



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**Προοπτική μελέτη εθελοντών με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση ήπατος.
Έλεγχος γενετικών και περιβαλλοντικών καθοριστών.**

Διπλωματική Εργασία
Βέζου Χαρά



Αθήνα, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δεδούσης Γεώργιος

**Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Μανιός Ιωάννης

**Αναπληρωτής Καθηγητής Διατροφικής Αγωγής και Αξιολόγησης
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Ματάλα Αντωνία - Λήδα

**Καθηγήτρια Ανθρωπολογίας της Διατροφής
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Η **Χαρά Βέζου** δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πρωτίστως θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Δεδούση Γεώργιο, Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την ευκαιρία να διεκπεραιώσω μέρος μιας ερευνητικής μελέτης με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, για την καθοδήγησή του και την υποστήριξή του σε όποιες δυσκολίες εμφανίστηκαν τόσο κατά τη συλλογή των δεδομένων όσο και κατά την επεξεργασία τους.

Η παρούσα μελέτη ήταν αποτέλεσμα συνεργασίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου με το Ακτινολογικό τμήμα του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» και της 1^{ης} Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό». Επομένως δε θα μπορούσα να παραλείψω να αποδώσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον διευθυντή του Ακτινολογικού τμήματος του ΓΝΑ «Λαϊκό», κυρίου Ρεβένα Κωνσταντίνου για την υπερηχογραφική αξιολόγηση των εθελοντών, καθώς και στον κύριο Κόκκινο Αλέξανδρο, Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, για την φιλοξενία στην 1^η Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του νοσοκομείου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα άτομα της ερευνητικής ομάδας του Mast4Health που με βοήθησαν συμμετέχοντας ενεργά στη συλλογή των δεδομένων, και σε όσους με υποστήριξαν με τα σχόλια τους και τις παρατηρήσεις τους κατά τη συγγραφή της εργασίας...

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξή τους και σε αυτό μου το εγχείρημα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	15
1.ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....	17
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ	17
1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	18
1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	19
1.3.1 ΜΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	19
1.3.2 ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	28
1.3.3 ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	31
1.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	35
1.4.1 ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ	36
1.4.2 DE NOVO ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ.....	37
1.4.3 ΛΙΠΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	37
1.4.4 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟΥ	38
1.4.5 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ	39
1.4.6 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ/ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	40
1.4.7 ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ	41
1.4.8 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	41
1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ	41
1.5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	42
1.5.2 ΕΛΕΓΧΟΣ – SCREENING	45
1.5.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	46
1.5.4 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	47
1.5.5 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	49
1.5.6 ΒΙΟΨΙΑ ΗΠΑΤΟΣ	53

1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD	54
1.6.1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ.....	54
1.6.2 ΔΙΑΤΡΟΦΗ	56
1.6.3 ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	59
1.6.4 ΑΠΩΛΕΙΑ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	60
1.6.5 ΒΑΡΙΑΤΡΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ.....	62
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	63
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	64
3.1 ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	64
3.1.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	64
3.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	65
3.3 ΜΕΤΡΗΣΙΜΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	65
3.3.1 ΚΟΙΝΩΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	66
3.3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ	66
3.3.3 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	66
3.3.4 ΑΤΟΜΙΚΟ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	68
3.3.5 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	69
3.3.6 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ.....	71
3.3.7 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	71
3.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΑΝΕΛΕΓΧΟΥ	74
3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	74
3.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	75
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	76
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΕΠΑΝΕΛΕΓΧΟ.....	81
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος (NAFLD) είναι η πλέον διαδεδομένη μορφή χρόνιας ηπατικής νόσου στον κόσμο. Η NAFLD παρουσιάζει ένα ιστολογικό φάσμα, που

κυμαίνεται από την ήπια στεάτωση έως την πιο επιθετική φλεγμονώδη μορφή, τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε ίνωση και σε κίρρωση του ήπατος. Η νόσος αναπτύσσεται μέσω σύνθετης διεργασίας που εμπλέκει τόσο γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση των μεταβολών της υγείας εθελοντών με NAFLD. Ο ρόλος της γενετικής προδιάθεσης (γονιδιακό προφίλ) και των περιβαλλοντικών παραγόντων (διατροφή, φυσική δραστηριότητα, κάπνισμα, βιοτικό επίπεδο) αξιολογήθηκε και εκτιμήθηκε στο χρόνο και επιπλέον διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην εξέλιξη της νόσου.

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 117 άτομα, εκ των οποίων όλοι ήταν συμμετέχοντες της μελέτης με τίτλο «NAFLD - Μη Αλκοολική Λιπώδης Διήθηση Ήπατος» και δέχθηκαν να πραγματοποιηθεί επανέλεγχος της υγείας τους. Κατά τη διάρκεια του επανελέγχου έγινε καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων τους και του ιατρικού ιστορικού τους καθώς και αξιολόγηση της φυσικής τους δραστηριότητας και των διατροφικών συνηθειών τους. Επιπλέον τα άτομα υποβλήθηκαν σε ανθρωπομετρικές μετρήσεις και υπερηχογραφικό έλεγχο άνω κοιλίας. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία για τη διενέργεια αιματολογικών και βιοχημικών αναλύσεων.

Από τους 117 εθελοντές που συμμετείχαν το 36.5% ήταν άντρες με μέσο όρο ηλικίας 51.8 ± 9.9 έτη και το 63.5% γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 55.1 ± 10.8 έτη. Τα κυριότερα ευρήματα της μελέτης κατά τον επανέλεγχο της υγείας των εθελοντών είναι ότι η αύξηση του ΔΜΣ κατά 0.96 kg/m^2 αυξάνει κατά 2.61 φορές την πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης ($p=0.042$) ανεξάρτητα από την ηλικία και το φύλο, η αύξηση της συστολικής πίεσης κατά 0.12 mmHg αυξάνει κατά 1.13 φορές την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου ($p=0.034$), η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου αυξάνει το σχετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ($p=0.028$), ο δείκτης HOMA-IR συνδέεται ανεξάρτητα με την πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης ($p=0.003$) και η αυξημένη αποκλειστική κατανάλωση ελαιολάδου είναι προστατευτική για την εκδήλωση της νόσου ($p=0.045$). Κατά την έναρξη της μελέτης, ωστόσο, στο υπό διαμόρφωση δείγμα τα αποτελέσματα που αποτέλεσαν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τη νόσο διέφεραν, και ήταν η αύξηση του λόγου περιφέρειας μέσης/ισχύου ($p=0.01$), η υπέρταση ($p=0.017$) και το να είναι κάποιος φορέας του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3 ($p=0.044$).

Λέξεις κλειδιά: Μη αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος, Προοπτική Μελέτη, Γονίδια, Διατροφή

ABSTRACT

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most widespread form of chronic liver disease worldwide. NAFLD includes a histological spectrum, ranging from mild steatosis to the most aggressive inflammatory form, the non-alcoholic steatohepatitis (NASH) which can develop into fibrosis and liver cirrhosis. The disease develops through a complex process involving both genetic and environmental factors.

The purpose of this research is to investigate changes in health of volunteers with NAFLD. It has been evaluated and estimated over time the impact of genetic predisposition (genetic profile) and environmental factors (nutrition, physical activity, smoking status, living standards). Furthermore, it has been investigated the interaction between genetic and environmental factors in the evolution of the disease.

The sample of the study is consisted of 117 individuals, all of whom participated in the study entitled “NAFLD – Non Alcoholic Fatty Liver Disease” and accepted to reevaluate their health condition. In terms of this reevaluation, their demographic data and medical history were recorded, as well as their physical activity and nutritional status were assessed. In addition, individuals were subjected to anthropometric measurements and ultrasound scan of the upper abdomen. Finally, blood samples were received in order to analyze their biochemical and hematological profile.

Of the 117 volunteers who participated, 36.5% were men with an average age of 51.8 ± 9.9 years and 63.5% were women with an average age of 55.1 ± 10.8 years. The main findings of the study in reevaluation of volunteers' health are that the increase of the BMI by 0.96 kg / m^2 increases 2.61 times the likelihood of hepatic steatosis ($p = 0.042$) irrespective of age and gender; increase in systolic pressure by 0.12mmHg increases 1.13 times the likelihood of disease appearance ($p = 0.028$), the HOMA-IR index is associated with the likelihood of hepatic steatosis ($p = 0.034$), the diagnosis of metabolic syndrome increases the risk of developing the disease ($p = 0.003$) and the increased exclusive consumption of olive oil is protective against the disease ($p = 0.045$). However, at the beginning of the study, the results for the constructed sample that constituted independent risk factors for the disease varied and was waist to hip ratio ($p = 0.01$), hypertension ($p = 0.017$) and being carrier of the polymorphism rs738409 of PNPLA3 gene ($p = 0.044$).

Keywords: Non Alcoholic Fatty Liver Disease, Longitudinal Study, Genes, Nutrition

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1.1: Η φυσική εξέλιξη της NAFLD. Το διάγραμμα δείχνει τα στάδια και τις κλινικές καταστάσεις που συμπεριλαμβάνονται στον όρο NAFLD. (Haas, Francque, & Staels, 2016)...	15
Εικόνα 1.4.1 Η θεωρία των πολλαπλών χτυπημάτων για την ανάπτυξη της NAFLD (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016).....	35
Εικόνα 1.5.5.1.1 Υπερηχογραφική αξιολόγηση της ηπατικής στεάτωσης (Lee & Park, 2014).....	49

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1.1: Γνωστές δευτεροπαθείς αιτίες ηπατικής στεάτωσης (<i>Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012</i>).....	16
Πίνακας 1.2.1: Ο επιπολασμός της NAFLD σε διάφορους πληθυσμούς της Ευρώπης (<i>Bedogni et al., 2007</i>).....	17
Πίνακας 1.2.2: Ο επιπολασμός της NAFLD ανά ήπειρο (<i>Younossi et al., 2016</i>).....	17
Πίνακας 1.5.1 Αιτίες αποκλεισμού διάγνωσης της NAFLD (<i>Ahmed et al., 2010</i>).....	41
Πίνακας 1.5.4.1 :Στατιστική ανάλυση των διάφορων μοντέλων πρόβλεψης για τη NAFLD (<i>Hassan et al., 2014; Machado & Cortez-Pinto, 2013</i>).....	48
Εικόνα 1.5.5.1.1 Υπερηχογραφική αξιολόγηση της ηπατικής στεάτωσης (<i>Lee & Park, 2014</i>).....	49
Πίνακας 1.6.1.1: Επιλογές θεραπείας για τη NAFLD (<i>Wilkins et al., 2013</i>).....	55
Πίνακας 1.6.4.1: Προτεινόμενες τροποποιήσεις στη δίαιτα και τη φυσική δραστηριότητα στα άτομα με NAFLD ή NASH (" <i>EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease,</i> " 2016).....	60
Πίνακας 3.2.1:Κριτήρια κατάταξης ως προς τον βαθμό λιπώδους διήθησης.....	65
Πίνακας 4.1.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης.....	76
Πίνακας 4.1.2: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης.....	77

Πίνακας 4.1.3: Κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης.....	78
Πίνακας 4.1.4: Βιοχημικός έλεγχος κατά την έναρξη της μελέτης.....	78
Πίνακας 4.1.5: Μη επεμβατικά μοντέλα πρόβλεψης κατά την έναρξη της μελέτης.....	79
Πίνακας 4.1.6: Διατροφικό προφίλ του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης.....	79
Πίνακας 4.1.7: Συσχετίσεις των γονιδίων με τη νόσο κατά την έναρξη της μελέτης.....	80
Πίνακας 4.1.8: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που προκύπτουν από το μοντέλο πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την ηπατική στεάτωση κατά την έναρξη της μελέτης.....	81
Πίνακας 4.2.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά τον επανέλεγχο.....	81
Πίνακας 4.2.2: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά τον επανέλεγχο.....	82
Πίνακας 4.2.3: Κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την παρακολούθηση.....	83
Πίνακας 4.2.4: Βιοχημικές τιμές κατά τον επανέλεγχο του δείγματος.....	83
Πίνακας 4.2.5: Μη επεμβατικά μοντέλα πρόβλεψης κατά τον επανέλεγχο.....	84
Πίνακας 4.2.6: Διατροφικό προφίλ του δείγματος κατά τον επανέλεγχο.....	84
Πίνακας 4.2.7: Συσχετίσεις των γονιδίων με τη νόσο κατά τον επανέλεγχο.....	85
Πίνακας 4.2.8: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που προκύπτουν από το μοντέλο πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την ηπατική στεάτωση κατά την παρακολούθηση.....	85
Πίνακας 4.2.9: Συσχετίσεις των γονιδίων με τα μη επεμβατικά σκορ πρόβλεψης της νόσου και του δείκτη φυσικής δραστηριότητας.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1.5.1.1:Αλγόριθμος αξιολόγησης ενός ασθενή με υποψία για NAFLD (<i>Wilkins et al., 2013</i>).....	43
---	----

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NAFLD	Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NAFL	Μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ	Non Alcoholic Fatty Liver
NASH	Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα	Non Alcoholic Steatohepatitis
HCC	Ηπατοκυτταρικό καρκίνο	Hepatocellular Carcinoma
TG	Τριγλυκερίδια	Triglycerides
IR	Ινσουλινοαντίσταση	Insulin Resistance
H-MRS	Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων	
MRI	Μαγνητική τομογραφία	
ALT	Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης	Alanine aminotransferase
GWAS	Μελέτη σάρωσης του γονιδιώματος	Genome-wide association study
ΠΜ	Περιφέρεια Μέσης	Waist circumference
ΔΜΣ	Δείκτης Μάζας Σώματος	Body Mass Index
MetS	Μεταβολικό σύνδρομο	Metabolic Syndrome
IFG	Διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας	Impaired fasting glucose
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας	High density lipoprotein
ΣΔΤ	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II	Diabetes Mellitus type II
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας	Low density lipoprotein
NIH	Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας	National Institute of Health
MRS	Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού	Magnetic Resonance Spectroscopy
AST	Αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος	Aspartate aminotranferase
γ-GT	Γ-γλουταμινική τρανσπεπτιδάση	Gamma glutamyl transpeptidase
SFA	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Saturated Fatty Acids
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	Polyunsaturated Fatty Acids
TC	Ολική χοληστερόλη	Total Cholesterol
MUFA	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	Monosaturated Fatty Acids
DNL	De novo λιπογένεση	
VLDL-TG	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας σε τριγλυκερίδια	Very Low Density Lipoprotein-Triglycerides
FFAs	Ελεύθερα λιπαρά οξέα	Free Fatty Acids
FC	Ελεύθερη χοληστερόλη	Free Cholesterol
KCs	Κύτταρα Kupffer	Kupffer Cells
HSCs	Αστεροειδή κύτταρα	
ΕΔ	Ενδοπλασματικό δίκτυο	
TLR4		Toll-like receptor 4
NF-κB	Πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας κB	Nuclear Factor- κB
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων	Tumor necrosis factor
PAI-I	Αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου	
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης	Lipopolysaccharide

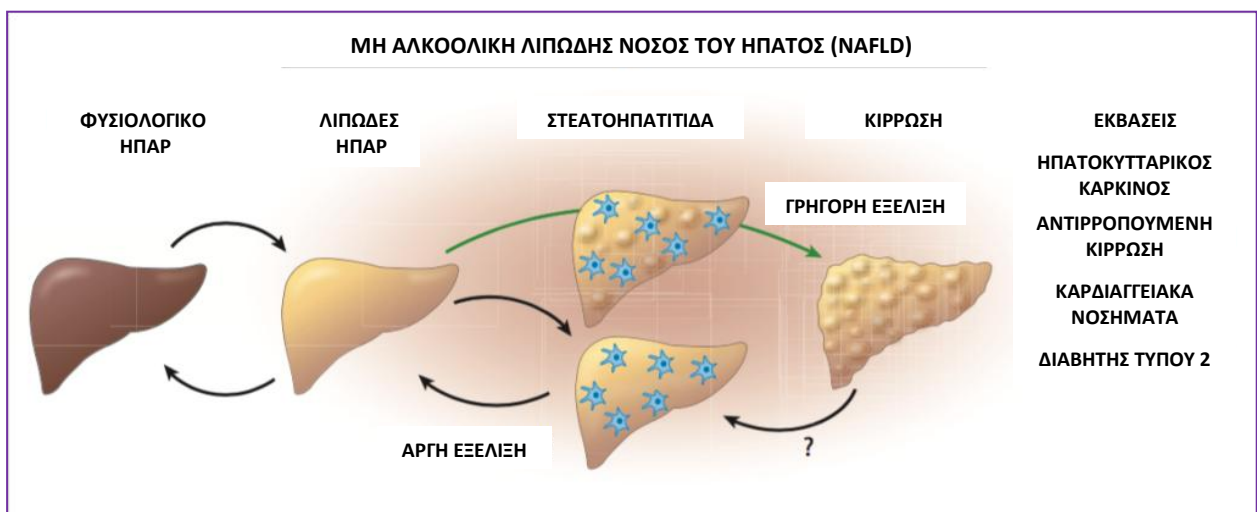
ROS	Ελευθέρες ρίζες οξυγόνου	Reactive Oxygen Species
UPR		Unfolded Protein Response
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη	Adenosine triphosphate
Fer	Φερριτίνης	Ferritin
ALP	Αλκαλική φωσφατάση	Alkaline Phosphatase
Alb	Αλβουμίνη	Albumin
PLT	Αιμοπετάλια	Platelet
US	Υπέρηχος	Ultrasound
MRE		Magnetic Resonance Elastography
CT	Αξονική τομογραφία	
PDFF	Πυκνότητα των πρωτονίων στο κλάσμα του λίπους	Proton Density Fat Fraction
RDA	Συνιστώμενες ημερήσιες προσλήψεις	Recommended Daily Allowances
DRI	Διαιτητικές προσλήψεις αναφοράς	Dietary References Intake
AGA	Αμερικάνικη Γαστρεντερολογική Ένωση	American Gastroenterological Association
EPA	Εικοσαπενταενοϊκό οξύ	Eicosapentaenoic acid
DHA	Δοκοσαεξαενοϊκό οξύ	Docosahexaenoic acid
SNPs	Απλός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός	Single Nucleotide Polymorphism
PNPLA3		patatin-like phospholipase domain- containing-3
SREBP-1c		Sterol regulatory element-binding protein 1
TM6SF2		Transmembrane 6 Superfamily Member 2
PPAR	Πυρηνικοί υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων	peroxisome proliferator activated nuclear receptors
GCKR		Glucokinase Regulatory
IRS1		Insulin Receptor Substrate 1
ENPP1		Plasma Cell Antigen 1
TRIB1		Tribble-1
HFE	Πρωτεΐνη αιμοχρωμάτωσης του ανθρώπου	
MnSOD2	Δισμουτάση του υπεροξειδίου συνδεδεμένη με μαγγάνιο	
IL-6	Ιντερλευκίνη- 6	Interleukin-6
KLF6		Kruppel-Like
AGTR1	Αγγειοτενσίνη II	
WHR	Λόγος Περιφέρειας Μέσης/Ισχίου	Waist to Hip Ratio
HPAQ	Ερωτηματολόγιο Φυσικής δραστηριότητας Χαροκοπίου	Harokopio Physical Activity Questionnaire
HbA1c	Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη	
Fe	Σίδηρος	
Glu	Γλυκόζη	Glucose
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	C- Reactive Protein
Ins	Ινσουλίνη Ορού	Insulin

1.ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο όρος μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease - NAFLD) συμπεριλαμβάνει ολόκληρο το φάσμα της λιπώδους ηπατικής νόσου, με δύο διακριτές παθολογικές καταστάσεις με διαφορετική πρόγνωση μεταξύ τους, το μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ (Non Alcoholic Fatty Liver - NAFL) και τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Non Alcoholic Steatohepatitis - NASH). Ιστολογικά η NASH ορίζεται ως η παρουσία ηπατικής στεάτωσης μαζί με φλεγμονή και ηπατοκυτταρικό τραύμα με ή χωρίς ίνωση. Η NASH μπορεί προοδευτικά να οδηγήσει από την ίνωση στην κίρρωση και ενδεχομένως στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (Hepatocellular Carcinoma – HCC) (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012). Στους περισσότερους ασθενείς η νόσος παραμένει σταθερή χωρίς κλινικά επακόλουθα και αναστρέψιμη με την κατάλληλη παρέμβαση (Εικόνα 1.1.1).

Εικόνα 1.1.1: Η φυσική εξέλιξη της NAFLD. Το διάγραμμα δείχνει τα στάδια και τις κλινικές καταστάσεις που συμπεριλαμβάνονται στον όρο NAFLD. (Haas, Francque, & Staels, 2016)



Ο κύριος παθογενετικός παράγοντας της NAFLD είναι η εναπόθεση τριγλυκεριδίων (triglycerides – TG) στα ηπατοκύτταρα, που σχετίζεται με την παρουσία ινσουλινοαντίστασης (IR), σε ποσοστό >5% του συνολικού βάρους του ήπατος (ηπατική στεάτωση), η οποία δεν οφείλεται σε υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ ή άλλες δευτεροπαθείς αιτίες (Πίνακας 1.1.1). Η ηπατική στεάτωση μπορεί να οριστεί είτε ιστολογικά είτε απεικονιστικά ($\geq 5.6\%$ μέσω μαγνητικής φασματοσκοπίας συντονισμού πρωτονίων (^1H -MRS) ή ποσοτικά μέσω μαγνητικής τομογραφίας) (EASL-EASD-EASO, 2016).

Κατανάλωση αλκοόλ ≥ 30 γρ./ημέρα για τους άντρες και ≥ 20 γρ./ημέρα για τις γυναίκες παραπέμπει σε διάγνωση λιπώδους ήπατος αλκοολικής αιτιολογίας (Dowman, Tomlinson, & Newsome, 2010).

Πίνακας 1.1.1: Γνωστές δευτεροπαθείς αιτίες ηπατικής στεάτωσης (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012)

ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΕΙΣ ΑΙΤΙΕΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΣΤΕΑΤΩΣΗΣ	
ΜΕΓΑΦΥΣΑΛΙΔΩΔΗΣ ΣΤΕΑΤΩΣΗ	ΜΙΚΡΟΦΥΣΑΛΙΔΩΔΗΣ ΣΤΕΑΤΩΣΗ
- Υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ - Ηπατίτιδα C (γονότυπος 3) - Νόσος Wilson - Λιποδυστροφία - Ασιτία - Παρεντερική Διατροφή - Αβητα-λιποπρωτεϊναιμία - Φαρμακευτική αγωγή (π.χ.αμιοδαρόνη, μεθοτρεξάτη,ταμοξιφέννη,κορτικοστεροειδή)	- Σύνδρομο Reye's - Φαρμακευτική αγωγή (βαλπροϊκό, αντιρετροϊκό) - Οξύ λιπώδες ήπαρ της κύησης - Σύνδρομο HELIP - Ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού (έλλειψη LCAT, νόσος αποθήκευσης εστέρα χοληστερόλης, νόσος Wolman)

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ποσοτικοποίηση του επιπολασμού της NAFL/NASH παγκοσμίως δεν είναι αξιόπιστη και σαφής εξαιτίας των μεγάλων διακυμάνσεων των παραμέτρων των διαθέσιμων μελετών (Sayiner, Koenig, Henry, & Younossi, 2016), παρόλα αυτά εκτιμάται ότι το 6-35% νοσεί παγκοσμίως, με μια διάμεσο περίπου στο 20% στον παγκόσμιο πληθυσμό (Younossi, Stepanova, et al., 2011). Στην Ευρώπη ο μέσος όρος εμφάνισης της νόσου είναι 25-26% με μεγάλες διακυμάνσεις τόσο μεταξύ των κρατών της όσο και μεταξύ των ηλικιακών ομάδων (Πίνακας 1.2.1) (Bedogni et al., 2007). Σύμφωνα με μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (Younossi et al., 2016), ο επιπολασμός της NAFLD ανά ήπειρο βρίσκεται στα εξής επίπεδα: 24% στην Ευρώπη, 27% στην Ασία, 13% στην Αφρική, 32% στη Μέση Ανατολή, 24% στη Βόρεια Αμερική και 30% στη Νότια Αμερική (Πίνακας 1.2.2). Ο επιπολασμός της NASH είναι αξιοσημείωτα χαμηλότερος, αφού κυμαίνεται μεταξύ 3-5% (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012), αλλά δεδομένης της ιστολογικής διάγνωσης που απαιτείται ο

πραγματικός επιπολασμός της στο γενικό πληθυσμό δεν είναι διαθέσιμος (Fazel, Koenig, Sayiner, Goodman, & Younossi, 2016).

Πίνακας 1.2.1: Ο επιπολασμός της NAFLD σε διάφορους πληθυσμούς της Ευρώπης (Bedogni et al., 2007)

	CASE IDENTIFICATION	PREVALENCE NAFLD
14 EU Countries	FLI	33% (adults)
Germany	US and LE	2% (36% in obese children)
Germany	US	30% (adults)
Greece	Histology	31% (adults)
Italy	US	26% (adults)
Italy	US	12.5% (adolescents)
Italy	US	44% (obese children)
Italy	US	69.5% (diabetic pts)
Romania	US	20% (adults)
Spain	US	25.8% (adults)
UK	US	46.2% (diabetic pts)

FLI, fatty liver index; US, ultrasound; LE liver enzymes.

Πίνακας 2.2.2: Ο επιπολασμός της NAFLD ανά ήπειρο (Younossi et al., 2016)

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ NAFLD (%)	95 % C.I. (%)
ΑΦΡΙΚΗ	13.48	(5.69-28.69)
ΑΣΙΑ	27.37	(23.29-31.88)
ΕΥΡΩΠΗ	23.71	(16.12-33.45)
ΜΕΣΗ ΑΝΑΤΟΛΗ	31.79	(13.48-58.23)
ΒΟΡΕΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ	24.13	(19.73-29.15)
ΝΟΤΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ	30.45	(22.74-39.44)
ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ	25.24	(22.1-28.65)

1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

1.3.1 ΜΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1.3.1.1 ΗΛΙΚΙΑ

Η βιβλιογραφία αναφέρει την εμφάνιση της NAFLD και της NASH σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, συμπεριλαμβανομένης και της παιδικής ηλικίας, όπου η παρουσία στεάτωσης είναι μικρότερη από ότι στους ενήλικες (13-15%), αλλά αυξάνει παρουσία παχυσαρκίας (30-80%) (Schwimmer et al., 2006). Ο επιπολασμός της νόσου στον ενήλικο πληθυσμό εκτιμάται μεταξύ

του 15-30% (Koehler et al., 2012). Ως γενικός κανόνας θα μπορούσε να τεθεί ότι όσο αυξάνει η ηλικία τόσο αυξάνει και η συχνότητα εμφάνισης της νόσου, ιδιαίτερα μεταξύ της ηλικίας των 40 με 60 (Amarapurkar et al., 2007; Frith, Day, Henderson, Burt, & Newton, 2009; Kagansky et al., 2004; Speliotes, Massaro, et al., 2010), ωστόσο υπάρχει και μια μελέτη σε ηλικιωμένους (≥ 65 ετών) που έχει δείξει ότι το επίπεδο της NAFLD μειώνεται όσο αυξάνει προοδευτικά η ηλικία αποτέλεσμα που αποδίδεται είτε στην μειωμένη επιβίωση των ασθενών με NAFLD είτε στην ανάπτυξη κίρρωσης (Koehler et al., 2012).

1.3.1.2 ΦΥΛΟ

Μελέτες που δημοσιεύτηκαν πριν τη δεκαετία του 90 παρουσίαζαν την εμφάνιση της NAFLD συχνότερη μεταξύ των μεσήλικων γυναικών (Ludwig, Viggiano, McGill, & Oh, 1980; Matteoni et al., 1999), αλλά οι πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι είναι πιο συχνή στους άντρες από ότι στις γυναίκες (Vernon, Baranova, & Younossi, 2011). Στο αντρικό φύλο, η NAFLD έχει αυξητική τάση μέχρι την ηλικία των 60 και μετά εκπίπτει (Eguchi et al., 2012; Fan et al., 2005) ενώ στο γυναικείο φύλο η νόσος εκδηλώνεται κυρίως μετά την ηλικία των 50, εφόσον χάνεται η προστατευτική δράση των οιστρογόνων, φτάνοντας στο μέγιστο στα 60-69 έτη και μειώνεται μετά τη δεκαετία των 70 (Carulli, Lonardo, Lombardini, Marchesini, & Loria, 2006; Eguchi et al., 2012; Fan et al., 2005; Hu et al., 2012). Ενδεχομένως μετά την ηλικία των 50 η συχνότητα εμφάνισης της NAFLD στα δύο φύλα να είναι κοινή, ή ακόμα και χαμηλότερη στους άντρες (Fan et al., 2005; Z. Wang, Xu, Hu, Hultström, & Lai, 2014).

1.3.1.3 ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλόγως την εθνικότητα και τη φυλή φαίνεται να ποικίλει η συχνότητα εμφάνισης της NAFLD. Οι Ισπανόφωνοι πληθυσμοί κατέχουν την πρώτη θέση με ποσοστό 45%, ακολουθούν οι Λευκοί Ισπανόφωνοι και η Καυκάσια φυλή με ποσοστό 33%, και τέλος οι Αφροαμερικάνοι με ποσοστό 24% (Browning et al., 2004). Οι διακυμάνσεις στη συχνότητα μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών δεν έχουν αποδοθεί ξεκάθαρα σε κάποια αιτία, αλλά εικάζεται ότι επηρεάζονται από τη γενετική προδιάθεση και τις αλλαγές στον τρόπο ζωής (Hassan, Bhalla, El Regal, & A-Kader, 2014).

1.3.1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Η φαινοτυπική έκφραση της NAFLD συχνά διαφέρει σε άτομα με κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, γεγονός που αποδίδεται στο διαφορετικό γονότυπο του κάθε ατόμου. Η κληρονομικότητά της ανέρχεται στο 40%, ακόμη και μετά από

προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο και την παχυσαρκία (Schwimmer et al., 2009). Σε μία μελέτη διδύμων φάνηκε ότι τα επίπεδα της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (alanine aminotransferase - ALT) στον ορό σε σχέση με την ηπατική στεάτωση ήταν κληρονομήσιμα στο 55% των συμμετεχόντων (Makkonen, Pietiläinen, Rissanen, Kaprio, & Yki-Järvinen, 2009). Μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (Genome-wide association - GWAS) έχουν δείξει αρκετά υπολειπόμενα αλληλόμορφα γονιδίων τα οποία ενδεχομένως να συνεισφέρουν στην ετερογένεια της νόσου.

1.3.1.4.α Γονίδια που επιδρούν στην ηπατική οξείδωση των τριγλυκεριδίων

PNPLA3

Η πρώτη μελέτη σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) για τη NAFLD έγινε το 2008 σε 2,111 άτομα χωρίς συγγένεια μεταξύ τους από διάφορες εθνικότητες που συμμετείχαν στην "Dallas Heart Study". Η ηπατική στεάτωση των συμμετεχόντων είχε αξιολογηθεί με H-MRS. Τα αποτελέσματά της έδειξαν ότι από τους 9,229 μη συνώνυμους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) υπάρχει ισχυρή συσχέτιση με τον πολυμορφισμό rs738409 C>G του γονιδίου patatin-like phospholipase domain-containing-3 (PNPLA3), ο οποίος οδηγεί σε υποκατάσταση της ισολευκίνης με μεθειονίνη στο κωδικόνιο 148 (p.Ile148Met), και της εμφάνισης αυξημένων επιπέδων ηπατικών TG. Η συσχέτιση αυτή ήταν ανεξάρτητη από τον δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), το σακχαρώδη διαβήτη, την κατανάλωση αλκοόλ και την παγκόσμια και τοπική καταγωγή (Romeo et al., 2008). Το εύρημα αυτό έχει επιβεβαιωθεί από πολυάριθμες μελέτες (Sookoian & Pirola, 2011) και έχει ισχυροποιηθεί η σύνδεση της γενετικής παραλλαγής PNPLA3 I148M με την εκδήλωση και εξέλιξη της NAFLD σε όλο το φάσμα της, από την απλή στεάτωση στην σοβαρή ηπατική βλάβη (J. H. Shen et al., 2015; L. Zhang et al., 2015), ακόμα και με την εμφάνιση HCC (Singal et al., 2014).

Δεδομένης της σύνδεσης της φυσιοπαθολογίας της NAFLD με το μεταβολικό σύνδρομο, έχουν μελετηθεί πιθανές συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs738409 C>G και των παραμέτρων που το ορίζουν και να μην έχουν παρατηρηθεί συσχετίσεις με την IR (Palmer et al., 2012) και με τα χαμηλότερα TG νηστείας σε σοβαρά παχύσαρκους ασθενείς και σε Ασιάτες (Stojkovic et al., 2014; Tang et al., 2015), ωστόσο η πλειοψηφία των μελετών δεν έχει δείξει συσχέτιση με το ΔΜΣ, τα λιπίδια ορού ή με γλυκαιμικά χαρακτηριστικά (Romeo et al., 2008; Speliotes, Butler, et al., 2010; Speliotes et al., 2011).

Το PNPLA3 γονίδιο βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 22 και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη την αδιπονουτρίνη που αποτελείται από 481 αμινοξέα και εκφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τις λιπιδαιμικές μεμβράνες των ηπατοκυττάρων και των λιποκυττάρων. Η έκφρασή της επάγεται στο ήπαρ από την κατανάλωση τροφής και την ύπαρξη IR από την περίσσεια των λιπαρών οξέων και τη δράση του κύριου ρυθμιστή της λιπογένεσης Sterol regulatory element-binding protein 1 - SREBP-1c (*Dongiovanni, Anstee, & Valenti, 2013*). Η δράση της μπορεί να είναι είτε καταβολική ως λιπάση των τριακυλογλυκερολών είτε αναβολική ως τρανσακετυλάση του ακέτυλο-coA (*Browning, 2013; Naik, Košir, & Rozman, 2013; Puppala, Siddapuram, Akka, & Munshi, 2013*).

Η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου κινδύνου (G) για τον πολυμορφισμό rs738409 είναι 0.49 στους Ισπανόφωνους πληθυσμούς, 0.23 για τους Καυκάσιους και 0.17 για τους Αφρικανοαμερικανούς (*Romeo et al., 2008*). Η πιθανότητα εμφάνισης ίνωσης αυξάνεται στα άτομα με τη γενετική παραλλαγή PNPLA3 I148M (*Krawczyk, Grünhage, Zimmer, & Lammert, 2011; Petta et al., 2012*), και ενδεχομένως αυτό να οφείλεται σε αυξημένη ηπατική στεάτωση λόγω φλεγμονής. Επίσης, έχει προταθεί ότι μπορεί να υπάρχει και ένας άμεσος παθογόνος μηχανισμός της γενετικής παραλλαγής (Valenti, Al-Serri, et al., 2010), ίσως μέσω ινογένεσης, αφού η I148M συνδέεται με την αυξημένη ίνωση ανεξάρτητα από την επίδρασή της στο περιεχόμενο των λιπιδίων των ηπατοκυττάρων (*Dongiovanni, Donati, et al., 2013*). Η εμφάνιση του HCC είναι συχνότερη σε ομόζυγους ασθενείς με GG γονότυπο από ό, τι σε ασθενείς με CC γονότυπο (OR = 1.76) (*Burza et al., 2012; Falletti et al., 2011; Guyot et al., 2013*). Οι ασθενείς PNPLA3 I148M έχουν περισσότερο από το διπλάσιο κίνδυνο για HCC (προσαρμοσμένο OR = 2,26) για καθένα αλληλόμορφο της γενετικής παραλλαγής (*Liu, Patman, et al., 2014*).

