

Συσχέτιση των επιπέδων λεπτίνης με τη βαρύτητα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος: Μελέτη Hellenic NAFLD.

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Σουλαϊδοπούλου Σπυριδούλα

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας Διατροφής
ΠΜΣ Εφαρμοσμένη Διαιτολογία Διατροφή
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Αθήνα 2016

Συσχέτιση των επιπέδων λεπτίνης με τη βαρύτητα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος: Μελέτη Hellenic NAFLD.

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Σουλαϊδοπούλου Σπυριδούλα

Εξεταστική Επιτροπή:

Ανδριάννα Χ. Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Γεώργιος Δεδούσης, Καθηγητής

Γιαννακούρης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση μιας έρευνας και η επίτευξη του αρχικού στόχου, η διεξαγωγή ενός συμπεράσματος, το οποίο μπορεί να αποτελέσει και βάση για περαιτέρω έρευνες, δεν είναι αποτέλεσμα ατομικής προσπάθειας μόνο, αλλά συλλογικής.

Στην ολοκλήρωση της έρευνας και στα κομμάτια της συγγραφής, συμμετείχε μία ομάδα ατόμων, χωρίς την βοήθεια των οποίων, δεν θα είχε ολοκληρωθεί. Αρχικά, πρέπει να δοθούν ευχαριστίες στην κυρία Καλιώρα και στον κύριο Δεδούση, που εμπιστεύτηκαν και ανέθεσαν αυτήν την έρευνα, αλλά και κυρίως στις διδακτορικούς Καλαφάτη Νάνα και Κατσαρέλη Έφη, των οποίων η βοήθεια, οι γνώσεις, η υπομονή και ο χρόνος ήταν πολύτιμοι για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Η έρευνα και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στον χώρο του εργαστηρίου του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
Ορισμός NAFLD.....	7
Επιδημιολογία.....	7
Διάγνωση.....	8
Παραεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης.....	9
Μη- παραεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης	11
Λοιπές παραεμβατικές μέθοδοι.....	12
Παθογένεια της νόσου.....	13
Παχυσαρκία και NAFLD.....	14
Διατροφή και NAFLD.....	16
Λεπτίνη και NAFLD.....	21
Περιφερική δράση της λεπτίνης.....	22
Κεντρικές δράσεις της λεπτίνης.....	22
Λεπτίνη και ομοιόσταση.....	23
Λεπτίνη, Παχυσαρκία και NAFLD.....	24
Σκοπός.....	25
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	26
Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά.....	26
Εργαστηριακές μετρήσεις.....	26
Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων.....	26
Μέτρηση των επιπέδων λεπτίνης.....	26
Πρωτόκολλο ELISA.....	27
Εργαστηριακός εξοπλισμός για τις μετρήσεις λεπτίνης.....	29
Στατιστική Ανάλυση.....	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD), αποτελεί μία ασθένεια που προσβάλλει ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού, το 50% των διαβητικών, και το 80% των παχύσαρκων. Η παθογένεια της ασθένειας είναι άγνωστη μέχρι τώρα, ενώ αυτό που εξετάζεται ταυτόχρονα, είναι οι συμπαράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν στην εμφάνισή της. Το κύριο κριτήριο για τον διαχωρισμό από άλλα νοσήματα, είναι ο αποκλεισμός της υπέρμετρης κατανάλωσης αλκοόλ, και η εξέταση μέσω ηπατικής βιοψίας και άλλων δεικτών. Στην παρούσα μελέτη, η οποία είναι μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων, έγινε ανάλυση σε ορούς πλάσματος 414 ατόμων, από τα οποία τα 150 ήταν υγιή, ενώ τα 264 έπασχαν από λιπώδη διήθηση. Οι συμμετέχοντες επιλέχθηκαν τυχαία, και διαχωρίστηκαν σε υγιείς και ασθενείς. Αφού έγινε καταγραφή των ανθρωπομετρικών στοιχείων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στους ορούς πλάσματος, με σκοπό να μετρηθεί η λεπτίνη, διάφοροι ηπατικοί ενζυμικοί δείκτες (SGOT, SGPT) καθώς και ο υπολογισμός του λόγου αυτών. Ο σκοπός ήταν η εξέταση των επιπέδων λεπτίνης σε συνάρτηση με τη λιπώδη διήθηση, και η διερεύνηση ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ αυτών. Αφού πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των ηπατικών ενζύμων, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων λεπτίνης, όπου με την αύξηση αυτών, αυξανόταν επίσης και η συχνότητα εμφάνισης της διήθησης.

Στα αποτελέσματα, φάνηκε πως η αύξηση των επιπέδων λεπτίνης στο αίμα, είναι αναλογική με την συχνότητα εμφάνισης της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου, υπάρχει δηλαδή συσχέτιση των επιπέδων με αυτήν.

1α. Λέξεις κλειδιά: μη αλκοολική λιπώδης νόσος (NAFLD), λεπτίνη, κλινική δοκιμή, ανασκόπηση, παχυσαρκία

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), is a disease which affects a large proportion cohort of patients, which, due to statistics, is a 50% of diabetic patients, and 80% of the obese. The pathogenesis of the disease is unknown up to now, whilst a variety of co-factors are being scanned, in order to clarify the relationship between them and the NAFLD. The main criteria to distinguish NAFLD from other liver diseases, is the exclusion of excessive alcohol consumption, and through examination of liver biopsy and other indicators. In the present study, case- control study was carried out, on which the serum plasma 414 individuals was measured, of whom 150 were healthy while 264 suffered from fatty liver infiltration. After having recorded the anthropometric data were measured in the sera of plasma, in order to measure leptin levels, various liver enzyme markers (SGOT, SGPT), the SGOT/SGPT ratio, and the investigation of any kind of correlation between them and the NAFLD. The purpose was to examine the levels of the leptin serum in the incidence of nonalcoholic fatty infiltration, and the correlation establishment (if any) between them. After the measurements were performed in liver enzymes, a correlation was observed between the levels of leptin and the appearance of the NAFLD. In particular, when serum leptin levels are increased, the appearance of the disease is more often.

The results have shown that the increased levels of leptin in blood are associated with the frequency of the appearance of the non alcoholic fatty liver disease, which in other words, means there is a correlation between the leptin levels and the disease.

1a. Keywords: non-alcoholic fatty disease (NAFLD), leptin, clinical testing, review, obesity

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ορισμός NAFLD

Η NAFLD (non alcoholic fatty liver disease ή αλλιώς μη- αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος), ορίζεται, ως η συσσώρευση πλεονάζοντος λίπους στο ήπαρ σε ποσοστό άνω του 5% των ηπατοκυττάρων με τη μορφή φυσαλίδων απουσία κατανάλωσης αλκοόλ, και μπορεί να αποτελεί και το 5%-10% του ηπατικού βάρους (1, 2). Είναι η πιο συχνή χρόνια ηπατική αθένεια. Παγκοσμίως, επικρατεί σε ποσοστά 20-30% (3). Στην NAFLD υπάρχουν διάφορα στάδια προσβολής του ήπατος, και μπορεί να ξεκινήσει από απλή στεάτωση, και να καταλήξει σε μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH), και μέχρι και σε κίρρωση του ήπατος, με ταυτόχρονα υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος. (4) Τα ακριβή αίτια εμφάνισης της νόσου δεν είναι γνωστά, υπάρχουν όμως διάφορες συσχετίσεις με παθολογικές καταστάσεις, που συνδέονται με την εμφάνιση αυτής. Για παράδειγμα, μία συσχέτιση με την εμφάνιση της νόσου μπορεί να γίνει με την αντίσταση στην ινσουλίνη (5), όπως για παράδειγμα στις γυναίκες, όπου μετά την εγκυμοσύνη υπάρχει αυξημένη ινσουλινοαντίσταση και αύξηση του σπλαχνικού λίπους, συνεπώς και αύξηση επικινδυνότητας για την εμφάνιση της NAFLD (6) . Διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας έχει παρατηρηθεί ανάμεσα στα δύο φύλα, την συνύπαρξη παχυσαρκίας αλλά και άλλων ασθενειών (7-10).

Επιδημιολογία

Η ασθένεια προσβάλλει το ένα τρίτο του πληθυσμού παγκοσμίως, χωρίς διάκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, αν και φαίνεται πως οι γυναίκες τείνουν να αναπτύσσουν μία πιο εξελιγμένη μορφή της νόσου (11-17). Σχετίζεται άμεσα με την παχυσαρκία και τον σακχαρώδη διαβήτη, αφού στο ποσοστό των παχυσάρκων παγκοσμίως, το 40-90% αυτών πάσχει από την μη αλκοολική λιπώδη νόσο (Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος ($BMI > 25$) αλλά και με την περίμετρο μέσης. (25, 26) Στις ανεπτυγμένες χώρες, έχει παρατηρηθεί αύξηση του ποσοστού που προσβάλλεται από την ασθένεια, κάτι το οποίο συσχετίζεται άμεσα με άλλους παράγοντες όπως το όπως το μεταβολικό σύνδρομο, τον διαβήτη τύπου 2, την υπέρταση και την υπερτριγλυκεριδαμία. Άλλοι λόγοι εμφάνισης της ασθένειας είναι λιποδυστροφία, διατροφικά

αίτια όπως υπέρμετρη κατανάλωση λίπους, έλλειψη βασικών θρεπτικών συστατικών, βιταμινών, φυτικών ινών κλπ, ολική παρεντερική διατροφή κ.α. (21- 23).

Στις ΗΠΑ, σε έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί σε πληθυσμό που έπασχε από NAFLD, φάνηκε πως το 1/4 αυτού ήταν υπέρβαρο, και το 80% αυτού του ποσοστού είχε αναπτύξει NAFLD. (24). Στην Ελλάδα, το ποσοστό το οποίο πάσχει από NAFLD σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα ήταν 32% του πληθυσμού.

Στη σύγκριση ανάμεσα σε φυλετικές ομάδες, φαίνεται να υπάρχουν κάποιες διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης της νόσου, με μεγαλύτερη διαφορά στους Αфро-Αμερικανούς, στους οποίους τα ποσοστά είναι αρκετά μικρότερα σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς (18).

Εμφανίζεται συνήθως ανάμεσα στην 4η και 5η δεκαετία της ζωής, αλλά και σε παιδιά (3% επιπολασμός) (19, 20), κάτι το οποίο εκτοξεύεται όταν υπάρχει προδιάθεση παχυσαρκίας (53% επιπολασμός) (18).

Η πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας είναι η μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH), η οποία σπανίζει στον γενικό πληθυσμό, με ποσοστά εμφάνισης 2-3% του συνόλου, ενώ στους παχύσαρκους μπορεί να αγγίζει μέχρι και το 37% (27). Όταν ο δείκτης μάζας σώματος είναι άνω του 40, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας είναι 90% ενώ ο επιπολασμός για NASH αγγίζει το 2-3% (24).

Διάγνωση

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει στις περιπτώσεις με NAFLD, είναι η δυσκολία στην διάγνωση, αφού είναι δύσκολη η διάκριση ανάμεσα σε διάφορες ασθένειες του ήπατος. Αφορμή για την διερεύνηση ύπαρξης αυτής είναι η εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης απουσία συστηματικής και υπέρμετρης κατανάλωσης αλκοόλ, και ο αποκλεισμός ύπαρξης άλλων νόσων.

Το πρώτο κριτήριο είναι ο αποκλεισμός της υπέρμετρης κατανάλωσης αλκοόλ (> 30 g/ ημέρα για άνδρες και > 20 g/ημέρα για γυναίκες σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας - WHO), ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της απόπτωσης του ήπατος λόγω αυτού. Πρέπει επίσης να αποκλειστεί το ενδεχόμενο για χρόνια ηπατοπάθεια, και διάφορες άλλες παθήσεις που μπορεί να έχουν προκαλέσει την ηπατική στεάτωση. Έτσι εξαιρούνται οι ασθενείς με οποιαδήποτε άλλη νόσο του ήπατος, όπως για παράδειγμα ηπατίτιδα Β και

C, άτομα που έχουν προσβληθεί από τοξικότητα φαρμάκων, με αυτοάνοσα νοσήματα, αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, αλλά και γενετικές ανωμαλίες αυτού.

Στη συνέχεια, εφαρμόζονται κάποιες από τις παρακάτω μεθόδους απεικόνισης του ήπατος, με σκοπό την έγκυρη διάγνωσή του. Υπάρχουν δύο κατηγορίες διάγνωσης της NAFLD, οι μη-παρεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης, και οι παρεμβατικές.

Παρεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης

Στις παρεμβατικές μεθόδους, ανήκει η βιοψία ήπατος, το χρυσό κλειδί για την απεικόνιση του ήπατος και την έγκυρη διάγνωση της ασθένειας.

