηγεί στην πρόβλεψη της παρουσίας στεάτωσης με ακρίβεια 84%. Παίρνει τιμές από 0 έως 100 και για FLI<30 απορρίπτεται η παρουσία NAFLD, ενώ για FLI≥60 επιβεβαιώνεται η υποψία για παρουσία της νόσου. Αυτό το σκορ είχε σχεδιαστεί, αρχικά, για να εντοπίζει ασθενείς με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης NAFLD, που έπρεπε να υποβληθούν σε υπερηχογράφημα (ultrasonography, US) και για τους οποίους ήταν επιτακτική η ανάγκη συμβουλευτικής για αλλαγές στον τρόπο ζωής. Επιπλέον, έχει ελεγχθεί η εγκυρότητά του, ώστε να αποτελεί καλό προγνωστικό δείκτη, χρήσιμο στην πρόβλεψη αυξημένου πάχους του μεσαίου έσω χιτώνα, κινδύνου για στεφανιαία νόσο, μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη, καθώς επίσης και της εννεαετούς επίπτωσης του διαβήτη και της πρόωρης αθηροσκλήρωσης[55].

Ακολουθώντας την ίδια λογική, το προϊόν συσσώρευσης λίπους (lipid accumulation product, LAP) αποτελεί ένα δείκτη, που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την περιφέρεια μέσης και τις TAG νηστείας. Ο LAP είχε χρησιμοποιηθεί, προηγουμένως, ως προβλεπτικός δείκτης για τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, το διαβήτη και την ολική θνησιμότητα σε ασθενείς με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο. Ο αλγόριθμος του LAP, προσαρμοσμένος για την ηλικία, αποτελεί μια ικανοποιητικά ακριβή προσέγγιση για τον εντοπισμό ατόμων με ηπατική στεάτωση που πρέπει να υποβληθούν σε US[55].

Άλλες μη παρεμβατικές μέθοδοι για τη διάγνωση της NAFLD αποτελούν τα NAFLD Fibrosis Score (NFS)[57], Enhanced Liver Fibrosis (ELF) panel[57]. Το NAFLD Fibrosis Score βασίζεται σε έξι άμεσα διαθέσιμες μεταβλητές (ηλικία, BMI, υπεργλυκαιμία, αριθμός αιμοπεταλίων, αλβουμίνη, λόγος AST/ALT) και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας μία δημοσιευμένη φόρμουλα (http://nafldscore.com). Σε μια μετά-ανάλυση 13 μελετών με 3064 ασθενείς[31], το NAFLD Fibrosis Score είχε τιμή AUROC (Area Under ROC Curve) 0,85 ως προς την ικανότητά του να προβλέπει την προχωρημένη ίνωση (π.χ. γεφυρωμένη ίνωση ή κίρρωση) και ένα σκορ <-1,455 είχε 90% ευαισθησία και 60% ειδικότητα να αποκλείσει την προχωρημένη ίνωση, ενώ ένα σκορ >0,676 είχε 67% ευαισθησία και 97% ειδικότητα να εντοπίσει την παρουσία προχωρημένης ίνωσης[58]. Επιπλέον, το συγκεκριμένο διαγνωστικό εργαλείο φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει και έναν αξιόλογο προγνωστικό δείκτη θνησιμότητας και ηπατικών επιπλοκών μεταξύ ασθενών με NAFLD. Ειδικότερα, οι Treeprasertsuk *et al.* συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους ασθενείς με NAFLD στους οποίους είχαν εφαρμόσει το NFS, προκειμένου να τους διαχωρίσουν σε αυτούς με ή χωρίς προχωρημένη ίνωση και για να τους κατηγοριοποιήσουν σε αυτούς με χαμηλή, μέτρια και αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης ίνωσης[59]. Στις κύριες εκβάσεις συμπεριλαμβάνονταν η θνησιμότητα από κάθε αίτιο και η θνησιμότητα που σχετιζόταν με

καρδιαγγειακή ή ηπατική νόσο. Η μελέτη τους έδειξε ότι υπήρχε σημαντική, βαθμονομημένη σχέση μεταξύ των 3 κατηγοριών του NFS και της εμφάνισης των ανωτέρω εκβάσεων. Επιπλέον, η ετήσια αλλαγή στο NFS στα άτομα με μέτρια και υψηλή πιθανότητα να αναπτύξουν ίνωση ήταν μικρότερη από αυτά με μικρή πιθανότητα και τα άτομα που πέθαναν παρουσίασαν μεγαλύτερη ετήσια αλλαγή στο NFS σε σχέση με αυτούς που επιβίωσαν. Έτσι, οι ερευνητές κατέληξαν ότι μια υψηλότερη τιμή NFS στην αρχή της μελέτης και η εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (coronary heart disease, CHD) ήταν σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες θνησιμότητας σε ασθενείς με NAFLD[59].

Το ELF panel αποτελείται από τα επίπεδα στο πλάσμα του υαλουρονικού οξέος, του ιστικού αναστολέα 1 των μεταλλοπεπτιδασών (tissue metallopeptidase inhibitor 1, TIMP-1) και του αμινοτελικού πεπτιδίου του προκολλαγόνου τύπου III (N- terminal type III procollagen peptide, PIIINP). Αυτό το εργαλείο είχε τιμή AUROC 0,90 με 80% ευαισθησία και 90% ειδικότητα στον εντοπισμό της προχωρημένης ίνωσης[58].

Άλλα διαγνωστικά εργαλεία για την ύπαρξη ίνωσης στην NAFLD που βασίζονται σε δείκτες του ορού και εμφανίζουν υψηλή διαγνωστική ικανότητα, αποτελούν τα FibroMeter (AUROC: 0,94) και FIB-4 (AUROC: 0,86) ή άλλα σύνθετα εργαλεία, όπως το Hepascore και το FibroTest, συγκρινόμενα με πιο απλά εργαλεία, όπως το APRI (AST-platelet ratio index) και το BARD[49]. Σε μια πρόσφατη μετά-ανάλυση, φάνηκε ότι το FibroTest, το ELF και το NFS παρουσίασαν σημαντικά καλύτερη διαγνωστική ακρίβεια, σε σχέση με το BARD σκορ, και οι τιμές AUROCs δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους για αυτά τα εργαλεία. Επιπλέον, το NFS είναι το εργαλείο που έχει ελεγχθεί περισσότερο για τη διάγνωση της προχωρημένης ίνωσης και παρόλη την καλή του διαγνωστική αξία, ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό ασθενών (20-58%) εμπίπτει στην «γκρίζα ζώνη»[32].

Απεικονιστικές μέθοδοι

Η διάγνωση της NAFLD απαιτεί επιβεβαίωση της ηπατικής στεάτωσης μέσω απεικόνισης της ηπατικής βιοψίας με κλινικό αποκλεισμό υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ (>20g/ημέρα)[3]. Επιπρόσθετα, η διάγνωση της NAFLD μπορεί να πραγματοποιηθεί, με σχετικά υψηλό βαθμό αξιοπιστίας, με βάση τη ραδιολογική απεικόνιση, όπως είναι ο υπέρηχος, η αξονική τομογραφία και η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού[60]. Παρόλα αυτά, η ευαισθησία αυτών των μεθόδων είναι χαμηλή και συχνά υπάρχει σημαντικού βαθμού μεταβλητότητα μεταξύ των παρατηρητών. Αποτελούν μεθόδους σχετικά χαμηλού κόστους και άμεσα διαθέσιμες, αλλά εμφανίζουν περιορισμένη ευαισθησία στον εντοπισμό ελάχιστης στεάτωσης (<30%) ή στεάτωσης μεταξύ παχύσαρκων ατόμων[61]. Έτσι, ένας αρνητικός υπερηχογραφικός έλεγχος δεν αποκλείει απαραίτητα και την NAFLD.

Απεικονιστική μέθοδο αποτελεί και η παροδική ελαστογραφία (transient elastography, TE) ή FibroScan, η οποία μετράει την ακαμψία του ήπατος μη παρεμβατικά και έχει αποδειχθεί επιτυχής στον εντοπισμό προχωρημένης ίνωσης σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β και C. Παρόλο που μια πρόσφατη μετά-ανάλυση έδειξε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την εν λόγω μέθοδο στον εντοπισμό ίνωσης στην NAFLD[31], εμφανίζει μεγάλο ποσοστό αποτυχίας σε άτομα με υψηλό BMI.

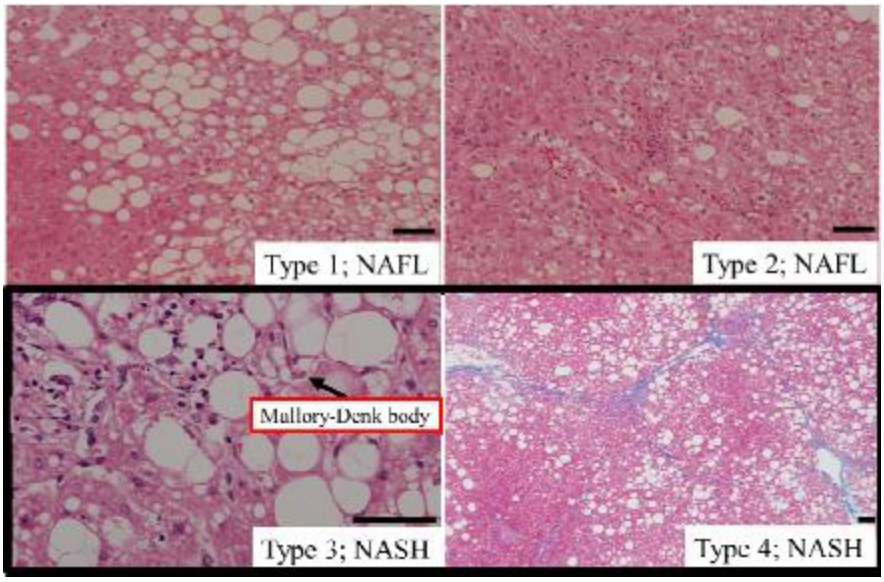
Παρεμβατικές μέθοδοι

Βιοψία ήπατος

Η βιοψία ήπατος αποτελεί τη «χρυσή μέθοδο» για τη διάγνωση και είναι ο μόνος τρόπος διαχωρισμού μεταξύ απλής στεάτωσης και NASH ή εντοπισμού του σταδίου της ίνωσης[62]. Η απόφαση για την πραγματοποίηση ηπατικής βιοψίας πρέπει να είναι εξατομικευμένη και να γίνεται όταν υπάρχει αβεβαιότητα για τη διάγνωση (για παράδειγμα παρουσία υψηλών επιπέδων παραμέτρων σιδήρου, αυτό-αντισωμάτων ή υποψίας συνυπάρχουσας τοξικότητας φαρμάκων) ή για να παρέχει πρόγνωση ως προς την έκβαση της νόσου. Επιπλέον, η ηπατική βιοψία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου προχωρημένης ίνωσης (σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία, ηλικία >45 ετών, AST:ALT>1)[63], όπου η διάγνωση της κίρρωσης έχει επιπτώσεις στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Βαθμολόγηση και σταδιοποίηση της NASH

Από την ερευνητική ομάδα των Brunt *et al.* προτάθηκε ένα σύστημα με το οποίο αξιολογείται ο βαθμός και το στάδιο της NASH[64]. Ο βαθμός 1 υποδεικνύει ήπια στεάτωση, κυρίως μακροφυσαλιδώδη με ελάχιστη διόγκωση των ηπατοκυττάρων και ελάχιστη φλεγμονή. Ο βαθμός 2 δείχνει μέτρια στεάτωση, συχνά τόσο μακρο- όσο και μικροφυσαλιδώδη με διόγκωση παρούσα στη ζώνη 3 των ηπατοκυττάρων, καθώς επίσης και μερική λοβιακή φλεγμονή. Ο βαθμός 3 παρουσιάζει όλα τα χαρακτηριστικά του βαθμού 2, αλλά απαιτεί και την παρουσία πυλαίας φλεγμονής. Η σταδιοποίηση της νόσου απαιτεί την τρίχρωμη χρώση του Masson. Το στάδιο 1 υποδεικνύει περιφλεβική και περιημιτονοειδή φλεγμονή στη ζώνη 3 των ηπατοκυττάρων, που μπορεί να είναι είτε εστιακή είτε εκτενής. Το στάδιο 2 προϋποθέτει τα γνωρίσματα του σταδίου 1 με την επιπρόσθετη παρουσία εστιακής ή εκτενούς πυλαίας φλεγμονής. Τέλος, το στάδιο 3 δείχνει γεφυροποιό ίνωση και το στάδιο 4 υποδηλώνει κίρρωση με ή χωρίς περιημιτονοειδή ίνωση.



Εικόνα 3 Ιστολογικά ευρήματα στην NAFLD. Δείγματα βιοψιών ήπατος NAFLD ασθενών. Αντιπροσωπευτικά ευρήματα τεσσάρων κατηγοριοποιήσεων σύμφωνα με τους Matteoni *et al.* (1999). Τύπος 1: μόνο στεάτωση (x100, χρώση αιματοξυλίνης (Hematoxylin, H) και εωσίνης (Eosin, E)), Τύπος 2: στεάτωση με λοβιακή φλεγμονή (x100, χρώση H και E), Τύπος 3: στεάτωση με διόγκωση ηπατοκυττάρων (x200, χρώση H και E) και σωμάτιο Mallory-Denk, Τύπος 4: τύπος 3 είτε με σωμάτια Mallory-Denk είτε με ίνωση (x40, χρώση Azan). Κλίμακα: 50μm[65].

Αργότερα, το NASH CRN υποκατηγοριοποίησε το στάδιο 1 των Brunt *et al.* σε 3 κατηγορίες. Έτσι, προέκυψε το στάδιο 1A, με ήπια περιημιτονοειδή φλεγμονή στη ζώνη 3, το στάδιο 1B, με μέτρια περιημιτονοειδή ίνωση στη ζώνη 3 και το στάδιο 1C, που χαρακτηρίζεται μόνο από πυλαία/περιπυλαία φλεγμονή. Το στάδιο 1C της ίνωσης παρατηρείται σποραδικά στα παιδιά και σε ασθενείς με σοβαρού βαθμού παχυσαρκία[66].

Νέες, μη παρεμβατικές, διαγνωστικές μέθοδοι

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η πρότυπη μέθοδος αξιολόγησης της σοβαρότητας της ηπατικής βλάβης είναι η βιοψία. Παρόλα αυτά, η παρεμβατική φύση της μεθόδου και η ευαισθησία της ως προς το σφάλμα του δείγματος την καθιστούν ακατάλληλο εργαλείο για τη διαλογή των ασθενών με NAFLD και την παρακολούθηση αυτών για την εν δυνάμει προοδευτικότητα της νόσου. Δεδομένων των περιορισμών αυτών στη χρήση της βιοψίας, καθώς επίσης και ότι οι ιστοπαθολογικοί παράγοντες κινδύνου για τελικού σταδίου ηπατική ανεπάρκεια σε ασθενείς με NAFLD περιλαμβάνουν τη NASH και την προχωρημένη ίνωση, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη ύπαρξης μη παρεμβατικών μεθόδων ικανών να εντοπίσουν αυτές τις δύο καταστάσεις.

Στην προσπάθεια εύρεσης τέτοιων μεθόδων για τη διάγνωση και τον εντοπισμό της σοβαρότητας του σταδίου της NAFLD σε διαβητικούς ασθενείς, οι οποίοι αποτελούν πληθυσμό υψηλού κινδύνου εμφάνισης της νόσου, έχει διερευνηθεί ο συσχετισμός διάφορων βιοδεικτών του ορού με στάδια της NAFLD που χαρακτηρίζονται από σοβαρότερες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Ειδικότερα, σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων με διαβητικούς ασθενείς και

διαγνωσμένη NAFLD μέσω βιοψίας, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης (adiponectin), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α), του τροποποιητικού παράγοντα της ανάπτυξης (transforming growth factor-β1, TGF-β1), των ιντερλευκινών -6, -8 και -10 (interleukin-6, -8, -10, IL-6, -8, -10) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP). Η σοβαρότητα της νόσου αξιολογήθηκε από δύο ηπατολόγους σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης του NASH CRN και εκτιμήθηκε η ανεξάρτητη συσχέτιση των κυτταροκινών με την ύπαρξη NASH και ανεπτυγμένης ίνωσης. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα κυτταροκινών μεταξύ ασθενών με NASH ή ανεπτυγμένη ίνωση ήταν ανάλογα με αυτών που δεν παρουσίαζαν τις ανωτέρω καταστάσεις. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού για αυτούς με NASH και τα χαμηλότερα επίπεδα τόσο της αδιπονεκτίνης όσο και του TGF-β1 για αυτούς με προχωρημένη ίνωση[67]. Έτσι, εφόσον οι δύο αυτοί δείκτες σχετίζονται με σοβαρότερα στάδια της NAFLD σε διαβητικούς ασθενείς μπορούν να αποτελέσουν εργαλεία για την υπόδειξη διεξαγωγής ηπατικής βιοψίας.

Πρόσφατα, η ερευνητική ομάδα των Chwist *et al.* προσπάθησε να εντοπίσει τη σταδίου 2 και 3 NAFLD σε ασθενείς με αποδεδειγμένη ιστολογικά παρουσία της νόσου, ποικίλης σοβαρότητας, χρησιμοποιώντας εργαστηριακούς δείκτες που περιελάμβαναν τη βισφατίνη (visfatin), την αδιπονεκτίνη, τη λεπτίνη, το υαλουρονικό οξύ, την ιντερλευκίνη 6, τη ζονουλίνη, την απτογλοβίνη και το αντιγόνο ειδικού πολυπεπτιδίου του ιστού (tissue polypeptide-specific antigen, TPSA)[68] σε συνδυασμό με άλλα άμεσα διαθέσιμα κλινικά, δημογραφικά και εργαστηριακά στοιχεία. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι αυτό το σύστημα βαθμολόγησης βασιζόμενο στις ανωτέρω μεταβλητές μπορεί να προβλέψει την προχωρημένη ίνωση με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Παρόλα αυτά, η κλινική του χρησιμότητα θα πρέπει να πιστοποιηθεί και σε μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων.

Στην ίδια λογική, οι Yu *et al.* διεξήγαγαν μία μελέτη κατά την οποία, μέσω πρωτεομικής προσέγγισης, προσπάθησαν να διερευνήσουν την ύπαρξη δυνητικών βιοδεικτών για την NAFLD. Παρατήρησαν ότι το πρωτεϊνικό μόριο που εκφραζόταν κυρίως σε αυτή την κατηγορία ασθενών ήταν η υπομονάδα α της αιμογλοβίνης (hemoglobin subunit alpha). Εν συνεχεία, εκμεταλλευόμενοι αυτό το εύρημα, μελέτησαν προοπτικά 6944 άτομα ελεύθερα της νόσου στην αρχή της μελέτης, ώστε να αξιολογήσουν την προγνωστική αξία της αιμογλοβίνης για την ανάπτυξη NAFLD. Φάνηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα αιμογλοβίνης στην αρχή της μελέτης συσχετίστηκαν με υψηλότερη επίπτωση της νόσου, προσδίδοντας πιθανά σημαντική προγνωστική αξία στον εν λόγω δείκτη[69].

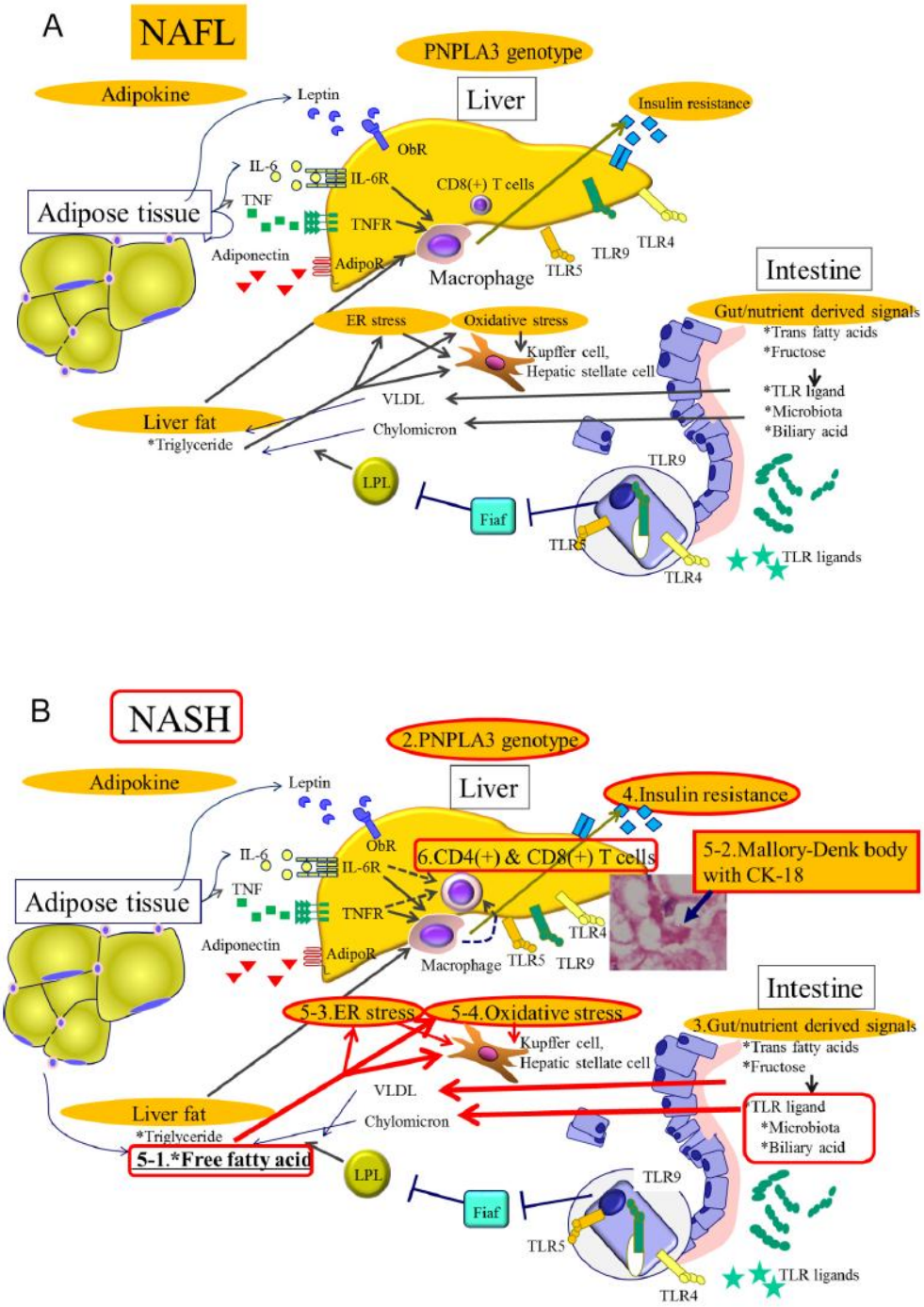
Επίσης, τα επίπεδα των θραυσμάτων της κυτοκερατίνης 18 (cytokeratin-18, CK18) στην κυκλοφορία έχουν διερευνηθεί εκτενώς σαν νέοι βιοδείκτες για την παρουσία στεατοηπατίτιδας

σε ασθενείς με NAFLD[31,70]. Οι Wieckowska *et al.* μέτρησαν τα επίπεδα των θραυσμάτων CK18 στο πλάσμα, που είχαν ληφθεί από 44 ασθενείς με υποψία για NAFLD τη στιγμή της βιοψίας ήπατος και συσχέτισαν τα ευρήματά τους με ηπατικά ανοσοϊστοχημικά δεδομένα[57]. Τα επίπεδα των θραυσμάτων CK18 στο πλάσμα ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με NASH, σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν απλή στεάτωση ή φυσιολογικές βιοψίες, και αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της NASH. Αυτή η παρατήρηση αναπαράχθηκε σε διάφορες μετέπειτα μελέτες και σε μία πρόσφατη μετά-ανάλυση εκτίμησε ότι τα επίπεδα της CK18 στο πλάσμα εμφανίζουν 78% ευαισθησία, 87% ειδικότητα και τιμή AUROC 0,82 ως προς την ύπαρξη στεατοηπατίτιδας σε ασθενείς με NAFLD[31]. Παρόλα αυτά, ενώ τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, σε κάθε μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετική τιμή που υποδεικνύει την ύπαρξη στεατοηπατίτιδας κι έτσι δεν υπάρχει κοινό σημείο αναφοράς για τον εντοπισμό της.

ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ NAFLD

Η συσσώρευση του λίπους στο ήπαρ αποτελεί το αποκορύφωμα της απορρύθμισης της εισροής λιπαρών οξέων στο ήπαρ, της εκροής αυτών από το ήπαρ και της ηπατικής de novo λιπογένεσης (de novo lipogenesis, DNL). Αδιποκίνες και κυτταροκίνες της κυκλοφορίας παίζουν ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, αλλά προκύπτουν και από αυτή. Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι, σχεδόν, καθολικά παρούσα στην NAFLD και ο διαβήτης αποτελεί πολύ συχνό εύρημα στους ασθενείς που αναπτύσσουν NASH. Η λιποτοξικότητα, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum, ER) εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ηπατικής βλάβης. Επιπλέον, η κατανομή του λιπώδους ιστού και διάφοροι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία και ίσως ακόμα και η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου να παίζει κάποιο ρόλο[71].

Η παθοφυσιολογία της NASH θεωρείται ως μια διαδικασία «δύο χτυπημάτων» (“two hit” theory)[72]. Το πρώτο χτύπημα είναι η ανάπτυξη της στεάτωσης μέσω της συσσώρευσης TAG στα ηπατοκύτταρα, ενώ το δεύτερο χτύπημα περιλαμβάνει μια ποικιλία από κυτταρικούς παράγοντες, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η απόπτωση και η εντερική διέγερση. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association study, GWAS) εντόπισε το γονίδιο PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain containing 3) ως παράγοντα-κλειδί στην ανάπτυξη της NASH. Η ανάμειξη του PNPLA3 στην παθογένεση της NASH υποδεικνύει ότι μια απλή διαδικασία δύο χτυπημάτων δεν επαρκεί για να εξηγήσει αυτή την τόσο ετερογενή νόσο. Πρόσφατα, προτάθηκε μια θεωρία «πολλαπλών χτυπημάτων» με την οποία υποστηρίζεται ότι η φλεγμονή αποτελεί τον επαγωγέα της στεάτωσης και ότι το γενετικό υπόβαθρο σχετίζεται με την προοδευτικότητα της νόσου[65].



Εικόνα 4 Πολλαπλά «χτυπήματα» σε (A) NAFL και (B) NASH[65]. (A) Παρουσιάζονται τα πολλαπλά «χτυπήματα» στη NAFL. Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος έχουν δείξει τη σημασία του πολυμορφισμού του γονιδίου PNPLA3 στην NAFLD. Αυτός ο γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να διαφοροποιήσει την απλή στεάτωση με ή χωρίς ελάχιστη φλεγμονή και την ίνωση που μπορούν να εξελιχθούν σε NASH. Πρόσφατα, το εντερικό μικροβίωμα έχει αναγνωριστεί ως εμπλεκόμενος παράγοντας στην ανάπτυξη της NAFLD. Η ποικιλία του μικροβιώματος μπορεί να επάγει τη διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου οδηγώντας σε λιποπολυσακχαριδαιμία, που σχετίζεται με την εξέλιξη της NASH. Τα εντερικά βακτήρια καταστέλλουν τη σύνθεση του παράγοντα Fiaf (fasting-induced adipocyte factor) οδηγώντας στην αυξημένη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL) και την αυξημένη συσσώρευση TAG. Η παχυσαρκία και ο διαβήτης επάγουν την IR, τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων και αλλαγές στην εντερική χλωρίδα. Τα μακροφάγα παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της φλεγμονής και της IR. **(B)** Η κατανάλωση FFAs και χοληστερόλης επάγουν τόσο το οξειδωτικό όσο και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγώντας στην ηπατική φλεγμονή και την ινογένεση, που επάγουν την εξέλιξη της NASH. Σε μερικές περιπτώσεις, η φλεγμονή μπορεί να προϋπάρχει της στεάτωσης και έχει βρεθεί ότι το αντίσωμα του TNF-α βελτιώνει τη στεάτωση σε ob/ob ποντίκια. Τα CD4(+) Τ-λεμφοκύτταρα ανευρίσκονται μετά την ανάπτυξη της NASH. Αδιποκίνες, όπως η IL-6 και ο TNF-α, παράγονται από τα λιποκύτταρα και επηρεάζουν το περιεχόμενο σε λίπος και το φλεγμονώδες περιβάλλον στο ήπαρ. Τα σωμάτια Mallory-Denk είναι μεγάλα ηωσινόφιλα πρωτεϊνικά συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων που περιέχουν CK-18 και αποτελούν το σήμα κατατεθέν της αλκοολικής ηπατίτιδας και της NASH.

Μεταβολισμός λιπιδίων και NAFLD

Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων, καθώς εισάγει ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids, FFAs) στο εσωτερικό του, παράγει, αποθηκεύει, αλλά και εξάγει λιπίδια στην κυκλοφορία. Έτσι, η όποια διαταραχή σε κάποια από τις παραπάνω διαδικασίες μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη NAFLD[73]. Τα λιπαρά οξέα (fatty acids, FAs) εμπλέκονται σε πληθώρα σημαντικών διεργασιών στα κύτταρα, όπως είναι η σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών, η αποθήκευση ενέργειας και ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης. Παρόλα αυτά, τα χρόνια αυξημένα επίπεδα FFAs μπορούν να διαταράξουν διάφορα μεταβολικά μονοπάτια και να επάγουν ινσουλινοαντίσταση σε πολλά όργανα. Η ηπατική συσσώρευση λίπους, έχει συνδεθεί ισχυρά με την ινσουλινοαντίσταση[74,75]. Η IR στον περιφερικό λιπώδη ιστό ενισχύει τη λιπόλυση και αυξάνει τη μεταφορά των FFAs που προέρχονται από το λιπώδη ιστό στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, η παχυσαρκία αυξάνει την παραγωγή του TNF-α στα λιποκύτταρα, διευκολύνει την IR στα λιποκύτταρα και αυξάνει το ρυθμό της λιπόλυσης[76]. Έτσι, τα FFAs της κυκλοφορίας είναι αυξημένα στα παχύσαρκα άτομα και ευθύνονται για την πλειοψηφία των ηπατικών λιπιδίων στην NAFLD[77].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η σύνθεση TAG διεγείρεται για τη διευθέτηση της περίσσειας των FFAs. Με αυτόν τον τρόπο, οι TAG μπορούν να αποθηκευθούν, εν συνεχεία, ως σταγονίδια λίπους μέσα στα ηπατοκύτταρα ή να εκκριθούν στο αίμα ως λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very-low-density lipoproteins, VLDL)[78]. Από μελέτες σε τρωκτικά έχει δειχθεί ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στην υπέρμετρη συσσώρευση ηπατικών TAG σχετίζονται με την αυξημένη διάθεση FFAs από τον περιφερικό λιπώδη ιστό στο ήπαρ και με την αυξημένη de novo σύνθεση λιπιδίων μέσω λιπογενετικών μονοπατιών. Αντιθέτως, η διάθεση των λιπιδίων μέσω της β-οξείδωσης και η εξαγωγή τους ως VLDL φαίνεται να επηρεάζονται σε κάποιο βαθμό[79]. Σε κυτταρικό επίπεδο, βλάβες στις οδούς σηματοδότησης της ινσουλίνης συμβάλλουν στην αυξημένη εισροή FFAs στο ήπαρ, η οποία διαδοχικώς ενεργοποιεί μια σειρά από καταρράκτες σηματοδότησης και οδηγεί στη φωσφορυλίωση διάφορων υποστρωμάτων[80]. Παρά το γεγονός ότι οι TAG αποτελούν την κύρια μορφή με την οποία τα λιπίδια είναι αποθηκευμένα στο ήπαρ στους ασθενείς με NAFLD, μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι με αυτή τη μορφή μπορεί να ασκούν προστατευτικό ρόλο. Ειδικότερα, η σύνθεση TAG φαίνεται να αποτελεί μια ευεργετική απάντηση προσαρμογής σε καταστάσεις όπου τα ηπατοκύτταρα εκτίθενται σε δυνητικά τοξικούς μεταβολίτες των TAG[81-83]. Τόσο τα FFAs όσο και η χοληστερόλη, ειδικά όταν συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια, θεωρούνται η «επιθετική» μορφή λιπιδίων που οδηγεί στην ηπατική βλάβη, η οποία επάγεται από τον TNF-α και το σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)[84,85]. Αυτά τα λιπίδια θα μπορούσαν

να είναι, επίσης, παρόντα σε ένα ήπαρ χωρίς στεάτωση και να δρουν ως πρόδρομοι φλεγμονής, οδηγώντας στο παθολογικό φάσμα της NAFLD. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι, η αφθονία των FAs προκαλεί λιποτοξικότητα μέσω επαγωγής απελευθέρωσης ROS, η οποία προκαλεί φλεγμονή, απόπτωση, και με αυτόν τον τρόπο, την εξέλιξη σε NASH και την ανάπτυξη ίνωσης[85-87].

Συνοπτικά, η συσσώρευση TAG στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, ως το σήμα κατατεθέν της NAFLD, προκύπτει από ανισορροπία μεταξύ της απόκτησης λιπιδίων (πρόσληψη FA και de novo λιπογένεση) και της μετακίνησης αυτών (μιτοχονδριακή οξείδωση FA και εξαγωγή ως συστατικά των VLDL) και συνοδεύει πολλούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της NASH.

Ηπατική πρόσληψη λιπαρών οξέων

Μία από τις πηγές των ηπατικών FAs είναι η πρόσληψη FFA από την κυκλοφορία του αίματος. Τα FFAs προέρχονται από τη λιπόλυση στα λιποκύτταρα, που συμβαίνει συνήθως σε κατάσταση νηστείας, και ενισχύεται από τις κατεχολαμίνες, τα νατριοδιουρητικά πεπτίδια και τη γλυκαγόνη, ενώ καταστέλλεται από την ινσουλίνη[88]. Παρόλα αυτά, η κατάσταση ινσουλινοαντίστασης (παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο) συνοδεύεται από αυξημένη λιπόλυση στα λιποκύτταρα, οδηγώντας σε αφθονία FFAs στη δεξαμενή του πλάσματος ανεξάρτητα από τη διατροφική κατάσταση[89]. Η πρόσληψη των FAs από το ήπαρ συμβάλλει στη σταθερή ισορροπία των ηπατικών TAGs, καθώς επίσης, και στην παθογένεση της NAFLD. Ο ρυθμός της πρόσληψης των FAs από το πλάσμα στα κύτταρα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των FAs στο πλάσμα και την ικανότητα των ηπατοκυττάρων να προσλαμβάνουν FAs, που με τη σειρά του εξαρτάται από τον αριθμό και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών μεταφορέων στην ημιτονοειδή μεμβράνη του πλάσματος στα ηπατοκύτταρα. Οι κύριοι μεμβρανικοί μεταφορείς FFAs του πλάσματος είναι η FA πρωτεΐνη μεταφορέας (FA transporter protein, FATP), οι καβεολίνες, η FA τρανσλοκάση/CD36 (FA translocase/CD36, FAT/CD36) και η πρωτεΐνη δέσμευσης FA (FA-binding protein, FABP)[90-94].

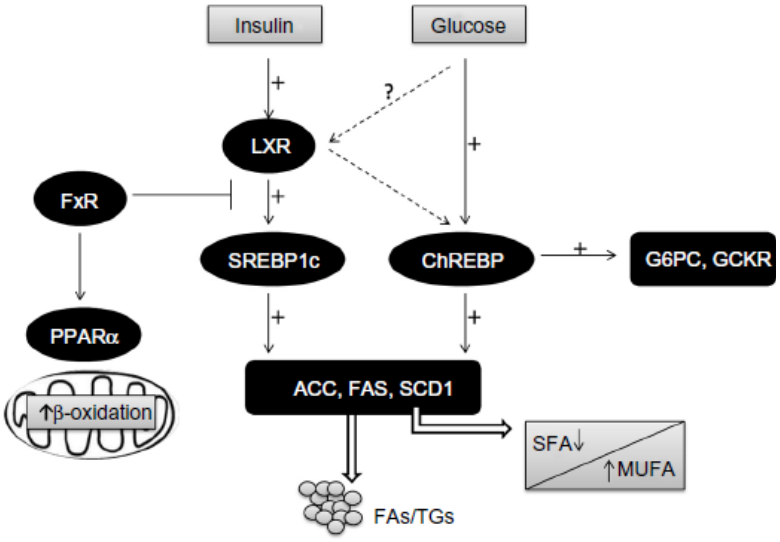
De novo λιπογένεση (De novo lipogenesis)

Η διαδικασία με την οποία το ήπαρ συνθέτει ενδογενή λιπαρά οξέα καλείται de novo λιπογένεση. Αυτή περιλαμβάνει την de novo σύνθεση FAs μέσω ενός περίπλοκου κυτταροσωμικού πολυμερισμού κατά τον οποίο η γλυκόζη μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA (acetyl-CoA), μέσω της γλυκολυτικής διαδικασίας, και την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος. Στη συνέχεια, η καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (acetyl-CoA carboxylase, ACC1) μετατρέπει το ακέτυλο-CoA σε μαλόνυλο-CoA. Τέλος, η συνθάση των λιπαρών οξέων (fatty

acid synthase, FAS) καταλύει το σχηματισμό του παλμιτικού οξέος από το μαλόνυλο-CoA και το ακέτυλο-CoA[95-97]. Ανάλογα με το μεταβολικό στάδιο, τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται, εν συνεχεία, σε TAGs και αποθηκεύονται ή μεταβολίζονται.

Το διαιτητικό λίπος πακετάρεται στα χυλομικρά και υδρολύεται, απελευθερώνοντας FAs από τα οποία περίπου το 20% μεταφέρεται στο ήπαρ[24.] Σε κατάσταση νηστείας, η μείωση των επιπέδων της ινσουλίνης διεγείρει την υδρολάση των TAGs των λιποκυττάρων και ως εκ τούτου απελευθερώνονται FFAs που μεταφέρονται στο ήπαρ. Εκεί, τα FFAs, που προέρχονται από τους περιφερικούς ιστούς, την ενδογενή σύνθεση ή τη δίαιτα, χρησιμοποιούνται: 1) για την παραγωγή ενέργειας και κετονικών σωμάτων μέσω της μιτοχονδριακής β-οξείδωσης, 2) εστεροποιούνται και αποθηκεύονται ως TAGs σε λιποσταγονίδια ή 3) πακετάρονται με την απολιποπρωτεΐνη B σε VLDL και εκκρίνονται στην κυκλοφορία[97,98]. Στους ασθενείς με NAFLD, η αύξηση των FAs μέσω της πρόσληψης και της de novo λιπογένεσης δεν αντισταθμίζεται από την οξείδωση των FAs και την παραγωγή VLDL κλασμάτων.

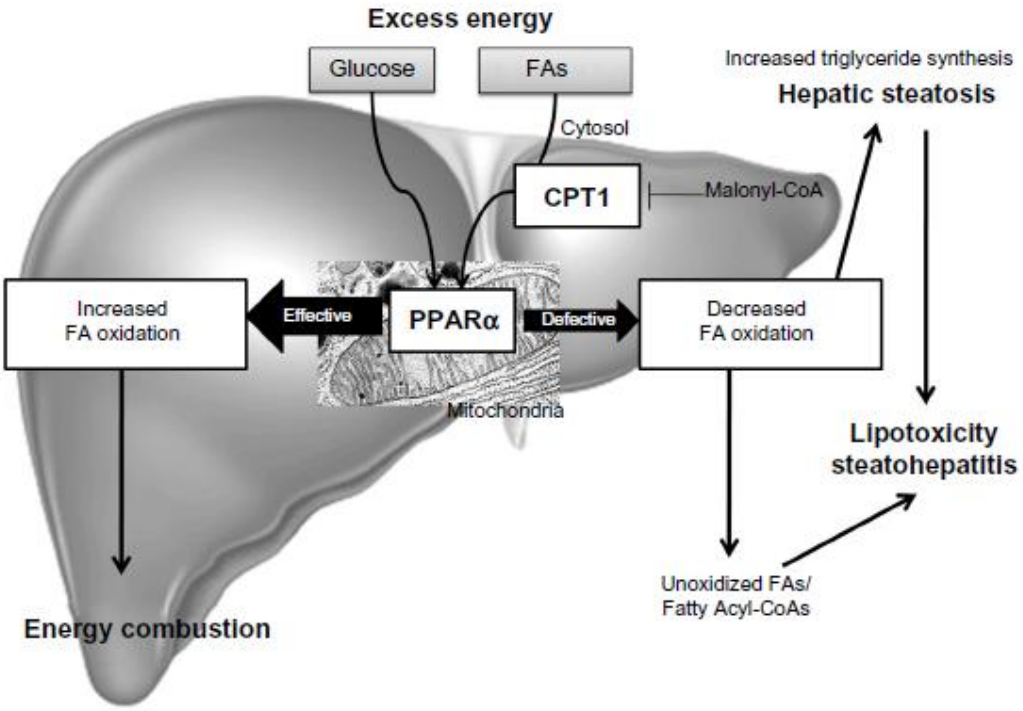
Ο ρυθμός της de novo λιπογένεσης ρυθμίζεται πρωταρχικά σε μεταγραφικό επίπεδο (Εικόνα 5)[99]. Διάφοροι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται, όπως ο LXRα, ο SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein 1c), ο ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) και ο FXR (farnesoid X receptor), καθώς επίσης και ένζυμα (ACC1, FAS, αποκορεστάση 1 του στερόυλο-CoA [SCD1]). Μεταγευματικά, τα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος και της ινσουλίνης αυξάνονται, προκαλώντας την ενεργοποίηση της λιπογένεσης, αφού ενεργοποιούν τους ChREBP και SREBP1c, αντίστοιχα[73,100]. Στους ανθρώπους, η NAFLD έχει συσχετιστεί με αυξημένη ηπατική έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην de novo λιπογένεση[101,102].