TM6SF2

Η Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2), είναι μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας με 377 αμινοξέα. Η χρωμοσωμική θέση του TM6SF2 γονιδίου στον άνθρωπο είναι η 19p13.11. Η έκφρασή της γίνεται σε διάφορους ιστούς και όργανα, με τα υψηλότερα επίπεδα της έκφρασής της να σχετίζονται με το λεπτό έντερο και το ήπαρ (*Dezso et al., 2008; Kozlitina et al., 2014; "TM6SF2 Gene,"*).

Ένας άλλος SNP του TM6SF2 (rs58542926, c.499G> A), υποκαθιστά το γλουταμινικό οξύ με το αμινοξύ της λυσίνης στο κωδικόνιο 167 (p.E167K). Η παρουσία αυτής της γενετικής

παραλλαγής είναι που σχετίζεται θετικά με τις αυξημένες τιμές στον ορό των AST και ALT (Kozlitina et al., 2014) και με την ανάπτυξη της NASH σε σύγκριση με ασθενείς που φέρουν τον GG γονότυπο (Sookoian & Pirola, 2011). Επίσης έχει συσχετισθεί με χαμηλότερα επίπεδα TG στο πλάσμα και χοληστερόλης, με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων των ηπατικών τριγλυκεριδίων (Dongiovanni et al., 2015). Διαταραχές στο TM6SF2, αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης NAFLD μειώνοντας παράλληλα την πιθανότητα υπερτριγλυκεριδαιμίας και αγγειακών παθήσεων που σχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα, καθιστώντας τη TM6SF2 E167K αμφιλεγόμενη (Holmen et al., 2014; Kahali et al., 2015). Η γενετική παραλλαγή TM6SF2 rs58542926 συνδέθηκε έντονα με την NAFLD, την προχωρημένη ίνωση και την κίρρωση (Liu, Reeves, et al., 2014), ανεξάρτητα από την ηλικία, το ΔΜΣ, το ΣΔΤ 2 και τον γονότυπο PNPLA3 rs738409, παραμένει όμως ασαφές εάν το αλληλόμορφο κινδύνου συνδέεται με τον κίνδυνο εμφάνισης HCC.

PPARα

Οι πυρηνικοί υποδοχείς εμπλέκονται στην πρόσληψη, σύνθεση, αποθήκευση και κινητοποίηση του ηπατικού λίπους, όπως οι πυρηνικοί υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων (peroxisome proliferator activated nuclear receptors – PPAR), είναι προφανές ότι εμπλέκονται στην εμφάνιση της NAFLD. Ο PPARα, ρυθμίζεται από τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, τα εικοσανοειδή και τις φιμπράτες (Kim et al., 2003), και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ. Παρουσία περίσσειας ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids – FFA), η ενεργοποίηση του PPARα περιορίζει τη συσσώρευση των TG αυξάνοντας τον ρυθμό του καταβολισμού των λιπαρών οξέων μέσω υπερέκφρασης της μιτοχονδριακής πρόσληψης και της β-οξειδωσης. Στους φορείς του μη συνώνυμου SNP rs1800234, που κωδικοποιεί τη V227A, αυξάνεται η δραστηριότητά του και έχει συσχετισθεί με τη NAFLD, ανεξάρτητα από τον μειωμένο ΔΜΣ (Chen, Li, Li, & Yu, 2008; Yamakawa-Kobayashi, Ishiguro, Arinami, Miyazaki, & Hamaguchi, 2002).

1.3.1.4.6 Γονίδια που επιδρούν στο μεταβολισμό της γλυκόζης και την ινσουλινοαντίσταση

GCKR

Το γονίδιο GCKR (Glucokinase Regulatory - GCKR) είναι ένα από τα γονίδια που έχουν συσχετισθεί με τη NAFLD μέσω GWAS ανάλυσης (Speliotes et al., 2011). Το GCKR γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με τη γλυκοκινάση αλλοεστερικά και ρυθμίζει τη δράση της στον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης και σηματοδοτεί την ηπατική λιπογένεση.

Υπερέκφραση της γλυκοκινάσης οδηγεί σε αύξηση της γλυκολυτικής πορείας, της de novo λιπογένεσης και των επιπέδων των TG, και κατά συνέπεια της NAFLD (*Peter et al., 2011*). Υπάρχουν δύο κοινές γενετικές παραλλαγές του GCKR που έχουν συσχετισθεί με τη NAFLD και σύμφωνα με αρκετές GWAS αναλύσεις είναι σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium - LD) μεταξύ τους (HapMap CEU $r^2 = 0.93$, CHB $r^2 = 0.82$) (*Saxena et al., 2007; Sparsø et al., 2008*). Μία από αυτές είναι GCKR rs780094, μία παραλλαγή των εσωνίων, η οποία πρώτη φορά συσχετίσθηκε με τη NAFLD σε μία μελέτη GWAS η οποία αποτελούνταν από 592 ασθενείς με NAFLD διαγνωσμένους με βιοψία ήπατος που συμμετείχαν στη NASH Clinical Research Network (*Speliotes et al., 2011*). Ο δεύτερος πολυμορφισμός είναι ο GCKR rs1260326, μία μη συνώνυμη γενετική παραλλαγή η οποία χαρακτηρίζεται από υποκατάσταση της κυτοσίνης (C) σε θυμίνη (T) κωδικοποιώντας μία υποκατάσταση προλίνης σε λευκίνη στο κωδικόνιο της θέσεως 446 (P446L) (*Saxena et al., 2007*). Η P446L παραλλαγή δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας στην ανταπόκριση της γλυκοκινάσης στην 6-φωσφορική-φρουκτόζη, ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο την πρόσληψη ηπατικής γλυκόζης (*Beer et al., 2009*). Αυτό οδηγεί σε αύξηση της γλυκόζης νηστείας και των επιπέδων ινσουλίνης, αλλά από την άλλη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της γλυκόλυσης και την παραγωγή μαλόνυλο-συνενζύμου-A το οποίο επάγει την ηπατική στεάτωση χρησιμεύοντας ως υπόστρωμα για τη λιπογένεση και μπλοκάροντας την οξείδωση των λιπαρών οξέων (*Peter et al., 2011; Rametta et al., 2013*). Επομένως ο γονότυπος GCKR φαίνεται να ρυθμίζει τη λιπογένεση και την ίνωση στην εξέλιξη της NASH (*Petta et al., 2014*).

IRS1 - ENPP1

Οι φορείς του μη συνώνυμου SNP του Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) rs1801278, που κωδικοποιεί Gln972Arg, σε συνδυασμό με το αν φέρουν το Plasma Cell Antigen 1 (ENPP1) rs1044498, που κωδικοποιεί Lys121Gln, αναστέλλουν τη σηματοδότηση του AKT μονοπατιού, επομένως και τη δράση του υποδοχέα της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να επάγεται η IR και η ίνωση (*Dongiovanni, Valenti, et al., 2010*).

TRIB1

Ένας άλλος ρυθμιστής της σηματοδότησης της ινσουλίνης είναι ο Tribble-1 (TRIB1). Η rs2954021 παραλλαγή του TRIB1 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη και τη σοβαρότητα της NAFLD (*Kitamoto et al., 2014*). Επιπλέον, είναι ένας επιβεβαιωμένος καθοριστής των επιπέδων των TG στον ορό. Ο μηχανισμός δράσης του είναι ακόμη ασαφής, αλλά ίσως συμπεριλαμβάνει

τη μεταβολή της έκφρασης του TRIB1, ο οποίος συμμετέχει στη ρύθμιση της de novo λιπογένεσης και στην έκφραση του MTPP (*Ishizuka et al., 2014; Makishima et al., 2015*).

PPAR γ

Ο PPAR γ εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον λιπώδη ιστό και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, καθώς και την πρόσληψη και αποθήκευση των FFA. Η φαρμακολογική ενεργοποίηση του PPAR γ βελτιώνει την IR στον διαβήτη και μειώνει τη στεάτωση με την αποκατάσταση της ινσουλινοευαισθησίας στο λιπώδη ιστό και την απελευθέρωση της αδιπονεκτίνης (*Belfort et al., 2006*). Ο SNP απώλειας λειτουργίας Pro12Ala στον PPAR γ 2, προκαλεί μια μέτρια εξασθένηση της μεταγραφικής δραστηριότητας λόγω μειωμένης συγγένειας δέσμησης με το DNA και αναστέλλει τη δράση του PPAR γ (*Tönjes, Scholz, Loeffler, & Stumvoll, 2006*). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί ασυνεπή αποτελέσματα σχετικά με τη σύνδεση αυτής της παραλλαγής και τη σοβαρότητα της ηπατικής βλάβης στη NAFLD (*Dongiovanni, Rametta, et al., 2010; Dongiovanni & Valenti, 2013*).

1.3.1.4.γ Γονίδια που επιδρούν στην ηπατική σύνθεση των τριγλυκεριδίων

LIPIN1

Το LIPIN1 γονίδιο κωδικοποιεί ένα ένζυμο φωσφατιδικής φωσφατάσης εξαρτώμενο από ιόντα μαγνησίου με υψηλά επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό, ο οποίος εμπλέκεται στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων και των TG (*Kumari et al., 2012*). Το LIPIN1 απαιτείται για τη λιπογένεση και την κανονική μεταβολική ροή μεταξύ του λιπώδους ιστού και του ήπατος, όπου επίσης ενεργεί ως επαγώγιμος συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Οι γενετικές παραλλαγές του LIPIN1 έχουν συσχετιστεί με αρκετές συνιστώσες του σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο, συμπεριλαμβανομένης της σωματικής μάζας, των επιπέδων ινσουλίνης, το μεταβολικό ρυθμό ηρεμίας και την ανταπόκριση στους ευαίσθητοποιητές της ινσουλίνης (*Pollin et al., 2008*).

FTO

Η πρωτεΐνη FTO είναι μια διοξυγενάση που επιδιορθώνει το αλκυλιωμένο DNA και RNA μέσω οξειδωτικής διμεθυλίωσης και για τη δράση της απαιτείται μοριακό οξυγόνο, ακετογλουταρικό και σίδηρος. Κωδικοποιείται από το γονίδιο FTO που εδράζεται στο χρωμόσωμα 16q12.2 του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το γονίδιο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον υποθάλαμο και στα νησίδια του παγκρέατος και ανιχνεύεται σε ιστούς που σχετίζονται

με μεταβολικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδη ιστού, του ήπατος και των σκελετικών μυών.

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο SNP rs1421085 (c.46-43098T> C) του γονιδίου FTO διαταράσσει ένα διατηρημένο μοτίβο που οδηγεί σε αποδυνάμωση ενός ισχυρού ενισχυτή των προλιποκυττάρων και τον διπλασιασμό της έκφρασης του IRX3 και IRX5 κατά την πρώιμη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του φαινότυπου στο λιπώδη ιστό από αποθήκευση ενέργειας στα μπεζ λιποκύτταρα στα λευκά, οδηγώντας στη μείωση της μιτοχονδριακής θερμογένεσης (*Claussnitzer et al., 2015*). Η μεταβολή αυτή της μιτοχονδριακής θερμογένεσης οδηγεί στη μείωση της οξειδωτικής ικανότητας των μιτοχονδρίων, επομένως σηματοδοτούνται μονοπάτια φλεγμονής που οδηγούν σε μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με την παχυσαρκία, όπως είναι και η NAFLD.

1.3.1.4.δ Γονίδια που επιδρούν στο οξειδωτικό στρες και τη στεατοηπατίτιδα

HFE

Η πρωτεΐνη αιμοχρωμάτωσης του ανθρώπου (HFE) δρα ρυθμίζοντας την απορρόφηση του σιδήρου μέσω ρύθμισης της αλληλεπίδρασης της τρανσφερίνης με τον υποδοχέα της. Η συσσώρευση του ηπατικού σιδήρου προάγει το οξειδωτικό στρες. Δύο μελέτες, εξετάζοντας 177 ασθενείς, συσχέτισαν τους φορείς ενός πολυμορφισμού του HFE (rs1800562) με πιο σοβαρή στεατοηπατίτιδα και προηγμένη ίνωση (George et al., 1998; Nelson et al., 2007). Ωστόσο, τρεις άλλες μελέτες δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση με τους φορείς είτε του C282Y ή H63D (rs1799945) (Bugianesi et al., 2004; Raszeja-Wyszomirska, Kurzawski, Lawniczak, Mieczynska-Kurtycz, & Lubinski, 2010; Valenti, Fracanzani, et al., 2010). Οι μετα-αναλύσεις παρείχαν επίσης αντικρουόμενα αποτελέσματα (Ellervik, Birgens, Tybjaerg-Hansen, & Nordestgaard, 2007; Hernaez et al., 2011). Μια δημοσίευση των Valenti et al. προτείνει ως κύριο ρόλο στην παθογένεια της NAFLD και της NASH να παίζει η αποθήκευση του σιδήρου και όχι οι μεταλλάξεις του γονιδίου (Valenti, Fracanzani, et al., 2010).

SOD2

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου συνδεδεμένη με μαγγάνιο (MnSOD2) που κωδικοποιείται από το πυρηνικό SOD2 γονίδιο, έχει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από το υπεροξείδιο των ελευθέρων ριζών (Valenti, Fracanzani, et al., 2010). Ένας κοινός πολυμορφισμός στο SOD2 γονίδιο (rs4880) οδηγεί σε υποκατάσταση του αμινοξέος αλανίνη με βαλίνη (A16V) στη μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης του ενζύμου (Shimoda-Matsubayashi et al., 1996) και έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την ίνωση σε ασθενείς με NAFLD, παρέχοντας πειστική γενετική απόδειξη ότι το οξειδωτικό στρες που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικό για την πρόοδο της ηπατικής βλάβης (Al-Serri et al., 2012; Namikawa et al., 2004).

1.3.1.4.ε Γονίδια που επιδρούν στη φλεγμονή και την ίνωση

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι μεσολαβητής της φλεγμονής και της ινσουλινοαντίστασης. Σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων για τη NAFLD, φάνηκε πως ο πολυμορφισμός 174C στο γονίδιο της IL-6 είναι πιο συχνός σε δείγματα ασθενών με NASH (Carulli et al., 2009). Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), είναι επίσης μία κυτταροκίνη η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD. Ο πολυμορφισμός rs361525 έχει συσχετισθεί με τη NASH, κάτι που

επιβεβαιώθηκε και από μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (*Tokushige et al., 2007; Valenti et al., 2002*).

KLF6

Ο παράγοντας Kruppel-Like (KLF6) ταυτοποιήθηκε ως πρώιμο γονίδιο που εκφράζεται στα ενεργοποιημένα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα μετά από ηπατική βλάβη. Ο πολυμορφισμός rs3750861 στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου επηρεάζει το εναλλακτικό μάτισμα και έδειξε ότι μειώνει την ενεργοποίηση των αστεροειδών ηπατικών κυττάρων και έτσι μειώνεται η πιθανότητα ίνωσης στη NAFLD (*Miele et al., 2008*). Ο ίδιος πολυμορφισμός του KLF6 επηρεάζει επίσης τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, την έκφραση της γλυκοκινάσης και τη λιπογένεση (*Bechmann et al., 2012*).

AGTR1

Ο υποδοχέας τύπου 1 της αγγειοτενσίνης II (AGTR1), που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (*Battaller et al., 2000*), διαμεσολαβεί την επίδραση της αγγειοτενσίνης II στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης και αποτελεί ένα υποψήφιο γονίδιο για συσχέτιση με την NAFLD (*Nabeshima et al., 2006*). Παρεμποδιστές του AGTR1 αναστέλλουν την ίνωση και ελέγχουν την εξέλιξη της NASH (*Hirose et al., 2007; Ibañez et al., 2007; Yokohama et al., 2004*). Οι Yoneda et al. το 2009 ταυτοποίησαν στο γονίδιο AGTR1 τον πολυμορφισμό rs3772622 καθώς και ακόμα τέσσερεις πολυμορφισμούς σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πρώτο, που εμφάνιζαν ισχυρή συσχέτιση με τη NAFLD και την ίνωση (*Yoneda et al., 2009*). Τα αποτελέσματα αυτά αμφισβητήθηκαν αφού βρέθηκε αλληλεπίδραση των γονιδίων AGTR1 και PNPLA3 και προστατευτική επίδραση των πολυμορφισμών του γονιδίου AGTR1 έναντι της NAFLD σε πληθυσμό Ινδών (*Zain et al., 2013*).

1.3.2 ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1.3.2.1 ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Η αυξανόμενη επιδημία της παχυσαρκίας συνδέεται με τον αυξανόμενο επιπολασμό της NAFLD και αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου τόσο για την εμφάνιση της νόσου όσο και για την εξέλιξή της. Στα παχύσαρκα άτομα η συχνότητα της NAFLD εκτιμάται στο 51.34% (95% Ο.Ε.: 41.38 - 61.20) και της NASH στο 81.83% (95% Ο.Ε.: 55.16 - 94.28) (*Younossi et al., 2016*). Η παχυσαρκία έχει συσχετισθεί ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο για στεατοηπατίτιδα, ίνωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (*Zelber-Sagi et al., 2012*).

Η κεντρικού τύπου παχυσαρκία φαίνεται να είναι μεταβολικά πιο ενεργή (σπλαχνικός λιπώδης ιστός) και να συσχετίζεται με την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, την αυξημένη λιπόλυση και την αυξημένη ροή ελεύθερων λιπαρών οξέων προς το ήπαρ (*Kabir et al., 2005*). Συνεπώς, η τιμή της περιφέρειας μέσης (ΠΜ) καθώς και η τιμή του λόγου ΠΜ/περιφέρεια ισχίου (ΠΙ) αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της NAFLD, με αποτέλεσμα τα άτομα με κεντρική εναπόθεση λίπους να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου, ανεξάρτητα και από την τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματός (ΔΜΣ) τους (*Paschos & Paletas, 2009; Souza, Diniz, Medeiros-Filho, & Araújo, 2012*).

Τόσο ο αυξημένος ΔΜΣ, όσο και τα αυξημένα επίπεδα σπλαχνικού λίπους έχουν συσχετισθεί θετικά με τη νόσο (*Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012*). Ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός, μάλιστα, αναγνωρίζεται και ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για νεκροφλεγμονώδη στεατοηπατίτιδα και ίνωση (*van der Poorten et al., 2013*). Ωστόσο, η νόσος μπορεί να εμφανιστεί και σε άτομα με φυσιολογικό ΔΜΣ, χωρίς απαραίτητως να συνυπάρχουν ινσουλινοαντίσταση ή μεταβολικές διαταραχές (*Margariti, Deutsch, Manolakopoulos, & Papatheodoridis, 2012*). Πιθανότατα τα άτομα αυτά να εμφανίζουν είτε συσσώρευση σπλαχνικού λίπους είτε δυσλειτουργικό λιπώδη ιστό με ή και χωρίς μη φυσιολογικά επίπεδα ηπατικών ενζύμων (*Marchesini & Forlani, 2002*) (*Marchesini, Bianchi, et al., 2001*).

1.3.2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Η NAFLD είναι συνδεδεμένη άμεσα με το μεταβολικό σύνδρομο (Metabolic Syndrome - MetS), το οποίο ορίζεται ως ο συνδυασμός τουλάχιστον τριών εκ των πέντε ακόλουθων χαρακτηριστικών γνωρισμάτων: διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (impaired fasting glucose - IFG) ($> 100 \text{ mg/dL}$) ή σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (ΣΔΤ 2), υπερτριγλυκεριδαιμία ($\geq 150 \text{ mg/dL}$), μειωμένη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) ($< 40 \text{ mg/dL}$ για τους άνδρες, $< 50 \text{ mg/dL}$ για τις γυναίκες), αυξημένη περιφέρεια μέσης (περιφέρεια μέσης $> 102 \text{ cm}$ για τους άνδρες και $> 88 \text{ cm}$ για τις γυναίκες) και συστολική πίεση ≥ 130 και/ή διαστολική πίεση $\geq 85 \text{ mm Hg}$ (*Alberti, Zimmet, Shaw, & Group, 2005*). Η συχνότητα εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου μεταξύ των ασθενών με NAFLD εκτιμάται στο 42.54% (95% Ο.Ε.: 30.06 - 56.05) ενώ μεταξύ των ασθενών με NASH στο 70.65% (95% Ο.Ε.: 54.64 - 82.79) (*Younossi et al., 2016*). Το 99% των ασθενών με διαγνωσμένη NAFLD εμφανίζει τουλάχιστον ένα από τα γνωρίσματα του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ το 33% εμφανίζει όλα τα γνωρίσματα (*Byrne & Targher,*

2016). Επιπλέον, μία πρόσφατη προοπτική μελέτη έδειξε ότι οι συμμετέχοντες με διαγνωσμένο MetS είχαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν NAFLD και εκτός αυτού, τα άτομα που πληρούσαν μόνο ένα εκ των διαγνωστικών κριτηρίων του MetS είχαν 3.6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης NAFLD σε σύγκριση με τα άτομα με κανένα χαρακτηριστικό του MetS (Y. Wang et al., 2013). Έχει διαπιστωθεί ότι ο κίνδυνος και η βαρύτητα της νόσου αυξάνονται όσο περισσότερα διαγνωστικά κριτήρια του MetS πληρούνται σε έναν ασθενή (Souza et al., 2012). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά η NAFLD ως η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου ωστόσο είναι πλέον ξεκάθαρο ότι θεωρείται ως ένας «παθογόνος παράγοντας» του (Byrne, 2012; Byrne, Olufadi, Bruce, Cagampang, & Ahmed, 2009; Byrne & Targher, 2014).

1.3.2.3 ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ

Τα αυξημένα επίπεδα TG και χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνες (LDL-C) σε συνδυασμό με τις μειωμένες συγκεντρώσεις HDL-C (Chatrath, Vuppalandhi, & Chalasani, 2012; Q. Q. Zhang & Lu, 2015) συνιστούν την αθηρογενετική δυσλιπιδαιμία που μπορεί να είναι τουλάχιστον μερικώς υπεύθυνη για τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με NAFLD, καθώς αυτές οι διαταραχές των λιπιδίων έχουν συσχετιστεί ως ανεξάρτητοι παράγοντες με νοσηρότητα και / ή θνησιμότητα από την καρδιαγγειακή νόσο (Graham, Cooney, Bradley, Dudina, & Reiner, 2012; Lim, Park, Sakuma, & Koh, 2013; Mureddu, Brandimarte, & De Luca, 2012; Tenenbaum, Klempfner, & Fisman, 2014). Από την άλλη πλευρά, δεν βρέθηκε ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ της ηπατικής στεάτωσης και της καρδιαγγειακής νόσου σε ένα υποσύνολο των συμμετεχόντων της μελέτης Diabetes Heart Study. Προτάθηκε, μάλιστα, ότι η ηπατική στεάτωση είναι περισσότερο ένα δευτερεύον φαινόμενο από ότι ένας άμεσος μεσολαβητής της καρδιαγγειακής νόσου (McKimmie et al., 2008). Η ποσοστιαία συχνότητα εμφάνισης της υπερτριγλυκεριδαιμίας μεταξύ των ασθενών με NAFLD εκτιμάται κατά μέσο όρο στο 40.74% (95% ΟΕ: 30.80 - 51.50) και των ασθενών με NASH στο 83.33% (95% Ο.Ε.: 36.87 - 97.72) (Younossi et al., 2016), ενώ η παρουσία δυσλιπιδαιμίας (υπερχοληστερολαιμίας, υπερτριγλυκεριδαιμίας ή και των δύο) όπως ορίστηκε από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institute of Health - NIH) (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, 2002) αναφέρεται στο 20% έως 80% των περιπτώσεων που σχετίζονται με τη NAFLD (Baskin, Ard, Franklin, & Allison, 2005; Diehl, Goodman, & Ishak, 1988; Loria, Carulli, Bertolotti, & Lonardo, 2009).

1.3.2.4 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II

Η IR και η υπερινσουλιναμία είναι τα πιο στενά συνδεδεμένα εργαστηριακά ευρήματα με την παρουσία της NAFLD σε μια μεγάλη σειρά ασθενών, ακόμη και σε αδύνατα άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη (*Bloomgarden, 2004; Gupte et al., 2004; Marchesini, Brizi, et al., 2001*). Η ποσοστιαία συχνότητα εμφάνισης του ΣΔΤ 2 μεταξύ των ασθενών με NAFLD εκτιμάται κατά μέσο όρο στο 22.51% (95% O.E.: 17.92 - 27.89) και των ασθενών με NASH στο 43.63% (95% O.E.: 30.28 - 57.98) (*Younossi et al., 2016*). Σε μια προοπτική μελέτη 100 ασθενών με ΣΔΤ 2, η επίπτωση της ηπατικής στεάτωσης ήταν 49%, επιβεβαιώνοντας τον ως ισχυρό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τη NAFLD (*Gupte et al., 2004*). Η συσχέτιση του μεταβολικού συνδρόμου και του ΣΔΤ 2 σχετίζεται με πιο επιθετική ασθένεια και αυξανόμενη θνησιμότητα (*Ekstedt et al., 2006; Younossi, Gramlich, Matteoni, Boparai, & McCullough, 2004*). Ο Targher et al. περιέγραψε τον ΣΔΤ 2 ως ανεξάρτητο παράγοντα για τον αυξημένο επιπολασμό της NAFLD και τη σύνδεσή της με τη καρδιαγγειακή νόσο, ανεξάρτητα από άλλους συγχυτικούς παράγοντες (*Targher et al., 2010*). Οι ασθενείς με ΣΔΤ2 λοιπόν βρίσκονται σε πολύ υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη στεατοηπατίτιδας, ενώ έχουν 2-4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν ηπατικές επιπλοκές (*Anstee, Targher, & Day, 2013; Michelotti, Machado, & Diehl, 2013; Sung, Wild, & Byrne, 2014*). Γενικά, η ισχυρή συσχέτιση της NAFLD με τον ΣΔΤ2 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε ασθενείς με ΣΔΤ2 θα πρέπει να γίνεται προσεκτική παρακολούθηση και αξιολόγηση της NAFLD (*Lonardo et al., 2015*).

1.3.2.5 ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο υποθυρεοειδισμός, το σύνδρομο αποφρακτικής υπνικής άπνοιας, το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, ο υπογοναδισμός και ο υποϋποφισισμός φαίνεται ότι αποτελούν, ανεξάρτητα από την παχυσαρκία, ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τη NAFLD (*Vuppalanchi & Chalasani, 2009*).

1.3.3 ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1.3.3.1 ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Η έκθεση στο κάπνισμα, είτε ενεργητικό είτε παθητικό, φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD. Μελέτες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της NAFLD (*Hamabe et al., 2011*) και μάλιστα ότι τα πακετο-έτη καπνίσματος τόσο των νυν όσο και των πρώην καπνιστών σχετίζονται με

μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου (Koehler et al., 2012). Σε μια μεγάλη πολυκεντρική μελέτη, με δείγμα 1091 ασθενών με NAFLD διαγνωσμένων με ηπατική βιοψία, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του καπνίσματος και της προχωρημένης ηπατικής ίνωσης. Τα αποτελέσματά αυτά υποδεικνύουν ότι το κάπνισμα μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη της NAFLD εν μέρει μέσω της επίδρασής του στην IR, αν και πιθανόν να εμπλέκονται και άλλα μεταβολικά μονοπάτια (Zein et al., 2011). Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να υποστηρίξουν μια επίσημη σύσταση για διακοπή του καπνίσματος σε ασθενείς με NAFLD.

1.3.3.2 ΥΠΝΟΣ

Η επίδραση του ύπνου στον κίνδυνο ή την πιθανότητα εμφάνισης της NAFLD δεν έχει μελετηθεί αρκετά ώστε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 8 επιδημιολογικών μελετών σε 97.371 ασθενείς με NAFLD έδειξε ότι η διάρκεια του ύπνου δεν επηρεάζει την πιθανότητα εμφάνισής της (N. Shen, Wang, & Yan, 2016). Ενδεχομένως η διάρκεια και η ποιότητα του ύπνου να συσχετίζεται περισσότερο με επιβεβαιωμένους παράγοντες κινδύνου της νόσου και έμμεσα να επηρεάζει την εμφάνισή της. Η μειωμένη συνολική διάρκεια ύπνου είναι ένας πιθανός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη παχυσαρκίας καθώς σχετίζεται τόσο με την έλλειψη φυσικής δραστηριότητας όσο και με την υπερκατανάλωση τροφής (Trovato, Martines, Brischetto, Catalano, et al., 2016). Σε μία μελέτη 47 ασθενών με NAFLD και 22 υγιών μαρτύρων, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς χρειάζονταν περισσότερο χρόνο μέχρι να κοιμηθούν, ενώ κοιμόνταν στατιστικά σημαντικά λιγότερες ώρες από τους υγιείς μάρτυρες με αποτέλεσμα να νιώθουν περισσότερη υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας, η οποία συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και IR (Bernsmeier et al., 2015).

1.3.3.3 ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Αρκετές μελέτες παρατήρησης έχουν δείξει συσχετίσεις μεταξύ της "κακής" φυσικής κατάστασης ή του καθιστικού τρόπου ζωής και του κινδύνου εμφάνισης της NAFLD και της NASH. Η καθιστική ζωή φαίνεται να εντείνει την κλινική σοβαρότητα της NAFLD (Neuschwander-Tetri, 2009). Σε μία μελέτη αξιολογήθηκε η συνήθης φυσική δραστηριότητα σε 191 άτομα μέσω ενός επιβεβαιωμένου ερωτηματολογίου και μετρήθηκε το ηπατικό λίπος μέσω φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Spectroscopy – MRS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η NAFLD ήταν πιο συχνή (11 – 25%) στα άτομα και των δύο

φύλων που βρίσκονταν στο χαμηλότερο εκατοστημόριο του μέσου όρου του επιπέδου άσκησης έναντι των ατόμων που βρίσκονταν στο υψηλότερο (2%), και η συσχέτιση αυτή ήταν ανεξάρτητη από συγχυτικούς παράγοντες (*Perseghin et al., 2007*), ενώ οι Lawlor et al. βρήκαν σημαντικά αυξημένα τα ηπατικά ένζυμα σε γυναίκες που ανέφεραν μειωμένη συχνότητα φυσικής δραστηριότητας (*Lawlor, Sattar, Smith, & Ebrahim, 2005*). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι γυναίκες με διαγνωσμένο διαβήτη κύησης στο παρελθόν και NAFLD ασκούσαν λιγότερες ημέρες την εβδομάδα σε σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογική ηπατική στεάτωση (*Tiikkainen et al., 2002*). Σε μια άλλη επιδημιολογική μελέτη παρατήρησης βρέθηκε ότι η σωματική άσκηση στον ελεύθερο χρόνο (μη οργανωμένη) συνδέεται με τη μείωση της περιμέτρου μέσης και χαμηλότερο επιπολασμό της NASH (*Zelber-Sagi et al., 2008*).

1.3.3.4 ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η επίδραση των μακροθρεπτικών στοιχείων της δίαιτας στη NAFLD δεν είναι ξεκάθαρη. Η υπερβολική κατανάλωση υδατανθράκων φαίνεται να είναι επιβλαβής για τα άτομα που νοσούν και αυτό γιατί σχετίζεται με τη φλεγμονή και την εξέλιξη της νόσου. Η αυξημένη κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υψηλές ποσότητες προστιθέμενων απλών σακχάρων (π.χ. αναψυκτικά, φρουτοποτά, επιδόρπια, μπισκότα, ζάχαρη και καραμέλες) συνδέεται κατά πολύ με τη νόσο, περισσότερο από οποιασδήποτε άλλη ομάδα τροφίμων (*Bray, Nielsen, & Popkin, 2004*). Προοπτικά επιδημιολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η αύξηση της πρόσληψης ζαχαρούχων ποτών προβλέπει την παχυσαρκία, τον ΣΔΤ 2, την καρδιαγγειακή νόσο και τη NASH, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες, όπως η πρόσληψη ενέργειας (*de Koning et al., 2012; Mozaffarian, Hao, Rimm, Willett, & Hu, 2011*). Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, σε μία μελέτη φάνηκε ότι δίαιτα υπερβολικά υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (1000 επιπλέον θερμίδες ανά ημέρα από απλά σάκχαρα, όπως καραμέλες και ζαχαρούχα ποτά) για μόλις 3 εβδομάδες αυξάνει τη de novo λιπογένεση, την ηπατική στεάτωση (κατά 30%) και τα TG ορού, και ταυτόχρονα μειώνει την HDL-C (*Sevastianova et al., 2012*). Μετα-αναλύσεις συγκρίνουν την ισοθερμιδική υποκατάσταση των υδατανθράκων με λιπαρά (κορεσμένα, μονοακόρεστα ή πολυακόρεστα) και έχουν δείξει ότι οι δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, αλλά όχι οι δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά προάγουν τη δυσλιπιδαιμία που είναι χαρακτηριστική του μεταβολικού συνδρόμου και της NAFLD (*Mensink, Zock, Kester, & Katan, 2003*).

Η ποιότητα των υδατανθράκων φαίνεται να σχετίζεται με τη νόσο. Αυξημένη κατανάλωση φρουκτόζης συνδέεται με το MetS, τον κίνδυνο εμφάνισης της NASH και της προχωρημένης ίνωσης. Η κατανάλωση φρουκτόζης διεγείρει τη de novo λιπογένεση και αναστέλλει την έκκριση της λεπτίνης, η οποία συμβάλλει στη μείωση του κορεσμού και την αύξηση της θερμιδικής πρόσληψης (Zivkovic, German, & Sanyal, 2007). Ωστόσο, σε μία μετα-ανάλυση που αξιολόγησε τόσο τις κλινικές δοκιμές όσο και τις μελέτες παρατήρησης με δείγμα ενηλίκων και παιδιών έδειξε ότι η φαινομενική σχέση μεταξύ των δεικτών υγείας του ήπατος (δηλ., της ηπατικής στεάτωσης, της ηπατικής de novo λιπογένεσης, της ALT, της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού οξέος (aspartate aminotransferase – AST) και της γ-γλουταμινικής τρανσπεπτιδάσης (gamma glutamyl transpeptidase - γ-GT) και της πρόσληψης φρουκτόζης ή σακχαρόζης φαίνεται να συγχέεται από την υπερβολική κατανάλωση ενέργειας. Εκτός αυτού, οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι τα διαθέσιμα στοιχεία δεν είναι αρκετά ισχυρά ώστε να εξάγουν συμπεράσματα σχετικά με τα αποτελέσματα της κατανάλωσης φρουκτόζης ή σακχαρόζης στην NAFLD (Chung et al., 2014).