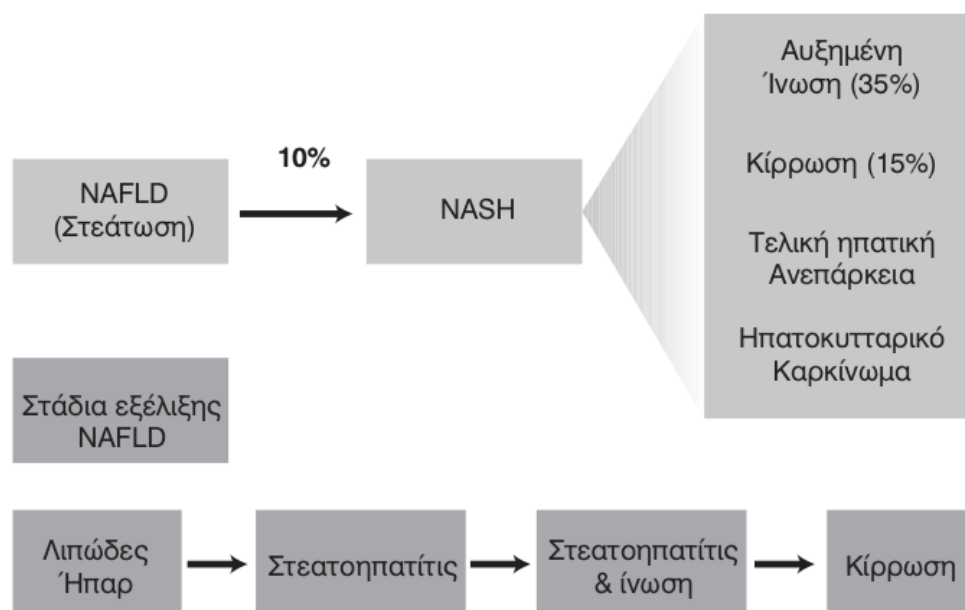
Βιοψία Ήπατος:

Η βιοψία ήπατος είναι σήμερα η “χρυσή μέθοδος” απεικόνισης και διάγνωσης της NAFLD (28), αφού επιτρέπει τον αποκλεισμό άλλων αιτιών βλάβης του ήπατος, αλλά και την εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας, καθώς μπορεί να γίνει διαχωρισμός ανάμεσα στην απλή στεάτωση, την στεατοηπατίτιδα, και την ίνωση (29, 30). Το μειονέκτημα εδώ είναι πως ως παρεμβατική μέθοδος, υπάρχουν οι πιθανοί κίνδυνοι της παρέμβασης, αλλά και η υποκειμενικότητα στη διάγνωση του ηπατολόγου (31, 32). Ο διαχωρισμός μεταξύ ηπατικής στεάτωσης και στεατοηπατίτιδας είναι ξεκάθαρος, μπορούν παρ’ όλα αυτά πολλές φορές να υπάρξουν διαφωνίες λόγω των διαφόρων σταδίων της NAFLD. Ένα δεύτερο μειονέκτημα είναι ότι απεικονίζεται ένα μικρό παρέγχυμα του ήπατος, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα της ηπατικής βλάβης. Κάτι σημαντικό όμως το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο είναι η εξατομίκευση

Βιοδείκτες ορού:

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με NAFLD, σε αρχικό στάδιο της νόσου, δεν παρουσιάζει συμπτώματα ηπατικής νόσου (το 80% περίπου των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί) (33, 34). Μερικά από τα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιάσουν είναι κόπωση, δυσφορία, και

καταβολή. Σαν κλινική εικόνα εμφανίζεται συνήθως υπερβάλλον βάρος, μικρή ευαισθησία στο δεξιό υποχόνδριο και ηπατομεγαλία (33, 34) (εικ. 1)



Εικ. 1. Εξέλιξη της NAFLD.

Ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών (33% των ασθενών) εμφανίζει κάποια συμπτώματα όπως σε μικρό βαθμό εύκολη κόπωση και καταβολή (16), επιγαστρική δυσφορία, κούραση, ναυτία, ανορεξία, κνησμό, και συνήθως αυτά τα συμπτώματα καθ' ότι ελαφριά, συνήθως παραλείπονται να αναφερθούν από τους ασθενείς. (16, 18, 19).

Με την επιδείνωση της νόσου, τα συμπτώματα γίνονται πιο έντονα, από τα οποία τα πιο συνήθη είναι πόνος στο άνω δεξιό τεταρτημόριο, όπως επίσης και ηπατομεγαλία σε μικρό ή ήπιο βαθμό (35, 37). Όσον αφορά τις βιοχημικές εξετάσεις, στα άτομα αυτά εμφανίζονται αρχικά αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων (αναφέρεται βέβαια ότι το 70% των ασθενών έχουν

φυσιολογικά επίπεδα ηπατικών ενζύμων, κάτι που αποκλείει δηλαδή τις μετρήσεις αυτές ως διαγνωστικό μέσο), τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης είναι 2-3 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά στο 50% των ασθενών, όπως επίσης και η φερριτίνη (32), ενώ εμφανίζονται ταυτόχρονα υπερλιπιδαιμία, υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιναιμία αλλά και μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, και αύξηση γλυκόζης ορού, ενώ οι τα ηπατικά ένζυμα μπορούν να φτάσουν και 4 φορές υψηλότερα του κανονικού (16). Τέλος, μπορεί να υπάρχει υπέρχρωση του δέρματος σε άτομα που έχουν αντίσταση στην ινσουλίνη, ή διαβήτη τύπου 2 (16).

Ένας τρόπος αξιολόγησης των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων είναι ο λόγος AST/ALT <1 (ο λόγος των ασπαρτικών τρανσαμινασών προς τις αλανινικές τρανσαμινάσες). Ο λόγος αυτός όταν είναι <1 υποδεικνύει κάποιου είδους βλάβη στο ήπαρ ή ηπατοτοξικότητα (32). Αντιστροφή αυτού του λόγου μπορεί να υποδηλώνει εξέλιξη σε κίρρωση στους ασθενείς αυτούς. Σε περιπτώσεις που οι αμινοτρανσφεράσες είναι φυσιολογικές, μπορεί να υπάρχουν όλα τα υπόλοιπα συμπτώματα τα οποία υποδηλώνουν από καλοήγη στεάτωση μέχρι κίρρωση. Οι τιμές των αμινοτρανσφερασών του ορού μπορεί να έχουν μεγάλη διακύμανση κατά την πορεία της νόσου (36), και δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των εξετάσεων ορού πλάσματος και της ηπατικής -φλεγμονώδους δραστηριότητας. Κοιλιακό υπερηχογράφημα, αξονική τομογραφία, και μαγνητική τομογραφία, μπορούν να δείξουν την ύπαρξη ασθένειας NAFLD αλλά δεν μπορεί να διαχωριστεί από την απλή καλοήγη μη- αλκοολική στεάτωση (NASH). Παρ' όλα αυτά μια μέτρηση με φασματοσκοπία μπορεί να δείξει τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (37).

Μη- παρεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης

Έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι αξιολόγησης της NAFLD με μη παρεμβατικές μεθόδους. Στις μεθόδους αυτές ανήκουν το υπερηχογράφημα (US), η αξονική (CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI). Το μειονέκτημα με αυτές τις μεθόδους είναι ότι καμία δεν είναι ακριβής 100% για την ηπατική στεάτωση, όπως επίσης είναι δύσκολη η διευκρίνιση του σταδίου της νόσου.

Υπερηχογράφημα:

Το υπερηχογράφημα αποτελεί έναν ανέξοδο τρόπο απεικόνισης του ήπατος, ασφαλή και μη παρεμβατικό. Οδηγεί σε μια υποκειμενική εκτίμηση της κατάστασης του ήπατος, όπου ο

διαχωρισμός όμως απλουστεύεται σε τρία στάδια, ήπια, μέτρια και σοβαρή. Περιορισμοί υπάρχουν και εδώ αφού υπάρχει αδυναμία στο να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια η λιπώδης διήθηση (40).

Αξονική τομογραφία:

Η αξονική τομογραφία είναι ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να γίνει απεικόνιση του ήπατος, και να προσδιοριστεί ποσοτικά το στάδιο της στεάτωσης. Η ευαισθησία της μεθόδου αγγίζει το 90%, οπότε μπορεί να θεωρηθεί έναν έγκυρο τρόπο διάγνωσης (40).

Μαγνητική τομογραφία:

Η μαγνητική τομογραφία είναι η πιο αξιόπιστη παρεμβατική μέθοδος απεικόνισης του ήπατος, με ποσοστό επιτυχίας μέχρι και 90%, όταν το στάδιο της ασθένειας είναι προχωρημένο (40).

Λοιπές μη-παρεμβατικές μέθοδοι

Σε συγκριτικές μελέτες όμως που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω σε εναλλακτικές μεθόδους απεικόνισης της ίνωσης, χρησιμοποιείται η ελαστογραφία, το FibroMeter (38) και το FIB-4 (39), ως κάποιες από τις ακριβέστερες. Άλλες πιο συνδυαστικές μέθοδοι είναι το Hepascore, και το Fibrotest, όπου πάλι σε σύγκριση με πιο απλές μεθόδους φάνηκαν να είναι ακριβέστερες.

Το μειονέκτημα εδώ, είναι ότι οι μετρήσεις και η αξιολόγηση πρέπει να διαφέρουν βάση κάποιων δημογραφικών χαρακτηριστικών, όπως το φύλο, η ηλικία, η φυλή. Επίσης, δεν έχει εμφανιστεί ένα σταθερό μοτίβο της διακύμανσης της ALT στον ορό, ώστε να μπορούν να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα με ακρίβεια (51).

Ένας άλλος δείκτης ο οποίος μετράται είναι ο αυτός της αντίστασης στην ινσουλίνη. Έτσι μετράται η λειτουργία των β-κυττάρων, και της αντίστασης στην ινσουλίνη, με αναφορά σε πληθυσμό φυσιολογικών ατόμων.

Τέλος, χρησιμοποιούνται επίσης και οι δείκτες ίνωσης, όπου συμπεριλαμβάνεται και ο παράγοντας NAFLD που μπορεί να επιφέρει αυτό το αποτέλεσμα.

Παθογένεια της νόσου

Το κύριο χαρακτηριστικό της NAFLD είναι η συσσώρευση τριγλυκεριδίων με την μορφή σταγονιδίων λίπους στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, συνήθως σε ποσοστό μεγαλύτερο από 5%-10%, και η δημιουργία έτσι των προϋποθέσεων για την ανάπτυξη NASH (41). Αυξημένη συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, και μειωμένη χρήση και εξαγωγή αυτών, προκαλεί αυτήν την συσσώρευση στο κυτταρόπλασμά τους. (11, 13, 42). Η περίσσεια υδατανθράκων μπορεί επίσης να οδηγήσει στην de novo σύνθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση της νόσου. Σχετίζεται άμεσα με τις συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου, του διαβήτη τύπου 2, με την αντίσταση στην ινσουλίνη, την υπέρταση, την κοιλιακή και σπλαχνική παχυσαρκία, την δυσλιπιδαιμία, και τα χαμηλά επίπεδα HDL και αυξημένα LDL. Επίσης, επιβαρυντικά λειτουργούν ο πρωτεϊνικός-θερμιδικός υποσιτιμός, και η παρατεταμένη παρεντερική διατροφή. (21, 43)

Υπόθεση δύο χτυπημάτων (2-hit hypothesis) :

Για την παθογένεια της νόσου υπάρχει η υπόθεση των δύο χτυπημάτων (2 hit hypothesis):

Αρχικά, υπάρχει η υπόθεση για “το πρώτο χτύπημα” (first hit), το οποίο είναι η συσσώρευση ηπατικών τριγλυκεριδίων, ή αλλιώς στεάτωση. Αυξάνει η ευαισθησία του ήπατος σε βλάβες που δημιουργούνται λόγω δευτερευόντων παραγόντων, όπως φλεγμονόδων ηπατοκινών/αντιποκινών, οξειδωτικού στρες, μιτοχονδριακή λειτουργία κλπ (44, 45). Ακολουθεί αύξηση του οξειδωτικού στρες, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ενδοτοξαμία. (16) Στη συνέχεια, υπάρχει η υπόθεση του “δεύτερου χτυπήματος”. Ένας άλλος παράγοντας που λειτουργεί επιβαρυντικά στην εμφάνιση βλαβών στο ήπαρ, είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αυτά εισχωρούν στο ήπαρ, και εκεί, είτε υποβάλλονται σε β-οξείδωση, είτε επανεστεροποιούνται με γλυκερόλη σχηματίζοντας τριγλυκερίδια. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μπορούν λοιπόν να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες, και την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, λειτουργώντας έτσι επιβαρυντικά για την ασθένεια (46). Μετά το επίπεδο της στεάτωσης, το ήπαρ είναι ευαίσθητο και αυξάνονται οι πιθανότητες εμφάνισης ηπατοκυτταρικής βλάβης, φλεγμονής και ίνωσης (47, 48, 49). Ως εκ τούτου, σε καταστάσεις παχυσαρκίας ή αντίστασης στην ινσουλίνη, η αυξημένη ποσότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων αυξάνει κατακόρυφα τις πιθανότητες για την στεάτωση.

Υπόθεση τριών χτυπημάτων (3- hit hypothesis):

Τέλος, έχει προταθεί και ένα “τρίτο χτύπημα” (third hit), για να ερμηνευθεί ο ανεπαρκής πολλαπλασιασμός των κυττάρων (51). Στο υγιές ήπαρ, ο κυτταρικός θάνατος διεγείρει την αντιγραφή των υγιών πρώιμων ηπατικών κυττάρων, για την αντικατάσταση των πρώτων. Ωστόσο, σε κατάσταση οξειδωτικού στρες, αναστέλλεται η αντιγραφή αυτή, και έτσι τα πρόγονα ηπατικά κύτταρα (οβάλ κύτταρα) αυξάνονται (50). Αυτά στη συνέχεια, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα ηπατικού τύπου. Τόσο τα οβάλ, όσο και τα ηπατικού τύπου κύτταρα, συνδέονται στενά με την ίνωση, προάγοντας έτσι την ασθένεια (50). Σε χρόνια ηπατική βλάβη, η ίνωση/ κίρρωση εξαρτάται από την αναγέννηση των κυττάρων, και γι’ αυτό ο κυτταρικός θάνατος θεωρείται το “τρίτο χτύπημα” της ασθένειας (51).