Εικόνα 5 Μεταγραφικός έλεγχος λιπογένεσης και γλυκόλυσης[99]. Η μετατροπή της γλυκόζης σε FAs μέσω της de novo λιπογένεσης ρυθμίζεται θρεπτικά από τα μονοπάτια σηματοδότησης της γλυκόζης και της ινσουλίνης, που επάγουν την έκφραση γλυκολυτικών και λιπογονικών γονιδίων συνεργιστικά ως απόκριση στους διαιτητικούς υδατάνθρακες. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα SREBP1c, που επάγει λιπογονικά ένζυμα (ACC1, FAS, SCD1), ενώ η γλυκόζη ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα ChREBP, που επάγει τόσο λιπογονικά (ACC1, FAS, SCD1) όσο και γλυκολυτικά (G6PC, GCKR) ένζυμα. Επιπλέον, ο ChREBP αποτελεί άμεσο στόχο των LXRs και μεταβάλλει το λόγο MUFA/SFA ευνοώντας τα MUFA διεγείροντας τη δραστηριότητα του SCD1. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η γλυκόζη ενεργοποιεί επίσης τα γονίδια των LXRs. Η ηπατική ενεργοποίηση του FxR παρεμποδίζει τη σύνθεση FA/TAG καταστέλλοντας τη δραστηριοποίηση των SREBP1c και LXRα, και επάγοντας την έκφραση του PPARα, που προωθεί τη μιτοχονδριακή οξείδωση των FAs. [**G6PC** (glucose 6-phosphatase, φωσφατάση της 6-γλυκόζης), **GCKR** (glucokinase regulatory protein, ρυθμιστική πρωτεΐνη της γλυκοκινάσης)]

Οξείδωση λιπαρών οξέων

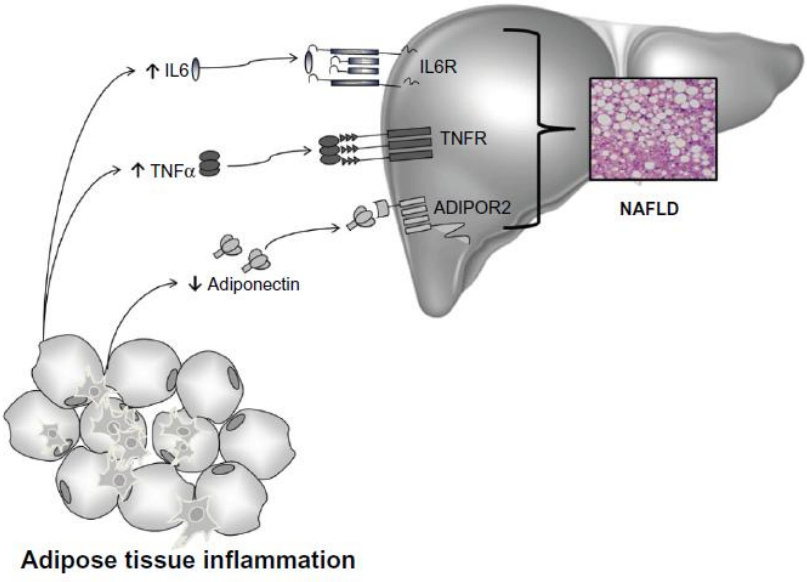
Η οξείδωση των λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισωμάτια και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Με αυτή τη διαδικασία διευκολύνεται η μετατροπή των ενεργοποιημένων FAs σε ακέτυλο-CoA. Τα FAs ενεργοποιούνται από τη συνθάση του ακέτυλο-CoA σε άκυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που τους επιτρέπει να περάσουν διαμέσου των μεμβρανών και να εισέλθουν στα οργανίδια του κυττάρου. Τα βραχείας και μεσαίας αλύσου FAs διαπερνούν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση. Παρόλα αυτά, τα ενεργοποιημένα μακράς αλύσου FAs (long chain fatty acids, LCFAs) διαπερνούν τη μεμβράνη μέσω της παλμιτόυλο-τρανσφεράσης 1 της καρνιτίνης (carnitine palmitoyltransferase-1, CPT1). Το μαλόνυλο-CoA, που αποτελεί πρόδρομο της de novo λιπογένεσης, αναστέλλει τη δράση της CPT1. Στη μεταγευματική κατάσταση, η οξείδωση των FAs αναστέλλεται και η de novo λιπογένεση προωθείται, επιτρέποντας την αποθήκευση και τη διανομή των λιπιδίων. Σε γενικές γραμμές, τα βραχείας, μεσαίας και μακράς αλύσου FAs οξειδώνονται στα μιτοχόνδρια με τη διαδικασία της β-οξείδωσης. Αντιθέτως, τα τοξικά, πολύ μακράς αλύσου FAs (very long chain fatty acids, VLCFAs) οξειδώνονται στο εσωτερικό των υπεροξειδιοσωμάτων. Στο σακχαρώδη διαβήτη ή σε κατάσταση υπερφόρτωσης με λιπαρά οξέα, η εξαρτώμενη από το κυτόχρωμα P450 (cytochrome P450, CYP4A) ω-οξείδωση των LCFAs λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και επάγει τη δημιουργία ROS και την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Κατά τη διάρκεια της β-οξείδωσης, προσφέρονται έμμεσα ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για να προωθηθεί η σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine tri-phosphate, ATP). Το ακέτυλο-CoA μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω κατεργασία μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος του Krebs) ή, σε περίπτωση αφθονίας FAs, να μετατραπεί σε κετονικά σώματα. Η σηματοδότηση μέσω της ινσουλίνης και του PPARα και πάλι εμπλέκονται στη ρύθμιση της οξείδωσης των FAs και της δημιουργίας κετονικών σωμάτων μέσω μεταγραφικής ρύθμισης της μιτοχονδριακής συνθάσης του 3-ύδροξυ-3-μεθυλογλουτάρυλο-CoA (3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA, HMG-CoA)[96] (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 Οξείδωση λιπαρών οξέων[99]. Στο ήπαρ η μιτοχονδριακή, υπεροξεισωμική και μικροσωμική οξείδωση των FAs ρυθμίζονται από τον PPARα και μεταβολίζουν ενέργεια. Η αυξημένη διέγερση του PPARα οδηγεί σε κατανάλωση ενέργειας και μείωση των αποθηκών λίπους. Αντιθέτως, η μειωμένη διέγερση του PPARα οδηγεί σε μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και σε αυξημένη λιπογένεση, οδηγώντας σε στεάτωση και στεατοηπατίτιδα.

Φλεγμονή και NAFLD

Είναι ευρέως γνωστό ότι η ισορροπία μεταξύ ενεργών προ- και αντι- φλεγμονωδών κυτταροκινών είναι θεμελιώδης στον έλεγχο της συστημικής και ηπατικής δράσης της ινσουλίνης, και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη NAFLD. Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της NAFLD και προκαλείται από πληθώρα παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων διαλυτών μεσολαβητών που προέρχονται από το λιπώδη ιστό ή/και από τα ανοσοκύτταρα, τις αδιποκίνες (Εικόνα 7)[103].



Εικόνα 7 Κυτοκίνες και NAFLD[99]. Η ισορροπία/ανισορροπία των προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό μπορεί κατά βάθος να επηρεάσουν και το ήπαρ. Η ηπατική έκφραση του mRNA της αδιπονεκτίνης βρέθηκε πιο μειωμένη σε ασθενείς με NAFLD. Παρόλα αυτά, η έκφραση του mRNA του TNF-α και της IL-6 ήταν μεγαλύτερη σε αυτούς τους ασθενείς. Η NAFLD σχετίζεται με περισσότερες προ-φλεγμονώδεις και λιγότερες αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες.

Αδιπονεκτίνη

Η αδιπονεκτίνη, ένα από τα κυριότερα προϊόντα των λιποκυττάρων, αποτελεί πρωτότυπο αντι-φλεγμονώδους και αντι-διαβητικής αδιποκίνης, οι δράσεις της οποίας εκδηλώνονται κυρίως με την ενεργοποίηση της κινάσης που ενεργοποιείται από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (adenosine monophosphate, AMP). Η αδιπονεκτίνη διαθέτει δύο ειδικούς υποδοχείς, τον υποδοχέα τύπου 1 και τύπου 2 της αδιπονεκτίνης (adiponectin receptor type 1 and 2, ADIPOR1 και 2). Ο ADIPOR1 εκφράζεται ευρέως, ενώ ο ADIPOR2 μπορεί κυρίως να ανιχνευθεί στο ήπαρ[104]. Τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στον ορό είναι χαμηλότερα σε παχύσαρκα άτομα, σε αυτούς με σακχαρώδη διαβήτη και σε κατάσταση ινσουλινοαντίστασης[105]. Αντιθέτως, η σύνθεση της αδιπονεκτίνης επάγεται από την απώλεια βάρους και την ενεργοποίηση του PPARγ από τις θειαζολιδινεδιόνες (thiazolidinediones, TZDs)[106]. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η αδιπονεκτίνη ασκεί αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις, διεγείρει την έκκριση αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-10 και ο ανταγωνιστικός υποδοχέας της IL-1 (IL-1 receptor antagonist, IL1Ra), μπλοκάρει την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κΒ (nuclear factor κΒ, NF-κΒ) και παρεμποδίζει την απελευθέρωση του TNF-α, της IL-6 και χημειοκινών[107,108.]

Το ήπαρ δεν αποτελεί πηγή της κυκλοφορούμενης αδιπονεκτίνης, αλλά αποτελεί το κύριο όργανο στόχο για πολλές από τις δράσεις της. Σε μύες με αλκοολική και μη αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια η παροχή ανασυνδυασμένης αδιπονεκτίνης βελτίωσε τη νεκρο-φλεγμονή και τη στεάτωση, εν μέρει μέσω αναστολής της ηπατικής παραγωγής TNF-α και της μείωσης της συγκέντρωσης αυτής της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης στο πλάσμα[109].

Στους ανθρώπους, τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με τους αντίστοιχους υγιείς και με ασθενείς με απλή στεάτωση, ανεξάρτητα από την IR και το WHR. Η IR και τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού σχετίστηκαν με αυξημένη στεάτωση και νεκρο-φλεγμονή, αλλά όχι με σοβαρή ίνωση, η οποία μπορούσε να προβλεφθεί μόνο από την IR[110]. Άλλη μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με νοσογόνο παχυσαρκία που έχουν IR και υποβάλλονται σε βαριατρική επέμβαση παρουσιάζουν μικρότερη έκφραση του mRNA της αδιπονεκτίνης στο λιπώδη ιστό και χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης στον ορό σε αντίθεση με αυτούς που δεν έχουν IR. Αυτή η περιορισμένη έκφραση της αδιπονεκτίνης είναι πιθανό να προδιαθέτει τους ασθενείς για την προοδευτική μορφή της NAFLD ή της NASH[111].

Η μικρή έκφραση του mRNA της αδιπονεκτίνης και του ADIPOR2 βρέθηκε στο ήπαρ ασθενών με NASH σε σχέση με αυτούς που είχαν απλή στεάτωση. Επιπλέον, η έκφραση του ADIPOR2 σχετιζόταν αντίστροφα με την αμινοτρανσφεράση της αλανίνης και το στάδιο της ίνωσης[112]. Πρόσφατα οι Moschen *et al.* κατέδειξαν σε μια προοπτική μελέτη ότι η γρήγορη απώλεια βάρους μετά από βαριατρική επέμβαση οδηγεί σε σημαντική βελτίωση τόσο των ιστολογικών

όσο και των βιοχημικών ηπατικών παραμέτρων, οι οποίες συνοδεύονται από αύξηση των επιπέδων αδιπονεκτίνης του ορού, καθώς επίσης και της ηπατικής έκφρασης του mRNA της αδιπονεκτίνης[113].

Κατά ολοκληρίαν, υπάρχουν πια δυνατές αποδείξεις ότι τα επίπεδα της κυκλοφορούμενης αδιπονεκτίνης είναι χαμηλότερα στην παχυσαρκία και σχετίζονται με ανθρώπινες ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της NAFLD[113,114].

TNF-α και IL-6

Ο TNF-α και η IL-6 αποτελούν δύο σημαντικές προ-φλεγμονώδεις αδιποκίνες και η έκφραση και των δύο αυξάνεται κατακόρυφα στα λιποκύτταρα των παχύσαρκων και των ασθενών με IR[115, 116]. Σε ασθενείς με σοβαρή παχυσαρκία, η έκφραση του mRNA της IL-6 και του TNF-α είναι πιο ξεκάθαρη στο λιπώδη ιστό παρά στο ήπαρ[117].

Ο TNF-α ταυτοποιήθηκε περισσότερο από δύο δεκαετίες πριν ως ο πρώτος φλεγμονώδης παράγοντας που συνδέεται με την IR[118]. Έχουν βρεθεί υψηλότερα επίπεδα TNF-α και διαλυτού υποδοχέα 2 του TNF-α (TNF-α receptor 2, TNFR2) στον ορό ασθενών με NASH σε σχέση με τον αντίστοιχο υγιή πληθυσμό και αυτές οι διαφορές ήταν ανεξάρτητες της υψηλότερης IR. Παρόλα αυτά, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στον TNF-α και τον TNFR2 μεταξύ ασθενών με απλή στεάτωση και NASH[110].

Η ενισχυμένη ηπατική έκφραση του TNF-α καταδείχθηκε πρόσφατα σε μια ομάδα παχύσαρκων ασθενών με NAFLD. Οι Crespo *et al.* ανέφεραν αυξημένη ηπατική έκφραση των TNF-α και TNFR2 σε ασθενείς με NASH σε σχέση με αυτούς που είχαν απλή στεάτωση. Σε αυτούς τους ασθενείς, η πιο προχωρημένη ίνωση συνοδευόταν επίσης από αυξημένη ηπατική έκφραση του TNF-α[119]. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, τα επίπεδα του TNF-α στο πλάσμα έχει βρεθεί ότι σχετίζονται θετικά με το βαθμό της ηπατικής ίνωσης, αξιολογημένης με βιοψία ήπατος ενδεικνυόμενης από υπέρηχο, σε ασθενείς με NAFLD προχωρημένων σταδίων[120].

Συν τοις άλλοις, ορισμένοι πολυγενετικοί πολυμορφισμοί του TNF-α έχει βρεθεί να συνοδεύονται από υψηλότερους δείκτες IR, υψηλότερο επιπολασμό διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη (impaired glucose tolerance, IGT) και μεγαλύτερη ευαισθησία για ανάπτυξη NAFLD και NASH[121,122].

Η IL-6 είναι μία πλειοτροπική κυτοκίνη που εκφράζεται σε πολλά φλεγμονώδη κύτταρα ως απόκριση σε διάφορους τύπους ερεθισμάτων, ρυθμίζοντας έναν αριθμό βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένης της IR και της ρύθμισης της φλεγμονής. Είναι γνωστή ως ο κύριος παράγοντας διέγερσης για την ηπατική σύνθεση και έκκριση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) στους ανθρώπους[123] και γι' αυτό το λόγο έχει προταθεί ως ένας δυνητικός

μεσολαβητής που οδηγεί σε NAFLD. Παρόλα αυτά, οι πραγματικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την επαγωγή της NAFLD μέσω της IL-6 παραμένουν ασαφείς.

Προκαταρκτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-6 παίζει προστατευτικό ρόλο στην ηπατική ίνωση, καθώς προάγει τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων και προστατεύει ενάντια στο οξειδωτικό στρες και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία[124]. Από την άλλη, οι Wieckowska *et al.* έχουν δείξει σημαντικά αυξημένη έκφραση της IL-6 στο ήπαρ σε ασθενείς με NASH σε σχέση με αυτούς με απλή στεάτωση ή φυσιολογικό ήπαρ. Επιπλέον, η ηπατική έκφραση IL-6 συσχετίστηκε θετικά με τη σοβαρότητα της φλεγμονής και της ίνωσης. Τα επίπεδα της IL-6 του πλάσματος, που μετρήθηκαν παράλληλα σε αυτή τη μελέτη, εμφάνισαν υψηλού βαθμού συσχέτιση με την ηπατική έκφραση της IL-6[125]. Σε άλλη μελέτη, η IL-6 αξιολογήθηκε μεταξύ διάφορων άλλων δεικτών σε ασθενείς με NAFLD και φάνηκε ότι τα κυκλοφορούμενα επίπεδα της IL-6 ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με τους υγιείς, αλλά δε φάνηκε το ίδιο για τους ασθενείς με NASH σε σχέση με αυτούς με απλή στεάτωση[126].

Η απώλεια βάρους είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της έκφρασης της IL-6 υποδόρια και στο ήπαρ με την επακόλουθη μείωση στην έκφραση του ηπατικού καταστολέα της κυτοκίνης σηματοδότησης 3 (cytokine signaling 3, SOCS3) και βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Από την άλλη μεριά, η έκφραση του TNF-α μετά από την απώλεια βάρους μειώθηκε μόνο στο λιπώδη ιστό και όχι στο ήπαρ[117]. Αυτό θα σήμαινε ότι το ήπαρ μπορεί να είναι ένα όργανο-κλειδί για την IL-6 και τον TNF-α που προέρχονται από το λιπώδη ιστό, διότι η συνεχής έκθεση του ήπατος σε αυτές τις αδιποκίνες επηρεάζει την ηπατική IR[127].

Βισφατίνη

Η βισφατίνη, που καλείται επίσης παράγοντας ενίσχυσης της προ-αποικίας β-κυττάρων (pre-B cell colony enhancing factor, PBEF) ή φωσφο-ριβοσυλ-τρανσφεράση του νικοτιναμιδίου (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT), ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1994 ως μία πρωτεΐνη που εκκρίνεται από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, δρώντας συνεργιστικά με την IL-7 και τον παράγοντα βλαστοκυττάρων (stem cell factor) στα πρώτα στάδια σχηματισμού των β-κυττάρων[128]. Παρόλο που κατά την πρώτη ανακάλυψη αυτού του μορίου αποδόθηκαν σε αυτό λειτουργίες κυτοκίνης, η περαιτέρω ανακάλυψη ότι αποτελεί ένζυμο-κλειδί στη γένεση του αδένινο-δινουκλεοτιδίου του νικοτιναμιδίου (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) διεύρυνε σημαντικά τις βιολογικές του προοπτικές[129]. Οι εξωκυτταρικές της λειτουργίες (δράση κυτοκίνης) είναι κυρίως προ-φλεγμονώδεις, καθώς επάγει δυνητικά διάφορες άλλες προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η IL-6. Οι ενδοκυτταρικές της λειτουργίες εστιάζονται στη ρύθμιση της δραστηριότητας των ενζύμων που καταναλώνουν NAD (NAD-

consuming enzymes) όπως είναι διάφορες σιρτουίνες (sirtuins) και ως εκ τούτου επηρεάζει επίσης τη βιοσύνθεση του TNF-α, τη διάρκεια ζωής των κυττάρων και τη μακροζωία.

Μέχρι στιγμής υπάρχουν διαθέσιμες λίγες αναφορές που απευθύνονται στο ρόλο αυτής της αδιποκίνης στην NAFLD. Σε ασθενείς με NAFLD παρατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις βισφατίνης στον ορό και η απώλεια βάρους σχετίζεται τόσο με μείωση των επιπέδων της στον ορό όσο και με μείωση της έκφρασης του mRNA της στο ήπαρ, υποδεικνύοντας ότι το λιπώδες ήπαρ μπορεί πράγματι να συμβάλλει σε μία αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων της βισφατίνης στον ορό[114]. Στην ίδια μελέτη διεξήχθη ανοσοϊστοχημική χρώση για τη βισφατίνη σε 18 ζεύγη ηπατικών βιοψιών. Η χρώση έδειξε ότι η βισφατίνη εκφραζόταν σε αφθονία στα ηπατοκύτταρα, αλλά η απώλεια βάρους μείωσε δραματικά την έκφρασή της. Άλλη μελέτη έχει καταδείξει τη συσχέτιση των επιπέδων βισφατίνης στον ορό με την ιστολογική κατάσταση του ήπατος στην NAFLD και θεωρήθηκε ότι τόσο υψηλά επίπεδα κυκλοφορούμενης βισφατίνης θα μπορούσαν να αποτελέσουν προβλεπτικό δείκτη για την παρουσία πυλαίας φλεγμονής σε ασθενείς με NAFLD[130].

Από την άλλη μεριά, οι Jarrar *et al.* πρότειναν ότι η βισφατίνη παίζει προστατευτικό ρόλο ενάντια στη φλεγμονώδη βλάβη των ηπατοκυττάρων[131]. Σε αυτή τη μελέτη τα επίπεδα της κυκλοφορούμενης βισφατίνης στον ορό ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με NAFLD σε αντίθεση με τον αντίστοιχο πληθυσμό υγιών, τόσο των αδύνατων όσο και των παχύσαρκων χωρίς παρουσία της νόσου. Επιπλέον, σε αυτούς που ανέπτυξαν NASH, η συγκέντρωση της βισφατίνης μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με την κατάσταση της απλής στεάτωσης, αλλά και σε αυτή την περίπτωση παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τους αντίστοιχους παχύσαρκους ή αδύνατους υγιείς.

Οι Auguet *et al.* αναφέρουν ότι τα κυκλοφορούμενα επίπεδα και η ηπατική έκφραση της βισφατίνης βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα σε μία ομάδα γυναικών με νοσογόνο παχυσαρκία σε σύγκριση με αντίστοιχες αδύνατες γυναίκες και παχύσαρκες γυναίκες με φυσιολογικά ηπατικά ιστολογικά χαρακτηριστικά. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν ότι τα επίπεδα της βισφατίνης του ορού παρουσίασαν υψηλού βαθμού συσχέτιση με τα επίπεδα της IL-6 και της CRP[132].

Από τα παραπάνω ευρήματα φαίνεται ότι η βισφατίνη αποτελεί μόριο με σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της NAFLD όπως και ότι το ήπαρ θα μπορούσε να είναι η κύρια πηγή αυτής της κυτοκίνης.

PPARδ

Η οικογένεια των PPARs αποτελείται από τρία μέλη, που ονομαστικά είναι ο PPARα, ο PPARβ/δ και ο PPARγ. Αυτοί οι υποδοχείς δρουν σαν αισθητήρες των FAs και ελέγχουν πολλά

μεταβολικά μονοπάτια που είναι απαραίτητα για την ενεργειακή ομοιόσταση του οργανισμού. Εξαιτίας του ρόλου του PPARδ σε πολλά μονοπάτια λίγα είναι γνωστά γι' αυτόν ειδικά για τη σχέση που έχει με την παχυσαρκία και την NAFLD, σε αντίθεση με τους άλλους δύο υποδοχείς της οικογένειας[133].

Οι Oliver *et al.* έδειξαν ότι παχύσαρκοι πίθηκοι rhesus με IR έπειτα από θεραπεία με έναν δυνητικό και ειδικό αγωνιστή του PPARδ, τον GW501516, ομαλοποίησαν τη γλυκόζη και την ινσουλίνη νηστείας, αύξησαν την HDL-c και μείωσαν την LDL-c[134]. Άλλες μελέτες σε ζωικό πρότυπο με υπέρ-έκφραση του PPARδ επαγόμενη από αδενοϊό έδειξαν ότι ο PPARδ ρυθμίζει τη λιπογένεση και τη χρήση της γλυκόζης για τη γλυκογονοσύνθεση. Αυτές οι επιδράσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην προστασία του ήπατος από τη βλάβη που προκαλείται από τα FFAs, πιθανά εξαιτίας της παραγωγής MUFA και της μείωσης των επιπέδων των λιποτοξικών SFA[135].

Υπέρβαροι και παχύσαρκοι άνδρες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αγωνιστές του PPARδ, είτε με τον GW501516 είτε με τον MBX-8025, εμφάνισαν βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, μείωση στις TAGs νηστείας του πλάσματος, στα μη εστεροποιημένα FAs, στην απολιποπρωτεΐνη B-100 και στην LDL-χοληστερόλη, καθώς επίσης και μειωμένο ηπατικό περιεχόμενο λίπους που αξιολογήθηκε μέσω απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (magnetic resonance imaging, MRI)[136,137]. Παρόλα αυτά, οι ακριβείς μηχανισμοί πίσω από τις επιδράσεις του PPARδ στο ήπαρ των ασθενών με NAFLD απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

NAFLD και λιποτοξικότητα

Η παθογένεση της NAFLD συνήθως ερμηνεύεται από τη θεωρία των «δύο χτυπημάτων. Η πρώτη βλάβη ή το «πρώτο χτύπημα» είναι η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ[138,139], που ακολουθείται από το «δεύτερο χτύπημα» κατά το οποίο προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές επάγουν τη φλεγμονή, την ηπατοκυτταρική βλάβη και την ίνωση[140]. Βάσει αυτής της υπόθεσης η συσσώρευση TAG είναι το «πρώτο χτύπημα» που προδιαθέτει για περαιτέρω ηπατική βλάβη στην παθογένεση της NASH, αν και πρόσφατα έχει αντικατασταθεί από ένα πιο περίπλοκο μοντέλο, καθώς υπάρχουν αναδυόμενες αποδείξεις που εστιάζουν στα FAs και τους μεταβολίτες τους ως κύριους λιποτοξικούς παράγοντες[141]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συσσώρευση λιπιδίων και η μεταβληθείσα σύνθεση των φωσφολιπιδίων μέσα στις μεμβράνες του ER προωθούν περισσότερο το στρες του ER στα ποντίκια[142]. Ως εκ τούτου, οι TAGs του κυτταροπλάσματος θεωρείται πια ότι είναι αδρανείς, και πράγματι, φαίνεται ότι η συσσώρευση των λιποσταγονιδίων ασκεί ηπατοπροστατευτική δράση[143]. Εν τούτοις, η συσσώρευση TAGs και ο σχηματισμός λιποσταγονιδίων πάνε χέρι-χέρι με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς στη NASH. Τα FAs, όπως και το άκυλο- και ακέτυλο-CoA, έχουν ταυτοποιηθεί ως δυνητικοί

παράγοντες λιποτοξικότητας[144]. Τα FAs έχει βρεθεί ότι ξεκινούν τον καταρράκτη της εξωτερικής απόπτωσης και ότι παρεμβαίνουν στη σηματοδότηση του πυρηνικού υποδοχέα (nuclear factor, NR), ο οποίος μπορεί να επηρεάζει την έκταση της ηπατικής βλάβης και να προάγει την περαιτέρω IR και το στρες του ER[145]. Συν τοις άλλοις, η β-οξείδωση των LCFAs μέσα στα υπεροξεισωμάτια και η ω-οξείδωση στο ER παρουσιάζονται ενισχυμένες στη NASH και συμβάλλουν στη λιποτοξικότητα και στο σχηματισμό των ROS[146.] Αυτό μπορεί να αποτελεί δευτερογενή συνέπεια στην αναστολή της μιτοχονδριακής β-οξείδωσης εξαιτίας της συσσώρευσης του μαλόνυλο-CoA και της αναστολής της CPT1. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες σημειώνουν ότι η ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής οξείδωσης των FAs προστατεύει από τη στεάτωση και την IR[147].

Είναι γνωστό ότι τα FAs επάγουν την παραγωγή του TNF-α. Η έκφραση του ηπατικού υποδοχέα του TNF-α σχετίζεται με τη σοβαρότητα της NAFLD[119]. Εξάλλου, η ενεργοποίηση του υποδοχέα του TNF-α αυξάνει την έκφραση του SREBP1c, που επάγει την ηπατική λιπογένεση και τη συσσώρευση λιπιδίων[148]. Η ενεργοποίηση του TNF-α παραλληλίζεται επίσης με την έκφραση του υποδοχέα θανάτου (death-receptor), ο οποίος διευκολύνει τον καταρράκτη της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι όντως η πρόδρομη μορφή της ηπατοκυτταρικής βλάβης στη NASH. Στην πραγματικότητα, η αποπτωτική δραστηριότητα μέσα στο μη υγιές ήπαρ σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, και επομένως, τα διασπασμένα θραύσματα της CK18 στον ορό σε ασθενείς με NAFLD θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατος δείκτης για την προοδευτικότητα της νόσου[149]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η συσσώρευση των FAs οδηγεί επίσης στην επαγωγή του στρες του ER και στην παραγωγή ROS, που και πάλι προάγουν την ηπατική βλάβη[150].

Αφ' ετέρου, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι το μεταβολικό οξειδωτικό στρες, η αυτοφαγία και η φλεγμονή αποτελούν ενδείξεις για την εξέλιξη της NASH. Με αυτή την έννοια, ο CYP2E1, η κύρια ισομορφή του ενζύμου CYP450, φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο μόριο στην ανάπτυξη της NASH, καθώς προάγει τις βλάβες από τα οξειδωτικά/νιτρωτικά μόρια, το μετασχηματισμό πρωτεϊνών, τη φλεγμονή και την IR[151,152]. Επίσης, οι Das *et al.* προτείνουν ότι ο πουρινεργικός υποδοχέας X7 (purinergic receptor X7, P2X7), που ενισχύεται από τον CYP2E1, μπορεί να έχει ρόλο-κλειδί στην αυτοφαγία που επάγεται από το μεταβολικό οξειδωτικό στρες στη NASH[153].

Συνοψίζοντας, ενώ η ηπατική συσσώρευση TAGs φαίνεται να είναι ένα ήπιο σύμπτωμα της ηπατικής στεάτωσης, οι μεταβολίτες των FAs συμβάλλουν στην εξέλιξη της NAFLD σε NASH. Η IR προάγει την πρόσληψη των FFAs από τον ορό και την ενδοηπατική συσσώρευση των FAs, που επάγει την απόπτωση και το σχηματισμό ROS. Τα FAs αυτά καθαυτά προάγουν επίσης την ηπατική IR μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα του TNF, υποδεικνύοντας ένα φαύλο κύκλο

λιπιδικής συσσώρευσης. Είναι πιθανό και άλλοι μηχανισμοί να συνεισφέρουν στην ηπατική βλάβη, γι' αυτό πολλοί συγγραφείς έχουν προτείνει την υπόθεση των «πολλαπλών παράλληλων χτυπημάτων» για να εξηγήσουν την παθοφυσιολογία της NAFLD[80].

Γενετικό υπόβαθρο στην NAFLD

Το γενετικό υπόβαθρο, ταυτόχρονα με την κοιλιακή παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ηπατική στεάτωση συμβάλλουν στο φαινότυπο της NAFLD/NASH. Μερικές ομάδες πληθυσμού τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερο επιπολασμό της NAFLD με τους Αμερικανούς της περιοχής του Μεξικό να έχουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά (~24%) σε σχέση με τους μη ισπανόφωνους λευκούς (~18%) και τους μη ισπανόφωνους μαύρους (~14%)[154]. Μπορεί να υπάρχουν κάποιες διαφορές που έγκεινται στα διαφορετικά διατροφικά πρότυπα, παρόλα αυτά οι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν σημαντικά σε αυτές τις διαφοροποιήσεις.

Η πρώτη NAFLD GWAS, που δημοσιεύτηκε το 2008 και διεξήχθη σε αμερικάνικο πληθυσμό από την Dallas Heart Study, έδειξε ότι ένας πολυμορφισμός του γονιδίου PNPLA3 σχετίζεται με την ευαισθησία για ανάπτυξη στεάτωσης και την εξέλιξη αυτής σε NAFLD[155,156]. Ως εκ τούτου μπορεί να εξηγεί ορισμένες από αυτές τις φυλετικές διαφορές. Το PNPLA3 κωδικοποιεί την αδιπονουτρίνη (adiponutrin, ADNP), μία λιπάση TAG που μεσολαβεί στην υδρόλυση των TAGs στα ηπατοκύτταρα και στα λιποκύτταρα και είναι κυρίως συνδεδεμένη στις κυτταρικές μεμβράνες και στα λιποσταγονίδια[155]. Το αλληλόμορφο γι' αυτό το γονίδιο που σχετίσθηκε με τον κίνδυνο για NASH, αλλά όχι τόσο με την παχυσαρκία και με τον κίνδυνο ανάπτυξης NASH εξαιτίας αυτής ήταν το PNPLA3 rs738409[G]-Ile148Met. Η ακριβής λειτουργία του PNPLA3 δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, αλλά θεωρείται ότι εμπλέκεται στη σύνθεση και στην υδρόλυση της ακύλο-γλυκερόλης. Φαίνεται ότι ο LXR και ο SREBP1c ρυθμίζουν την έκφρασή του και ότι τα FAs που συντίθενται στο ήπαρ καθυστερούν τη μετέπειτα εξασθένισή του[157]. Αυτή η παραλλαγή του γονιδίου PNPLA3 (rs738409[G]-Ile148Met) έχει φανεί ότι σχετίζεται σημαντικά με την ηπατική στεάτωση, ανεξάρτητα από τον BMI και την παρουσία διαβήτη, καθώς επίσης και με αυξημένο κίνδυνο για NASH και HCC[158-160]. Η αρχική μελέτη των Romeo *et al.* που ανακάλυψαν τη σημασία της συχνότητας εμφάνισης αυτού του συγκεκριμένου λιγότερο συχνού αλληλομόρφου (minor allele frequency, MAF), βρήκαν ότι αυτό παρουσιαζόταν συχνότερα στους ισπανόφωνους (MAF: 0,49), ενώ ακολουθούσαν οι Ευρώ-Αμερικανοί (MAF: 0,23) και οι Αφρό-Αμερικανοί (MAF: 0,17). Επιπλέον, αυτή η μελέτη διαπίστωσε την ύπαρξη και ενός δεύτερου πολυμορφισμού μονού νουκλεοτιδίου (single-nucleotide polymorphism, SNP) στο γονίδιο PNPLA3 (rs6006460-Ser453Ile) και σχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα ηπατικών TAGs και είχε την αντίθετη κατανομή στον εξεταζόμενο πληθυσμό. Συνδυαστικά σε αυτούς τους δύο SNPs αποδόθηκε το 72% της ποικιλομορφίας που παρατηρήθηκε στα ηπατικά επίπεδα των

TAGs στον πληθυσμό που εξετάστηκε[155]. Παρόλο που, για την ώρα, δεν υπάρχει ακριβής κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αυτός ο πολυμορφισμός οδηγεί σε ηπατοπάθεια, είναι πιθανό ότι αυτός σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του γονιδίου στο ήπαρ και όχι στο λιπώδη ιστό[161]. Ωστόσο, το εύρημα ότι ο γονότυπος του PNPLA3 είναι πιο σημαντικός σε δέκτες μοσχεύματος ήπατος σε σχέση με τους δότες για τη μετέπειτα ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης, υποδεικνύει ότι πιθανότατα εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες[162].

Σε μεταγενέστερη μελέτη, οι Speliotes *et al.* υιοθέτησαν μια προσέγγιση δύο σταδίων, κατά την οποία διεξήγαγαν μια ανιχνευτική μετά-ανάλυση σε δεδομένα GWAS από τέσσερις μελέτες κοορτής (Age/Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study, Old Order Amish Study, Family Heart Study και Framingham Heart Study) στην οποία βρήκαν τις θέσεις που σχετίζονταν με τα ηπατικά επίπεδα TAGs μετρημένα με αξονική τομογραφία (computed tomography, CT). Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν να σχετίζονται με το ενδοηπατικό περιεχόμενο TAG μελετήθηκαν κατόπιν σε μια άλλη μελέτη κοορτής ασθενών με ιστολογικά χαρακτηρισμένη NAFLD για την ανίχνευση υποψήφιων γονιδίων που εμπλέκονται στη νόσο. Πέντε SNPs που βρίσκονταν μέσα ή κοντά στο PNPLA3 (rs738409) και τα γονίδια που κωδικοποιούν την πυρηνική πρωτεΐνη neurocan (NCAN, rs2228603), τη ρυθμιστική υπομονάδα 3B της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B [PPP1R3B], rs4240624), τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της γλυκοκινάσης (glucokinase regulatory protein [GCRP], rs780094] και την πρωτεΐνη 1 τύπου λυσοφωσφολιπάσης (lysophospholipase-type protein 1 [LYPLAL1], rs12137855) εντοπίστηκαν να σχετίζονται με τη νόσο[163].

Η απολιποπρωτεΐνη C III (apolipoprotein C III, ApoC3) βρίσκεται στις VLDL και παρεμποδίζει τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL), μειώνοντας έτσι την περιφερική πρόσληψη λίπους και αυξάνοντας τις TAGs του ορού. Έχει βρεθεί ότι δύο κοινές παραλλαγές γονιδίων που οδηγούν σε υψηλά επίπεδα της ApoC3 μπορούν να θέσουν τα άτομα σε μεγαλύτερο κίνδυνο για υπερτριγλυκεριδαιμία και NAFLD δεδομένης μιας μέτριας περίσσειας ενέργειας[164,165]. Η ApoC3 επιτείνει τη στεάτωση που προκαλείται από ενεργειακή περίσσεια και η επίδρασή της μπορεί να μετριαστεί με χαμηλή πρόσληψη λίπους και θερμίδων[166]. Ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο της υπεροξειδικής δισμουτάσης 2 (superoxide dismutase 2, SOD2), που κωδικοποιεί την υπεροξειδική δισμουτάση 2 του μαγγανίου (manganese-superoxide dismutase 2), μπορεί, επίσης, να συμβάλλει στη σοβαρότητα της NAFLD μεταβάλλοντας την ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες.

Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι κατηγορίες γονιδίων και ορισμένα υποψήφια γονίδια αυτών των επιμέρους κατηγοριών που φέρονται να εμπλέκονται στην NAFLD.

Πίνακας 1 Πρόσφατα χαρακτηρισμένα υποψήφια γονίδια στη μη αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια[167].

Κατηγορία γονιδίων	Παραδείγματα
Γονίδια που ελέγχουν τη συσσώρευση λιπιδίων	PNPLA3 PPARGC1A PPARα
Γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων	MTTP Apolipoprotein E PXR PEMPT
Γονίδια που καθορίζουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη	Adiponectin Insulin receptor signaling (IRS) TCF7L2
Γονίδια που ρυθμίζουν τη φλεγμονή	TNF IL-6 TRAIL STAT3 Leptin receptor
Γονίδια που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες	UGT1A1 Cytochrome P450 Glutathione-S-transferases
Γονίδια που σχετίζονται με την ίνωση	Angiotensin II type 1 receptor Krupper-like factor 6 (KLF6)

IL-6 (interleukin 6), MTP (microsomal triglyceride transfer protein), PNPLA3 (patatin-like phospholipase 3), PPARGC1A (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co activator 1-alpha), PXR (pregnane X receptor), PEMPT (phosphatidyl ethanolamine methyltransferase), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), TCF7L2 (transcription factor 7-like 2), TNF (tumor necrosis factor), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), UGT1A1 (UDP glucuronosyl-transferase 1 family, polypeptide A1).

Μικροβιακή χλωρίδα και NAFLD

Το εντερικό μικροβίωμα αναγνωρίζεται όλο και εντονότερα ως σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει τόσο στη διατήρηση της υγείας όσο και στην ανάπτυξη της νόσου στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο δυνητικό ρόλο της εντερικής μικροχλωρίδας στην παθογένεση της παχυσαρκίας και της NAFLD. Η σύνθεση της δίαιτας μπορεί να μεταβάλει σε σύντομο χρονικό διάστημα το μικροβίωμα και να παρέχει ένα επιπρόσθετο μονοπάτι μέσω του οποίου η δίαιτα επηρεάζει την παχυσαρκία και τις επιπλοκές της, όπως την NAFLD[168]. Θεωρείται ότι οι αλλαγές στο μικροβίωμα επηρεάζουν την

παχυσαρκία και την NAFLD μέσω της παραγωγής μικροβιακών προϊόντων, τα οποία αλληλεπιδρούν τοπικά με τα εντεροκύτταρα και επηρεάζουν τη σηματοδότηση που εμπλέκεται στην NAFLD. Αυτό επιτυγχάνεται με την αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού οδηγώντας σε αυξημένη έκθεση σε λιποπολυσακχαρίτες και άλλους ενεργοποιητές της οικογένειας πρωτεϊνών Toll-like receptor (TLR), που εμπλέκονται στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής και μέσω αλλαγών που οδηγούν σε αυξημένη διαθεσιμότητα θερμίδων ή παθολογικά διαφοροποιημένη σύνθεση μικροθρεπτικών που προκύπτουν από το μικροβιακό μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών[169]. Έχει βρεθεί ότι, σε μύες χωρίς μικρόβια, η ευαισθησία στην ινσουλίνη βελτιώθηκε και η συγκέντρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών μειώθηκε όταν κατανάλωναν υψηλή σε λιπαρά δίαιτα[170]. Επίσης, έχει φανεί ότι η μεταφορά μικροχλωρίδας από μύες επιρρεπείς στην ανάπτυξη IR οδηγεί σε υψηλότερους ρυθμούς IR και ενίσχυση της λιπογένεσης που έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένο ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους όταν καταναλώνουν υψηλή σε λιπαρά δίαιτα[171]. Μία μελέτη σε ανθρώπους από τους Vrieze *et al.* έδειξε ότι η εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζει την IR, καθώς όταν μεταφέρθηκε μικροχλωρίδα αδύνατων ατόμων σε παχύσαρκους με μεταβολικό σύνδρομο, η ινσουλινοευαισθησία των τελευταίων βελτιώθηκε[172].

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ο ρόλος της διατροφής στην NAFLD

Η NAFLD συνδέεται στενά με την παχυσαρκία και τη σύσταση της διατροφής σε συγκεκριμένες ομάδες τροφίμων, καθώς επίσης και στη σύσταση αυτής σε μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά[173, 174]. Συγκεκριμένα, η παχυσαρκία προκύπτει όταν η ενεργειακή πρόσληψη είναι μεγαλύτερη από την ενεργειακή κατανάλωση με την υπερβάλλουσα ενέργεια να αποθηκεύεται ως λίπος. Οι ασθενείς με NAFLD που λαμβάνουν περίσσεια ενέργειας έχουν παρουσιάσει βελτίωση μετά από απώλεια βάρους που επετεύχθη με μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη[174]. Διάφορες μελέτες έχουν αξιολογήσει τις διατροφικές συνήθειες ασθενών που τους συστηνόταν η προσκόλληση σε ένα συγκεκριμένο διατροφικό πρότυπο και τα δυνητικά οφέλη από την τροποποίηση της δίαιτας.

Διατροφικές Συνήθειες

Η εξέταση των γενικών διατροφικών συνηθειών προσομοιάζει περισσότερο με τις συνθήκες της πραγματικής ζωής, όπου οι άνθρωποι καταναλώνουν γεύματα αποτελούμενα από ποικιλία τροφών με σύνθετους συνδυασμούς θρεπτικών συστατικών που μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά ή συνεργιστικά μεταξύ τους[175]. Το δυτικό διατροφικό πρότυπο φαίνεται να περιλαμβάνει υπερκατανάλωση φρουκτόζης και αναψυκτικών, κρέατος ή κορεσμένων λιπαρών οξέων και

χοληστερόλης, μικρότερη κατανάλωση φυτικών ινών, ψαριών ή ω-3 λιπαρών οξέων και μικρότερη κατανάλωση ορισμένων βιταμινών, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μικρότερη κατανάλωση από τη συνιστώμενη σε λαχανικά και, εν γένει, μια μη ισορροπημένη διατροφή[176]. Ορισμένες διατροφικές συνήθειες σχετίζονται στενά με την υπερβάλλουσα ενεργειακή πρόσληψη, όπως είναι ο αυξημένος όγκος τροφής, οι δίαιτες υψηλής ενεργειακής πυκνότητας, οι ακατάλληλες ώρες γευμάτων και ο τρόπος κατανάλωσης, καθώς επίσης και η αυξημένη πρόσληψη ορισμένων θρεπτικών συστατικών[174].

Ο αυξημένος όγκος των γευμάτων αυξάνει την ενεργειακή πρόσληψη οδηγώντας στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και NAFLD[177]. Η ενεργειακή πρόσληψη τείνει, επίσης, να είναι μεγαλύτερη σε εστιατόρια με μπουφέ, καθώς εκεί εκτίθεται πληθώρα διαφορετικών τροφών. Μία αύξηση στην ποικιλία των πιάτων σε ένα γεύμα έχει βρεθεί ότι αυξάνει την ενεργειακή πρόσληψη τουλάχιστον κατά 25%, εξαιτίας της ποικιλίας των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφών, όπως η γεύση και το άρωμα[178,179]. Η ενεργειακή πρόσληψη μπορεί να μειωθεί μειώνοντας την κατανάλωση γευμάτων εκτός σπιτιού και των γευμάτων σε μέρη με μπουφέ. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια γευμάτων εντός σπιτιού, οι ενεργειακές απαιτήσεις ενός γεύματος θα πρέπει να καθορίζονται εκ των προτέρων με την κατανομή των μερίδων ανά άτομο.