Για την επίδραση της ποιότητας και της ποσότητας των πρωτεϊνών στην εμφάνιση της NAFLD δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα. Ο υποσιτισμός που προκαλείται από ανεπάρκεια πρωτεΐνης οδηγεί σε ηπατική στεάτωση (Zivkovic et al., 2007). Στην Israeli National Health and Nutrition Survey ωστόσο όταν οι ερευνητές ανέλυσαν τη διατροφική σύσταση μιας υποομάδας 375 συμμετεχόντων παρατήρησαν ότι οι άνδρες της ομάδας των ασθενών με NAFLD κατανάλωναν στατιστικά σημαντικά περισσότερες πρωτεΐνες σε σχέση με τους άνδρες που δεν είχαν NAFLD (Zelber-Sagi et al., 2007).

Σε παχύσαρκους ασθενείς έχει φανεί ότι διατροφή που στο 55% της αποτελείται από λίπη αυξάνει τα ενδοηπατικά επίπεδα των TG τους στο 35% και τα επίπεδα της ινσουλίνης ορού νηστείας τους, ανεξάρτητα από το βάρος (Westerbacka et al., 2005). Η υπερβολική κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων (Saturated Fatty Acids - SFA: λαρδί, γάλα και καρύδα) προάγει το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και την ηπατοκυτταρική βλάβη. Παρόλα αυτά ο αυστηρός περιορισμός τους μπορεί να μην είναι ωφέλιμος σε ασθενείς με NAFLD. Μια μελέτη με ποικίλο δείγμα αξιολόγησε τρεις δίαιτες με διαφορετικά ποσοστά συνολικού λίπους και SFA. Η πρώτη, που ήταν και η δίαιτα ελέγχου, αποτελούταν από 38% συνολικό λίπος και από αυτό το 14% ήταν SFA, η δεύτερη δίαιτα αποτελούταν από 30% συνολικό λίπος και από αυτό το 9% ήταν SFA, και η τρίτη δίαιτα αποτελούταν από 25%

συνολικό λίπος και το 6% ήταν SFA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δεύτερη και η τρίτη δίαιτα σχετίζονταν με μείωση της HDL-C και της LDL-C και αύξηση των TG. Σε άτομα με υψηλότερο σωματικό λίπος και IR (χαρακτηριστικά της NAFLD), οι αλλαγές αυτές ήταν περισσότερο εμφανείς με τη δεύτερη δίαιτα. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι δίαιτες με <7% ή >10% σε SFA ενδεχομένως να μην ενδείκνυνται σε ασθενείς με NAFLD (Zivkovic et al., 2007).

Η κατανάλωση trans λιπαρών οξέων (υδρογονωμένα λίπη), αυξάνει τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής και οδηγεί σε ενδοθλιακή δυσλειτουργία και καταστροφικές αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ αυξάνοντας τους λόγους ολικής χοληστερόλης (Total Cholesterol - TC)/HDL και LDL/HDL (Zivkovic et al., 2007). Τα δεδομένα για την επίδραση των trans λιπαρών οξέων στην ηπατοκυτταρική βλάβη και στους ασθενείς με NAFLD δεν είναι επαρκή, αλλά δίνεται η σύσταση η ημερήσια κατανάλωσή τους να μη ξεπερνά το 1% των συνολικών θερμίδων (Reiner et al., 2011).

Η υπερβολική κατανάλωση ω-6 λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA) δεν ενθαρρύνεται επειδή μεταβάλλει την παραγωγή φλεγμονωδών δεικτών και είναι πιο επιρρεπής η υπεροξειδωση των λιπιδίων με επακόλουθο τη μείωση της HDL (Reiner et al., 2011). Σε παχύσαρκους άνδρες, χωρίς ηπατική νόσο, που έλαβαν 50γρ./ημέρα κραμβέλαιο (έλαιο πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated Fatty Acids – MUFA) και χαμηλό σε κορεσμένα λιπαρά οξέα) κατά τη διάρκεια τεσσάρων εβδομάδων φάνηκε ότι η TC τους, η LDL τους και τα ηπατικά ένζυμά τους ήταν σε πιο υγιή επίπεδα σε σύγκριση με όσους λάμβαναν 50γρ./ημέρα ελαιόλαδο (Kruse et al., 2015).

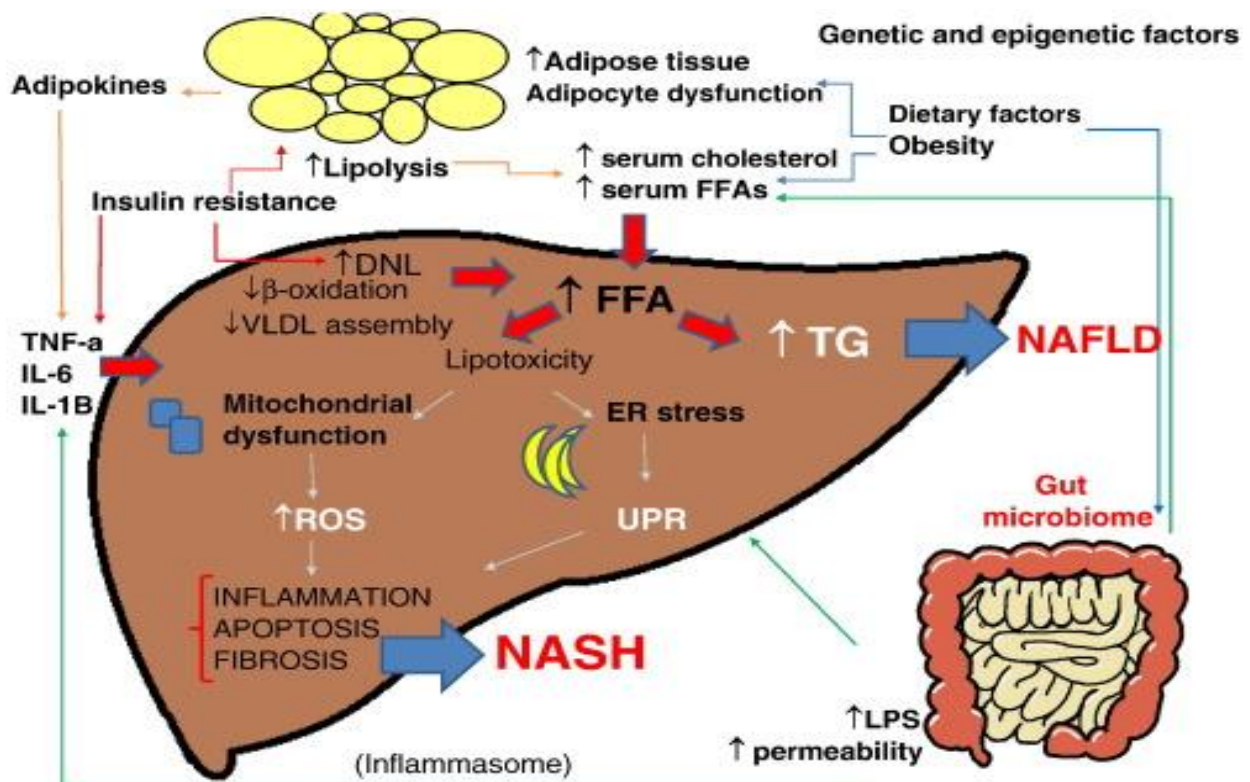
1.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η παθοφυσιολογία της NAFLD είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει πολυάριθμους γενετικούς, διαιτητικούς, μεταβολικούς και ορμονικούς παράγοντες. Οι μέχρι τώρα προσεγγίσεις στρέφονταν σε ένα μοντέλο "δύο χτυπημάτων" για να εξηγήσουν την εξέλιξη από την NAFL σε NASH. Σύμφωνα με αυτό, το οποίο πρώτη φορά διατυπώθηκε το 1998 από τους Day et. al (Day & James, 1998), η ηπατική συσσώρευση TG, η οποία πυροδοτείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τον καθιστικό τρόπο ζωής, τη διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, την παχυσαρκία αλλά και την IR, ενεργεί ως το πρώτο χτύπημα, ευαισθητοποιώντας το συκώτι σε περαιτέρω φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το οξειδωτικό στρες, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η δράση των λιποκυτταροκινών και οι βακτηριακές ενδοτοξίνες που προέρχονται από την εντερική

μικροχλωρίδα λειτουργούν ως το "δεύτερο χτύπημα" με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής, ίνωσης και τον κυτταρικό θάνατο (Day & James, 1998).

Το μοντέλο αυτό ήταν αρκετά απλοϊκό ώστε να εξηγήσει την πολυπλοκότητα της NAFLD. Το 2010, από τους Tigli et.al, διατυπώθηκε η "θεωρία των πολλαπλών παράλληλων χτυπημάτων", η οποία υποστηρίζει ότι μια σειρά πολλαπλών παθοφυσιολογικών διεργασιών ("χτυπημάτων"), δρα παράλληλα και όχι διαδοχικά με αποτέλεσμα την ηπατική στεάτωση και φλεγμονή (Tilg & Moschen, 2010). Σε αυτές τις διεργασίες συμπεριλαμβάνονται η IR, η de novo λιπογένεση, η λιποτοξικότητα, η φλεγμονή του λιπώδους ιστού, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), η μικροχλωρίδα του εντέρου και οι γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες.

Εικόνα 2.4.1 Η θεωρία των πολλαπλών χτυπημάτων για την ανάπτυξη της NAFLD (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016)



1.4.1 ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Η IR είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες στην ανάπτυξη στεάτωσης και NASH. Η IR έχει οριστεί ως μία κατάσταση στην οποία χρειάζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις ινσουλίνης από το κανονικό για να επιτευχθούν φυσιολογικές μεταβολικές απαντήσεις (υπερινσουλιναιμία) ή φυσιολογικές συγκεντρώσεις ινσουλίνης αποτυγχάνουν να πετύχουν

φυσιολογικές μεταβολικές απαντήσεις (*Bugianesi, McCullough, & Marchesini, 2005*). Η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε αύξηση της ηπατικής de novo λιπογένεσης (DNL) και σε διαταραχές της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό, με επακόλουθο την αυξημένη ροή ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids - FFAs) στο ήπαρ, την εστεροποίησή τους σε TG και την εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης (*Bugianesi, Moscatiello, Ciaravella, & Marchesini, 2010*).

1.4.2 DE NOVO ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ

Η συσσώρευση λίπους στο συκώτι συμπεριλαμβάνει διάφορες αιτίες, όπως η υπερβολική πρόσληψη FFAs από τη διατροφή, η αυξημένη εισροή FFAs στο ήπαρ λόγω της IR και την ηπατική de novo λιπογένεση (*Petta, Muratore, & Craxi, 2009; Tessari, Coracina, Cosma, & Tiengo, 2009*). Η συνεισφορά της de novo λιπογένεσης στη συνολική παραγωγή ενδοηπατικών TG σε φυσιολογικά άτομα είναι μικρή και εκτιμάται σε λιγότερο από 5% των λιπαρών οξέων που ενσωματώνονται στις εκκρινόμενες λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας σε τριακυλογλυκερόλες (Very Low Density Lipoprotein-TG - VLDL-TG) (*Diraison, Moulin, & Beylot, 2003*). Ωστόσο, η συνεισφορά της de novo λιπογένεσης στην συνολική παραγωγή ενδοηπατικών TG σε ασθενείς με NAFLD είναι αρκετά υψηλότερη και αντιπροσωπεύει το 15%-23% των λιπαρών οξέων ενδοηπατικά και εκκρινόμενα στις VLDL-TG (*Diraison et al., 2003; Donnelly et al., 2005*). Επιπλέον, αποτελέσματα από μία μελέτη που χρησιμοποίησε εξελιγμένες τεχνικές MRS για την αξιολόγηση του μεταγευματικού μεταβολισμού της γλυκόζης in vivo, προτείνει ότι η αύξηση της de novo λιπογένεσης προηγείται της ανάπτυξης μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (*Petersen et al., 2007*). Η σύνδεση της NAFLD με μεταβολικές διαταραχές υποστηρίζεται από τα δεδομένα μιας πρόσφατης έρευνας σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο και υψηλό ποσοστό ηπατικού λίπους και η οποία έδειξε πως τα άτομα αυτά είχαν τριπλάσιο αριθμό de novo σύνθεσης FFAs (*Lambert, Ramos-Roman, Browning, & Parks, 2014*).

1.4.3 ΛΙΠΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα λιπίδια μπορεί να είναι επιβλαβή για τα ηπατοκύτταρα στη NAFLD. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα SFAs μακράς αλύσου όπως το παλμιτικό (C16: 0) και το στεατικό (C18: 0), τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στα ζωικά λίπη και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και παράγονται στο ήπαρ από τα σάκχαρα που προέρχονται από τη διατροφή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα SFAs μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια για β-οξείδωση ή εστεροποιούνται για να απεκκριθούν με τις VLDL με αποτέλεσμα να

αποθηκευτούν ως σταγονίδια λιπιδίων. Στην παθοφυσιολογία της NASH, πολλαπλοί μηχανισμοί λειτουργούν ταυτόχρονα ώστε να προκαλέσουν βλάβη στα ηπατοκύτταρα που κατακλύζονται από SFA και από ελεύθερη χοληστερόλη (Free Cholesterol - FC) από την de novo σύνθεση (Fuchs & Sanyal, 2012; Simonen et al., 2011). Η συσσώρευση FC οδηγεί σε τραυματισμό του ήπατος μέσω της ενεργοποίησης των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης στα κύτταρα Kupffer (Kupffer Cells - KCs), στα αστεροειδή κύτταρα (HSCs) και στα ηπατοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των KCs και HSCs προάγει τη φλεγμονή και την ίνωση (Arguello, Balboa, Arrese, & Zanlungo, 2015). Αυτά τα λιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των FC, SFA και ορισμένων ενδιάμεσων λιπιδίων από την περίσσεια SFA, μπορούν να ενεργοποιήσουν μια ποικιλία ενδοκυτταρικών αποκρίσεων όπως ο JNK1 και μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης, με αποτέλεσμα το λιποτοξικό στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και στα μιτοχόνδρια αντίστοιχα (Fuchs & Sanyal, 2012; Malhi, Bronk, Werneburg, & Gores, 2006; Simonen et al., 2011). Επιπροσθέτως, ο toll-like receptor 4 (TLR4) είναι ένας υποδοχέας αναγνώρισης ο οποίος ενεργοποιεί ένα προφλεγμονώδες σηματοδοτικό μονοπάτι σε απόκριση της περίσσειας SFAs και οδηγεί τελικά σε ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ) και στην παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-α) (Sharifnia et al., 2015).

1.4.4 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟΥ

Η διαταραγμένη λειτουργία του λιπώδους ιστού συνιστά μία εκ των παραλλήλων διεργασιών και γενεσιουργό αιτία για την παθογένεση της NAFLD (Buzzetti et al., 2016). Ο λιπώδης ιστός πέρα από τη λειτουργία του για αποθήκευση ενέργειας αποτελεί και ένα ενδοκρινές όργανο που εκκρίνει ορμόνες, τις αντιποκίνες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η λεπτίνη, η αντιπονεκτίνη, η ρεζιστίνη, ο αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (PAI - I), ο TNF - α και η ιντερλευκίνη - 6 (IL - 6) (Arslan, Erdur, & Aydin, 2010).

Παθολογική υπερτροφία και υπερπλασία των λιποκυττάρων, που συχνά παρατηρείται σε παχύσαρκα άτομα μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση των ενδοκρινικών λειτουργιών του λιπώδους ιστού (Gesta, Tseng, & Kahn, 2007). Η λεπτίνη είναι μία ορμόνη που παράγεται κυρίως από ώριμα λιποκύτταρα και επιδρά στη ρύθμιση εισροής και κατανάλωσης ενέργειας, στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην προαγωγή της φλεγμονής και της ίνωσης. Υψηλά επίπεδα λεπτίνης παρατηρούνται σε παχύσαρκους ασθενείς και σε ασθενείς με NAFLD (Giby & Ajith, 2014; Yu, Marsh, Hu, Feng, & Wu, 2016). Αντίθετα, η αντιπονεκτίνη είναι μία αντιφλεγμονώδης ορμόνη που προωθεί την οξείδωση των FFAs στους μύες (Krawczyk,

Bonfrate, & Portincasa, 2010), αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και ανταγωνίζεται τη δράση του TNF-α. Τα επίπεδα έκκρισης και κυκλοφορίας της αντιπονεκτίνης είναι αντιστρόφως ανάλογα με το σωματικό λίπος, και είναι μειωμένα σε ασθενείς με NAFLD, αφενός λόγω της υποβόσκουσας IR και αφετέρου λόγω της ενδοηπατικής εναπόθεσης λίπους (*Giby & Ajith, 2014; Yu et al., 2016*).

Η συσσώρευση FFAs και η επακόλουθη λιποτοξικότητα, η ινσουλινοαντίσταση και η δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού επάγουν την ελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (*Bilzer, Roggel, & Gerbes, 2006*). Η παρουσία στεάτωσης είναι στενά συνδεδεμένη με τη χρόνια ηπατική φλεγμονή, ένα αποτέλεσμα που εν μέρει αποδίδεται στην ενεργοποίηση του Iκκ-β/NF-κΒ μονοπατιού, η αυξημένη δράση του οποίου σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών στο ήπαρ, όπως είναι ο TNF-α, η ιντερλευκίνη-6 και η ιντερλευκίνη-1B, καθώς και με τη διέγερση των KCs (*Dowman et al., 2010*). Τα KCs όπως και τα HSCs του ήπατος παράγουν τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β) ο οποίος καταλύει το μετασχηματισμό των HSCs σε μυοϊνοβλάστες και οι τιμές του οποίου έχουν βρεθεί επίσης αυξημένες τόσο σε ζωικά μοντέλα στα οποία έχει γίνει επαγωγή της NAFLD όσο και σε ασθενείς με ηπατική ίνωση (*Braunersreuther, Viviani, Mach, & Montecucco, 2012*). Το μονοπάτι Iκκ-β/NF-κΒ μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί άμεσα από τα FFAs, στοιχείο που δηλώνει ότι η παχυσαρκία και η επακόλουθη αύξηση των ηπατικών FFAs αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες για την εμφάνιση φλεγμονής (*Yu et al., 2016*). Η αυξημένη έκφραση των φλεγμονωδών γονιδίων και η ενεργοποίηση των μακροφάγων στον σπλαχνικό και υποδόριο λιπώδη ιστό των ασθενών με NAFLD συσχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου από απλή στεάτωση σε NASH και ίνωση (*du Plessis et al., 2015*). Η φλεγμονή και η ενεργοποίηση του NF-κΒ μπορούν να προάγουν την καρκινογένεση και επομένως η χρόνια φλεγμονή παρουσία ηπατικής στεάτωσης δύναται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (*Dowman et al., 2010*).

Ένας επιπρόσθετος παράγοντας του λιπώδους ιστού που εμφανίζεται σε πλεόνασμα σε ασθενείς με NAFLD είναι η ρεζιστίνη, ωστόσο ο ακριβής ρόλος της στην παθογένεια της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος (*Yu et al., 2016*).

1.4.5 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην παθογένεια και στην εξέλιξη της NAFLD, μέσω του λεγόμενου έντερο – ηπατικού άξονα (gut – liver axis) έχει μελετηθεί, και έχουν

βρεθεί να εμπλέκονται συγκεκριμένοι "εντερότυποι" που μπορεί να ρυθμίζουν απευθείας την έκφραση των γονιδίων του ξενιστή και να επηρεάζουν τη συστηματική φλεγμονή (*Arumugam et al., 2011*). Η ισχυρή αλληλεπίδραση που υπάρχει μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας και του ήπατος προκύπτει λόγω της ανατομικής του θέσης καθώς, το 70% της αιματικής παροχής του ήπατος προέρχεται από το έντερο μέσω της πυλαίας φλέβας (*Compare et al., 2012*). Οι βακτηριακές ενδοτοξίνες, με κυριότερη τον λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide - LPS), που παράγονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο μπορούν να μεταφερθούν στο ήπαρ μέσω του εντερικού φραγμού και να οδηγήσουν σε συσσώρευση τοξικών βακτηριακών υποπροϊόντων, τα οποία δύναται να προκαλέσουν ηπατική φλεγμονή, συσσώρευση λίπους και IR μέσω ενεργοποίησης καταρράκτη φλεγμονωδών παραγόντων (*Ceccarelli et al., 2015; Dowman et al., 2010; Yu et al., 2016*). Ο ρόλος της βακτηριακής υπερανάπτυξης στην παθογένεια και προώθηση της NASH έχει αποδειχθεί από μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους και έδειξαν ότι η απορρύθμιση και η μεταβολή της εντερικής μικροχλωρίδας είτε μετά από εντερική παράκαμψη είτε λόγω λήψης αντιβιοτικών είναι ικανή να οδηγήσει σε ηπατική φλεγμονή και εμφάνιση της NASH (*Bäckhed et al., 2004*). Άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την εντερική μικροχλωρίδα και συμβάλλουν στην ανάπτυξη της NASH είναι η αυξημένη παραγωγή ενδογενούς αιθανόλης από βακτήρια, η μετατροπή της διαιτητικής χολίνης σε μεθυλαμίνη και η ρύθμιση του μεταβολισμού των χολικών οξέων (*Machado & Cortez-Pinto, 2012*).

1.4.6 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ/ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η β-οξειδωση μέσα σε ένα φυσιολογικό ήπαρ γίνεται στα μιτοχόνδρια, αλλά στην περίπτωση της NAFLD, η διαδικασία αυτή μπορεί να διαταραχθεί λόγω της αυξημένης εισροής FFAs, η οποία προκαλεί την «υπερφόρτωση» των μιτοχονδρίων και διαταράσσει την οξειδωτική τους ικανότητα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) και άλλων τοξικών μεταβολιτών. Οι ρίζες αυτές προωθούν το οξειδωτικό stress, με επακόλουθη ενεργοποίηση φλεγμονωδών μονοπατιών και της μιτοχονδριακής βλάβης (*Gusdon, Song, & Qu, 2014*), καθώς και μηχανισμών απόπτωσης και νέκρωσης των ηπατοκυττάρων που οδηγούν στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικού τραύματος (*Abdelmegeed et al., 2012*). Οι δομικές ανωμαλίες των μιτοχονδρίων και η μείωση της δράσης της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων συνεισφέρουν τόσο στην εξέλιξη της NASH όσο και της ηπατοκαρκινογένεσης, ενώ όσο πιο προχωρημένο το στάδιο της νόσου τόσο

μεγαλύτερα τα επίπεδα οξειδωτικού στρες (*Dowman et al., 2010; Takaki, Kawai, & Yamamoto, 2013*). Παρόλα αυτά δεν έχει καταστεί σαφές το κατά πόσον η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι ένα παθογόνο αποτέλεσμα της NAFLD ή αν είναι η συνέπεια ενός τροποποιημένου μεταβολισμού των λιπιδίων (*Buzzetti et al., 2016*).

1.4.7 ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

Το ΕΔ είναι ένα ενδοκυττάριο οργανίδιο υπεύθυνο για τη σύνθεση, την αναδίπλωση, την επισκευή και την κυκλοφορία πολλών πρωτεϊνών. Υπό καταστάσεις φλεγμονής, οξειδωτικού στρες, IR και σηματοδότησης απόπτωσης, η ικανότητα του ΕΔ για τις παραπάνω διεργασίες μειώνεται, ενώ η ανάγκη για πρωτεϊνόςύνθεση αυξάνεται. Αυτή η ανισορροπία μεταξύ των αναγκών σε πρωτεΐνες και της δυνατότητας του ΕΔ να ανταπεξέλθει ονομάζεται "στρες του ενδοπλασματικού δικτύου" (*Yu et al., 2016*). Αυτό το είδος κυτταρικού στρες συνήθως ενεργοποιεί ένα προσαρμοστικό μηχανισμό απόκρισης που στοχεύει στην επίλυση του στρες του ΕΔ και ονομάζεται unfolded protein response (UPR) (*M. Wang & Kaufman, 2014*). Στην NAFLD, οι παράγοντες που επάγουν τον UPR μηχανισμό συμπεριλαμβάνουν την υπεργλυκαιμία, τη μιτοχονδριακή βλάβη που εξαντλεί τα αποθέματα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), η υπερχοληστερολαιμία, η εξάντληση της φωσφατιδυλοχολίνης και το οξειδωτικό στρες (*Seki, Kitada, & Sakaguchi, 2005*). Εν τέλει η ενεργοποίηση του συστήματος UPR φαίνεται να αποσκοπεί στη μείωση του ρυθμού πρωτεϊνόςύνθεσης και αύξησης της αποδόμησης των πρωτεϊνών, γεγονός που ευνοεί την απόπτωση (*Buzzetti et al., 2016*).

1.4.8 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι γενετικοί παράγοντες ή οι επιγενετικές τροποποιήσεις επηρεάζουν την περιεκτικότητα των ηπατοκυττάρων σε λίπος, τις ενζυμικές διεργασίες και το φλεγμονώδες περιβάλλον του ήπατος. Έτσι επηρεάζεται η εξέλιξη της νόσου, που μπορεί είτε να παραμείνει σε ένα σταθερό στάδιο της NAFLD είτε να επιδεινωθεί σε φλεγμονή και NASH (*Buzzetti et al., 2016*).

1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Για να τεθεί η διάγνωση της NAFLD απαιτείται α) επιβεβαιωμένη ηπατική στεάτωση είτε ιστολογικά είτε απεικονιστικά, β) ο αποκλεισμός υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ (≥ 30 γρ./ημέρα για τους άντρες, ≥ 20 γρ./ημέρα για τις γυναίκες), γ) ο αποκλεισμός ανταγωνιστικών αιτιών για ηπατική στεάτωση και δ) ο αποκλεισμός άλλων αιτιών για χρόνια ηπατική νόσο (*Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012*).

Πιθανές αιτίες ανάπτυξης ηπατικής στεάτωσης και παράθεση των συνθηκών αυτών δίνονται στον **Πίνακα 1.5.1** όπως διατυπώνονται από τους Ahmed et.al, 2010 (Ahmed, Abu, & Byrne, 2010).

Πίνακας 1.5.1 Αιτίες αποκλεισμού διάγνωσης της NAFLD (Ahmed et al., 2010)

A	Υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ Αλκοολικό λιπώδες ήπαρ, Αλκοολική ηπατίτιδα
B	Αυτοάνοση ηπατική νόσος Αυτοάνοση ηπατίτιδα, Πρωτοπαθής χολική κίρρωση, Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, Κοιλιοκάκη
Γ	Λοίμωξη Ηπατίτιδα A, B, C, D, E
Δ	Μεταβολικές διαταραχές Ανεπάρκεια α-1-Αντιθρυψίνης, Αιμοχρωμάτωση, Νόσος Wilson, Υποθυρεοειδισμός, Υπερθυρεοειδισμός, Δυσανορρόφηση
Ε	Φαρμακογενής ηπατοτοξικότητα Αμιδοαρόνη, Μεθοτρεξάτη, Ισονιαζίδη, Περεξιλίνη, Κορτικοστεροειδή, Οιστρογόνα
ΣΤ	Θρέψη Παρεντερική θρέψη, Σύνδρομο δυσανορρόφησης, Τοξικότητα βιταμίνης A

Η διάγνωση της NAFLD σε πολλούς ασθενείς γίνεται τυχαία είτε κατά τη διάρκεια εργαστηριακού ελέγχου ρουτίνας όπου παρατηρείται ανεξήγητη αύξηση των ηπατικών ενζύμων, είτε κατά τη διενέργεια εξέτασης του ήπατος με απεικονιστική μέθοδο που εκτελείται για τη διερεύνηση άλλου νοσήματος και ανευρίσκεται ηπατική στεάτωση (Hassan et al., 2014).

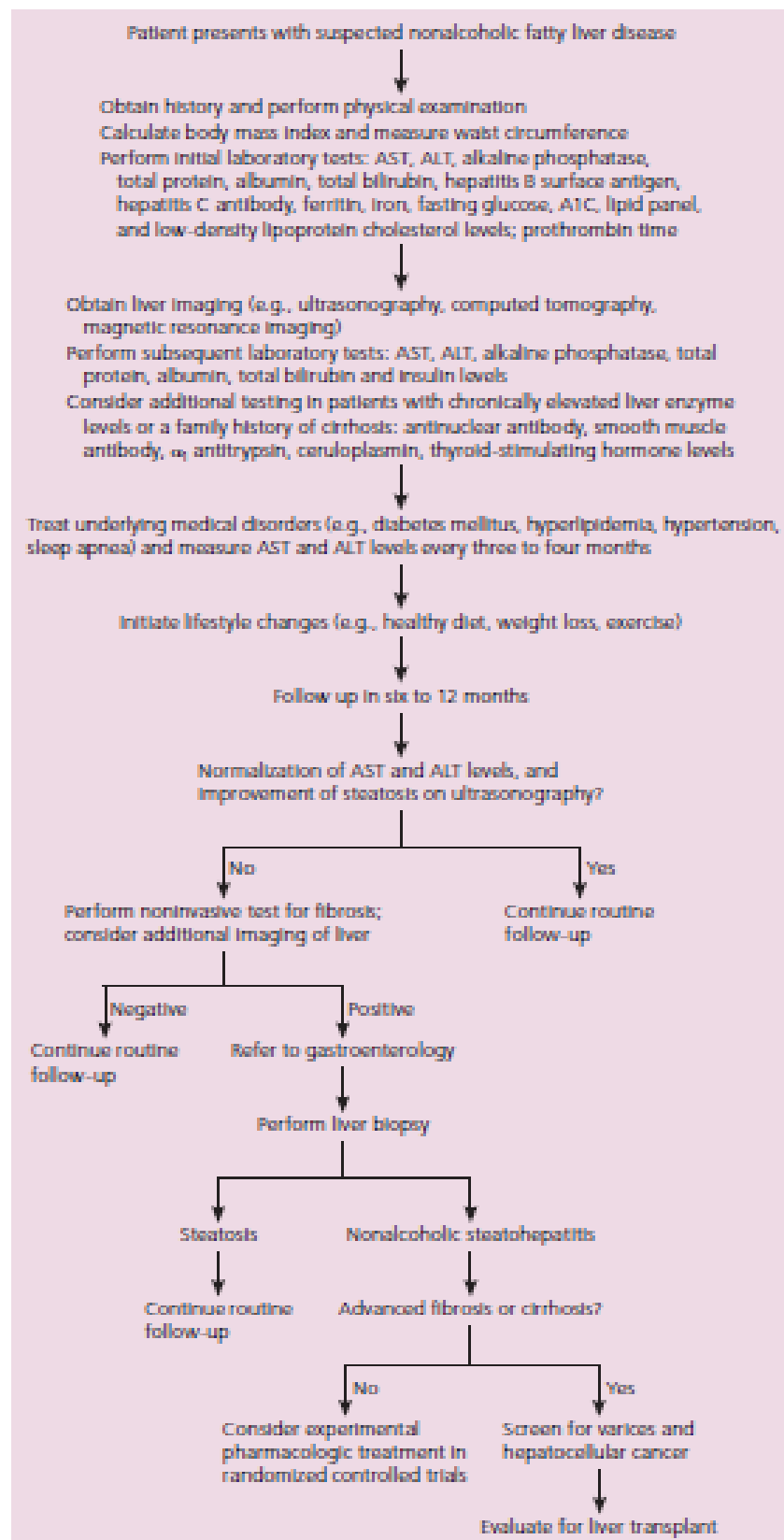
1.5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η πλειοψηφία των ασθενών που διαγιγνώσκονται με NAFLD είναι ασυμπτωματικοί. Συμπτώματα που θέτουν υποψία νόσου είναι η γενική δυσφορία ή ο ασαφής πόνος στο άνω δεξιό τεταρτημόριο της κοιλιάς (Torres, Williams, & Harrison, 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την κλινική εξέταση των ασθενών ένα σύνηθες φυσικό εύρημα είναι η ηπατομεγαλία. Άλλα κλινικά ή φυσικά ευρήματα μη ειδικά για τη νόσο αποτελούν η γενική κακουχία, η κοιλιακή δυσφορία, η ναυτία και άλλα συμπτώματα που εμπλέκουν το γαστρεντερικό σύστημα. Η κοιλιοκάκη θα πρέπει να αποκλειστεί για άτομα ύποπτα νόσου (Puri & Sanyal, 2012). Σπάνια, σε προχωρημένου σταδίου περιπτώσεις, εμφανίζονται συμπτώματα που

χαρακτηρίζουν την ηπατοπάθεια όπως ο ίκτερος, ο ασκίτης ή ακόμα και η ηπατική εγκεφαλοπάθεια (Paschos & Paletas, 2009).

Κατά τη διάρκεια της φυσικής εξέτασης, είναι χρήσιμο να διερευνηθεί το άτομο για παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για NAFLD, όπως ο αυξημένος ΔΜΣ, το υπερβάλλον βάρος, η ΠΜ και η αυξημένη πίεση του αίματος (Wilkins, Tadmor, Hepburn, & Schade, 2013). Δεδομένης της ισχυρής συσχέτισης μεταξύ του MetS και της NAFLD (Ratziu, Bellentani, Cortez-Pinto, Day, & Marchesini, 2010), κλινικές ενδείξεις για IR θα πρέπει να προκαλέσουν υποψία για NAFLD. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αποκλεισθούν τα κοινά αίτια ηπατικής βλάβης (**Πίνακας 1.5.1**), συνεπώς είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν εργαστηριακές εξετάσεις ώστε να αξιολογηθούν: η έλλειψη της άλφα-1 αντιτρυψίνης, τα επίπεδα τρανσφερίνης και φερριτίνης (Ferritin – Fer) ορού, η παρουσία αντιπυρηνικών αντισωμάτων, αντισωμάτων έναντι των λείων μυϊκών ινών, αντισωμάτων έναντι των μικροσωμίων του ήπατος-νεφρού, αντισωμάτων έναντι του κυτταρόπλασμα του ήπατος, μεταλλάξεις στο γονίδιο HFE, καθώς και τα επίπεδα κερουλοπλασμίνης (Loria et al., 2010). Η χρήση ενδοφλέβιων ουσιών, η μετάγγιση αίματος και η σεξουαλική δραστηριότητα θα πρέπει να συνεκτιμηθούν ως παράγοντες κινδύνου για ιογενή ηπατίτιδα (Wilkins et al., 2013).