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα συνεπώς, είναι μία από τις κύριες αιτίες που συμβάλλουν στην επιβάρυνση της ασθένειας. Αυτά προκύπτουν από 3 πηγές: μέσω της λιπόλυσης, μέσω της διατροφής, αλλά και μέσω της de novo σύνθεσης λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με την χρήση σταθερών ισοτόπων που χρησιμοποίησαν οι Donnelly et al (52), φαίνεται πως το 60% των λιπαρών οξέων προέρχεται από την λιπόλυση, το 26% από την de novo σύνθεσή τους, και το 15% από την τροφή. Φαίνεται, τέλος, πως αλλαγές στην πρωτεΐνη μεταφοράς μικροσωματίων (MTP), αλλά και στην αποπρωτεΐνη Β, μπορούν να μειώσουν την ικανότητα καύσης και απομάκρυνσης των λιπιδίων VLDL, δημιουργώντας έτσι, άλλον έναν επιβαρυντικό παράγοντα για την NAFLD.

Παχυσαρκία και NAFLD

Η διαίτα κατέχει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της φυσικής κατάστασης, στην ομαλή λειτουργία του σώματος, και στην διατήρηση καλών επιπέδων υγείας. Όσον αφορά τη στεάτωση, η εμφάνισή της εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως αυτόν της διατροφής. Μία διατροφή υψηλή σε λιπαρά, θα επιβαρύνει την συσσώρευση λίπους στο ήπαρ, και θα επηρεάσει την επιδείνωση της νόσου. Η ακριβής επίδραση, παρόλα αυτά, της διατροφής στην ανάπτυξη της NAFLD δεν είναι γνωστή (16). Ένας άλλος παράγοντας που φαίνεται να συνδέεται με την NAFLD είναι η ινσουλινοαντίσταση, αφού υπάρχει αυξημένη συσχέτιση της δεύτερης με την εμφάνιση της πρώτης (110). Η αντίσταση στην ινσουλίνη στα β-κύτταρα, αποτρέπει την ανασταλτική επίδραση της λεπτίνης στην έκκριση ινσουλίνης.

Αναπτύσσεται έτσι υπερινσουλιναιμία, όπου μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη της NAFLD. Λόγω ινσουλिनoαντίστασης, παρατηρείται μια σύνδεση αυξημένου βάρους, υψηλού ΔΜΣ δηλαδή, με την NAFLD. Η ινσουλινoαντίσταση με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε σακχαρώδη διαβητη τύπου 2, και μεταβολικό σύνδρομο. Σε προχωρημένο στάδιο, στα άτομα στα οποία έχει εμφανιστεί ο ΣΔ2, η ασθένεια μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση ή NASH. Αυτά σε συνδυασμό με το αυξημένο βάρος και την κατάσταση παχυσαρκίας, αποτελούν δυο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της ηπατικής αυτής νόσου.

Στους ασθενείς με NAFLD, έχει βρεθεί ότι η διατροφή που ακολουθούν είναι συνήθως υψηλή σε λιπαρά οξέα και χοληστερόλη, και φτωχή σε άλλα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως φυτικές ίνες, βιταμίνες (κυρίως E και C), καθώς και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (52). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα επιβαρύνουν τον οργανισμό (για παράδειγμα τα υψηλά τριγλυκερίδια πλάσματος μεταγευματικά) και οδηγούν στην ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου (58). Σε περιπτώσεις αυξημένης αντίστασης στην ινσουλίνη, αυξάνεται η μετατροπή τριγλυκεριδίων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και κατά συνέπεια και η αύξηση κυκλοφορίας αυτών στο αίμα (58).

Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει στην αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη, είναι η μειωμένη λειτουργία λεπτίνης. Η λεπτίνη είναι η ορμόνη η οποία παράγεται στο ήπαρ και παίζει καθοριστικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Με την δράση της λεπτίνης αναστέλλεται η λιπογένεση και η συσσώρευση λίπους στα όργανα, κι έτσι αυτά δεν επιβαρύνονται από το υπερβάλλον λίπος (58, 60). Απουσία ή μειωμένη δράση αυτής, σημαίνει μειωμένη ανάπτυξη του λιπώδους ιστού, και συσσώρευση του λίπους σε όργανα όπως το ήπαρ ή την καρδιά, με αποτέλεσμα κατά συνέπεια την αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη. Γι' αυτό και η απουσία ή η μειωμένη ευαισθησία αυτής σχετίζεται με λιποδυστροφίες (57).

Εκτός από την αντίσταση στην ινσουλίνη, σημαντικό επιβαρυντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου φαίνεται να κατέχει το οξειδωτικό stress, το οποίο προκύπτει από την αυξημένη είσοδο ελεύθερων λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη, τα οποία με την σειρά τους αυξάνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, την υπεροξείδωση των λιπιδίων άρα και το οξειδωτικό stress (59). Με την εμφάνιση αυτού, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και τελικά, απόπτωση των κυττάρων του ήπατος (52).

Τέλος, γενετικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της νόσου, όπως γονίδια που ελέγχουν την απόκριση στην ινσουλίνη, γονίδια που ελέγχουν τον μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ (61), γονίδια υπεύθυνα για την παχυσαρκία, αλλά και για το οξειδωτικό stress (60, 61).

Η παχυσαρκία μπορεί να οριστεί και ως μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση, καθότι σχετίζεται με την αυξημένη ύπαρξη κυτοκινών, όπως η Ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η αδιπονεκτίνη, η λεπτίνη, και ο παράγοντας νέκρωσης (TNF-α), οι οποίες αποτελούν σημαντικό επιβαρυντικό παράγοντα για την ανάπτυξη της NAFLD. Συνεπώς εμφανίζεται μια σύνδεση του λιπώδους ιστού και της ασθένειας, αφού φαίνεται πως ο πρώτος είναι πηγή φλεγμονώδων αλλά και αντιφλεγμονώδων παραγόντων (13, 14, 15, 42,). Φυσιολογικά, αυτές οι ορμόνες μπορούν να συνυπάρχουν και να συνεργάζονται σε ισορροπία, αυτή όμως η ομοιόσταση διαταράσσεται από την ύπαρξη NASH, και έτσι παρατηρείται διακύμανση αυτών, όπως μειωμένη αδιπονεκτίνη και αυξημένη TNF-α. Στην ρύθμιση της NAFLD πολλαπλοί είναι οι μηχανισμοί που μπορεί να παίζουν ρόλο στην ηπατοκυτταρική βλάβη, και στην ανάπτυξη NASH. Μερικοί από αυτούς είναι το οξειδωτικό stress και τα μειωμένα οξειδωτικά, η υπεροξείδωση των λιπιδίων, οι δραστικοί μεταβολίτες, η αυξημένη εντερική διαπερατότητα με συνέπεια την εντερική διαρροή καθώς και η γενετική προδιάθεση (54, 57, 58, 60).

Διατροφή και NAFLD

Οι παρεμβάσεις που έχουν γίνει σε άτομα με NAFLD στοχεύουν την προώθηση της απώλειας βάρους καθώς η διατροφή που συνήθως ακολουθούνταν ήταν όπως προαναφέρθηκε άστατη και ελλειπής σε πολλά θρεπτικά συστατικά. Τα άτομα που πάσχουν από NASH ειδικότερα, συνήθως καταναλώνουν υψηλές ποσότητες θερμίδων, κορεσμένο λίπος, χοληστερόλη, ενώ φαίνεται πως μειωμένα είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οι φυτικές ίνες, οι βιταμίνες και κυρίως οι C και E κ.α. Λόγω αυτού του είδους της διατροφής, αυξάνεται το σωματικό βάρος, προκύπτουν διάφορες ασθένειες όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ενώ φαίνεται πως η απώλεια βάρους μπορεί να μειώσει τους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την NASH και την ίνωση (53).

Στην έρευνα που πραγματοποίησαν ο Yang και οι συνεργάτες του, μετά από διατροφική παρέμβαση 3 μηνών σε παχύσαρκα άτομα με NAFLD, μειώθηκαν ο δείκτης μάζας σώματος, η περιφέρεια μέσης, τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών στο αίμα, τα επίπεδα GGT, αλλά και το σπλαχνικό και ηπατικό λίπος (16). Το πρωτόκολλο δίαιτας που ακολουθήθηκε στην έρευνα ήταν περιορισμός 500-600 θερμίδων την ημέρα, αποτελούνταν από 55% υδατάνθρακες, 15% πρωτεΐνες, και 30% λίπος, η χοληστερόλη ήταν κάτω των 300 mg ημερησίως, ενώ λαμβάνονταν τουλάχιστον 20-30 γρ φυτικών ινών. (54).

Σύμφωνα με την AGA (American Gastroenterological Association- Ένωση Γαστρεντερολόγων Αμερικής) η σύσταση είναι απώλεια 3-5% του αρχικού βάρους για την βελτίωση της στεάτωσης, ενώ απώλεια 10% του βάρους μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση της στεατοηπατίτιδας. Οι συστάσεις στις επιμέρους διατροφικές ομάδες είναι:

- 1) **Υδατάνθρακες:** φαίνεται πως η υπερβολική κατανάλωση υδατανθράκων μπορεί να είναι επιζήμια και να επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου. Δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες (λιγότερο από 45% της ημερήσιας πρόσληψης θερμιδών) μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση των μεταβολικών παραγόντων, μέσω μείωσης του ολικού και ειδικότερα του ενδοηπατικού λίπους και ειδικότερα των τριγλυκεριδίων, και να αυξήσει την HDL. Αυτό όμως που φαίνεται να είναι ακόμα πιο σημαντικό στην πρόσληψη υδατανθράκων, είναι το είδος και όχι η ποσότητα αυτών. Δίαιτα υψηλή σε φρουκτόζη ευνοεί την ανάπτυξη της NAFLD, αφού η πρώτη προωθεί την de novo λιπογένεση μέσω αναστολής της έκκρισης της λεπτίνης, η οποία έχει ως ρόλο την μείωση του κορεσμού. Αυξάνει έτσι η θερμιδική πρόσληψη άρα και η συσσώρευση περισσότερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ (55, 56). Προτείνεται λοιπόν 45-60% κατανάλωση υδατανθράκων την ημέρα, αλλά μειωμένη πρόσληψη από γλυκαντικές ουσίες, όπως η φρουκτόζη, ενώ συστήνονται η αύξηση της κατανάλωσης υδατανθράκων μέσω φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, δημητριακών και γαλακτοκομικών με μειωμένα λιπαρά. (57, 58)
- 2) **Πρωτεΐνες:** λίγα είναι γνωστά για την επίδραση των πρωτεϊνών στην NAFLD. Σε έρευνες έχει βρεθεί ότι η δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνες, συμβάλλει στην βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, στην διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης, και των ηπατικών ενζύμων. Ο υποσιτισμός και η ανεπάρκεια πρωτεϊνών στην διατροφή προκαλούν στεάτωση, ενώ η υπερβολική κατανάλωση αυτών μπορεί να προκαλέσει σπειραματική σκλήρυνση, υπέρταση και νεφρική ανεπάρκεια. Συνιστάται μέτρια πρόσληψη αυτών, 20-25% του συνόλου της ημερήσιας πρόσληψης, για την απώλεια βάρους, την βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης και του διαβήτη τύπου 2.
- 3) **Λίπος:** η υπέρμετρη κατανάλωση λίπους καταλήγει να είναι επιζήμια για τον οργανισμό, και ειδικά όσον αφορά στην συσσώρευση λίπους στο συκώτι, μπορεί να παίζει δραματικό ρόλο. Διατροφή πλούσια σε λίπος μπορεί να προκαλέσει στεάτωση και συσσώρευση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα (59). Οι συστάσεις γενικά κυμαίνονται στο κλασσικό πρότυπο, 20-30% της ημερήσιας πρόσληψης (57, 58, 60). Η υπερβολική κατανάλωση λιπαρών οξέων μπορεί να

προκαλέσει την ζημιά των ηπατοκυττάρων αλλά και ο αποκλεισμός από την άλλη μπορεί να είναι επίσης επικίνδυνος, αφού σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε άτομα με υψηλό λίπος και ινσουλινοαντίσταση, και στα οποία δόθηκε δίαιτα με <7% κορεσμένα λιπαρά όξέα, φάνηκε πως το αποτέλεσμα ήταν η μείωση τόσο της LDL όσο και της HDL, αλλά και η αύξηση των τριγλυκεριδίων (TG). Τα πολυακόρεστα από την άλλη είναι αυτά που για ακόμα μία φορά προτείνονται να καταναλώνονται αντί των μονο-ακόρεστων, αφού τα αποτελέσματα δείχνουν πως μειώνεται η LDL, τα TG και τα VLDL, ενώ αυξάνεται ταυτόχρονα η HDL. Τα ω-6 πολυακόρεστα προτείνονται επίσης να καταναλώνονται, σε ποσοστό 5-10% των ημερήσιων θερμιδών, κυρίως από φυτικά λιπαρά, και όχι παραπάνω, αφού η υπερβολική κατανάλωση αυτών αυξάνει τους δείκτες φλεγμονής και είναι πιο επιρρεπής σε υπεροξειδωση των λιπιδίων. και μείωση της HDL (58) Οι συστάσεις για την χοληστερόλη τέλος, είναι 200-300 mg ημερησίως. Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί αν μπορούν να συμβάλλουν στην βελτίωση της νόσου ή όχι. Ενώ ακόμα δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως ο ρόλος τους, υπάρχει και η σύσταση της κατανάλωσης 1 γρ την ημέρα, όπου μπορεί να μειώσει το λίπος που εισχωρεί στο ήπαρ, και των 2 γρ την ημέρα, όπου συμβάλλει στην μείωση γλυκόζης ορού νηστείας, των τριγλυκεριδίων, των ηπατικών ενζύμων και στην βελτίωση του βαθμού στεάτωσης.