Η κατανάλωση fast-food έχει παρουσιάσει σημαντική θετική συσχέτιση με την πρόσληψη βάρους και την IR στον άνθρωπο. Στη μελέτη CARDIA, μία 15ετή προοπτική μελέτη με 3031 νέους ενήλικες, φάνηκε ότι το βάρος αυτών που επισκέπτονταν συχνά (περισσότερο από 2 φορές εβδομαδιαίως) εστιατόρια τύπου fast-food αυξήθηκε κατά 4,5kg και είχαν διπλάσια αύξηση στην IR σε αντίθεση με αυτούς που κατανάλωναν λιγότερο από 1 φορά εβδομαδιαίως fast-food, ανεξαρτήτως φυλής και εθνικότητας[180]. Επιπλέον, η χορήγηση δίαιτας τύπου καφετέριας (“cafeteria diet”), που είναι παρεμφερής με το fast-food, σε πειραματικά μοντέλα ζώων οδήγησε σε ηπατική βλάβη[181]. Στην κλινική εκτίμηση ατόμων με αυξημένες τιμές ALT, το ιατρικό ιστορικό δε θα έπρεπε να περιλαμβάνει μόνο ερωτήσεις για την κατανάλωση αλκοόλ και αναψυκτικών, αλλά και να διερευνά την ύπαρξη πρόσφατης υπερβάλλουσας κατανάλωσης fast-food. Έχουν θεσπιστεί επίσημοι κανόνες για τη βιομηχανία του fast-food που έχουν υιοθετηθεί από διάφορες χώρες, όπως η μείωση της ενέργειας, η αύξηση των ποσοτήτων των λαχανικών και η απουσία παιχνιδιών στα παιδικά γεύματα που μπορούν να λειτουργήσουν ως δέλεαρ για αυτήν την ευαίσθητη πληθυσμιακή ομάδα[174]. Συνεπώς, πριν την εφαρμογή ενός διατροφικού πλάνου σε ασθενείς με NAFLD θα πρέπει να εκτιμηθεί η συχνότητα κατανάλωσης fast-food, τηγανισμένων τροφών και η κατανάλωση γευμάτων εκτός σπιτιού. Ο περιορισμός όλων των παραπάνω θα μπορούσε να εμποδίσει την ανάπτυξη και/ή την εξέλιξη της NAFLD. Σε αυτούς

τους ασθενείς συστήνεται να γευματίζουν στο σπίτι συχνότερα και να καταναλώνουν χαμηλής ενεργειακής πυκνότητας δίαιτα με έμφαση στην κατανάλωση λαχανικών[174].

Η παράλειψη του πρωινού, ειδικά στα παιδιά και στους εφήβους, έχει συσχετιστεί με την παχυσαρκία[182]. Η παράλειψή του, συχνά, οδηγεί σε αυξημένη κατανάλωση τροφής στα υπόλοιπα γεύματα της ημέρας. Μύες με υψηλότερη ενεργειακή πρόσληψη στο βραδινό γεύμα είχαν υψηλότερο βάρος, περισσότερο σπλαχνικό λίπος και υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, ενώ όλα τα παραπάνω ήταν μειωμένα όταν η αναλογία των προσλαμβανόμενων θερμίδων στο πρωινό και το βραδινό γεύμα ήταν 3:1[183].

Επίδραση θρεπτικών συστατικών στην NAFLD

Η επίδραση των θρεπτικών συστατικών στην ανάπτυξη της NAFLD μπορεί να παρατηρηθεί ήδη από την εμβρυική ζωή. Μελέτη που διεξήχθη σε επίμυες έδειξε ότι η μη ισορροπημένη διατροφή της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας συμβάλλει στην ανάπτυξη της νόσου στους απογόνους, καθώς επίσης και του οξειδωτικού στρες. Έχει φανεί ότι οι μεταβολικές διαταραχές που εγκαθίστανται κατά την εγκυμοσύνη και το θηλασμό δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από την υιοθέτηση μιας συνετής διατροφής κατά την περίοδο του απογαλακτισμού. Η διατροφική εκπαίδευση των εγκύων παίζει καίριο ρόλο στην πρόληψη των μεταβολικών διαταραχών, όπως είναι η NAFLD[184].

Πρόσληψη λίπους και NAFLD

Διάφορες μελέτες τόσο σε ζωικά πρότυπα όσο και σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι δίαιτα πλούσια σε λιπαρά επάγει την ηπατική στεάτωση. Μία δοκιμή 5 ημερών έδειξε ότι μια ισοθερμιδική δίαιτα πλούσια σε λίπη και χαμηλή σε υδατάνθρακες προκαλεί 3,7-5,3 φορές προσαύξηση στην ηπατική de novo λιπογένεση σε υπερινσουλιναιμικά παχύσαρκα άτομα σε σύγκριση με νορμοϊνσουλιναιμικά αδύνατα και παχύσαρκα άτομα[185]. Σε μία άλλη διασταυρούμενη μελέτη, που συμμετείχαν 10 παχύσαρκες γυναίκες, αυτές ακολούθησαν δύο διαφορετικές ισοθερμιδικές δίαιτες ανά 2 διαδοχικές εβδομάδες με τυχαία σειρά. Οι δίαιτες αυτές απέδιδαν είτε 16% είτε 56% ενέργεια προερχόμενη από λίπος. Το ηπατικό περιεχόμενο λίπους αξιολογήθηκε με φασματοσκοπία πρωτονίου. Φάνηκε ότι το ενδοηπατικό λίπος μειώθηκε κατά 20% στη χαμηλή σε λιπαρά δίαιτα και αυξήθηκε κατά 35% στην υψηλή σε λιπαρά δίαιτα. Οι αλλαγές στο ηπατικό λίπος συνοδεύονταν από παρόμοιες αλλαγές στα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας στον ορό και αυτές οι αλλαγές ήταν ανεξάρτητες από το σωματικό βάρος, το οποίο δεν άλλαξε κατά τη διάρκεια της μελέτης[186]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το είδος του λίπους μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση στην NAFLD. Τα SFAs, τα MUFAs, τα PUFAs, τα ω-3 FAs και τα trans FAs εκδηλώνουν διαφορετική δράση στη νόσο.

Η αυξημένη πρόσληψη SFAs σχετίζεται, συνήθως, με υψηλή IR και T2DM, που μπορεί να προκαλέσουν την εξέλιξη της NAFLD. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συσσώρευση SFAs στο ήπαρ μπορεί να είναι επιβλαβής για τη λειτουργία του. Μια 7ήμερη διατροφική επισκόπηση φανέρωσε ότι η κατανάλωση SFAs ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με NAFLD σε αντίθεση με τον αντίστοιχο υγιή πληθυσμό[187]. Επιπλέον, τόσο η πρόσληψη SFAs όσο και γενικότερα των λιπών έχει καταγραφεί να είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με NAFLD και NASH σε σχέση με τα υγιή άτομα[188]. Σε μία μελέτη ασθενείς με NAFLD κατανεμήθηκαν τυχαία σε ισοθερμιδική δίαιτα που είτε ήταν χαμηλή σε λιπαρά (low-fat), χαμηλή σε SFAs (low-saturated fat) και χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη (low-glycemic index, GI) (LSAT: 23% λίπος, 7% SFAs, GI <55) είτε ήταν πλούσια σε λιπαρά (high-fat), πλούσια σε SFAs (high-saturated fat) και υψηλού GI (HSAT: 43% λίπος, 23% SFAs, GI >70). Το ενδοηπατικό περιεχόμενο σε λίπος αξιολογήθηκε με φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού πριν και 4 εβδομάδες μετά από την παρέμβαση σε όλους τους συμμετέχοντες. Φάνηκε ότι αυτοί που κατανάλωσαν την LSAT δίαιτα είχαν σημαντική μείωση στο ηπατικό λίπος, παρατήρηση που δεν επαληθεύτηκε και σε αυτούς που κατανάλωσαν την HSAT δίαιτα[189]. Σε άλλες μελέτες που διεξήχθησαν σε μοντέλα ζώων, βρέθηκε ότι δίαιτα υψηλή σε λίπος επάγει την ηπατική στεάτωση και τη φλεγμονή, την IR και την αύξηση των επιπέδων του TNF-α[190,191]. Αυτές οι αλλαγές θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ. Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η έκθεση των ηπατοκυττάρων στο στεαρικό και στο παλμιτικό οξύ προκαλεί την απόπτωσή τους μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (caspase 3) και της διέγερσης του κατακερματισμού του DNA[192]. Πρόσληψη SFAs λιγότερο από 10% της συνολικής ενέργειας ελαττώνει τα επίπεδα της LDL-c του ορού και των TAGs. Ο περιορισμός των SFAs σε λιγότερο από 7% της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας δεν οδηγεί σε περαιτέρω βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και μπορεί να είναι επιζήμια για τον ασθενή. Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη των SFAs θα πρέπει να είναι πάνω από 7% και λιγότερο από 10% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης[193].

Η υπερκατανάλωση χοληστερόλης θεωρείται σημαντική αιτία της NAFLD[194]. Αξιολόγηση της διαιτητικής καταγραφής καταναλισκόμενων τροφίμων παχύσαρκων και μη ασθενών με NAFLD έδειξε ότι η πρόσληψη χοληστερόλης είναι πολύ μεγαλύτερη σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με τα αντίστοιχα υγιή άτομα[195]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι μη παχύσαρκοι ασθενείς κατανάλωναν περισσότερη χοληστερόλη από τους παχύσαρκους, υποδεικνύοντας ότι η πρόσληψη αυτής είναι κρίσιμη στην έναρξη της νόσου, αλλά και στην εξέλιξή της ανεξάρτητα από την ύπαρξη παχυσαρκίας[195]. Παρόλο που οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η χοληστερόλη επάγει την ανάπτυξη της νόσου δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως, οι μεταβολίτες της χοληστερόλης στο ήπαρ, οι οξυστερόλες επάγουν την ενεργοποίηση του SREBP-1c και την de

πονο σύνθεση λιπαρών οξέων μέσω του LXRα[196]. Τα δεδομένα που αφορούν στη χοληστερόλη είναι αμφιλεγόμενα, καθώς κάποιες μελέτες δεν έχουν εντοπίσει διαφορά στην πρόσληψή της μεταξύ ασθενών με NAFLD και υγιών ατόμων, αξιολογώντας, όμως, ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και όχι τη διαιτητική καταγραφή καταναλισκόμενων τροφίμων[197,198]. Θα πρέπει να υπάρχει η υποψία για υπερκατανάλωση διαιτητικής χοληστερόλης στους μη παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD και θα ήταν επιθυμητό να αξιολογείται η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε χοληστερόλη, όπως είναι τα αυγά και τα αυγά ψαριών, το συκώτι και τα γλυκά. Η μείωση της προσλαμβανόμενης χοληστερόλης έχει προταθεί, επίσης, για την πρόληψη της ανάπτυξης CVD, ανεξάρτητα από την παρουσία παχυσαρκίας[199].

Τα trans FAs (tFAs) απαντούν φυσικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα και σε διάφορα είδη κρέατος, αλλά συντίθενται και στο γαστρεντερικό σωλήνα των μηρυκαστικών από τη βακτηριακή μικροχλωρίδα. Επιπλέον, σχηματίζονται κατά την παραγωγή των μαργαρινών από την υδρογόνωση των φυτικών λιπών. Το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (ισομερές *cis*-9 *trans*-11) περιέχεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και δεν επηρεάζει με αρνητικό τρόπο τον ανθρώπινο οργανισμό. Από την άλλη, τα trans FAs που περιέχονται στις υδρογονωμένες μαργαρίνες είναι επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Η πρόσληψη του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (ισομερές *trans*-10 *cis*-12) από τις υδρογονωμένες μαργαρίνες επάγει τη δράση προφλεγμονωδών ουσιών, εντείνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και προδιαθέτει για διαταραχές στο λιπιδαιμικό προφίλ. Η συσχέτιση μεταξύ των tFAs και του αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και καρδιαγγειακής νόσου μέσω αύξησης των επιπέδων της LDL-c, μείωσης των επιπέδων της HDL-c, αύξησης των TAGs και της CRP δείχνουν ότι μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση της NAFLD[200]. Οι διατροφικές συστάσεις στην NAFLD περιλαμβάνουν την αποφυγή κατανάλωσης των tFAs που περιέχονται σε επεξεργασμένα τρόφιμα[193].

Η διαιτητική πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (monounsaturated fatty acids, MUFAs) έχει ευεργετικές επιδράσεις στην NAFLD. Τα MUFAs μπορούν να μειώσουν την οξειδωμένη LDL (oxidized LDL, oxLDL), την LDL-c, την ολική χοληστερόλη (total cholesterol, TC), το λόγο τόσο της LDL-c όσο και της TC προς την HDL-c και τις συγκεντρώσεις των TAGs χωρίς, όμως, να μειώσουν την HDL-c που, συνήθως, παρέχεται από δίαιτες χαμηλών λιπαρών. Σε πρόσφατη μελέτη των Bozzetto *et al.* αξιολογήθηκε η επίδραση τεσσάρων διαφορετικών ισοθερμιδικών διαιτών στο λιπώδες ήπαρ διαβητικών ασθενών[201]. Οι συμμετέχοντες κατανεμήθηκαν τυχαία να καταναλώσουν μία δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες, φυτικές ίνες και χαμηλού GI με (CHO/PA group) ή χωρίς (CHO/fiber group) αερόβια άσκηση ή μία δίαιτα πλούσια σε MUFA με (MUFA/PA group) ή χωρίς (MUFA group) αερόβια άσκηση. Τα ποσοστά των SFA, PUFA και πρωτεϊνών ήταν παρεμφερή και στα τέσσερα διατροφικά πλάνα. Έπειτα

από παρέμβαση 8 εβδομάδων, η δίαιτα που ήταν πλούσια σε MUFA φάνηκε να μειώνει το ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους συγκριτικά με τη δίαιτα υψηλών CHO, φυτικών ινών και χαμηλού GI ανεξάρτητα από την προσθήκη αερόβιας άσκησης. Ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου τα MUFAs εκδηλώνουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες στο ηπατικό λίπος μπορεί να σχετίζεται με τη δυνατότητά τους να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην περιφερική ευαισθησία στην ινσουλίνη, στην παραγωγή αντιφλεγμονωδών ουσιών και στην αναστολή της δράσης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (nuclear factor-κΒ, NF-κΒ)[202]. Ως εκ τούτου, η αντικατάσταση των υδατανθράκων και των SFAs από MUFAs θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη για τους NAFLD ασθενείς. Μία μετά-ανάλυση τυχαιοποιημένων διασταυρούμενων δοκιμών που συνέκριναν την επίδραση διαιτών χαμηλών σε SFAs, υψηλών σε CHO ή υψηλών σε MUFAs σε διαβητικούς ασθενείς, έδειξαν ότι οι δίαιτες πλούσιες σε MUFAs βελτίωσαν το λιποπρωτεϊνικό προφίλ και το γλυκαιμικό έλεγχο. Οι δίαιτες που είναι πλούσιες σε MUFAs μειώνουν τις TAGs του πλάσματος και τη συγκέντρωση της VLDL-c κατά 19% και 22% αντίστοιχα και προκαλούν μέτρια αύξηση των επιπέδων της HDL-c, χωρίς να αυξάνουν αυτά της LDL-c[203]. Το ω-9 ελαϊκό οξύ αποτελεί το επικρατέστερο MUFA στη διατροφή και το ελαιόλαδο αποτελεί μια από τις κύριες πηγές του. Παρόλα αυτά, δεν έχει καταγραφεί ότι οι ασθενείς με NAFLD καταναλώνουν λιγότερα MUFAs από τον αντίστοιχο υγιή πληθυσμό και, συνεπώς, ο ρόλος αυτών και του ελαιολάδου θα πρέπει να διευκρινιστεί καλύτερα στην εν λόγω νόσο[176].

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs), συμπεριλαμβανομένου του δοκοσαεξαενοϊκού (DHA) και του εικοσαπενταενοϊκού (EPA) οξέος, επηρεάζουν θετικά την πορεία της NAFLD. Τρόφιμα πλούσια σε EPA και DHA αποτελούν τα ψάρια, τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, το κραμβέλαιο και οι λιναρόσποροι. Η κατανάλωση ελαίων ψαριού μειώνει την de novo λιπογένεση, αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από το λιπώδη ιστό και μειώνει το σπλαχνικό λίπος[193]. Η κατανάλωση των ω-3 FAs εμποδίζει την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Έχει φανεί ότι η συμπληρωματική χορήγηση ω-3 FAs (2gr/day) για 6 μήνες μπορεί να βελτιώσει την εξέλιξη της NAFLD μειώνοντας το βαθμό της στεάτωσης[204]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η μειωμένη διαθεσιμότητα των ω-3 FAs εντείνει τη σύνθεση FAs και τη συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα[205]. Η συνιστώμενη προσλαμβανόμενη αναλογία των ω-3 προς τα ω-6 FAs είναι μείζονος σημασίας και θεωρείται ότι θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1:1 και 1:4. Πηγές των ω-6 FAs αποτελούν τα δημητριακά, τα αυγά και το ζωικό λίπος. Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με NASH προσλαμβάνουν υψηλές ποσότητες ω-6 FAs εις βάρος των ω-3. Η αντικατάσταση των ω-6 FAs από το α-λινολενικό οξύ (ω-3) έχει φανεί ότι αυξάνει την ινσουλινοευαισθησία και μειώνει τα

επίπεδα χοληστερόλης του ορού σε πειραματικά πρότυπα ζώων που κατανάλωναν υψηλή ποσότητα φρουκτόζης. Μία τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή 8 εβδομάδων κατέδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση 4gr/day ω-3 FAs μείωσε το ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους χωρίς καμιά αξιόλογη μεταβολή στα επίπεδα της ALT του ορού σε γυναίκες με PCOS[206]. Σε μία συστηματική ανασκόπηση αναφέρεται ότι η πρόσληψη ω-3 συμπληρωμάτων έχει ευεργετική επίδραση στο ηπατικό λίπος και στα επίπεδα AST, αλλά χωρίς να εντοπίζεται η βέλτιστη δόση[207]. Επιπλέον, σε μία άλλη μελέτη αξιολογήθηκε η παρατεταμένη συμπληρωματική χορήγηση ω-3 FAs στην ηπατική στεάτωση[208]. Τα ευρήματα έδειξαν ότι 1gr/day ω-3 συμπληρώματος για 12 μήνες βελτιώνει τα υπερηχογραφικά και αιμοδυναμικά χαρακτηριστικά της ηπατικής στεάτωσης. Πιστεύεται ότι τα PUFAs εκδηλώνουν και αντιφλεγμονώδη δράση[209]. Η επίδραση των ω-3 FAs στο μεταβολισμό των λιπών φαίνεται να διαμεσολαβείται από γονιδιωματικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπών, όπως αυτά που εκφράζουν τον PPAR-γ, τον SREBP-1 και τον ChREBP[210]. Επιπλέον, η μειωμένη μεταγευματική λιπαιμία και η αυξημένη δραστηριότητα της LPL που επάγεται από τα ω-3 FAs ελαττώνουν τη «δεξαμενή» των TAGs του πλάσματος και, ως εκ τούτου, την ηπατική πρόσληψη των TAGs από την κυκλοφορία[211]. Επιπρόσθετα, η πρόσληψη ω-3 FAs βελτίωσε παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη CVD, όπως δείκτες IR και φλεγμονής, καθώς επίσης και τα επίπεδα ALT του ορού, των λιπιδίων και της γλυκόζης[212]. Η συμπληρωματική χορήγηση των PUFAs, ειδικά των ω-3, μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική διατροφική προσέγγιση για τη θεραπεία ασθενών με NAFLD και θα μπορούσε να προλάβει την εμφάνιση CVD, αφού έχει καταγραφεί μικρότερη κατανάλωση PUFAs από αυτούς τους ασθενείς έναντι των αντίστοιχων υγιών ατόμων ανεξάρτητα από την περίσσεια πρόσληψης λίπους[187]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι μη παχύσαρκοι ασθενείς με NAFLD είχαν σημαντικά μικρότερη πρόσληψη PUFAs από τους παχύσαρκους, φανερώνοντας ότι η ανισορροπία των θρεπτικών συστατικών και η έλλειψη των PUFAs σε αυτή την κατηγορία ασθενών συμβάλλει στην έναρξη και την εξέλιξη της νόσου[195]. Επιπλέον, μια επιδημιολογική μελέτη έδειξε ότι ο προσλαμβανόμενος λόγος PUFAs/SFAs, τόσο σε ασθενείς με NAFL όσο και σε αυτούς με NASH, είναι μικρότερος σε αντίθεση με αυτόν που λαμβάνουν τα αντίστοιχα υγιή άτομα[213]. Έτσι, σημαντική διατροφική παρέμβαση για την αντιμετώπιση της νόσου, αποτελεί ο συνδυασμός της κατάλληλης ενεργειακής πρόσληψης με την αυξημένη κατανάλωση ψαριών πλούσια σε ω-3 PUFAs έναντι του κρέατος που περιέχει υψηλές ποσότητες SFAs.

Πρόσληψη υδατανθράκων και NAFLD

Οι υδατάνθρακες κατηγοριοποιούνται σε απλούς και σύνθετους, με την υπερκατανάλωση των απλών, όπως η σουκρόζη και η φρουκτόζη, να αποτελούν κύρια αιτία ανάπτυξης της NAFLD. Η κατανάλωση αναψυκτικών, συμπεριλαμβανομένων αυτών που περιέχουν σουκρόζη, αυξάνεται σημαντικά παγκοσμίως[214], γεγονός το οποίο κρίνεται ανησυχητικό, αφού έχει αποδειχθεί ότι τα αναψυκτικά αποτελούν την κύρια πηγή τεχνητώς προστιθέμενης ζάχαρης[215]. Η κατανάλωση των ζαχαρούχων ποτών έχει συνδεθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, σακχαρώδους διαβήτη, μεταβολικού συνδρόμου, λιπώδους ήπατος και καρδιοπάθειας, πιθανά μέσω της παροχής περίσσειας ενέργειας και μεγάλων ποσοτήτων ταχέως απορροφούμενων σακχάρων[216]. Έχει καταγραφεί ότι η μέση κατανάλωση αναψυκτικών είναι τουλάχιστον διπλάσια σε ασθενείς με NAFLD σε αντίθεση με τον αντίστοιχο υγιή πληθυσμό[217]. Έχει βρεθεί ότι ο βαθμός των αλλαγών στο ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους, αξιολογούμενου μέσω υπερηχογραφικού ελέγχου, σχετίζεται με την αύξηση του αριθμού των καταναλισκόμενων μπουκαλιών αναψυκτικών, υποδεικνύοντας ότι η κατανάλωση αυτών μπορεί να αποτελέσει προβλεπτικό παράγοντα για την ανάπτυξη της NAFLD[218]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση των απλών, αλλά και των ολικών υδατανθράκων είναι υψηλότερη στους ασθενείς με NASH παρά σε αυτούς με απλή στεάτωση[188]. Η υπερβολική πρόσληψη απλών υδατανθράκων έχει δειχθεί ότι επάγει τη γρήγορη αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στον ορό, προκαλώντας κατόπιν αντιδραστική υπογλυκαιμία, που οδηγεί σε μία αίσθηση πείνας, σε αυξημένη όρεξη και τελικά σε υπερφαγία[219]. Η υπερκατανάλωση απλών υδατανθράκων συνδέεται στενά με την παχυσαρκία και τη στεάτωση, πιθανότατα μέσω της ενεργοποίησης του SREBP-1c, ο οποίος ενισχύει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση FAs[220]. Δίαιτα πλούσια σε σουκρόζη αυξάνει την ηπατική σύνθεση των TAGs. Η κατανάλωση δίαιτας εμπλουτισμένης είτε με σουκρόζη είτε με φρουκτόζη οδηγεί στην ενδοηπατική συσσώρευση λίπους τόσο στους ανθρώπους όσο και στους επίμυες[176]. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς με NAFLD θα πρέπει να περιορίζουν την κατανάλωση φρουκτόζης. Εξάλλου, τα αναψυκτικά τύπου "cola" περιέχουν καραμελόχρωμα, που είναι πλούσιο σε τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products, AGEs) και μπορούν να επάγουν την IR και τη φλεγμονή[215]. Πέρα από τα παραπάνω, έχει βρεθεί ότι και η κατανάλωση αναψυκτικών με ασπαρτάμη επάγει την ανάπτυξη της NAFLD και οι ερευνητές έχουν προτείνει ότι αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει εξαιτίας της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της εξάντλησης του ATP στο ήπαρ που προκαλεί ο μεταβολισμός της[221].

Αντιθέτως, η κατάλληλη πρόσληψη σύνθετων υδατανθράκων, και ειδικότερα αυτών της ολικής αλέσεως, μπορεί να προλαμβάνει την ανάπτυξη και/ή την εξέλιξη της NAFLD, καθώς αυτοί οι καρποί περιέχουν αντιοξειδωτικές βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και διαιτητικές ίνες εκτός των

υδατανθράκων[222]. Πράγματι, η πρόσληψη προϊόντων ολικής αλέσεως μπορεί να μειώσει το σπλαχνικό λίπος και να έχει ευεργετική δράση στην παχυσαρκία, τη δυσλιπιδαιμία και το μεταβολικό σύνδρομο[223]. Επιπλέον, μια μετά-ανάλυση έδειξε ότι τα προϊόντα ολικής αλέσεως μείωσαν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών νοσημάτων και σακχαρώδους διαβήτη τύπου ΙΙ, καθώς επίσης και τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, τα επίπεδα λιπιδίων και το σωματικό βάρος, παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεση της NAFLD[224-226].

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η κατανάλωση σουκρόζης και φρουκτόζης αποτελεί πολύ σημαντικό, αλλά τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση και/ή την εξέλιξη της NAFLD. Έτσι, το διατροφικό πλάνο για αυτήν την κατηγορία ασθενών θα πρέπει να στοχεύει στη μειωμένη πρόσληψη των υδατανθράκων, αυξάνοντας παράλληλα την κατανάλωση προϊόντων ολικής αλέσεως. Ο περιορισμός της πρόσληψης των αναψυκτικών απαιτεί ο ίδιος ο ασθενής να έχει κίνητρο για την αλλαγή συμπεριφοράς και την υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Στις Η.Π.Α. έχει προταθεί να μειωθεί η κατανάλωση αυτών των προϊόντων μέσω της αυξημένης φορολόγησής τους και τα έσοδα να διατεθούν σε εθνικά προγράμματα υγείας[214].

Πρόσληψη πρωτεϊνών και NAFLD

Οι επιδράσεις της ποιότητας και της ποσότητας της προσλαμβανόμενης πρωτεΐνης στην NAFLD έχουν αξιολογηθεί ελάχιστα και οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής επικεντρώνονται σε ζωικά πρότυπα. Έχει δειχθεί ότι μία προσαύξηση στην πρόσληψη της διαιτητικής πρωτεΐνης μειώνει τον κίνδυνο συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ τόσο στους ανθρώπους όσο και σε ζωικά πρότυπα. Επίσης, η πρωτεϊνική δυσθρεψία οδηγεί σε στεάτωση[227,228]. Μελέτη σε μύες έδειξε ότι αυτοί που κατανάλωναν δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες, είτε υψηλή είτε χαμηλή σε λίπος, παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη συσσώρευση ενδοηπατικού λίπους μετά από 1 ή 12 εβδομάδες σε σύγκριση με αυτούς που κατανάλωναν δίαιτα με φυσιολογικό ποσοστό πρωτεϊνών και αντίστοιχα ποσοστά λίπους με την άλλη ομάδα μυών[228]. Η μελέτη ζωικών προτύπων έχει προσφέρει πληροφορίες αναφορικά με τους μηχανισμούς δράσης της αντικατάστασης μέρους των διαιτητικών υδατανθράκων από πρωτεΐνες στο μεταβολισμό των λιπών. Επίμυες με παχυσαρκία επαγόμενη από την υψηλή κατανάλωση σουκρόζης έλαβαν είτε μια υποθερμιδική δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες και υψηλή σε πρωτεΐνη (high-protein diet, HPD) είτε μια δίαιτα ελέγχου βασιζόμενη στους υδατάνθρακες (carbohydrate-based control diet, CD). Υπήρχε σημαντικά μεγαλύτερη βελτίωση στο λιπώδες ήπαρ και στην υπερτριγλυκεριδαιμία με την HPD δίαιτα σε σχέση με την CD. Η έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από τον αυξητικό παράγοντα 21 των ινοβλαστών (fibroblast growth factor-21, FGF21) και εμπλέκονται στη λιπόλυση και στη χρήση λιπών στο ήπαρ αυξήθηκαν στους παχύσαρκους επίμυες που έλαβαν την HPD δίαιτα[229]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του

γονιδίου του FGF21, που ρυθμίζεται από το ισοζύγιο γλυκαγόνης/ινσουλίνης, και των αυξημένων συγκεντρώσεων των TAGs στο ήπαρ των ζώων. Η ηπατική έκφραση της αποκορεστάσης 1 του στεάρυλο-CoA (stearoyl-CoA desaturase-1, SCD-1), που ρυθμίζεται κυρίως από τους διαιτητικούς υδατάνθρακες, μειώθηκε σημαντικά με την κατανάλωση της HPD δίαιτας σε αντίθεση με την CD[229]. Έτσι, φαίνεται ότι μια υποθερμιδική δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες μπορεί να βελτιώσει το ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους και την υπερτριγλυκεριδαιμία σε σύγκριση με μία δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες. Τα δύο κυτταρικά μονοπάτια που ευθύνονται για αυτά τα οφέλη περιλαμβάνουν τη διέγερση της ηπατικής λιπόλυσης και τη χρήση των λιπών που μεσολαβείται από τον FGF21, καθώς επίσης και τη μείωση της ηπατικής παραγωγής των VLDL-TAGs που μεσολαβείται από τη ρύθμιση της SCD1[229].

Μία δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνες (40% της ολικής ενέργειας ως πρωτεΐνη) μειώνει το σωματικό λίπος και τον κίνδυνο ανάπτυξης CVD περισσότερο από μία δίαιτα που παρέχει 15% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης ως πρωτεΐνη[230]. Από την άλλη, η υπερκατανάλωση πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει σπειραματική σκλήρυνση, νεφραγγειακή υπέρταση και νεφρική δυσλειτουργία σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια[193]. Έχει δειχθεί ότι μέτρια κατανάλωσης πρωτεΐνης (25% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης ως πρωτεΐνη) είναι τόσο αποτελεσματική στη μείωση του σωματικού λίπους όσο και μια δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνη[230]. Διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος και η πρωτεΐνη της σόγιας θα μπορούσαν να δράσουν προληπτικά ή να βελτιώσουν το λιπώδες ήπαρ, αλλά οι μελέτες που το αναφέρουν περιορίζονται μόνο σε ζωικά πρότυπα. Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος εκδηλώνει τα ευεργετήματά της μέσω της αύξησης του βασικού μεταβολικού ρυθμού και της μιτοχονδριακής κατανάλωσης οξυγόνου[231]. Επιπλέον, η μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής μπορεί να αποτελεί έναν ακόμα πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος προστατεύει έναντι της ενδοηπατικής συσσώρευσης λίπους[232]. Φαίνεται ότι η αυξημένη πρόσληψη πρωτεΐνης σχετίζεται με μεγαλύτερο καταβολισμό αμινοξέων, ο οποίος λαμβάνει χώρα στο ήπαρ. Αυτή η υψηλότερη κατανάλωση ενέργειας για τον καταβολισμό των αμινοξέων αυξάνει την ενεργειακή δαπάνη και την οξείδωση του λίπους και παρεμποδίζει τη συσσώρευση του τελευταίου στα ηπατοκύτταρα[233].

Θεωρείται ότι η μέτρια κατανάλωση πρωτεϊνών (25% της ολικής ενέργειας) είναι η βέλτιστη για ασθενείς με NAFLD, εξαιτίας της θετικής της επίδρασης στην απώλεια βάρους και την ινσουλινοευαισθησία. Αυτό το ποσοστό πρωτεϊνικής πρόσληψης δεν εμφανίζει παρενέργειες στους ασθενείς με NAFLD[230]. Παρόλα αυτά, οι διαθέσιμες μελέτες που εστιάζουν στην επίδραση των πρωτεϊνών και των μηχανισμών μέσω των οποίων αυτές δρουν προστατευτικά

έναντι της ηπατικής αποθήκευσης λίπους είναι ελάχιστες και περιορίζονται κυρίως σε ζωικά πρότυπα για μικρό χρονικό διάστημα. Η διεξαγωγή περισσότερων μελετών που θα εστιάζουν στο ρόλο της ποιότητας και της ποσότητας των πρωτεϊνών στην NAFLD είναι απαραίτητη για να διαλευκανθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης.

Ο ρόλος των βιταμινών Ε και D

Το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι αποτελεί μηχανισμό κλειδί της ηπατοκυτταρικής βλάβης και της εξέλιξης της NASH. Η βιταμίνη Ε έχει αντιοξειδωτική δράση και έχει μελετηθεί για τη συμβολή της στη θεραπεία της νόσου, καθώς έχει καταγραφεί ότι υπάρχει έλλειψη αυτής σε ασθενείς με NAFLD/NASH σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό[187]. Επιπλέον, στα παιδιά η πρόσληψη της βιταμίνης Ε έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται αρνητικά με το βαθμό του ηπατικού λίπους. Το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων και ο δείκτης του οξειδωτικού στρες βρέθηκαν να σχετίζονται θετικά με το σκορ της ίνωσης σε ασθενείς με NAFLD, ενώ η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση σχετιζόταν αρνητικά[234]. Επίσης, έχει καταδειχθεί ότι οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες στον ορό αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες της ηπατικής ίνωσης[235]. Οι ασθενείς με NAFLD/NASH χρειάζονται μεγαλύτερη ποσότητα βιταμίνης Ε για να μπορέσουν να αντισταθμίσουν την αύξηση του οξειδωτικού στρες. Ακόμα και αν αυτοί οι ασθενείς λαμβάνουν όμοια δόση βιταμίνης Ε με τους υγιείς είναι πολύ πιθανό να εμφανίσουν μειωμένα επίπεδα της βιταμίνης στον ορό[236].

Αυτοί που αντιμετωπίζουν πρόβλημα συμμόρφωσης με τις διατροφικές συστάσεις είναι θεμιτό να λαμβάνουν συμπληρωματική χορήγηση της βιταμίνης Ε. Φαίνεται ότι χορήγηση υψηλής δόσης της βιταμίνης μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ALT του ορού σε ασθενείς με NAFLD[237]. Μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη (PIVENS) έδειξε ότι η λήψη βιταμίνης Ε με τη μορφή συμπληρώματος για 2 έτη από ασθενείς με NASH χωρίς διαβήτη βελτίωσε το σκορ ιστολογικής δραστηριότητας σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ομάδα που λάμβανε το συμπλήρωμα της βιταμίνης (43%) σε σχέση με την ομάδα που λάμβανε το placebo (19%), υποδεικνύοντας ότι η βιταμίνη Ε εκδηλώνει αντιοξειδωτική δράση στην κλινική πράξη[238]. Παρόλα αυτά, η χορήγηση υψηλών ποσοτήτων βιταμίνης Ε μπορεί να επάγει την εγκεφαλική αγγειακή νόσο και να αυξήσει την ολική θνησιμότητα[239]. Μία πρόσφατη μετά-ανάλυση έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης Ε για 2 έτη σε ασθενείς με NAFLD βελτίωσε το ιστολογικό σκορ τους, αλλά οδήγησε σε επιδείνωση της IR και αύξησε τα επίπεδα των TAGs[32]. Οι πρακτικές κατευθυντήριες οδηγίες των Η.Π.Α. για τη διάγνωση και τη διαχείριση της NAFLD αναφέρουν ότι η καθημερινή χορήγηση 800 IU/day βιταμίνης Ε (α-τοκοφερόλη) βελτιώνει τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του ήπατος σε μη διαβητικούς ενήλικες με NASH διαγνωσμένη μέσω βιοψίας και, ως εκ τούτου, θα πρέπει να θεωρείται ως φαρμακοθεραπεία πρώτης γραμμής για αυτούς

τους ασθενείς. Επίσης, αναφέρεται ότι η συμπληρωματική χορήγηση της βιταμίνης Ε δεν ενδείκνυται για τη θεραπεία της NASH σε διαβητικούς ασθενείς, για ασθενείς με NAFLD που δεν έχουν κάνει ηπατική βιοψία, καθώς επίσης και για ασθενείς με κίρρωση επαγόμενη από τη NASH ή κρυπτογενή κίρρωση[174]. Έτσι, οι ασθενείς που λαμβάνουν βιταμίνη Ε με τη μορφή συμπληρώματος θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, συμπληρωματική χορήγηση της τάξης των 300 mg/day φαίνεται να είναι ασφαλής και αποτελεσματική τόσο σε ασθενείς με ίνωση όσο και σε ασθενείς με διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας[237,240].

Η βιταμίνη D παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της φλεγμονής και της αυτοαναοσίας. Έλλειψη της βιταμίνης D μπορεί να οδηγήσει σε IR, μεταβολικό σύνδρομο και NAFLD[241]. Η έλλειψη της συγκεκριμένης βιταμίνης έχει συσχετισθεί με τη σοβαρότητα της NAFLD και την ηπατική ίνωση, πιθανά εξαιτίας του μεγαλύτερου οξειδωτικού στρες που παρατηρείται ελλείψει αυτής[242]. Η ηπατική έκφραση των υποδοχέων της βιταμίνης D, του CYP2R1 και του CYP27A1, έχει συσχετισθεί αρνητικά με τη σοβαρότητα της στεάτωσης, της φλεγμονής και του σκορ της NAFLD στους ασθενείς με NAFLD[243].

Η περίσσεια στην πρόσληψη ενέργειας που συνοδεύεται από έλλειψη της βιταμίνης D ενισχύει την έναρξη και την εξέλιξη της NAFLD/NASH. Έτσι, τα επίπεδα της πρόσληψης της βιταμίνης D, καθώς επίσης και η συγκέντρωση της βιταμίνης στον ορό θα πρέπει να εκτιμώνται πριν από την έναρξη της διατροφικής θεραπείας στην NAFLD. Ασθενείς που παρουσιάζουν έλλειψη της βιταμίνης D συστήνεται να καταναλώνουν καθημερινά τρόφιμα με υψηλό περιεχόμενο σε βιταμίνη D, όπως είναι τα ψάρια και τα μανιτάρια.

Προ- και πρεβιοτικά στην NAFLD

Τα προβιοτικά είναι ζωντανά βακτήρια ή τρόφιμα τα οποία περιέχουν ζωντανά βακτήρια και μπορούν να εκδηλώσουν ευεργετήματα για την υγεία του ξενιστή ρυθμίζοντας την εντερική μικροβιακή χλωρίδα του. Η εντερική μικροχλωρίδα μεταβάλλεται με το BMI και τις διατροφικές συνήθειες[244]. Η αλλαγή του εντερικού περιβάλλοντος από τα προβιοτικά έχει φανεί να βελτιώνει την παθολογία που συνοδεύει την NAFLD[245]. Μία τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με placebo κλινική δοκιμή έδειξε ότι η χορήγηση προβιοτικών (*Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophiles*) για 3 μήνες μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των AST, ALT και γGT στον ορό ασθενών με NAFLD[246]. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα που έχουν προκύψει από μελέτες σε ζωικά πρότυπα. Η θεραπεία με προβιοτικά θα μπορούσε να ενταχθεί στη διατροφοθεραπεία για την NAFLD.

Από την άλλη, τα πρεβιοτικά είναι φυτικές ίνες που λειτουργούν ως υπόστρωμα για τα ωφέλιμα βακτήρια που βρίσκονται στο παχύ έντερο. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να πέψει αυτές

τις φυτικές ίνες, αλλά αυτές θρέφουν και προάγουν την ανάπτυξη των ωφέλιμων βακτηρίων του εντέρου, που με τη σειρά τους εκδηλώνουν ευεργετήματα τόσο για το πεπτικό σύστημα όσο και για τη γενική υγεία του ξενιστή. Η ολιγοφρουκτόζη αποτελεί ένα άπεπτο ολιγομερές της φρουκτόζης που βρίσκεται στις φυτικές τροφές. Τρόφιμα πλούσια σε ολιγοφρουκτόζη είναι τα ραδίκια, οι αγκινάρες, τα πράσα, τα σπαράγγια και το σκόρδο[192]. Κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ανθρώπους έχουν καταδείξει τη συμβολή της κατανάλωσης ολιγοφρουκτόζης στη μείωση των TAGs και της γλυκόζης του ορού. Η συμπληρωματική χορήγηση αυτού του πρεβιοτικού σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς συμβάλλει στη μείωση των μεταγευματικών επιπέδων γλυκόζης και επηρεάζει θετικά το γλυκαιμικό έλεγχο. Δίαιτα πλούσια σε ολιγοφρουκτόζη διεγείρει το αίσθημα κορεσμού μέσω βακτηριακής ζύμωσης στο παχύ έντερο. Επιπλέον, η πρόσληψη ολιγοφρουκτόζης μετριάζει τη φλεγμονή εντός των ηπατοκυττάρων και προκαλεί μείωση στη συγκέντρωση της γκρελίνης, που αποτελεί ισχυρή ορεξιογόνο ορμόνη[247].

Αντιοξειδωτικές φαινόλες

Μεταξύ των συστάσεων που αφορούν αλλαγές στον τρόπο ζωής για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης εκφυλιστικών νοσημάτων και τον περιορισμό των επιπλοκών που σχετίζονται με μεταβολικές διαταραχές περιλαμβάνεται η κατανάλωση μιας δίαιτας πλούσιας σε φρούτα και λαχανικά. Με βάση αυτή τη λογική, βρίσκονται υπό μελέτη διάφορα συστατικά των τροφίμων για τη δυνητική τους φαρμακολογική δράση σε ποικίλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις[248]. Πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων έχουν καταγραφεί στα φρούτα και τα λαχανικά και ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνουν τη δράση τους έχει διερευνηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί για ορισμένες τάξεις πολυφαινολών και ιδιαίτερα για τις ανθοκυανίνες (anthocyanins, ACNs). Οι έξι ανθοκυανιδίνες (μη γλυκοζυλιωμένα μέρη των ACNs) που απαντώνται ευρέως στα φρούτα και τα λαχανικά είναι η πελαγρονιδίνη (pelagronidin), η κυανιδίνη (cyaniding), η δελφινιδίνη (delphinidin), η πεονιδίνη (peonidin), η πετουνιδίνη (petunidin) και η μαλβιδίνη (malvidin), οι οποίες συνδέονται με διάφορα σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη)[248,249]. Οι ACNs είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, μωβ και μπλε χρώμα πολλών λουλουδιών, δημητριακών καρπών, φρούτων και λαχανικών. Βρίσκονται κυρίως στο φλοιό των καρπών και συνήθως σε αναλογία με την ένταση του χρώματος[248].