Διάγραμμα 1.5.1.1:Αλγόριθμος αξιολόγησης ενός ασθενή με υποψία για NAFLD (Wilkins et al., 2013)



1.5.2 ΕΛΕΓΧΟΣ – SCREENING

Ένα ερώτημα που τίθεται στη βιβλιογραφία είναι αν αξίζει να αναζητηθεί και να διαγνωσθεί η NAFLD σε ασυμπτωματικά άτομα με φυσιολογικές τιμές ηπατικών ενζύμων, καθώς στην πλειοψηφία τους η απλή στεάτωση δεν θα εξελιχθεί περαιτέρω. Σε γενικές γραμμές, τα προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου προορίζονται να αποφέρουν οφέλη για τη δημόσια υγεία, όμως υπάρχουν ορισμένοι παράμετροι που πρέπει να εξεταστούν πριν από την υιοθέτηση τέτοιων προγραμμάτων για οποιαδήποτε ασθένεια, συμπεριλαμβανομένης και της NASH. Πρώτον, η ασθένεια που εξετάζεται πρέπει να έχει ιατρική σημασία, να είναι κοινή στον γενικό πληθυσμό, να έχει καλά χαρακτηρισμένη φυσική ιστορία και να έχει μια παρέμβαση με θεραπευτικό όφελος (Adams & Feldstein, 2010). Επίσης, θα πρέπει να είναι εύκολα εφαρμόσιμος ο προσυμπτωματικός έλεγχος και να έχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Παρόλο που η NASH είναι χρόνια νόσος με υψηλή συχνότητα στο γενικό πληθυσμό, δεν έχει κάποια διαθέσιμη αποτελεσματική θεραπεία, ούτε εύκολα εφαρμόσιμο και αξιόπιστο προσυμπτωματικό έλεγχο. Επομένως δε συνίσταται ο έλεγχος για NAFLD στο γενικό πληθυσμό (Edens, Kuipers, & Stolk, 2009). Ακόμη και σε άτομα που διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο όπως άτομα με διαβήτη (Younossi et al., 2004) δεν συνίσταται έλεγχος λόγω της αβεβαιότητας που έχουν οι διαγνωστικές εξετάσεις, οι θεραπευτικές επιλογές, τα μακροπρόθεσμα οφέλη, καθώς και η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας του ελέγχου (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012). Αν και πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι τα μέλη οικογένειας παιδιών με NAFLD παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο για NAFLD (Schwimmer et al., 2009; Willner et al., 2001), δεν υπήρξαν πειστικές έρευνες που να αποδεικνύουν τη χρησιμότητα του ελέγχου των μελών της οικογένειας προς το παρόν. Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει για τη δημιουργία διαγνωστικών σκορ, για τη διαστρωμάτωση των ασθενών με βάση τους παράγοντες κινδύνου που έχουν, προκειμένου να ελέγχονται μόνο όσοι έχουν την υψηλότερη πιθανότητα για ανάπτυξη της νόσου. Ωστόσο, μέχρι στιγμής κανένα από αυτά τα σκορ δεν έχει αποκτήσει ευρεία αποδοχή (Hassan et al., 2014). Υπάρχουν ωστόσο καταστάσεις στις οποίες είναι απαραίτητη η διερεύνηση για NAFLD σε ασυμπτωματικά άτομα, όταν αυτά είναι δότες για μεταμόσχευση ήπατος, καθώς η στεάτωση αποτελεί κίνδυνο για πρωτοπαθή απόρριψη του μοσχεύματος και μείζονα ηπατεκτομή (McCormack, Dutkowski, El-Badry, & Clavien, 2011), και επιπλέον αυξάνει τον κίνδυνο για μετεγχειρητική θνησιμότητα (Walsh, 2010).

1.5.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Καμία από τις εργαστηριακές εξετάσεις δεν είναι διαγνωστική για την NAFLD. Οι αμινοτρανσφεράσες χρησιμοποιούνται συνήθως για τον έλεγχο της ηπατικής νόσου αφού τα αυξημένα επίπεδά τους υποδεικνύουν την παρουσία ηπατικής στεάτωσης, φλεγμονής ή ίνωσης, ωστόσο έχουν χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα και δεν προβλέπουν τις κλινικές εκβάσεις της νόσου (*Fracanzani et al., 2008; Musso, Gambino, Cassader, & Pagano, 2011*). Οι τιμές τους κυμαίνονται 2 έως 4 φορές υψηλότερα από τα ανώτερα επίπεδα αναφοράς, με την τιμή της ALT να είναι μεγαλύτερη από την AST στις περισσότερες των περιπτώσεων. Αν ο λόγος AST/ALT είναι μεγαλύτερος της μονάδας, υποδηλώνει επιδείνωση της νόσου και ανάπτυξη ίνωσης (*Angulo, Keach, Batts, & Lindor, 1999*). Παρόλο που τα αυξημένα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με το NAFL, δεν έχουν όλοι οι ασθενείς με NASH αυξημένα επίπεδα AST ή ALT (*Williams et al., 2011*). Αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες κοορτής που έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της ALT είναι σε φυσιολογικά όρια στο 80% των ασθενών με NAFL και τα επίπεδά της τείνουν να επανакανονικοποιούνται με την πάροδο του χρόνου, ακόμη και με προοδευτική ίνωση (*Adams, Sanderson, Lindor, & Angulo, 2005; Browning et al., 2004*). Δεδομένου ότι αυτά τα ένζυμα τείνουν να παρουσιάζουν διακυμάνσεις, οι μετρήσεις των αμινοτρανσφερασών προτείνεται να επαναλαμβάνονται: α) για επιβεβαίωση των αυξημένων τιμών, β) σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για NAFLD με φυσιολογικά αποτελέσματα. Αφού επιβεβαιωθούν τα αυξημένα αποτελέσματα των ηπατικών ενζύμων, είναι αναγκαία περαιτέρω διερεύνηση για να αποκλειστούν άλλες αιτίες ηπατικής νόσου και να επιβεβαιωθεί η διάγνωση (*Fazel et al., 2016*).

Υπάρχουν και κάποιες επιπλέον βιοχημικές εξετάσεις που συνεκτιμούνται στα πλαίσια ενός εργαστηριακού ελέγχου. Το επίπεδο της γ-GT μπορεί να είναι υψηλό σε ασθενείς με NAFLD και έχει συσχετιστεί με προχωρημένη ίνωση (*Tahan et al., 2008*) και θνησιμότητα από όλες τις αιτίες (*Ruhl & Everhart, 2009*), πιθανώς περισσότερο στους άνδρες (*Haring et al., 2009*). Μια πρόσφατη προοπτική βελγική μελέτη σε 230 ασθενείς με NAFLD διαπίστωσε ότι οι τιμές της γ-GT ήταν 5 φορές μεγαλύτερες του φυσιολογικού ορίου και συσχετίστηκαν με τη μεγαλύτερη ηλικία, το διαβήτη και την αυξημένη ίνωση (*Francque et al., 2011*). Τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase - ALP) είναι ελαφρώς αυξημένα στο 1/3 των ασθενών, αλλά σπάνια αποτελούν το μοναδικό εύρημα ηπατικής δυσλειτουργίας (*Sass, Chang,*

& Chopra, 2005). Η συγκέντρωση της Fer είναι ανεβασμένη περίπου στο 20-50% των ασθενών , γεγονός που φαίνεται να σχετίζεται με χειρότερη ιστολογική πρόγνωση (Angulo et al., 1999; Kowdley et al., 2012) και ο κορεσμός της τρανσφερίνης αυξάνεται στο 6-11% των ασθενών (Angulo, 2002). Επιπλέον, οι χαμηλές τιμές αλβουμίνης (Albumin – Alb) και η υπερχολερυθριναιμία δεν αποτελούν χαρακτηριστικά της νόσου, και παρατηρούνται μόνο σε ασθενείς με NASH κίρρωση (Oh, Winn, & Poordad, 2008).

1.5.4 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Αμέτρητες προσπάθειες έχουν γίνει για τη πρόβλεψη της ίνωσης στην NAFLD με μη επεμβατικά μοντέλα. Αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι το NAFLD Fibrosis Score (NFS), το οποίο ενσωματώνει την ηλικία, τον ΔΜΣ, τον λόγο AST/ALT, την υπεργλυκαιμία, τον αριθμό των αιμοπεταλίων (Platelets – PLT) και την Alb. Σε μία μεγάλη προοπτική μελέτη ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με NAFLD, το NFS έδειξε ότι έχει AUROC 0.84, ευαισθησία 82%, ειδικότητα 98%, PPV 90% και NPV 36%. Επιπλέον το NFS έχει δύο κατωφλικές τιμές οι οποίες χωρίζουν τους ασθενείς σε αυτούς που έχουν χαμηλή πιθανότητα ίνωσης (<1.455), υψηλή πιθανότητα ίνωσης (>0.676) και ενδιάμεση (-1.455 – 0.676). Από τους προσδιορισθέντες ασθενείς το 90% είχε την κατάλληλη διάγνωση. Ωστόσο, ένας σημαντικός περιορισμός του συστήματος βαθμολόγησης είναι ότι το 25% των ασθενών ήταν απροσδιόριστο (Angulo et al., 2007). Η κλινική χρησιμότητα του NFS έχει αποδειχθεί και επιβεβαιωθεί και από μία μετα-ανάλυση (Musso et al., 2011). Προς το παρόν το NFS είναι το πιο ευρέως εφαρμόσιμο μοντέλο και έχει αξία περιορίζοντας τον αριθμό των βιοψιών που κρίνονται απαραίτητες για τη διάγνωση της NAFLD (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, Sanyal, et al., 2012).

Ένα επιβεβαιωμένο μοντέλο πρόβλεψης (Lassailly et al., 2011) είναι το FibroTest (FT) που περιλαμβάνει: την ηλικία, την α2-μακροσφαιρίνη, την χολερυθρίνη, τη γ-GT και την απολιποπρωτεΐνη A1. Αρχικά αναπτύχθηκε για την ιογενή ηπατίτιδα και την αλκοολικής αιτιολογίας ηπατοπάθεια και στη συνέχεια επεκτάθηκε στην NAFLD, όπου έδειξε AUROC για σημαντική ίνωση 0.75-0.86, με ευαισθησία 77%, εξειδίκευση 98%, PPV 90% και NPV 73%. Το μοντέλο αυτό δεν μπόρεσε να διακρίνει την ήπια από τη μέτρια ίνωση και το ένα τρίτο των ασθενών αποδόθηκε σε ενδιάμεσες τιμές και επομένως δεν μπορούσε να ταξινομηθεί. Πρόσθετες αιτίες αποτυχίας ήταν το σύνδρομο Gilbert, η χολόσταση, η οξεία φλεγμονή και η

μη φυσιολογική λιποπρωτεΐνη A1 που σχετίζονταν με ανωμαλίες των λιπιδίων που συχνάζουν σε αυτούς τους ασθενείς (*Ratziu et al., 2006*).

Το μοντέλο BARD περιλαμβάνει το ΔΜΣ, το λόγο AST / ALT και την παρουσία σακχαρώδη διαβήτη (*Harrison, Oliver, Arnold, Gogia, & Neuschwander-Tetri, 2008*). Σε ένα μεγάλο δείγμα παχύσαρκων ασθενών με NAFLD, η παρουσία τουλάχιστον 2 παραγόντων αύξανε 17 φορές τον κίνδυνο για προχωρημένη ίνωση, με υψηλό NPV. Οι μετέπειτα μελέτες έδειξαν λιγότερη ακρίβεια του μοντέλου, και ειδικότερα όταν συγκρίνονταν με το NFS (*Fujii et al., 2009; McPherson, Stewart, Henderson, Burt, & Day, 2010; Ruffillo et al., 2011*). Ωστόσο, έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ευκολότερο να εκτιμηθεί και δεν αποδίδει απροσδιόριστα αποτελέσματα.

Το FIB-4, περιγράφηκε για να αξιολογήσει την προχωρημένη ίνωση στη χρόνια ηπατική νόσο, ενσωματώνοντας την ηλικία, τις αμινοτρανσφεράσες και τον αριθμό των PLT. Συγκρίθηκε με αρκετά άλλα μοντέλα για την NAFLD, δείχνοντας AUROC συχνότερα πάνω από 0.80 και κάνοντας πάντοτε την καλύτερη εκτίμηση, ακόμη και σε σύγκριση με το NFS (*Adams et al., 2011; McPherson et al., 2010*). Είναι μια πολλά υποσχόμενη δοκιμασία, ίσως και σε συνδυασμό με άλλες βαθμολογίες.

Άλλα μοντέλα πρόβλεψης για την ίνωση αποτελούν το European Liver Fibrosis Test (ELF) (*Rosenberg et al., 2004*), το Fibrometer (*Calès et al., 2009*), το NAFLD Diagnostic Panel (*Younossi, Page, et al., 2011*), το BAAT (*Ratziu et al., 2000*), το μοντέλο NICE (*Anty et al., 2010*) και η δοκιμή NASH (*Poynard et al., 2006*). Καθένα από αυτά τα μοντέλα πρόβλεψης ενσωματώνουν διάφορες εργαστηριακές τιμές και χαρακτηριστικά του ασθενούς και παρόλο που παρουσιάζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, δεν παύουν να υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί, στους οποίους συγκαταλέγεται η συμμετοχή μικρού αριθμού ασθενών και η έλλειψη προοπτικών μελετών ώστε να αποδειχθεί η εγκυρότητα τους (*Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, Sanyal, et al., 2012*).

Πίνακας 1.5.4.1 :Στατιστική ανάλυση των διάφορων μοντέλων πρόβλεψης για τη NAFLD (Hassan et al., 2014; Machado & Cortez-Pinto, 2013)

	NFS	Fibrotest	FIB-4	ELF	BARD	NICE	NASH test	BAAT	Fibrometer	NAFLD Diagnostic Panel
AUROC	0.84	0.75-0.86	0.86	0.87	0.81	0.88	0.79	0.86	0.943	0.81
Sens (%)	82	77	85	89		84	33	14	79	93
Spec (%)	98	98	65	96		86	94	100	96	91
PPV (%)	90	90	36	80	43	44	66	100	88	58
NPV (%)	93	73	95	98	96	98	81	73	92	95

1.5.5 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Οι απεικονιστικές μέθοδοι διάγνωσης για τη NAFLD και τη NASH έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας που ενδιαφέρεται να εξακριβώσει αυτήν με τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα και τα πιο πολλά προτερήματα στην κλινική πράξη ώστε να αποφευχθεί η διενέργεια της βιοψίας ήπατος.

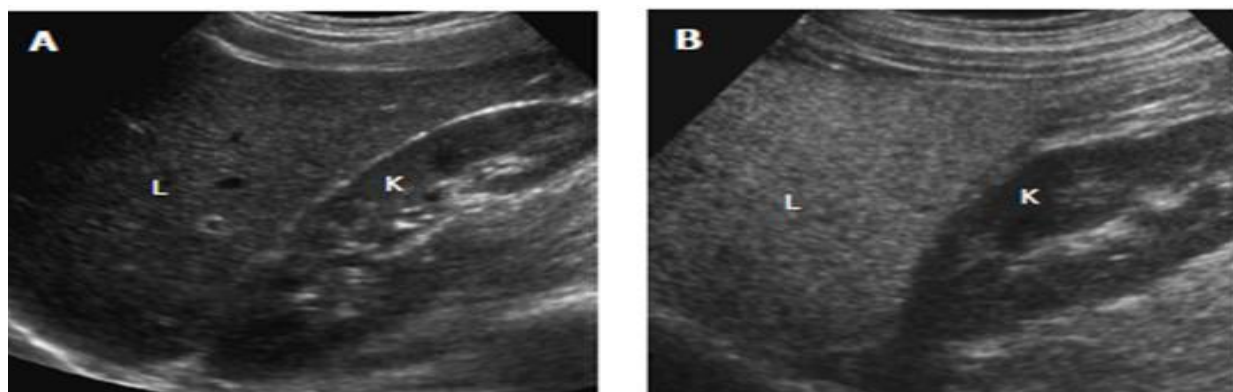
1.5.5.1 ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΗΜΑ

Η υπερηχογραφική αξιολόγηση (Ultrasound - US) της NAFLD έχει μεγάλο ενδιαφέρον ως μη επεμβατική μέθοδος για την αξιολόγηση και τη διάγνωση της NAFLD και της NASH. Κατά τον US παρατηρείται χαρακτηριστική αύξηση της ηπατικής ηχογένειας ("Bright Liver") (Cui et al., 2015; Lee & Park, 2014), η οποία οφείλεται στην ενδοκυτταρική συσσώρευση κενοτοπίων λίπους. Η αξιολόγηση της ηπατικής στεάτωσης περιλαμβάνει την ποιοτική οπτική εκτίμηση της ηπατικής ηχογένειας, μέτρηση της διαφοράς μεταξύ του ήπατος και του δεξιού νεφρού, εκτίμηση της ηχητικής διείσδυσης στο βαθύ τμήμα του ήπατος, και τον προσδιορισμό της σαφήνειας των τοιχωμάτων των ενδοηπατικών αγγείων (**Εικόνα 1.5.5.1.1**). Η σοβαρότητα της ηπατικής στεάτωσης ταξινομείται κλινικά με τη χρήση μίας κλίμακας τεσσάρων βαθμίδων, ως ακολούθως (Saadeh et al., 2002) :

- I. Βαθμός 0 - Φυσιολογική ηχογένεια
- II. Βαθμός 1 - Ήπια λιπώδης διήθηση, διάχυτη αύξηση της ηχογένειας στο ηπατικό παρέγχυμα με φυσιολογική απεικόνιση του διαφράγματος και των ενδοηπατικών αγγείων

- III. Βαθμός 2** - Μέτρια λιπώδης διήθηση, διάχυτη αύξηση της ηχογένειας στο ηπατικό παρέγχυμα με ελαφρά διαταραγμένη απεικόνιση των ενδοηπατικών αγγείων και του διαφράγματος
- IV. Βαθμός 3** - Σοβαρή λιπώδης διήθηση, σημαντική αύξηση της ηχογένειας με φτωχή ή μη απεικόνιση των ενδοηπατικών αγγείων, του διαφράγματος, και του οπισθίου δεξιού λοβού του ήπατος

Εικόνα 1.5.5.1.1 Υπερηχογραφική αξιολόγηση της ηπατικής στεάτωσης (Lee & Park, 2014)



A: Εικόνα φυσιολογικού ήπατος, η ηχογένεια του ηπατικού παρεγχύματος (L) και νεφρικού φλοιού είναι παρόμοια. **B:** Εικόνα λιπώδους ήπατος, με αυξημένη ηχογένεια του ήπατος (L) και σαφώς φωτεινότερο σε σχέση με το φλοιό του νεφρού (K). Τροποποιήθηκε από τους Lee SS και συνεργάτες.

Η διαγνωστική ακρίβεια του US ποικίλει, ανάλογα με τη βαρύτητα της στεάτωσης. Σε ασθενείς χωρίς συνυπάρχουσα ηπατική νόσο, ο US προσφέρει μια αρκετά ακριβής διάγνωση, ειδικά σε μέτρια έως σοβαρή ηπατική στεάτωση (που ιστολογικά αντιστοιχεί σε $\geq 30\%$ ή 33% ηπατοκυττάρων), όπου η ευαισθησία κυμαίνεται από $81,8\%$ έως $100,0\%$ και η ειδικότητα στο 98% . Αντίθετα, η διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου μειώνεται σε μεγάλο βαθμό επί παχυσαρκίας και όταν περιλαμβάνονται όλες οι βαθμίδες της ηπατικής στεάτωσης, ιδίως οι πιο χαμηλές (δηλαδή, από $\geq 3\%$ ή 5%), με ευαισθησία που κυμαίνεται από $53,3\%$ έως $66,6\%$ και ειδικότητα από $77,0\%$ έως $93,1\%$. (Lee & Park, 2014)

Στους περιορισμούς της μεθόδου περιλαμβάνονται η υποκειμενικότητα και η μεταβλητότητα της μέτρησης αναλόγως τον εξεταστή, καθιστώντας τη μέθοδο αυτή πολύ εξαρτώμενη από το χειριστή και την εμπειρία του (Schwenzer et al., 2009). Ένας άλλος περιορισμός της μεθόδου είναι η ποιοτική φύση του συστήματος ταξινόμησης. Αν και είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική απεικόνισης στην κλινική πράξη για την αξιολόγηση της ηπατικής στεάτωσης, λόγω χαμηλού κόστους, ευκολίας και απουσίας ανεπιθύμητων

παρενεργειών, εντούτοις αδυνατεί να αποδώσει ακόμα και τις πιο μικρές μεταβολές στη βαρύτητα της στεάτωσης στο follow-up. Έτσι, ο US μπορεί να αποτελεί ένα αποδεκτό εργαλείο στην πρώτη διαλογή για στεάτωση στην κλινική πρακτική (Ratziu et al., 2010) ωστόσο, είναι ανεπαρκής στην αξιολόγηση των ασθενών με NAFLD μετά από θεραπευτική παρέμβαση (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012; Lee & Park, 2014).

1.5.5.2 ΕΛΑΣΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η Ελαστογραφία (Fibroscan) είναι μία μη επεμβατική μέθοδος αξιολόγησης της ακαμψίας του ιστού του ήπατος και χρησιμοποιεί την τεχνολογία των υπερήχων για τη μέτρηση αυτής. Η απόδοση της εξέτασης αυξάνει όσο αυξάνει το ποσοστό ίνωσης στο ήπαρ (Yoneda et al., 2007). Η Ελαστογραφία έχει επικυρωθεί ως εργαλείο ελέγχου προχωρημένης ίνωσης στην NAFLD, με υψηλή προγνωστική αξία 97%, ωστόσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποκλειστεί η φλεγμονή του ήπατος (V. W. Wong et al., 2010). Επιφυλάξεις υπάρχουν για τη χρήση της ελαστογραφίας σε ασθενείς που έχουν > 33% στεάτωση και σε παχύσαρκους ασθενείς καθώς μειώνεται η ακρίβειά της (Gaia et al., 2011; G. L. Wong, 2013). Ο συνδυασμός της ελαστογραφίας με έναν ή περισσότερους βιοχημικούς δείκτες μπορεί να αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο για μη-διδεισδυτική μέτρηση της ίνωσης σε ασθενείς με NAFLD (Obika & Noguchi, 2012).

Ένα επιπλέον διαγνωστικό μέσο εκτίμησης της ηπατικής ακαμψίας είναι η MR ελαστογραφία (Magnetic Resonance Elastography – MRE) , η οποία χρησιμοποιεί την απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό για να καταγράψει διατμηματικά στο ήπαρ τις εικόνες διάδοσης των κυμάτων, παράγοντας ένα ελαστογράφημα υψηλής ανάλυσης που χαρτογραφεί τις τιμές ακαμψίας του ήπατος (Talwalkar et al., 2008). Η ευαισθησία της MRE μπορεί να διακρίνει με επιτυχία τους ασθενείς που πάσχουν από NAFLD με προχωρημένη ίνωση από αυτούς με ίνωση σταδίου 0-2 με AUROC 0,924, ευαισθησία 86% και εξειδίκευση 91%. Επιπλέον, μπορεί να έχει χαμηλότερο ποσοστό αποτυχίας σε παχύσαρκους ασθενείς σε σύγκριση με την ελαστογραφία εφόσον χρησιμοποιηθεί ο εξειδικευμένος εξοπλισμός από κατάρτισμένο χειριστή (Caldwell & Argo, 2010; Loomba et al., 2014).

1.5.5.3 ΑΞΟΝΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ

Η αξονική τομογραφία (CT) αποτελεί μία ακόμη μέθοδο για την εκτίμηση της παρουσίας και της ποσότητας της ηπατικής στεάτωσης. Η ευαισθησία της κυμαίνεται από 82% έως 95% και η εξειδίκευσή της πλησιάζει το 100% (Park et al., 2006; Wilkins et al., 2013). Στα θετικά της

μεθόδου είναι η ευρεία κλινική εφαρμογή της και η σχετική ακρίβειά της, ωστόσο η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της επηρεάζεται από υποβόσκουσα ηπατική νόσο, συγκριτικά με το US έχει μεγαλύτερο κόστος και εκθέτει τον ασθενή σε ιονίζουσα ακτινοβολία, για αυτό το λόγο δε συστήνεται να χρησιμοποιείται με αποκλειστικό σκοπό τη διάγνωση της ηπατικής στεάτωσης (Hassan et al., 2014).

1.5.5.4 ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ

Η απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό (MRI) μπορεί να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μικρό ποσοστό ηπατικής στεάτωσης, ακόμα και της τάξεως του 3% (Fishbein et al., 2005). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορά των συχνοτήτων συντονισμού μεταξύ των σημάτων των πρωτονίων νερού και λίπους (Reeder, Cruite, Hamilton, & Sirlin, 2011). Δηλαδή ο μαγνητικός συντονισμός ποσοτικοποιεί την ηπατική στεάτωση μετρώντας την πυκνότητα των πρωτονίων στο κλάσμα του λίπους (Proton Density Fat Fraction - PDFF) το οποίο είναι το κλάσμα των MRI-ορατών πρωτονίων που δεσμεύονται στο λίπος διαιρούμενο από όλα τα πρωτόνια στο ήπαρ (δεσμευμένα σε λίπος και νερό) (Dulai, Sirlin, & Loomba, 2016). Η MRI εμφανίζει ευαισθησία 76.7% - 90.0% και ειδικότητα 87.1% - 91.0% (Lee et al., 2010; van Werven et al., 2010).

Η MRI έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ευαίσθητη από τη βιοψία του ήπατος όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των αλλαγών του ηπατικού λίπους (Raptis et al., 2012; Urdzik et al., 2012) και μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για τη μη επεμβατική διάγνωση της NAFLD στους ενήλικες για ερευνητικούς σκοπούς (Idilman, Keskin, Elhan, Idilman, & Karcaaltincaba, 2014). Τα πλεονεκτήματα της έναντι των άλλων μεθόδων είναι τα εξής: η υψηλή ακρίβεια (μελετάται όλο το ηπατικό παρέγχυμα και όχι ένα δείγμα), η τεχνική ευκολία, η επαναληψιμότητα της μεθόδου, η απουσία ανεπιθύμητων παρενεργειών και επιπλοκών. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το υψηλό κόστος και το ότι δεν ενδείκνυται για ασθενείς με εμφυτεύματα και κλειστοφοβία (Koplay, Sivri, Erdogan, & Nayman, 2015; Lee & Park, 2014).

Η MRS είναι μία απεικονιστική μέθοδος ανίχνευσης της ηπατικής στεάτωσης με ευαισθησία και ειδικότητα 80.0% - 91.0% και 80.2% - 87.0% αντίστοιχα στις περισσότερες μελέτες (Willner et al., 2001) και ακρίβεια κοντά στο 100% (Meisamy et al., 2011). Η MRS μπορεί να μετρήσει τα σήματα των πρωτονίων άμεσα από τις ακυλικές ομάδες των αποθηκευμένων ηπατικών TG με αποτέλεσμα την ακρίβεια στη διάγνωση και την ποσοτικοποίηση της στεάτωσης (Szczepaniak et al., 2005). Με τη χρήση της MRS, οι κλινικοί

γιατροί είναι σε θέση να υπολογίσουν το κλάσμα του ήπατος που αποτελείται από λίπος. Το κλάσμα του λίπους θεωρείται μη φυσιολογικό όταν παίρνει τιμές μεγαλύτερες από 5,56% (*Meisamy et al., 2011*). Η MRS έχει υψηλό κόστος, εκθέτει τους ασθενείς σε ακτινοβολία (αν και χαμηλότερη από την CT), η εφαρμογή της απαιτεί εμπειρογγνωμοσύνη και είναι χρονοβόρα και περίπλοκη με αποτέλεσμα η χρησιμότητά της να είναι μικρότερη συγκριτικά με την MRI (*Koplay et al., 2015*).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι και οι δύο μέθοδοι έχουν καλύτερη διαγνωστική αξία συγκριτικά με την υπερηχογραφία και την αξονική τομογραφία και ότι δύνανται να διακρίνουν αποτελεσματικά την απλή στεάτωση από τη στεατοηπατίτιδα (*Koplay et al., 2015*).

1.5.6 ΒΙΟΨΙΑ ΗΠΑΤΟΣ

Η βιοψία ήπατος παραμένει η μέθοδος αναφοράς (gold standard) για τη διάγνωση και τον προσδιορισμό της στεάτωσης, το βαθμό της φλεγμονής και το στάδιο της ίνωσης. Αποτελεί το μοναδικό έλεγχο που μπορεί να διακρίνει την NASH από την NAFL μέσω της ιστολογικής εξέτασης του ήπατος (*Wilkins et al., 2013*). Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Γαστρεντερολογική Ένωση (American Gastroenterological Association - AGA) η βιοψία ήπατος συστήνεται μόνο σε ασθενείς με NAFLD που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για NASH και μεγάλο βαθμό ίνωσης. Αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές υποδηλώνουν ότι η παρουσία μεταβολικού συνδρόμου και το NAFLD fibrosis score χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό αυτών των ασθενών υψηλού κινδύνου (*Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012*). Παρόλα αυτά υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση της μεθόδου συμπεριλαμβανομένου του κόστους, του σφάλματος της δειγματοληψίας και της διακύμανσης του εξεταστή. Δεδομένου ότι λαμβάνεται δείγμα από το 0.00002% του ήπατος εκτιμάται ότι το 24% των περιπτώσεων με NASH διαφεύγει της διάγνωσης και στο 22%-37% αξιολόγησης του σταδίου της ίνωσης ταξινομείται εσφαλμένα (*Janiec, Jacobson, Freeth, Spaulding, & Blaszyk, 2005; Ratziu et al., 2005*). Επιπλέον, παρόλο που γενικά θεωρείται μία ασφαλής μέθοδος ενέχει ο κίνδυνος επιπλοκών στο 1-3% και του θανάτου στο 0.01% (*Bravo, Sheth, & Chopra, 2001*).

Συμπερασματικά, σημαντική θα ήταν η ανάπτυξη μη επεμβατικών δεικτών που θα στοχεύουν: (i) σε χώρους πρωτοβάθμιας υγείας ώστε να προσδιορίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της NAFLD σε άτομα με αυξημένο μεταβολικό κίνδυνο, (ii) σε δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια υγεία ώστε να εντοπίζουν άτομα με κακή πρόγνωση, π.χ. σοβαρή NASH (iii) να παρακολουθούν την εξέλιξη της νόσου (iv) να προβλέπουν την ανταπόκριση στις θεραπευτικές

παρεμβάσεις. Η επίτευξη αυτών των στόχων θα μπορούσε να μειώσει την ανάγκη για ηπατική βιοψία ((EASL), (EASD), & (EASO), 2016a).

1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD

Η διαχείριση της NAFLD έχει αναχθεί σε πρόκληση για τα συστήματα υγείας παγκοσμίως αφού ο επιπολασμός της συνεχώς αυξάνει. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις θα πρέπει να στοχεύουν είτε στην πρόληψη είτε στην αντιστροφή της ηπατικής βλάβης και της ίνωσης. Λίγες είναι οι διαθέσιμες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες που είναι κατάλληλα σχεδιασμένες και έχουν δείξει βελτίωση της νεκροφλεγμονής και της ίνωσης, επομένως πρωταρχικής σημασίας παραμένει η διαχείριση των συνοδών νοσημάτων. Διάφορες θεραπευτικές παρεμβάσεις έχουν προταθεί στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η υιοθέτηση υγιεινών συνηθειών και η απώλεια βάρους όπου απαιτείται, καθώς και ο αυστηρός έλεγχος των μεταβολικών παραγόντων κινδύνου κυρίως μέσω της συμβολής της φαρμακευτικής αγωγής.

1.6.1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

Η φαρμακοθεραπεία θα πρέπει να στοχεύει στην αναστολή της εξέλιξης της NASH (γεφύρωση της ίνωσης και της κίρρωσης) αλλά και σε ασθενείς σε πρώιμο στάδιο της NASH με αυξημένο κίνδυνο προοδευτικής ίνωσης (άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών, ΣΔΤ 2, MetS, αυξημένες τιμές ALT (Adams *et al.*, 2005) ή σε ασθενείς με ενεργή NASH και υψηλή νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα (Sanyal *et al.*, 2015). Μέχρι σήμερα, κανένα φάρμακο δεν έχει ελεγχθεί σε κλινικές δοκιμές φάσης III και έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της NASH από τους αρμόδιους οργανισμούς. Ως εκ τούτου, καμία συγκεκριμένη θεραπεία δεν μπορεί να συνιστάται σταθερά για τη νόσο και οποιαδήποτε φαρμακευτικό σκεύασμα δε μπορεί να αναγράφει ότι τη θεραπεύει (Mazzella, Ricciardi, Mazzotti, & Marchesini, 2014; Ratzliff, Goodman, & Sanyal, 2015; Yoonossi, Reyes, Mishra, Mehta, & Henry, 2014). Η ασφάλεια και η ανεκτικότητα των φαρμάκων είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για τη θεραπευτική τους χρήση, εξαιτίας όμως των συνοδών νοσημάτων που σχετίζονται με τη NASH και την επακόλουθη πολυφαρμακία, ελλοχεύει ο κίνδυνος αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την ανάπτυξη ενός θεραπευτικού σκευάσματος και στρέφει τη φαρμακευτική θεραπευτική προσέγγιση να στοχεύει στον έλεγχο των παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη της NASH ((EASL), (EASD), & (EASO), 2016b).

Τρεις ανασκοπήσεις του Cochrane βρήκαν ανεπαρκή τα στοιχεία που υποστηρίζουν τη χρήση χολικών οξέων (π.χ. ουρσοδεοξυχολικό οξύ), τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα, τη μετφορμίνη (Glucophage), ή τις θειαζολιδινεδιόνες σε ασθενείς με NAFLD χωρίς διαβήτη (*Angelico, Burattin, Alessandri, Del Ben, & Lirussi, 2007; Lirussi, Azzalini, Orlando, Orlando, & Angelico, 2007; Orlando, Azzalini, Orlando, & Lirussi, 2007*). Μια άλλη μετα-ανάλυση από 49 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες βρήκε τις θειαζολιδινεδιόνες (ιδιαίτερα τη πιογλιταζόνη [Actos]) να βελτιώνουν τη στεάτωση και τη φλεγμονή, αλλά συσχετίστηκαν με αύξηση βάρους 2 έως 5 κιλών στο 66% έως 75% των ασθενών και με οίδημα στο 4% έως 10% των ασθενών (*Musso, Gambino, Cassader, & Pagano, 2010*). Αυτή η μετα-ανάλυση βρήκε επίσης αντιφατικά και ετερογενή αποτελέσματα για τη χρήση της μετφορμίνης, της σιμβαστατίνης (Zocor), των αντιοξειδωτικών, της πεντοξυφυλλίνης (Trental), της τελμισαρτάνης (Micardis) και της L-καρνιτίνης (*Musso et al., 2010*). Μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή 247 ενηλίκων χωρίς διαβήτη και με NASH επιβεβαιωμένη από βιοψία ήπατος, βρήκε βελτίωση στα επίπεδα της AST και της ALT με τη χρήση της βιταμίνης E σε δόση 800 IU και της πιογλιταζόνης, αλλά χωρίς βελτίωση στα επίπεδα της ίνωσης (*Sanyal et al., 2010*). Οι Φιμπράτες, οι στατίνες και τα ω-3 λιπαρά οξέα επιφέρουν μέτρια βελτίωση στα επίπεδα της AST, αλλά δεν υπερτερούν έναντι της απώλειας βάρους και της αύξησης της σωματικής δραστηριότητας (*Loria et al., 2010*). Μια συστηματική ανασκόπηση δύο τυχαιοποιημένων μελετών και τεσσάρων προοπτικών μελετών κοορτής διαπίστωσαν ότι η πεντοξυφυλλίνη μείωσε τα επίπεδα AST και ALT, παρόλο που η μελέτη δεν εξέτασε τη βελτίωση της νοσηρότητας του ασθενούς ή της θνησιμότητας (*Li et al., 2011*).