- 4) **Φυτικές ίνες:** όσον αφορά τις φυτικές ίνες, ενθαρρύνεται η κατανάλωσή τους λόγω μίας πληθώρας ευεργετικών αποτελεσμάτων στον οργανισμό. Οι αδιάλυτες φυτικές ίνες συγκεκριμένα, βοηθούν στην αίσθηση του κορεσμού, και έτσι συμβάλλουν στην μείωση πρόσληψης θερμιδών, όπως επίσης και στην γαστρεντερική κινητικότητα, κάνοντας την κέννωση πιο εύκολη. Οι διαλυτές φυτικές ίνες, από την άλλη, επιβραδύνουν την κέννωση του στομάχου, και την απορρόφηση της γλυκόζης και της χοληστερόλης. Λαμβάνοντας υπ' όψη τον επιπολασμό της ασθένειας σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία, διαβήτη τύπου 2, και μεταβολικό σύνδρομο, η χρήση των φυτικών ινών μπορεί να είναι θεραπευτική σε αυτές τις περιπτώσεις, για τον έλεγχο του γλυκαιμικού δείκτη, των λιπιδίων αλλά και του βάρους. Η κατανάλωσή τους είναι εύκολη, καθώς βρίσκονται σε πληθώρα τροφίμων και σε αφθονία. Οι συνιστώμενες ποσότητες καθημερινά ξεκινούν από τα 20 και φτάνουν μέχρι και τα 40 γραμμάρια ημερησίως, εκ των οποίων τα 5-15 να προέρχονται από διαλυτές φυτικές ίνες (57, 58).

- 5) **Πρεβιοτικά και Προβιοτικά:** Τα πρεβιοτικά είναι υδατάνθρακες οι οποίοι δεν μπορούν να αφομιωθούν από τον οργανισμό, και έχουν παρόμοια ανάπτυξη και λειτουργία με τα προβιοτικά, τα βακτήρια δηλαδή από τους ζωικούς οργανισμούς τα οποία είναι ευεργετικά για το ανθρώπινο σώμα. Ενώ σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα με NAFLD φάνηκαν ευεργετικά αποτελέσματα από τα πρεβιοτικά, στους ανθρώπους χρειάζονται ακόμα αρκετές κλινικές μελέτες για την διεξαγωγή συμπερασμάτων. Παρ' όλα αυτά επισημαίνεται ότι και η μεγαλύτερη πρόσληψη από 30 γρ ημερησίως μπορεί να οδηγήσει σε γαστρεντερικές διαταραχές (61). Σε ασθενείς με ηπατική στεάτωση μπορεί να έχουν πολλές επιδράσεις, όπως στην βελτίωση της μικροβιακής χλωρίδας, και την μείωση της εντερικής φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες (62, Δ-53). Οι συνιστώμενες ποσότητες για την κατανάλωση προβιοτικών είναι 300 γρ ημερησίως, απλού γιαουρτιού ή και ενισχυμένου σε προβιοτικά, για 8 εβδομάδες, αφού αυτή η ποσότητα φάνηκε να είναι ευεργετική για τον οργανισμό (63).
- 6) **Βιταμίνη Ε:** Το οξειδωτικό στρες είναι ο μηχανισμός αντίδρασης στον ηπατοκυτταρικό τραυματισμό και στην εξέλιξη της νόσου. Η βιταμίνη Ε, γνωστή αντιοξειδωτική ουσία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία της NAFLD. Μπορεί οι ακριβείς δοσολογίες να μην έχουν προσδιοριστεί ακόμα, και οι επιδράσεις των διαφορετικών δόσεων στην ασθένεια, αλλά είναι επιβεβαιωμένο ότι μπορεί να βελτιώσει την στεάτωση, την λοίμωξη και να μειώσει και τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών. Οι συστάσεις για την βιταμίνη είναι στα 800 IU/Η σε μη-διαβητικούς ασθενείς με NAFLD , ενώ η χρήση της δεν συνιστάται σε κίρρωση, ή σε NASH αφού προκαλεί διάρροια, στομαχική δυσπεψία, στομαχικούς ιλίγγους.
- 7) **Καφεΐνη:** ο καφές αποτελείται συνολικά από παραπάνω από 1.000 ουσίες, με κύριο συστατικό όμως την καφεΐνη. Η καφεΐνη μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMAD, η οποία με τη σειρά της μειώνει τον αυξητικό παράγοντα για την μεταγραφή γονιδίων CTGF, αυτών που είναι υπεύθυνα για την ηπατική ίνωση (64). Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον καφέ, έχουν και αντιοξειδωτικές και υπο-γλυκαιμικές ικανότητες, με αποτέλεσμα να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι X. Jiang et al (65) σε πλυθησμό μεγαλύτερο του ενός εκατομμυρίου, φάνηκε πως η κατανάλωση 2 φλυτζανιών καφέ την ημέρα, μείωνε τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 κατά 11%, ενώ η κατανάλωση 200 μγ/ημέρα καφεΐνης, είχε το ίδιο αποτέλεσμα, σε ποσοστό αυτή τη φορά 14%. Συνεπώς, συνιστάται η κατανάλωση καφέ από άτομα τα οποία πάσχουν από NASH και NAFLD, αφού

φαίνεται να συμβάλλει στην επιβράδυνση της νόσου. Τα επίπεδα φλεγμονής μειώνονται, καθώς επίσης και η εμφάνιση ηπατικής ίνωσης. Παρ' όλο που συνιστάται η κατανάλωσή του, δεν περιλαμβάνεται στους τρόπους θεραπείας της νόσου, παρά μόνο σαν βοηθητικός παράγοντας (64).

- 8) **Μεσογειακή δίαιτα:** Λοιπές διατροφικές συστάσεις: η μεσογειακή δίαιτα φαίνεται πως είναι το καλύτερο διατροφικό πρότυπο για να ακολουθάται σε ασθενείς όπως δυσλιπιδαιμίες, διαβήτης, ινσουλινοαντίσταση κ.λ.π. (61). Τα καροτενοειδή, οι φυτικές ίνες, και το φολικό οξύ μπορούν να μειώσουν το οξειδωτικό στρες και να μειώσουν την χοληστερόλη. Τέλος μπορούν επίσης να βελτιώσουν τα επίπεδα αδιπνεκτίνης, την πρωτεΐνη που είναι μειωμένη στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις, και τα μειωμένα επίπεδά της επιβαρύνουν την ανάπτυξη της ηπατικής στεάτωσης (66).

Λεπτίνη και NAFLD

Η λιπώδης μάζα, δεν αποτελείται μόνο από συσσωρευμένο παθητικό λίπος, και δεν λειτουργεί αποκλειστικά επιβαρυντικά στο σώμα. Στον λιπώδη ιστό παράγονται ταυτόχρονα μια σειρά από πρωτεΐνες, τις αντιποκίνες (αδипονεκτίνη, λεπτίνη), διάφοροι μεσολαβητές κυτοκινών (Ιντερλευκίνη-6 ή αλλιώς IL-6), καθώς επίσης και ο παράγοντας νέκρωσης (TNF-a), με πολλές βιολογικές δραστηριότητες (67, 68, 70). Σε περιπτώσεις παχυσαρκίας και υψηλής λιπώδους μάζας, όπως για παράδειγμα σε καταστάσεις NAFLD, εμπλέκονται αρκετοί μηχανισμοί, κάποιοι από τους οποίους δεν θα λειτουργούσαν χωρίς τα παράγωγα του λιπώδους ιστού, δηλαδή τις αντιποκίνες, τις κυτοκίνες και διάφορες άλλες ορμόνες (67, 68, 69). Οι αντιποκίνες, οι οποίες σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε ισορροπία στο σώμα, σε κατάσταση παχυσαρκίας διαταράσσονται και προωθούν μια κατάσταση φλεγμονής στο σώμα, καθώς επίσης και ωθούν προς την αντίσταση στην ινσουλίνη, με αποτέλεσμα να προωθούν την ανάπτυξη NAFLD (71) και στη συνέχεια την ανάπτυξη της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας που προαναφέρθηκε (NASH). Η αδипονεκτίνη, της οποίας ο ρόλος είναι να προωθεί την ευαισθητοποίηση του ήπατος και των μυών στην ινσουλίνη, σε καταστάσεις όπου εμφανίζεται αντίσταση στην ινσουλίνη, διαβήτη τύπου 2 και παχυσαρκίας, εμφανίζεται με μειωμένη συγκέντρωση στον ορό του αίματος. Η λεπτίνη, αντιθέτως, που έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αίσθηση της όρεξης και του κορεσμού, καθώς και στην ρύθμιση του βάρους (72, 73), σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, διαβήτη τύπου 2 καθώς και παχυσαρκίας, εμφανίζεται σε αυξημένη συγκέντρωση (74).

Η λεπτίνη ανακαλύφθηκε αρχικά από τον Friedman (75) και τους συνεργάτες του το 1994, ενώ από τους Zang (76) και τους συνεργάτες του, μελετήθηκαν οι λειτουργίες της στους ποντικούς καθώς και τα ελλωτάματα στον μεταβολισμό από την έλλειψη αυτής. Η λεπτίνη είναι μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 146 αμινοξέα, και παράγεται στον λευκό λιπώδη ιστό, σε ποσότητα αναλογική με τα τριγλυκερίδια (77), και καθώς ο ρόλος της είναι ρυθμιστικός στην ομοιόσταση της ενέργειας, η έλλειψη αυτής προκαλεί μια ποικιλία από συμπεριφορικές και φυσιολογικές αλλαγές (78). Εκκρίνεται στην κυκλοφορία, και εισέρχεται στον εγκέφαλο όπου τέλος εισχωρεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στον εγκέφαλο, κατά την είσοδό της, δεσμεύει και ενεργοποιεί την μακρά μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης (LepRb), η οποία εκφράζεται σε εξειδικευμένα υποσύνολα των νευρώνων του υποθαλάμου (79-82). Μετά από διάφορες μεταλλάξεις στον υποδοχέα της λεπτίνης, οι οποίες απενεργοποιούν την δράση της, ή και λόγω ανταγωνιστών που μειώνουν τη δράση αυτής,

φαίνεται η σημασία της δέσμευσης της λεπτίνης με τον υποδοχέα για να αποκτήσει τη βιολογική της δράση (83, 84).

Περιφερική δράση της λεπτίνης

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες οι οποίες προσπαθούν να διευκρινίσουν τον ρόλο της λεπτίνης στην περιφερική λειτουργία. Σε ποντίκια με σηματομένη λεπτίνη, φάνηκε ότι είχαν φυσιολογικό βάρος αλλά και φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης, αλλά, πέραν αυτού, ακολουθούσαν και μία διατροφή χαμηλή σε λιπαρά, και παρουσίαζαν μία καθυστερημένη εμφάνιση μειωμένης ανοχής στη γλυκόζη λόγω ηλικίας. Σε έρευνες σε ποντίκια που πραγματοποίησαν οι Huynh και οι Morioka (85, 86), από την άλλη, όπου απενεργοποίησαν τους υποδοχείς της λεπτίνης (LepRb) στο

πάγκρεας με τη χρήση Pdx^{cre} ή RIP^{cre} (μεταλλαγμένα γονίδια δηλαδή, τα οποία έχουν ως ρόλο την μελέτη της λειτουργίας των γονιδιακών λειτουργιών), φάνηκε πάλι βελτίωση στην ανοχή στη γλυκόζη. Εδώ όμως προκύπτει προβληματισμός λόγω της επίδρασης Pdx και της RIP στον υποθάλαμο. Η έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης έχει επίσης εμφανιστεί και στα εντερικά κύτταρα, η λειτουργία όμως της σε αυτό το κομμάτι δεν έχει προσδιοριστεί (87). Στην καρδιά, από την άλλη, ο ρόλος των υποδοχέων της λεπτίνης, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί λόγω της χρήσης των μεταλλαγμένων γονιδίων. Η δυσκολία εμπίπτει με το γεγονός ότι είναι δύσκολο να διευκρινιστούν οι αρνητικές επιδράσεις των μεταλλαγμένων γονιδίων που χρησιμοποιούνται.