Η πρόσληψη των ACNs εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 180mg/day και 215mg/day, αλλά αυτές οι τιμές μπορεί να είναι 10 φορές μικρότερες στις πιο ανεπτυγμένες χώρες[250]. Επιπλέον, η βιοδιαθεσιμότητα αυτών φαίνεται ότι είναι πολύ μικρότερη από αυτή των άλλων πολυφαινολών και λιγότερο από το 1% των προσλαμβανόμενων ACNs απορροφάται τελικά[251]. Οι ACNs

μεταβολίζονται πολύ γρήγορα και η παρουσία τους στην κυκλοφορία περιορίζεται μόνο σε λίγες ώρες. Παρόλα αυτά, η τακτική πρόσληψη ACNs μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία μειώνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης CVD και διαφόρων τύπων καρκίνου[252,253]. Οι ACNs κατέχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και μπορούν να παίξουν ρόλο κλειδί στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες δεσμεύοντας τις ROS, αλλά και ρυθμίζοντας το ενδογενές αμυντικό σύστημα[254]. Εκτός των άλλων, έχει αποδειχθεί ότι οι ACNs βελτιώνουν την υπεργλυκαιμία, ρυθμίζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και μειώνουν τη φλεγμονή[255,256]. Τα τελευταία χρόνια αυτή η τάξη πολυφαινολών έχει μελετηθεί για το ρόλο που παίζει στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και την εναπόθεση λίπους σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του ήπατος[257,258]. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι ACNs μπορούν να ελαττώσουν το ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους, αλλά η επίδρασή τους στην NAFLD δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως ακόμα.

Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ότι η πρόσληψη των ACNs βελτιώνει τόσο την ηπατική όσο και τη συστημική IR, καθώς επίσης και τα λιπίδια του ορού, δράσεις που συνδέονται συχνά με τη μειωμένη πρόσληψη βάρους[259,260]. Άλλες μελέτες προτείνουν ότι οι ACNs ενισχύουν τη δράση του PPARα, ο οποίος με τη σειρά του επάγει τη λιπόλυση και μειώνει τη λιπογένεση, γεγονός στο οποίο αποδίδεται το μειωμένο ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους[258,260]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα μελετών που υποστηρίζουν ότι οι ACNs ενεργοποιούν το μονοπάτι της AMPK, διαμέσου του οποίου μεσολαβούνται οι επιδράσεις των ACNs στον ηπατικό μεταβολισμό των λιπών και στην αντιοξειδωτική απόκριση[261,262]. Οι Suda *et al.* στρατολόγησαν 48 άνδρες με υψηλά ηπατικά ένζυμα, που δεν προέρχονταν από ιό ηπατίτιδας και άρα αποδόθηκαν στην NAFLD. Κατά τη διάρκεια παρέμβασης 8 εβδομάδων οι συμμετέχοντες λάμβαναν δύο φορές ημερησίως είτε 200mg ακυλιωμένων ACNs είτε placebo. Η πρόσληψη των ακυλιωμένων ACNs σχετίστηκε με μείωση των επιπέδων της γGT. Παρόλα αυτά, η ηπατική βλάβη δεν αξιολογήθηκε άμεσα και το ενδοηπατικό περιεχόμενο λίπους δεν επιβεβαιώθηκε μέσω απεικονιστικής τεχνικής. Επίσης, η επίδραση των ακυλιωμένων ACNs δε συγκρίθηκε με κάποιο τρόφιμο ελέγχου ή με την απουσία παρέμβασης[263].

Απώλεια βάρους

Η πλέον αποτελεσματική θεραπεία για την NAFLD είναι η απώλεια βάρους. Μέτρια απώλεια βάρους της τάξης του 5% περίπου μπορεί να βελτιώσει τη στεάτωση και τους δείκτες που σχετίζονται με τη λειτουργία του ήπατος, ενώ μια απώλεια περίπου 10% συνδέεται με ιστολογική βελτίωση και μικρότερο κίνδυνο για την εξέλιξη της νόσου[264]. Τα τελευταία χρόνια, οι μελέτες που αφορούν στην επίδραση της απώλειας βάρους στην NAFLD/NASH έχουν

επικεντρωθεί σε καλά δομημένες και ισορροπημένες δίαιτες σε συνδυασμό με συμπεριφοριστικά προγράμματα που στοχεύουν στη μακροπρόθεσμη αλλαγή του τρόπου ζωής.

Σε μελέτη που διήρκεσε 1 χρόνο και συμπεριέλαβε συμπεριφοριστική θεραπεία, τακτικές συναντήσεις με διαιτολόγο σε ομάδες και εβδομαδιαία καταγραφή καταναλισκόμενων τροφών, οι 9 στους 15 ασθενείς έχασαν ~7% του βάρους τους. Αυτή η μείωση στο βάρος συνοδευόταν από βελτιωμένο σκορ της NASH, αλλά ακόμα και οι ασθενείς που δεν έχασαν βάρος παρουσίασαν σταθερά σκορ[265]. Σε μία παρέμβαση 48 εβδομάδων, 32 ασθενείς με NASH τυχαιοποιήθηκαν ώστε να λάβουν εντατική παρέμβαση αλλαγής του τρόπου ζωής ή βασική εκπαίδευση σχετικά με τον υγιεινό τρόπο ζωής (ομάδα ελέγχου). Το διατροφικό πλάνο ήταν ισορροπημένο και μέτρια υποθερμιδικό και συνδυάστηκε με μέτριας έντασης φυσική δραστηριότητα με έμφαση στο περπάτημα με βηματόμετρα. Επιπλέον, εφαρμόστηκαν οι κλασικές στρατηγικές συμπεριφοριστικής θεραπείας που συμπεριελάμβαναν μεταξύ άλλων αυτοέλεγχο στην κατανάλωση τροφής και στην διεκπεραίωση της άσκησης, τεχνικές ελέγχου ερεθισμάτων και επίλυση προβλημάτων. Το NAS σκορ βελτιώθηκε σημαντικά στην ομάδα της εντατικής θεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Οι συμμετέχοντες που έχασαν >7% του βάρους τους παρουσίασαν σημαντικές βελτιώσεις στη στεάτωση, στη λοβιακή φλεγμονή, στο ηπατοκυτταρικό πρήξιμο και στο NAS σκορ σε σχέση με αυτούς που είχαν μικρότερη απώλεια βάρους[264]. Πρόσφατα, μια τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή διερεύνησε την επίδραση μιας δωδεκάμηνης εντατικής παρέμβασης στην αλλαγή του τρόπου ζωής στην ηπατική στεάτωση σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Η παρέμβαση περιελάμβανε μέτριο ενεργειακό περιορισμό σε συνδυασμό με αυξημένη φυσική δραστηριότητα και εβδομαδιαίες συνεδρίες, ενώ η ομάδα ελέγχου έλαβε μόνο γενικές πληροφορίες για την υγιεινή διατροφή και την άσκηση. Μετά από 12 μήνες, οι συμμετέχοντες που ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης, συγκρινόμενοι με την ομάδα ελέγχου, έχασαν περισσότερο βάρος (-8,5% έναντι -0,05%) και είχαν μεγαλύτερη μείωση στο βαθμό στεάτωσης που αξιολογήθηκε με H-MRS (-50,8% έναντι -22,8%). Επιπρόσθετα, η παρέμβαση ήταν αποτελεσματική στην πρόληψη της NAFLD, καθώς 26% των ασθενών στην ομάδα ελέγχου έναντι 3% των ασθενών στην ομάδα παρέμβασης ανέπτυξε NAFLD σε βάθος 12 μηνών, ενώ δεν είχε στην αρχή της μελέτης[266]. Στη μελέτη των Oza *et al.* 67 ασθενείς με NAFLD συμμετείχαν σε μια εξάμηνη παρέμβαση αλλαγής τρόπου ζωής με έδρα το σπίτι που περιελάμβανε μηνιαία συνεδρία με γιατρό και διατροφική συμβουλευτική ανά 3 μήνες. Στους 6 μήνες υπήρχαν αξιόλογες βελτιώσεις στο σωματικό βάρος, στο λόγο ήπαρ/σπλήνα και στα ηπατικά ένζυμα. Παρόλα αυτά, μόνο το 33% (22 ασθενείς) των αρχικών συμμετεχόντων ολοκλήρωσε την παρέμβαση, υποδεικνύοντας ότι ίσως οι ασθενείς να απαιτούν πιο εντατική παρακολούθηση[267].

Σε μια προοπτική μελέτη στην οποία οι συμμετέχοντες παρακολουθούνταν για 5 έτη μετά τη διεξαγωγή βαριατρικής επέμβασης, φάνηκε ότι η παρατεταμένη διατήρηση της απώλειας βάρους σχετιζόταν με σημαντική μείωση της στεάτωσης και μειωμένο πρήξιμο των ηπατοκυττάρων, που αποτελεί χαρακτηριστική οργανική βλάβη της NASH. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι υπήρχε μια ελαφρά αύξηση της ίνωσης, το 96% των ασθενών παρέμεινε σε επίπεδο ίνωσης ≤F1[268]. Έχει καταδειχθεί ότι η απώλεια βάρους μειώνει τους δείκτες του οξειδωτικού στρες στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ σε μια κοορτή ασθενών που υπέστησαν επέμβαση γαστρικής παράκαμψης[269]. Επιπλέον, έχει φανεί ότι τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης αυξάνονται μετά από την απώλεια βάρους που επάγεται από την τοποθέτηση γαστρικού δακτυλίου[113].

Στις περισσότερες από τις μελέτες που διερευνούν την επίδραση της απώλειας βάρους στην NAFLD/NASH, η ιστολογική αξιολόγηση του ήπατος δεν περιλαμβάνεται ως έκβαση. Από την άλλη πλευρά, όταν διεξάγεται ηπατική βιοψία, λόγω της παρεμβατικής της φύσης, ο αριθμός των ασθενών είναι περιορισμένος και, ως εκ τούτου και η στατιστική δύναμη της μελέτης. Η ηπατική βιοψία κρίνεται απαραίτητη για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, πέρα από τις παρατηρούμενες μειώσεις στα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων και την παλινδρόμηση της στεάτωσης μέσω απεικονιστικών μεθόδων. Αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς ορισμένες δίαιτες μπορεί να φαίνονται αποτελεσματικές ως προς τη βελτίωση των ηπατικών ενζύμων, ενώ στην πραγματικότητα εντείνουν την ηπατική βλάβη, κάτι που μπορεί να εντοπιστεί μόνο με βιοψία. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τις ως τώρα μελέτες, παρά το μικρό τους δείγμα, τα ευρήματά τους συγκλίνουν και υποδεικνύουν ότι η απώλεια βάρους μπορεί να θεωρείται μια εδραιωμένη θεραπευτική μέθοδος.

Φυσική δραστηριότητα

Παρά τη μικρή μακροπρόθεσμη συμμόρφωση που παρατηρείται με τις συστάσεις για αύξηση της φυσικής δραστηριότητας (physical activity, PA), έχει φανεί ότι αυτή είναι εξαιρετικά ευεργετική, καθώς μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης T2DM, IR, υπέρτασης, δυσλιπιδαιμίας, διαταραγμένης γλυκόζης νηστείας (impaired fasting glucose, IFG) και μεταβολικού συνδρόμου[270,271]. Επιπλέον, ο αριθμός των καθιστικών ωρών αποτελεί προβλεπτικό δείκτη ανάπτυξης IR, ανεξάρτητα από την εκτέλεση μέτριας και υψηλής έντασης PA[272]. Έτσι, η PA θα μπορούσε να παίξει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία των ασθενών με NAFLD/NASH και θα πρέπει να αποτελεί εδραιωμένη σύσταση για όλους αυτούς τους ασθενείς.

Έχει δειχθεί ότι 1 εβδομάδα άσκησης αυξάνει τα επίπεδα των PUFAs στο ήπαρ, καθώς επίσης και τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης, ενώ μειώνει τα επίπεδα της CK-18 στην κυκλοφορία[273,274]. Η ένταση της άσκησης είναι πιθανό να παίζει επίσης κάποιο ρόλο στη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης NASH και ίνωσης. Μία ανάλυση που διεξήχθη σε ασθενείς εγγεγραμμένους στη

βάση δεδομένων του NASH CRN φανέρωσε ότι οι ασθενείς που εκτελούσαν υψηλής έντασης PA (≥6 μεταβολικά ενεργειακά ισοδύναμα [metabolic equivalent of task, MET]) για τουλάχιστον 75min/wk είχαν λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν NASH και προχωρημένη ίνωση[275].

Με την πάροδο των ετών συγκεντρώνεται όλο και μεγαλύτερος όγκος κλινικών δοκιμών που υποστηρίζουν τις ευεργετικές επιδράσεις της άσκησης στην NAFLD/NASH. Μία μελέτη στρατολόγησε 141 ασθενείς με υποψία για NAFLD, με βάση τις διαταραγμένες τιμές των ηπατικών ενζύμων και απουσία άλλων αιτιών ηπατοπάθειας, που τυχαιοποιήθηκαν είτε στην ομάδα παρέμβασης είτε στην ομάδα ελέγχου[276]. Η ομάδα παρέμβασης περιελάμβανε 3 μήνες συμβουλευτικής για την αύξηση της PA σε τρία επίπεδα έντασης. Φάνηκε ότι οι ασθενείς που αύξησαν την PA τους ≥60min/wk μείωσαν στατιστικά σημαντικά το βάρος τους (-2,4kg περίπου), τον HOMA και όλα τα ηπατικά ένζυμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι αλλαγές στον HOMA και τα ηπατικά ένζυμα ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους[276]. Μία άλλη κλινική μελέτη εκτίμησε την επίδραση αερόβιας προπόνησης 4 εβδομάδων στα επίπεδα των λιπιδίων του ήπατος, του αίματος, της κοιλιακής περιοχής και των μυών σε 19 παχύσαρκους άνδρες και γυναίκες με καθιστική ζωή[277]. Η αερόβια προπόνηση περιελάμβανε 3 συνεδρίες ποδηλασίας εβδομαδιαίως (30-45min) και η εκτίμηση των αλλαγών των λιπιδίων έγινε μέσω απεικονιστικών μεθόδων (MRS, H-MRS)[277]. Μετά το πέρας των 4 εβδομάδων, η ομάδα παρέμβασης μείωσε τη συγκέντρωση των ενδοηπατικών TAGs κατά 21%, τον όγκο του σπλαχνικού λιπώδους ιστού κατά 12% και τα FFAs του πλάσματος κατά 14%. Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν υπήρξε καμία αλλαγή στο βάρος και στη διαιτητική πρόσληψη και, ως εκ τούτου, οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν αποδίδονται εξ ολοκλήρου στην επίδραση της άσκησης[277]. Έχει φανεί ότι η υψηλότερη καρδιοαναπνευστική αντοχή αποτελεί ανεξάρτητο προβλεπτικό δείκτη για τη μείωση του ηπατικού λίπους κατά τη διάρκεια παρεμβάσεων που στοχεύουν στην αλλαγή του τρόπου ζωής και περιλαμβάνουν διαιτητική συμβουλευτική και άσκηση. Παρόλα αυτά, είναι γεγονός ότι η καρδιοαναπνευστική αντοχή δεν αντανακλά μόνο τις πρόσφατες συνήθειες της σωματικής άσκησης, αλλά και το γενετικό υπόβαθρο[278].

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για το ρόλο της άσκησης αντιστάσεων ως ένα βοηθητικό εργαλείο εκγύμνασης[279]. Το 2005, οι Ibanez et al. έδειξαν ότι η άσκηση αντιστάσεων, χωρίς παράλληλη δίαιτα απώλειας βάρους, βελτίωσε σημαντικά την ευαισθησία στην ινσουλίνη, καθώς επίσης και τη γλυκόζη νηστείας, ενώ μείωσε το σπλαχνικό λίπος[280]. Επιπλέον, οι Tsuzuku *et al.* κατέδειξαν ότι η άσκηση αντιστάσεων, που χρησιμοποιεί το βάρος του σώματος ως φορτίο, φαίνεται να είναι αποτελεσματική στη μείωση του σπλαχνικού λίπους και στη βελτίωση του μεταβολικού προφίλ, απουσία απώλειας βάρους[281]. Μία τυχαιοποιημένη

κλινική δοκιμή που συνέκρινε την επίδραση της αερόβιας και της προπόνησης αντιστάσεων στους παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου, έδειξε ότι μόνο η προπόνηση αντιστάσεων μείωσε το συνολικό σωματικό λίπος με παράλληλη αύξηση της άλιπης μάζας σώματος[282]. Μετά-ανάλυση που συνέκρινε τα δύο είδη προπονήσεων, κατέληξε ότι η προπόνηση αντιστάσεων οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση της άλιπης μάζας σώματος[283]. Η αύξηση της μυϊκής μάζας μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, αυξάνοντας τη διαθέσιμη περιοχή στην οποία μπορεί να αποθηκευτεί η γλυκόζη και κατά συνέπεια, μειώνοντας την ινσουλίνη που απαιτείται για να διατηρηθεί η φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη[284].

Η PA ευνοεί την πορεία της NAFLD/NASH πέρα από την απώλεια βάρους. Η άσκηση από μόνη της, χωρίς αλλαγή στο σωματικό βάρος ή στη σύσταση του σώματος, μπορεί να βελτιώσει την ινσουλινοευαισθησία και την ομοιόσταση της γλυκόζης αυξάνοντας τους υποδοχείς της ινσουλίνης στους μύες και, κατά συνέπεια, αυξάνοντας την παράδοση της γλυκόζης και της ινσουλίνης εκεί[285,286]. Επίσης, η PA εκδηλώνει ευεργετικές επιδράσεις στο μεταβολισμό των FFAs, καθώς αυξάνει την οξείδωση των λιπιδίων σε όλο το σώμα[287]. Η ηπατική συσσώρευση των TAGs έχει φανεί ότι μειώνεται με την άσκηση[288] και η ηπατική πρόσληψη των FFAs ήταν μικρότερη σε προπονημένους σε σχέση με μη προπονημένους άνδρες[289]. Παρεμφερή αποτελέσματα βρέθηκαν και από μελέτη σε ομοζυγωτικούς αρσενικούς διδύμους που είχαν σημαντική διαφορά στην PA που εκτελούσαν κατά τον ελεύθερο χρόνο τους και στην αερόβια ικανότητα[287]. Απομονώνοντας τις συγχυτικές επιδράσεις των γενετικών παραγόντων, ο πιο δραστήριος δίδυμος αποδείχθηκε ότι είχε μειωμένη πρόσληψη FFAs από το ήπαρ[287].

Φαρμακοθεραπεία

Η φαρμακευτική θεραπεία θα μπορούσε να τεθεί υπό σκέψη για τους ασθενείς με NAFLD/NASH με ανεπιτυχείς προσπάθειες απώλειας βάρους. Υπάρχουν αποδείξεις που υποστηρίζουν ότι υπάρχει κάποιο όφελος από τη λήψη μεγάλων δόσεων βιταμίνης Ε (800 IU/day) και πιογλιταζόνης, που αποτελεί αγωνιστή του PPAR-γ και ανήκει στην ομάδα των TZDs φαρμάκων, καθώς έχει φανεί ότι μειώνουν τη στεάτωση, τη φλεγμονή και τις συγκεντρώσεις των ηπατικών ενζύμων[48,238,290]. Παρόλα αυτά, δεν έχει παρατηρηθεί περιορισμός του βαθμού της ίνωσης με τη λήψη τους. Η βιταμίνη Ε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δρα ως αντιοξειδωτικό και ο PPAR-γ εμπλέκεται στο μεταβολισμό και τη λειτουργία του λιπώδους ιστού[291]. Η ενεργοποίηση του PPAR-γ οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα FFAs στην κυκλοφορία, βελτιώνει την IR και αυξάνει τις συγκεντρώσεις της αδιπονεκτίνης[291]. Ορισμένα άτομα διαθέτουν αρνητικές μεταλλάξεις αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, εκδηλώνοντας μεταβολικό σύνδρομο, κεντρική παχυσαρκία, μειωμένα επίπεδα αδιπονεκτίνης και NAFL[292].

Η πιογλιταζόνη και η βιταμίνη Ε έχουν δείξει κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με NASH, αλλά η μακροχρόνια χρήση τους επιφέρει παρενέργειες που έχουν δημιουργήσει αμφιβολίες για την ασφαλή θεραπευτική τους χρήση. Συγκεκριμένα, η χρήση της βιταμίνης Ε έχει σχετιστεί με την αύξηση της ολικής θνησιμότητας, τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε σχετικά υγιείς άνδρες, καθώς επίσης και με τον αυξημένο κίνδυνο αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου[290]. Στη μελέτη PIVENS φάνηκε ότι η πιογλιταζόνη επέφερε αύξηση βάρους κατά ~4,7kg στους ασθενείς με NASH που τη λάμβαναν[238], γεγονός που είναι δύσκολο να το εκλογικεύσει κανείς σε ένα πληθυσμό που αντιμετωπίζει πρόβλημα υπερβάλλοντος βάρους. Επίσης, η μακροχρόνια χρήση της πιογλιταζόνης έχει κατηγορηθεί για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς επίσης και καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, καθώς προκαλεί κατακράτηση υγρών και απώλεια της οστικής μάζας[291]. Η ροζιγλιταζόνη, που επίσης ανήκει στα TZDs φάρμακα, έχει αποσυρθεί από την αγορά στην Ευρώπη και έχει περιοριστεί σε μεγάλο βαθμό στην Αμερική, εξαιτίας του αυξημένου κινδύνου πρόκλησης στεφανιαίων συμβαμάτων[48].

Σύμφωνα με την «Αμερικάνικη Ένωση για τη Μελέτη των Παθήσεων του Ήπατος» (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD), το «Αμερικάνικο Κολλέγιο Γαστρεντερολογίας» (American College of Gastroenterology) και την «Αμερικάνικη Ένωση Γαστρεντερολογίας» (American Gastroenterological Association), η πιογλιταζόνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της NASH σε ασθενείς με αποδεδειγμένη παρουσία της νόσου μέσω βιοψίας[48]. Παρόλα αυτά, τονίζεται ότι οι μελέτες που έχουν διερευνήσει τη δράση της περιορίζονται σε μη διαβητικούς ασθενείς και ότι δεν έχει εδραιωθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της μακροχρόνιας χρήση της. Αναφορικά με τη βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη), αναφέρεται ότι η καθημερινή λήψη 800 IU βελτιώνει τα ηπατικά ιστολογικά χαρακτηριστικά σε μη διαβητικούς ασθενείς με διαγνωσμένη NASH μέσω βιοψίας και ότι θα πρέπει να θεωρείται φαρμακοθεραπεία πρώτης γραμμής για αυτούς τους ασθενείς[48]. Όμως, η χρήση της δε συνιστάται, προς το παρόν, για τη θεραπεία της NASH σε διαβητικούς ασθενείς, για αυτούς που η NAFLD δεν έχει διαγνωστεί μέσω βιοψίας, για την κίρρωση που προέρχεται από τη NASH, καθώς επίσης και για την κρυπτογενή κίρρωση.

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει στο παρελθόν την επίδραση της μετφορμίνης στα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών και των ιστολογικών χαρακτηριστικών του ήπατος σε ασθενείς με NASH. Ωστόσο, μία πρόσφατη μετά-ανάλυση φανέρωσε ότι η χρήση μετφορμίνης για 6-12 μήνες σε συνδυασμό με παρέμβαση αλλαγών του τρόπου ζωής δε βελτίωσε τις συγκεντρώσεις των ηπατικών ενζύμων ούτε τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του ήπατος, σε σύγκριση με τη μεμονωμένη δράση της παρέμβασης στην αλλαγή του τρόπου ζωής[30]. Τα αποτελέσματα ήταν

ανεξάρτητα της δόσης της μετφορμίνης και της παρουσίας T2DM. Σύμφωνα με την AASLD, η μετφορμίνη δεν εκδηλώνει σημαντική επίδραση στα ιστολογικά χαρακτηριστικά του ήπατος και δε συστήνεται ως εξειδικευμένη θεραπεία για τη NASH[48].

Σε πλήθος μελετών έχει διερευνηθεί και η δυνητική επίδραση του ουρσοδεοξυχολικού οξέος (ursodeoxyholic acid, UDCA) στη βελτίωση των συγκεντρώσεων των ηπατικών ενζύμων και της στεάτωσης σε ασθενείς με NAFLD, καθώς επίσης και των ηπατικών ιστολογικών χαρακτηριστικών σε ασθενείς με NASH, χωρίς αξιόλογα αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, στις πρακτικές κατευθυντήριες οδηγίες της AASLD η χρήση του δε συστήνεται για τη θεραπεία της NAFLD/NASH[48].

Η χρήση των ω-3 FAs για τη θεραπεία της υπερτριγλυκεριδαιμίας έχει οδηγήσει στη διερεύνηση της επίδρασής τους στη θεραπεία της NAFLD. Παρόλα αυτά, είναι νωρίς για να προκύψουν τελειωτικά συμπεράσματα και, έτσι, δεν συνιστώνται ως ειδική θεραπεία για την NAFLD/NASH, αλλά συνιστώνται για τη θεραπεία της υπερτριγλυκεριδαιμίας στους ασθενείς με NAFLD[48].

Στους ασθενείς με NAFLD/NASH θα πρέπει να εκτιμάται ο κίνδυνος εκδήλωσης CVD, καθώς επίσης και των παραγόντων κινδύνου που έχουν για ανάπτυξη CVD, αφού αυτή αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου σε αυτόν τον πληθυσμό[293]. Οι στατίνες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας και, κατά συνέπεια, για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης CVD. Δεδομένης της έλλειψης αποδείξεων ότι οι ασθενείς με NAFLD/NASH βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης ηπατικής βλάβης από τη χρήση των στατινών, αυτά τα φάρμακα ενδείκνυνται για τη θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας σε αυτή την κατηγορία ασθενών, αλλά όχι ως εξειδικευμένη θεραπεία για την NAFLD/NASH[48].

Σκοπός

Στόχος της παρούσας κλινικής μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της διατροφής με αποξηραμένο φρούτο (Κορινθιακή σταφίδα) ως σνακ, έναντι ισοενεργειακής διατροφής με άλλα σνακς, στους δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με NAFLD/NASH. Επιπλέον, διερευνάται η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 και στην απόκριση στις διατροφικές συστάσεις, όπως αυτή αξιολογήθηκε από πλήθος κλινικό-εργαστηριακών και ανθρωπομετρικών δεικτών. Τα αποξηραμένα φρούτα είναι σχετικά χαμηλού κόστους, η κατανάλωση τους δεν επηρεάζεται από την εποχικότητα και δεν παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες στην αποθήκευση και στη διατήρηση, ενώ μπορούν να καταναλωθούν ως ένα υγιεινό σνακ που μεταφέρεται εύκολα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στρατολόγηση Ασθενών

Στη μελέτη συμμετείχαν 55 ασθενείς με NAFLD/NASH οι οποίοι εντάχθηκαν είτε στην ομάδα παρέμβασης (n=28) είτε στην ομάδα ελέγχου (n=27) με τυχαιοποιημένο τρόπο. Τα κριτήρια επιλογής που έπρεπε να πληρούν οι συμμετέχοντες της μελέτης ήταν: α) η ηλικία άνω των 18 ετών, β) η ύπαρξη μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας μετά από υπερηχογραφική εξέταση, γ) BMI 22-40 kg/m2, δ) το σταθερό σωματικό βάρος κατά τους τελευταίους 6 μήνες πριν από την έναρξη της μελέτης και η αποχή από πρόγραμμα απώλειας βάρους και ε) το δυτικοποιημένο μοντέλο διατροφής (MedDietScore<35, με έμφαση στη μειωμένη ημερήσια κατανάλωση φρούτων και λαχανικών). Κριτήρια αποκλεισμού για την ένταξη των ασθενών στη μελέτη αποτελούσαν: α) η ύπαρξη χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας (ορολογικοί δείκτες: HBsAg, anti-HCV), β) η ύπαρξη συγγενούς ή επίκτητης ηπατικής νόσου (αιμοχρωμάτωση, νόσος του Wilson, αυτοάνοση ηπατίτιδα, αλκοολική ηπατοπάθεια, φαρμακευτική ηπατοπάθεια, έλλειψη α1-αντιθρυψίνης), γ) το ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε ηπατοτοξικά φάρμακα (amiodarone, methotrexate, corticosteroids, oestrogens, tamoxifen και calcium channel blockers), δ) η ένδειξη (κλινική ή ιστολογική) κίρρωσης ήπατος, ε) η επέμβαση βαριατρικής χειρουργικής (gastrointestinal bypass surgery), στ) η καθημερινή κατανάλωση αιθυλικής αλκοόλης >20 gr/ημέρα για τις γυναίκες και >30gr/ημέρα για τους άνδρες για περισσότερο από 6 μήνες τα τελευταία 5 χρόνια, ζ) οι γυναίκες που διένυαν περίοδο εγκυμοσύνης ή γαλουχίας, η) η λήψη φαρμάκων ή ουσιών με θετική επίδραση στη λιπώδη ηπατοπάθεια, όπως οι θειαζολιδινεδιόνες (πιογλιταζόνη), η βιταμίνη Ε, η μετφορμίνη, το UDCA, το SAM-e, η βηταΐνη, το γαϊδουράγκαθο, η γεμφιμπροζίλη, η θεραπεία anti-TNF, τα προβιοτικά, η πεντοξυφυλλίνη και η υπολιπιδαιμική θεραπεία, θ) η συνύπαρξη νόσου με μειωμένο προσδόκιμο ζωής και ι) η ύπαρξη σοβαρής ψυχιατρικής νόσου. Από όλους τους ασθενείς ελήφθη γραπτή συγκατάθεση για την εθελοντική τους συμμετοχή στην εξάμηνη παρέμβαση. Στο Παράρτημα Ι φαίνονται οι πληροφορίες που συμπεριλήφθησαν στο φάκελο κάθε ασθενούς.

Χαρακτηρισμός πληθυσμού ασθενών

Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Στην αρχή της παρέμβασης (baseline) σε όλους τους συμμετέχοντες έγινε καταγραφή ύψους (cm), σωματικού βάρους (Kg), περιφέρειας μέσης (cm) και περιφέρειας ισχίων στο ύψος των μειζόνων τροχαντήρων (cm), ενώ εκτιμήθηκε η σύσταση του σώματος με τη συσκευή BC-418 (Body composition analyzer BC-418, Japan). Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν ο λόγος περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων (WHR) και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) [ως το σωματικό

βάρος (ΣΒ σε Kg) / τετράγωνο του ύψους (m^2)]. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε κατηγορίες έγινε ως εξής α) φυσιολογικού βάρους (BMI<25), β) υπέρβαροι (25≤BMI≤29,9) και γ) παχύσαρκοι (BMI≥30).

Αξιολόγηση αρτηριακής πίεσης και καρδιακής συχνότητας

Η εκτίμηση της αρτηριακής πίεσης και της καρδιακής συχνότητας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό πιεσόμετρο. Λαμβάνονταν δύο μετρήσεις και την τελική τιμή αποτελούσε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

Ιστορικό διατροφής και άσκησης-Διατροφικές συστάσεις

Έγινε καταγραφή των διατροφικών συνηθειών, του τρόπου ζωής και άσκησης, όπως και άλλων συνηθειών, π.χ. κάπνισμα, καθώς και των συμπληρωμάτων διατροφής που περιέχουν αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, για την εκτίμηση των διατροφικών συνηθειών χρησιμοποιήθηκαν 2 εργαλεία: ένα Ερωτηματολόγιο Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων (Food Frequency Questionnaire, FFQ) (Παράρτημα ΙΙ), καθώς και το σκορ υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής (MedDietScore)[294] (Παράρτημα ΙΙΙ).

Για τις ανάγκες της παροχής διατροφικών συστάσεων στους ασθενείς, σχεδιάστηκαν δύο μη υποθερμιδικά διαιτολόγια των 2000 και 2500kcal με εναλλακτικές προτάσεις στα διάφορα γεύματα της ημέρας και χρήσιμες συμβουλές (Παράρτημα 4).

Προετοιμασία δειγμάτων διατροφικής παρέμβασης με Κορινθιακή σταφίδα

Σε συνεργασία με την Παναιγειάλειο Ένωση Συνεταιρισμών (ΠΕΣ) παρασκευάστηκε ειδική συσκευασία σταφίδας, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρέμβαση από τους εθελοντές. Πρόκειται για ατομική ημερήσια συσκευασία που περιείχε 36g σταφίδας, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 2 ισοδύναμα φρούτου. Η συσκευασία αυτή ήταν πρακτική και διευκόλυνε τους ασθενείς που συμμετείχαν στην ομάδα παρέμβασης για την καλύτερη συμμόρφωση στο πρωτόκολλο.



Εικόνα 10 Ημερήσια συσκευασία σταφίδας για το σκοπό της μελέτης.

Εργαστηριακές μετρήσεις

Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Αρχικά, κατά την αιμοληψία, το δείγμα που ελήφθη από τους εθελοντές τοποθετήθηκε σε δέκα δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκια (vacutainer tubes). Οι τρεις από αυτούς περιείχαν αντιπηκτικό και οι δύο εξ αυτών δόθηκαν για γενική εξέταση αίματος και την εκτίμηση της Hb_{A1C} στα αντίστοιχα εργαστηριακά τμήματα του Γ.Π.Ν.Α. «ΛΑΪΚΟ». Οι τέσσερις από τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες δόθηκαν στα κατάλληλα εργαστηριακά τμήματα του νοσοκομείου για την εκτίμηση βιοχημικών δεικτών, της ινσουλίνης, του Fe και της φερριτίνης. Το περιεχόμενο αίμα στους τρεις εναπομείναντες δοκιμαστικούς σωλήνες, εκ των οποίων ο ένας περιείχε αντιπηκτικό, φυγοκεντρήθηκε, με τη βοήθεια φυγόκεντρου συσκευής (4^oC, 3000rpm, 10'), για το διαχωρισμό του στα επιμέρους κλάσματά του. Μετά τη φυγοκέντρηση, για το αίμα που περιεχόταν στα vacutainer tubes χωρίς αντιπηκτικό, χρησιμοποιήθηκαν μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (eppendorf tubes) χωρητικότητας 2ml, ώστε να αποθηκευτεί το κλάσμα του ορού (10x eppendorfs). Από το εναπομείναν vacutainer tube με το αντιπηκτικό, μετά τη φυγοκέντρηση, παραλήφθηκε το κλάσμα του πλάσματος το οποίο κατανεμήθηκε σε 4 eppendorfs και το κλάσμα των λευκών αιμοσφαιρίων (white blood cells, WBC) το οποίο κατανεμήθηκε σε δύο eppendorfs. Στη συνέχεια, το υπόλοιπο δείγμα ξεπλύθηκε με περίπου 2ml φυσιολογικού ορού, αναδεύτηκε και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις μέχρι να απομακρυνθεί όλο το εναπομείναν πλάσμα. Κατόπιν, προστέθηκαν 5μL αντιοξειδωτικού (BHT) και, μετά από το πιπετάρισμα του μείγματος, το κλάσμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων (red blood cells, RBC) κατανεμήθηκε σε 4 eppendorfs. Επιπλέον, αποθηκεύτηκε ολικό αίμα (whole blood) σε δύο eppendorfs. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους συμμετέχοντες της μελέτης.

Μέτρηση δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες

Για τη μέτρηση των δεικτών φλεγμονής που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένα sandwich Enzyme Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) kits. Έτσι, μετρήθηκαν η λεπτίνη *(Invitrogen Corporation, Camarillo, USA),* η CRP *(Invitrogen Corporation, Camarillo, USA),* η βισφατίνη *(BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Brno, Czech Republic)*, ο TNF-α *(Invitrogen Corporation, Camarillo, USA,* υψηλής ευαισθησίας*)* η IL-6 *(R&D Systems Inc., Minneapolis, USA,* υψηλής ευαισθησίας*)* και η oxLDL *(Mercodia AB, Uppsala, Sweden).* Επιπλέον, κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με διάφορα εύρη λήψης όγκων και τα αντίστοιχα tips τους, vacutainer tubes και ογκομετρική φιάλη για την παρασκευή διαλυμάτων, eppendorfs,

απιονισμένο νερό, συσκευή Vortex για την ανάδευση και την ομοιογενοποίηση των δειγμάτων και των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν, καθώς επίσης και φωτόμετρο ELISA reader (*Biotek PowerWave XS2*). Τα προαναφερθέντα σετ αντιδραστηρίων διατηρήθηκαν σε ψυγείο (-4 ^{o}C). Για την πραγματοποίηση των ανωτέρω μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από τους εθελοντές, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και ο οποίος διατηρήθηκε σε καταψύκτη (-80 ^{o}C).

Αρχή της μεθόδου για το πρωτόκολλο της sandwich ELISA

Η τεχνική της sandwich ELISA χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων που δεσμεύονται μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων, ειδικών για το συγκεκριμένο αντιγόνο (π.χ. αντίσωμα πρόσδεσης και ανίχνευσης). Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο θέσεις σύνδεσης (αντιγονικά επιτόπια) στις οποίες μπορούν να προσδεθούν τα αντισώματα, εφόσον για την εν λόγω τεχνική χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα που δρουν ως "sandwich". Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση και την ανίχνευση των αντιγόνων μπορούν να είναι είτε μονοκλωνικά είτε πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως τα αντισώματα πρόσδεσης (capture antibody), με τα οποία είναι ήδη επιστρωμένες οι θέσεις των πλακών (coated plate wells). Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν μία θέση σύνδεσης με το αντιγόνο και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η επαρκής ανίχνευση (detection antibody) και ποσοτικοποίηση ακόμα και μικρών ποσοτήτων του αντιγόνου. Μετά τη δέσμευση του αντιγόνου από τα δύο αντισώματα, που χρησιμοποιούνται ανάλογα με το προς μέτρηση αντιγόνο, ακολουθεί πλύση, ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δεν δεσμεύθηκε από αυτά. Ακολουθεί, συνήθως, η προσθήκη ενός ανιχνευτή (detector) για τη δημιουργία συμπλόκου αντίσωμα-αντιγόνο και ανιχνευτή. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος και προστίθεται κατάλληλο υπόστρωμα με το οποίο λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Η ένταση του χρωματισμένου προϊόντος που προκύπτει είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού μορίου που βρίσκεται στο δείγμα που μετρήθηκε και απορροφά, συνήθως, στα 450nm. Πλεονέκτημα της ανάλυσης αποτελεί το γεγονός ότι το προς ανάλυση δείγμα δεν απαιτείται να καθαριστεί προηγουμένως και η τεχνική παρουσιάζει υψηλού βαθμού ευαισθησία (Εικόνα 11).

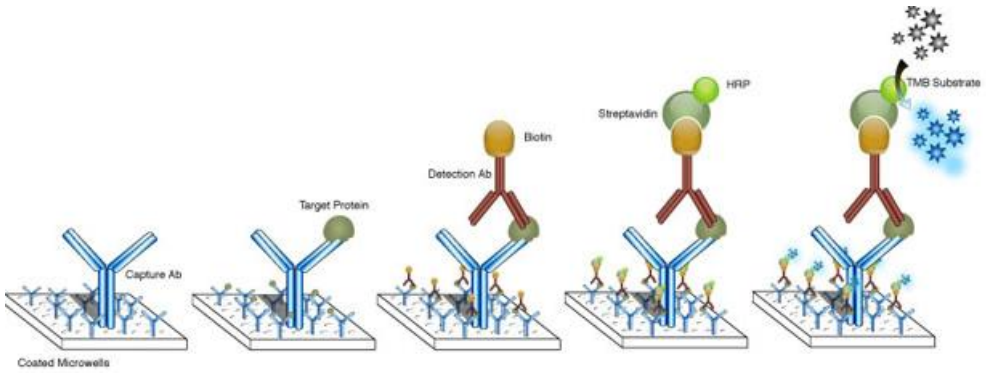
Αναλυτική πορεία

Τα βήματα που ακολουθούνται για τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου της sandwich ELISA είναι σε μεγάλο βαθμό κοινά και παρατηρούνται μόνο μικρές διαφορές μεταξύ των εταιρειών κατασκευής των kits, αλλά και των προς μέτρηση πρωτεϊνικών μορίων. Αρκετές φορές απαιτείται η αραίωση των δειγμάτων πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Για τους δείκτες που μετρήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε αραίωση στη λεπτίνη (1:200), στην CRP (1:3000), στη βισφατίνη (1:4), στον TNF-α (1:2) και στην

oxLDL (1:6561). Αφού προετοιμασθούν όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα, σύμφωνα με τις υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρείας, τοποθετείται στις, ήδη επιστρωμένες με το αντίσωμα σύλληψης, θέσεις των πλακών κατάλληλη ποσότητα διαλύτη και δείγματος (αραιωμένου ή μη) ή προτύπου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον TNF-α προστίθεται, επιπλέον, ρυθμιστικό διάλυμα επώασης. Στη συνέχεια, η πλάκα επωάζεται είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 37^{o}C για 1-2h. Εξαίρεση αποτελεί η μέτρηση της βισφατίνης, η οποία σε αυτό το σημείο απαιτεί ολονύκτια επώαση. Κατόπιν, οι θέσεις της πλάκας πλένονται, ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του αντιγόνου που δε δεσμεύθηκε. Οι οδηγίες πλύσης μπορούν να ποικίλουν, κυρίως όσον αφορά στον αριθμό των επαναλήψεων που απαιτούνται για την ολοκλήρωση ενός πλυσίματος και του όγκου καθαριστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται. Μετά την τελευταία επανάληψη πλύσης, απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθεται στις θέσεις της πλάκας το αντίσωμα-ανιχνευτής. Για τη λεπτίνη και τον TNF-α αυτό το βήμα προηγείται της πρώτης επώασης. Εφόσον προστεθεί το αντίσωμα-ανιχνευτής, ακολουθεί επώαση για 1-2h είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 37^{o}C. Μετά το πέρας της επώασης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και οι θέσεις πλένονται εκ νέου επαναλαμβάνοντας τις οδηγίες πλυσίματος που υποδεικνύει ο εκάστοτε κατασκευαστής. Και πάλι, μετά την τελευταία επανάληψη πλύσης, απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού δευτερογενούς αντισώματος-ανιχνευτή που δεσμεύεται με μη ειδικό τρόπο σε μια θέση σύνδεσης του αντισώματος-ανιχνευτή που προστέθηκε νωρίτερα στη διαδικασία. Ακολουθεί επώαση για 30min-1h είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 37^{o}C. Στην IL-6 αυτό το βήμα δεν υπάρχει. Μετά την επώαση απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος που απαιτείται για τον κάθε βιοδείκτη. Έπειτα, προστίθεται το υπόστρωμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έναρξη της χρωματομετρικής αντίδρασης, καθώς η χρωμοφόρος ομάδα του αντιδρά με τον ανιχνευτή. Ακολουθεί επώαση για 10-30min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Η επώαση για την IL-6, μετά από την προσθήκη του υποστρώματος, διαρκεί 60min και μετά προστίθεται το διάλυμα του ενισχυτή με το οποίο ξεκινά η χρωματομετρική αντίδραση, ακολουθούμενο από επώαση 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ολοκληρωθεί η επώαση, προστίθεται το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης, χωρίς να επηρεαστεί το χρώμα στις θέσεις της πλάκας. Η οπτική πυκνότητα του χρώματος των επιμέρους θέσεων της πλάκας προσδιορίζεται φωτομετρικά με τη συσκευή ELISA reader ρυθμισμένη στα 450nm. Για την IL-6 ρυθμίζεται στα 490nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων στις κατάλληλες για κάθε βιοδείκτη μονάδες μέτρησης κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα δείγματα των ορών που ελήφθησαν πριν και μετά την ολοκλήρωση της εξάμηνης παρέμβασης, ώστε να εντοπιστούν τυχόν διαφορές μεταξύ της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου μετά τη λήψη σταφίδας.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από το μητρικό διάλυμα (stock solution) που παρέχεται για τον κάθε βιοδείκτη. Έτσι, επιτυγχάνονται συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, που με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο, δίνουν συγκεκριμένες τιμές απορρόφησης. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος y=f(x), όπου x η συγκέντρωση του εκάστοτε βιοδείκτη, στις κατάλληλες μονάδες μέτρησης, και y η απορρόφηση στα 450nm (για την IL-6 στα 490nm).