Πίνακας 1.6.1.1: Επιλογές θεραπείας για τη NAFLD (Wilkins et al., 2013)

ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	ΗΠΑΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΗΠΑΤΟΣ	ΣΧΟΛΙΑ
Αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης	Βελτίωση	Βελτίωση	Μετά-ανάλυση μίας RCT, περιορισμένη χρήση σε ασθενείς με NAFLD και υπέρταση
Αντιοξειδωτικά συμπληρώματα	Ασυνεπή δεδομένα	Ασυνεπή δεδομένα	Συστηματική ανασκόπηση, μετα-ανάλυση και 1 RCT
Βαριατρική χειρουργική	-	-	Συστηματική ανασκόπηση
Άσκηση	Ασυνεπή δεδομένα	Βελτίωση	Μετά-ανάλυση
Φιμπράτες	Βελτίωση	Μη αποτελεσματική	Μετά-ανάλυση από 1 RCT
L-καρνιτίνη	Βελτίωση	Μη αποτελεσματική	Μετά-ανάλυση από 1 RCT
Μετφορμίνη	Βελτίωση	Ασυνεπή δεδομένα	Μετά-ανάλυση από 6 RCT
Ω-3 λιπαρά οξέα	Βελτίωση	Καμία επίδραση	Λίγα δεδομένα αποτελεσματικότητας
Ορλιστάτη	Βελτίωση	Βελτίωση	Μετά-ανάλυση
Πεντοξυφυλλίνη	Βελτίωση	Ασυνεπή δεδομένα	Μετά-ανάλυση και συστηματική ανασκόπηση
Συμβαστατίνη	Βελτίωση	Ασυνεπή δεδομένα	Μετά-ανάλυση
Θειαζολιδινεδιόνες	Βελτίωση	Ασυνεπή δεδομένα	Μετά-ανάλυση από 9 RCTs που σχετίζονται με την πρόσληψη βάρους
Ουρσοδεοξυχολικό οξύ	Βελτίωση	Ασυνεπή δεδομένα	Μετά-ανάλυση από 6 RCTs
Απώλεια βάρους	Βελτίωση	Βελτίωση	Μετά-ανάλυση

RCT = Randomized Controlled Trial - Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή

1.6.2 ΔΙΑΤΡΟΦΗ

1.6.2.1 ΜΑΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Η προτεινόμενη διατροφική σύσταση σε ασθενείς με NAFLD παραμένει υπό διερεύνηση. Η πρόσληψη πρωτεϊνών πρέπει να προσαρμόζεται στο σωματικό βάρος και την ιατρική κατάσταση του κάθε ατόμου. Σε υγιείς ενήλικες η πρωτεϊνική πρόσληψη πρέπει να καλύπτει το 16-17% των ημερήσιων ενεργειακών αναγκών τους (Bates, Lennox, Prentice, Bates, & Swan, 2012), ενώ σε ασθενείς με ηπατίτιδα εκτιμάται ότι απαιτείται κατ' ελάχιστο 1.0 έως 1.2 γρ./κιλό/ημέρα και σε όσους έχουν κίρρωση μπορεί να φτάνουν μέχρι 1.5 γρ./κιλό/ημέρα. Οι κατευθυντήριες γραμμές της Αμερικάνικης Ένωσης Ηπατικών Παθήσεων (American Association of the Liver Diseases – AASLD) συστήνουν η πρωτεϊνική πρόσληψη σε ασθενείς με NAFLD να είναι παρόμοια με του γενικού πληθυσμού, με βάση τις συνιστώμενες ημερήσιες προσλήψεις (Recommended Daily Allowances - RDA) και τις διαιτητικές προσλήψεις αναφοράς (Dietary References Intake - DRI) (Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012).

Σύμφωνα με τις διατροφικές συστάσεις για ασθενείς με NAFLD, οι υδατάνθρακες θα πρέπει να αποτελούν το 40 - 50% των ημερήσιων θερμιδικών αναγκών, και μόλις το 10% αυτών να προέρχεται από απλούς υδατάνθρακες. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες μπορεί να επιδεινώσει τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με NAFLD (*Ueno et al., 1997*). Αντιθέτως, οι παρεμβάσεις με δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες φαίνεται να υπερτερεί έναντι της απλής υποθερμιδικής διαίτας αλλά και έναντι της διαίτας ίσου θερμιδικού περιεχομένου αλλά με μεγαλύτερο ποσοστό υδατανθράκων (*Browning et al., 2011*), ωστόσο συγκρίνοντάς τις με υποθερμιδική δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά έπειτα από εξάμηνη παρέμβαση φαίνεται να μην υπάρχει θετική επίδραση στα ενδοηπατικά TG αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διαιτών (*Haufe et al., 2011*). Το χαμηλό ποσοστό πρόσληψης υδατανθράκων (40%) έχει δείξει, επίσης, και χαμηλότερα επίπεδα της ALT (*Ryan, Abbasi, Lamendola, Carter, & McLaughlin, 2007*).

Σε μία μελέτη αξιολογήθηκε η κατανάλωση τροφίμων υψηλού γλυκαιμικού δείκτη σε 247 υγιείς ενήλικες και κατέδειξε ότι η αυξημένη κατανάλωση τροφίμων υψηλού γλυκαιμικού δείκτη αυξάνει το βαθμό ηπατικής στεάτωσης (*Valtueña et al., 2006*). Επιπλέον η σύγκριση κατανάλωσης προϊόντων ολικής αλέσεως με την κατανάλωση επεξεργασμένων υδατανθράκων συνδέεται με μείωση του κοιλιακού λίπους (*Katcher et al., 2008; Maki et al., 2010; McKeown et al., 2009*) κάτι που για τους ασθενείς με NAFLD είναι ευεργετικό και θα μπορούσε να υποστηρίξει τη σύσταση για χρήση προϊόντων ολικής άλεσης ως πηγή υδατανθράκων κατά τη διάρκεια μιας υποθερμιδικής διαίτας. Τέλος, οι συστάσεις προτείνουν αποφυγή των ροφημάτων και των τροφίμων υψηλών σε φρουκτόζη (*EASL et al., 2016a*) αφού σε αρκετές μελέτες έχει συσχετισθεί και η φρουκτόζη με τη NAFLD (*Nseir, Nassar, & Assy, 2010*), αλλά σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, η σχέση μεταξύ πρόσληψης φρουκτόζης ή σακχαρόζης και της NASH φαίνεται να συγχέεται από την υπερβολική κατανάλωση ενέργειας (*Chung et al., 2014*).

Η πρόσληψη λίπους πρέπει να συνιστά λιγότερο από το 30% της ημερήσιας θερμιδικής πρόσληψης σε ασθενείς με NAFLD. Σε μια μελέτη των Yamamoto M et al. φάνηκε ότι η μειωμένη κατανάλωση λιπαρών για 6 μήνες προκαλεί μείωση των ηπατικών ενζύμων (*Yamamoto et al., 2007*). Σε μία ανασκόπηση βρέθηκαν στοιχεία που υποστηρίζουν την αρνητική επίδραση τόσο της αυξημένης κατανάλωσης SFA (>10%) όσο και της χαμηλής (<6%) και προτείνει ότι ένα εύρος SFA μεταξύ 6% και 10% ίσως είναι πιο ευεργετικό σε ασθενείς με

NAFLD, με ταυτόχρονη πρόσληψη MUFA έως 25% και αυξημένη πρόσληψη ω-3 PUFA (McCarthy & Rinella, 2012).

Απαραίτητη κρίνεται η αύξηση της κατανάλωσης προϊόντων διατροφής πλούσιων σε MUFA και PUFA καθώς μειώνουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν στη βελτίωση της κλινικής εικόνας της NAFLD. Η αύξηση της πρόσληψης MUFAs και η μείωση της ποσότητας των SFAs και των υδατανθράκων στη δίαιτα μπορεί να είναι επωφέλης για τους ασθενείς με NAFLD (Assy, Nassar, Nasser, & Grosowski, 2009). Μια δίαιτα με MUFA πάνω από το 40% της ενέργειας από λιπαρά συσχετίστηκε με μειωμένη VLDL-C και TG και ήταν πιο αποδεκτή στους ασθενείς με ΣΔΤ 2 από μια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (Sofi & Casini, 2014). Η χορήγηση συμπληρώματος ω-3 λιπαρών οξέων, στην ποσότητα των 2 γρ./ημέρα για 6 μήνες, έδειξε μείωση του επιπέδου της ηπατικής στεάτωσης καθώς και της δραστηριότητας της ALT στον ορό και των επιπέδων των TG στον ορό (Spadaro et al., 2008). Ο Hatzitolios A. et al. κατέδειξε μείωση των επιπέδων των τρανσαμινασών και εξομάλυνση των υπερηχογραφικών ενδείξεων της ηπατικής στεάτωσης μετά από εξάμηνη θεραπεία με ωμέγα-3 λιπαρά οξέα (15 ml/ημέρα) σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία και απουσία στεάτωσης στο 35% των ασθενών (Hatzitolios et al., 2004). Η μακροχρόνια κατανάλωση ελαιολάδου εμπλουτισμένου με ω-3 PUFAs έχει φανεί ότι οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας των ηπατικών ενζύμων και των επιπέδων των TG (Sofi et al., 2010). Τα ω-3 PUFAs από seal oil έχει αναφερθεί ότι είναι ασφαλή και αποτελεσματικά σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς με NAFLD, καθώς κανονικοποιούν τη δραστηριότητα της ALT στον ορό και την ηπατική στεάτωση (Zhu, Liu, Chen, Huang, & Zhang, 2008). Η διαιτητική πρόσληψη εικοσαπενταενοϊκού οξέος (eicosapentaenoic acid, EPA) και δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (docosahexaenoic acid, DHA) μαζί έχει συσχετισθεί αρνητικά με την παρουσία της NAFLD στους άνδρες (Oya et al., 2010). Το EPA έχει δείξει ότι βελτιώνει τη NASH, πιθανώς, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του (Tanaka et al., 2008).

1.6.2.2 ΜΙΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Η βιταμίνης E λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης έχει μελετηθεί ως θεραπεία της NASH, αφού αναστέλλει τον μηχανισμό του οξειδωτικού στρες που προάγει την ηπατοκυτταρική βλάβη, και βελτιώνει τη στεάτωση, τη φλεγμονή και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών. Η χορήγησή της δε φαίνεται να επιδρά στην ίνωση. Σε μία μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων δοκιμών που αξιολογήθηκαν διαφορετικές δόσεις βιταμίνης E σε

άτομα με ηπατική νόσο συμπέραναν ότι η συμπληρωματική χορήγησή της μπορεί να βελτιώσει τα επίπεδα AST και ALT σε περιπτώσεις NASH, χρόνιας ηπατίτιδας C, αλλά όχι στη NAFLD (*Ji, Sun, & Shen, 2014*). Η AGA, ωστόσο, προτείνει τη χρήση 800 IU/ημέρα βιταμίνης E σε μη διαβητικούς ασθενείς με NASH ώστε να βελτιώσουν την ιστολογική κατάσταση του ήπατος τους και να αποτρέψουν την εξέλιξη της νόσου, ωστόσο η χορήγησή της δε συνίσταται σε διαβητικούς ασθενείς με NASH, με κρυπτογενή ή κίρρωση σχετιζόμενη με τη NASH, ή με NAFLD (*Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, & Sanyal, 2012*).

Τα πρεβιοτικά είναι μη ζυμώσιμοι υδατάνθρακες που διεγείρουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ορισμένων ειδών βακτηρίων στο παχύ έντερο, με ευεργετική δράση, των προβιοτικών, δηλαδή ζωντανών μικροοργανισμών που είναι κυρίως γαλακτοβάκιλλοι και μπιφιντοβακτήρια. Δεδομένης της σχέσης μεταξύ εντερικής μικροχλωρίδας και της NAFLD, και από τα δεδομένα μίας μετα- ανάλυσης, είναι αρκετά ελπιδοφόρα ως προς τη χρήση τους για τη θεραπεία της ηπατικής στεάτωσης, της βελτίωσης των αμινοτρανσφερασών, της TC και της IR (*Ma et al., 2013*). Τα προ- και πρεβιοτικά φαίνεται ότι ασκούν πολλές άμεσες και έμμεσες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων στην τοπική μικροχλωρίδα, βελτιώσεις του φραγμού των επιθηλιακών κυττάρων και μείωση της προκαλούμενης από το έντερο φλεγμονής (*Iacono, Raso, Canani, Calignano, & Meli, 2011*). Μια συστηματική ανασκόπηση σε τυχαιοποιημένες δοκιμές που αξιολόγησε τα αποτελέσματα των προβιοτικών, πρεβιοτικών ή και των δύο, σε διαφορετικές δόσεις, για τη θεραπεία της NAFLD σε ενήλικες κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν επαρκή και αξιόπιστα δεδομένα για να υποστηρίξουν τη σύστασή τους ως εναλλακτική θεραπεία της NAFLD (*Buss, Valle-Tovo, Miozzo, & Alves de Mattos, 2014*).

1.6.3 ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Η φυσική δραστηριότητα συνδέεται με τη βελτίωση μιας σειράς παθολογικών καταστάσεων που συνυπάρχουν με τη NAFLD και συμμετέχουν στην παθογένειά της. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι διαταραγμένες τιμές της γλυκόζης, η IR, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, η υπερλιπιδαιμία, η υπέρταση και το μεταβολικό σύνδρομο. Τα οφέλη της φυσικής δραστηριότητας στη NAFLD πρέπει να αξιολογούνται αντικειμενικά και να συνίσταται σε όλους τους ασθενείς (*Krasnoff, Painter, Wallace, Bass, & Merriman, 2008; Ueno et al., 1997*). Μια πρόσφατη μελέτη και μια μετα-ανάλυση προτείνουν ότι η αερόβια άσκηση υπερτερεί των ασκήσεων αντοχής, παρόλο που ο ανεξάρτητος ρόλος της τακτικής φυσικής δραστηριότητας

έχει αξιολογηθεί μόνο σε λίγες μελέτες και βέλτιστο σχήμα άσκησης δεν έχει καθοριστεί ακόμα (*Ismail, Keating, Baker, & Johnson, 2012; Johnson et al., 2009*). Προτείνονται, λοιπόν, τριάντα λεπτά μέτριας έως έντονης αερόβιας άσκησης (π.χ. διάδρομος, ελλειπτικό, ποδήλατο ή κολύμβηση) 3 έως 5 φορές την εβδομάδα, με επιφυλάξεις όμως στα άτομα με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο (*Méndez-Sánchez, Arrese, Zamora-Valdés, & Uribe, 2007*). Σε μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση 12 μελετών τονίστηκε ότι οι παρεμβάσεις άσκησης γίνονται σε μικρά δείγματα, μειώνοντας την ισχύ των αποτελεσμάτων για τα κλινικά οφέλη της στο ήπαρ. Παρόλα αυτά, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η επίδραση της άσκησης έχει θεραπευτική αξία για την ηπατική στεάτωση, ωστόσο το όφελός της στις τιμές της ALT είναι ασαφές (*Keating, Hackett, George, & Johnson, 2012*). Η θετική επίδραση της άσκησης είναι εμφανής ακόμη και αν υπάρχει ελάχιστη ή και καθόλου απώλεια βάρους, ακόμα και για επίπεδα άσκησης κάτω από τις τρέχουσες συστάσεις για τη διαχείριση της παχυσαρκίας (*Chan et al., 2007; Devries, Samjoo, Hamadeh, & Tarnopolsky, 2008; Johnson et al., 2009; St George et al., 2009; R. T. Wang, Koretz, & Yee, 2003*).

1.6.4 ΑΠΩΛΕΙΑ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

Η απώλεια βάρους αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για τη θεραπεία της NAFLD. Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών, παρατηρήθηκε ότι απώλεια βάρους τουλάχιστον 7% του συνολικού σωματικού βάρους είναι αποτελεσματική στην ιστολογική βελτίωση της νόσου, αν και η απώλεια αυτή επιτεύχθηκε σε λιγότερους από το 50% των ασθενών (*Musso, Cassader, Rosina, & Gambino, 2012*). Μεγαλύτερη απώλεια βάρους (έως και 10%) φαίνεται να συνδέεται και με μείωση της νεκρο-φλεγμονής (*Chalasani, Younossi, Lavine, Diehl, Brunt, Cusi, Charlton, Sanyal, et al., 2012*). Ωστόσο συστήνεται η απώλεια βάρους να είναι σταδιακή και ελεγχόμενη (0.5 – 1 κιλό/εβδομάδα) γιατί απότομες αλλαγές του βάρους (>1.6 κιλό/εβδομάδα) έχουν συσχετισθεί με πυλαία φλεγμονή, προοδευτική ίνωση (*Andersen, Gluud, Franzmann, & Christoffersen, 1991*), εκθετική αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης χολολιθίασης (*Weinsier, Wilson, & Lee, 1995*) και σε περιπτώσεις δίαιτας πολύ χαμηλής σε θερμίδες (388 θερμίδες/ημέρα) ενεργοποιείται το σύστημα φλεγμονής και αυξάνονται τα επίπεδα της χολερυθρίνης στον ορό (*Adams & Angulo, 2006*). Αύτη η σύσταση θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ώστε να προλαμβάνονται ακραίες μειώσεις του βάρους που μπορεί να οδηγήσουν μέχρι και σε ηπατική ανεπάρκεια και επομένως σε επιδείνωση της NAFLD (*Gasteyger, Larsen, Vercruysse, & Astrup, 2008*).

Πίνακας 1.6.4.1: Προτεινόμενες τροποποιήσεις στη διαίτα και τη φυσική δραστηριότητα στα άτομα με NAFLD ή NASH ("EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease," 2016)

ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ • 500-1000 kcal ενεργειακό έλλειμμα για απώλεια 500-1000 γρ./εβδομάδα • Στόχος 7-10% απώλεια του αρχικού σωματικού βάρους • Μακροχρόνια διατήρηση συνδυάζοντας τη φυσική δραστηριότητα σύμφωνα με τις αρχές της γνωσιακής συμπεριφορικής θεραπείας.	Ο θερμιδικός περιορισμός καθοδηγεί την απώλεια βάρους και τη μείωση του λίπους στο ήπαρ, ανεξάρτητα από τη μακροθρεπτική σύσταση της διατροφής (Boden, 2009). Μία 12μηνη εντατική παρέμβαση του τρόπου ζωής με μέσο όρο απώλειας 8%, οδηγεί σε σημαντική μείωση της ηπατικής στεάτωσης (Lazo et al., 2010). Το λίπος στο ήπαρ αυξάνεται με την επαναπρόσληψη του βάρους, αλλά οι περισσότερες από τις ευεργετικές μεταβολικές επιδράσεις διατηρούνται και η εξέλιξη σε ΣΔ2 καθυστερεί (Perreault et al., 2012).
ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΑΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ • Μέτρια προς χαμηλή πρόσληψη λίπους & μέτρια προς υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων • Δίαιτες χαμηλών υδατανθράκων κετογονικές ή υψηλής πρωτεΐνης	Προσκόλληση στη Μεσογειακή Διατροφή έχει αναφερθεί ότι μειώνει το λίπος στο ήπαρ, συγκρινόμενη με μία διαίτα χαμηλή σε λίπος/ υψηλή υδατανθράκων σε cross-over σύγκριση (Ryan et al., 2013; Thoma, Day, & Trenell, 2012).
ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗΣ • Αποφυγή ροφημάτων και τροφίμων υψηλών σε φρουκτόζη	Στο γενικό πληθυσμό, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης φρουκτόζης και NAFLD (Barrera & George, 2014).
ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΑΛΚΟΟΛ • Αυστηρά κάτω από την συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (30g/άνδρες, 20g/γυναίκες)	Σε επιδημιολογικές μελέτες, μέτρια πρόσληψη αλκοόλ (κυρίως κρασί) σχετίζεται με χαμηλότερο επιπολασμό της NAFLD, NASH και μικρότερη ίνωση ιστολογικά (Dunn et al., 2012; Kwon, Greenon, & Conjeevaram, 2014; Liangpunsakul & Chalasani, 2012). Η αποχή είναι υποχρεωτική στην κίρρωση για την μείωση του κινδύνου ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Ascha et al., 2010).

ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΚΑΦΕ	Δεν υπάρχουν περιορισμοί όσον αφορά το ήπαρ	Προστατευτικός στη NAFLD, μειώνοντας την ιστολογική σοβαρότητα (<i>Saab, Mallam, Cox, & Tong, 2014</i>).
ΆΣΚΗΣΗ/ ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	150-200 λεπτά/εβδ. μέτριας έντασης αεροβική 3-5φ/ εβδομ. Ασκήσεις αντιστάσεων: προωθούν την μυοσκελετική υγεία, με επίδραση στους μεταβολικούς παράγοντες κινδύνου Καθιστική ζωή- προωθεί την κόπωση και την υπνηλία μέσα στην ημέρα, μειώνει την προσκόλληση στην άσκηση	Δοσοεξαρτώμενη σχέση άσκησης – οφέλους (<i>Bacchi et al., 2013; Keating et al., 2012; Thoma et al., 2012</i>) Κάθε ενασχόληση με φυσική δραστηριότητα ή αύξηση προηγούμενου επιπέδου είναι προτιμότερη από την συνεχόμενη καθιστική συμπεριφορά.

1.6.5 ΒΑΡΙΑΤΡΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ

Η NAFLD/NASH δεν συνιστά σε καμία περίπτωση κριτήριο για την πραγματοποίηση ενός βαριατρικού χειρουργείου, αλλά σε αυτούς που πληρούν τα κριτήρια για την πραγματοποίηση ενός τέτοιου χειρουργείου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μία εναλλακτική θεραπεία (*Hafeez & Ahmed, 2013*). Τα οφέλη της έγκεινται στη μείωση του βάρους και των μεταβολικών επιπλοκών που φαίνονται να είναι μακροπρόθεσμα. Ελέγχοντας τους αντιπροσωπευτικούς δείκτες που σχετίζονται με την ηπατική βλάβη στη NAFLD υποδεικνύεται ότι η βαριατρική χειρουργική είναι αποτελεσματική και ότι υπάρχουν ενδείξεις βελτίωσης της νεκροφλεγμονής και της ίνωσης (*Caiazzo et al., 2014*). Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από μία πρόσφατη προοπτική μελέτη με μονοετή παρακολούθηση που έδειξε ότι η απώλεια βάρους από βαριατρική χειρουργική επέμβαση απάλλαξε το 85% των ασθενών από τη NASH και βελτίωσε την ίνωση στο 34% (*Lassailly et al., 2015*). Τα πιθανά οφέλη της βαριατρικής χειρουργικής θα πρέπει να αντισταθμίζονται και με τις περι-/μετεγχειρητικές επιπλοκές. Επιπλέον δεν διατίθενται συμπεράσματα σχετικά με τις συγκριτικές επιδράσεις των διαφόρων ειδών βαριατρικών επεμβάσεων και την επίδραση τους στην ηπατική στεάτωση (*EASL et al., 2016a*). Τέλος, οι βαριατρικές επεμβάσεις θα πρέπει να αποφεύγονται σε άτομα με προχωρημένη κίρρωση και πυλαία πίεση γιατί η απότομη απώλεια βάρους αυξάνει τον κίνδυνο ηπατικής ανεπάρκειας (*D'Albuquerque et al., 2008*).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία αποτελεί μέρος μίας προοπτικής μελέτης που ακόμα δεν έχει ολοκληρωθεί. Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η παρουσίαση των περιγραφικών χαρακτηριστικών των εθελοντών με βάση τη λιπώδη διήθηση του ήπατος στις δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, η διερεύνηση των μεταβολών σε δείκτες υγείας των εθελοντών, σε ανθρωπομετρικές μετρήσεις και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή, η φυσική δραστηριότητα, το κάπνισμα, το βιοτικό επίπεδο και η επίδραση αυτών των παραμέτρων αλλά και του γονότυπου στην εξέλιξη της νόσου και της υγείας τους.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί προοπτική μελέτη της μελέτης με τίτλο «NAFLD - Μη Αλκοολική Λιπώδης Διήθηση Ήπατος» που είναι μια επιδημιολογική μελέτη ασθενών - μαρτύρων η οποία ξεκίνησε το Μάιο του 2012 και ολοκληρώθηκε τον Δεκέμβριο του 2014, και είχε ως στόχο τη διερεύνηση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

3.1 ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η στρατολόγηση των εθελοντών (n=404) πραγματοποιήθηκε έπειτα από επίσκεψη τους στα εξωτερικά ιατρεία του ηπατολογικού και της παχυσαρκίας του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο). Ο επανέλεγχος τους πραγματοποιήθηκε από τον Δεκέμβριο του 2016 έως και τον Ιούνιο του 2017 στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο) έπειτα από τηλεφωνική επικοινωνία κατά την οποία ερωτιόνταν για αλλαγές στην υγεία τους ή στη φαρμακευτική αγωγή τους, αλλαγές στην πρόσληψη του αλκοόλ ενώ στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας γίνονταν επιπλέον οι ερωτήσεις αν είναι εγκυμονούσες ή θηλάζουσες. Ενημερώνονταν ότι έχουν τη δυνατότητα να ξανασυμμετάσχουν στη μελέτη ώστε να επαναξιολογηθεί η κατάσταση της υγείας τους πραγματοποιώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία με αυτή του πρώτου μέρους της μελέτης. Εφόσον ήταν σύμφωνοι προγραμματίζονταν το ραντεβού και την προηγούμενη ημέρα τηλεφωνικά τους δίνονταν περαιτέρω διευκρινιστικές οδηγίες.

Συνολικά τηλεφωνική επικοινωνία έγινε με το 50.2% (n=203) των εθελοντών. Το ποσοστό συμμετοχής του follow up έφτασε το 28.9% (n=117). Από τους εθελοντές που συμμετείχαν το 36.5% ήταν άντρες (51.8 ± 9.9) και το 63.5% γυναίκες (55.1 ± 10.8). Το 10.9% αρνήθηκε να συμμετάσχει ξανά, ενώ το 10.4% ναι μεν ήταν πρόθυμο να συμμετάσχει αλλά λόγω προσωπικών κωλυμάτων που συνέτρεχαν τη δεδομένη χρονική περίοδο δεν κατάφερε να προγραμματίσει το ραντεβού.

3.1.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Οι εθελοντές για να ενταχθούν στη μελέτη έπρεπε να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια:

- ✓ Η ηλικία τους να κυμαίνεται μεταξύ 18-65 ετών
- ✓ Η τρέχουσα ή συστηματική κατανάλωση αλκοόλ να μην είναι μεγαλύτερη από 20 γρ./ημέρα για τις γυναίκες και μεγαλύτερη από 30 γρ./ημέρα για τους άντρες.

✓ Να μην έχουν διαγνωσθεί με κάποια από τις παρακάτω νόσους:

- Ηπατίτιδα Β ή C
- Αυτοάνοση ηπατική νόσο
- Ασθένεια Wilson
- Αιμοχρωμάτωση
- Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Οι εθελοντές κατά την προσέλευσή τους δήλωναν την ενυπόγραφη συγκατάθεση τους για τη συμμετοχή τους σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Η έγκριση για τη διεξαγωγή της μελέτης δόθηκε από την Επιτροπή Έρευνας του Επιστημονικού Συμβουλίου του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο) και από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.

3.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

Όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε US άνω κοιλίας για τη διάγνωση της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος από ιατρό Ακτινολόγο. Τα κριτήρια της νόσου ήταν η διάχυτη υπερηχογένεια ήπατος, η αυξημένη ηχογένεια ήπατος έναντι της ηχογένειας των νεφρών και η ασαφopoίηση των αγγειακών τοιχωμάτων. Έπειτα αξιολογούνταν το επίπεδο λιπώδους διήθησης του ηπατικού παρεγχύματος όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2.1: Κριτήρια κατάταξης ως προς τον βαθμό λιπώδους διήθησης

ΒΑΘΜΟΣ ΛΙΠΩΔΟΥ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΟΣ	
0	Φυσιολογική ηχογένεια
I	Ελαφρά αύξηση ηχογένειας με φυσιολογική απεικόνιση διαφράγματος και αγγείων
II	Μέτρια αύξηση ηχογένειας με ελαφρά διαταραχή απεικόνισης διαφράγματος και αγγείων
III	Μεγάλη αύξηση ηχογένειας με περιορισμένη απεικόνιση τοιχώματος αγγείων και διαφράγματος

Ως υγιείς χαρακτηρίζονταν άτομα με επίπεδο βαθμού λιπώδους διήθησης 0, ενώ ως ασθενείς με NAFLD χαρακτηρίζονταν τα άτομα με επίπεδο βαθμού λιπώδους διήθησης I, II, III.

3.3 ΜΕΤΡΗΣΙΜΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η καταγραφή των δημογραφικών χαρακτηριστικών, η λήψη του ατομικού και του οικογενειακού ιστορικού, και το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (Food

Frequency Questionnaire - FFQ) πραγματοποιήθηκαν έπειτα από συνέντευξη με τα άτομα του δείγματος.

3.3.1 ΚΟΙΝΩΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα κοινωνικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά συμπεριελάμβαναν: ηλικία, φύλο, οικογενειακή κατάσταση, τόπο διαμονής, ποιος μένει μαζί, αριθμό παιδιών, συνολικά έτη εκπαίδευσης, μορφωτικό επίπεδο, επαγγελματική κατάσταση και τύπος εργασίας, και το ετήσιο οικογενειακό εισόδημα. Πιο συγκεκριμένα, το μορφωτικό επίπεδο, κατατάχθηκε σε πρωτοβάθμια εκπαίδευση (≤ 6 έτη - Δημοτικό Σχολείο), υποχρεωτική εκπαίδευση (≤ 9 έτη - Γυμνάσιο), δευτεροβάθμια εκπαίδευση (≤ 12 έτη - Λύκειο), ανώτερη εκπαίδευση (≤ 15 έτη - Επαγγελματικές σχολές/IEK), ανώτατη εκπαίδευση (≤ 16 έτη - ΑΕΙ/ΤΕΙ), μεταπτυχιακές σπουδές (≥ 17 έτη - Μεταπτυχιακό/Διδακτορικό). Η οικονομική κατάσταση στη συνέχεια ταξινομήθηκε στα εξής επίπεδα: ετήσιο εισόδημα < 8.000 €, $8.000-15.000$ €, $15.000-25.000$ € και > 25.000 €.

3.3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ

Σε αυτήν την ενότητα ερωτήσεων, ερωτήθηκε το κατά πόσο ο εθελοντής καπνίζει καθημερινά, περιστασιακά ή καθόλου. Στην περίπτωση που κάπνιζε ρωτήθηκε η ηλικία έναρξης (και η ηλικία που το σταμάτησε αν ήταν πρώην καπνιστής), τα χρόνια καπνίσματος, το είδος τους τσιγάρου και η ποσότητα σε ημερήσια βάση, καθώς και αν ήταν παθητικός καπνιστής. Με χρήση των απαντήσεων για τα συνολικά χρόνια καπνίσματος και τον αριθμό τσιγάρων ανά ημέρα υπολογίστηκε η μεταβλητή Pack-years που αφορά τους καπνιστές και ορίζεται ως 20 τσιγάρα ανά ημέρα για ένα έτος.

Η φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκε από ένα έγκυρο και ορθά μελετημένο ερωτηματολόγιο, το HPAQ (Harokopio Physical Activity Questionnaire). Το ερωτηματολόγιο αυτό διαθέτει 3 ενότητες, τη φυσική δραστηριότητα στην εργασία, στο σπίτι και την ψυχαγωγία και αναφέρεται σε δραστηριότητες που αφορούν ακριβώς την εβδομάδα που προηγήθηκε της αξιολόγησης. Με χρήση του ανωτέρω ερωτηματολογίου υπολογίστηκε ο δείκτης φυσικής δραστηριότητας PAL.

3.3.3 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι ερωτήσεις που αφορούσαν τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά ήταν ένα πλήρες ιστορικό βάρους, το σύννηθες βάρος, το ύψος, το σωματικό βάρος γέννησής τους, η διάρκεια κύησης τους, οι μήνες θηλασμού τους, αν είναι αριστερόχειρας ή δεξιόχειρας, το χρώμα και το

σχήμα μαλλιών, ο τύπος και η ηλικία έναρξης της ανδρογενετικής αλωπεκίας και τέλος το χρώμα ματιών.

3.3.3.1 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΜΕΣΗΣ

Ο εξεταζόμενος στεκόταν σε όρθια θέση και του ζητούταν να απαλλαγεί από τον ρουχισμό στην περιοχή της κοιλιάς. Τα χέρια του βρίσκονταν χαλαρά στο πλάι, ενώ τα πόδια του βρίσκονταν σε ευθεία θέση και ενωμένα. Το βάρος του έπρεπε να είναι ίσα κατανεμημένο. Η μέτρηση γινόταν με τη χρήση μη-εκτατής ταινίας (seca) στην πιο στενή περιοχή της μέσης. Στην περίπτωση παχυσάρκων ή αυξημένης συσσώρευσης λίπους στην κοιλιά η μέτρηση πραγματοποιούνταν κατά προσέγγιση στην περιοχή του αφαλού εξασφαλίζοντας την σωστή τοποθέτηση της μεζούρας. Ζητούταν από τον εξεταζόμενο να εκπνεύσει ελαφρά καθώς γινόταν η μέτρηση και καταγραφόταν η τιμή με ακρίβεια $\pm 0,1$ εκ.

3.3.3.2 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΣΧΙΟΥ

Ακριβώς μετά τη μέτρηση της ΠΜ, καθώς ο εξεταζόμενος βρισκόταν στην ίδια θέση, ο εξεταστής τοποθετημένος στο πλάι με τη χρήση μη-εκτατής ταινίας (seca) με ακρίβεια $\pm 0,1$ εκ. μετρούσε την περιφέρεια στο ύψος όπου παρατηρείται η μέγιστη περιφέρεια των γλουτών ελέγχοντας να είναι τοποθετημένη παράλληλα με το δάπεδο.

Από τις παραπάνω μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος της ΠΜ προς την ΠΙ (Waist to Hip Ratio - WHR). Ως παθολογική ΠΜ ορίστηκε η ΠΜ >88 εκ. ή >102 εκ. για γυναίκες και άντρες αντίστοιχα, ενώ ως παθολογικός WHR ορίστηκε ο WHR $\geq 0,85$ ή $\geq 0,90$ για γυναίκες και άντρες αντίστοιχα (WHO, 8-11 December 2008).