Κεντρικές δράσεις της λεπτίνης

Η κεντρική δράση της λεπτίνης μέσα στον εγκέφαλο έχει να κάνει με την δέσμευση στους υποδοχείς λεπτίνης κυρίως στον υποθάλαμο (80, 82). Ενώ ο ρόλος της λεπτίνης είναι να ρυθμίζει την όρεξη και τον κορεσμό, και οι υποδοχείς αυτής να συμβάλλουν στον έλεγχο της αποστροφής προς την τροφή, τον κύριο ρόλο σχετικά με τον έλεγχο της όρεξης φαίνεται να τον κατέχει η λεπτίνη που δεσμεύεται στον υποθάλαμο (88, 89, 90). Στον υποθάλαμο, η λεπτίνη έχει δράση σε πολλούς υποδοχείς νευρώνων που ελέγχουν την έκφραση των υποδοχέων αυτής, κάθε ομάδα εκ των των οποίων, έχει ένα διαφορετικό ρόλο στην έκφραση και τη δράση της λεπτίνης.

Λεπτίνη και ομοιόσταση

Ο Coleman και οι συνεργάτες του (93) μελέτησαν την διαφορά σε παχύσαρκα ποντίκια και σε ποντίκια με διαβήτη και παρατήρησαν ότι στα πρώτα υπήρχε μειωμένη πρόσληψη τροφής μέχρι λιμοκτονίας, ενώ οι φαινότυποι ήταν ίδιοι και στις δύο ομάδες. Υπέθεσε λοιπόν την ύπαρξη ενός “παράγοντα κορεσμού” προς μελέτη. Οι Ravussin και οι συνεργάτες του (94), δεν βρήκαν καμία διαφορά ανάμεσα σε φυσιολογικού βάρους ποντικούς και σε παχύσαρκους, όσον αφορά την δαπάνη ενέργειας. Οι Leibel & Hirsch το 1984 (95), αυτό που παρατήρησαν ήταν ότι σε περιπτώσεις χαμηλού βάρους, οι δαπάνες είναι μειωμένες, κάτι που δεν συμφωνεί με τις αλλαγές στο σωματικό βάρος που επήλθαν στα ποντίκια. Μετά την απώλεια βάρους, συνεχίστηκε μια μειωμένη λειτουργία του μεταβολισμού και αλλά και μία συνεχή απώλεια βάρους παρ’ όλο που το ισοζύγιο ενέργειας διατηρούνταν σταθερό, και αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη της “λιποστατικής” θεωρίας σχετικά με την συντήρηση του σωματικού βάρους, η οποία υποδηλώνει ένα σήμα που αντανακλά την μάζα του λιπώδους ιστού και ελέγχει την νευρική λειτουργία στον υποθάλαμο σχετικά με την ενεργειακή πρόσληψη και δαπάνη. Στην συνέχεια, και μετά από μια σειρά ερευνών σε ποντίκια υπέρβαρα και μη, ο Coleman κατέληξε ότι αυτός ο “παράγοντας κορεσμού” ήταν η λεπτίνη. Σε περιπτώσεις όπου η λεπτίνη ήταν ανεπαρκής εκ γενετής, τα ποντίκια ήταν τελικά υπέρβαρα, και μάλιστα, πολλά από αυτά κατέληγαν να έχουν φαινότυπο που υποδήλωνε νοσηρότητα (96-100). Σε άτομα που δεν είχαν πρόβλημα με την παραγωγή λεπτίνης, οι επιδράσεις αυτής στην ενεργειακή ομοιόσταση ήταν διάφορες, και επηρεαζόταν ταυτόχρονα από εξωγενείς παράγοντες, όπως το αυξημένο ή μειωμένο βάρος, το ενεργειακό ισοζύγιο κλπ.

Όσον αφορά την εξωγενή χορήγηση λεπτίνης, σε πειράματα με χορήγηση αυτής (101), φάνηκε αυτή να μην επηρεάζει προς την διατήρηση φυσιολογικού ή και χαμηλού βάρους, όπως ακριβώς συνέβαινε και σε περιπτώσεις ανεπάρκειας αυτής. Αντιθέτως, είχε κάποιες αντίστροφες από το επιθυμητό επιδράσεις, όπως για παράδειγμα στον έλεγχο της όρεξης, στην θερμογένεση, και αλλαγές που ευνοούν προς την επαναπρόσληψη βάρους μετά από μία απώλεια κιλών. Συνεπώς, η εξωγενής χορήγηση λεπτίνης δεν είναι αποτελεσματική όσον αφορά τις φυσιολογικές της λειτουργίες σε περιπτώσεις διαιτητικού περιορισμού προς απώλεια βάρους, και δεν μπορεί από μόνη της να ευνοήσει στην απώλεια αυτού. Συμπερασματικά, δεν είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την απώλεια βάρους, αφού επηρεάζεται τόσο από τις αποθήκες ενέργειας όσο και από το ενεργειακό ισοζύγιο.

Λεπτίνη, Παχυσαρκία και NAFLD

Παρ' όλο που ο ρόλος της λεπτίνης είναι ρυθμιστικός στην αίσθηση του κορεσμού, και ενώ το αναμενόμενο θα ήταν να βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα παχύσαρκα άτομα, συμβαίνει το αντίθετο (91, PO- MAffeì 1995). Για την ακρίβεια, όσο αυξάνεται το σωματικό βάρος, τόσο φαίνεται να αυξάνεται και η συγκέντρωση λεπτίνης ορού. Υπάρχει δηλαδή, μία, κατ' αναλογία με το σωματικό βάρος, συγκέντρωση αυτής που εκκρίνεται από την λιπώδη μάζα σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικό βάρος (92). Το αξιοσημείωτο είναι ότι παρ' όλα αυτά, υπάρχει αυξημένη λιπώδης μάζα, κάτι που σημαίνει ότι δεν υπάρχει απόκριση της λεπτίνης. Υπάρχουν δύο υποθέσεις για την αδυναμία δράσης της λεπτίνης, είτε μια εγγενής ή επίκτητη ανωμαλία στη δράση της λειτουργίας της, είτε μια αδυναμία του οργανισμού να αποκριθεί στην υπερφαγία και να λειτουργήσει σωστά. Αυτές οι δύο υποθέσεις προκαλούν τους ερευνητές για μία περαιτέρω ανάλυση της λειτουργίας της λεπτίνης, την επίδρασή της στις νευρικές οδούς, και την συνλειτουργία της με άλλους παράγοντες ενεργειακής ομοιόστασης.

Η μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης είναι ένα σημαντικό κλειδί ίσως για την ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων. Ο όρος “αντίσταση στην ινσουλίνη” περιγράφει την αυξημένη όρεξη για κατανάλωση τροφής στα παχύσαρκα ζώα, παρ' όλη την αυξημένη κυκλοφορία λεπτίνης στο αίμα, η οποία θα έπρεπε να έχει τα αντίθετα αποτελέσματα.

Συνεπώς, υπάρχει η ανάγκη για τη διερεύνηση της λεπτίνης σε σχέση με την NAFLD, αφού και οι δύο συνδέονται με την παχυσαρκία.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη των επιπέδων λεπτίνης στα άτομα τα οποία πάσχουν από μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, με σκοπό την συσχέτιση των επιπέδων της πρώτης με την βαρύτητα της νόσου, και την επίδραση αυτής στην βελτίωση ή την επιδείνωση της δεύτερης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Για την πραγματοποίηση της έρευνας, έγινε καταγραφή των χαρακτηριστικών του πληθυσμού των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα, ώστε να υπάρχει ομοιογένεια του δείγματος, καθώς και κάποια συγκεκριμένα κοινά χαρακτηριστικά που απαιτούνταν.

Στην έρευνα χρησιμοποιήσαμε 414 δείγματα ορού, από τα οποία τα 264 προέρχονταν από υγιή άτομα (απουσία NAFLD/NASH) με φυσιολογική λειτουργία του ήπατος (υγιείς), και τα υπόλοιπα 150 ήταν από άτομα ασθενή, έπασχαν δηλαδή από NAFLD/NASH. Τα 264 άτομα χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου για την σύγκριση με τα άτομα που είχαν λιπώδη διήθηση, που βρίσκονταν δηλαδή σε κάποιο στάδιο NAFLD/NASH (ασθενείς).

Εργαστηριακές μετρήσεις

Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Τα δείγματα ορού που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκια, σε κατάψυξη στους -80C. Ο ορός αίματος που παραλήφθηκε αρχικά, φυγοκεντρήθηκε για το διαχωρισμό στα επιμέρους κλάσματά του. Από τα δείγματα αίματος τα οποία περιείχαν αντιπηκτικό, μετά τη φυγοκέντρηση, παραλήφθηκε το πλάσμα και τοποθετήθηκε σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκι, (eppendorf tubes), χωρητικότητας 2ml, για την αποθήκευση και τη φύλαξη αυτού στην κατάψυξη στους -80C. Παρομοίως, αποθηκεύτηκε και το κλάσμα των λευκών αιμοσφαιρίων, και ο ορός χωρίς αντιπηκτικό.

Μέτρηση των επιπέδων λεπτίνης

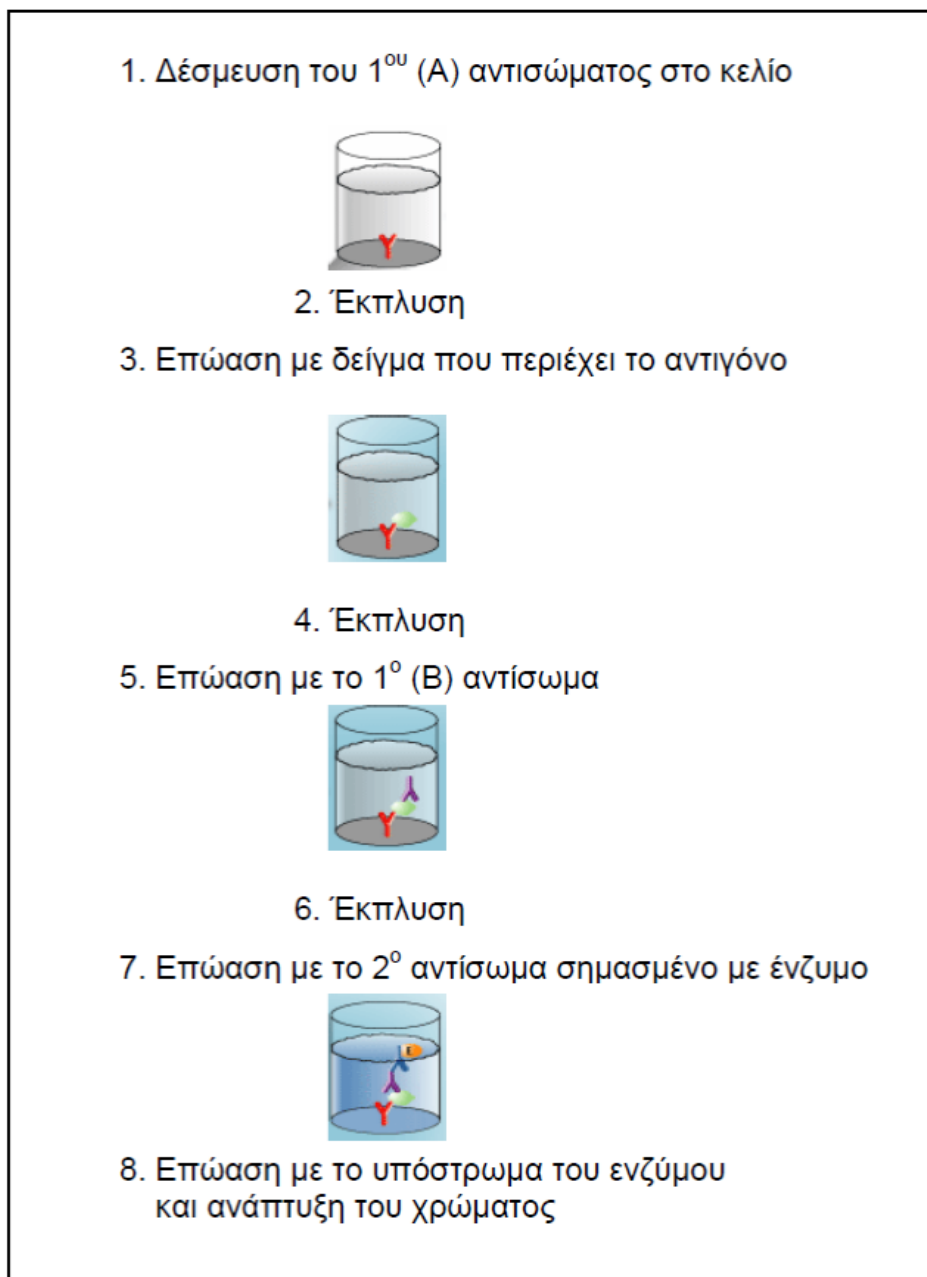
Η μέτρηση της συγκέντρωσης λεπτίνης από τον ορό των εθελοντών πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο sandwich ELISA, η οποία αποτελεί την πιο ευαίσθητη και εξειδικευμένη μέθοδο ELISA. Τα βήματα για την διεξαγωγή του πρωτοκόλλου είναι κοινά μεταξύ των διαφόρων kit του εμπορίου, και διαφέρουν μόνο σε μερικά σημεία. Στην έρευνα

χρησιμοποιήθηκε το kit Human Leptin DuoSet Elisa της εταιρίας R&D του οποίου το πρωτόκολλο περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Πρωτόκολλο ELISA

Το αντιγόνο ενώνεται με δυο αντισώματα, το αντίσωμα δέσμευσης και το αντίσωμα ανίχνευσης. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται αρχικά επίστρωση των κελίων (coating) με ένα ειδικό, για το προς ανίχνευση αντιγόνο, αντίσωμα, συνήθως μονοκλωνικό (1ο (A) αντίσωμα). Η δέσμευση γίνεται συνήθως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με το πολυστυρόλιο. Οι ελεύθερες θέσεις στα κελία δεσμεύονται με μια κοινή πρωτεΐνη, συνήθως αλβουμίνη ορού βοός (BSA), για την αποφυγή στα επόμενα στάδια μη ειδικών αντιδράσεων. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με τα δείγματα τα οποία περιέχουν την προς ανάλυση ουσία (αντιγόνο), ώστε να επιτευχθεί η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Στην ίδια ακριβώς διαδικασία, καθώς και στις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας, υποβάλλεται γνωστή ποσότητα της προς ανάλυση ουσίας (καθαρό αντιγόνο).