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της sandwich ELISA. (1) Οι θέσεις της πλάκας καλύπτονται με το αντίσωμα σύλληψης. (2) Προστίθεται το δείγμα και το υπάρχον αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα σύλληψης. (3) Προστίθεται το αντίσωμα-ανιχνευτής και δεσμεύει το αντιγόνο. (4) Προστίθεται το δευτερογενές ενζυμικό αντίσωμα (ανιχνευτής) και δεσμεύεται στο αντίσωμα-ανιχνευτή. (5) Προστίθεται το υπόστρωμα και η χρωμοφόρος ομάδα του αντιδρά με τον ανιχνευτή δίνοντας χρωματομετρική αντίδραση.

Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability)

Για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτική ικανότητας του ορού χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με διάφορα εύρη λήψης όγκων και τα αντίστοιχα tips τους, αναλυτικός ζυγός, vacutainer tube και ογκομετρική φιάλη για την παρασκευή διαλυμάτων, αποσταγμένο νερό, συσκευή Vortex για την ανάδευση και ομοιογενοποίηση των δειγμάτων και των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν, καθώς επίσης και φωτόμετρο ELISA reader (*Biotek PowerWave XS2*). Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από τους εθελοντές, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, και ο οποίος διατηρήθηκε σε καταψύκτη (-80 ^{o}C).

Αρχή της μεθόδου για το πρωτόκολλο οξείδωσης ορού

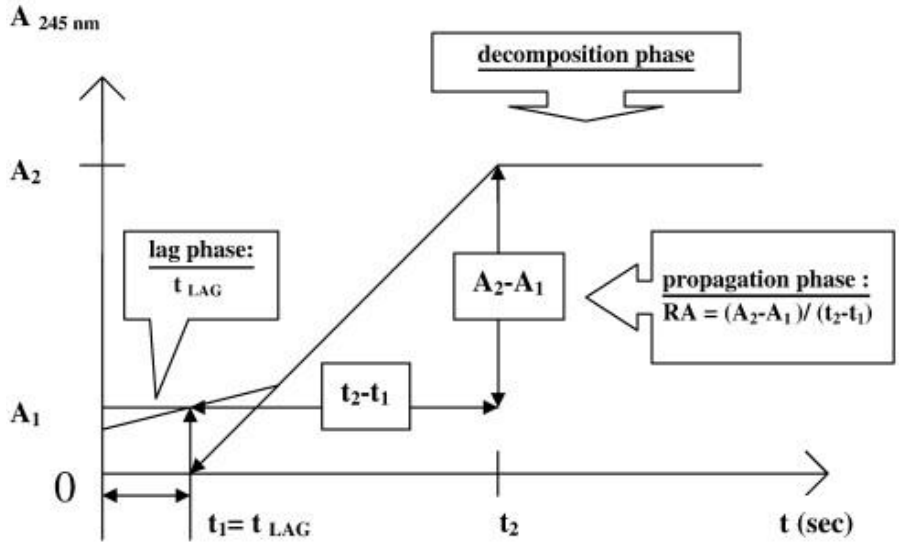
Με το διάλυμα του θειικού χαλκού ($CuSO_4$) προκαλείται οξείδωση της LDL κατά την οποία παράγονται λιποειδικά υπεροξείδια. Η ανίχνευσή τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245nm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση (LagTime).

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζεται stock διάλυμα $CuSO_4$ συγκέντρωσης 20mM, για το οποίο ζυγίζονται 0,0125g CuSO4x5H2O (MW=249,68) και διαλύονται σε 2,5mL αποσταγμένο H_2O. Το διάλυμα

φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, παρασκευάζεται working διάλυμα $CuSO_4$ συγκέντρωσης 200μM, για το οποίο αραιώνεται 1:100 το stock διάλυμα $CuSO_4$ με αποσταγμένο H_2O. Δηλαδή, λαμβάνονται 20μL και αραιώνονται με αποσταγμένο H_2O έως όγκο 2000μL. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα PBS buffer, για το οποίο αναδιαλύονται σε 1000mL αποσταγμένου νερού 9g χλωριούχου νατρίου (NaCl), 0,9076g $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,2408g $NaH_2PO_4.2H2O$ και ρυθμίζεται το pH στο 7,4. Παρασκευάζεται διάλυμα ορού αραιωμένο 1:12 με PBS buffer. Δηλαδή, λαμβάνονται 5μL ορού και αραιώνονται με PBS έως όγκο 60μL σε eppendorfs των 2mL. Έπειτα, παρασκευάζεται μίγμα $CuSO_4$ και PBS, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 16μM. Για την πλάκα που χρησιμοποιήθηκε, η οποία περιείχε 96 θέσεις και απορροφά στο υπεριώδες (ultraviolet, UV) φάσμα ακτινοβολιών, λήφθηκαν 23mL PBS και προστέθηκαν 2mL $CuSO_4$. Σε κάθε θέση της πλάκας τοποθετούνται 20μL αραιωμένου ορού. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230μL μίγματος PBS-$CuSO_4$, η πλάκα εισάγεται στο ELISA reader και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245nm για 4h ανά 2min. Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού διεξήχθη τόσο για τα δείγματα των ορών που ελήφθησαν στην αρχή της παρέμβασης όσο και κατά την ολοκλήρωση αυτής, ώστε να διερευνηθούν πιθανές διαφορές μετά την πρόσληψη σταφίδας μεταξύ των δύο ομάδων.

Η καμπύλη που προκύπτει μετά από το πρωτόκολλο οξείδωσης ορού είναι της μορφής που φαίνεται στην Εικόνα 12. Καταγράφεται φωτομετρικά η απορρόφηση των παραγόμενων συζυγών διενίων (conjugated diene lipid hydroperoxides, CD) στα 245nm. Η χρονική πορεία της οξείδωσης της LDL παρουσιάζει αρχικά μία φάση κατά την οποία δεν επέρχεται οξείδωση (lag-phase-time, χρονική υστέρηση) λόγω της παρουσίας των αντιοξειδωτικών του δείγματος, ακολουθούμενη από μία αύξηση της απορρόφησης, λόγω του σχηματισμού CD (propagation phase) όταν εξαντληθούν τα αντιοξειδωτικά. Η αντίσταση της LDL στην οξείδωση υπολογίζεται σε αντιστοιχία με τη διάρκεια της lag phase και το ρυθμό παραγωγής CD κατά την propagation phase. Η χρονική υστέρηση καθορίζεται γραφικά ως το σημείο τομής των εφαπτομένων των τμημάτων της καμύλης που αντιπροσωπεύουν την lag και την propagation phase (σημείο στο οποίο άρχισε να αυξάνεται η απορρόφηση). Η μέτρηση περιλαμβάνει την εύρεση του lag time σε δείγματα ορού πριν και μετά από την παρέμβαση. Εάν παρουσιασθεί αύξηση του χρόνου επαγωγής σε σχέση με αυτόν πριν από την παρέμβαση, ορίζουμε την αναστολή στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL, λόγω της αύξησης των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών.



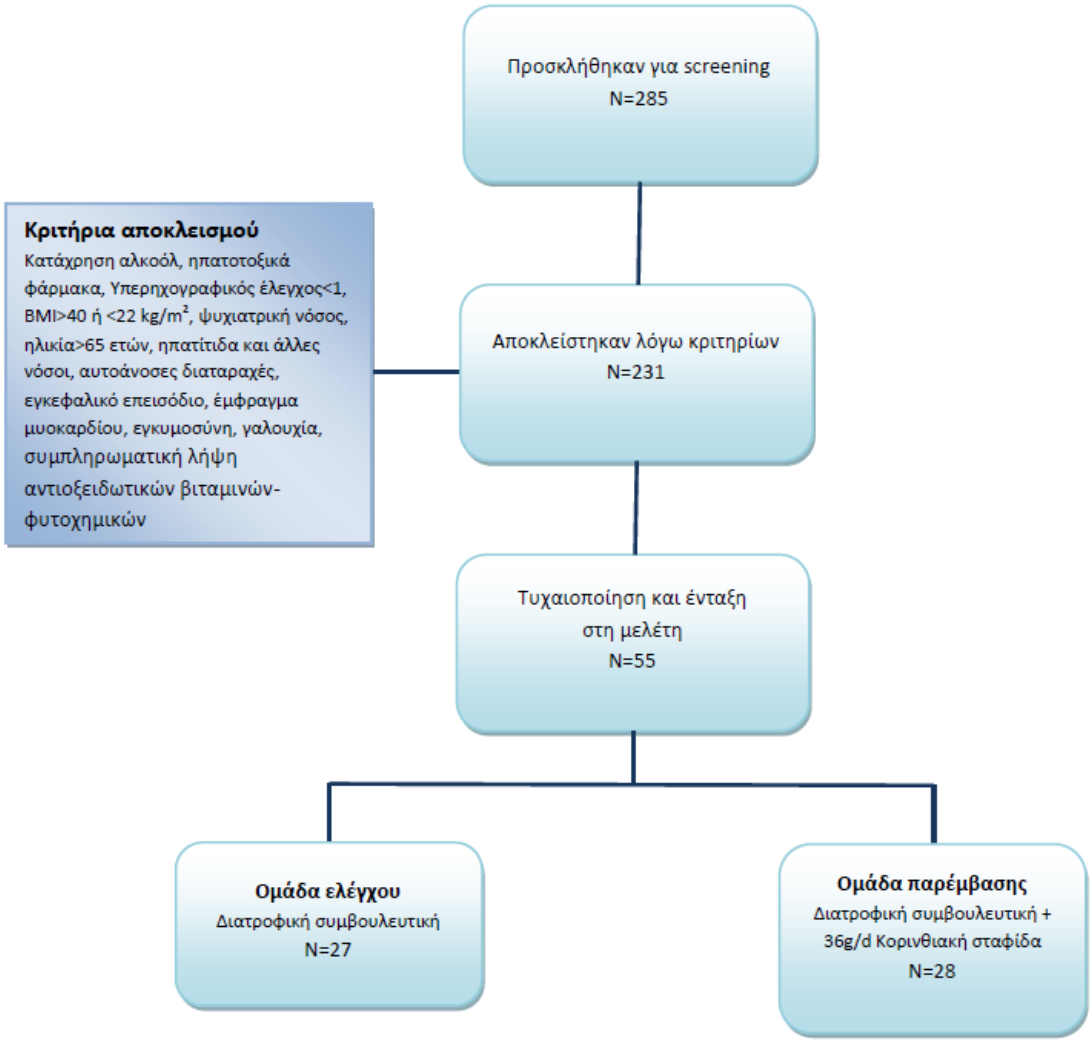
Εικόνα 12 Κινητική της επαγόμενης από το χαλκό οξείδωσης των λιπιδίων του ορού in vitro. Η τιμή t_{LAG} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών του ορού. Η τιμή RA αντιπροσωπεύει τη μετατροπή των PUFAs σε υδροϋπεροξείδια λίπους (συζευγμένα διένια). Α=απορρόφηση, t=χρόνος.

Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, διεξήχθη, αρχικά, έλεγχος κανονικότητας (Normality Test) με την εφαρμογή του κριτηρίου Kolmogorov-Smirnov για τις παρατηρήσεις όλων των μεταβλητών. Στη συνέχεια, για τις μεταβλητές που παρουσίαζαν κανονική κατανομή (normal distribution) πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος της σύγκρισης των μέσων όρων δύο ανεξάρτητων μεταβλητών (Independent Samples T-Test), ώστε να συγκριθούν οι διαφορές των μέσων τιμών όλων των δεικτών που αξιολογήθηκαν μεταξύ της ομάδας παρέμβασης (Group 1) και της ομάδας ελέγχου (Group 0), τόσο στην αρχή της μελέτης όσο και μετά την ολοκλήρωση αυτής. Με τη διεξαγωγή του ανωτέρω ελέγχου στην αρχή της μελέτης διερευνήθηκε η πιθανότητα οι δύο ομάδες να παρουσίαζαν διαφορές ως προς τα χαρακτηριστικά τους για t=0, και συνεπώς την πιθανότητα το δείγμα να ήταν ετερογενές. Στο τέλος της παρέμβασης (t=6), με την εφαρμογή αυτού του στατιστικού ελέγχου διερευνήθηκε η πιθανότητα της ύπαρξης διαφορών μετά την ολοκλήρωση της παρέμβασης μεταξύ των δύο ομάδων. Για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή εφαρμόστηκε ο αντίστοιχος μη παραμετρικός έλεγχος MANN-WHITNEY TEST. Επιπλέον, ο στατιστικός έλεγχος Independent Samples T-Test εφαρμόστηκε για να διερευνηθεί αν οι ασθενείς που ήταν ετεροζυγώτες (CG) ή ομοζυγώτες (GG) (Group 2) για τον πολυμορφισμό PNPLA3 παρουσίαζαν διαφορετική απόκριση από αυτούς που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου (CC) (Group 1) στο τέλος της παρέμβασης (t=6), ως προς τους δείκτες που αξιολογήθηκαν. Στους ελέγχους της σύγκρισης των μέσων όρων δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, η τιμή p-Value επελέχθη ανάλογα με το αν οι

διακυμάνσεις των μεταβλητών θεωρούνταν ίσες, όπως προέκυπτε από τον έλεγχο Levene για την ισότητα των διακυμάνσεων (Levene's Test for Equality of Variances). Συγκεκριμένα, αν η τιμή p-Value του κριτηρίου Levene ήταν μεγαλύτερη του 0,05, οι διακυμάνσεις θεωρούνταν ίσες. Για να ανιχνευθεί η πιθανότητα διαφορών στους μέσους όρους των μεταβλητών, που παρουσίαζαν κανονική κατανομή, στο εσωτερικό της κάθε ομάδας στο τέλος της μελέτης συγκριτικά με την έναρξη αυτής, διεξήχθη ο στατιστικός έλεγχος της σύγκρισης των μέσων όρων δύο εξαρτημένων μεταβλητών (Paired Samples T-Test). Ο αντίστοιχος μη παραμετρικός έλεγχος WILCOXON TEST εφαρμόστηκε για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Μετά την κατηγοριοποίηση του αρχικού δείγματος σε αυτούς που έχασαν βάρος (adherent) (ομάδα παρέμβασης n=18, ομάδα ελέγχου n=17) οι ανωτέρω έλεγχοι, εκτός αυτού για τον πολυμορφισμό του PNPLA3, επανελήφθησαν σε αυτή την υπό-ομάδα ασθενών. Σε όλους τους στατιστικούς ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε για p-Value<0,05. Η στατιστική ανάλυση στο σύνολό της διεξήχθη με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 21 (IBM SPSS Statistics Version 21).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Χαρακτηρισμός του δείγματος

Στην αρχή της μελέτης κατεγράφησαν όλα τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που στρατολογήθηκε, ώστε να διαπιστωθεί ότι οι ασθενείς τόσο της ομάδας παρέμβασης όσο και της ομάδας ελέγχου παρουσίαζαν ομοιογένεια και ότι ξεκινούσαν όλοι την εξάμηνη παρέμβαση έχοντας το ίδιο υπόβαθρο. Στη στατιστική ανάλυση συμπεριλήφθησαν 44 ασθενείς, καθώς 5 άτομα αποχώρησαν για προσωπικούς λόγους από το πρωτόκολλο και 6 άτομα δεν αναλύθηκαν εξαιτίας τροποποίησης της ληφθείσας φαρμακευτικής αγωγής, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Έτσι, στο τέλος της μελέτης η ομάδα παρέμβασης περιελάμβανε 23 ασθενείς (Group 1, n=23) και η ομάδα ελέγχου 21 (Group 0, n=21). Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εντοπίστηκε στα επίπεδα της ινσουλίνης, καθώς αυτά ήταν χαμηλότερα στην ομάδα ελέγχου έναντι αυτών στην ομάδα παρέμβασης ($p=0,038$). Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του δείγματος στην αρχή της μελέτης.

Πίνακας 2 Χαρακτηρισμός του δείγματος στην αρχή της μελέτης.

Variables	Group 0 ± SE (n=21)	Group 1 ± SE (n=23)	*p-Value*
Body weight (kg)	79,77±2,94	84,87±3,01	0,234
BMI (kg/m^2)	28,16±0,83	29,50±0,85	0,265
Fat (%)	31,16±1,88	33,56±1,82	0,365
Fat Trunk (%)	30,07±1,67	32,57±1,47	0,265
Waist Circumference (cm)	96,67±2,25	101,00±2,36	0,195
Hip Circumference (cm)	107,30±2,08	112,49±1,89	0,071
WHR	0,90±0,017	0,89±0,015	0,730
SBP (mmHg)	130,33±2,90	129,09±2,76	0,757
DBP (mmHg)	81,43±1,88	80,26±1,91	0,666
HF (bpm)	68,43±2,77	71,44±1,75	0,351
MedDietScore	32,00±0,94	29,78±0,88	0,093
Ultrasound (Hz)	1,60±0,11	1,93±0,15	0,080
Elastography (kPa)	5,52±0,35	5,32±0,17	0,605
NAFLD Score	-2,32±0,25	-2,32±0,19	0,981
Glucose (mg/dl)	92,05±3,71	95,70±2,68	0,424
Total Cholesterol (mg/dl)	202,76±6,99	209,61±6,93	0,491
HDL (mg/dl)	56,66±3,34	55,98±2,84	0,876
LDL (mg/dl)	120,81±6,54	125,52±7,55	0,642
TAG (mg/dl)	114,10±11,29	137,30±20,38	0,337
SGOT (U/L)	23,10±1,39	22,78±1,21	0,865
SGPT (U/L)	29,48±3,01	30,04±2,86	0,892
SGOT/SGPT	0,88±0,64	0,85±0,053	0,736
γGT (U/L)	32,71±6,36	32,09±6,32	0,945
ALP (U/L)	59,85±3,13	70,10±5,60	0,118
TBIL (mg/dl)	0,65±0,052	0,69±0,071	0,721
DBIL (mg/dl)	0,20±0,02	0,20±0,02	0,978
TPR (g/dl)	7,33±0,10	7,32±0,07	0,925
Alb (g/dl)	4,55±0,06	4,66±0,04	0,111
Fe (μg/dl)	112,52±9,42	94,65±5,55	0,103
Fer (ng/dl)	100,18±23,90	107,22±13,69	0,795
HbA1C (%)	5,54±0,10	5,80±0,11	0,107
Insulin (μIU/ml)	12,06±0,75	15,75±1,50	0,038
WBC (x 10^3/μl)	6,16±0,38	6,68±0,47	0,402
RBC (x 10^6/μl)	5,02±0,11	4,95±0,10	0,649
Plt (x 10^3/mm^3)	248,48±12,51	239,17±8,64	0,538
Urea (mg/dl)	28,48±1,84	29,39±1,33	0,686
Uric Acid (mg/dl)	5,03±0,22	5,10±0,24	0,828

CRP(ng/ml)	2399,20±665,71	2676,20±532,61	0,747
Visfatin (ng/ml)	8,42±0,40	9,62±1,15	0,343
Leptin (ng/ml)	63,46±10,56	95,89±17,02	0,117
IL-6 (pg/ml)	1,72±0,70	1,57±0,34	0,842
oxLDL (U/L)	125,74±5,66	137,53±6,23	0,171
TNF-α (pg/ml)	1,31±0,16	0,86±0,23	0,120
Energy (Kcal)	1981,10±113,85	1923,10±142,43	0,755
Carbohydrates (g)	205,46±15,28	200,47±15,80	0,822
Sugars (g)	60,78±4,75	62,62±5,78	0,809
Fat, Total (g)	99,48±8,30	89,78±8,58	0,423
SFA (g)	27,98±3,34	31,92±2,71	0,362
PUFA (g)	14,79±1,51	12,54±1,99	0,380
MUFA (g)	46,04±4,02	35,82±4,50	0,100
Protein (g)	82,59±6,60	78,34±6,60	0,652
Insoluble Fibre (g)	1,98±0,60	0,91±0,25	0,096
Crude Fibre (g)	2,75±0,31	3,08±0,83	0,723

Σύγκριση διαφορών σε κάθε ομάδα στο τέλος της μελέτης

Στο τέλος της μελέτης, από τη βάση δεδομένων των ασθενών, φάνηκε ότι τόσο οι συμμετέχοντες στην ομάδα παρέμβασης όσο και αυτοί στην ομάδα ελέγχου κατάφεραν να μειώσουν στατιστικά σημαντικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά που αφορούσαν στο βάρος (Group 0: *p=0,001*, Group 1: *p=0,002*), στο BMI (Group 0: *p=0,001*, Group 1: *p=0,001*), στην περιφέρεια των ισχίων (Group 0: *p=0,010*, Group 1: *p<0,001*), καθώς επίσης και σε κλινικούς δείκτες που αφορούσαν στα επίπεδα της Hb_{A1C} (Group 0: *p=0,028*, Group 1: *p=0,001*) και στα επίπεδα της CRP στον ορό (Group 0: *p=0,027*, Group 1: *p=0,001*), αλλά και στις τιμές του ελαστογραφικού ελέγχου (Group 0: *p=0,043*, Group 1: *p=0,008*). Από την άλλη, ο βαθμός υιοθέτησης της Μεσογειακής Διατροφής, όπως απεικονίστηκε από το MedDietScore, αυξήθηκε και στις δύο ομάδες (Group 0: *p=0,005*, Group 1: *p<0,001*). Όσον αφορά στην ομάδα ελέγχου, φάνηκε ότι τόσο η SBP όσο και η DBP μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά (*p=0,001* και *0,003* αντίστοιχα*)*, καθώς επίσης και η HDL και η LDL (*p=0,0016* και για τις δύο*)*, αλλά και το NAFLD score *(p=0,018).* Επιπλέον, οι ασθενείς στην ομάδα ελέγχου εμφάνισαν μείωση στην πρόσληψη του συνολικού λίπους (*p=0,047*). Παρόλα αυτά, μόνο οι συμμετέχοντες στην ομάδα παρέμβασης κατόρθωσαν να ελαττώσουν τόσο το συνολικό σωματικό λίπος (*p=0,010*) όσο και το σπλαχνικό (*p=0,045*), καθώς επίσης και την περιφέρεια μέσης (*p=0,007*). Οι τιμές του υπερηχογραφικού ελέγχου, επίσης, μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά στην ομάδα που λάμβανε σταφίδα (*p=0,029*). Αναφορικά με τη γλυκόζη νηστείας και την IL-6, αυτές εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση σε αυτούς τους ασθενείς (*p=0,004* και *0,041* αντίστοιχα). Επιπλέον, οι ασθενείς που στρατολογήθηκαν στην ομάδα παρέμβασης φάνηκε ότι περιόρισαν

σημαντικά την πρόσληψη των SFAs (*p=0,003*). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι ασθενείς που λάμβαναν δύο ισοδύναμα (36g) σταφίδας καθημερινά, αντικατέστησαν με αυτόν τον τρόπο ένα σνακ αντίστοιχης ενεργειακής αξίας και δεν αύξησαν τη συνολική πρόσληψη των σακχάρων τους, όπως προκύπτει από την ανάλυση των ανακλήσεων 24ώρου που ελήφθησαν. Στον Πίνακα 3 φαίνονται λεπτομερώς οι διαφορές των δεικτών φλεγμονής, οξειδωτικού στρες, καθώς και στοιχεία που αφορούν στη διατροφική πρόσληψη των ασθενών των δύο ομάδων στην αρχή και στο τέλος της μελέτης.

Πίνακας 3 Διαφορές στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου στο τέλος της μελέτης.

Variables	Group 0 ± SE (n=21)			Group 1 ± SE (n=23)		
	baseline	6-month follow-up	*p-value*	baseline	6-month follow-up	*p-value*
CRP(ng/ml)	2399,20±665,71	841,63±237,47	0,023	2136,90±387,74	825,01±150,40	0,002
Visfatin (ng/ml)	8,42±0,42	4,73±0,68	0,066	9,62±1,15	9,17±0,67	0,696
Leptin (ng/ml)	63,46±10,56	55,21±8,56	0,090	95,89±17,02	85,21±15,97	0,190
IL-6 (pg/ml)	1,72±0,70	1,317±0,32	0,322	1,57±0,34	0,85±0,11	0,009
oxLDL (U/L)	125,74±5,66	115,54±5,65	0,072	137,53±6,23	125,07±7,01	0,160
TNF-α (pg/ml)	1,31±0,16	1,14±0,13	0,055	0,86±0,23	1,06±0,25	0,063
Total Serum Oxidizability (sec)	6033,62±228,51	6145.05±206,57	0,569	5578,95±137,05	5745,90±186,55	0,462
Energy (Kcal)	1981,10±113,85	1831,80±128,47	0,429	1923,10±142,43	1777,40±122,90	0,343
Carbohydrates (g)	205,46±15,28	205,25±16,72	0,992	200,47±15,80	185,58±12,20	0,363
Sugars (g)	60,78±4,75	68,78±7,77	0,367	62,62±5,78	65,23±5,70	0,551
Fat, Total (g)	99,48±8,30	80,34±5,71	0,047	89,78±8,58	84,87±8,72	0,642
SFA (g)	27,98±3,34	22,70±2,02	0,130	31,92±2,71	22,60±2,25	0,003
PUFA (g)	14,79±1,512	12,94±1,44	0,274	12,54±1,99	13,04±1,67	0,503
MUFA (g)	46,04±4,02	36,32 ±3,48	0,031	35,83±4,50	41,73±5,56	0,350
Protein (g)	82,59±6,60	76,49±7,80	0,545	78,34±6,60	74,18±6,03	0,576

Σύγκριση διαφορών μεταξύ της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου κατά την ολοκλήρωση της μελέτης

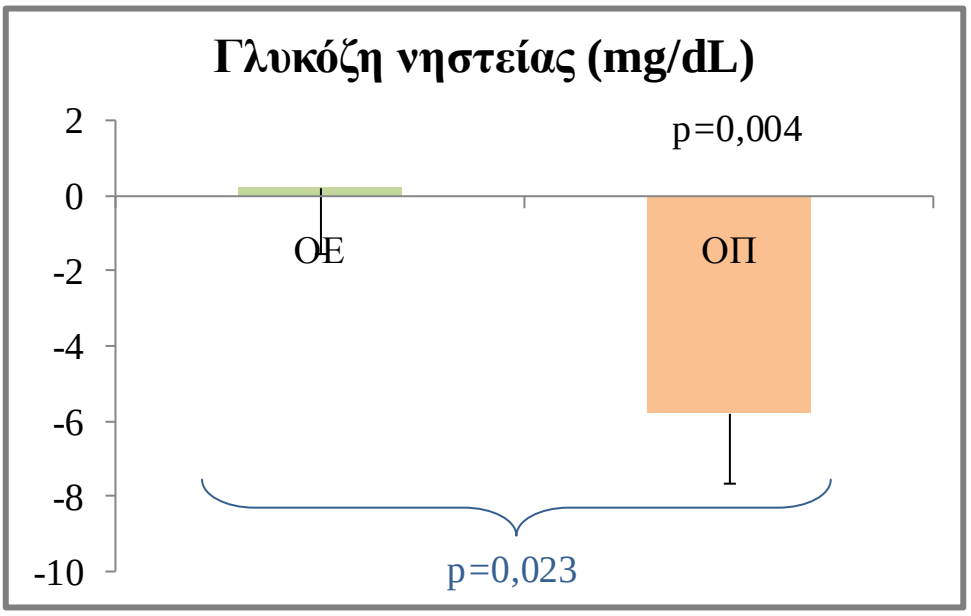
Κατά την ολοκλήρωση της μελέτης διεξήχθη έλεγχος ώστε να διαπιστωθεί αν υπήρχαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ομάδων ως προς τους δείκτες που εκτιμήθηκαν. Από την αξιολόγηση των καταχωρημένων μετρήσεων στη βάση δεδομένων των ασθενών που στρατολογήθηκαν στο ερευνητικό πρωτόκολλο προέκυψαν τα κάτωθι. Αναφορικά με το MedDietScore, φάνηκε ότι τα άτομα στην ομάδα παρέμβασης αύξησαν κατά περίπου 6 μονάδες το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής Διατροφής, σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου που την

αύξησε κατά το ήμισυ σε σχέση με την ομάδα παρέμβασης (5,78 *vs.* 3,05, *p=0,044*). Επιπλέον, όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση, οι ασθενείς που λάμβαναν σταφίδα μείωσαν κατά περίπου 6 μονάδες τη γλυκόζη νηστείας στο τέλος της μελέτης σε σχέση με τους ασθενείς στην ομάδα ελέγχου (-5,78 *vs.* 0,24, *p=0,023*), αλλά οι ασθενείς της ομάδας ελέγχου εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση στη DBP (-0,457 *vs.* -4,905, *p=0,003*). Διαφορά σημειώθηκε, επίσης, ως προς τη μείωση της IL-6, η οποία κατεγράφη στατιστικά σημαντική στην ομάδα παρέμβασης σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (-0,7204 *vs.* -0,4057, *p=0,032*).

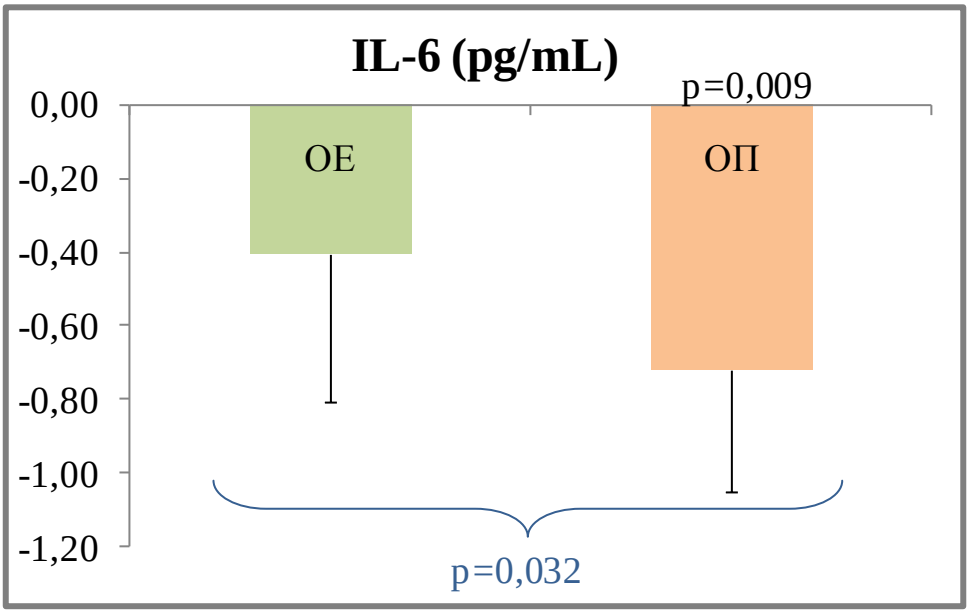
Πίνακας 4 Σύγκριση μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας παρέμβασης κατά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου.

Variables	**Group 0 ± SE (n=21)**	**Group 1 ± SE (n=23)**	***p-Value***
CRP(ng/ml)	-1558,00±652,24	-1312,00±343,18	0,748
Visfatin (ng/ml)	-3,70±0,58	-0,45±1,14	0,233
Leptin (ng/ml)	-8,26±4,64	-10,69±7,89	0,794
IL-6 (pg/ml)	-0,41±0,40	-0,72±0,33	0,032
oxLDL (U/L)	-10,20±5,37	-12,47±8,58	0,828
TNF-α (pg/ml)	-0,17±0,14	0,20±0,20	0,066
Total Serum Oxidizability (sec)	111,43±192,24	166,95±227,67	0,851
Energy (Kcal)	-149,30±185,09	-145,70±150,41	0,988
Carbohydrates (g)	-0,21±20,91	-14,89±16,03	0,577
Sugars (g)	8,01±8,67	2,66±4,39	0,575
Fat, Total (g)	-19,14±9,04	-4,92±10,43	0,313
SFA (g)	-5,29±3,35	-9,32±2,74	0,353
PUFA (g)	-1,85±1,99	0,50±2,26	0,442
MUFA (g)	-9,72±4,18	5,90±6,19	0,054
Protein (g)	-6,10±9,91	-4,16±7,33	0,874
Insoluble Fibre (g)	-0,81±0,60	-0,32±0,31	0,461
Crude Fibre (g)	1,51±0,93	0,86±1,02	0,642

Γράφημα 1 Μεταβολή των επιπέδων της γλυκόζης νηστείας στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου και διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της μελέτης.



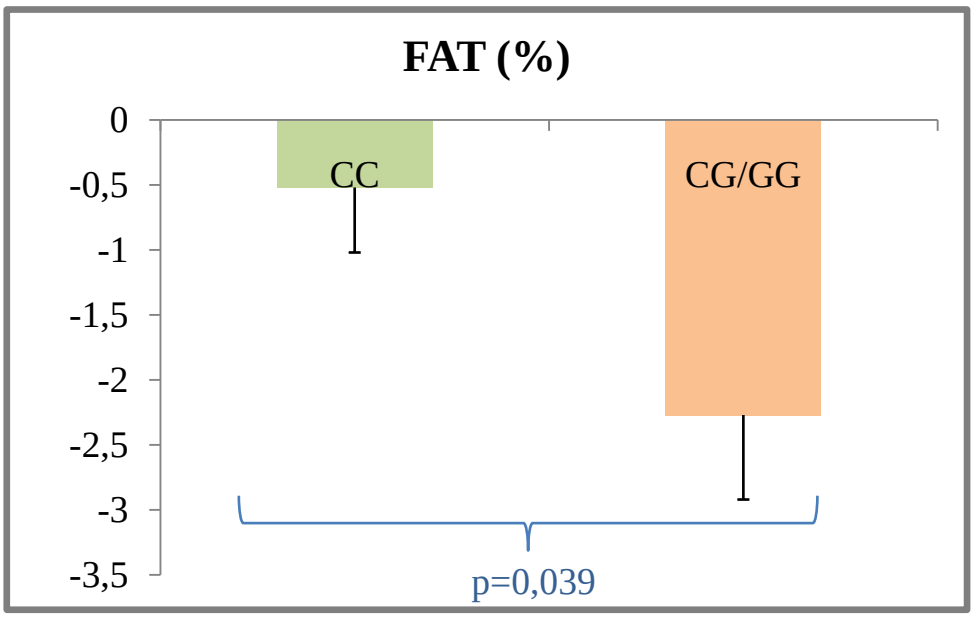
Γράφημα 2 Μεταβολή των επιπέδων της IL-6 στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου και διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της μελέτης.



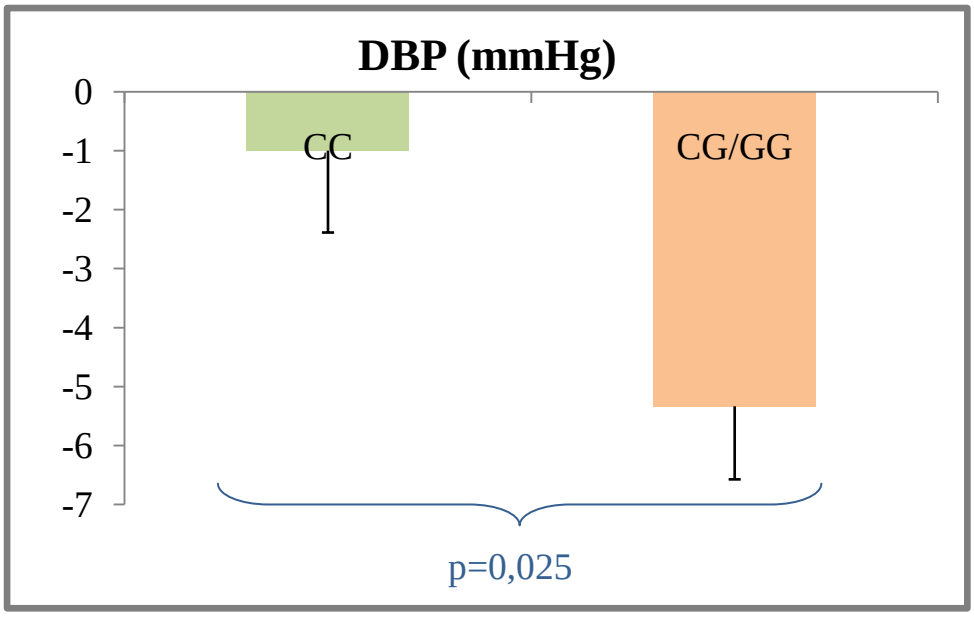
Διαφορές στην απόκριση μεταξύ των ασθενών με τουλάχιστον ένα ή κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό του PNPLA3 στο τέλος της μελέτης

Τα διαθέσιμα δεδομένα για τη γονοτύπιση των ασθενών που στρατολογήθηκαν στο παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο, οι οποίοι αποτελούσαν μέρος του πληθυσμού που γονοτυπήθηκε για τις ανάγκες άλλης μελέτης στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, επιτρέπουν την απόπειρα για μια διατροφογενετική προσέγγιση, παρότι το δείγμα είναι πολύ μικρό για να διατυπωθούν τελειωτικά συμπεράσματα. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ασθενών που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου (CC) (Group 1, n=28) για τον πολυμορφισμό PNPLA3 και αυτών που διέθεταν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου (CG, GG) (Group 2, n=16). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό PNPLA3 ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη διατροφική συμβουλευτική ως προς τη μείωση του ολικού σωματικού λίπους σε σχέση με τους συμμετέχοντες που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό (-2,27 *vs.* -0,52, *p=0,039*). Επιπλέον, η ίδια κατηγορία ασθενών παρουσίασε στατιστικά σημαντική βελτίωση στα επίπεδα της διαστολικής αρτηριακής πίεσης, μειώνοντας αυτή κατά περίπου 4 μονάδες σε σχέση με την ομάδα των ασθενών που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου (-5,34 *vs.* -1,00, *p=0,025*). Η συγκέντρωση της ινσουλίνης φάνηκε, επίσης, να ελαττώνεται στους ασθενείς που διέθεταν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό PNPLA3 μετά το πέρας της παρέμβασης και τη διατροφική συμβουλευτική, σε αντίθεση με τους άλλους ασθενείς (-1,27 *vs.* 2,22, *p=0,030*). Το ποσοστό του σπλαχνικού λίπους έτεινε να μειωθεί περισσότερο στους ασθενείς που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό του PNPLA3 σε σχέση με αυτούς που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου (-2,46 *vs.* -0,40), αν και αυτή η μείωση δεν ήταν τελικά στατιστικά σημαντική (*p=0,053*).

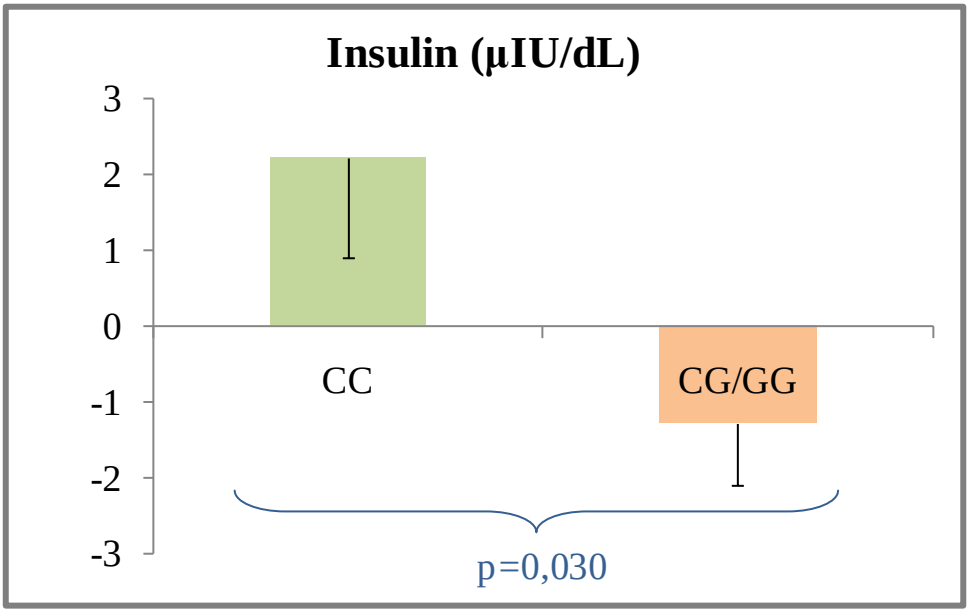
Γραφημα 3 Διαφορά στη μεταβολή του ποσοστού του σωματικού λίπους μεταξύ της ομάδας που διέθετε τον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 και της ομάδας που δεν τον διέθετε στο τέλος της μελέτης.



Γραφημα 4 Διαφορά στη μεταβολή της διαστολικής αρτηριακής πίεσης μεταξύ της ομάδας που διέθετε τον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 και της ομάδας που δεν τον διέθετε στο τέλος της μελέτης.



Γραφημα 5 Διαφορά στη μεταβολή των επιπέδων της ινσουλίνης μεταξύ της ομάδας που διέθετε τον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 και της ομάδας που δεν τον διέθετε στο τέλος της μελέτης.



Διαφορές των ασθενών που έχασαν βάρος σε κάθε ομάδα στο τέλος της παρέμβασης

Στους ασθενείς οι οποίοι έχασαν βάρος, τόσο στην ομάδα παρέμβασης (n=18) όσο και στην ομάδα ελέγχου (n=17), διεξήχθη σύγκριση των διαφορών των μέσων όρων κάθε υπό-ομάδας με σκοπό να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στο τέλος της εξάμηνης παρέμβασης σε σχέση με την έναρξη αυτής. Διαπιστώθηκε ότι και στις δύο υπό-ομάδες των ασθενών που έχασαν βάρος υπήρξε στατιστικά σημαντική απώλεια βάρους (Group 0 *p<0,001*, Group 1 *p<0,001*), μείωση του BMI (Group 0 *p<0,001*, Group 1 *p<0,001*), του ολικού σωματικού λίπους (Group 0 *p=0,005*, Group 1 *p=0,009*), της περιφέρειας μέσης (Group 0 *p=0,035*, Group 1 *p=0,015*) και ισχίων (Group 0 *p=0,003*, Group 1 *p=0,001*). Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση των επιπέδων της Hb_{A1C} (Group 0 *p=0,019*, Group 1 *p<0,001*) και βελτίωση στις τιμές του υπερηχογραφικού ελέγχου (Group 0 *p=0,034*, Group 1 *p=0,014*). Διατροφικά, φάνηκε ότι και οι δύο υπό-ομάδες βελτίωσαν το βαθμό προσκόλλησης στη Μεσογειακή Διατροφή αυξάνοντας τις τιμές του MedDietScore (Group 0 *p=0,015*, Group 1 *p<0,001*) και μείωσαν τα προσλαμβανόμενα SFAs (Group 0 *p=0,020*, Group 1 *p=0,008*). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ασθενείς που έχασαν βάρος και ανήκαν στην ομάδα ελέγχου μείωσαν στατιστικά σημαντικά το σπλαχνικό λίπος (*p=0,020*), την SBP και την DBP (*p=0,001* και *<0,001* αντίστοιχα), την HDL και την LDL (*p=0,038* και *0,011* αντίστοιχα), το NAFLD score (*p=0,041*), καθώς επίσης και τη συνολική πρόσληψη λίπους (*p=0,003*). Και μετά από αυτή την ομαδοποίηση, φαίνεται από την ανάλυση των ληφθέντων ανακλήσεων 24ώρου ότι οι ασθενείς που λάμβαναν τα δύο ισοδύναμα

σταφίδας καθημερινά δεν αύξησαν τη συνολική κατανάλωση σακχάρων, αλλά αντικατέστησαν με τη σταφίδα ένα σνακ αντίστοιχης διατροφικής αξίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι ασθενείς που έχασαν βάρος και ανήκαν στην ομάδα που λάμβανε σταφίδα, βελτίωσαν στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας και τις τιμές του ελαστογραφικού ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι συμμετέχοντες στην ομάδα που λάμβανε σταφίδα, οι οποίοι έχασαν βάρος, παρουσίασαν σημαντική βελτίωση στα επίπεδα δεικτών φλεγμονής. Ειδικότερα, κατά την ολοκλήρωση της μελέτης, αυτοί οι ασθενείς εμφάνισαν μειωμένες τιμές στον ορό για την CRP (*p=0,002*), τη λεπτίνη (*p=0,036*) και την IL-6 (*p=0,031*). Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι διαφορές των ασθενών που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου στο τέλος της μελέτης.