3.3.3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΑΡΟΥΣ

Η ανάλυση της σύστασης τους σώματος και η ζύγιση πραγματοποιήθηκε με συσκευή TANITA BODY COMPOSITION ANALYZER BC-418. Ο εξεταζόμενος απομάκρυνε οποιοδήποτε μεταλλικό αντικείμενο ερχόταν σε επαφή με το σώμα του, αφαιρούσε τα παπούτσια του και τις κάλτσες του, βαριά αντικείμενα από τις τσέπες του και τον βαρύ ρουχισμό. Ο εξεταστής ρύθμιζε τη συσκευή να αφαιρεί 1 kg για το ρουχισμό του εξεταζόμενου, εισάγαγε το φύλο του, την ηλικία του, το ύψος του, και επέλεγε το είδος του σωματότυπού του – standard ή athletic. Έπειτα τοποθετούταν ο εξεταζόμενος στη συσκευή πατώντας στις μεταλλικές επιφάνειες με γυμνό πόδι και κρατούσε με τα χέρια τις χειρολαβές σε απόσταση $\sim 45^\circ$ από τον κορμό του. Τα αποτελέσματα που εξάγει ο αναλυτής εκτιμούν το ποσοστό του σωματικού

λίπους, το συνολικό νερό, την λιπώδη, την άλιπη και την μυϊκή μάζα τόσο συνολικά όσο και τμηματικά στα μέρη του σώματος. Επιπλέον μετρά το βάρος και υπολογίζει το ΔΜΣ.

Η TANITA BODY COMPOSITION ANALYZER BC-418 είναι ένας αναλυτής σύστασης σώματος που η αρχή της μεθόδου του στηρίζεται σε δεδομένα DXA μέσω βιοηλεκτρικής εμπέδησης (BIA). Η BIA εκτιμά αυτές τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν μετρώντας την αντίσταση του σώματος. Το λίπος δεν είναι διαπερατό στον ηλεκτρισμό σε αντίθεση με το νερό, το περισσότερο από το οποίο βρίσκεται στο μυϊκό ιστό. Ο βαθμός δυσκολίας με τον οποίο ο ηλεκτρισμός διαπερνά μια ουσία είναι γνωστός ως ηλεκτρική αντίσταση και το ποσοστό λίπους και άλλοι παράμετροι μπορούν να εκτιμηθούν μετρώντας τα επίπεδα της. Μέσω της χρήσης 8 ηλεκτροδίων ο αναλυτής κάνει δυνατή την εκτίμηση διαφορετικής σύστασης σώματος για τα άκρα και την κοιλιά. Αποτελεί ένα απλό, γρήγορο και μη επεμβατικό μέσο εκτίμησης της σύστασης σώματος. Ωστόσο, η αντίσταση του σώματος μπορεί να ποικίλει λόγω αλλαγών στην ποσότητα και την κατανομή του σωματικού νερού (60% του σωματικού βάρους) και αλλαγών στην θερμοκρασία του, ενώ είναι δυνατό να εμφανίζει μεταβολές και μέσα στην ημέρα. Στην παρούσα μελέτη, για να μειωθεί το σφάλμα που προκύπτει από αυτή την διακύμανση, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε:

- ✓ 3 ώρες ή περισσότερο μετά την αφύπνιση (το άτομο απέφευγε οποιαδήποτε έντονη σωματική δραστηριότητα μέχρι την μέτρηση)
- ✓ 3 ώρες ή περισσότερο μετά το τελευταίο γεύμα
- ✓ 12 ώρες ή περισσότερο μετά από έντονη σωματική δραστηριότητα
- ✓ μετά από διούρηση

3.3.4 ΑΤΟΜΙΚΟ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Κατά τη λήψη του ατομικού ιατρικού ιστορικού ο εθελοντής ερωτιόταν αν έχει διαγνωσθεί είτε στο παρελθόν είτε στην περίοδο της εθελοντικής συμμετοχής του με κάποιες ιατρικές παθήσεις. Ενδεικτικά αναφέρονται ο σακχαρώδης διαβήτης, η δυσλιπιδαιμία, οι νεοπλασίες, η κατάθλιψη, η ηπατίτιδα, οι πολυκυστικές ωοθήκες, η νόσος Wilson, κ.α. Επιπλέον έγιναν ερωτήσεις για τη φαρμακευτική αγωγή, τις χειρουργικές επεμβάσεις, την ομάδα αίματος, πόνους σε ισχίο, γόνατα και πλάτη, κατάγματα μετά την ηλικία των 16 ετών και για τις γυναίκες ο αριθμός των κυήσεων, τέκνων και οι μήνες θηλασμού αυτών.

Κατά τη λήψη του οικογενειακού ιατρικού ιστορικού ο εθελοντής ερωτιόταν αν με τις ίδιες ιατρικές παθήσεις έχουν διαγνωσθεί οι γονείς του και τα αδέρφια του. Σε περίπτωση που

οι γονείς ή οι γονείς των γονέων του δεν ήταν εν ζωή ζητούταν η ηλικία και η αιτία θανάτου τους.

3.3.5 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

3.3.5.1 ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΗΜΑ ΗΠΑΤΟΣ-ΧΟΛΗΦΟΡΩΝ

Πραγματοποιούνταν υπερηχογράφημα άνω κοιλίας από ιατρό Ακτινολόγο, με χρήση του συστήματος υπερήχων SonoAce X8 Ultrasound System (Samsung Medison) και γινόταν κλινική εκτίμηση για λιπώδη διήθηση ήπατος, χολολιθίαση και debris. Να σημειωθεί ότι ο εθελοντής καλούταν να τελέσει νηστεία 10-12 ωρών και να μην είχε καταναλώσει αλκοόλ το προηγούμενο 24ωρο.

3.3.5.2 ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Εκτίμηση της αρτηριακής πίεσης και της καρδιακής συχνότητας του εκάστοτε εθελοντή πραγματοποιούνταν χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό πιεσόμετρο μπράτσου. Για την τοποθέτηση του πιεσόμετρου στο χέρι αφαιρούνταν ο ρουχισμός και το χέρι στηριζόταν σε οριζόντια επιφάνεια στο ύψος της καρδιάς. Λαμβάνονταν τρεις μετρήσεις και την τελική τιμή αποτελούσε ο μέσος όρος των δύο τελευταίων μετρήσεων. Πριν τις διαδοχικές μετρήσεις ο εξεταζόμενος παρέμενε σε κατάσταση ηρεμίας για 5' και κάθε μέτρηση απείχε από την επόμενη 1'.

3.3.5.3 ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Σε όλους τους συμμετέχοντες πραγματοποιούνταν πρωινή αιμοληψία συνολικού όγκου 20cc από ιατρό Παθολόγο, μετά από 12ωρη νηστεία και ζητούταν να μη γίνει λήψη της φαρμακευτικής αγωγής, εφόσον λάμβαναν, πριν την αιμοληψία. Ζητούταν από τον εθελοντή να καθίσει σε αναπαυτική καρέκλα, αφαιρούνταν ο ρουχισμός από το χέρι και εφαρμόζοταν το λάστιχο περίδεσης 7-8cm πάνω από την περιοχή που αναμενόταν να φλεβοκεντηθεί. Μετά την εφαρμογή του υπήρχε η δυνατότητα ψηλάφησης του κερκιδικού σφυγμού. Ζητούταν από τον εθελοντή να ανοιγοκλείσει την παλάμη του και στη συνέχεια να παραμείνει με την παλάμη σε γροθιά. Επιλεγόταν από τον εξεταστή η κατάλληλη φλέβα και με τη χρήση πεταλούδας γινόταν λήψη της απαραίτητης ποσότητας αίματος. Το αίμα μεταφερόταν σε σωληνάρια αιμοληψίας με EDTA και κιτρικό νάτριο ως αντιπηκτικό και σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό.

Ακολουθούσε η φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 3000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, με τη φυγόκεντρο Hettich Universal 32R (DJB Labcare).

Η απομόνωση του ορού γινόταν από τα φυγοκεντρημένα σωληνάκια χωρίς το αντιπηκτικό και αφού ήταν πλέον ευδιάκριτος ο διαχωρισμός του ορού από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος ο όρος απομακρυνόταν με τη χρήση πιπέτας Pasteur και μοιραζόταν στα erpendorfs.

Μετά τη φυγοκέντρηση των σωληναρίων τα οποία περιείχαν αντιπηκτικό EDTA παρατηρούταν διαχωρισμός των συστατικών του αίματος στις εξής φάσεις: στο κάτω μέρος παρατηρούταν τα ερυθροκύτταρα ακολουθούσε η πολύ λεπτή στιβάδα των λευκοκυττάρων (Buffy Coat) και στο πάνω μέρος βρισκόταν το πλάσμα με τα αιωρούμενα αιμοπετάλια. Χρησιμοποιώντας πιπέτες Pasteur απομακρυνόταν αρχικά το πλάσμα που βρισκόταν υψηλότερα και μοιραζόταν σε erpendorfs και στη συνέχεια απομακρυνόταν η στιβάδα των λευκοκυττάρων και μεταφερόταν σε 2 erpendorfs.

Μέρος των δειγμάτων αίματος που συλλέχτηκαν ακολούθησε πορεία βιοχημικής και αιματολογικής ανάλυσης, και μέρος αποθηκεύτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80) για μελλοντικούς σκοπούς.

3.3.5.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ανάλυση της γενικής εξέτασης αίματος και ο προσδιορισμός των επιπέδων της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο). Οι βιοχημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από δείγμα ορού σε συνεργασία με εξωτερικό ιατρικό εργαστήριο και προσδιορίστηκαν ο σίδηρος (Fe), η φερριτίνη (Fer), η γλυκόζη νηστείας (Glu), η ολική χοληστερόλη (TC), η HDL-C, τα TG, η οξαλοξική τρανσαμινάση (SGOT), η πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT), η ALP, γ-GT, η κρεατινίνη, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η ολική χολερυθρίνη, η άμεση χολερυθρίνη, η Alb, τα λευκώματα ορού και η ινσουλίνη ορού (Ins).

Τα επίπεδα της LDL-C υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο Friedewald (*Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972*). Ο δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο των Matthews και συν (*Matthews et al., 1985*). Η παρουσία μεταβολικού συνδρόμου ορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια που δημοσιεύτηκαν από τους Alberti και συν. (*Alberti et al., 2005*). Επιπλέον υπολογίστηκαν το Nafld fibrosis score (NFS) χρησιμοποιώντας τον τύπο (1) των Angulo και συν. (*Angulo et al., 2007*) και το Fibrosis-4 (FIB-4) σύμφωνα με τον τύπο (2) που ανέπτυξαν οι Richard και συν. (*Sterling et al., 2006*).

NFS = $(-1.675 + 0.037 \times \text{age (yr)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/diabetes (yes = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{platelet count (x } 10^9/\text{L)} - 0.66 \times \text{albumin (g/dl)}$ **(1)**

FIB-4 = $\text{age (yr)} \times \text{AST Level (U/L)} / \text{Platelet Count (} 10^9/\text{L)} \times \sqrt{\text{ALT (U/L)}}$ **(2)**

3.3.6 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ

Ο εθελοντής ερωτήθηκε πόσο συχνά παραγγέλνει ή τρώει εκτός σπιτιού, πόσο συχνά τρώει πρωινό, πόσα γεύματα έχει μέσα στην ημέρα του μαζί με τα σνακ, πόσα κυρίως γεύματα έχει μέσα στην ημέρα του και τέλος αν καταναλώνει βιολογικά προϊόντα σόγιας.

3.3.6.1 ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η αξιολόγηση των διατροφικών συνηθειών του εθελοντή για το τελευταίο έτος αξιολογήθηκε μέσω ενός εκτενούς FFQ. Συγκεκριμένα το ερωτηματολόγιο περιείχε ερωτήσεις για 172 τρόφιμα (FFQ 172 Food Items), από όλες τις ομάδες τροφίμων: γαλακτοκομικά προϊόντα, ακατέργαστα δημητριακά και παράγωγα τους, κατεργασμένα δημητριακά και παράγωγά τους, λαχανικά, φρούτα, ξηρούς καρπούς, ψάρια, πουλερικά, όσπρια, αυγά, κόκκινο κρέας και παράγωγά του, γλυκά, λίπη, junk food, αναψυκτικά, αλκοόλ και ροφήματα. Ο εθελοντής μέσω συνέντευξης από Διαιτολόγο - Διατροφολόγο κλήθηκε να προσδιορίσει τη συχνότητα και την ποσότητα κατανάλωσης από κάθε τρόφιμο συγκρίνοντας τις καταναλισκόμενες ποσότητες του εθελοντή με τις προτεινόμενες του ερωτηματολογίου που εμφανίζονταν είτε ως εικόνες μερίδων είτε ως ποσότητες εκφρασμένες στα ισοδύναμα του τροφίμου ή σε κοινώς κατανοητές μονάδες μέτρησης (π.χ. 1 κλαμπ σάντουιτς).

Η συχνότητα της κατανάλωσης των παραπάνω τροφίμων ποσοτικοποιήθηκε προσεγγιστικά σε όρους ημερήσιας κατανάλωσης και υπολογίστηκαν οι θερμίδες του κάθε εθελοντή ημερησίως καθώς και η κατανάλωση διάφορων ομάδων τροφίμων σε μερίδες ανά ημέρα.

3.3.7 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρώτο μέρος της μελέτης και περιελάμβανε τρία στάδια, την απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων από δείγματα αίματος (περιγράφηκε στην υποενότητα 4.3.5.3), την απομόνωση γενετικού υλικού από τα λευκά αιμοσφαίρια και τέλος την ανάλυση του γονιδιώματος.

3.3.7.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Το γενετικό υλικό των ατόμων της μελέτης απομονώθηκε από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος στο αυτοματοποιημένο σύστημα έκλουσης iPrepTM Purification Instrument (Life Technologies), με χρήση του πακέτου iPrepTM PurelinkTM gDNA Blood Kit (Life Technologies).

Αρχή μεθόδου:

Η χρήση του πακέτου iPrepTMPurelinkTMgDNA Blood Kit επιτρέπει την γρήγορη και αυτοματοποιημένη απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από buffy coat. Η απομόνωση του gDNA γίνεται με χρήση των μαγνητικών μικροσφαιριδίων Dynabeads MyOneTMSILANE, στο σύστημα iPrepTMPurification Instrument, και το gDNA που εκλύεται είναι κατάλληλο για εφαρμογές όπως η PCR, η γονοτύπηση και η ανάλυση του γονιδιώματος. Το αυτοματοποιημένο σύστημα iPrepTMPurification Instrument είναι ένα ρομποτικό σύστημα έκλουσης νουκλεϊκών οξέων. Χάρη στην ενσωματωμένη σύριγγα και την ενσωματωμένη μαγνητική μονάδα παρέχει την δυνατότητα εκχύλισης 13 δειγμάτων ταυτόχρονα, βάσει της τεχνολογίας μαγνητικών μικροσφαιριδίων. Η τεχνολογία των μαγνητικών μικροσφαιριδίων παρέχει μια επιφάνεια εναλλασσόμενου φορτίου που εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος του διαλύματος και διευκολύνει τον διαχωρισμό του DNA. Σε συνθήκες χαμηλού pH, τα σφαιρίδια έχουν θετικό φορτίο που προσδένονται στο αρνητικά φορτισμένο DNA. Οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά υπολείμματα δε προσδένονται και δε ξεπλένονται με τα υδατικά διαλύματα έκπλυσης. Προκειμένου να παραληφθεί το DNA, το φορτίο στην επιφάνεια των σφαιριδίων εξουδετερώνεται αυξάνοντας το pH στο 8.5 με την χρήση ενός διαλύματος έκπλυσης χαμηλής αλατότητας. Τα μικροσφαιρίδια Dynabeads MyOneTMSILANE είναι μαγνητικά σφαιρίδια (1μm) διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) στην επιφάνεια των οποίων προσροφύεται ειδικά το DNA. Η χρήση της τεχνολογίας των μικροσφαιριδίων για την έκλυση του gDNA έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή μεθόδων όπως η φυγοκέντρηση ή η χρήση αντλίας κενού.

Το πρωτόκολλο της μεθόδου είναι καταγεγραμμένο στην κάρτα iPrepTMCard:gDNA blood που αναγνωρίζεται από το αυτοματοποιημένο σύστημα, και κωδικοποιεί παραμέτρους της μεθόδου όπως ο όγκος των αντιδραστηρίων, τα βήματα ανάμειξης τους και τους χρόνους επώασης.

3.3.7.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο έλεγχος της καθαρότητας του gDNA που απομονώθηκε, έγινε με χρήση του φασματοφωτόμετρου P330 NanoPhotometer® P-Class (IMPLEN) βάσει της ιδιότητας του να απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm. Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) διαλύματος DNA σε νερό σε μήκος κύματος 260 και 280nm. Ο λόγος OD260/OD280 χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του DNA και της επιμόλυνσης από πρωτεΐνες καθώς αυτές απορροφούν στα 280nm. Τιμές μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA. Ο λόγος OD260/OD280 χρησιμοποιείται σαν δεύτερη μέτρηση ένδειξης καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων με επιθυμητές τιμές 2-2,2. Μικρότερες τιμές υποδεικνύει παρουσία μορίων που απορροφούν στα 230nm όπως EDTA και φαινόλες.

3.3.7.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ

Η γονοτύπηση είναι το τελευταίο πειραματικό στάδιο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του γονότυπου άγνωστων δειγμάτων. Το καθαρό απομονωμένο γενετικό υλικό προορίζεται για σάρωση του γονιδιώματος με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR). Η Real-Time PCR μία παραλλαγή της κλασικής PCR με τη διαφορά ότι στην παρακολούθηση της αύξησης των PCR προϊόντων κατά την διάρκεια της αντίδρασης (real time) γίνεται σε οθόνη υπολογιστή. Δίνεται επίσης η δυνατότητα να σημειωθούν τα προϊόντα της PCR με φθορίζουσα ουσία προσαρμοσμένη στους ειδικούς ανιχνευτές για την αλληλουχία στόχο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, όταν ο ανιχνευτής ή ο εκκινητής συνδεθεί με την αλληλουχία στόχο, να αποσυνδεθεί ο αδροντοποιητής από τη φθορίζουσα ουσία, το οποίο και εκπέμπει σήμα. Η γονοτυπική ταυτοποίηση έγινε με την χρήση του μηχανήματος StepOnePlus™ της εταιρίας Applied Biosystems StepOne™ με την βοήθεια της ανάλυσης TaqMan® SNP Genotyping. Πρόκειται για μία ολοκληρωμένη συλλογή αντιστοιχισμένων εκκινητών και ανιχνευτών που οδηγούν στον προσδιορισμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε ανθρώπινες δείγματα DNA. Χρησιμοποιείται ειδικό TaqMan® αντιδραστήριο για την ενίσχυση και την ανίχνευση συγκεκριμένων SNP σε καθαρισμένα δείγματα γονιδιωματικού DNA. Η δράση του αντιδραστηρίου βελτιστοποιείται με την προσθήκη ειδικού Master mix. Αφού έχει γίνει η αραίωση όπως περιγράφηκε παραπάνω προστίθενται 4,5μl gDNA σε κάθε well. Επίσης, σε κάθε plate προστίθενται 2 αρνητικοί δείκτες, δηλαδή νερό, και 2 θετικοί δείκτες, όπου προστίθενται DNA από γνωστό

δείγμα. Στη συνέχεια, προστίθενται 5,5 μl reaction mix (αποτελείται από 5μl Master mix και 0,5μl Genotyping Assay) σε κάθε well. Το plate καλύπτεται με ειδικό πλαστικό κάλυμμα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και εισάγεται στο StepOnePlus™.

3.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΑΝΕΛΕΓΧΟΥ

Οι ερωτήσεις που δέχθηκαν οι εθελοντές κατά τον επανέλεγχο ήταν ακριβώς οι ίδιες με αυτές που ερωτήθηκαν και στο πρώτο μέρος της μελέτης, εφόσον ο στόχος ήταν να καταγραφούν και να αξιολογηθούν οι αλλαγές στην υγεία τους, παρόλα αυτά έγιναν και κάποιες επιπλέον ερωτήσεις με στόχο τον εμπλουτισμό των πληροφοριών για τον τρόπο ζωής τους και την κατάσταση της υγείας τους. Οι ερωτήσεις αυτές αναφέρονται στην μεθοδολογία αλλά δεν αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Το πρωτόκολλο των μετρήσεων σε μεγάλο βαθμό διατηρήθηκε σταθερό. Οι διαφορές του έγκειται στις βιοχημικές αναλύσεις, οι οποίες στον επανέλεγχο δίνονταν σε εξωτερικό ιατρικό εργαστήριο αναλύσεων και στον US άνω κοιλίας όπου πραγματοποιήθηκε ως επί των πλείστων από μία συσκευή νεότερης τεχνολογίας.

3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Σε συνεργασία με τον απόφοιτο του μεταπτυχιακού προγράμματος του τμήματος Τηλεματικής και Πληροφορικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Κωνσταντίνο Παπαγιαννόπουλο δημιουργήθηκε μια ηλεκτρονική πλατφόρμα καταχώρησης ερωτηματολογίων η οποία έχει χαρακτηριστικά διαδικτυακής εφαρμογής. Οι ενότητες των ερωτηματολογίων τα οποία περιέχει είναι τρεις. Η πρώτη αποτελείται από τις ερωτήσεις που γίνονται στην τηλεφωνική επικοινωνία, η δεύτερη αποτελεί συγκερασμό του ερωτηματολογίου της μελέτης HELIC και της μελέτης NAFLD και η τρίτη αποτελείται από το FFQ 172 Food Items μαζί με εικόνες τους για τον προσδιορισμό της μερίδας.

Τα πλεονεκτήματα που παρέχει η πλατφόρμα στον ερευνητή είναι το φιλικό περιβάλλον της, η καταγραφή και η διατήρηση των δεδομένων, η εξαγωγή τους σε μορφή αρχείου ικανού για στατιστική επεξεργασία, ο απευθείας υπολογισμός ορισμένων δεικτών (π.χ. δείκτης φυσικής δραστηριότητας) και η παρουσίαση με μορφή γραφημάτων των απαντήσεων σε ερωτήσεις κλειστού τύπου. Παρόλα αυτά η πρόσβαση στην πλατφόρμα μπορεί να γίνει μόνο online μέσω vnr του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, κάτι το οποίο δυσχεραίνει την παρακάμψη της έντυπης καταχώρησης. Για τις ανάγκες της παρούσας ερευνητικής εργασίας

καταχωρήθηκαν όλα τα δεδομένα του πρώτου και του δεύτερου μέρους της μελέτης ώστε να γίνει η εξαγωγή των αρχείων για την στατιστική επεξεργασία.

3.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως συχνότητες και ποσοστά (n, %). Η κανονικότητα της κατανομής των ποσοτικών μεταβλητών εξετάστηκε γραφικά (ιστόγραμμα), ώστε να διερευνηθεί αν θα χρησιμοποιηθούν παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι για την ανάλυση των δεδομένων. Η σχέση μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών εξετάστηκε με το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test. Επιπλέον, εφαρμόστηκε το Mann-Whitney U test για ανεξάρτητα δείγματα προκειμένου να εξεταστούν οι διαφορές των παραμέτρων που μελετήθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων (απουσία νόσου και ηπατική στεάτωση). Επίσης πραγματοποιήθηκε πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμηση για να διερευνηθεί η σχέση της νόσου και των γονιδίων με τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Οι παραπάνω έλεγχοι είναι δίπλευροι και ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας έχει οριστεί το 0.05. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS, έκδοση 21.0 (SPSS, Chicago, IL).

Ο χρόνος επανελέγχου του δείγματος δεν ήταν κοινός για όλους τους εθελοντές. Επιπλέον χάριν της στατιστικής ανάλυσης δημιουργήθηκαν δύο κατηγορικές μεταβλητές η απουσία νόσου, που συμπεριλαμβάνει άτομα μη διαγνωσμένα με ηπατική στεάτωση αλλά και ήπια στεάτωση, και την ομάδα της ηπατικής στεάτωσης, που συμπεριλαμβάνει άτομα μέτριας ή σοβαρής ηπατικής στεάτωσης. Επιπλέον από το δείγμα δεν αφαιρέσαμε ακραίες τιμές καθώς είναι αρκετά μικρό.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 117 άτομα. Από αυτά τα 2 έχουν αποκλειστεί από τις αναλύσεις, καθώς δεν πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη, το ένα λόγω κατανάλωσης αλκοόλ άνω των 30γρ./ημέρα, και το άλλο λόγω ηπατίτιδας C.

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στο πρώτο μέρος της μελέτης από τα 115 άτομα τα 64 (56%) είχαν απουσία νόσου ενώ τα 51 (44%) άτομα είχαν ηπατική στεάτωση. Η διάμεση τιμή της ηλικίας της ομάδας με απουσία νόσου είναι 49.5 έτη με το 25% των παρατηρήσεων να βρίσκονται κάτω των 44 ετών και το 75% των παρατηρήσεων άνω των 57 ετών. Στην ομάδα με ηπατική στεάτωση η διάμεση τιμή είναι τα 55 έτη με το 25% των παρατηρήσεων να βρίσκονται κάτω των 57 ετών και το 75% των παρατηρήσεων άνω των 60 ετών. Το 54.8% των ανδρών και το 45.2% των γυναικών είχαν απουσία της νόσου.

Παρακάτω παρατίθενται τα χαρακτηριστικά του δείγματος με βάση την εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης ή απουσία αυτής.

Πίνακας 4.1.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης

	Απουσία νόσου (N=64)	Ηπατική στεάτωση (N=51)	<i>P</i>
Φύλο			
Άρρεν	23 (54.8)	19 (45.2)	0.884
Θήλυ	41 (56.2)	32 (43.8)	
Ηλικία (έτη)	49.50 (44, 57)	55 (47, 60)	0.023
Εισόδημα			
<8.000€	3 (25)	9 (75)	0.135
8.000-15.000€	15 (60)	10 (40)	
15.000-25.000€	22 (62.9)	13 (37.1)	
>25.000€	22 (57.9)	16 (42.1)	
Μορφωτικό επίπεδο			
Δημοτικό	1 (16.7)	5 (83.3)	0.040•
Γυμνάσιο	1 (16.7)	5 (83.3)	
Λύκειο	15 (53.6)	13 (46.4)	
Επαγγελματικές σχολές/ΙΕΚ	10 (55.6)	8 (44.4)	
Ανώτερη εκπαίδευση	20 (57.1)	15 (42.9)	
Μεταπτυχιακές σπουδές	17 (77.3)	5 (22.7)	
Οικογενειακή κατάσταση			
Έγγαμος/η	47 (56)	37 (44)	0.750•
Ελεύθερος/η	11 (61.1)	7 (38.9)	
Διαζευγμένος/η	4 (40)	6 (60)	

Χήρος/α	1 (50)	1 (50)	
Ύπνος (ώρες)	7 (6.50, 8)	7 (6.50, 8)	0.572
Κάπνισμα			
Καπνιστής	23 (69.7)	10 (30.3)	0.121
Πρώην καπνιστής	11 (44)	14 (56)	
Μη καπνιστής	30 (52.6)	27 (47.4)	
Πακετο-έτη Καπνίσματος	0.89 (0, 14.25)	0 (0, 16)	0.883
PAL	1.21 (1.10, 1.31)	1.18 (1.12, 1.29)	0.691

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο), ενώ οι κατηγορικές ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney *U* test για τις ποσοτικές μεταβλητές και χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test ή το •Fisher's exact test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα κατά την έναρξη της μελέτης, στο υπό διαμόρφωση δείγμα, η ηλικία των ατόμων με ηπατική στεάτωση διέφερε στατιστικά σημαντικά από την ηλικία των μη νοσούντων, με τα άτομα που έχουν τη νόσο να έχουν μεγαλύτερη ηλικία [55 (47 , 60) έναντι 49.5 (44 , 57) έτη, *p*=0.023]. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε και στο μορφωτικό επίπεδο μεταξύ των δύο ομάδων, χαρακτηρίζοντας την ομάδα των νοσούντων με χαμηλότερο μορφωτικό επίπεδο (*p*=0.040).

Πίνακας 4.1.2: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης

	Απουσία νόσου (N=64)	Ηπατική στεάτωση (N=51)	<i>P</i>
Ύψος (m)	1.69 (1.62, 1.75)	1.65 (1.61, 1.75)	0.520
Βάρος (kg)	70.85 (65.03, 78.65)	85.40 (75.80, 99.60)	<0.001
Επίπεδο ΔΜΣ			<0.001
Φυσιολογικός	33 (94.3)	2 (5.7)	
Υπέρβαρος	26 (53.1)	23 (46.9)	
Παχύσαρκος	5 (16.1)	26 (83.9)	
Περίμετρος μέσης (cm)	91.50 (83.25, 102.75)	91.50 (81.38, 98)	0.498
Περίμετρος ισχίων (cm)	104 (99.50, 108.50)	110 (106, 119)	<0.001
WHR	0.80 (0.76, 0.87)	0.91 (0.85, 0.96)	<0.001
Λιπώδης μάζα σώματος (kg)	19.20 (15.48, 23.50)	28.18 (22.95, 36.40)	<0.001
Κοιλιακό λίπος (kg)	25.80 (22, 30.70)	32.90 (28.20, 38.70)	<0.001

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο), ενώ οι κατηγορικές ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney *U* test για τις ποσοτικές μεταβλητές και χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Στα άτομα με ηπατική στεάτωση φαίνεται να υπάρχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές για τις ανθρωπομετρικές μετρήσεις του βάρους, του επιπέδου του ΔΜΣ, της περιφέρειας ισχίων, του λόγου περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, της συνολικής

μάζας λίπους και του λίπους στην περιοχή της κοιλιάς σε σύγκριση με τους μη νοσούντες με $p < 0.001$. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 83.9% των παχύσαρκων ατόμων βρίσκεται στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση.

Πίνακας 4.1.3: Κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης

	Απουσία νόσου (N=64)	Ηπατική στεάτωση (N=51)	<i>P</i>
MetS, n (%)			
Όχι	61 (66.3)	31 (33.7)	<0.001
Ναι	3 (13)	20 (87)	
Υπερλιπιδαιμία, n (%)			
Όχι	38 (71.7)	15 (28.3)	0.001
Ναι	26 (41.9)	36 (58.1)	
Υπέρταση, n (%)			
Όχι	60 (66.7)	30 (33.3)	<0.001
Ναι	4 (16)	21 (84)	
ΣΔΤ 2, n (%)			
Όχι	63 (57.3)	47 (42.7)	0.169•
Ναι	1 (20)	4 (80)	
Συστολική πίεση (mmHg)	119.85 (110, 127.88)	128 (121.92, 133.88)	<0.001
Διαστολική πίεση (mmHg)	76.25 (67.88, 83)	82.33 (77.46, 89)	0.001

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test ή το •Fisher's exact test (κατηγορικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Το μεταβολικό σύνδρομο, η υπερλιπιδαιμία και η υπέρταση συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με τη νόσο ($p \leq 0.001$), με το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού της μελέτης που έχει τις νόσους να συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα των ατόμων με την ηπατική στεάτωση.

Πίνακας 4.1.4: Βιοχημικός έλεγχος κατά την έναρξη της μελέτης

	Απουσία νόσου (N=64)	Ηπατική στεάτωση (N=51)	<i>P</i>
SGOT(U/L)	20 (17, 23)	22 (18, 25)	0.220
SGPT(U/L)	19 (14, 22)	24 (19, 33)	0.001
γ-GT(U/L)	14 (11, 23.25)	21 (14, 33)	0.016
CRP (mg/L)	2.33 (2.24, 2.33)	2.33 (2.24, 4.21)	0.027
ALP (U/L)	57 (43, 72)	64 (52.75, 81.25)	0.183

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test (ποσοτικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Ο βιοχημικός έλεγχος του δείγματος έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση για την ομάδα με την ηπατική στεάτωση για τις τιμές των SGPT ($p=0.001$), γ -GT ($p=0.016$) και CRP ($p=0.027$). Η CRP φαίνεται να έχει ίδια διάμεση τιμή αλλά το ενδροτεταρτομοριακό της εύρος μας δείχνει ότι στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση το 75% των παρατηρήσεων κατανέιμετε σε τιμές άνω του 4.21 [2.33(2.24 , 4.21) έναντι 2.33(2.24 , 2.33)]

Πίνακας 4.1.5: Μη επεμβατικά μοντέλα πρόβλεψης κατά την έναρξη της μελέτης

	Απουσία νόσου (N=64)	Ηπατική στεάτωση (N=51)	<i>P</i>
NFS	-2.27 (-2.92, -1.37)	-2.22 (-2.81, -1.26)	0.716
FIB4	0.99 (0.70, 1.26)	0.88 (0.69, 1.37)	0.832
HOMA-IR	1.82 (1.47, 2.41)	3.16 (2.41, 4.46)	<0.001
AST/ALT	1.05 (0.85, 1.26)	0.82 (0.68, 1.08)	<0.001

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1° και 3° τεταρτημόριο). Τα *p values* προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test (ποσοτικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Ο δείκτης HOMA-IR βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση ($p<0.001$), ενώ ο λόγος SGOT/SGPT ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην ομάδα που δε νοσούσε ($p<0.001$).

Πίνακας 4.1.6: Διατροφικό προφίλ του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης

	Απουσία νόσου (N=64)	Ηπατική στεάτωση (N=51)	<i>P</i>
Καφές¹ (μερίδα/ημέρα)	2 (0.79, 2)	2 (0.50, 2)	0.890
Ξηροί καρποί² (μερίδα/ημέρα)	0.43 (0.14, 0.96)	0.43 (0.14, 0.93)	0.984
Ψάρια³ (μερίδα/ημέρα)	0.33 (0.20, 0.49)	0.29 (0.14, 0.43)	0.187
Λιπαρά Ψάρια⁴ (μερίδα/ημέρα)	0.13 (0.02, 0.16)	0.07 (0, 0.14)	0.524
Γαλακτοκομικά⁵ (μερίδα/ημέρα)	0.86 (0.25, 1.21)	0.57 (0.21, 1)	0.031
Πλήρη Γαλακτοκομικά⁶ (μερίδα/ημέρα)	0 (0, 0.21)	0 (0, 0.07)	0.116
Light Γαλακτοκομικά⁷ (μερίδα/ημέρα)	0.46 (0, 1)	0.50 (0, 0.79)	0.689
Ελαιόλαδο, n (%)			
Όχι	32 (48.5)	34 (51.5)	0.073
Ναι	32 (65.3)	17 (34.7)	
Kcal/ημέρα	2295.31 (1788.57, 3049.33)	2395.21 (1935.15, 2919.43)	0.719

¹200ml

²15 γρ.

^{3,4}Μικρά ψάρια 60γρ. Μεγάλα ψάρια 75γρ.

^{5,6,7}Γάλα 240γρ., Γιαούρτι 200γρ.