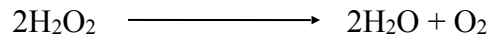
Ακολουθεί το στάδιο της ανίχνευσης με τη χρήση ενός αντισώματος ειδικού για το ίδιο αντιγόνο, για άλλο όμως επίτοπο, (1ο (B) αντίσωμα), το οποίο μπορεί να είναι και συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο, όπως υπεροξειδάση, ή βιοτίνη. Εάν το (1ο(B) αντίσωμα) δεν είναι σημασμένο ακολουθεί επώαση με το 2ο αντίσωμα, σημασμένο με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος. Εάν το (1ο (B) αντίσωμα) είναι σημασμένο με ένζυμο ακολουθεί κατευθείαν η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος, ενώ εάν είναι σημασμένο με βιοτίνη ακολουθεί επώαση με στρεπταβιδίνη, σημασμένη με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος.



Εικόνα 1. Τα στάδια της Ανοσοενζυμικής μεθόδου sandwich ELISA

Η χρωμοαντίδραση, η οποία είναι κοινή σε όλα τα είδη ELISA που αναφέρθηκαν, αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης, δηλαδή του H_2O_2 , και μιας χρωμογόνου ουσίας που είναι η ο-φαινυλενοδιαμίνη (OPD). Από τη διάσπαση του H_2O_2 παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο οξειδώνει την OPD προς ένα διαλυτό έγχρωμο παράγωγο με μέγιστο μήκος κύματος 492nm.

Υπεροξειδάση



Λόγω της ευαισθησίας της OPD στο φως η χρωμοαντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, με προσθήκη ίσου όγκου 2N διαλύματος H_2SO_4 , ακολουθεί φωτομέτρηση σε ειδικό φωτόμετρο για πλάκες ELISA BIOTECH PowerWave XS2 στα 492nm και οι απορροφήσεις οπτικοποιούνται με το λογισμικό GEN5.1.10. Όλα τα δείγματα (και το πρότυπο) δοκιμάζονταν εις διπλούν και εν συνεχεία υπολογίζονταν ο μέσος όρος της απορρόφησης του καθενός, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του περιεχόμενου αντιγόνου. Με βάση την απορρόφηση της πρότυπης ποσότητας του αντιγόνου υπολογίζεται η ποσότητα του αντιγόνου ανά κελίο. Από όλα τα δείγματα αφαιρούνταν ο μέσος όρος της απορρόφησης ενός δείγματος «τυφλού», που περιείχε μόνο το μέσο αραίωσης.

Εργαστηριακός εξοπλισμός για τις μετρήσεις λεπτίνης

Για την μέτρηση των επιπέδων λεπτίνης στα δείγματα ορού, χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με διάφορα εύρη λήψης όγκων και τα αντίστοιχα tips τους, αναλυτικός ζυγός για την μέτρηση των αντιδραστηρίων, vacutainer tube και ογκομετρικές φιάλες διάφορων όγκων για την λήψη των κατάλληλων όγκων αντιδραστηρίων και την παρασκευή διαλυμάτων, απεσταγμένο νερό για το ξέπλυμα των οργάνων, Vortex συσκευή για την ανάδευση των διαλυμάτων, και τέλος, χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Elisa reader (Biotek PowerWave XS2) για την φωτομέτρηση της λεπτίνης.

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, διεξήχθη αρχικά έλεγχος κανονικότητας (Normality Test) με την εφαρμογή δύο κριτηρίων, αρχικά του κριτηρίου Kolmogorov- Smirnov,

και δεύτερον με το Shapiro-Wilk, για τις παρατηρήσεις όλων των μεταβλητών. Καθώς διαπιστώθηκε ότι οι τιμές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκε εφαρμόστηκε ο έλεγχος MANN-WHITNEY TEST για τις δύο ομάδες, τους υγιείς (Case Control 1) και τους ασθενείς (Case Control 2). Με τον τρόπο αυτό συγκρίναμε τους μέσους όρους μεταξύ των δύο ομάδων.

Το όριο για την τιμή p-Value που χρησιμοποιήθηκε στο τέλος των ελέγχων σύγκρισης ήταν το 0,05. Η στατιστική ανάλυση συνολικά των μετρήσεων, διεξήχθη με το πρόγραμμα SPSS 21 (IBM SPSS Statistics Version 21).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 414 δείγματα ορού πλάσματος, από τα οποία τα 264 ήταν από άτομα χωρίς λιπώδη διήθηση, ενώ τα 150 ήταν από άτομα που βρίσκονταν σε κάποιο στάδιο της ασθένειας. Όλα τα δείγματα που περιλήφθησαν στην αρχή, χρησιμοποιήθηκαν τελικά και στην μέτρηση χωρίς να υπάρχουν αποκλεισμοί. Οι μέσοι όροι των χαρακτηριστικών των δειγμάτων, παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Τα 264 άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για την έρευνα, ήταν από 18 ετών έως 72, με δείκτη μάζας σώματος (BMI) 24,7 και περίμετρο μέσης (WC) 84,4 και δείκτη περιφέρειας ισχύων/ περιφέρεια μέσης (WH) 0,82. Ο μέσος όρος άλιπης μάζας (FFMass) ήταν 52,6 κιλά, ενώ το μέσο ποσοστό λίπους (FatMass %) ήταν 26,1%. Τα άτομα αυτά είχαν τέλος, μέτρια έως έντονη δραστηριότητα.

Για την ομάδα με λιπώδη διήθηση, τα 150 άτομα δηλαδή, τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ήταν τα εξής: μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 50 έτη, και ο μέσος δείκτης μάζας σώματος ήταν 31, με το μικρότερο να είναι στο 21,9 και το μεγαλύτερο στο 44,5. Η περίμετρος μέσης ήταν 103 εκατοστά, ενώ ο δείκτης δείκτη περιφέρειας ισχύων/ περιφέρεια μέσης 0,92. Ο μέσος όρος άλιπης μάζας σώματος ήταν 34,2, και το μέσο ποσοστό λίπους 34,1. Τα άτομα αυτά είχαν επίσης, όπως και η πρώτη ομάδα, μία μέτρια προς έντονη φυσική δραστηριότητα.

Στο σύνολό τους, και οι δύο ομάδες αποτελούνταν από άτομα με βάρος άνω του φυσιολογικού, αφού και οι δύο ομάδες ανήκαν κατά μέσο όρο στους υπέρβαρους και οριακά πρώτου βαθμού παχυσαρκίας ομάδες, με την ομάδα των ασθενών να έχει λίγο υψηλότερο δείκτη μάζας σώματος από την πρώτη. Από το δείκτη μέση/περιφέρεια διακρίνεται ότι και οι δύο ομάδες είχαν αυξημένο κοιλιακό λίπος, ενώ τέλος, και το ποσοστό λίπους στην δεύτερη ομάδα ήταν αρκετά υψηλό.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αναφέρονται στον πίνακα 2.

	Υγιείς (N= 264)	Ασθενείς (N= 150)	p-Value
Ηλικία	42.66 ± 12.36	50.76 ± 10.84	0.0001
Φύλο (% άνδρες)	37,9	43,3	0,276
BMI (kg/m ²)	24.75 ± 3.18	31.05 ± 4.60	0.000
WC (cm)	84.45 ± 10.11	103.03 ± 10.95	0.000
HC (cm)	103.07 ± 7.73	112.54 ± 9.44	0.000
WHR	0.82 ± 0.08	0.92 ± 0.78	0.000
Λιπώδης Μάζα %	26.12 ± 8.77	34.18 ± 9.00	0.000
Άλιπη Μάζα %	52.67 ± 11.3	58.25 ± 12.31	0.000
PAL	1.42 ± 0.22	1.38 ± 0.23	0.035
Λεπτίνη (mg/ml)	14.56 ± 13.78	31.00 ± 24.86	0.000
SGOT (U/L)	18.79 ± 7.62	21.44 ± 8.64	0.003
SGPT (U/L)	20.18 ± 8.40	28.75 ± 11.73	0.000
gammaGT (U/L)	18.52 ± 13.05	25.99 ± 15.35	0.000
SGOT/SGPT	1.07 ± 0.30	0.82 ± 0.21	0.000

Πιν. 2. Σύγκριση Μ.Ο. περιγραφικών χαρακτηριστικών, υγιών και ασθενών μαρτύρων.

Καθώς οι μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, εφαρμόστηκε όπως ήδη αναφέρθηκε, το Mann- Whitney Test. Σκοπός ήταν η σύγκριση των μέσων όρων των παραμέτρων, μεταξύ των υγιών και των ασθενών των οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα. Για τον υπολογισμό του p-value εφαρμόστηκε το Mann- Whitney Test για τις μη-παραμετρικές μεταβλητές, ενώ για τις ποσοτικές (φύλο) εφαρμόστηκε το χ^2 (chi- square). Από τον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές των δύο ομάδων, αφού σε όλες τις τιμές το p-value είναι μικρότερο του 0.05. Στη συνέχεια, στη διαδικασία ανάλυσης των τιμών, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της παλινδρόμησης (Regression), με σκοπό να αναλυθεί η επίδραση της κάθε παραμέτρου στα επίπεδα λεπτίνης, η κάθε μία ξεχωριστά και ανεξάρτητα των άλλων.

Μετά το πέρας των συγκρίσεων των μέσων όρων των τιμών μεταξύ των δύο ομάδων, ακολουθεί η πολλαπλή λογαριθμική παλινδρόμηση για την διερεύνηση και τον υπολογισμό της πιθανότητας ανάπτυξης μη- αλκοολικής λιπώδους διήθησης συγκριτικά με τα επίπεδα λεπτίνης, σε σχέση με διάφορους παράγοντες, όπως το φύλο, την ηλικία, το ΔΜΣ και την φυσική δραστηριότητα. Στην αρχή έγιναν συγκρίσεις λεπτίνης και ανάπτυξης NAFLD, ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και το ΔΜΣ. Η λεπτίνη δεν συσχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου ($p > 0,05$) (Πιν. 3).

	B	S. E.	p-Value
Φύλο	1,339	0,420	0,001
Ηλικία	0,054	0,014	0,000
ΔΜΣ	0,395	0,058	0,000
Λεπτίνη	0,023	0,012	0,061

Πιν. 3. Παλινδρόμηση για την επίδραση λεπτίνης στην εμφάνιση NAFLD ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία και ΔΜΣ.

Στη συνέχεια, έγινε συσχέτιση της εμφάνισης ασθένειας και των επιπέδων λεπτίνης, ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία, το ΔΜΣ καθώς και την φυσική δραστηριότητα (Πιν. 4). Εκεί, φάνηκε πως η αύξηση της συγκέντρωσης της λεπτίνης κατά 1 ng/ml στο αίμα, είχε λίγο μεγαλύτερη συσχέτιση με την εμφάνιση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου ($p = 0,057$) όταν η παλινδρόμηση γινόταν ανεξάρτητα και από τη φυσική δραστηριότητα.

	B	S. E.	p-Value
Φύλο	1,353	0,423	0,001
Ηλικία	0,053	0,014	0,000
ΔΜΣ	0,391	0,058	0,000
Λεπτίνη	0,024	13	0,57
PAL	-0,776	0,675	0,251

Πιν. 4. Παλινδρόμηση για την επίδραση λεπτίνης στην εμφάνιση NAFLD ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία, BMI και φυσική δραστηριότητα.

Σε επόμενο στάδιο υπολογισμού συσχέτισης λεπτίνης και εμφάνισης της ασθένειας, ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία, λεπτίνη και λιπώδη μάζα, φαίνεται πως η αύξηση της λεπτίνης κατά μία μονάδα αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης NAFLD κατά 3,1 % ($p=0,009$). (Πιν. 5)

	B	St. E.	p-Value
Φύλο	4,304	0,545	0,000
Ηλικία	0,037	0,014	0,006
Λεπτίνη	0,031	0,012	0,009
Λιπώδης Μάζα %	0,218	0,036	0,000

Πιν. 5. Παλινδρόμηση για την επίδραση λεπτίνης στην εμφάνιση NAFLD ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία και λιπώδη μάζα.

Τέλος, υπολογίστηκε η συσχέτιση των επιπέδων λεπτίνης στον ορό, και η πιθανότητα εμφάνισης NAFLD, ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία, φυσική δραστηριότητα και λιπώδη μάζα.