Πίνακας 5 Διαφορές στην υπό-ομάδα παρέμβασης και στην υπό-ομάδα ελέγχου των ασθενών που έχασαν βάρος στο τέλος της μελέτης.

Variables	**Group 0 ± SE (n=17)**			**Group 1 ± SE (n=18)**		
	baseline	**6-month follow-up**	***p-value***	**baseline**	**6-month follow-up**	***p-value***
Body weight (kg)	80,59±3,45	76,68±3,17	<0,001	82,25±3,01	79,42±2,74	<0,001
BMI (kg/m^2)	28,48±0,98	27,08±0,93	<0,001	29,03±0,89	28,07±0,88	<0,001
Fat (%)	32,26±1,88	30,16±2,08	0,005	34,82±1,73	33,41±1,97	0,009
Fat Trunk (%)	31,25±1,66	29,16±1,98	0,020	33,21±1,26	31,96±1,52	0,063
Waist Circumference (cm)	97,42±2,81	94,53±3,06	0,035	99,25±2,58	96,89±2,61	0,015
Hip Circumference (cm)	107,71±2,51	105,53±2,41	0,003	110,96±1,91	107,65±1,57	0,001
WHR	0,90±0,02	0,89±0,02	0,448	0,89±0,02	0,89±0,02	1,000
SBP (mmHg)	131,76±3,44	121,68±2,84	0,001	127,17±3,33	123,14±2,77	0,097
DBP (mmHg)	82,68±2,19	76,18±2,13	<0,001	78,72±2,20	77,47±2,07	0,380
HF (bpm)	67,53±2,53	67,00±2,08	0,788	69,39±1,64	67,44±1,63	0,209
MedDietScore	31,94±1,10	34,76±1,30	0,015	30,06±1,05	35,17±1,29	<0,001
Ultrasound (Hz)	1,59±0,13	1,41±0,11	0,034	2,00±0,19	1,75±0,15	0,014
Elastography (kPa)	5,58±0,44	4,94±0,18	0,059	5,24±0,21	4,74±0,17	0,013
NAFLD Score	-2,15±0,27	-1,93±0,29	0,041	-2,18±0,21	-2,09±0,23	0,185
Glucose (mg/dl)	92,47±4,48	92,47±4,51	1,000	94,61±2,19	86,39±2,22	<0,001
Total Cholesterol	202,71±8,46	209,76±9,05	0,306	209,50±8,08	210,61±7,83	0,713

(mg/dl)						
HDL (mg/dl)	56,90±3,52	52,68±3,27	0,038	55,91±3,33	52,79±3,58	0,187
LDL (mg/dl)	121,35±8,02	137,18±8,26	0,011	122,35±9,25	130,12±8,76	0,171
TAG (mg/dl)	107,06±11,13	99,53±10,29	0,394	150,44±24,96	141,94±20,28	0,356
SGOT (U/L)	23,71±1,60	21,41±1,57	0,183	22,44±1,44	22,33±1,67	0,942
SGPT (U/L)	29,18±3,63	23,88±2,88	0,209	28,39±3,32	25,94±2,86	0,541
SGOT/SGPT	0,92±0,07	0,98±0,07	0,366	0,88±0,06	0,94±0,06	0,100
γGT (U/L)	32,00±7,09	36,00±12,69	0,287	32,11±8,06	34,83±9,91	0,856
ALP (U/L)	56,56±3,02	57,06±3,34	0,790	69,80±6,16	67,33±5,94	0,109
TBIL (mg/dl)	0,63±0,05	0,66±0,08	0,550	0,61±0,05	0,61±0,05	0,971
DBIL (mg/dl)	0,20±0,02	0,23±0,02	0,052	0,17±0,02	0,18±0,02	0,364
Fe (μg/dl)	107,06±7,83	103,06±6,87	0,685	94,28±5,90	87,44±5,15	0,289
Fer (ng/dl)	67,04±10,82	69,11±9,92	0,657	109,53±16,80	107,43±14,15	0,701
HbA1C (%)	5,58±0,12	5,44±0,11	0,019	5,80±0,13	5,58±0,11	<0,001
Insulin (μIU/dl))	11,86±0,94	11,36±1,48	0,689	15,51±1,57	16,39±1,99	0,590
Urea (mg/dl)	26,76±1,66	32,12±2,22	0,012	30,28±1,62	31,72±1,74	0,225
Uric Acid (mg/dl)	4,71±0,23	4,99±0,28	0,289	4,70±0,34	4,59±0,36	0,544
CRP(ng/ml)	2283,86±720,08	899,86±286,62	0,084	2338,92±405,70	872,88±164,29	0,002
Visfatin (ng/ml)	8,37±0,46	4,97±0,78	0,056	9,14±1,23	8,36±0,82	0,470
Leptin (ng/ml)	68,24±12,57	57,74±10,07	0,076	98,49±17,96	78,61±13,60	0,036
IL-6 (pg/ml)	1,87±0,85	1,45±0,39	0,136	1,26±0,17	0,80±0,10	0,031
oxLDL (U/L)	126,69±6,97	114,85±6,70	0,080	137,98±7,44	123,10±8,87	0,165
TNF-α (pg/ml)	1,298±0,161	0,877±0,130	0,066	0,63±0,13	1,17±0,23	0,080
Total Serum Oxidizability (sec)	5861,06±213,99	6136,24±251,82	0,153	5563,63±179,31	5798,44±220,83	0,405
Energy (Kcal)	2044,91±130,60	1735,03±122,19	0,097	1897,99±161,62	1752,82±154,20	0,390
Carbohydrates (g)	210,78±16,37	193,10±18,37	0,403	200,11±16,47	178,67±14,55	0,219
Sugars (g)	62,82±5,67	63,99±8,49	0,900	64,19±6,80	61,48±6,35	0,562
Fat, Total (g)	105,19±9,58	76,03±5,61	0,003	87,91±10,35	84,94±10,87	0,811
SFA (g)	30,09±3,75	21,69±2,08	0,020	31,49±3,22	21,52±2,79	0,008
PUFA (g)	15,56±1,77	12,60±1,63	0,197	12,24±2,26	13,23±2,12	0,696
MUFA (g)	47,69±4,84	33,22±3,59	0,001	36,06±5,64	42,60±6,61	0,366
Protein (g)	89,36±7,22	74,25±5,77	0,086	76,77±8,10	74,83±7,41	0,819
Insoluble Fibre (g)	2,23±0,72	1,08±0,31	0,158	0,59±0,20	0,67±0,32	0,594
Crude Fibre (g)	2,63±0,36	3,91±1,17	0,435	3,23±1,05	4,20±0,78	0,184

Σύγκριση διαφορών μεταξύ της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου κατά την ολοκλήρωση της μελέτης στους ασθενείς που έχασαν βάρος

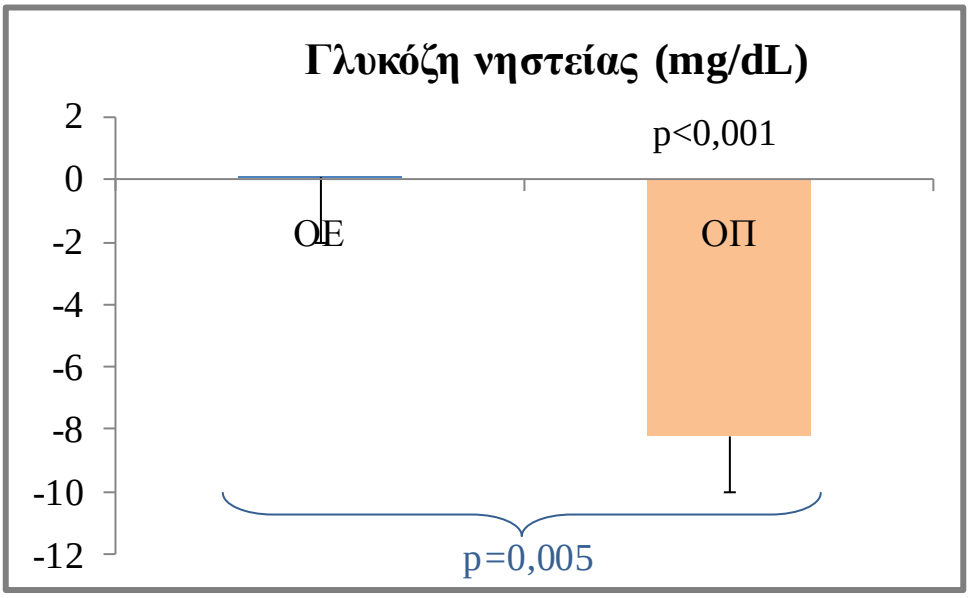
Οι ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη (n=44) διαχωρίστηκαν με το κριτήριο της απώλειας βάρους. Συγκεκριμένα, αυτοί που έχασαν βάρος (n=35) χαρακτηρίστηκαν ως "adherent" και σε αυτήν την υπό-ομάδα ασθενών διερευνήθηκε αν υπήρχαν διαφορές στο τέλος της παρέμβασης μεταξύ αυτών που στρατολογήθηκαν στην ομάδα παρέμβασης (n=18) και αυτών που στρατολογήθηκαν στην ομάδα ελέγχου (n=17). Οι "adherent" ασθενείς της ομάδας ελέγχου εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση της DBP έναντι αυτών στην ομάδα παρέμβασης (-6,50 *vs.* -1,25, *p=0,009*). Φάνηκε ότι οι ασθενείς που έχασαν βάρος και ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης μείωσαν κατά 8 μονάδες τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας σε αντίθεση με αυτούς στην ομάδα ελέγχου που δεν εμφάνισαν διαφορά (-8,22 *vs.* 0,00, *p=0,005*). Επιπλέον, οι ίδιοι ασθενείς παρουσίασαν πτώση στα επίπεδα της IL-6 κατά 4 μονάδες περίπου σε σχέση με τους ασθενείς που έχασαν βάρος στην ομάδα ελέγχου (-3,96 *vs.* -0,42, *p=0,035*). Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μεταβολές στις εξεταζόμενες παραμέτρους στο τέλος της μελέτης μεταξύ των δύο ομάδων στους ασθενείς που έχασαν βάρος.

Πίνακας 6 Διαφορές μεταξύ των ασθενών που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου στο τέλος της μελέτης.

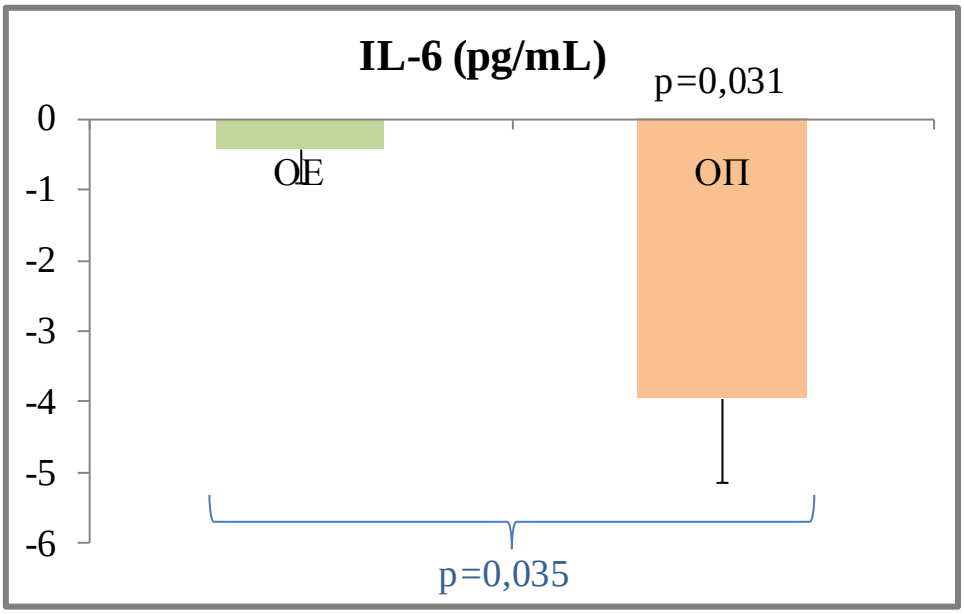
Variables	Group 0 ± SE (n=17)	Group 1 ± SE (n=18)	*p-Value*
Body weight (kg)	-3,91±0,68	-2,83±0,55	0,223
BMI (kg/m^2)	-1,40±0,23	-0,96±0,17	0,129
Fat (%)	-2,10±0,65	-1,41±0,48	0,395
Fat Trunk (%)	-2,09±0,80	-1,25±0,63	0,414
Waist Circumference (cm)	-2,89±1,23	-2,36±0,87	0,724
Hip Circumference (cm)	-2,18±0,61	-3,31±0,77	0,260
WHR	-0,01±0,01	0,00±0,01	0,528
SBP (mmHg)	-10,09±2,43	-4,03±2,30	0,079
DBP (mmHg)	-6,50±1,27	-1,25±1,39	0,009
HF (bpm)	-0,53±1,94	-1,94±1,49	0,564
MedDietScore	2,82±1,04	5,11±0,98	0,119
Ultrasound (Hz)	-0,18±0,07	-0,25±0,08	0,613
Elastography (kPa)	-0,64±0,31	-0,50±0,18	0,700
NAFLD Score	0,23±0,10	0,10±0,07	0,297
Glucose (mg/dl)	0,00±2,10	-8,22±1,75	0,005
Total Cholesterol (mg/dl)	7,06±6,67	1,11±2,97	0,424

HDL (mg/dl)	-4,22±1,86	-3,11±2,25	0,706
LDL (mg/dl)	15,82±5,52	7,76±5,42	0,305
TAG (mg/dl)	-7,53±9,89	-8,50±20,49	0,967
SGOT (U/L)	-2,29±1,65	-0,11±1,51	0,335
SGPT (U/L)	-5,29±3,67	-2,44±2,25	0,660
SGOT/SGPT	0,06±0,07	0,05±0,03	0,921
γGT (U/L)	4,00±9,21	2,72±2,86	0,660
ALP (U/L)	0,50±1,85	-2,47±1,44	0,893
TBIL (mg/dl)	0,03±0,05	0,00±0,03	0,609
DBIL (mg/dl)	0,03±0,02	0,01±0,01	0,202
Fe (μg/dl)	-4,00±9,65	-6,83±6,24	0,803
Fer (ng/dl)	2,08±4,58	-2,11±5,40	0,564
HbA1C (%)	-0,15±0,07	-0,22±0,05	0,325
Insulin (μIU/dl)	-0,51±1,24	0,89±1,62	0,519
Urea (mg/dl)	5,35±1,89	1,44±1,15	0,089
Uric Acid (mg/dl)	0,28±0,25	-0,11±0,18	0,225
CRP(ng/ml)	-1384,00±727,40	-1466,04±365,99	0,921
Visfatin (ng/ml)	-3,40±0,68	-0,78±1,06	0,060
Leptin (ng/ml)	-10,50±5,54	-19,88±8,71	0,370
IL-6 (pg/ml)	-0,42±0,49	-3,96±1,18	0,035
oxLDL (U/L)	-11,84±6,34	-14,89±10,25	0,805
TNF-α (pg/ml)	-0,42±0,17	0,54±0,23	0,060
Total Serum Oxidizability (sec)	275,18±183,42	234,81±274,05	0,902
Energy (Kcal)	-309,88±175,79	-145,18±164,74	0,499
Carbohydrates (g)	-17,68±20,60	-21,44±16,82	0,888
Sugars (g)	1,17±9,16	-2,71±4,58	0,702
Fat, Total (g)	-29,16±8,23	-2,97±12,20	0,088
SFA (g)	-8,40±3,26	-9,97±3,30	0,737
PUFA (g)	-2,96±2,20	0,99±2,49	0,245
MUFA (g)	-14,48±3,73	6,54±7,04	0,014
Protein (g)	-15,10±8,25	-1,94±8,37	0,271
Insoluble Fibre (g)	-1,15±0,66	0,08±0,31	0,108
Crude Fibre (g)	1,28±1,08	0,98±1,30	0,859

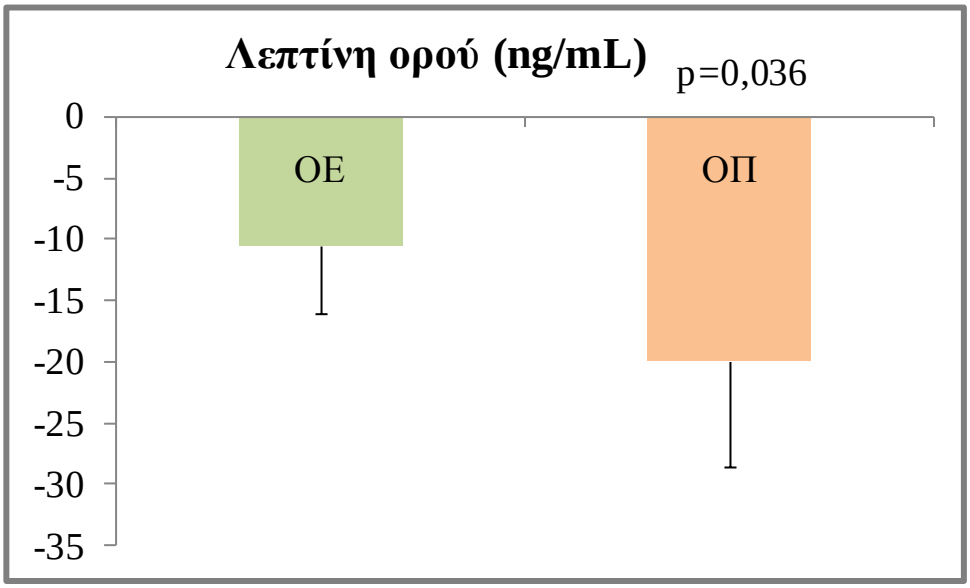
Γράφημα 6 Μεταβολή των επιπέδων της γλυκόζης νηστείας στους ασθενείς που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου και σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της μελέτης.



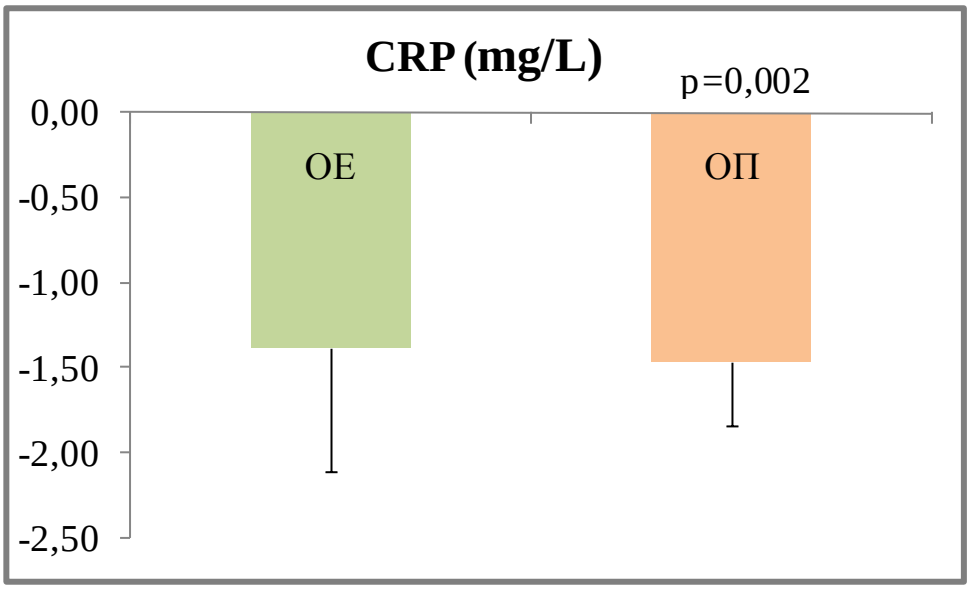
Γράφημα 7 Μεταβολή των επιπέδων της IL-6 στους ασθενείς που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου και σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της μελέτης.



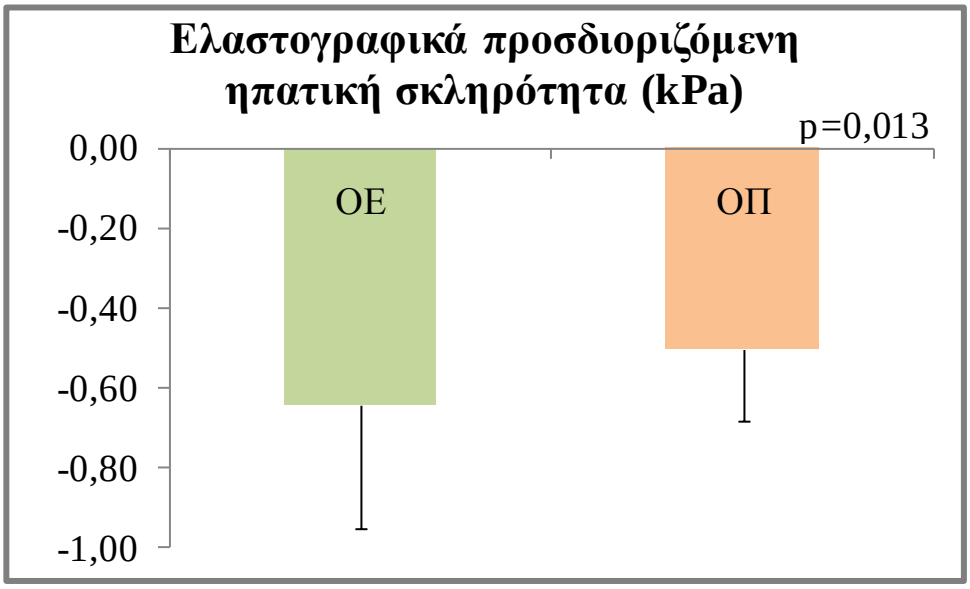
Γράφημα 8 Μεταβολή των επιπέδων της λεπτίνης στους ασθενείς που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου στο τέλος της μελέτης.



Γράφημα 9 Μεταβολή των επιπέδων της CRP στους ασθενείς που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου στο τέλος της μελέτης.



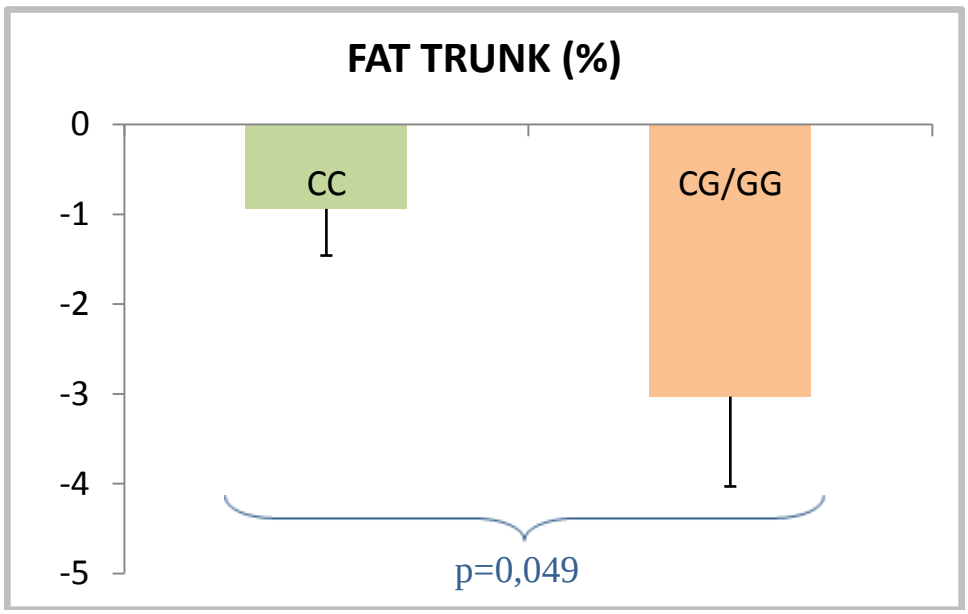
Γράφημα 10 Μεταβολή των τιμών της ελαστογραφικά προσδιοριζόμενης ηπατικής σκληρότητας στους ασθενείς που έχασαν βάρος στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου στο τέλος της μελέτης.



Διαφορές στην απόκριση μεταξύ των ασθενών που έχασαν βάρος με τουλάχιστον ένα ή κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό PNPLA3 στο τέλος της μελέτης

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ασθενών που έχασαν βάρος και δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου (CC) (Group 1, n=23) για τον πολυμορφισμό PNPLA3 και αυτών που διέθεταν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου (CG, GG) (Group 2, n=12). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό PNPLA3 εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση του σπλαχνικού λίπους σε σχέση με τους συμμετέχοντες που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό (-3,03 *vs.* -0,94, *p=0,049*) μετά τη διατροφική παρέμβαση. Επίσης, το ολικό σωματικό λίπος έτεινε να μειωθεί περισσότερο στους ετεροζυγώτες/ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό ασθενείς με NAFLD που έχασαν βάρος σε σχέση με τους υπόλοιπους (-2,80 *vs.* -1,20), παρότι η μεταβολή δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα (*p=0,054*).

Γράφημα 11 Διαφορά στη μεταβολή του ποσοστού του σπλαχνικού λίπους στους ασθενείς που έχασαν βάρος μεταξύ της ομάδας που διέθετε τον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 και της ομάδας που δεν τον διέθετε στο τέλος της μελέτης.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Κορινθιακή σταφίδα (*Vitis vinifera* L.) αποτελεί το αποξηραμένο στον ήλιο ομόλογο του προϊόντος της αμπέλου, που καλλιεργείται και παράγεται, σχεδόν αποκλειστικά, στη νότια Ελλάδα αποτελώντας σημαντικό κομμάτι της διατροφής επί σειρά αιώνων. Στις μέρες μας, η παραγωγή της αντιστοιχεί περίπου στο 3-5% της παγκόσμιας παραγωγής. Η σταφίδα είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, σύνθετους υδατάνθρακες, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες απαραίτητες για τη ζωή, ενώ δεν περιέχει καθόλου λίπος ή χοληστερόλη. Επιπλέον, περιέχει τις φλαβονόλες κερκετίνη και καμπφερόλη και τα φαινολικά οξέα καφταρικό και κουταρικό[295]. Συγκεκριμένα, η Κορινθιακή σταφίδα περιέχει κυρίως βανιλικό οξύ, καθώς επίσης και καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγκικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, πρωτοκατεχουικό οξύ, φερουλικό οξύ και κερκετίνη[296], ενώ έχει χαρακτηριστεί ως μέτριου γλυκαιμικού δείκτη τρόφιμο (GI: 66,3±3,4)[297]. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται ότι η πρόσληψή τους σχετίζεται αντιστρόφως με την επίπτωση πολλών εκφυλιστικών νοσημάτων, και κυρίως η πρόσληψη αυτών που βρίσκονται στα φρούτα και στα λαχανικά, εξαιτίας των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους[298].

Η επίδραση της κατανάλωσης σταφίδας, όσο και άλλων αποξηραμένων φρούτων, στο σωματικό βάρος μελετήθηκε σε μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων που συμμετείχαν 13292 ενήλικες. Φάνηκε ότι αυτοί που κατανάλωναν περισσότερο από 20g αποξηραμένου φρούτου καθημερινά είχαν υψηλότερη ενεργειακή πρόσληψη, σε σύγκριση με αυτούς που δεν κατανάλωναν, αλλά εμφάνιζαν χαμηλότερο σωματικό βάρος, BMI και περιφέρεια μέσης[299]. Στην παρούσα μελέτη διάρκειας 24 εβδομάδων, οι ασθενείς με NAFLD που εντάχθηκαν είτε στην ομάδα που λάμβανε σταφίδα είτε στην ομάδα ελέγχου, φάνηκε ότι μείωσαν εξίσου το σωματικό τους βάρος, το BMI και την περιφέρεια ισχίων στο τέλος της παρέμβασης. Προφανώς, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι επρόκειτο για μια ελεγχόμενη κλινική δοκιμή κατά την οποία όλοι οι ασθενείς υπόκεινταν σε διατροφική συμβουλευτική και έλαβαν ισοθερμιδικά διαιτολόγια στα πλαίσια της Μεσογειακής διατροφής, που η μόνη τους διαφορά ήταν η καθημερινή λήψη 36g Κορινθιακής σταφίδας (2 ισοδύναμα φρούτου) προς αντικατάσταση άλλου σνακ όμοιας διατροφικής αξίας στην ομάδα παρέμβασης. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με το ότι και οι δύο ομάδες βελτίωσαν σημαντικά τα επίπεδα της Hb_{A1C}, της CRP και τις τιμές του ελαστογραφικού ελέγχου, καθώς επίσης και το ότι αύξησαν σημαντικά την προσκόλληση τους στη Μεσογειακή διατροφή (MedDietScore) αποδεικνύουν ότι η διατροφική θεραπεία λειτούργησε αποτελεσματικά για όλους τους συμμετέχοντες. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς που λάμβαναν σταφίδα αύξησαν σε μεγαλύτερο βαθμό το MedDietScore και φάνηκε ότι μείωσαν σημαντικά την πρόσληψη SFAs, ενώ η συνολική πρόσληψη σακχάρων δε μεταβλήθηκε. Αυτό σημαίνει ότι αυτοί στους οποίους η

σταφίδα ενσωματώθηκε στη διατροφή τους δεν την κατανάλωναν επιπρόσθετα, αλλά συμμορφούμενοι με τις διατροφικές συστάσεις που τους δόθηκαν, αντικατέστησαν με αυτή ένα σνακ ίδιας διατροφικής αξίας. Επιπλέον, οι ασθενείς που ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης μείωσαν σημαντικά τόσο το ολικό όσο και το σπλαχνικό λίπος, την περιφέρεια μέσης, καθώς επίσης και τις τιμές του υπερηχογραφικού ελέγχου, αλλά και αυτές της γλυκόζης νηστείας. Έχει δειχθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις και τα τρόφιμα πλούσια σε αυτές, όπως είναι η Κορινθιακή σταφίδα, εκδηλώνουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και επηρεάζουν την πρόσληψη γλυκόζης στο έντερο[300], καθώς επίσης και ότι η κατανάλωση σταφίδας προάγει τον κορεσμό επηρεάζοντας τα επίπεδα ορμονών που ρυθμίζουν την όρεξη[301]. Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς την απώλεια βάρους μεταξύ των δύο ομάδων και την ενεργειακή πρόσληψη και, ως εκ τούτου, αυτές οι διαφορές δεν είναι ξεκάθαρο αν μπορούν να αποδοθούν στην κατανάλωση της σταφίδας.

Η μεταγευματική επίδραση της χορήγησης σταφίδας έχει μελετηθεί σε υγιή άτομα ως προς την αντίσταση στην οξείδωση του ορού που αυτή μπορεί να προκαλέσει, καθώς επίσης και για να ποσοτικοποιηθούν οι φαινολικές ενώσεις που είναι βιοδιαθέσιμες[302]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανάλωση σταφίδας επηρεάζει το αντιοξειδωτικό δυναμικό *in vivo* και ότι οι φυτοχημικές της ενώσεις βιοδιατίθενται. Στην παρούσα μελέτη, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την κατανάλωση ή μη σταφίδας στους ασθενείς με NAFLD μετά από τις 24 εβδομάδες.

Σε άλλη μελέτη των Kanellos *et al.,* που δόθηκε η ίδια ποσότητα σταφίδας για 24 εβδομάδες σε ασθενείς με T2DM, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο σωματικό βάρος ούτε στην ομάδα παρέμβασης ούτε στην ομάδα ελέγχου, αλλά οι ασθενείς που λάμβαναν σταφίδα μείωσαν σημαντικά την DBP στο τέλος της μελέτης[303]. Στην παρούσα μελέτη οι ασθενείς με NAFLD που λάμβαναν σταφίδα δεν παρουσίασαν βελτίωση στα επίπεδα της DBP. Οι ασθενείς στην ομάδα ελέγχου μείωσαν σημαντικά τη DBP και τη SBP, καθώς επίσης και την HDL, την LDL, το NAFLD score, και την ολική κατανάλωση λίπους, ως αποτέλεσμα της επιτυχημένης διατροφικής συμβουλευτικής. Οι διαφορές αυτές παρέμειναν σημαντικές ακόμα και μετά την κατηγοριοποίηση των συμμτεχόντων σε αυτούς που έχασαν βάρος. Τότε, μάλιστα, καταγράφηκε και η στατιστικά σημαντική μείωση του σπλαχνικού λίπους.

Στη μελέτη των Kanellos *et al.* δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στη συγκέντρωση της CRP. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση αυτής της προφλεγμονώδους κυτοκίνης μειώθηκε σημαντικά και στις δύο ομάδες μετά την ολοκλήρωση της παρέμβασης. Ωστόσο, αυτή η διαφορά παρέμεινε στατιστικά σημαντική, μετά την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε αυτούς που έχασαν βάρος, μόνο στην ομάδα παρέμβασης.

Παράλληλα, πολύ σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι οι NAFLD ασθενείς που λάμβαναν σταφίδα μείωσαν σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6. Μάλιστα, αυτή η μείωση παρέμεινε στατιστικά σημαντική μεταξύ της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου ακόμα και όταν στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο οι ασθενείς που έχασαν βάρος. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς αυτούς, στατιστικά σημαντική μείωση εμφάνισαν και τα επίπεδα της, επίσης προφλεγμονώδους αδιποκίνης, λεπτίνης στην ομάδα παρέμβασης.

Η IL-6 εκφράζεται σε πολλά φλεγμονώδη κύτταρα και ρυθμίζει μεταξύ άλλων την IR και τη φλεγμονή. Παρόλο που, η CRP αποτελεί μη ειδικό δείκτη φλεγμονής, το εύρημα ότι μετά από την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε αυτούς που έχασαν βάρος, αυτοί που ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης είχαν μειωμένα επίπεδα λεπτίνης και IL-6 υποδεικνύει ότι η φλεγμονή πράγματι βελτιώθηκε σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπλέον, η IL-6 αποτελεί τον κύριο παράγοντα διέγερσης για την ηπατική σύνθεση και έκκριση της CRP στους ανθρώπους[123] και γι' αυτό το λόγο έχει προταθεί ως ένας δυνητικός μεσολαβητής που οδηγεί σε NAFLD. Επειδή και οι δύο ομάδες έχασαν βάρος και βελτίωσαν εξίσου ορισμένους ανθρωπομετρικούς δείκτες, η μείωση των επιπέδων αυτών των δεικτών φλεγμονής αποδίδεται στην πρόσληψη των αντιοξειδωτικών φαινολικών συστατικών της σταφίδας.

Επιπλέον, η ηπατική έκφραση της IL-6 έχει συσχετιστεί θετικά με τη σοβαρότητα της φλεγμονής και της ίνωσης, ενώ τα επίπεδα της IL-6 του πλάσματος έχουν δείξει υψηλού βαθμού συσχέτιση με την ηπατική έκφραση αυτής[125]. Στην παρούσα μελέτη αυτό επιβεβαιώνεται από το εύρημα ότι μετά από την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε αυτούς που έχασαν βάρος, οι τιμές του ελαστογραφικού ελέγχου παρέμειναν σημαντικά μειωμένες στην ομάδα που έπαιρνε σταφίδα.

Η μελέτη των εκχυλισμάτων μεθανόλης από σταφίδα έχει δείξει ότι αυτή εκδηλώνει αντιοξειδωτική δράση, η οποία σχετίζεται με το περιεχόμενό της σε φαινολικά συστατικά, και μεταξύ άλλων αναστέλλει την οξείδωση της LDL[304]. Επιπλέον, τα μεθανολικά εκχυλίσματα της σταφίδας παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου του στομάχου, περιορίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο και καταστέλλοντας τα επίπεδα του ICAM-1 σε κυτταρική σειρά στομάχου[305], αλλά και έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου[306]. Αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες αποδίδονται στο υψηλό περιεχόμενο της σταφίδας σε φαινολικές ενώσεις. Παρά το γεγονός ότι στο παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο υπήρξε βελτίωση σε δείκτες φλεγμονής, δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της oxLDL ή αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού.

Οι συμμετέχοντες που ήταν ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό rs738409 του PNPLA3 φάνηκε να ανταποκρίνονται καλύτερα στη διατροφική συμβουλευτική ως προς τη μείωση του ολικού σωματικού λίπους, των επιπέδων της διαστολικής αρτηριακής πίεσης και της συγκέντρωσης της ινσουλίνης, σε σχέση με τους συμμετέχοντες που δε διέθεταν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό. Επιπρόσθετα, μεταξύ των ασθενών που έχασαν βάρος, παρατηρήθηκε ότι για αυτούς που διέθεταν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό η αποτελεσματικότερη απόκριση στις διατροφικές συστάσεις απεικονίστηκε μέσω της σημαντικής μείωσης του σπλαχνικού λίπους. Η αδιπονουτρίνη, που εκφράζεται από το PNPLA3, εκδηλώνει τόσο δράση υδρολάσης των TAGs, ευνοώντας τη λιπόλυση, όσο και δράση ακύλο-τρανσφεράσης του λυσοφωσφατιδικού οξέος οδηγώντας σε αυξημένη κυτταρική συσσώρευση λιπιδίων[307]. Οι Kumari *et al.* αναφέρουν ότι ο προαναφερθείς πολυμορφισμός επάγει την ηπατική σύνθεση λιπιδίων, καθώς η δράση της αδιπονουτρίνης ως ακυλοτρανσφεράσης του λυσοφωσφατιδικού οξέος ενισχύεται[307], ενώ έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι ο εν λόγω πολυμορφισμός στερεί από την αδιπονουτρίνη τη λιπολυτική δράση και έτσι επάγεται η συσσώρευση των ενδοηπατικών λιπιδίων[308]. Σε κάθε περίπτωση, η παρούσα μελέτη υποδεικνύει, αν και σε μικρό δείγμα, ότι οι ασθενείς με NAFLD που διαθέτουν αυτόν τον πολυμορφισμό μπορούν να ωφεληθούν από μία ισορροπημένη διατροφή για να μειώσουν δείκτες που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου.

Συμπερασματικά, οι ασθενείς με NAFLD μπορούν να επωφεληθούν από την υιοθέτηση μιας υγιεινής διατροφής στα πλαίσια του Μεσογειακού προτύπου και παράλληλα η Κορινθιακή σταφίδα ως σνακ στην καθημερινή διατροφή τους αποτελεί μια ασφαλή επιλογή η οποία μπορεί να βελτιώσει, πιθανά, τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών και το βαθμό της ίνωσης μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης των περιεχόμενων σε αυτή φαινολικών συστατικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ludwig J., Viggiano T.R., McGill D.B., Ott B.J., Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clin Proc. 1980;55:434-438.
2. Raman M., Allard J., Nonalcoholic fatty liver disease: A clinical approach and review. Can J Gastroenterol. 2006;20(5):345-349.
3. Neuschwander-Tetri B.A., Caldwell S.H., Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. Hepatology. 2003;37(5):1202-1219.
4. Ratziu V., Bellentani S., Cortez-Pinto H., Day C., Marchesini G., A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. Journal of Hepatology. 2010;53:372–384.
5. Kleiner D.E., Brunt E.M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. Semin Liver Dis. 2012;32:3-13.
6. Takahashi Y., Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. World J Gastroenterol. 2014;20(42):15539-48.
7. Marchesini G., Bugianesi E., Forlani G., Cerrelli F., Lenzi M., Manini R., Natale S., Vanni E., Villanova N., Melchionda N., Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology. 2003;37:917-23.
8. Adams L.A., Angulo P., Lindor K.D., Nonalcoholic fatty liver disease. JAMC. 2005;172(7):899-905.
9. Mezey E. Dietary fat and alcoholic liver disease. Hepatology. 1998;28:901-5.
10. Lee J.H., Rhee P.L., Lee J.K., et al. Role of hyperinsulinemia and glucose intolerance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver in patients with normal body weight. Korean J Intern Med. 1998;13:12-4.
11. Caldwell S.H., Oelsner D.H., Iezzoni J.C., Hespenheide E.E., Battle E.H., Driscoll C.J. Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. Hepatology. 1999;29:664-9.
12. Gutierrez-Grobe Y., Ponciano-Rodríguez G., Ramos M.H., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. Ann Hepatol. 2010;9:402-9.
13. Vuppalanchi R., Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their management. Hepatology. 2009;49:306-17.
14. Kallwitz E.R., Kumar M., Aggarwal R., Berger R., Layden-Almer J., Gupta N., Cotler S.J. Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease in an obesity clinic: the impact of triglycerides. Dig Dis Sci. 2008;53:1358-63.
15. Wagenknecht L.E., Scherzinger A.L., Stamm E.R., Hanley A.J., Norris J.M., Chen Y.D., Bryer-Ash M., Haffner S.M., Rotter J.I. Correlates and heritability of nonalcoholic fatty liver disease in a minority cohort. Obesity (Silver Spring). 2009;17:1240-6.
16. Hamabe A., Uto H., Imamura Y., Kusano K., Mawatari S., Kumagai K., Kure T., Tamai T., Moriuchi A., Sakiyama T., Oketani M., Ido A., Tsubouchi H. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. J Gastroenterol. 2011;46:769-78.
17. Liu Y., Dai M., Bi Y., Xu M., Xu Y., Li M., Wang T., Huang F., Xu B., Zhang J., Li X., Wang W., Ning G. Active smoking, passive smoking, and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population-based study in China. J Epidemiol. 2013;23:115-21.
18. Zein C.O., Unalp A., Colvin R., Liu Y., McCullough A.J. Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. J Hepatol. 2011;54:753-9.
19. Younossi Z.M., Stepanova M., Afendy M., Fang Y., Younossi Y., Mir H., Srishord M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9:524-30.
20. Bellantani S., Saccoccio G., Masutti F., Croce L.S., Brandi G., Sasso F., Cristianini G., Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. Ann Intern Med. 2000;132:112-7.
21. Gupte P., Amarapurkar D., Agal S. Baijal R., Kulshrestha P., Pramanik S., Patel N., Madan A., Amarapurkar A., Hafeezunnisa. Nonalcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. J Gastroenterol Hepatol. 2004;19:854-8.
22. Matteoni C.A., Younossi Z.M., Gramlich T., Boparai N., Liu Y.C., McCullough A.J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology. 1999;116:1413-9.
23. Ekstedt M., Franzen L.E., Mathiesen U.L., Thorelius L., Holmqvist M., Bodemar G., Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Hepatology. 2006;44:865-73.
24. Powell E.E., Jonsson J.R., Clouston A.D. Steatosis: co-factor in other liver diseases. Hepatology. 2005;42:5-13.
25. Adams L., Lymp J., St Sauver J., Sanderson S.O., Lindor K.D., Feldstein A., Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. Gastroenterology. 2005;129:113-21.
26. Krawczyk K., Szczesniak P., Kumor A., Jasinska A., Omulecka A., Pietruczuk M., Orszulak-Michalak D., Sporny S., Malecka-Panas E. Adipohormones as prognostic markers in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). J Physiol Pharmacol. 2009;60(3):71-5.