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο), ενώ οι κατηγορικές ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test για τις ποσοτικές μεταβλητές και χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Η αποκλειστική χρήση ελαιολάδου, η κατανάλωση ψαριών, ξηρών καρπών και καφέ, καθώς και η συνολική θερμιδική πρόσληψη ανά ημέρα, δε φάνηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων. Η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων διέφερε στατιστικά σημαντικά ($p=0.031$), με την ομάδα που ήταν απουσία νόσου να τα καταναλώνει περισσότερο [0.86(0.25 , 1.21) έναντι 0.57(0.21 , 1)]. Ωστόσο το είδος των γαλακτοκομικών προϊόντων δε φάνηκε να διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 4.1.7: Συσχετίσεις των γονιδίων με τη νόσο κατά την έναρξη της μελέτης

	Επίπεδο_NAFLD		<i>P</i>
	Απουσία νόσου	Ηπατική στεάτωση	
GCKR			
Not carriers	16 (25)	48 (75)	0.670
Carriers	14 (28.6)	35 (71.4)	
TM6SF2			
Not carriers	53 (82.8)	11 (17.2)	0.291
Carriers	44 (89.8)	5 (10.2)	
PNPLA3			
Not carriers	35 (54.7)	29 (45.3)	0.414
Carriers	23 (46.9)	26 (53.1)	

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως συχνότητες (ποσοστά). * $P<0.05$

Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των γονιδίων με τη νόσο κατά την έναρξη της μελέτης.

Πίνακας 4.1.8: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που προκύπτουν από το μοντέλο πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την ηπατική στεάτωση κατά την έναρξη της μελέτης

	B	OR (95% CI)	P
WHR	31.779	6.330E+13 (1901.002, 2.108E+24)	0.010
Υπέρταση	3.87	47.946 (1.978, 1162.040)	0.017
PNPLA3	2.221	9.250 (1.067, 79.597)	0.044

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως B, odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI).

Από το μοντέλο της πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης βρέθηκε ότι τα άτομα με ηπατική στεάτωση έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης υπέρτασης, και αυξημένο λόγο περιφέρειας μέσης/ισχύων σε σχέση με τους μη νοσούντες. Επιπλέον φαίνεται ότι οι φορείς του αλληλομόρφου κινδύνου (G) για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3 έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Το μοντέλο αυτό προέκυψε έπειτα από διόρθωση για την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ.

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΕΠΑΝΕΛΕΓΧΟ

Κατά τον επανέλεγχο υπάρχουν δύο άτομα τα οποία δεν ολοκλήρωσαν τη διαδικασία αξιολόγησης με υπερηχογραφικό έλεγχο και το ένα δεν πραγματοποίησε ούτε την αιμοληψία. Επομένως το δείγμα ως προς την παρουσία της νόσου ή όχι αποτελείται από 113 άτομα.

Πίνακας 4.2.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά τον επανέλεγχο

	Απουσία νόσου (N=72)	Ηπατική στεάτωση (N=41)	P
Φύλο			
Άρρεν	23 (54.8)	19 (45.2)	0.128
Θήλυ	49 (69)	22 (31)	
Ηλικία (έτη)	55.50 (48, 63)	57 (48, 62.50)	0.886
Εισόδημα			
<8.000€	14 (58.3)	10 (41.7)	0.723
8.000-15.000€	21 (72.4)	8 (27.6)	
15.000-25.000€	19 (61.3)	12 (38.7)	
>25.000€	18 (64.3)	10 (35.7)	
Μορφωτικό επίπεδο			
Δημοτικό	2 (33.3)	4 (66.7)	0.629•
Γυμνάσιο	3 (50)	3 (50)	
Λύκειο	16 (61.5)	10 (38.5)	
Επαγγελματικές σχολές/ΙΕΚ	13 (68.4)	6 (31.6)	
Ανώτερη εκπαίδευση	20 (66.7)	10 (33.3)	

Μεταπτυχιακές σπουδές	18 (69.2)	8 (30.8)	
Οικογενειακή κατάσταση			
Έγγαμος/η	50 (61.7)	31 (38.3)	0.401•
Ελεύθερος/η	14 (77.8)	4 (22.2)	
Διαζευγμένος/η	7 (63.6)	4 (36.4)	
Χήρος/α	1 (33.3)	2 (66.7)	
Ύπνος (ώρες)	7 (6.5, 8)	6.5 (6, 7)	0.015
Κάπνισμα			
Καπνιστής	24 (75)	8 (25)	0.168
Πρώην καπνιστής	15 (51.7)	14 (48.3)	
Μη καπνιστής	33 (63.5)	19 (36.5)	
Πακετο-έτη Καπνίσματος	0.84 (0, 11.25)	0.80 (0, 16.63)	0.873
PAL	1.24 (1.14, 1.37)	1.21 (1.15, 1.32)	0.418

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο), ενώ οι κατηγορικές ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test για τις ποσοτικές μεταβλητές και χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test ή το •Fisher's exact test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Οι ώρες του ύπνου ανά ημέρα κατά τον επανέλεγχο βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές, με περισσότερες ώρες να εμφανίζονται στην ομάδα που δε νοσούσε σε σύγκριση με την ομάδα που νοσούσε με $p=0.015$ [7(6.5, 8) έναντι 6.5(6, 7)].

Πίνακας 4.2.2: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά τον επανέλεγχο

	Απουσία νόσου (N=72)	Ηπατική στεάτωση (N=41)	<i>P</i>
Ύψος (m)	1.66 (1.60, 1.75)	1.67 (1.62, 1.76)	0.420
Βάρος (kg)	72.30 (64.28, 81.48)	90 (74.30, 104.10)	<0.001
Επίπεδο ΔΜΣ			<0.001
Φυσιολογικός	32 (94.1)	2 (5.9)	
Υπέρβαρος	30 (60)	20 (40)	
Παχύσαρκος	10 (34.5)	19 (65.5)	
Περίμετρος μέσης (cm)	89.90 (79, 98)	100 (91.25, 112.05)	<0.001
Περίμετρος ισχίων (cm)	103.50 (96.50, 111)	106.50 (103.10, 118.50)	0.002
WHR	0.84 (0.78, 0.92)	0.92 (0.84, 0.98)	<0.001
Λιπώδης μάζα σώματος (kg)	21.75 (16.03, 27.93)	28.50 (21.60, 41.30)	<0.001
Κοιλιακό λίπος (kg)	11.70 (8.55, 15.10)	15.80 (11.15, 20.60)	<0.001

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο), ενώ οι κατηγορικές ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test για τις ποσοτικές μεταβλητές και χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Από τις ανθρωπομετρικές μετρήσεις το ύψος ήταν το μόνο που δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 4.2.3: Κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την παρακολούθηση

	Απουσία νόσου (N=72)	Ηπατική στεάτωση (N=41)	<i>P</i>
MetS, n (%)			
Όχι	70 (73.7)	25 (26.3)	<0.001
Ναι	2 (11.1)	16 (88.9)	
Υπερλιπιδαιμία, n (%)			
Όχι	37 (74)	13 (26)	0.043
Ναι	35 (55.6)	28 (44.4)	
Υπέρταση, n (%)			
Όχι	59 (68.6)	27 (31.4)	0.054
Ναι	13 (48.1)	14 (51.9)	
ΣΔΤ 2, n (%)			
Όχι	69 (68.3)	32 (31.7)	0.008•
Ναι	3 (25)	9 (75)	
Συστολική πίεση (mmHg)	120.25 (110.13, 129.88)	129 (120, 140.75)	0.001
Διαστολική πίεση (mmHg)	74 (71, 80)	79.50 (75, 83.50)	0.005

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test ή το •Fisher's exact test (κατηγορικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Η συστολική και διαστολική πίεση διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων με τιμές $p=0.001$ και $p=0.005$ αντίστοιχα, και ήταν αυξημένες στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση σε σύγκριση με τους μη νοσούντες.

Πίνακας 4.2.4: Βιοχημικές τιμές κατά τον επανέλεγχο του δείγματος

	Απουσία νόσου (N=72)	Ηπατική στεάτωση (N=41)	<i>P</i>
SGOT (U/L)	18 (15.25, 22)	20 (17.50, 23)	0.057
SGPT (U/L)	15 (11, 21)	21 (17.50, 28.50)	<0.001
γ-GT (U/L)	15 (11.25, 19)	24 (15, 35.50)	<0.001
CRP (mg/L)	0.80 (0.40, 1.68)	1.70 (0.70, 3.20)	0.007
ALP(U/L)	61 (49, 72)	66 (52, 83)	0.199

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test (ποσοτικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Οι βιοχημικές τιμές SGPT, γ-GT και CRP ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση.

Πίνακας 4.2.5: Μη επεμβατικά μοντέλα πρόβλεψης κατά τον επανέλεγχο

	Απουσία νόσου (N=72)	Ηπατική στεάτωση (N=41)	<i>P</i>
NFS	-1.93 (-2.79, -1.22)	-1.81 (-2.60, -0.77)	0.322
FIB4	1.15 (0.88, 1.44)	0.91 (0.74, 1.19)	0.018
HOMA-IR	1.77 (1.17, 2.31)	3.38 (2.31, 4.77)	<0.001
AST/ALT	1.24 (0.96, 1.53)	0.91 (0.78, 1)	<0.001

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test (ποσοτικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Ο δείκτης HOMA-IR ήταν αυξημένος στατιστικά σημαντικά στην ομάδα με ηπατική στεάτωση ($p < 0.001$) σε σύγκριση με την ομάδα χωρίς ηπατική στεάτωση.

Πίνακας 4.2.6: Διατροφικό προφίλ του δείγματος κατά τον επανέλεγχο

	Απουσία νόσου (N=72)	Ηπατική στεάτωση (N=41)	<i>P</i>
Καφές ¹ (μερίδα/ημέρα)	2 (1, 2.50)	2 (1, 2)	0.524
Ξηροί καρποί ² (μερίδα/ημέρα)	0.64 (0.21, 1.18)	0.36 (0.11, 1)	0.092
Ψάρια ³ (μερίδα/ημέρα)	0.28 (0.20, 0.41)	0.26 (0.20, 0.42)	0.874
Λιπαρά Ψάρια ⁴ (μερίδα/ημέρα)	0.09 (0, 0.14)	0.13 (0, 0.14)	0.913
Γαλακτοκομικά ⁵ (μερίδα/ημέρα)	0.68 (0.21, 1.21)	0.50 (0.23, 0.71)	0.385
Πλήρη Γαλακτοκομικά ⁶ (μερίδα/ημέρα)	0 (0, 0.21)	0 (0, 0.13)	0.941
Light Γαλακτοκομικά ⁷ (μερίδα/ημέρα)	0.21 (0, 1)	0.43 (0, 0.55)	0.932
Ελαιόλαδο, n (%)			
Όχι	38 (55.9)	30 (44.1)	0.033
Ναι	34 (75.6)	11 (24.4)	
Kcal/ημέρα	2408.62 (1910.87, 2803.85)	2494.59 (2063.29, 3151.90)	0.307

¹200ml

²15 γρ.

^{3,4}Μικρά ψάρια 60γρ. Μεγάλα ψάρια 75γρ.

^{5,6,7}Γάλα 240γρ., Γιαούρτι 200γρ.

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο), ενώ οι κατηγορικές ως συχνότητες (ποσοστά). Τα *p* values προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test για τις ποσοτικές μεταβλητές και χρησιμοποιώντας το Pearson's χ^2 test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Η αποκλειστική κατανάλωση ελαιολάδου φάνηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ($p = 0.033$) με το 75.6% που το χρησιμοποιούσε αποκλειστικά ως λίπος στη διατροφή του να ανήκει στην ομάδα χωρίς ηπατική στεάτωση. Καμία άλλη ομάδα

τροφίμων ή οι συνολικές θερμίδες κατανάλωσης ανά ημέρα δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 4.2.7: Συσχετίσεις των γονιδίων με τη νόσο κατά τον επανέλεγχο

	NAFLD_level		<i>P</i>
	Απουσία νόσου	Ηπατική στεάτωση	
GCKR			
Not carriers	16 (53.3)	14 (46.7)	0.121
Carriers	56 (69.1)	25 (30.9)	
TM6SF2			
Not carriers	61 (64.2)	34 (35.8)	0.725
Carriers	11 (68.8)	5 (31.2)	
PNPLA3			
Not carriers	39 (68.4)	18 (31.6)	0.420
Carriers	33 (61.1)	21 (38.9)	

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως συχνότητες (ποσοστά). **P*<0.05

Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των γονιδίων με τη νόσο κατά τον επανέλεγχο του δείγματος.

Πίνακας 4.2.8: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που προκύπτουν από το μοντέλο πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την ηπατική στεάτωση κατά την παρακολούθηση

	B	OR (95% CI)	<i>P</i>
ΔΜΣ	0.96	2.61 (1.04, 6.57)	0.042
Συστολική πίεση	0.12	1.13 (1.01, 1.26)	0.034
MetS	5.59	267.41 (1.85, 38639.50)	0.028
FIB4	-4.19	0.02 (0, 0.53)	0.021
HOMA-IR	1.73	5.65 (1.77, 18.06)	0.003
Ελαιόλαδο	-3.09	0.05 (0.002, 0.93)	0.045

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως *B*, odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI).

Από το μοντέλο της πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης, όπου λήφθηκε υπόψιν ο χρόνος παρακολούθησης και το επίπεδο στεάτωσης κατά την έναρξη της μελέτης και έγινε στάθμιση για τους συγχυτικούς παράγοντες (φύλο, ηλικία, ΔΜΣ) βρέθηκε ότι τα άτομα με αυξημένη συστολική πίεση, MetS, ΔΜΣ και HOMA-IR έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίζουν ηπατική στεάτωση. Η αποκλειστική κατανάλωση ελαιολάδου φάνηκε να μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης.

Πίνακας 4.2.9: Συσχετίσεις των γονιδίων με τα μη επεμβατικά σκορ πρόβλεψης της νόσου και του δείκτη φυσικής δραστηριότητας

	D_NFS	D_FIB4	D_HOMAIR	D_PAL
GCKR				
Not carriers	-0.54 (-1.11, 0.29)	-0.08 (-0.23, -0.02)	0.25 (-0.72, 0.88)	-0.06 (-0.18, 0.04)
Carriers	-0.24 (-0.73, 0.42)	-0.09 (-0.23, 0.02)	0.39 (-0.43, 1.08)	-0.03 (-0.13, 0.07)
TM6SF2				
Not carriers	-0.41 (-0.82, 0.21)	-0.10 (-0.23, 0.01)	0.37 (-0.47, 1.07)	-0.06 (-0.18, 0.06)
Carriers	0.05 (-0.25, 0.64)	-0.07 (-0.17, 0.12)	0.33 (-0.54, 0.80)	0.001 (-0.06, 0.08)
PNPLA3				
Not carriers	-0.29 (-0.82, 0.39)	-0.11 (-0.21, 0.003)	0.38 (-0.53, 1.03)	-0.06 (-0.15, 0.04)
Carriers	-0.43 (-0.79, 0.44)	-0.07 (-0.23, 0.03)	0.28 (-0.50, 1.02)	-0.005 (-0.17, 0.08)

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως διάμεση τιμή (1^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Τα *p values* προέκυψαν από τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney U test (ποσοτικές μεταβλητές). Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται πιο έντονα.

Το μοντέλο πρόβλεψης NFS, καθώς και ο δείκτης φυσικής δραστηριότητας PAL αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στους μη φορείς σε σχέση με τους φορείς του πολυμορφισμού rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η NAFLD αποτελεί αναμφισβήτητα μια ευρέως διαδεδομένη νόσο με σοβαρές κλινικές επιπτώσεις κατά την εξέλιξή της, χωρίς θεραπευτική αντιμετώπιση και με πολλούς υποψήφιους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνισή της. Το ερευνητικό ενδιαφέρον φαίνεται να συγκεντρώνεται ολοένα και περισσότερο στην επίδραση των περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στην εμφάνισή της, και ο καλύτερος σχεδιασμός μελετών για την επιβεβαίωση σχέσης αιτίας αποτελέσματος είναι ο προοπτικός. Στόχος, λοιπόν, της παρούσας προοπτικής ερευνητικής μελέτης ήταν η αξιολόγηση και η συσχέτιση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και η παρουσίαση των περιγραφικών χαρακτηριστικών του δείγματος σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές με βάση την εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης ή απουσία αυτής.

Αρχικά, παρουσιάστηκαν οι διαφορές στα δημογραφικά, ανθρωπομετρικά, βιοχημικά χαρακτηριστικά, το ιστορικό κάποιων ασθενειών, το διατροφικό προφίλ και κάποιοι γονότυποι ανάμεσα στους ασθενείς με NAFLD και τους υγιείς ως προς τη νόσο κατά την έναρξη της μελέτης και ακολούθησε η παρουσίαση των αντίστοιχων αποτελεσμάτων κατά τον επανέλεγχο των ατόμων της μελέτης. Επίσης, παρουσιάστηκαν οι συσχετίσεις των περιγραφικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στα άτομα με απουσία νόσου και με τη νόσο και στις δύο χρονικές στιγμές. Τέλος, έγινε παρουσίαση της μεταβολής των μη επεμβατικών μοντέλων πρόβλεψης, καθώς και της φυσικής δραστηριότητας με βάση το αν είναι φορείς ή όχι του αλληλομόρφου κινδύνου για τη NAFLD για τα γονίδια PNPLA3, TM6SF2 και GCKR.

Κατά την έναρξη της μελέτης όσον αφορά τη σχέση της νόσου με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, προτείνεται πως η ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με NAFLD και των υγιών ως προς τη νόσο. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλότερη ηλικία ωστόσο, τα αποτελέσματα από την πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμηση δεν κατέληξαν σε κάποια συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και της νόσου μετά από διόρθωση για το φύλο και το ΔΜΣ. Η βιβλιογραφία προτείνει πως ο επιπολασμός της νόσου αυξάνει με την ηλικία με τα άτομα 40-60 ετών να έχουν την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης (*Amarapurkar et al., 2007; Frith et al., 2009; Kagansky et al., 2004; Speliotes, Massaro, et al., 2010*). Επίσης, οι ασθενείς χαρακτηρίζονταν από χαμηλότερο μορφωτικό επίπεδο σε σχέση με τους υγιείς.

Κατά τον επανέλεγχο του δείγματος, και έτσι όπως διαμορφώθηκαν σύμφωνα με την ηπατική στεάτωση οι δύο ομάδες, τα παραπάνω χαρακτηριστικά, ηλικία και μορφωτικό επίπεδο δεν παρέμειναν στατιστικά σημαντικά, αλλά εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις ώρες ύπνου, με την ομάδα των υγιών ατόμων να κοιμάται περισσότερες ώρες ανά ημέρα σε σχέση με τους μη υγιείς. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι υπάρχει η τάση οι πολύ λίγες ώρες ύπνου να σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου (*Trovato, Martines, Brischetto, Catalano, et al., 2016*) και ότι η μειωμένη συνολική διάρκεια ύπνου αποτελεί πιθανό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη παχυσαρκίας, έναν από τους κυριότερους προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση της NAFLD (*Trovato, Martines, Brischetto, Trovato, & Catalano, 2016*). Σε μία ελληνική μελέτη, επίσης, φάνηκε η ιδανική διάρκεια ύπνου (≥ 7 ωρών) να σχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (*Katsagoni et al., 2017*). Η διάρκεια του ύπνου ωστόσο δεν εμφάνισε κάποια συσχέτιση με την νόσο στο μοντέλο της πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης. Επιπλέον, το φύλο σε καμία από τις δύο χρονικές στιγμές δε φάνηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά, κάτι που αντιτίθεται στη βιβλιογραφία, η οποία αναφέρει ότι στο αντρικό φύλο υπάρχει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου (*Vernon et al., 2011*).

Όσον αφορά τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος και στις δύο χρονικές στιγμές φάνηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του ΔΜΣ, στη περιφέρεια ισχύων, στο WHR, στο συνολικό λίπος του σώματος και στο κοιλιακό λίπος, με αυξημένες τιμές στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση σε σύγκριση με την ομάδα με απουσία της νόσου. Κατά τον επανέλεγχο του δείγματος στατιστικά σημαντική αύξηση φάνηκε και στην περιφέρεια μέσης στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση. Κατά την έναρξη της μελέτης ο WHR συσχετίσθηκε με τη νόσο ανεξάρτητα από την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ κάτι που δε συνέβη κατά τον επανέλεγχο. Το εύρημα αυτό αναδεικνύει την κεντρική τύπου παχυσαρκία ως παράγοντα κινδύνου για τη νόσο κάτι που επιβεβαιώνεται και από μελέτες, οι οποίες προσεγγίζουν τον σπλαχνικό λιπώδη ιστό ως ένα ενεργό μεταβολικό όργανο που αποτελεί πηγή TG και οδηγεί στην ηπατική στεάτωση (*Marchesini & Forlani, 2002*) (*Marchesini, Bianchi, et al., 2001*). Από την άλλη ο ΔΜΣ συσχετίστηκε με τη νόσο κατά τον επανέλεγχο ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία όπου ουσιαστικά κάθε 0.96 kg/m^2 αύξηση στα επίπεδα του ΔΜΣ συσχετίσθηκαν με 2.61 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης. Αυτό το αποτέλεσμα συνάδει με τη βιβλιογραφία όπου φαίνεται ο αυξημένος ΔΜΣ και η

παχυσαρκία να αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες της NAFLD αφού αναφέρεται ότι η πλειονότητα των ασθενών με NAFLD είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (*Marchesini et al., 2003*), και η νόσος είναι 2 φορές συχνότερη σε υπέρβαρους ανθρώπους και 4 φορές συχνότερη σε παχύσαρκους (*Bellentani & Tiribelli, 2001; Fabbrini, Sullivan, & Klein, 2010; Vernon et al., 2011*).

Η αξιολόγηση των βιοχημικών παραμέτρων έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις ίδιες βιοχημικές εξετάσεις που αποτελούν δείκτες υγείας του ήπατος τόσο κατά την έναρξη της μελέτης όσο και κατά τον επανέλεγχο των ατόμων. Ειδικότερα φάνηκε η ομάδα με την ηπατική στεάτωση να έχει αυξημένες τιμές SGPT, γ-GT και CRP σε σύγκριση με τους μη νοσούντες, οι οποίες όμως παρέμεναν εντός των φυσιολογικών ορίων. Το εύρημα αυτό για την SGPT συμφωνεί με τη βιβλιογραφία όπου αναφέρει αύξηση του ηπατικού ενζύμου στους νοσούντες αλλά παρόλα αυτά παραμένει εντός των φυσιολογικών ορίων (*Paschos & Paletas, 2009*). Επίσης, η αυξημένη CRP έχει συσχετισθεί ως ανεξάρτητος παράγοντας με την παρουσία της νόσου (*Riquelme et al., 2009; Yenion et al., 2014*), όπως και οι υψηλές τιμές της γ-GT (*Tahan et al., 2008*). Μια σχετικά πρόσφατη προοπτική βελγική μελέτη σε 230 ασθενείς με NAFLD διαπίστωσε ότι οι τιμές της γ-GT ήταν 5 φορές μεγαλύτερες του φυσιολογικού ορίου και συσχετίστηκαν με τη μεγαλύτερη ηλικία, το διαβήτη και την αυξημένη ίνωση (*Francque et al., 2011*).

Αναφορικά με τα κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων, κατά την έναρξη της μελέτης, φάνηκε ότι το MetS διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ($p \leq 0.001$), με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών που το έχουν (87%) να εμφανίζουν ηπατική στεάτωση. Το MetS έχει φανεί ότι συνυπάρχει με τη NAFLD στο 42.54% των ασθενών (*Younossi et al., 2016*) και σε μία πρόσφατη προοπτική μελέτη φάνηκε ότι οι συμμετέχοντες με διαγνωσμένο MetS είχαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν NAFLD και εκτός αυτού, τα άτομα που πληρούσαν μόνο ένα εκ των διαγνωστικών κριτηρίων του MetS είχαν 3.6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης NAFLD σε σύγκριση με τα άτομα με κανένα χαρακτηριστικό του MetS (*Y. Wang et al., 2013*). Η υπερλιπιδαιμία και η υπέρταση, δύο συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου, διέφεραν και αυτές στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων με μεγαλύτερη κατανομή των ατόμων που φέρουν τις νόσους στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση. Το 58.1 % των ατόμων που είχαν υπερλιπιδαιμία περιλαμβάνονταν στην ομάδα της ηπατικής στεάτωσης, ποσοστό που περικλείεται εντός των εκτιμήσεων της βιβλιογραφίας για την παρουσία υπερλιπιδαιμίας στο 20% έως 80% των ασθενών με NAFLD (*Baskin et al., 2005*;

Diehl et al., 1988; Loria et al., 2009). Η υπέρταση έδειξε αυξημένη συσχέτιση με την πιθανότητα εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης στην πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμηση ύστερα από διόρθωση για φύλο, ηλικία και ΔΜΣ. Οι Cotrim et al. έχουν καταγράψει στο 64% τον επιπολασμό της υπέρτασης μεταξύ των ασθενών με NAFLD. Η υπέρταση και ιδίως η αυξημένη συστολική αρτηριακή πίεση συνιστά ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την NAFLD, ακόμη και σε μη παχύσαρκους και μη διαβητικούς ασθενείς και φαίνεται επίσης να αυξάνει τον κίνδυνο εξέλιξης της νόσου σε NASH (Souza et al., 2012).

Κατά τον επανέλεγχο του δείγματος, ωστόσο, υπάρχει ένα αντικρουόμενο αποτέλεσμα με τη βιβλιογραφία, καθώς πέραν του MetS το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισής του στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση (88.9%, $p=0.001$) και το οποίο παρέμεινε στατιστικά σημαντικό και στο λογαριθμιστικό μοντέλο παλινδρόμησης υποδεικνύοντας αυξημένη συσχέτιση με την πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης σε όσους έχουν MetS, η υπερλιπιδαιμία εμφανίστηκε με μειωμένη συχνότητα στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση κατά 11.2% και $p=0.043$. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως να εξηγείται από το γεγονός ότι η αντιλιπιδαιμική αγωγή χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση της ηπατικής στεάτωσης, άρα δεδομένης της επίδρασης αυτής να εμφανίζονται και χαμηλότερα επίπεδα της νόσου ή και απουσία αυτής. Από την άλλη η συχνότητα εμφάνισης του ΣΔΤ 2 που υπερείχε κατά 68.3% και $p=0.008$ στην ομάδα με τη νόσο έναντι 31.7% στην ομάδα απουσία της νόσου φαίνεται να επιβεβαιώνει τη βιβλιογραφία που τον κατατάσσει στον κυριότερο παράγοντα κινδύνου της NAFLD. Σε μια προοπτική μελέτη 100 ασθενών με ΣΔΤ 2, η επίπτωση της ηπατικής στεάτωσης ήταν 49%, επιβεβαιώνοντας τον ως ισχυρό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τη NAFLD (Gupte et al., 2004). Τόσο η συστολική όσο και η διαστολική πίεση είχε στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση και στις δύο φάσεις της μελέτης ενώ κατά τον επανέλεγχο η αύξηση της συστολικής πίεσης κατά 0.12 mmHg φάνηκε να αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της ηπατικής στεάτωσης κατά 1.13 φορές.

Όσον αφορά τη σχέση της κατανάλωσης ομάδων τροφίμων ανά ημέρα και της νόσου κατά την έναρξη της μελέτης μόνο η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ήταν αυξημένη στην ομάδα που δε νοσούσε σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p=0.031$. Ωστόσο δε διατήρησε την σημαντικότητά της στο μοντέλο της πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης ώστε να επιβεβαιώσει κάποια προστατευτική δράση έναντι της νόσου,

παρόλα αυτά συμβαδίζει με τα ευρήματα δύο μελετών όπου στη μία που ήταν ασθενών-μαρτύρων και ανέλυσε δεδομένα από 200 ασθενείς με NAFLD και 200 υγιείς μάρτυρες φάνηκε ότι οι ασθενείς κατανάλωναν μικρότερη ποσότητα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Shi et al., 2012), ενώ το ίδιο αποτέλεσμα φάνηκε και στους ασθενείς της μελέτης των Ferolla και συνεργατών (Ferolla et al., 2013). Κατά τον επανέλεγχο η αποκλειστική κατανάλωση ελαιολάδου ήταν στατιστικά σημαντική στην ομάδα των υγιών ατόμων ($p=0.033$) και συσχετίστηκε με τη νόσο έπειτα από διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες (ΔΜΣ, ηλικία, φύλο), υποδεικνύοντας ότι η μειωμένη κατανάλωση ελαιολάδου αυξάνει κατά 0.05 φορές τον σχετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ($p=0.045$). Το ελαιόλαδο αποτελεί το τρόφιμο με αυξημένη περιεκτικότητα σε έναν από τους κυριότερους εκπροσώπους των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, το ολεϊκό οξύ. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν ευνοϊκή επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ, μειώνοντας το λόγο LDL/HDL και το λόγο TC/HDL-C, με αποτέλεσμα να έχει προστατευτική δράση στην ανάπτυξη ίνωσης (Zelber-Sagi, Ratziu, & Oren, 2011). Μελέτη σε ζωικά μοντέλα έδειξε ότι η κατανάλωση ελαιολάδου μειώνει την ηπατική στεάτωση (Hussein et al., 2007). Στη μελέτη των Nigam et al., ύστερα από εξάμηνη παρέμβαση με χρήση ελαιολάδου βρέθηκε στατιστικά σημαντική βελτίωση του βαθμού ηπατικής στεάτωσης του δείγματος (Nigam et al., 2014).

Σχετικά με προγνωστικά μοντέλα πρόβλεψης της νόσου στο πρώτο μέρος της μελέτης αλλά και στον επανέλεγχο η ομάδα με την ηπατική στεάτωση διέφερε στατιστικά σημαντικά στο ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης της αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης (HOMA-IR), καθώς και στο λόγο AST/ALT. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν και στο δεύτερο μέρος της μελέτης, όπου ο δείκτης HOMA-IR ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην ομάδα με την ηπατική στεάτωση και στο μοντέλο της λογαριθμιστικής παλινδρόμησης φάνηκε ότι για αύξηση 1.73 της τιμής αυξάνει 5.65 ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, εφόσον η IR εμπλέκεται στον παθογενετικό μηχανισμό της NAFLD. Ο HOMA-IR πρώτη φορά συσχετίστηκε με τη NAFLD το 1999 από τους Marchesini et al., και έδειξε μία ανεξάρτητη συσχέτιση της IR και της διαγνωσμένης με US NAFLD (Marchesini et al., 1999). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μελλοντικές μελέτες (Marchesini, Brizi, et al., 2001; Sanyal et al., 2001). Ο λόγος AST/ALT και στις δύο χρονικές στιγμές φάνηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην ομάδα χωρίς τη νόσο, κάτι το οποίο μας δείχνει ότι οι τιμές της ALT είναι μεγαλύτερες από της AST στην ομάδα με την

ηπατική στεάτωση κάτι που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία και ότι ενδεχομένως η επιδείνωση ή η εμφάνιση της νόσου αυξάνει ως πιθανότητα στην ομάδα των υγιών ατόμων εφόσον ο λόγος AST/ALT είναι μεγαλύτερος της μονάδας (*Angulo et al., 1999*). Το εύρημα αυτό δεν μπόρεσε να δώσει συσχέτιση με τη νόσο στο μοντέλο λογαριθμιστικής παλινδρόμησης. Τέλος το FIB-4 έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα χωρίς τη νόσο μόνο κατά τον επανέλεγχο κάτι που παρέμεινε στατιστικά σημαντικό και στο μοντέλο της λογαριθμιστικής παλινδρόμησης με ένα εύρημα ($b=-4.19$, $OR=0.02$, $p=0.003$) που αντιτίθεται στην ιδιότητα του δείκτη αφού αποτελεί δείκτη πρόγνωσης της ίνωσης και σε καμία από τις δύο ομάδες δεν υπάρχουν τιμές που να υποδηλώνουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ίνωσης, αντιθέτως όλοι οι συμμετέχοντες εμφανίζουν τιμές του FIB-4 score <1.45 (κατωφλική τιμή χαμηλής πιθανότητας ίνωσης).

Το γονιδιακό προφίλ των εθελοντών διερευνήθηκε για την επίδραση του στη NAFLD, στο διατροφικό προφίλ και στα μη επεμβατικά μοντέλα πρόβλεψης, καθώς και τις ώρες ύπνου, το δείκτη φυσικής δραστηριότητας PAL και τις καπνιστικές συνήθειες. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν στις μεταβλητές της διαφοράς (πριν-μετά) του δείκτη φυσικής δραστηριότητας PAL και του NFS score με το γονότυπο TM6SF2. Πιο συγκεκριμένα φάνηκε να αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στους φορείς τους πολυμορφισμού rs58542926 του γονιδίου TM6SF2 σε σχέση με τους μη φορείς το NFS score και ο δείκτης φυσικής δραστηριότητας PAL. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώνονται από την βιβλιογραφία. Επιπλέον οι φορείς του πολυμορφισμού rs738409 του PNPLA3 γονιδίου κατά την έναρξη της μελέτης φάνηκε στο μοντέλο της λογαριθμιστικής παλινδρόμησης να εμφανίζουν κατά 9.25 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης σε σχέση με τους μη φορείς ($p=0.044$) ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και το ΔΜΣ. Το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στον επανέλεγχο του δείγματος, πιθανότατα λόγω μεταβολής της σύστασης των ομάδων σε αυτούς που νοσούν και όχι. Από την άλλη βέβαια η βιβλιογραφία έχει ισχυρή τοποθέτηση υπέρ αυτού του αποτελέσματος αφού οι φορείς του αλληλομόρφου κινδύνου (G) εμφανίζουν αυξημένο επίπεδο λιπώδους διήθησης (*Sookoian et al., 2009*).