Φάνηκε πως η αύξηση των επιπέδων λεπτίνης κατά 1 ng/ml στο αίμα, αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης NAFLD κατά 3,2%, ανεξάρτητα από τους παραπάνω παράγοντες. Υπάρχει δηλαδή ακόμα μεγαλύτερη συσχέτιση της ασθένειας και των επιπέδων λεπτίνης, αφού $p=,007$. (Πιν 6)

	B	St. E.	p-Value
Ηλικία	0,037	0,014	0,007
Λιπώδης Μάζα %	0,213	0,036	0,000
Φύλο	4,254	0,545	0,000
PAL	-0,523	0,641	0,415
Λεπτίνη	0,032	0,12	0,007

Πιν. 6. Παλινδρόμηση για την επίδραση λεπτίνης στην εμφάνιση NAFLD ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία, φυσική δραστηριότητα και λιπώδη μάζα.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως η αύξηση των επιπέδων λεπτίνης στον ορό, σχετίζεται με την αύξηση συχνότητας εμφάνισης της νόσου. Συγκεκριμένα η αύξηση κατά 1 ng/ml ορού, αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου κατά 3,1% όταν υπολογίζεται ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και τη λιπώδη μάζα, και οι πιθανότητες αυξάνονται στο 3,2 % όταν υπολογίζεται επιπλέον και ανεξάρτητα από τη φυσική δραστηριότητα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παχυσαρκία άρχισε να θέτει σε κίνδυνο την υγεία του ατόμου, αφού σε καταστάσεις χρόνιας ειδικά παραμονής αυτής, μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες, να λειτουργήσει επιβαρυντικά για τις ήδη υπάρχουσες, και να συμβάλλει στην ανάπτυξη διαφόρων μεταβολικών συνδρόμων. Ένα πολύ σοβαρό αρνητικό αποτέλεσμα στο οποίο μπορεί να οδηγήσει είναι η ανάπτυξη της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου (NAFLD). Αυτό με την σειρά του εμπεριέχει άλλους κινδύνους, όπως την ανάπτυξη στεατοηπατίτιδας (το 30%-40% των ασθενών NAFLD καταλήγουν σε αυτήν), μία ασθένεια που μπορεί να αποβεί και θανατηφόρα.

Η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση, η οποία χωρίζεται σε τρία στάδια, ανάλογα με τη σοβαρότητα της πάθησης του ήπατος, σχετίζεται άμεσα με το συσσωρευμένο λίπος στο συκώτι. Σταδιακά, φαίνεται πως τα ποσοστά εμφάνισής της αυξάνονται, όσο η ποιότητα της τροφής που καταναλώνεται, η διάθεση για δραστηριότητα, το άγχος και όλοι οι εξωτερικοί παράγοντες υποβαθμίζονται. Αυτό φαίνεται να μην σχετίζεται με το φύλο, ή την ηλικία, παρ' όλο που υπάρχουν κάποιες διαφορές ανάμεσα σε φυλές, όπως για παράδειγμα ανάμεσα σε νοτιο αφρικανούς και στο δυτικό πολιτισμό, αλλά αυτό που παίζει τον κύριο ρόλο είναι οι εξωτερικοί παράγοντες. Η παθογένεια της ασθένειας, είναι ακόμα άγνωστη, αλλά παρ' όλα αυτά, φαίνεται να υπάρχουν παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη αυτής. Η αυξημένη σύνθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ, και η μειωμένη οξείδωση αυτών, προκαλούν την συσσώρευσή τους στο ήπαρ. Αφού η μη αλκοολική λιπώδης νόσος συνδέεται συνήθως με υπερλιπιδαιμία, παχυσαρκία, διαβήτη τύπου 2, και όποιες παθήσεις σχετίζονται με αυξημένο βάρος, γίνεται κι η σύνδεση αυτής με το αυξημένο λίπος. Συνδυαστικά, η αντίσταση στην ινσουλίνη λόγω της αναστολής οξείδωσης των λιπαρών οξέων, μπορεί επίσης να συσχετιστεί με τον επιπολασμό της ασθένειας.

Καθώς σχετίζεται με την αυξημένη συσσώρευση λίπους στο συκώτι, αυτό υποδεικνύει και την άμεση συσχέτισή του με τρίτους παράγοντες, όπως ορμόνες και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον λιπώδη ιστό. Το αυξημένο λίπος προκαλεί και την έκφραση των αυξημένων αδιποκινών στον λιπώδη ιστό. Διάφορες τέτοιες είναι οι αδιπονεκτίνες και οι αδιποκίνες, και διάφορες άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται και σχετίζονται άμεσα με τον λιπώδη ιστό. Στην ανάπτυξη λοιπόν της μη αλκοολικής λιπώδης νόσου, αποτελεί προτεραιότητα η διερεύνηση του ρόλου αυτών των πρωτεϊνών, και η επίδρασή τους θετική ή αρνητική στην διήθηση. Μία τέτοια πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί αρκετά, και ανήκει στις υποψήφιες για την συσχέτισή της με την ασθένεια αυτή, είναι και η λεπτίνη.

Αρχικά, η κατάσταση της παχυσαρκίας θεωρούνταν αποτέλεσμα μόνο κακής διατροφικής συμπεριφοράς, και έλλειψη αυτοελέγχου. Με την μελέτη όμως της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και μετά την πρώτη κλωνοποίησή της το 1994 (102), φάνηκε πως μία μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό, ή σε κάποιον υποδοχέα της, μπορεί επίσης να συνδέεται με την νοσηρή παχυσαρκία. Με την εξέλιξη των ερευνών, σε ποντίκια με ανεπάρκεια ή έλλειψη λεπτίνης, φάνηκαν ήδη τα πρώτα αποτελέσματα στο φαινότυπό τους, καθώς επίσης και μελετήθηκε και η δράση της στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στην κατάσταση παχυσαρκίας, τα επίπεδα λεπτίνης λοιπόν εμφανίζονται αυξημένα (103), και, συνεχώς, σε έρευνα που πραγματοποίησαν ο Frederick RC και οι συνεργάτες του (77), όπου σε υπέρβαρα άτομα έγινε ενίσχυση σε λεπτίνη σε ενέσιμη μορφή, φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στο βάρος τους ή στον έλεγχο της όρεξής τους. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, πως η λεπτίνη δεν φαίνεται να έχει θετική, προς την βελτίωση της υγείας των παχύσαρκων, επίδραση. Σε έρευνα των Manuela G Neuman MSc PhD (109), όπου έγινε μέτρηση των επιπέδων των βιοδεικτών σε άτομα με NAFLD, φάνηκε επίσης ότι ανάμεσα σε άλλα, όπως τα τριγλυκερίδια, την ολική χοληστερόλη, την αντίσταση στην ινσουλίνη κλπ, η λεπτίνη ήταν σε αυξημένα επίπεδα, κάτι που μπορεί να υποδηλώνει τη σύνδεση μεταξύ τους. Συνεπώς, θεωρήθηκε ότι ίσως ένα χρήσιμο εργαλείο για την διάγνωση, αλλά ενδεχομένως και για την πρόβλεψη της ανάπτυξης της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου, μπορεί να είναι και η μέτρηση αυξημένων επιπέδων λεπτίνης.

Σχετικά με την ινσουλίνη, και τα επίπεδα σακχάρου νηστείας, φαίνεται να υπάρχει και εκεί μία θετική συσχέτιση στην επίδραση στην έκφραση λεπτίνης και την έκκρισή της. Αυτή η σύνδεση έχει γίνει και ανεξάρτητα του βάρους των εξεταζομένων. Όσον αφορά την ηπατοπάθεια όμως, πάλι σε άτομα τα οποία έπασχαν από στεατοηπατίτιδα (NASH), τα επίπεδα λεπτίνης ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα υγιή άτομα (104). Εδώ φαίνεται να γίνεται και διαχωρισμός στα δύο φύλα, αφού οι γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης ορού από ότι οι άντρες (106).

Συνολικά λοιπόν, φαίνεται πως υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση λεπτίνης ορού σε παχύσαρκα άτομα, με τις γυναίκες να έχουν υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους άνδρες (105). Σε έρευνα που πραγματοποίησαν οι Israt Ara Hossain (107) και οι συνεργάτες του, σε άτομα τα οποία δεν είχαν αναπτύξει διαβήτη, αλλά είχαν την προδιάθεση, στα δύο φύλα, φάνηκε διαφορά στα επίπεδα λεπτίνης ανάμεσα στους άνδρες και στις γυναίκες, με τις δεύτερες να έχουν σαφέστατα υψηλότερα ποσοστά (107). Διαφορά υπήρχε και στην ανάπτυξη της ηπατοπάθειας, με τις γυναίκες πάλι να έχουν υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τους άνδρες. Αυτές οι δύο ενδείξεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το αυξημένο λίπος, και τα αυξημένα επίπεδα λεπτίνης, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη ρύθμιση του βάρους, επιβαρύνουν και συνδέονται με την ανάπτυξη της ασθένειας. Το

γεγονός ότι υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Huang et al (108) οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η λεπτίνη ορού, τόσο αυξάνεται και ο κίνδυνος για την εμφάνιση του NAFLD, αλλά και ότι σε παθολογικές πλέον καταστάσεις, τα επίπεδα αυτής όταν μετρήθηκαν ήταν αυξημένα. Στη σύγκριση των δύο φύλων, μια εξήγηση που δόθηκε, ήταν ότι στις γυναίκες το σωματικό λίπος είναι πάντα υψηλότερο σε σύγκριση με των ανδρών, άρα και κατά συνέπεια και τα επίπεδα λεπτίνης πιο υψηλά. Η έρευνα των Israt Ara Hossain (107) έδειξε ότι σε καταμέτρηση ατόμων τα οποία είχαν ήδη νοσήσει, το ποσοστό των ανδρών ήταν υψηλότερο, και αυτό δικαιολογείται λόγω του ότι μπορεί οι γυναίκες να έχουν υψηλότερη λιπώδη μάζα, στους άνδρες όμως υπάρχει η διαφορά, ότι είχαν και υψηλότερα επίπεδα αμινοτρασφερασών, κάτι που σημαίνει ότι παρ' όλο που το υποδόριο λίπος είναι σχεδόν ίδιο μεταξύ των δύο, το σπλαχνικό είναι υψηλότερο στους άνδρες. Στο σπλαχνικό λίπος είναι που διεγείρονται και εκκρίνονται οι ορμόνες που είναι υπεύθυνες για την λιπόλυση, και έτσι είναι μεγαλύτερα τα ποσοστά του λίπους που μπορούν να εναποθετηθούν στο συκώτι και να το επιβαρύνουν. Εδώ δηλαδή, υπάρχει η διαφοροποίηση ανάμεσα στα δύο φύλα, με υψηλότερη ομάδα κινδύνου αυτή των ανδρών.

Καθώς είναι πολύ σημαντικό να μπορέσει να βρεθεί η παθογένεια της νόσου και να αντιμετωπιστεί, κυρίαρχο μέλημα είναι η σωστή και έγκυρη διάγνωση. Αν και όπως ήδη αναφέρθηκε, η βιοψία του ήπατος είναι το χρυσό κλειδί, καθ' ότι ακριβέστερο των άλλων, φέρει και πολλούς κινδύνους επιπλοκών. Τα υπόλοιπα μέσα εκτίμησης της κατάστασης του ήπατος είναι λιγότερο ακριβή, και μπορεί να υπάρξει σύγχυση με τα αποτελέσματα λόγω λάθους αξιολόγησης.

Στην συγκεκριμένη έρευνα λοιπόν, βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων λεπτίνης σε άτομα με λιπώδη διήθηση, αφού όσο αύξαναν τα επίπεδα ορού αυτής, τόσο αυξήθηκαν και οι πιθανότητες τα άτομα αυτά να έχουν αναπτύξει την νόσο. Κατά συνέπεια, αυξάνονταν και το επίπεδο διήθησης ανάλογα με τα επίπεδα λεπτίνης.

Περιορισμοί στην έρευνα δημιουργούνται λόγω μικρού δείγματος, καθώς ένα μεγαλύτερο δείγμα θα έδινε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, και με μεγαλύτερη βαρύτητα. Ένας δεύτερος περιορισμός είναι το ότι η έρευνα δεν ήταν προοπτική, ώστε να παρακολουθηθεί η εξέλιξη της νόσου στα άτομα αυτά. Η έρευνα τέλος δεν ασχολήθηκε με τις διαβαθμίσεις της νόσου ανάλογα με τα επίπεδα λεπτίνης, κάτι που επίσης μπορεί να οδηγήσει σε πιο ξεκάθαρα συμπεράσματα.