27. Yatsuji S., Hashimoto E., Tobari M., Taniai M., Tokushige K., Shiratori K. Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24:248-54.
28. Caldwell S.H., Crespo D.M. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol. 2004;40:578-84.
29. Browning J.D., Kumar K.S., Saborian M.H., Thiele D.L. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. Am J Gastroenterol. 2004;99:292-8.
30. Vernon G., Baranova A., Younossi Z.M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis in adults. Aliment Pharmacol Ther. 2011;34:274-85.
31. Gambino G.R., Cassader M., Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. Annals of Medicine. 2011;43(8):617-49.
32. Musso G., Gambino R., Cassader M., Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. Ann Med. 2011;43:617-49.
33. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 2002;346:1221-31.
34. Söderberg C., Stål P., Askling J., Glaumann H., Lindberg G., Marmur J., Hultcrantz R. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. Hepatology. 2010;51:595-602.
35. Targher G., Bertolini L., Poli F., Rodella S., Scala L., Tessari R., Zenari L., Falezza G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. Diabetes. 2005;54:3541-6.
36. Yu J., Shen J., Sun T.T., Zhang X., Wong N. Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. Seminars in Cancer Biology. 2013;23P:483-91.
37. Patton H.M., Sirlin C., Behling C., Middleton M., Schwimmer J.B., Lavine J.E., Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a critical appraisal of current data and implications for future research. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006;43:413-27.
38. Papandreou D., Rousso I., Mavromichalis I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. Clin Nutr. 2007;26:409-15.
39. Schwimmer J.B., Deutsch R., Kahen T., Lavine J.E., Stanley C., Behling C. Prevallence of fatty liver in children and adolescents. Pediatrics. 2006;118:1388-93.
40. Younossi Z.M., Baranova A., Ziegler K., Del Giacco L., Schlauch K., Born T.L., Elariny H., Gorreta F., VanMeter A., Younoszai A., Ong J.P., Goodman Z., Chandhoke V. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2005;42:665-74.
41. Manti S., Romano C., Chirico V., Filippelli M., Cuppari C., Loddo I., Salpietro C., Arrigo T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Non-Alcoholic Steatohepatitis in Childhood: Endocrine-Metabolic "Mal-Programming". Hepat Mon. 2014;14(5):e17641.
42. Alisi A., Manco M., Panera N., Nobili V. Association between type two diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in youth. Ann Hepatol. 2009;8(1):44-50.
43. Huang S.C., Yang Y.J. Serum retinol-binding protein 4 is independently associated with pediatric NAFLD and fasting triglyceride level. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013;56:145-50.
44. Wiegand S., Keller K.M., Röbl M., L' Allemand D., Reinehr T., Widhalm K., Holl R.W. Obese boys at increased risk for non-alcoholic fatty liver disease: evaluation of 16390 overweight or obese children and adolescents. Int J Obes (Lond). 2010;34:1468-74.
45. Fassio E., Alvarez E., Dominguez N., Landeira G., Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. Hepatology. 2004;40:820-6.
46. Adams L.A., Sanderson S., Lindor K.D., Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. J Hepatol. 2005;42:132-8.
47. Younossi Z.M., Gramlich T., Matteoni C.A., Boparai N., McCullough A.J. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. Clin Gastroenterol Hepatol. 2004;2:262-5.
48. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., Diehl A.M., Brunt E.M., Cusi K., Charlton M., Sanyal A.J. The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology. 2012;55(6):2005-23.
49. Kowdley K.V. The role of iron in nonalcoholic liver disease: the story continues. Gastroenterology. 2010;138:817-19.
50. Bacon B.R., Adams P.C., Kowdley K.V., Powell P.W., Tavill A.S. Diagnosis and management of hemochhromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Sttudy of Liver Diseases. Hepatology. 2011;54:328-43.
51. Vuppalanchi R., Gould R.J., Wilson L.A., Unalp-Arida A., Cummings O.W., Chalasani N., Kowdley K.V. Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. Hepatol Int. 2012;1-12.

52. Bacon B.R., Farahvash M.J., Janney C.G., Neuschwander-Tetri B.A. Nonalcoholic steatohepatitis: An expanded clinical entity. Gastroenterology. 1994;107:1103-9.
53. Verma S., Jensen D., Hart J., Mohanty S.R. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Liver Int. 2013;33:1398-1405.
54. Poynard T., Ratziu V., Naveau S., Thabut D., Charlotte F., Messous D., Capron D., Abella A., Massard J., Ngo Y., Munteanu M., Mercadier A. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. Comparative Hepatology. 2005;4:10
55. Festi D., Schiumerini R., Marzi L., Di Biase A.R., Mandolesi D., Montrone L., Scaioli E., Bonato G., Marchesini-Reggiani G., Colecchia A. Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease – availability and accuracy of non-invasive methods. Aliment Pharmacol Ther. 2013;37:392-400.
56. Bedogni G., Bellentani S., Miglioli L., Masutti F., Passalacqua M., Castiglione A., Tiribelli C. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. BMC Gastroenterology. 2006;6:33.
57. Wieckowska A., Zein N.N., Yerian L.M., Lopez A.R., McCullough A.J., Feldstein A.E. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2006;44:27-33.
58. Angulo P., Hui J.M., Marchesini G., Bugianesi E., George J., Farrell G.C., Enders F., Saksena S., Burt D.A., Bida P.J., Lindor K., Sanderson O.S., Lenzi M., Adams A.L., Kench J., Therneau M.T., Day P.C. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. Hepatology. 2007;45:846-54.
59. Treeprasertsuk S., Björnsson E., Enders F., Suwanwalaikorn S., Lindor K.D. NAFLD fibrosis score: A prognostic predictor for mortality and liver complications among NAFLD patients. World J Gastroenterol. 2013;19(8):1219-29.
60. Joy D., Thava V.R., Scott B.B. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003;15:539-43.
61. Mottin C.C., Moretto M., Padoin A.V., Swarowsky A.M., Toneto M.G., Glock L., Repetto G. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. Obes Surg. 2004;14:635-7.
62. Saadeh S., Younossi Z.M., Remer E.M., Gramlich T., Ong J.P., Hurley M., Mullen K.D., Cooper J.N., Sheridan M.J. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology. 2002;123:745-50.
63. Angulo P., Keach J.C., Batts K.P., Lindor K.D. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 1999;30:1356-62.
64. Brunt E.M., Janney C.J., Di Bisceglie A.M., Neuschwander-Tetri B.A., Bacon B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histology lesions. Am J Gastroenterol. 1999;94:2467-74.
65. Takaki A., Kawai D., Yamamoto K. Molecular Mechanisms and New Treatment Strategies for Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). Int J Mol Sci. 2014;15:7352-79.
66. Kleiner D.E, Brunt E.M., Van Natta M., Behling C., Contos M.J., Cummings O.W., Ferrell L.D., Liu Y.C., Torbenson M.S., Unalp-Arida A., Yeh M., McCullough A.J., Sanyal A.J. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2005;41:1313-21.
67. Leite N.C., Salles G.F., Cardoso C.R.L., Villela-Nogueira C.A. Serum biomarkers in type 2 diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. Hepatology Research. 2013;43:508-15.
68. Chwist A., Hartleb M., Lekstan A., Kukla M., Gutkowski K., Kajor M. A composite model including visfatin, tissue polypeptide-specific antigen, hyaluronic acid, and hematological variables for the diagnosis of moderate-to-severe fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: a preliminary study. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej. 2014;124(12):704-12.
69. Yu C., Xu C., Xu L., Yu J., Miao M., Li Y. Serum proteomic analysis revealed diagnostic value of hemoglobin for nonalcoholic fatty liver disease. Journal of Hepatology. 2012;56:241-7.
70. Whieckowska A., McCullough A.J., Feldstein A.E. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. Hepatology. 2007;46:582-9.
71. Koppe S.W.P. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. Translational Research. 2014;164(4):312-22. [http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.06.008]
72. Gentile C.L., Pagliassotti M.J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. J Nutr Biochem. 2008;19:567–76.
73. Musso G., Gambino R., Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Prog Lipid Res. 2009;48(1):1-26.
74. Petta S., Muratore C., Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. Dig Liver Dis. 2009;41(9):615-25.
75. Utzschneider K.M., Kahn S.E. Review: the role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(12):4753-61.
76. Hotamisligil G.S. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006;444(7121):860-7.

77. Savage D.B., Semple R.K. Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. Curr Opin Lipidol. 2010;21(4):329-36.
78. Postic C., Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. J Clin Invest. 2008;118(3):829-38.
79. Lewis G.F., Carpentier A., Adeli K., Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr Rev. 2002;23(2):201-29.
80. Tilg H., Moschen A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. Hepatology. 2010;52(5):1836-46.
81. Koliwad S.K., Streeper R.S., Monetti M., Cornelissen I., Chan L., Terayama K., Naylor S., Rao M., Hubbard B., Farese R.V. JR. DGAT1-dependent triacylglycerols storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. J Clin Invest. 2010;120(3):756-67.
82. Yamaguchi K., Yang L., McCall S., Huang J., Yu X.X., Pandey S.K., Bhanot S., Monia B.P., Li Y.X., Diehl A.M. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2007;45(6):1366-74.
83. Amaro A., Fabbrini E., Kars M., Yue P., Schechtman K., Schonfeld G., Klein S. Dissociation between intrahepatic triglyceride content and insulin resistance in familial hypobetalipoproteinemia. Gastroenterology. 2010;139(1):149-53.
84. Feldstein A.E., Werneburg N.W., Canbay A., Gicciardi M.E., Bronk S.F., Rydzewski R., Burgart L.J., Gores G.J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology. 2004;40(1):185-94.
85. Marí M., Caballero F., Colell A., Morales A., Caballeria J., Fernandez A., Enrich C., Fernandez-Checa J.C., Garcia-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizers to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. Cell Metab. 2006;4(3):185-98.
86. Cheung O., Sanyal A.J. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis. 2008;28(4):351-9.
87. Malhi H., Gores G.J. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis. 2008;28(4):360-9.
88. Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2005;19(4):471-82.
89. Delarue J., Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007;10(2):142-8.
90. Martin G., Nemoto M., Gelman L., Geffroy S., Najib J., Fruchart J.C., Roevens P., de Martinville B., Deeb S., Auwerx J. The human fatty acid transport protein-1 (SLC27A1; FATP-1) cDNA and gene: organization, chromosomal localization, and expression. Genomics. 2000;66(3):296-304.
91. Ge F., Zhou S., Hu C., Lobdell H., Berk P.D. Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not ob/ob or db/db mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299(4):855-66.
92. Zhou S.L., Stump D., Sorrentino D., Potter B.J., Berk P.D. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. J Biol Chem. 1992;267(20):14456-61.
93. Zhou S.L., Stump D., Kiang C.L., Isola L.M., Berk P.D. Mitochondrial aspartate aminotransferase expressed on the surface of 3T3-L1 adipocytes mediates saturable fatty acid uptake. Proc Soc Exp Biol Med. 1995;208(3):263-70.
94. Trigatti B.L., Anderson R.G., Gerber G.E. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 1999;255(1):34-9.
95. Fabbrini E., Sullivan S., Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology. 2010;51(2):679-89.
96. Bechmann L.P., Hannivoort R.A., Gerken G., Hotamisligil G.S., Trauner M., Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. J Hepatol. 2012;56(4):952-64.
97. Kawano Y., Cohen D.E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol. 2013;48(4):434-41.
98. Fuchs M. Non-alcoholic fatty liver disease: the bile acid-activated farnesoid x receptor as an emerging treatment target. J Lipids. 2012;2012:934396.
99. Berlanga A., Guiu-Jurado E., Porras J.A., Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. Clinical and Experimental Gatsroenterology. 2014;7:221-39.
100. Ferré P., Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. Diabetes Obes Metab. 2010;12(2):83-92.
101. Mitsuyoshi H., Yasui K., Harano Y., Endo M., Tsuji K., Minami M., Itoh Y., Okanoue T., Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2009;39(4):366-73.

102. Kohjima M., Higuchi N., Kato M., Kotoh K., Yoshimoto T., Fujino T., Yada M., Yada R., Harada N., Enjoji M., Takayanagi R., Nakamuta M. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Med. 2008;21(4):507-11.
103. Tilg H., Moschen A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. Mol Med. 2008;14(3-4):222-31.
104. Tilg H. Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease; key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis. Curr Pharm Des. 2010;16(17):1893-5.
105. Maeda N., Takahashi M., Funahashi T., Kihara S., Nishizawa H., Kishida K., Nagaretani H., Matsuda M., Komuro R., Ouchi N., Kuriyama H., Hotta K., Nakamura T., Shimomura I., Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes. 2001;50(9):2094-9.
106. Lutchman G., Modi A., Kleiner D.E., Promrat K., Heller T., Ghany M., Borg B., Loomba R., Liang T.J., Premkumar A., Hoofnagle J.H. The effect of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2007;46(2):424-9.
107. Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., Tilg H. AAdiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;323(2):630-5.
108. Tilg H., Moschen A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue,, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):772-83.
109. Xu A., Wang Y., Keshaw H., Xu L.Y., Lam K.S., Cooper G.J. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J Clin Invest. 2003;112(1):91-100.
110. Hui J.M., Hodge A., Farrell G.C., Kench J.G., Kriketos A., George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? Hepatology. 2004;40(1):46-54.
111. Baranova A., Gowder S.J., Schlauch K., Elariny H., Collantes R., Afendy A., Ong J.P., Goodman Z., Chandhoke V., Younossi Z.M. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. Obes Surg. 2006;16(9):1118-25.
112. Kaser S., Moschen A., Cayon A., Kaser A., Crespo J., Pons-Romero F., Ebenbichler C.F., Patsch J.R., Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. Gut. 2005;54(1):117-21.
113. Moschen A.R., Molnar C., Wolf A.M., Weiss H., Graziadei I., Kaser S., Ebenbichler C.F., Stadlmann S., Moser P.L., Tilg H. Effects of weight loss induced by bariatric surgery on hepatic adipocytokine expression. J Hepatol. 2009;51(4):765-77.
114. Marra F., Bertolani C. Adipokines in liver diseases. Hepatology. 2009;50(3):957-69.
115. Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.
116. Kern P.A., Saghizadeh M., Ong J.M., Bosch R.J., Deem R., Simsolo R.B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. J Clin Invest. 1995;95(5):2111-9.
117. Moschen A.R., Molnar C., Geiger S., Graziadei I., Ebenbichler C.F, Weiss H., Kaser S., Kaser A., Tilg H. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha expression. Gut. 2010;59(9):1259-64.
118. Lang C.H., Dobrescu C., Bagby G.J. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. Endocrinology. 1992;130(1):43-52.
119. Crespo J., Cayón A., Fernández-Gil P., Hernandez-Guerra M., Mayorga M., Dominquez-Diez A., Fernandez-Escalante J.C., Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. Hepatology. 2001;34(6):1158-63.
120. Lesmana C.R.A., Hasan I., Budihusodo U., Gani R.A., Krisnuhoni E., Akbar N., Lesmana L.A. Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. J Dig Dis. 2009;10(3):201-6.
121. Valenti L., Fracanzani A.L., Dongiovanni P., Santorelli G., Branchi A., Taioli E., Fiorelli G., Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology. 2002;122(2):274-80.
122. Zhou Y.J., Li Y.Y., Nie Y.Q., Yang H., Zhan Q., Huang J., Shi S.L., Lai X.B., Huang H.L. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. J Gastroenterol Hepatol. 2010;25(4):772-7.
123. Gabay C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999;340(6):448-54.
124. Cressman D.E., Greennbaum L.E., DeAngelis R.A., Ciliberto G., Furth E.E., Poli V., Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. Science. 1996;274(5291):1379-83.
125. Wieckowska A., Papouchado B.G., Li Z., Lopez R., Zein N.N., Feldstein A.E. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol. 2008;103(6):1372-9.

126. Haukcland J.W., Damås J.K., Konopski Z., Loberg E.M., Haaland T., Goverud I., Torjesen P.A., Birkeland K., Bjoro K., Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. J Hepatol. 2006;44(6):1167-74.
127. Senn J.J., Klover P.J., Nowak I.A., Zimmers T.A., Koniaris L.G., Furlanetto R.W., Mooney R.A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. J Biol Chem. 2003;278(16):13740-6.
128. Samal B., Sun Y., Stearns G., Xie C., Suggs S., McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. Mol Cell Biol. 1994;14(2):1431-7.
129. Moschen A.R., Gerner R.R., Tilg H., Pre-B Cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. Curr Pharm Des. 20100;16(17):1913-20.
130. Aller R., de Luis D.A., Izaola O., Sagrado M.G., Conde R., Velasco M.C., Alvarez T., Pacheco D., Gonzalez J.M. Influence of visfatin on histopathological changes of non-alcoholic fatty liver disease. Dig Dis Sci. 2009;54(8):1772-7.
131. Jarrar M.H., Baranova A., Collantes R., Ranard B., Stepanova M., Bennett C., Fang Y., Elariny H., Goodman Z., Chandhoke V., Younossi Z.M. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther. 2008;27(5):412-21.
132. Auguet T., Terra X., Porras J.A., Orellana-Gavalda J.M., Martinez S., Aguilar C., Lucas A., Pellitero S., Hernandez M., Del Castillo D., Richart C. Plasma visfatin levels and gene expression in morbidly obese women with associated fatty liver disease. Clin Biochem. 2013;46(3):202-8.
133. Videla L.A., Pettinelli P. Misregulation of PPAR functioning and its pathogenic consequences associated with nonalcoholic fatty liver disease in human obesity. PPAR Res. 2012;2012:107434.
134. Oliver W.R. Jr, Shenk J.L., Snaith M.R., Russell C.S., Plunket K.D., Bodkin N.L., Lewis M.C., Winegar D.A., Sznaidman M.L., Lambert M.H., Xu H.E., Sternbach D.D., Kliewer S.A., Hansen B.C., Willson T.M. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(9):5306-11.
135. Liu S., Hatano B., Zhao M., Yen C.C., Kang K., Reilly S.M., Gangl M.R., Corgun C., Balschi J.A., Ntambi J.M., Lee C.H. Role of peroxisome proliferator-activated receptor {delta}/{beta} in hepatic metabolic regulation. J Biol Chem. 2011;286(2):1237-47.
136. Risérus U., Sprecher D., Johnson T., Olson E., Hirschberg S., Liu A., Fang Z., Hegde P., Richards D., Sarov-Blat L., Strum J.C., Basu S., Cheeseman J., Fielding B.A., Humphreys S.M., Danoff T., Moore N.R., Murgatroyd P., O'Rahilly S., Sutton P., Willson T., Hassall D., Frayn K.N., Karpe F. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. Diabetes. 2008;57(2):332-9.
137. Ooi E.M.M., Watts G.F., Sprecher D.L., Chan D.C., Barrett P.H.R. Mechanism of action of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta agonist on lipoprotein metabolism in dyslipidemic subjects with central obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(10):1568-76.
138. Farrell G.C., Larter C.Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology. 2006;43(2 Suppl 1):99-112.
139. Haider D.G., Schindler K., Schaller G., Prager G., Woltz M., Ludvik B. Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(4):1578-81.
140. Tacke F., Luedde T., Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. Clin Rev Allergy Immunol. 2009;36(1):4-12.
141. Neuschwander-Tetri B.A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. Hepatology. 2010;52(2):774-88.
142. Fu S., Yang L., Li P., Hofmann O., Dicker L., Hide W., Lin X., Watkins S.M., Ivanov A.R., Hotamisligil G.S. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. Nature. 2011;473(7348):528-31.
143. Ricchi M., Odoardi M.R., Carulli L., Anzivino C., Ballestri S., Pinetti A., Fantoni L.I., Marra F., Bertolotti M., Banni S., Lonardo A., Carulli N., Loria P. Differential effects of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(5):830-40.
144. Han M.S., Park S.Y., Shinzawa K., Kim S., Chung K.W., Lee J.H., Kwon C.H., Lee K.W., Lee J.H., Park C.K., Chung W.J., Hwang J.S., Yan J.J., Song D.K., Tsujimoto Y., Lee M.S. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. J Lipid Res. 2008;49(1):84-97.
145. Nolan C.J., Larter C.Z. Lipotoxicity: why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(5):703-6.
146. Kohjima M., Enjoji M., Higuchi N., et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Med. 2007;20(3):351-8.
147. Orellana-Gavalda J.M., Herrero L., Malandrino M.I., Pneda A., Sol Rodriguez-Pena M., Petry H., Asins G., Van Deventer S., Hegardt F.G., Serra D. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. Hepatology. 2011;53(3):821-32.

148. Endo M., Masaki T., Seike M., Yoshimatsu H. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c). Exp Biol Med (Maywood). 2007;232(5):614-21.
149. Feldstein A.E., Wieckowska A., Lopez A.R., Liu Y.C., Zein N.N., McCullough A.J. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. Hepatology. 2009;50(4):1072-8.
150. Feldstein A.E. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis. 2010;30(4):391-401.
151. Abdelmegeed M.A., Benerjee A., Yoo S.H., Jang S., Gonzalez F.J., Song B.J. Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol. 2012;57(4):860-6.
152. Seth R.K., Das S., Kumar A., Chanda A., Kadiiska M.B., Michelotti G., Manautou J., Diehl A.M., Chatterjee S. CYP2E1-dependent and leptin-mediated hepatic CD57 expression on CD8+ T cells aid progression of environment-linked nonalcoholic steatohepatitis. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;274(1):42-54.
153. Das S., Seth R.K., Kumar A., Kadiiska M.B., Michelotti G., Diehl A.M., Chatterjee S. Purinergic receptor X7 is a key modulator of metabolic oxidative stress-mediated autophagy and inflammation in experimental nonalcoholic steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013;305(12):950-63.
154. Lazo M., Hernaez R., Eberhardt M.S., Bonekamp S., Kamel I., Guallar E., Koteish A., Brancati F.L., Clark J.M. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Am J Epidemiol. 2013;178:38-45.
155. Romeo S., Kozlitina J., Xing C., Pertsemlidis A., Cox D., Pennacchio L.A., Boerwinkle E., Cohen J.C., Hobbs H.H. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat Genet. 2008;40:1461–5.
156. Victor R.G., Haley R.W., Willett D.L., Peshock R.M., Vaeth P.C., Leonard D., Basit M., Cooper R.S., Iannacchione V.G., Visscher W.A., Staab J.M., Hobbs H.H.; Dallas Heart Study Investigators. The Dallas Heart Study: a population-based probability sample for the multidisciplinary study of ethnic differences in cardiovascular heath. Am J Cardiol. 2004;93:1473-80.
157. Huang Y., He S., Li J.Z., Seo Y.K., Osborne T.F., Cohen J.C., Hobbs H.H. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:7892-7.
158. Dongiovanni P., Donati B., Fares R., Lombardi R., Mancina R.M., Romeo S., Valenti L. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. World J Gastroenterol. 2013;19:6969-78.
159. Sookoian S., Pirola C.J. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2011;53:1883-94.
160. Trepo E., Nahon P., Bontempi G., Valenti L., Falleti E., Nischalke H.D., Hamza S., Corradini S.G., Burza M.A., Guyot E., Donati B., Spengler U., Hillon P., Toniutto P., Henrion J., Franchimont D., Devière J., Mathurin P., Moreno C., Romeo S., Deltenre P. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: evidence from a meta-analysis of individual participant data. Hepatology. 2014;59:2170-7.
161. Li J.Z., Huang Y., Karaman R., Ivanova P.T., Brown H.A., Roddy T., Castro-Perez J., Cohen J.C., Hobbs H.H. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. J Clin Invest. 2012;122:4130-44.
162. Finkenstedt A., Auer C., Glodny B., Posch U., Steitzer H., Lanzer G., Pratschke J., Biebl M., Steurer M., Graziadei I., Vogel W., Zoller H. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 rs738409-G in recipients of liver transplants is a risk factor for graft steatosis. Clin Gastroenterol Hepatol.2013;11:1667-72.
163. Speliotes E.K., Yerges-Armstrong L.M., Wu J., et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. PLoS Genet. 2011;7:e1001324.
164. Peter A., Kantartzis K., Machicao F., Machann J., Wagner S., Templin S., Königsrainer I., Königsrainer A., Schick F., Fritsche A., Häring H.U., Stefan N. Visceral obesity modulates the impact of apolipoprotein C3 gene variants on liver fat content. Int J Obes. 2012;36:774-82.
165. Petersen K.F., Dufour S., Hariri A., Nelson-Williams C., Foo J.N., Zhang X.M., Dziura J., Lifton R.P., Shulman G.I. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 2010;362:1082-9.
166. Lee H.Y., Birkenfeld A.L., Jornayvaz F.R., Jurczak M.J., Kanda S., Popov V., Frederick D.W., Zhang D., Guigni B., Bharadwaj K.G., Choi C.S., Goldberg I.J., Park J.H., Petersen K.F., Samuel V.T., Shulman G.I. Apolipoprotein CIII overexpressing mice are predisposed to diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. Hepatology. 2011;54:1650-60.
167. Tilg H., Moschen A. Update on nonalcoholic fatty liver disease: genes involved in nonalcoholic fatty liver disease and associated inflammation. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010;13:391-6.

168. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D., Lewis J.D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science. 2011;334:105-8.
169. Mehal W.Z. The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013;10:637-44.
170. Rabot S., Membrez M., Bruneau A., Gérard P., Harach T., Moser M., Raymond F., Mansourian R., Chou C.J.. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. FASEB J., 2010;24:4948-59.
171. Le Roy T., Llopis M., Lepage P., Bruneau A., Rabot S., Bevilacqua C., Martin P., Philippe C., Walker F., Bado A., Perlemuter G., Cassard-Doulcier A.M., Gérard P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. Gut. 2013;62:1787-94.
172. Vrieze A., Van Nood E., Holleman F., Salojärvi J., Kootte R.S., Bartelsman J.F., Dallinga-Thie G.M., Ackermans M.T., Serlie M.J., Oozeer R., Derrien M., Druesne A., Van Hylckama Vlieg J.E., Bloks V.W., Groen A.K., Heilig H.G., Zoetendal E.G., Stroes E.S., de Vos W.M., Hoekstra J.B., Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. Gastroenterology. 2012;143:913-16.e7.
173. Kalafati I.P., Borsa D., Dedoussis G.V. The Genetics of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Role of Diet as a Modifying Factor. Curr Nutr Rep. 2014;3:223-32.
174. Yasutake K., Kohjima M., Kotoh K., Nakashima M., Nakamuta M., Enjoji M. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2014;20(7):1756-67.
175. Hu F.B., Rimm E.B., Stampfer M.J., Ascherio A., Spiegelman D., Willett W.C. Prospective study of major dietary patterns and risk of coronary heart disease in men. Am J Clin Nutr. 2000;72:912-21.
176. Zelber-Sagi S., Ratziu V., Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: An overview of the epidemiological evidence. World J Gastroenterol. 2011;17(29):3377-89.
177. Ledikwe J.H., Ello-Martin J.A., Rolls B.J. Portion sizes and the obesity epidemic. J Nutr. 2005;135:905-9.
178. Bellisle F., Le Magnen J. The structure of meals in humans: eating and drinking patterns in lean and obese subjects. Physiol Behav. 1981;27:649-58.
179. Rolls B.J., Rowe E.A., Rolls E.T., Kingston B., Megson A., Gunary R. Variety in a meal enhances food intake in man. Physiol Behav. 1981;26:215-21.
180. Pereira M.A., Kartashov A.I., Ebbeling C.B., Van Horn L., Stattery M.L., Jacobs D.R. Jr, Ludwig D.S. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. Lancet. 2005;365:36-42.
181. Tetri L.H., Basaranoglu M., Brunt E.M., Yerian L.M., Neuschwander-Tetri B.A. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;295:G987-95.
182. de Castro J.M. When, how much and what foods are eaten are related to total daily food intake. Br J Nutr. 2009;102:1228-37.
183. Fuse Y., Hirao A., Kuroda H., Otsuka M., Tahara Y., Shibata S. Differential roles of breakfast only (one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner (two meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism. J Circadian Rhythms. 2012;10:4
184. Bayol S.A., Simbi B.H., Fowkes R.C. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. Endocrinology. 2010;151:1451-61.
185. Schwarz J.M., Linfoot P., Dare D., Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. Am J Clin Nutr. 2003;77(1):43-50.
186. Westerbacka J., Lammi K., Hakkinen A.M., Rissanen A., Salminen I., Aro A., Yki-Jarvinen H. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:2804-9.
187. Musso G., Gambino R., De Michieli F., Cassader M., Rizzetto M., Durazzo M., Fagá E., Silli B., Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2003;37:909-16.
188. Toshimitsu K., Matsuura B., Ohkubo I., Niiya T., Furukawa S., Hiasa Y., Kawamura M., Ebihara K., Onji M. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. Nutrition. 2007;23:46-52.
189. Utzschneider K.M., Bayer-Carter J.L., Arbuckle M.D., Tidwell J.M., Richards T.L., Craft S. Beneficial effect of a weight-stable, low-fat/low-saturated fat/low-glycaemic index diet to reduce liver fat in older subjects. Br J Nutr. 2013;109:1096-104.
190. Longato L., Tong M., Wands J.R., de la Monte S.M. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. Hepatol Res. 2012;42:412-27.
191. Schattenberg J.M., Galle P.R. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and men. Dig Dis. 2010;28:247-54.
192. Kargulewicz A., Stankowiak-Kulpa H., Grzymisławski M. Dietary recommendations for patients with nonalcoholic fatty liver disease. Prz Gastroenterol. 2014;9(1):18-23.

193. Zivkovic A.M., German J.B., Sanyal A.J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. Am J Nutr. 2007;86:285-300.
194. Musso G., Cassader M., Rosina F., Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-anlysis of randomized trials. Diabetoologia. 2012;55:885-904.
195. Yasutake K., Nakamuta M., Shima Y., Ohyama A., Masuda K., Haruta N., Fujino T., Aoyagi Y., Fukuizumi K., Yoshimoto T., Takemoto R., Miyahara T., Harada N., Hayata F., Nakashima M., Enjoji M. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. Scand J Gastroenterol. 2009;44:471-7.
196. Nakamuta M., Fujino T., Yada R., Yada M., Yasutake K., Yoshimoto T., Harada N., Higuchi N., Kato M., Kohjima M., Taketomi A., Maehara Y., Nakashima M., Kotoh K., Enjoji M. Impact of cholesterol metabolism and the LXRalpha-SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Med. 2009;23:603-8.
197. Cortez-Pinto H., Jesus L., Barros H., Lopes C., Moura M.C., Camilo M.E. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? Clin Nutr. 2006;25:816-23.
198. Zelber-Sagi S., Nitzan-Kaluski D., Goldsmith R., Webb M., Blendis L., Halpern Z., Oren R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. J Hepatol. 2007;47:711-7.
199. U.S. Department of Agriculture, U.S. Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans. 7th ed. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, 2010. URL: http://www.health.gov/dietaryguidelines/
200. Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Rimm E., Colditz G.A., Rosner B.A., Hennekens C.H., Willett W.C. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med. 1997;337:1491-9.
201. Bozzetto L., Prinster A., Annuzzi G., Costagliola L., Mangione A., Vitelli A., Mazzarella R., Longobardo M., Mancini M., Vigorito C., Riccardi G., Rivellese A.A. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. Diabetes Care. 2012;35(7):1429-35.
202. Hashemi Kani A., Moayed Alavian S., Haghighatdoost F., Azadbakht L. Dietray macronutrients composition in nonalcoholic fatty liver disease: A review on the related documents. Hepat Mon. 2014;14(2):e10939.
203. Carg A. High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. Am J Clin Nutr. 1998;67:577S-82S.
204. Spadaro L., Magliocco O., Spampinato D., Piro S., Oliveri C., Alagona C., Papa G., Rabuazzo A.M., Purrello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. Dig Liv Dis. 2008;40:194-9.
205. Vos M.B., Mc Clein C.J. Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease in children. Curr Gastroenterol Rep. 2008;10:308-15.
206. Cussons A.J., Watts G.F., Mori T.A., Stuckey B.G. Omega-3 fatty acid supplementation decreases liver fat content in polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial employing proton magnetic resonance spectroscopy. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(10):3842-8.
207. Parker H.M., Johnson N.A., Burdon C.A., Cohn J.S., O'Connor H.T., George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. J Hepatol. 2012;56(4):944-51.
208. Capanni M., Calella F., Biagini M.R., Genise S., Raimondi L., Bedogni G., Svegliati-Baroni G., Sofi F.,Milani S.,Abbate R., Surrenti C.,Casini A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. Aliment Pharmacol Ther. 2006;23(8):1143-51.
209. Mouzaki M., Allard J.P. The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Gastroenterol. 2012;46(6):457-67.
210. Jump D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. Curr Opin Lipidol. 2008;19(3):242-7.
211. Qi K., Fan C., Jiang J., Zhu H., Jiao H., Meng Q., Deckelbaum R.J. Omega-3 fatty acid containing diets decrease plasma triglyceride concentrations in mice by reducing endogenous triglyceride synthesis and enhancing the blood clearance of triglyceride-rich particles. Clin Nutr. 2008;27(3):424-30.
212. Yamagishi K., Iso H., Date C., Fukui M., Wakai K., Kikuchi S., Inaba Y., Tanabe N., Tamakoshi A. Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. J am Coll Cardiol. 2008;52:988-96.
213. Tarantino G., Conca P., Pasanisi F., Ariello M., Mastrolia M., Arena A., Tarantino M., Scopacasa F., Vecchione R. Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis? Eur J Gastroenteroll Hepatol. 2009;21(5):504-11.
214. Brownell K.D., Farley T., Willett W.C., Popkin B.M., Chaloupka F.J., Thompson J.W., Ludwig D.S. The public health and economic benefits of taxing sugar-sweetened beverages. N Engl J Med. 2009;361:1599-605.

215. Gaby A.R. Adverse effects of dietary fructose. Altern Med Rev. 2005;10:294-306.
216. Malik V.S., Popkin B.M., Bray G.A., Despres J.P., Willett W.C., Hu F.B. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabettes: a meta-analysis. Diabetes Care. 2010;33:2477-83.
217. Assy N., Nasser G., Kamayse I., Nseir W., Beniashvili Z., Djibre A., Grosovski M. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. Can J Gastroenterol. 2008;22:811-6.
218. Abid A., Taha O., Nseir W., Farah R., Grosovski M., Assy N. Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome. J Hepatol. 2009;51:918-24.
219. Melanson K.J., Westerterp-Plantenga M.S., Saris W.H., Smith F.J., Campfield L.A. Blood glucose patterns and appetite in time-blinded humans: carbohydrate versus fat. Am J Physiol. 1999;277:R337-R345.
220. Yamazaki T., Nakamori A., Sasaki E., Wada S., Ezaki O. Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddy mice. Hepatology. 2007;46:1779-90.
221. Trocho C., Pardo R., Rafecas I., Virgili J., Remesar X., Fernandez-Lopez J.A., Alemany M. Formaldeyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. Life Sci. 1998;63(5):337-49.
222. Ross A.B., Godin J.P., Minehira K., Kirwan J.P. Increasing whole grain intake as part of prevention and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Int J Endocrinol. 2013;585876.
223. Katcher H.I., Legro R.S., Kunselman A.R., Gillies P.J., Demers L.M., Bagshaw D.M., Kris-Etherton P.M. The effects of a whole grain-enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. Am J Clin Nutr. 2008;87:79-90.
224. Ye E.Q., Chacko S.A., Chou E.L., Kugizaki M., Liu S. Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. J Nutr. 2012;142:1304-13.
225. Mellen P.B., Walsh T.F., Herrington D.M. Whole grain intake and cardiovascular disease: a meta-analysis. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2008;18:283-90.
226. Nettleton J.A., McKeown N.M., Kanoni S., et al. Interactions of dietary intake with fasting glucose- and insulin-related genetic loci in individuals of European descent: a meta-analysis of 14 cohort studies. Diabetes Care. 2010;33:2684-91.
227. Bortolotti M., Kreis R., Debard C., Cariou B., Faeh D., Chetiveaux M., Ith M., Vermathen P., Stefanoni N., Lê K.A., Schneiter P., Krempf M., Vidal H., Boesch C., Tappy L. High protein intake reduces intrahepatocellular lipid deposition in humans. Am J Clin Nutr. 2009;90(4):1002-10.
228. Schwarz J., Tome D., Baars A., Hooiveld G.J., Muller M. Dietary protein affects gene expression and prevents lipid accumulation in the liver in mice. PLos One. 2012;7(10):ee47303.
229. Uebanso T., Taketani Y., Fukaya M., Sato K., Takei Y., Sato T., Sawada N., Amo K., Harada N., Arai H., Yamamoto H., Takeda E. Hypocaloric high-protein diet improves fatty liver and hypertriglyceridemia in sucrose-fed rats via two pathways. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;297(1):E76-84.
230. Arciero P.J., Gentile C.L., Pressman R., Everett M., Ormsbee M.J., Martin J., Santamore J., Gorman L., Fehling P.C., Vukovich M.D., Nindl B.C. Moderate protein intake improves total and regional body composition and insulin sensitivity in overweight adults. Metabolism. 2008;57:757-65.
231. Shertzer H.G., Woods S.E., Krishan M., Genter M.B., Pearson K.J. Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet. J Nutr. 2011;141(4):582-7.
232. Oz H.S., Chen T.S., Neuman M. Nutrition intervention: a strategy against systemic inflammatory syndrome. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2009;33(4):380-9.
233. Leidy H.J., Mattes R.D., Campbell W.W. Effects of acute and chronic protein intake on metabolism, appetite, and ghrelin during weight loss. Obesity (Silver Spring). 2007;15(5):1215-25.
234. Horoz M., Bolukbas C., Bolukbas F.F., Sabuncu T., Aslan M., Sarifakiogullari S., Gunaydin N., Erel O. Measurement of the antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. BMC Gastroenterol. 2005;5:35.
235. Koruk M., Taysi S., Svas M.C., Yilmaz O., Akcay F., Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Ann Clin Lb Sci. 2004;34:57-62.
236. Shi L., Liu Z.W., Li Y., Gong C., Zhang H., Song L.J., Huang C.Y., Li M. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu. Biomed Environ Sci. 2012;25:383-91.
237. Hasegawa T., Yoneda M., Nakamura K., Makino I., Terano A. Plasma transforming growth factor-beta 1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. Aliment Pharmacol Ther. 2001;15:1667-72.
238. Sanyal A.J., Chalasani N., Kowdley K.V., McCullough A., Diehl A.M., Bass N.M., Neuschwander-Tetri B.A., Lavine J.E., Tonascia J., Unalp A., Van Natta M., Clark J., Brunt E.M., Kleiner D.E., Hoofnagle J.H., Robuck P.R. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. N Engl J Med. 2010;362:1675-85.
239. Sesso H.D., Buring J.E., Christen W.G., Kurth T., Belanger C., MacFadyen J., Bubes V., Manson J.E., Glynn R.J., Gaziano J.M. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. JAMA. 2008;300:2123-33.

240. Han Y., Shi J.P., Ma A.L., Xu Y., Ding X.D., Fan J.G. Randomized, vitamin e-controlled trial of bicyclol plus metformin in nonalcoholic fatty liver disease patients with impaired fasting glucose. Clin Drug Investig. 2014;34:1-7.
241. Alvarez J.A., Ashraf A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. Int J Endocrinol. 2010;2010:351385.
242. Manco M., Ciampalini P., Nobili V. Low levels of 25-hydroxyvitamin D(3) in children with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 20100;51:2229; author reply 2230.
243. Barchetta I., Carotti S., Lbadia G., Gentilucci U.V., Muda A.O., Angelico F., Silecchia G., Leonetti F., Fraioli A., Picardi A., Morini S., Cavallo M.G. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. Hepatology. 2012;56;2180-7.
244. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006;444:1022-3.
245. Kelishadi R., Farajian S., Mirlohi M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic fatty liver disease; a systematic review on the current evidence. Hepat Mon. 2013;13:e7233.
246. Aller R., De Luis D.A., Izaola O., Conde R., Gonzalez Sagrado M., Primo D., De La Fuente B., Gonzalez J. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. Eu Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15:1090-5.
247. Parnell J.A., Reimer R.A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. Am J Clin Nutr. 2009;89:1751-9.
248. Valenti L., Rizo P., Mazzocchi A., Porrini M., Fargion S., Agostoni C. Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013;2013:145421.
249. Chiou A., Panagopoulou E.A., Gatzali F., De Marchi S., Karathanos V.T. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (Vitis vinifera L., var. Apyrena). Food Chemistry. 2014;146:157-65.
250. Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. 2006;54(11):4069-75.
251. Yang M., Koo S.I., Song W.O., Chun O.K. Food matrix affecting anthocyanins bioavailability: review. Current Medicinal Chemistry. 2011;18(2):291-300.
252. Wang L.-S., Stoner G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Letters. 2008;269(2):281-90.
253. Chong M.F.-F., MacDonald R., Lovegrove J.A. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. British Journal of Nutrition. 2010;104(3):S28-39.
254. Galvano F., La Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battistini N.C., Tavazzi B., Galvano G. Cyanidins: metabolism and biological properties. Journal of Nutritional Biochemistry. 2004;15(1):2-11.
255. Basu A., Du M., Leyva M.J., Sanchez K., Betts N.M., Wu M., Aston C.E., Lyons T.J. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. Journal of Nutrition. 2010;140(9):1582-7.
256. Vendrame S., Daugherty A., Kristo A.S., Riso P., Klimis-Zacas D. Wild blueberry (Vaccinium angustifolium) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. Journal of Nutritional Biochemistry. 2013;24(8):1508-12.
257. Titta L., Trinei M., Stendardo M., Berniakovich I., Petroni K., Tonelli C., Riso P., Porrini M., Minucci S., Pelicci P.G., Rapisarda P., Reforgiato Recupero G., Giorgio M. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. International Journal of Obesity. 2010;34(3):578-88.
258. Vendrame S., Daugherty A., Kristo A.S., Klimis-Zacas D. Wild blueberry (Vaccinium angustifolium)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats. British Journal of Nutrition. 2013.
259. Guo H., Xia M., Zou T., Ling W., Zhong R., Zhang W. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. Journal of Nutritional Biochemistry. 2012;23(4):349-60.
260. Seymour E.M., Tanone I.I., Urcuyo-Llanes D.E., Lewis S.K., Kirakosyan A., Kondoleon M.G., Kaufman P.B., Bolling S.F. Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats. Journal of Medicinal Food. 2011;14(12):1511-8.
261. Guo H., Liu G., Zhong R., Wang Y., Wang D., Xia M. Cyanidin-3-O-β-glucoside regulates fatty acid metabolism via an AMP-activated protein kinase-dependent signaling pathway in human HepG2 cells. Lipids in Health and Disease. 2012;11:10.
262. Hwang Y.P., Choi J.H., Han E.H., Kim H.G., Wee J.H., Jung K.O., Jung K.H., Kwon K.I., Jeong T.C., Chung Y.C., Jeong H.G. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation

through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. Nutrition Research. 2011;31(12):896-906.
263. Suda I., Ishikawa F., Hattakeyama M., Miyawaki M., Kudo T., Hirano K., Ito A., Yamakawa O., Horiuchi S. Intake of purple sweet potato beverage affects on serum hepatic biomarker levels of healthy adult men with borderline hepatitis. European Journal of Clinical Nutrition. 2008;62(1):60-7.
264. Promrat K., Kleiner D.E., Niemeier H.M., Jackvony E., Kearns M., Wands J.R., Fava J.L. Wing R.R. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2010;51:121-9.
265. Huang M.A., Greenson J.K.,, Chao C., Anderson L., Peterman D., Jacobson J., Emick D., Lok A.S., Conjeevaram H.S. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study.
266. Lazo M., Solga S.F., Horska A., Bonekamp S., Diiehl A.M., Brancati F.L., Wagenknecht L.E., Pi-Sunyer F.X., Kahn S.E., Clark J.M. Fatty liver subgroup of the Look AHEAD Research Group. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2010;33:2156-63.
267. Oza N., Eguchi Y., Mizuta T., Ishibashi E., Kitajima Y., Horie H., Ushirogawa M., Tsuzura T., Nakashita S., Takahashi H., Kawaguchi Y., Oda Y., Iwakiri R., Ozaki I., Eguchi T., Ono N., Fujimoto K. A pilot trial of body weight reduction for nonalcoholic fatty liver disease with a home-based lifestyle modification interventiondelivered in collaboration with interdisciplinary medical staff. J Gastroenterol. 2009;44:1203-8.
268. Mathurin P., Hollebecque A., Arnalsteen L., Buob D., Leteurtre E., Caiazzo R., Pigeyre M., Verkindt H., Dharancy S., Louvet A., Romon M., Pattou F. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. Gastroenterology. 2009;137:532-40.
269. Gregor M.F., Yang L., Fabbrini E., Mohammed B.S., Eagon J.C., Hotamisligil G.S., Klein S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. Diabetes. 2009;58:693-700.
270. Bassuk S.S., Manson J.E. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. J Appl Physiol. 2005;99:1193-1204.
271. LaMonte M.J., Blair S.N., Church T.S. Physical activity and diabetes prevention. J Appl Physiol. 2005;99:1205-13.
272. Helmerhorst H.J., Wijndaele K., Brage S., Wareham N.J., Ekelund U. Objectively measured sedentary time may predict insulin resistance independent of moderate- and vigorous-intensity physical activity. Diabetes. 2009;58:1776-9.
273. Haus J.M., Solomon T.P., Kelly K.R., Fealy C.E., Kullman E.L., Scelsi A.R., Lu L., Pagadala M.R., McCullough A.J., Flask C.A., Kirwan J.P. Improved hepatic lipid composition following short-term exercise in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98:E1181-8.
274. Fealy C.E., Haus J.M., Solomon T.P., Pagadala M., Flask C.A., McCullough A.J., Kirwan J.P. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosisin nonalcoholic fatty liver disease. J Appl Physiol. 2012;113:1-6.
275. Kistler K.D., Brunt E.M., Clark J.M., Diehl A.M., Sallis J.F., Schwimmer J.B.; NASH CRN Research Group.. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Am J Gastroenterol. 2011;106;460-8.
276. St George A., Bauman A., Johnston A., Farrell G., Chey T., George J. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2009;50:68-76.
277. Johnson N.A., Sachinwalla T., Walton D.W., Smith K., Armstrong A., Thompson M.W., George J. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. Hepatology. 2009;50:1105-12.
278. Kantartzis K., Thamer C., Peter A., Machann J., Schik F., Schraml C., Konigsrainer A., Konigsrainer I., Krober S., Niess A., Fritsche A., Haring H.U., Stefan N. High cardiorespiratory fitness is an independent predictor of the reduction in liver fat during a lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease. Gut. 2009;58:1281-8.
279. Pollock M.L., Franklin B.A., Balady G.J., Chaitman B.L., Fleg J.L., Fletcher B., Limacher M., Pina I.L., Stein R.A., Williams M., Bazzarre T. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. Circulation. 2000;101:828-33.
280. Ibanez J., Izquierdo M., Arguelles I., Forga L., Larrion J.L., Garcia-Unciti M., Idoate F., Gorostiaga E.M. Twice-weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2005;28:662-7.
281. Tsuzuku S., Kajioka T., Endo H., Abbott R.D., Curb J.D., Yano K. Favorable effects of non-instrumental resistance training on fat distribution and metabolic profiles in healthy elderly people. Eur J Appl Physiol. 2007;99:549-55.

282. Banz W.J., Maher M.A., Thompson W.G., Bassett D.R., Moore W., Ashraf M., Keefer D.J., Zemel M.B. Effects of resistance versus aerobic training on coronary artery disease risk factors. Exp Biol Med. 2003;228:434-40.
283. Ballor D.L., Keesey R.E. A meta-analysis of the factors affecting exercise-induced changes in body mass, fat mass and fat-free mass in males and females. Int J Obes. 1991;15:717-26.
284. Miller W.J., Sherman W.M., Ivy J.L. Effect of strength training on glucose tolerance and post-glucose insulin response. Med Sci Sports Exerc. 1984;16:539-43.
285. Boule N.G., Haddad E., Kenny G.P., Wells G.A., Sigal R.J. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. JAMA. 2001;286:1218-27.
286. Goodyear L.J., Kahn B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. Annu Rev Med. 1998;49:235-61.
287. Hannukainen J.C., Nuutila P., Borra R., Kaprio J., Kujala U.M., Janatuinen T., Heinonen O.J., Kapanen J., Viljanen T., Haaparanta M., Ronnemaa T., Parkkola R., Knuuti J., Kalliokoski K.K. Increased physical activity decreases hepatic free fatty acid uptake: a study in human monozygotic twins. J Physiol. 2007;578:347-58.
288. Tamura Y., Tanaka Y., Sato F., Choi J.B., Wataba H., Niwa M., Kinoshita J., Ooka A., Kumashiro N., Igarashi Y., Kyogoku S., Maehara T., Kawasumi M., Hirose T., Kawamori R. Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:3191-6.
289. Iozzo P., Takala T., Oikonen V., Bergman J., Gronroos T., Ferrannini E., Nuutila P., Knuuti J. Effect of training status on regional disposal of circulating free fatty acids in the liver and skeletal muscle during physiological hyperinsulinemia. Diabetes Care. 2004;27:2172-7.
290. Pacana T., Sanyal A.J. Vitamin E and nonalcoholic fatty liver disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2012;15:641-8.
291. Ahmadian M., Suh J.M., Hah N., Liddle C., Atkins A.R., Downes M., Evans R.M. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. Nat Med. 2013;19:557-66.
292. Savage D.B., Tan G.D., Acerini C.L., Jebb S.A., Agostini M., Gurnell M., Williams R.L., Umpleby A.M., Thomas E.L., Bell J.D., Dixon A.K., Dunne F., Boiani R., Cinti S., Vidal-Puig A., Karpe F., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes. 2003;52:910-7.
293. Targher G., Day C.P., Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 2010;363:1341-50.
294. Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Arvaniti F., Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. Prev Med. 2007;44(4):335-40.
295. Karadeniz F., Durst R.W., Wrolstad R.E. Polyphenolic composition of raisins. J Agric Food Chem. 2000;48:5343-50.
296. Chiou A., Karathanos V.T., Mylona A., Salta F.N., Preventi F., Andrikopoulos N.K. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chem. 2007;102:516-22.
297. Kanellos P.T., Kaliora A.C., Liaskos C., Tentolouris N.K., Perrea D., Karathanos V.T. Astudy of glycemic response to Corinthian raisins in healthy subjects and in type 2 diabetes mellitus patients. Plant Foods Hum Nutr. 2013;68:145-8.
298. Blasa M., Gennari L., Angelico D., Ninfali P. Fruit and vegetable antioxidant in health. In: Watson R.R., Preedy V.R. (eds) Bioactive foods in promoting health, 1st edn. Elsevier, London. 2010;37-58.
299. Keast D.R., Jones J.M. Dried fruit consumption associated with reduced improved overweight or obesity in adults: NHANES, 1999-2004. FASEB J. 2009;23:LB11.
300. Andrade-Cetto A., Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia on streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2001;78:145-9.
301. Puglisi M.J., Mutungi G., Brun P.J., McGrane M.M., Labonte C., Volek J.S., Fernandez M.L. Raisins and walking alter appetite hormones and plasma lipids by modifications in lipoprotein metabolism and up-regulation of the low-density lipoprotein receptor. Metabolism. 2009;58:120-8.
302. Kanellos P.T., Kaliora A.C., Gioxari A., Christopoulou G.O., Kalogeropoulos N., Karathanos V.T. Absorption and bioavailability of antioxidant phytochemicals and increase of serum oxidation resistance inn healthy subjects following supplementation with raisins. Plant Foods Hum Nutr. 2013;68:411-5.
303. Kanellos P.T., Kaliora A.C., Tentolouris N.K., Argiana V., Perrea D., Kalogeropoulos N., Kountouri A.M., Karathanos V.T. Apilot, randomized controlled trial to examine the health outcomes of raisin consumption in patients with diabetes. Nutrition. 2014;30:358-64.
304. Kaliora A.C., Kountouri A.M., Karathanos V.T. Antioxidant properties of raisins (*Vitis vinifera* L.). J Med Food. 2009;12(6):1302-9.

305. Kaliora A.C., Kountouri A.M., Karathanos V.T., Koumbi L., Papadopoulos N.G., Andrikopoulos N.K. Effect of raisins (*Vitis vinifera* L.) from different origins on gastric cancer cell growth. Nutrition and Cancer. 2008;60(6):792-9.
306. Kountouri A.M., Gioxari A., Karvela E., Kaliora A.C., Karvelas M., Karathanos V.T. Chemopreventive properties of raisins originating from Greece in colon cancer cells. Food Funct. 2013;4:366-72.
307. Kumari M., Schoiswohl G., Chitraju C., Paar M., Cornaciu I., Rangrez A.Y., Wongsiriroj N., Nagy H.M., Ivanova P.T., Scott S.A., Knittelfelder O., Rechberger G.N., Birner-Gruenberger R., Eder S., Brown A.H., Haemmerle G., Oberer M., Lass A., Kershaw E.E., Zimmermann R., Zechner R. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. Cell Metab. 2012;15(5):691-702.
308. Huang Y., Cohen J.C., Hobbs H.H. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. J Biol Chem. 2011;286:37085–93.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΦΑΚΕΛΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

N A F L D

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΘΕΛΟΝΤΗ:.....

Στοιχεία Εθελοντή	
Ημερομηνία:	
Νοσοκομείο / Κλινική:	
Κωδικός:	
Ονοματεπώνυμο:	
Φύλο:	
Διεύθυνση:	
Τηλέφωνο επικοινωνίας:	**Σταθερό:** **Κινητό:**

Στοιχεία Συνταγογράφησης	
Όνομα Πατρός:	
ΑΜΚΑ:	
ΑΜΑ:	
Ασφαλιστικός Φορέας:	
Ραντεβού:	

Κωδικός:.....

ΑΤΟΜΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ *(συνέχεια)*
Σας έχει πει ποτέ ο γιατρός σας πως έχετε κάποια από τις παρακάτω ασθένειες ή διαταραχές;

Σοβαρή Δερματοπάθεια	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Αλλεργία	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Οστεοπόρωση	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Γαστρικό Έλκος	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Γαστροοισοφαγική Παλινδρόμηση	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Νόσο Crohn ή Ελκώδη κολίτιδα	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Καρκίνος: Προσδιορίστε:	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
ΑΝ ΝΑΙ ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ: ΠΟΤΕ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΕ , ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ		
Άλλο - Προσδιορίστε:	.....	
ΚΑΠΝΙΣΜΑ : **ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΣΙΓΑΡΩΝ/ΗΜΕΡΑ:** **ΕΝΑΡΞΗ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ:** **ΕΤΗ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ:** **ΕΤΗ ΑΠΟΧΗΣ:**	**ΝΑΙ** **ΟΧΙ** **ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ**	
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ		

Κωδικός:.....

ΑΤΟΜΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ *(συνέχεια)*
Σας έχει πει ποτέ ο γιατρός σας πως έχετε κάποια από τις παρακάτω ασθένειες ή διαταραχές;

Λιπώδη διήθηση του ήπατος	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Ιστορικό αλκοολισμού	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Άπνοια Ύπνου	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Υπερλιπιδαιμία	☐ ΝΑΙ	☐ΟΧΙ
Έχετε αυξημένα τριγλυκερίδια ή χοληστερόλη;	☐ΝΑΙ	☐ΟΧΙ
Διαβήτης Τύπου Ι	☐ ΝΑΙ - ΗΛΙΚΙΑ:.....	☐ ΟΧΙ
Διαβήτης Τύπου ΙΙ	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Υπέρταση	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Πολυκυστικές ωοθήκες	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Ασθένεια Wilson	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Ηπατίτιδα C	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Ηπατίτιδα Β	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Υποθυρεοειδισμό	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Υπερθυρεοειδισμό	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Στένωση Στεφανιαίων Αρτηριών	☐ ΝΑΙ - Ποσοστό Στένωσης:.....	☐ ΟΧΙ
Στεφανιαία Νόσο	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Σταθερή Στηθάγχη	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Ασταθής Στηθάγχη	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Έμφραγμα μυοκαρδίου	☐ ΝΑΙ - ΗΛΙΚΙΑ:..... ☐ ΝΑΙ - ΗΛΙΚΙΑ:.....	☐ ΟΧΙ
Καρδιακή Ανεπάρκεια	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Καρδιακή Αρρυθμία	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Βηματοδότης	☐ ΝΑΙ - ΗΛΙΚΙΑ:.....	☐ ΟΧΙ
Θρόμβωση	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο	☐ ΝΑΙ - ΗΛΙΚΙΑ:.....	☐ ΟΧΙ
Πνευμονία	☐ ΝΑΙ - ΗΛΙΚΙΑ:.....	☐ ΟΧΙ
Άσθμα	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Χρόνια Βρογχίτιδα	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ
Χρόνιο Άγχος, Κατάθλιψη	☐ ΝΑΙ	☐ ΟΧΙ

Φαρμακευτική Αγωγή

Παίρνετε κάποιου είδους φάρμακο;
☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ

Εάν απαντήσατε ΝΑΙ, παρακαλώ συμπληρώστε προσεκτικά τον παρακάτω πίνακα

Όνομα Φαρμακευτικής Αγωγής (Φάρμακο ή Ιατρική Παρέμβαση)	Γιατί παίρνετε το Φάρμακο ή ακολουθείτε την Ιατρική Παρέμβαση;	Συχνότητα που παίρνετε το Φάρμακο ή ακολουθείτε την Ιατρική Παρέμβαση

Κωδικός:.....

ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	Screening Visit =1	Time=0 Visit=2	Time=1 Visit =3	Time=3 Visit=4	Time=6 Visit =5	Μεταβολή	Ποσοστο Μεταβολης
Ύψος (cm)							
Βάρος (kg)							
BMI							
Περίμετρος μέσης (cm)							
Περιφέρεια ισχύων (cm)							
Ratio περιφέρεια μεσης/ισχιων							
ΛΙΠΟΜΕΤΡΗΣΗ							
Σωματικό Λίπος							
Νερο							
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ							
Συστολική αρτηριακή πίεση (SBD- mmHg							
1^{H} ΜΕΤΡΗΣΗ							
2^{H} ΜΕΤΡΗΣΗ							
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ							
Διαστολική αρτηριακή πίεση (DBP- mmHg)							
1^{H} ΜΕΤΡΗΣΗ							
2^{H} ΜΕΤΡΗΣΗ							

Κωδικός:.....

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Συμπληρώστε των πίνακα και σημειώστε όπου γνωρίζετε την ηλικία που εμφανίσθηκε στο συγγενικό σας πρόσωπο η συγκεκριμένη ασθένεια ή διαταραχή.

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	ΑΔΕΛΦΙΑ							ΠΑΤΕΡΑΣ	ΜΗΤΕΡΑ
	1	2	3	4	5	6	7		
Λιπώδη διήθηση ήπατος									
Παχυσαρκία									
Απνοια Ύπνου									
Υπερλιπιδαιμία									
Διαβήτης Τύπου Ι									
Διαβήτης Τύπου ΙΙ									
Υπέρταση									
Πολυκυστικές ωοθήκες									
Ασθένεια Wilson									
Ηπατίτιδα C									
Ηπατίτιδα Β									
Υποθυρεοειδισμό									
Υπερθυρεοειδισμό									
Στένωση Στεφανιαίων Αρτηριών									
Στεφανιαία Νόσο									
Σταθερή Στηθάγχη									
Ασταθής Στηθάγχη									
Έμφραγμα μυοκαρδίου									
Καρδιακή Ανεπάρκεια									
Καρδιακή Αρρυθμία									
Βηματοδότης									
Θρόμβωση									
Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο									
Πνευμονία									
Άσθμα									
Χρόνια Βρογχίτιδα									
Χρόνιο Άγχος, Κατάθλιψη									
Σοβαρή Δερματοπάθεια									
Αλλεργία									
Οστεοπόρωση									
Γαστρικό Έλκος									
Γαστροοισοφαγική Παλινδρόμηση									
Νόσο Crohn									
Καρκίνος: Προσδιορίστε:									
Αρθρίτιδα:									

Είναι οι *Γονείς* σας εν ζωή;

ΓΟΝΕΑΣ	Εν ζωή	ΗΛΙΚΙΑ ΘΑΝΑΤΟΥ	ΑΙΤΙΑ ΘΑΝΑΤΟΥ
Πατέρας	☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ		
Μητέρα	☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ		

Κωδικός:.....

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Ημερομηνία	Time =0	Time=3 mo	Time= 6	Μεταβολή	Ποσοστο μεταβολής	Φυσιολογικές Τιμές
Λευκά αιμοσφαίρια (WBC)						
Ερυρθά αιμοσφαίρια (RBC)						
Αιμοσφαιρίνη (Hgb)						
Αιματοκρίτης (Hct)						
PLT						
Σίδηρος (Fe)						
Φερριτίνη (Fer)						
Γλυκόζη νηστείας (Glu)						
Χοληστερόλη (TC)						
HDL-C						
LDL-C						
Τριγλυκερίδια (TG)						
SGOT						
SGPT						
γ- GT						
Creatinine						
ALP						
CRP Λαικο						
Ολική χολερυθρίνη (Άμεση/Έμμεση)						
Νάτριο (Na)						
Κάλιο (K)						
Ουρικό οξύ						
Ουρία						
Ινσουλινη						
Hba1c						
Ολικα Λευκωματα						
Αλβουμινη						
INR						
TNF-a						
Il-6						
Λεπτινη						
GLP-1						
Adiponectin						
Visfatin						
MDA						
GSH						
IRI -HOMA						
FA Λιπαρα Οξεα						
CRP Χαροκοπειο						
ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ						
Λευκά αιμοσφαίρια (WBC)						
%neut						
%lymph						
%mono						
%eos						
%baso						
Ερυρθά αιμοσφαίρια (RBC)						
Αιμοσφαιρίνη (Hgb)						
Αιματοκρίτης (Hct)						
MCV						
MCH						
MCHC						
MPV						
RDW						
PLT						
PCT						

CODE: .....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:.....

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Α. Υπερηχογράφημα ήπατος - χοληφόρων:

ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΟΣ:.....

ΚΑΘΕΤΟΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΗΠΑΤΟΣ	Cm	
ΛΙΠΩΔΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗ ΗΠΑΤΟΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
ΒΑΘΜΟΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	Ο Ι	ΙΙ ΙΙΙ
ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
DEBRIS	ΝΑΙ	ΟΧΙ

ΣΧΟΛΙΑ:

.....

.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: .....

Β. SHEARWAVE ΕΛΑΣΡΟΓΡΑΦΙΑ

ΧΕΙΡΙΣΤΗΣ ΙΑΤΡΟΣ:.....

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΕΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ Mean Value (kPa)	ΕΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ Min VALUE (kPa)	ΕΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ Max VALUE (kPa)
1^{H}			
2^{H}			
3^{H}			
4^{H}			
5^{H}			
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ			

Κωδικός:.....

Παρακαλούμε σκεφτείτε **τις τελευταίες 7 μέρες (εβδομάδα)**.
Θα θέλαμε να μας δώσετε κάποιες πληροφορίες για την φυσική σας δραστηριότητα.
Οι πληροφορίες που θα μας δώσατε θα παραμείνουν απόρρητες.

ΕΝΟΤΗΤΑ 1: ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ

- Ποια είναι η βασική σας απασχόληση: _____
- Εργαστήκατε τις τελευταίες 7 μέρες;
  Όχι ☐ **➔προχωρήστε στην ενότητα 2**
  Ναι ☐ Πόσες μέρες: _____ *(1)*
  – Πόσες ώρες τη μέρα κατά μέσο όρο: _____ώρες/ ημέρα εργασίας(2)
  – Εκ των οποίων πόσο χρόνο κατά μέσο όρο καταναλώσατε:

	Ώρες/ ημέρα εργασίας	
καθιστή/ος		(3)
όρθια/ος		(4)
σε κίνηση		(5)
μεταφέροντας βάρος		(6)
Συνολικός χρόνος εργασίας		

  – Πόσος χρόνος χρειάστηκε για τη μετακίνηση σας **από και προς** τη δουλειά σας αυτές τις μέρες: _____ λεπτά/ ημέρα (7)
  – **Εκ του οποίου χρόνου** πόση ώρα α)περπατήσατε: _____ λεπτά/ ημέρα που πήγα στη δουλειά(8)
  β)οδηγήσατε: _____ λεπτά/ ημέρα που πήγα στη δουλειά(9)

ΕΝΟΤΗΤΑ 2: ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΣΠΙΤΙ

- Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών πόσες ώρες (κατά μέσο όρο) **την ημέρα**:
  – κοιμηθήκατε (συμπεριλαμβανομένου και τυχόν μεσημεριανού ύπνου): _____ώρες/ ημέρα *(10)*
  – είδατε τηλεόραση-βίντεο: _____ ώρες/ ημέρα *(11)*

- Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών πόσες ώρες **συνολικά** καταναλώσατε:
  – για ελαφριές δουλειές σπιτιού (π.χ. μαγείρεμα, πλύσιμο πιάτων κλπ): _____ώρες/ εβδομάδα *(12)*
  – για βαριές δουλειές σπιτιού(π.χ. πλύσιμο στο χέρι, σφουγγάρισμα κλπ): _____ώρες/ εβδομάδα*(13)*
  – για διάβασμα και στον υπολογιστή (εκτός ωρών εργασίας): _____ ώρες/ εβδομάδα *(14)*

ΕΝΟΤΗΤΑ 3: ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΨΥΧΑΓΩΓΙΑ

- Με τι μέσο μετακινηθήκατε κυρίως την τελευταία εβδομάδα (σημειώστε **μόνο ένα**):

- Τις τελευταίες 7 μέρες πόσες ώρες **συνολικά**:

	Ώρες/ εβδομάδα	
χορέψατε σε club ή/και bar:		(15)
ήσασταν καθιστός/η ή στεκόσασταν όρθιος/α με φίλους σε καφετέρια – μπαρ – ταβέρνα – εστιατόριο- θέατρο-σινεμά:		(16)
περπατήσατε για ψυχαγωγία (βόλτα στα μαγαζιά, στο πάρκο κλπ) και για μετακίνηση (εκτός μετακίνησης προς και από τη δουλειά):		(17)

- Τις τελευταίες 7 μέρες γυμναστήκατε:
  Ναι ☐ Όχι ☐

- Αν ναι τι ακριβώς κάνετε και πόσες ώρες **συνολικά** τις τελευταίες 7 μέρες:

	Ώρες/ εβδομάδα	
		(18)
		(19)
		(20)

Μοτοσικλέτα ☐ Ι.Χ. ☐ Περπατώντας ☐ Ποδήλατο ☐
Μέσα Μαζικής Μεταφοράς (πχ. λεωφορείο, μετρό κλπ) ☐ Ταξί ☐

Κωδικός:.....

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

Με το παρόν έγγραφο δηλώνω την εθελοντική συμμετοχή μου στην κλινική μελέτη με τίτλο «Παχυσαρκία και μεταβολικό σύνδρομο: διατροφική παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα σε λιπώδη διήθηση του ήπατος (NAFLD/ NASH) – Διερεύνηση μοριακών μηχανισμών δράσης
Η κλινική δοκιμή διεξάγεται με τη συνεργασία του Χαροκοπείου Πανεπιστήμιου, της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και του Τομέα Αναπτυξιακής Βιολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Σκοπός της είναι η μελέτη της επίδρασης κατανάλωσης Κορινθιακής σταφίδας σε καθημερινή βάση (36 γρ.) σε ασθενείς με Μη Αλκοολική Λιπώδη Διήθηση του Ήπατος (NAFLD/ NASH) για χρονικό διάστημα 6 μηνών.

Βεβαιώνω ότι έχω ενημερωθεί προφορικά για το πειραματικό πρωτόκολλο στο οποίο θα συμμετέχω εάν υπογράψω το παρών συμφωνητικό. Συγκεκριμένα, γνωρίζω ότι **έχω την υποχρέωση**:

1. Συμπλήρωσης ερωτηματολογίου που θα περιλαμβάνει:
   - δημογραφικά στοιχεία
   - κατάσταση υγείας (ιατρικό ιστορικό ατομικό και οικογενειακό)
   - καπνιστικές συνήθειες
   - διατροφικές συνήθειες
   - φυσική δραστηριότητα.
2. Θα υποβληθώ σε μετρήσεις ανθρωπομετρικών παραμέτρων, δηλαδή ύψους, σωματικού βάρους, περιφέρειας μέσης, περιφέρειας γλουτών.
3. Να υποβληθώ σε μέτρηση ολικού σωματικού λίπους, μέτρηση αρτηριακής πίεσης, Καρδιακής συχνότητας
4. Να υποβληθώ σε λήψη αίματος όγκου 30cc
5. Να υποβληθώ σε υπέρηχο ήπατος
6. Να υποβληθώ σε μέτρηση ίνωσης ήπατος με ShearWave Ελαστογραφία
7. Θα καταναλώνω 18 γρ. σταφίδας 2 φορές την ημέρα που θα μου έχουν χορηγηθεί σε ειδικές συσκευασίες για συνολικό διάστημα 6 μηνών

Η διάρκεια της κλινικής δοκιμής θα είναι συνολικά 6 μήνες , όπου οι εθελοντές θα έρχονται στο χώρο της μελέτης για τις παραπάνω εξετάσεις στην έναρξη της μελέτης και ακολούθως στους ένα, δύο, τρείς και έξι μήνες παρέμβασης. Συγκεκριμένα, σε κάθε συνάντηση θα πραγματοποιούνται οι μετρήσεις 1-4, ενώ οι μετρήσεις 5 και 6 θα πραγματοποιηθούν μόνο στην έναρξη και το τέλος της μελέτης. Επιπλέον, καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πραγματοποιούνται τηλεφωνικές κλήσεις για τη λήψη διατροφικού ιστορικού.

Γνωρίζω ότι όλες οι παραπάνω μετρήσεις θα γίνουν υπό την επίβλεψη Ιατρού και Κλινικού Διαιτολόγου και ότι δεν προκαλούν καμία ενόχληση ούτε ενέχουν οποιονδήποτε κίνδυνο για την υγεία μου.

- **Είμαι σύμφωνος/η** να ακολουθήσω τα στάδια 1-7
- **Κατανοώ** ότι οποιαδήποτε ερωτήματα που αφορούν στη διαδικασία θα απαντηθούν πλήρως από τον Καθηγητή κ. Καραθάνο Βάϊο
- **Κατανοώ** ότι οποιαδήποτε πληροφορία αφορά σε εμένα και τα αποτελέσματα των εξετάσεών μου θα παραμείνουν απόρρητα ως προς το όνομά μου, δηλαδή δεν θα δημοσιευθούν ονομαστικά σε δημοσίευση που πιθανά προκύψει από τη μελέτη.

Εγώ ο υπογραφόμενος δίνω με ελεύθερη βούληση τη συναίνεσή μου για την **αυστηρά εθελοντική** συμμετοχή μου στη μελέτη αυτή υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Καραθάνου Βάϊου.

Ονοματεπώνυμο Εθελοντή _____
Διεύθυνση _____ ☏ _____
Τηλ.☎ Fax E-mail

Ημερομηνία ____/____/_____ Υπογραφή Εθελοντή

_____

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – FOOD FREQUENCY QUESTIONNAIRE

Τρόφιμα	Συχνότητα κατανάλωσης	Μέγεθος μερίδας
Δημητριακά ολικής αλέσεως *ψωμί* *ζυμαρικά* *ρύζι* *δημητριακά πρωινού* *φρυγανιές*		
Πατάτες *βραστές* *ψητές* *τηγανητές*		
Φρούτα και χυμούς *φρέσκα φρούτα* *αποξηραμένα φρούτα* *χυμοί*		
Λαχανικά και σαλάτες *ωμά* *βρασμένα*		
Όσπρια		
Ψάρι και σούπες *ψητό* *βραστό* *τηγανητό*		
Κόκκινο κρέας και προϊόντα του *κρέας* *αλλαντικά*		
Πουλερικά *κρέας* *αλλαντικά*		
Γαλακτοκομικά πλήρη σε λιπαρά *γάλα* *γιαούρτι* *λευκά τυριά* *κίτρινα τυριά*		
Ελαιόλαδο στην καθημερινή μαγειρική		
Αλκοολούχα ποτά *κρασί* *μπύρα* *άλλο*		
Αναψυκτικά		Coca-cola ☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ Sprite ☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ Ανθρακούχοι χυμοί ☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ Χωρίς ζάχαρη ☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ
Καφές *τύπος καφέ* *φλιτζάνια/ημέρα*		☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ ☐Ελληνικός ☐Νες / cappuccino ☐Φίλτρου ☐0-1(60 gr καφείνης) ☐1-2 ☐3-5 ☐5+
Τσάι *Φλιτζάνια/ημέρα*		☐ΝΑΙ ☐ΟΧΙ ☐0-1(60 gr τεΐνης) ☐1-2 ☐3-5 ☐5+

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ – MedDietScore

Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ

MedDietScore©

Πόσο συχνά καταναλώνετε τα παρακάτω τρόφιμα;	**Συχνότητα Κατανάλωσης** (μερίδες/εβδομάδα)					
1. Δημητριακά ολικής αλέσεως (π.χ. ψωμί, ζυμαρικά, ρύζι, κλπ)	*Ποτέ*	*1-6*	*7-12*	*13-18*	*19-31*	*>32*
	0	1	2	3	4	5
2. Πατάτες	*Ποτέ*	*1-4*	*5-8*	*9-12*	*13-18*	*>18*
	0	1	2	3	4	5
3. Φρούτα και χυμούς	*Ποτέ*	*1-4*	*5-8*	*9-15*	*16-21*	*>22*
	0	1	2	3	4	5
4. Λαχανικά και σαλάτες	*Ποτέ*	*1-6*	*7-12*	*13-20*	*21-32*	*>33*
	0	1	2	3	4	5
5. Όσπρια	*Ποτέ*	*<1*	*1-2*	*3-4*	*5-6*	*>6*
	0	1	2	3	4	5
6. Ψάρι και σούπες	*Ποτέ*	*<1*	*1-2*	*3-4*	*5-6*	*>6*
	0	1	2	3	4	5
7. Κόκκινο κρέας και προϊόντα του	*≤1*	*2-3*	*4-5*	*6-7*	*8-10*	*>10*
	5	4	3	2	1	0
8. Πουλερικά	*≤3*	*4-5*	*5-6*	*7-8*	*9-10*	*>10*
	5	4	3	2	1	0
9. Γαλακτοκομικά πλήρη σε λιπαρά	*≤10*	*11-15*	*16-20*	*21-28*	*29-30*	*>30*
	5	4	3	2	1	0
10. Ελαιόλαδο στην καθημερινή μαγειρική	*Ποτέ*	*Σπάνια*	*<1*	*1-3*	*3-5*	*καθημερινά*
	0	1	2	3	4	5
11. Αλκοολούχα ποτά (ml/ημέρα, 100 ml = 1 ποτήρι 12%)	*<300*	*300*	*400*	*500*	*600*	*>700 ή 0*
	5	4	3	2	1	0

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV – ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ 2000Kcal ΚΑΙ 2500Kcal

2000Kcal

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ

Πρωινό
1)1 ποτήρι ημίπαχο γάλα ή γιαούρτι με 1 ποτήρι δημητριακά σκέτα χωρίς ζάχαρη ή
2)1 ποτήρι ημίπαχο γάλα ή γιαούρτι με 2-3 φρυγανιές και 2κ.γ. μέλι/μαρμελάδα ή

Δεκατιανό
1) 2 μερίδες φρούτου ή
2) 1 μικρό κουλούρι Θεσσαλονίκης ή
3) 1 τοστ με 1 φέτα τυρί ελαφρύ (30γρ) και 1 φέτα γαλοπούλα (30γρ) ή
4) 1 γιαούρτι ημίπαχο

Κυρίως γεύμα στο σπίτι
-**Επιλογές Σαλάτας:**
1) 2 ποτήρια ωμή σαλάτα π.χ. μαρούλι, λάχανο, καρότο, τομάτα, αγγούρι ή συνδυασμός τους ή
2) 1 ποτήρι σαλάτα βραστή π.χ. κολοκυθάκια, μπρόκολο, κουνουπίδι ή
-**Επιλογές Κυρίως Πιάτου:**
1) 120γρ κόκκινο κρέας π.χ. μπριζόλα, μπιφτέκι, φιλέτο με 1 φέτα ψωμί και:
-1 ποτήρι ρύζι βρασμένο ή
-1 ποτήρι μακαρόνια βρασμένα και αβουτύρωτα
-3 μικρές στο μέγεθος του αβγού/1 μέτρια πατάτα βραστή/ψητή ή
-1.5 ποτήρι αρακάς μαγειρεμένος
2) 120γρ κοτόπουλο ψητό κατά προτίμηση στήθος με 1 φέτα ψωμί και:
-1 ποτήρι ρύζι βρασμένο ή
-1 ποτήρι μακαρόνια βρασμένα και αβουτύρωτα
-3 μικρές στο μέγεθος του αβγού/1 μέτρια πατάτα βραστή/ψητή ή
-1,5 ποτήρι αρακάς μαγειρεμένος
3) 120γρ ψάρι ψητό/βραστό με 3 μικρές/1 μέτρια πατάτα βραστή/ψητή ή 2-3 φέτες ψωμί
4) 1 και 1/3 ποτήρι μακαρόνια βρασμένα και αβουτύρωτα με 1 κουταλιά τριμμένο τυρί light και:
-3 κουταλιές κιμά μοσχαρίσιο ή
-4 κουταλιές κόκκινη σάλτσα
5) 1,5 ποτήρια όσπρια (ρεβύθια, φασόλια, φακές, φάβα) ή λαδερά μαγειρεμένα (φασολάκια, μπριάμ, μπάμιες, γεμιστά) με 60γρ τυρί light και 1 φέτα ψωμί

Το κυρίως γεύμα δεν πρέπει να ξεπερνά τα 4-5κ.γ. σε ελαιόλαδο

Απογευματινό
1) 1 γιαούρτι ημίπαχο ή
2) 1 μπάρα δημητριακών

Βραδινό
1) 1 ποτήρι γάλα 1.5% με 1 ποτήρι δημητριακά σκέτα χωρίς ζάχαρη ή
2) 1 κεσεδάκι γιαούρτι 2% με 1 ποτήρι δημητριακά σκέτα χωρίς ζάχαρη ή
3) 1 μικρή αραβική πίτα ή τοστ με 1 φέτα (30γρ) τυρί light, 1 φέτα (30γρ) γαλοπούλα ή
4) 1 ποτήρι σαλάτα με 60γρ τόνο σε νερό, 3-4 φρυγανιές και 2 κ.γ. ελαιόλαδο ή
5) 1 ποτήρι σαλάτα με 60γρ κοτόπουλο στήθος ψητό, 3-4 φρυγανιές και 2 κ.γ. ελαιόλαδο ή
6) 1 ποτήρι σαλάτα και 1 αυγό βραστό με 1 φέτα ψωμί ή
7) 2/3 μερίδας μεσημεριανού

2500Kcal

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ

Πρωινό
1)1 ποτήρι ημίπαχο γάλα ή γιαούρτι με 1 ποτήρι δημητριακά σκέτα χωρίς ζάχαρη ή
2)1 ποτήρι ημίπαχο γάλα ή γιαούρτι με 2-3 φρυγανιές και 2κ.γ. μέλι/μαρμελάδα ή

Δεκατιανό
1) 2 μερίδες φρούτου ή
2) 1 μικρό κουλούρι Θεσσαλονίκης ή
3) 1 τοστ με 1 φέτα τυρί ελαφρύ (30γρ) και 1 φέτα γαλοπούλα (30γρ) ή
4) 1 γιαούρτι ημίπαχο

Κυρίως γεύμα στο σπίτι
-**Επιλογές Σαλάτας:**
1) 2 ποτήρια ωμή σαλάτα π.χ. μαρούλι, λάχανο, καρότο, τομάτα, αγγούρι ή συνδυασμός τους ή
2) 1 ποτήρι σαλάτα βραστή π.χ. κολοκυθάκια, μπρόκολο, κουνουπίδι ή
-**Επιλογές Κυρίως Πιάτου:**
1) 180γρ κόκκινο κρέας π.χ. μπριζόλα, μπιφτέκι, φιλέτο με 1 φέτα ψωμί και:
-1 ποτήρι ρύζι βρασμένο ή
-1 ποτήρι μακαρόνια βρασμένα και αβουτύρωτα
-3 μικρές στο μέγεθος του αβγού/1 μέτρια πατάτα βραστή/ψητή ή
-1.5 ποτήρι αρακάς μαγειρεμένος
2) 180γρ κοτόπουλο ψητό κατά προτίμηση στήθος με 1 φέτα ψωμί και:
-1 ποτήρι ρύζι βρασμένο ή
-1 ποτήρι μακαρόνια βρασμένα και αβουτύρωτα
-3 μικρές στο μέγεθος του αβγού/1 μέτρια πατάτα βραστή/ψητή ή
-1,5 ποτήρι αρακάς μαγειρεμένος
3) 180γρ ψάρι ψητό/βραστό με 3 μικρές/1 μέτρια πατάτα βραστή/ψητή ή 2-3 φέτες ψωμί
4) 1 και 1/3 ποτήρι μακαρόνια βρασμένα και αβουτύρωτα με 1 κουταλιά τριμμένο τυρί light και:
-3 κουταλιές κιμά μοσχαρίσιο ή
-4 κουταλιές κόκκινη σάλτσα
5) 1,5 ποτήρια όσπρια (ρεβύθια, φασόλια, φακές, φάβα) ή λαδερά μαγειρεμένα (φασολάκια, μπριάμ, μπάμιες, γεμιστά) με 90γρ τυρί light και 1 φέτα ψωμί

Το κυρίως γεύμα δεν πρέπει να ξεπερνά τα 4-5κ.γ. σε ελαιόλαδο

Απογευματινό
1) 1 γιαούρτι ημίπαχο ή
2) 1 μπάρα δημητριακών

Βραδινό
1) 1 ποτήρι γάλα 1.5% με 1 ποτήρι δημητριακά σκέτα χωρίς ζάχαρη ή
2) 1 κεσεδάκι γιαούρτι 2% με 1 ποτήρι δημητριακά σκέτα χωρίς ζάχαρη ή
3) 1 μικρή αραβική πίτα ή τοστ με 1 φέτα (30γρ) τυρί light, 1 φέτα (30γρ) γαλοπούλα ή
4) 1 ποτήρι σαλάτα με 90γρ τόνο σε νερό, 3-4 φρυγανιές και 2 κ.γ. ελαιόλαδο ή
5) 1 ποτήρι σαλάτα με 90γρ κοτόπουλο στήθος ψητό, 3-4 φρυγανιές και 2 κ.γ. ελαιόλαδο ή
6) 1 ποτήρι σαλάτα και 1 αυγό βραστό με 1 φέτα ψωμί ή
7) 2/3 μερίδας μεσημεριανού

ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ

ΠΡΟΣΟΧΗ!

- ☐ 1 ποτήρι είναι 240ml ή διαφορετικά 1 πλαστικό ποτήρι νερού
- ☐ 1 φέτα ψωμί είναι 30γρ και ισοδυναμεί με 2 φρυγανιές ή 4 κράκερς
- ☐ 30γρ κρέας ή τυρί ισοδυναμεί με ένα σπιρτόκουτο σε ύψος και πάχος
- ☐ 1 μικρή πατάτα είναι 75γρ
- ☐ **Τυριά light** είναι:
  - -κίτρινα τυριά τύπου Milner, Dirollo
  - -λευκά τυριά τύπου φέτας π.χ. Μιλνερ, Ήπειρος, καθώς και μυτζήθρα/ανθότυρο
  - -λευκά μαλακά τυριά: cottage, Philadelphia, Κατίκι Δομοκού

Συστήνονται

- ☐ 6-8 ποτήρια νερό την ημέρα
- ☐ τουλάχιστον 1 ποτήρι γάλα /ημέρα
- ☐ τα φαγητά να μαγειρεύονται με ελαιόλαδο
- ☐ το ελαιόλαδο να μην ξεπερνά τα 6 κ.γ. την ημέρα
- ☐ τουλάχιστον 1 φορά την εβδομάδα ψάρι
- ☐ τουλάχιστον 2 φορές την εβδομάδα όσπρια / λαδερά
- ☐ όχι πάνω από 1 φορά κόκκινο κρέας την εβδομάδα
- ☐ όχι πάνω από 2 φορές το μήνα τηγανιτά
- ☐ όχι πάνω από 3 αυγά την εβδομάδα
- ☐ **κατανάλωση γλυκών όχι πάνω από 1 ή 2 φορές την εβδομάδα**
- ☐ το ίδιο ισχύει για τα αναψυκτικά

Φρούτα & Χυμοί

Μία μερίδα φρούτου αντιστοιχεί σε 15g υδατανθράκων και 60 περίπου θερμίδες.
Παρακάτω, δίνονται οι ισοδυναμίες των γνωστότερων φρούτων και χυμών που αντιστοιχούν σε μία μερίδα φρούτου στο διαιτολόγιο.

Ακτινίδιο	1 μέτριο
Αχλάδι	1 μέτριο
Ανανάς	1/2 φλιτζάνι
Ανανάς χυμός	1/3 φλιτζάνι
Βερίκοκα	2 μέτρια
Βερίκοκα χυμός	1/3 φλιτζάνι
Γιαρμάς	1 μέτριος
Γκρέιπ-φρουτ χυμός	½ φλιτζάνι
Κεράσια	10 μεγάλα
Καρπούζι	1 φλιτζάνι (175g)
Μανταρίνι	1 μεγάλο (120g)
Μάνγκο	1/2 μέτριο
Μήλο	1 μέτριο
Μήλο χυμός	1/3 φλιτζάνι
Μούρα	1/2 φλιτζάνι
Μπανάνα	1/2 μέτρια
Νεκταρίνι	1 μέτριο
Πεπόνι	3/4 φλιτζάνι
Πορτοκάλι	1 μέτριο
Πορτοκάλι χυμός	1/2 φλιτζάνι
Ροδάκινο	1 μέτριο
Φράουλες	1/2 φλιτζάνι