Μέσα από τη συγκεκριμένη μελέτη, και από πληθώρα άλλων, έχει βρεθεί ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων λεπτίνης και ανάπτυξης μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης. Μπορεί δηλαδή η λεπτίνη να γίνει ένας καλός προγνωστικός δείκτης για την εμφάνιση αλλά και την εξέλιξη τη

νόσου. Περαιτέρω έρευνες όμως είναι απαραίτητες για τον τρόπο με τον οποίο η λεπτίνη σχετίζεται με την NAFLD, και με τον δείκτη παχυσαρκίας που λειτουργεί επίσης ως επιβαρυντικός παράγοντας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver versus nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.014. [Epub ahead of print]. (A-1)
2. D. M. Torres, C. D. Williams, and S. A. Harrison, “Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 10, no. 8, pp. 837–858, 2012. (ΠΑ-2)
3. G. Vernon, A. Baranova, and Z. M. Younossi, “Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults,” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 34, no. 3, pp. 274–285, 2011. (ΠΑ-1)
4. J. M. Clark, “The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults,” *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 40, supplement 1, pp. S5–S10, 2006.
5. G. Marchesini, M. Brizi, G. Bianchi et al., “Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome,” *Diabetes*, vol. 50, no. 8, pp. 1844–1850, 2001.
6. J. C. Lovejoy, C. M. Champagne, L. de Jonge, H. Xie, and S. R. Smith, “Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition,” *International Journal of Obesity*, vol. 32, no. 6, pp. 949–958, 2008.
7. A. Suzuki and M. F. Abdelmalek, “Nonalcoholic fatty liver disease in women,” *Women’s Health*, vol. 5, no. 2, pp. 191–203, 2009.
8. H. Völzke, S. Schwarz, S. E. Baumeister et al., “Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population,” *Gut*, vol. 56, no. 4, pp. 594–595, 2007.
9. S. H. Park, W. K. Jeon, S. H. Kim et al., “Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 21, no. 1, pp. 138–143, 2006.
10. J. D. Yang, M. F. Abdelmalek, H. Pang et al., “Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis,” *Hepatology*, vol. 59, no. 4, pp. 1406–1414, 2014.

11. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
12. JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-52.
13. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-63.
14. Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity, *Hepatology* 2002; 36: 403-9.
15. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2557-62.
16. Claudia P. Oliveira, Priscila de Lima Sanches, Erlon Oliveira de Abreu-Silva, and Aline Marcadenti, Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Diabetes Research*, Volume 2016, Article ID 4597246, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4597246>
17. Michael Rosenbaum and Rudolph L Leibel, Role of leptin in energy homeostasis in humans, *J Endocrinol.* 2014 October ; 223(1): T83–T96. doi:10.1530/JOE-14-0358.
18. J. K. DOWMAN, J.W. TOMLINSON and P.N. NEWSOME, Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease, *Q J Med* 2010; 103:71–83
19. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995; 40:2002–9.
20. Franzese A, Vajro P, Argenziano A, PuzzIELLO A, Iannucci MP, Saviano MC, et al. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci* 1997; 42:1428–32.

21. W. I. Youssef and A. J. McCullough, "Steatohepatitis in obese individuals," *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, vol. 16, no. 5, pp. 733–747, 2002.
22. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an over- view of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115:141–50
23. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocr Rev* 2008; 29:939–60.
24. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA* 2003; 289:3000–4.
25. *Lavine JE, Schwimmer JB.* Non-alcoholic fatty liver disease in the pediatric population. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 549-558.
26. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Non-alcoholic fatty liver, steatohepa- titis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923.
27. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic his- tology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; 45:600–6.
28. Adams LA, Feldstein AE. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4: 623–35.
29. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–21.
30. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467–74.
31. Ratziu V, Bugianesi E, Dixon J, et al. Histological progression of non- alcoholic fatty liver disease: a critical reassessment based on liver sampling variability. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 821–30.

32. Fukusato T, Fukushima J, Shiga J, et al. Liver Disease Working Group- Kanto. Interobserver variation in the histopathological assessment of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005; 33: 122–7.
33. *AJ*. The clinical features, diagnosis and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 521-533
34. *Adams LA, Angulo P*. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22: 1129-1133.
35. Necati Örmeci, Department of Gastroenterology, Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnosis, pathogenesis, and management, *Turk J Gastroenterol* 2014; 25: 127-32
36. Ipekci SH, Basaranoglu M, Sonsuz A. The fluctuation of serum levels of aminotransferase in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 371.
37. Sonsuz A, Basaranoglu M, Ozbay G. Relationship between aminotransferase levels and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1370-1.
38. Guha IN, Parkes J, Roderick P, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008; 47: 455–60.
39. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010; 59: 1265–9.
40. Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol* 2009; 51: 433–45.
41. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, et al. Significance of exercise in nonalcoholic fatty liver disease in men: a community-based large cross-sectional study. *J Gastroenterol* 2014. [Epub ahead of print].

42. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-52.
43. F. Angelico, M. Del Ben, R. Conti et al., “Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 3, pp. 1578–1582, 2005.
44. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? *Gastroenterology* 1998; 114:842–5.
45. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006; 130:207–10.
46. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40:185–94.
47. C. P. Day and O. F. W. James, “Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’?” *Gastroenterology*, vol. 114, no. 4, pp. 842–845, 1998.
48. A. E. Feldstein, “Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease,” *Seminars in Liver Disease*, vol. 30, no. 4, pp. 391–401, 2010.
49. S. Petta, C. Muratore, and A. Craxi, “Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future,” *Digestive and Liver Disease*, vol. 41, no. 9, pp. 615–625, 2009.
50. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; 163:1301–11.
51. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28:370–9
52. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115:1343–51.
53. A. R. Moschen and H. Tilg, “Nutrition in pathophysiology and treatment of nonalcoholic fatty liver disease,” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 11, no. 5, pp. 620– 625, 2008.

54. M. C. Elias, E. R. Parise, L. D. Carvalho, D. Szejnfeld, and J. P. Netto, "Effect of 6-month nutritional intervention on non- alcoholic fatty liver disease," *Nutrition*, vol. 26, no. 11-12, pp. 1094–1099, 2010.
55. A. M. Zivkovic, J. B. German, and A. J. Sanyal, "Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 86, no. 2, pp. 285–300, 2007
56. M. Chung, J. Ma, K. Patel, S. Berger, J. Lau, and A. H. Lichtenstein, "Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 100, no. 3, pp. 833–849, 2014
57. American Diabetes Association, "Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association," *Diabetes Care*, vol. 31, supplement 1, pp. S61–S78, 2007
58. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Z. Reiner, A. L. Catapano et al., "ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)," *European Heart Journal*, vol. 32, no. 14, pp. 1769–1818, 2011.
59. P. Dongiovanni, C. Lanti, S. Gatti et al., "High fat diet subverts hepatocellular iron uptake determining dysmetabolic iron overload," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 2, Article ID e0116855, 2015.
60. R. D. Santos, A. C. M. Gagliardi, H. T. Xavier et al., "Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gordura e Saúde Cardiovascular," *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 100, no. 1, supplement 3, pp. 1–40, 2013
61. J. A. Parnell, M. Raman, K. P. Rioux, and R. A. Reimer, "The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance," *Liver International*, vol. 32, no. 5, pp. 701–711, 2012

62. A. Iacono, G. M. Raso, R. B. Canani, A. Calignano, and R. Meli, "Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 22, no. 8, pp. 699–711, 2011
63. S. Nabavi, M. Raftaf, M. H. Somi, A. Homayouni-Rad, and M. Asghari-Jafarabadi, "Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease," *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no. 12, pp. 7386–7393, 2014.
64. B. M. Attar and D. H. Van Thiel, "Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 481893, 10 pages, 2013
65. X. Jiang, D. Zhang, and W. Jiang, "Coffee and caffeine intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective studies," *European Journal of Nutrition*, vol. 53, no. 1, pp. 25–38, 2014
66. L. Abenavoli, "Non-alcoholic fatty liver disease and beneficial effects of dietary supplements," *World Journal of Hepatology*, vol. 7, no. 12, pp. 1723–1724, 2015.
67. Arslan N, Erdur B, Aydın A. Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian Pediatr* 2010; 47: 829-839.
68. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395:763–770.
69. Hall ME, Smith G, Hall JE, Stec DE. Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCreMer transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301:H253–260
70. Bates SH, Myers MG Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; 14:447–452.
71. Machado MV, Coutinho J, Carepa F, Costa A, Proença H, Cortez-Pinto H. How adiponectin, leptin, and ghrelin orchestrate together and correlate with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 1166-1172
72. LuoR,LiX,JiangR,GaoX,LüZ,HuaW.Serum concentrations of resistin and adiponectin and their relationship to insulin resistance in subjects with impaired glucose tolerance. *J Int Med Res* 2012; 40: 621-630

73. Nazal L, Riquelme A, Solis N, et al. Hypoadiponectinemia and its association with liver fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2010; 20: 1400-1407.
74. Canas JA, Damaso L, Altomare A, Killen K, Hossain J, Balagopal PB. Insulin resistance and adiposity in relation to serum β -carotene levels. *J Pediatr* 2012; 161: 58-64.
75. Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, Feng GS. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:16064–16069.
76. Zhang J, Scarpace PJ. The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo. *Br J Pharmacol*. 2009; 158:475–482.
77. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995a; 1:1311–1314.
78. Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:1593–1598
79. Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2000; 423:261–281.
80. Patterson CM, Leshan RL, Jones JC, Myers MG Jr. Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin receptor-expressing cells. *Brain Res*. 2011
81. Tartaglia LA. The leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272:6093–6096.
82. Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK. Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2009; 514:518–532.
83. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996; 84:491–495.
84. Shpilman M, Niv-Spector L, Katz M, Varol C, Solomon G, Ayalon-Soffer M, Boder E, Halpern Z, Elinav E, Gertler A. Development and characterization of high affinity leptins and leptin antagonists. *J Biol Chem*. 2011; 286:4429–4442.

85. Huynh FK, Levi J, Denroche HC, Gray SL, Voshol PJ, Neumann UH, Speck M, Chua SC, Covey SD, Kieffer TJ. Disruption of hepatic leptin signaling protects mice from age- and diet-related glucose intolerance. *Diabetes*. 2010; 59:3032–3040
86. Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest*. 2007; 117:2860–2868.
87. Rajala MW, Patterson CM, Opp JS, Foltin SK, Young VB, Myers MG Jr. Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice. *Endocrinology*. 2014; 155:748– 757. [
88. Hayes MR, Skibicka KP, Lechner TM, Guarnieri DJ, DiLeone RJ, Bence KK, Grill HJ. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. *Cell Metab*. 2010; 11:77–83.
89. Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006; 51:801–810
90. Ring LE, Zeltser LM. Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. *J Clin Invest*. 2010; 120:2931–2941
91. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*. 1995; 1:1155–1161
92. Tobe K, Ogura T, Tsukamoto C, Imai A, Matsuura K, Iwasaki Y, Shimomura H, Higashi T, Tsuji T. Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university students. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94:3328–3335.
93. Coleman D. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 1973; 9:294– 298.10.1007/BF01221857

94. Ravussin E, Burnand B, Schutz Y, Jequier E. Twenty-four hour energy expenditure and resting metabolic rate in obese, moderately obese, and control subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1982; 35:566–573
95. Leibel R, Hirsch J. Diminished energy requirements in reduced-obese patients. *Metabolism*. 1984; 33:164–170.10.1016/0026-0495(84)90130-6
96. Halaas J, Gajiwala K, Maffei M, Cohen S, Chait B, Rabinowitz D, Lallone R, Burley S, Friedman J. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the ob gene. *Science*. 1995; 269:543– 546.10.1126/science.7624777
97. Halaas J, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton D, Friedman J. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *PNAS*. 1997; 94:8878– 8883.10.1073/pnas.94.16.8878
98. Barash I, Cheung C, Weigle D, Ren H, Kramer J, Fallon M, Kabisigting E, Kujiper J, Clifton D, Steiner R. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 1996; 137:3144– 3147.10.1210/endo.137.7.8770941
99. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Swewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997; 387:903–908.10.1038/43185
100. Farooqi I, Jebb S, Langmack G, Lawrence E, Cheetham C, Prentice A, Hughes I, McCamish M, O’Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341:879–884.10.1056/NEJM199909163411204
101. Leibel, R.; Rosenbaum, M. Metabolic response to weight perturbation. In: Clément, K., editor. *Novel Insights into Adipose Cell Functions, Research and Perspectives in Endocrine Interactions*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2010. p. 121-133.
102. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372(6505):425–432
103. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*. 1996; 2(5):589–593.

104. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ (2006) The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *AJG* 101: 2629–2640
105. Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ (2003) Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med* (Maywood) 228: 1175–80.
106. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, et al. (1996) Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3424–7
107. Hossain IA, Akter S, Rahman MK, Ali L (2015) Gender Specific Association of Serum Leptin and Insulinemic Indices with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Prediabetic Subjects. *PLoS ONE* 10(11): e0142165. doi:10.1371/journal.pone.0142165
108. Huang XD, Fan Y, Zhang H, Wang P, Yuan JP, Li MJ, et al. (2008) Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 14: 2888–2893.
109. Manuela G Neuman MSc PhD, Lawrence B Cohen MSc MD, Radu M Nanau BSc, Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease, *Can J Gastroenterol Hepatol* Vol 28 No 11 December 2014
110. Hossain IA, Akter S, Rahman MK, Ali L (2015) Gender Specific Association of Serum Leptin and Insulinemic Indices with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Prediabetic Subjects. *PLoS ONE* 10(11): e0142165. doi:10.1371/journal.pone.0142165
111. Zois CD¹, Baltayiannis GH, Bekiari A, Goussia A, Karayiannis P, Doukas M, Demopoulos D, Mitsellou A, Vougiouklakis T, Mitsi V, Tsianos EV., Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece, *World J Gastroenterol*. 2010 Aug 21;16(31):3944-9.
112. AlShaalán R, Aljiffry M, Al-Busafi S, Metrakos P, Hassanain M, Nonalcoholic fatty liver disease: Noninvasive methods of diagnosing hepatic steatosis, *Saudi J Gastroenterol*. 2015 Mar-Apr;21(2):64-70