Τέλος, αξίζει να αναφερθούν οι περιορισμοί και τα πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης. Στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης συγκαταλέγεται το μέγεθος του δείγματος, κάτι που δυσχεραίνει την ανάδειξη των διαφορών μεταξύ των ατόμων με διαφορετικό γονότυπο στις ομάδες των υγιών και των ασθενών, και γενικά μειώνει τη

στατιστική ισχύ των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, η αξιολόγηση της συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ανά ημέρα έγινε με FFQ και πιθανότατα ενέχει κάποιο σφάλμα υποεκτίμησης ή υπερεκτίμησης των διατροφικών συνηθειών από τον εξεταζόμενο. Στους περιορισμούς της μεθόδου αξιολόγησης της ηπατικής στεάτωσης (US) περιλαμβάνονται η υποκειμενικότητα και η μεταβλητότητα της μέτρησης αναλόγως τον εξεταστή, και στην παρούσα μελέτη ο εξεταστής διέφερε στις δύο χρονικές στιγμές. Επιπλέον διέφερε και η συσκευή απεικόνισης, αφού ήταν μια νεότερης τεχνολογίας και ενδεχομένως να επηρεάζει το αποτέλεσμα. Σε ότι αφορά τα πλεονεκτήματα της μελέτης μπορεί να συμπεριληφθεί ο προοπτικός σχεδιασμός της που μπορεί να εξάγει σχέσεις αιτίας-αποτελέσματος και να επιβεβαιώσει αποτελέσματα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας με μεγαλύτερη ισχύ ή να αναδείξει νεότερα αποτελέσματα. Βέβαια, σημαντικό για τη στατιστική ισχύ των αποτελεσμάτων είναι η αύξηση του αριθμού του δείγματος του επανελέγχου ώστε να αναδειχτούν δεδομένα για τη σχέση της διατροφής και της γενετικής επίδραση στη NAFLD.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (EASL), E. A. f. t. S. o. t. L., (EASD), E. A. f. t. S. o. D., & (EASO), E. A. f. t. S. o. O. (2016a). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*, 59(6), 1121-1140. doi:10.1007/s00125-016-3902-y
- (EASL), E. A. f. t. S. o. t. L., (EASD), E. A. f. t. S. o. D., & (EASO), E. A. f. t. S. o. O. (2016b). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 64(6), 1388-1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004
- Abdelmegeed, M. A., Banerjee, A., Yoo, S. H., Jang, S., Gonzalez, F. J., & Song, B. J. (2012). Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 57(4), 860-866. doi:10.1016/j.jhep.2012.05.019
- Adams, L. A., & Angulo, P. (2006). Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J*, 82(967), 315-322. doi:10.1136/pgmj.2005.042200
- Adams, L. A., & Feldstein, A. E. (2010). Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 4(5), 623-635. doi:10.1586/egh.10.56
- Adams, L. A., George, J., Bugianesi, E., Rossi, E., De Boer, W. B., van der Poorten, D., . . . Jeffrey, G. P. (2011). Complex non-invasive fibrosis models are more accurate than simple models in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 26(10), 1536-1543. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06774.x
- Adams, L. A., Sanderson, S., Lindor, K. D., & Angulo, P. (2005). The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol*, 42(1), 132-138. doi:10.1016/j.jhep.2004.09.012
- Ahmed, M. H., Abu, E. O., & Byrne, C. D. (2010). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): new challenge for general practitioners and important burden for health authorities? *Prim Care Diabetes*, 4(3), 129-137. doi:10.1016/j.pcd.2010.02.004
- Al-Serri, A., Anstee, Q. M., Valenti, L., Nobili, V., Leathart, J. B., Dongiovanni, P., . . . Daly, A. K. (2012). The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. *J Hepatol*, 56(2), 448-454. doi:10.1016/j.jhep.2011.05.029
- Alberti, K. G., Zimmet, P., Shaw, J., & Group, I. E. T. F. C. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491), 1059-1062. doi:10.1016/S0140-6736(05)67402-8
- Amarapurkar, D., Kamani, P., Patel, N., Gupte, P., Kumar, P., Agal, S., . . . Deshpande, A. (2007). Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol*, 6(3), 161-163.
- Andersen, T., Gluud, C., Franzmann, M. B., & Christoffersen, P. (1991). Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol*, 12(2), 224-229.
- Angelico, F., Burattin, M., Alessandri, C., Del Ben, M., & Lirussi, F. (2007). Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD005166. doi:10.1002/14651858.CD005166.pub2
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346(16), 1221-1231. doi:10.1056/NEJMra011775
- Angulo, P., Hui, J. M., Marchesini, G., Bugianesi, E., George, J., Farrell, G. C., . . . Day, C. P. (2007). The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*, 45(4), 846-854. doi:10.1002/hep.21496

- Angulo, P., Keach, J. C., Batts, K. P., & Lindor, K. D. (1999). Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 30(6), 1356-1362. doi:10.1002/hep.510300604
- Anstee, Q. M., Targher, G., & Day, C. P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(6), 330-344. doi:10.1038/nrgastro.2013.41
- Anty, R., Iannelli, A., Patoureaux, S., Bonnafe, S., Lavallard, V. J., Senni-Buratti, M., . . . Tran, A. (2010). A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther*, 32(11-12), 1315-1322. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x
- Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., & Zanlungo, S. (2015). Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*, 1852(9), 1765-1778. doi:10.1016/j.bbdis.2015.05.015
- Arslan, N., Erdur, B., & Aydin, A. (2010). Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian Pediatr*, 47(10), 829-839.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., . . . Consortium, M. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180. doi:10.1038/nature09944
- Ascha, M. S., Hanoun, I. A., Lopez, R., Tamimi, T. A., Feldstein, A. F., & Zein, N. N. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 51(6), 1972-1978. doi:10.1002/hep.23527
- Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., & Grosowski, M. (2009). Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 15(15), 1809-1815.
- Bacchi, E., Negri, C., Targher, G., Faccioli, N., Lanza, M., Zoppini, G., . . . Moghetti, P. (2013). Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). *Hepatology*, 58(4), 1287-1295. doi:10.1002/hep.26393
- Barrera, F., & George, J. (2014). The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. *Clin Liver Dis*, 18(1), 91-112. doi:10.1016/j.cld.2013.09.009
- Baskin, M. L., Ard, J., Franklin, F., & Allison, D. B. (2005). Prevalence of obesity in the United States. *Obes Rev*, 6(1), 5-7. doi:10.1111/j.1467-789X.2005.00165.x
- Bataller, R., Ginès, P., Nicolás, J. M., Görg, M. N., Garcia-Ramallo, E., Gasull, X., . . . Rodés, J. (2000). Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 118(6), 1149-1156.
- Bates, B., Lennox, A., Prentice, A., Bates, C., & Swan, G. (2012). *National Diet and Nutrition Survey: Headline Results from Years 1 and 2 and 3 (combined) of the Rolling Programme (2008/ 2009–2010/ 11)*.
- Bechmann, L. P., Gastaldello, A., Vetter, D., Patman, G. L., Pascoe, L., Hannivoort, R. A., . . . Reeves, H. L. (2012). Glucokinase links Krüppel-like factor 6 to the regulation of hepatic insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55(4), 1083-1093. doi:10.1002/hep.24793
- Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Castiglione, A., Crocè, L. S., Tiribelli, C., & Bellentani, S. (2007). Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. *Hepatology*, 46(5), 1387-1391. doi:10.1002/hep.21827
- Beer, N. L., Tribble, N. D., McCulloch, L. J., Roos, C., Johnson, P. R., Orho-Melander, M., & Gloyn, A. L. (2009). The P446L variant in GSKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum Mol Genet*, 18(21), 4081-4088. doi:10.1093/hmg/ddp357

- Belfort, R., Harrison, S. A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., . . . Cusi, K. (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, 355(22), 2297-2307. doi:10.1056/NEJMoa060326
- Bellentani, S., & Tiribelli, C. (2001). The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol*, 35(4), 531-537.
- Bernsmeier, C., Weisskopf, D. M., Pflueger, M. O., Mosimann, J., Campana, B., Terracciano, L., . . . Cajochen, C. (2015). Sleep Disruption and Daytime Sleepiness Correlating with Disease Severity and Insulin Resistance in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comparison with Healthy Controls. *PLoS One*, 10(11), e0143293. doi:10.1371/journal.pone.0143293
- Bilzer, M., Roggel, F., & Gerbes, A. L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, 26(10), 1175-1186. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x
- Bloomgarden, Z. T. (2004). Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*, 27(3), 824-830.
- Boden, G. (2009). High- or low-carbohydrate diets: which is better for weight loss, insulin resistance, and fatty livers? *Gastroenterology*, 136(5), 1490-1492. doi:S0016-5085(09)00451-X [pii] 10.1053/j.gastro.2009.03.019
- Braunersreuther, V., Viviani, G. L., Mach, F., & Montecucco, F. (2012). Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 18(8), 727-735. doi:10.3748/wjg.v18.i8.727
- Bravo, A. A., Sheth, S. G., & Chopra, S. (2001). Liver biopsy. *N Engl J Med*, 344(7), 495-500. doi:10.1056/NEJM200102153440706
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 79(4), 537-543.
- Browning, J. D. (2013). Common genetic variants and nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11(9), 1191-1193. doi:10.1016/j.cgh.2013.05.013
- Browning, J. D., Baker, J. A., Rogers, T., Davis, J., Satapati, S., & Burgess, S. C. (2011). Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction. *Am J Clin Nutr*, 93(5), 1048-1052. doi:10.3945/ajcn.110.007674
- Browning, J. D., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J. D., Cohen, J. C., . . . Hobbs, H. H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 40(6), 1387-1395. doi:10.1002/hep.20466
- Bugianesi, E., Manzini, P., D'Antico, S., Vanni, E., Longo, F., Leone, N., . . . Rizzetto, M. (2004). Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*, 39(1), 179-187. doi:10.1002/hep.20023
- Bugianesi, E., McCullough, A. J., & Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 42(5), 987-1000. doi:10.1002/hep.20920
- Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M. F., & Marchesini, G. (2010). Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des*, 16(17), 1941-1951.
- Burza, M. A., Pirazzi, C., Maglio, C., Sjöholm, K., Mancina, R. M., Svensson, P. A., . . . Romeo, S. (2012). PNPLA3 I148M (rs738409) genetic variant is associated with hepatocellular carcinoma in obese individuals. *Dig Liver Dis*, 44(12), 1037-1041. doi:10.1016/j.dld.2012.05.006
- Buss, C., Valle-Tovo, C., Miozzo, S., & Alves de Mattos, A. (2014). Probiotics and synbiotics may improve liver aminotransferases levels in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Hepatol*, 13(5), 482-488.

- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
- Byrne, C. D. (2012). Dorothy Hodgkin Lecture 2012: non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. *Diabet Med*, 29(9), 1098-1107. doi:10.1111/j.1464-5491.2012.03732.x
- Byrne, C. D., Olufadi, R., Bruce, K. D., Cagampang, F. R., & Ahmed, M. H. (2009). Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 116(7), 539-564. doi:10.1042/CS20080253
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2014). Ectopic fat, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease: implications for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(6), 1155-1161. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303034
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: is universal screening appropriate? *Diabetologia*, 59(6), 1141-1144. doi:10.1007/s00125-016-3910-y
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., . . . Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15718-15723. doi:10.1073/pnas.0407076101
- Caiazzo, R., Lassailly, G., Leteurtre, E., Baud, G., Verkindt, H., Raverdy, V., . . . Pattou, F. (2014). Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann Surg*, 260(5), 893-898; discussion 898-899. doi:10.1097/SLA.0000000000000945
- Caldwell, S., & Argo, C. (2010). The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*, 28(1), 162-168. doi:10.1159/000282081
- Calès, P., Lainé, F., Boursier, J., Deugnier, Y., Moal, V., Oberti, F., . . . Lunel, F. (2009). Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol*, 50(1), 165-173. doi:10.1016/j.jhep.2008.07.035
- Carulli, L., Canedi, I., Rondinella, S., Lombardini, S., Ganazzi, D., Fargion, S., . . . Loria, P. (2009). Genetic polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease: interleukin-6-174G/C polymorphism is associated with non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis*, 41(11), 823-828. doi:10.1016/j.dld.2009.03.005
- Carulli, L., Lonardo, A., Lombardini, S., Marchesini, G., & Loria, P. (2006). Gender, fatty liver and GGT. *Hepatology*, 44(1), 278-279. doi:10.1002/hep.21218
- Ceccarelli, S., Panera, N., Mina, M., Gnani, D., De Stefanis, C., Crudele, A., . . . Alisi, A. (2015). LPS-induced TNF- α factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget*, 6(39), 41434-41452. doi:10.18632/oncotarget.5163
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., . . . Sanyal, A. J. (2012). 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*, 55(6), 2005-2023. doi:10.1002/hep.25762
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., . . . Association, A. G. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol*, 107(6), 811-826. doi:10.1038/ajg.2012.128

- Chan, H. L., de Silva, H. J., Leung, N. W., Lim, S. G., Farrell, G. C., & NAFLD, A.-P. W. P. o. (2007). How should we manage patients with non-alcoholic fatty liver disease in 2007? *J Gastroenterol Hepatol*, 22(6), 801-808. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.04977.x
- Chatrath, H., Vuppalachchi, R., & Chalasani, N. (2012). Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, 32(1), 22-29. doi:10.1055/s-0032-1306423
- Chen, S., Li, Y., Li, S., & Yu, C. (2008). A Val227Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha) gene associated with non-alcoholic fatty liver disease and decreased waist circumference and waist-to-hip ratio. *J Gastroenterol Hepatol*, 23(9), 1415-1418. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05523.x
- Chung, M., Ma, J., Patel, K., Berger, S., Lau, J., & Lichtenstein, A. H. (2014). Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 100(3), 833-849. doi:10.3945/ajcn.114.086314
- Claussnitzer, M., Dankel, S. N., Kim, K. H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., . . . Kellis, M. (2015). FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med*, 373(10), 895-907. doi:10.1056/NEJMoa1502214
- Compare, D., Coccoli, P., Rocco, A., Nardone, O. M., De Maria, S., Carteni, M., & Nardone, G. (2012). Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 22(6), 471-476. doi:10.1016/j.numecd.2012.02.007
- Cui, J., Ang, B., Haufe, W., Hernandez, C., Verna, E. C., Sirlin, C. B., & Loomba, R. (2015). Comparative diagnostic accuracy of magnetic resonance elastography vs. eight clinical prediction rules for non-invasive diagnosis of advanced fibrosis in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study. *Aliment Pharmacol Ther*, 41(12), 1271-1280. doi:10.1111/apt.13196
- D'Albuquerque, L. A., Gonzalez, A. M., Wahle, R. C., de Oliveira Souza, E., Mancero, J. M., & de Oliveira e Silva, A. (2008). Liver transplantation for subacute hepatocellular failure due to massive steatohepatitis after bariatric surgery. *Liver Transpl*, 14(6), 881-885. doi:10.1002/lt.21472
- Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.
- de Koning, L., Malik, V. S., Kellogg, M. D., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2012). Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men. *Circulation*, 125(14), 1735-1741, S1731. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067017
- Devries, M. C., Samjoo, I. A., Hamadeh, M. J., & Tarnopolsky, M. A. (2008). Effect of endurance exercise on hepatic lipid content, enzymes, and adiposity in men and women. *Obesity (Silver Spring)*, 16(10), 2281-2288. doi:10.1038/oby.2008.358
- Dezso, Z., Nikolsky, Y., Sviridov, E., Shi, W., Serebriyskaya, T., Dosymbekov, D., . . . Nikolskaya, T. (2008). A comprehensive functional analysis of tissue specificity of human gene expression. *BMC Biol*, 6, 49. doi:10.1186/1741-7007-6-49
- Diehl, A. M., Goodman, Z., & Ishak, K. G. (1988). Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology*, 95(4), 1056-1062.
- Diraison, F., Moulin, P., & Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*, 29(5), 478-485. doi:MDOI-DM-11-2003-29-5-1262-3636-101019-ART3 [pii]

- Dongiovanni, P., Anstee, Q. M., & Valenti, L. (2013). Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des*, 19(29), 5219-5238.
- Dongiovanni, P., Donati, B., Fares, R., Lombardi, R., Mancina, R. M., Romeo, S., & Valenti, L. (2013). PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. *World J Gastroenterol*, 19(41), 6969-6978. doi:10.3748/wjg.v19.i41.6969
- Dongiovanni, P., Petta, S., Maglio, C., Fracanzani, A. L., Pipitone, R., Mozzi, E., . . . Valenti, L. (2015). Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology*, 61(2), 506-514. doi:10.1002/hep.27490
- Dongiovanni, P., Rametta, R., Fracanzani, A. L., Benedan, L., Borroni, V., Maggioni, P., . . . Valenti, L. (2010). Lack of association between peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma2 polymorphisms and progressive liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a case control study. *BMC Gastroenterol*, 10, 102. doi:10.1186/1471-230X-10-102
- Dongiovanni, P., & Valenti, L. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor genetic polymorphisms and nonalcoholic Fatty liver disease: any role in disease susceptibility? *PPAR Res*, 2013, 452061. doi:10.1155/2013/452061
- Dongiovanni, P., Valenti, L., Rametta, R., Daly, A. K., Nobili, V., Mozzi, E., . . . Fargion, S. (2010). Genetic variants regulating insulin receptor signalling are associated with the severity of liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 59(2), 267-273. doi:10.1136/gut.2009.190801
- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5), 1343-1351. doi:10.1172/JCI23621
- Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., & Newsome, P. N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*, 103(2), 71-83. doi:10.1093/qjmed/hcp158
- du Plessis, J., van Pelt, J., Korf, H., Mathieu, C., van der Schueren, B., Lannoo, M., . . . van der Merwe, S. (2015). Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 149(3), 635-648.e614. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.044
- Dulai, P. S., Sirlin, C. B., & Loomba, R. (2016). MRI and MRE for non-invasive quantitative assessment of hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD and NASH: Clinical trials to clinical practice. *J Hepatol*, 65(5), 1006-1016. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.005
- Dunn, W., Sanyal, A. J., Brunt, E. M., Unalp-Arida, A., Donohue, M., McCullough, A. J., & Schwimmer, J. B. (2012). Modest alcohol consumption is associated with decreased prevalence of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Hepatol*, 57(2), 384-391. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.024
- EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. (2016). *J Hepatol*, 64(6), 1388-1402. doi:S0168-8278(15)00734-5 [pii] 10.1016/j.jhep.2015.11.004
- Edens, M. A., Kuipers, F., & Stolk, R. P. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease is associated with cardiovascular disease risk markers. *Obes Rev*, 10(4), 412-419. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00594.x
- Eguchi, Y., Hyogo, H., Ono, M., Mizuta, T., Ono, N., Fujimoto, K., . . . JSG-NAFLD. (2012). Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*, 47(5), 586-595. doi:10.1007/s00535-012-0533-z

- Ekstedt, M., Franzén, L. E., Mathiesen, U. L., Thorelius, L., Holmqvist, M., Bodemar, G., & Kechagias, S. (2006). Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*, 44(4), 865-873. doi:10.1002/hep.21327
- Ellervik, C., Birgens, H., Tybjaerg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G. (2007). Hemochromatosis genotypes and risk of 31 disease endpoints: meta-analyses including 66,000 cases and 226,000 controls. *Hepatology*, 46(4), 1071-1080. doi:10.1002/hep.21885
- Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), 679-689. doi:10.1002/hep.23280
- Falletti, E., Fabris, C., Cmet, S., Cussigh, A., Bitetto, D., Fontanini, E., . . . Toniutto, P. (2011). PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int*, 31(8), 1137-1143. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02534.x
- Fan, J. G., Zhu, J., Li, X. J., Chen, L., Li, L., Dai, F., . . . Chen, S. Y. (2005). Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol*, 43(3), 508-514. doi:10.1016/j.jhep.2005.02.042
- Fazel, Y., Koenig, A. B., Sayiner, M., Goodman, Z. D., & Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65(8), 1017-1025. doi:10.1016/j.metabol.2016.01.012
- Ferolla, S. M., Ferrari, T. C., Lima, M. L., Reis, T. O., Tavares-Jr, W. C., Couto, O. F., . . . Couto, C. A. (2013). Dietary patterns in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Clinics (Sao Paulo)*, 68(1), 11-17.
- Fishbein, M., Castro, F., Cheruku, S., Jain, S., Webb, B., Gleason, T., & Stevens, W. R. (2005). Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *J Clin Gastroenterol*, 39(7), 619-625.
- Fracanzani, A. L., Valenti, L., Bugianesi, E., Andreoletti, M., Colli, A., Vanni, E., . . . Fargion, S. (2008). Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*, 48(3), 792-798. doi:10.1002/hep.22429
- Francque, S., De Maeght, S., Adler, M., Deltenre, P., de Galocsy, C., Orlent, H., . . . Liver, S. C. o. t. B. A. f. t. S. o. t. (2011). High prevalence of advanced fibrosis in association with the metabolic syndrome in a Belgian prospective cohort of NAFLD patients with elevated ALT. Results of the Belgian NAFLD registry. *Acta Gastroenterol Belg*, 74(1), 9-16.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 18(6), 499-502.
- Frith, J., Day, C. P., Henderson, E., Burt, A. D., & Newton, J. L. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology*, 55(6), 607-613. doi:10.1159/000235677
- Fuchs, M., & Sanyal, A. J. (2012). Lipotoxicity in NASH. *J Hepatol*, 56(1), 291-293. doi:10.1016/j.jhep.2011.05.019
- Fujii, H., Enomoto, M., Fukushima, W., Tamori, A., Sakaguchi, H., & Kawada, N. (2009). Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. *Gut*, 58(11), 1566-1567; author reply 1567. doi:10.1136/gut.2009.182758
- Gaia, S., Carenzi, S., Barilli, A. L., Bugianesi, E., Smedile, A., Brunello, F., . . . Rizzetto, M. (2011). Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis. *J Hepatol*, 54(1), 64-71. doi:10.1016/j.jhep.2010.06.022
- Gasteyger, C., Larsen, T. M., Vercruysse, F., & Astrup, A. (2008). Effect of a dietary-induced weight loss on liver enzymes in obese subjects. *Am J Clin Nutr*, 87(5), 1141-1147.

- George, D. K., Goldwurm, S., MacDonald, G. A., Cowley, L. L., Walker, N. I., Ward, P. J., . . . Powell, L. W. (1998). Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*, 114(2), 311-318.
- Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131(2), 242-256. doi:10.1016/j.cell.2007.10.004
- Giby, V. G., & Ajith, T. A. (2014). Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 6(8), 570-579. doi:10.4254/wjh.v6.i8.570
- Graham, I., Cooney, M. T., Bradley, D., Dudina, A., & Reiner, Z. (2012). Dyslipidemias in the prevention of cardiovascular disease: risks and causality. *Curr Cardiol Rep*, 14(6), 709-720. doi:10.1007/s11886-012-0313-7
- Gupte, P., Amarapurkar, D., Agal, S., Baijal, R., Kulshrestha, P., Pramanik, S., . . . Hafeezunnisa. (2004). Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol*, 19(8), 854-858. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03312.x
- Gusdon, A. M., Song, K. X., & Qu, S. (2014). Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 637027. doi:10.1155/2014/637027
- Guyot, E., Sutton, A., Rufat, P., Laguillier, C., Mansouri, A., Moreau, R., . . . Nahon, P. (2013). PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol*, 58(2), 312-318. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.036
- Haas, J. T., Francque, S., & Staels, B. (2016). Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol*, 78, 181-205. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105331
- Hafeez, S., & Ahmed, M. H. (2013). Bariatric surgery as potential treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a future treatment by choice or by chance? *J Obes*, 2013, 839275. doi:10.1155/2013/839275
- Hamabe, A., Uto, H., Imamura, Y., Kusano, K., Mawatari, S., Kumagai, K., . . . Tsubouchi, H. (2011). Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. *J Gastroenterol*, 46(6), 769-778. doi:10.1007/s00535-011-0376-z
- Haring, R., Wallaschofski, H., Nauck, M., Dörr, M., Baumeister, S. E., & Völzke, H. (2009). Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels. *Hepatology*, 50(5), 1403-1411. doi:10.1002/hep.23135
- Harrison, S. A., Oliver, D., Arnold, H. L., Gogia, S., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2008). Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut*, 57(10), 1441-1447. doi:10.1136/gut.2007.146019
- Hassan, K., Bhalla, V., El Regal, M. E., & A-Kader, H. H. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol*, 20(34), 12082-12101. doi:10.3748/wjg.v20.i34.12082
- Hatzitolios, A., Savopoulos, C., Lazaraki, G., Sidiropoulos, I., Haritanti, P., Lefkopoulos, A., . . . Dimitrios, K. (2004). Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia. *Indian J Gastroenterol*, 23(4), 131-134.
- Haufe, S., Engeli, S., Kast, P., Böhnke, J., Utz, W., Haas, V., . . . Jordan, J. (2011). Randomized comparison of reduced fat and reduced carbohydrate hypocaloric diets on intrahepatic fat in overweight and obese human subjects. *Hepatology*, 53(5), 1504-1514. doi:10.1002/hep.24242
- Hernaez, R., Yeung, E., Clark, J. M., Kowdley, K. V., Brancati, F. L., & Kao, W. H. (2011). Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*, 55(5), 1079-1085. doi:10.1016/j.jhep.2011.02.013

- Hirose, A., Ono, M., Saibara, T., Nozaki, Y., Masuda, K., Yoshioka, A., . . . Onishi, S. (2007). Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6), 1375-1381. doi:10.1002/hep.21638
- Holmen, O. L., Zhang, H., Fan, Y., Hovelson, D. H., Schmidt, E. M., Zhou, W., . . . Willer, C. J. (2014). Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. *Nat Genet*, 46(4), 345-351. doi:10.1038/ng.2926
- Hu, X., Huang, Y., Bao, Z., Wang, Y., Shi, D., Liu, F., . . . Yu, X. (2012). Prevalence and factors associated with nonalcoholic fatty liver disease in Shanghai work-units. *BMC Gastroenterol*, 12, 123. doi:10.1186/1471-230X-12-123
- Hussein, O., Grosovski, M., Lasri, E., Svalb, S., Ravid, U., & Assy, N. (2007). Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*, 13(3), 361-368.
- Iacono, A., Raso, G. M., Canani, R. B., Calignano, A., & Meli, R. (2011). Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. *J Nutr Biochem*, 22(8), 699-711. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.10.002
- Ibañez, P., Solis, N., Pizarro, M., Aguayo, G., Duarte, I., Miquel, J. F., . . . Arrese, M. (2007). Effect of losartan on early liver fibrosis development in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 22(6), 846-851. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04700.x
- Idilman, I. S., Keskin, O., Elhan, A. H., Idilman, R., & Karcaaltincaba, M. (2014). Impact of sequential proton density fat fraction for quantification of hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol*, 49(5), 617-624. doi:10.3109/00365521.2014.894118
- Ishizuka, Y., Nakayama, K., Ogawa, A., Makishima, S., Boonvisut, S., Hirao, A., . . . Japan, J. M. U. P. T. o. L.-S. H. G. B. f. A. o. (2014). TRIB1 downregulates hepatic lipogenesis and glycogenesis via multiple molecular interactions. *J Mol Endocrinol*, 52(2), 145-158. doi:10.1530/JME-13-0243
- Ismail, I., Keating, S. E., Baker, M. K., & Johnson, N. A. (2012). A systematic review and meta-analysis of the effect of aerobic vs. resistance exercise training on visceral fat. *Obes Rev*, 13(1), 68-91. doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00931.x
- Janiec, D. J., Jacobson, E. R., Freeth, A., Spaulding, L., & Blaszyk, H. (2005). Histologic variation of grade and stage of non-alcoholic fatty liver disease in liver biopsies. *Obes Surg*, 15(4), 497-501. doi:10.1381/0960892053723268
- Ji, H. F., Sun, Y., & Shen, L. (2014). Effect of vitamin E supplementation on aminotransferase levels in patients with NAFLD, NASH, and CHC: results from a meta-analysis. *Nutrition*, 30(9), 986-991. doi:10.1016/j.nut.2014.01.016
- Johnson, N. A., Sachinwalla, T., Walton, D. W., Smith, K., Armstrong, A., Thompson, M. W., & George, J. (2009). Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology*, 50(4), 1105-1112. doi:10.1002/hep.23129
- Kabir, M., Catalano, K. J., Ananthnarayan, S., Kim, S. P., Van Citters, G. W., Dea, M. K., & Bergman, R. N. (2005). Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(2), E454-461. doi:10.1152/ajpendo.00203.2004
- Kagansky, N., Levy, S., Keter, D., Rimon, E., Taiba, Z., Fridman, Z., . . . Malnick, S. (2004). Non-alcoholic fatty liver disease--a common and benign finding in octogenarian patients. *Liver Int*, 24(6), 588-594. doi:10.1111/j.1478-3231.2004.0969.x

- Kahali, B., Liu, Y. L., Daly, A. K., Day, C. P., Anstee, Q. M., & Speliotes, E. K. (2015). TM6SF2: catch-22 in the fight against nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease? *Gastroenterology*, 148(4), 679-684. doi:10.1053/j.gastro.2015.01.038
- Katcher, H. I., Legro, R. S., Kunselman, A. R., Gillies, P. J., Demers, L. M., Bagshaw, D. M., & Kris-Etherton, P. M. (2008). 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*, 87(1), 79-90.
- Katsagoni, C. N., Georgoulis, M., Papatheodoridis, G. V., Fragopoulou, E., Ioannidou, P., Papageorgiou, M., . . . Kontogianni, M. D. (2017). Associations Between Lifestyle Characteristics and the Presence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case-Control Study. *Metab Syndr Relat Disord*, 15(2), 72-79. doi:10.1089/met.2016.0105
- Keating, S. E., Hackett, D. A., George, J., & Johnson, N. A. (2012). Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*, 57(1), 157-166. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.023
- Kim, H., Haluzik, M., Asghar, Z., Yau, D., Joseph, J. W., Fernandez, A. M., . . . LeRoith, D. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes*, 52(7), 1770-1778.
- Kitamoto, A., Kitamoto, T., Nakamura, T., Ogawa, Y., Yoneda, M., Hyogo, H., . . . Hotta, K. (2014). Association of polymorphisms in GCKR and TRIB1 with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome traits. *Endocr J*, 61(7), 683-689.
- Koehler, E. M., Schouten, J. N., Hansen, B. E., van Rooij, F. J., Hofman, A., Stricker, B. H., & Janssen, H. L. (2012). Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: results from the Rotterdam study. *J Hepatol*, 57(6), 1305-1311. doi:10.1016/j.jhep.2012.07.028
- Koplay, M., Sivri, M., Erdogan, H., & Nayman, A. (2015). Importance of imaging and recent developments in diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 7(5), 769-776. doi:10.4254/wjh.v7.i5.769
- Kowdley, K. V., Belt, P., Wilson, L. A., Yeh, M. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Chalasani, N., . . . Network, N. C. R. (2012). Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55(1), 77-85. doi:10.1002/hep.24706
- Kozlitina, J., Smagris, E., Stender, S., Nordestgaard, B. G., Zhou, H. H., Tybjaerg-Hansen, A., . . . Cohen, J. C. (2014). Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, 46(4), 352-356. doi:10.1038/ng.2901
- Krasnoff, J. B., Painter, P. L., Wallace, J. P., Bass, N. M., & Merriman, R. B. (2008). Health-related fitness and physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 47(4), 1158-1166. doi:10.1002/hep.22137
- Krawczyk, M., Bonfrate, L., & Portincasa, P. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24(5), 695-708. doi:10.1016/j.bpg.2010.08.005
- Krawczyk, M., Grünhage, F., Zimmer, V., & Lammert, F. (2011). Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *J Hepatol*, 55(2), 299-306. doi:10.1016/j.jhep.2010.10.042
- Kruse, M., von Loeffelholz, C., Hoffmann, D., Pohlmann, A., Seltmann, A. C., Osterhoff, M., . . . Pfeiffer, A. F. (2015). Dietary rapeseed/canola-oil supplementation reduces serum lipids and liver enzymes and alters postprandial inflammatory responses in adipose tissue compared to olive-oil supplementation in obese men. *Mol Nutr Food Res*, 59(3), 507-519. doi:10.1002/mnfr.201400446

- Kumari, M., Schoiswohl, G., Chitraju, C., Paar, M., Cornaciu, I., Rangrez, A. Y., . . . Zechner, R. (2012). Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab*, 15(5), 691-702. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.008
- Kwon, H. K., Greenson, J. K., & Conjeevaram, H. S. (2014). Effect of lifetime alcohol consumption on the histological severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 34(1), 129-135. doi:10.1111/liv.12230
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726-735. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.049
- Lassailly, G., Caiazzo, R., Buob, D., Pigeyre, M., Verkindt, H., Labreuche, J., . . . Mathurin, P. (2015). Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*, 149(2), 379-388; quiz e315-376. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.014
- Lassailly, G., Caiazzo, R., Hollebecque, A., Buob, D., Leteurtre, E., Arnalsteen, L., . . . Mathurin, P. (2011). Validation of noninvasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest, and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23(6), 499-506. doi:10.1097/MEG.0b013e3283464111
- Lawlor, D. A., Sattar, N., Smith, G. D., & Ebrahim, S. (2005). The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol*, 161(11), 1081-1088. doi:10.1093/aje/kwi125
- Lazo, M., Solga, S. F., Horska, A., Bonekamp, S., Diehl, A. M., Brancati, F. L., . . . Clark, J. M. (2010). Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 33(10), 2156-2163. doi:dc10-0856 [pii] 10.2337/dc10-0856
- Lee, S. S., & Park, S. H. (2014). Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20(23), 7392-7402. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7392
- Lee, S. S., Park, S. H., Kim, H. J., Kim, S. Y., Kim, M. Y., Kim, D. Y., . . . Yu, E. S. (2010). Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol*, 52(4), 579-585. doi:10.1016/j.jhep.2010.01.008
- Li, W., Zheng, L., Sheng, C., Cheng, X., Qing, L., & Qu, S. (2011). Systematic review on the treatment of pentoxifylline in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*, 10, 49. doi:10.1186/1476-511X-10-49
- Liangpunsakul, S., & Chalasani, N. (2012). What should we recommend to our patients with NAFLD regarding alcohol use? *Am J Gastroenterol*, 107(7), 976-978. doi:10.1038/ajg.2012.20
- Lim, S., Park, Y. M., Sakuma, I., & Koh, K. K. (2013). How to control residual cardiovascular risk despite statin treatment: focusing on HDL-cholesterol. *Int J Cardiol*, 166(1), 8-14. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.127
- Lirussi, F., Azzalini, L., Orlando, S., Orlando, R., & Angelico, F. (2007). Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD004996. doi:10.1002/14651858.CD004996.pub3
- Liu, Y. L., Patman, G. L., Leathart, J. B., Piguet, A. C., Burt, A. D., Dufour, J. F., . . . Anstee, Q. M. (2014). Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 61(1), 75-81. doi:10.1016/j.jhep.2014.02.030
- Liu, Y. L., Reeves, H. L., Burt, A. D., Tiniakos, D., McPherson, S., Leathart, J. B., . . . Anstee, Q. M. (2014). TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*, 5, 4309. doi:10.1038/ncomms5309

- Lonardo, A., Bellentani, S., Argo, C. K., Ballestri, S., Byrne, C. D., Caldwell, S. H., . . . Group, N.-a. F. L. D. S. (2015). Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis*, 47(12), 997-1006. doi:10.1016/j.dld.2015.08.004
- Loomba, R., Wolfson, T., Ang, B., Hooker, J., Behling, C., Peterson, M., . . . Sirlin, C. (2014). Magnetic resonance elastography predicts advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a prospective study. *Hepatology*, 60(6), 1920-1928. doi:10.1002/hep.27362
- Loria, P., Adinolfi, L. E., Bellentani, S., Bugianesi, E., Grieco, A., Fargion, S., . . . Fegato, N. E. C. o. t. A. I. p. l. s. d. (2010). Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis*, 42(4), 272-282. doi:10.1016/j.dld.2010.01.021
- Loria, P., Carulli, L., Bertolotti, M., & Lonardo, A. (2009). Endocrine and liver interaction: the role of endocrine pathways in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6(4), 236-247. doi:10.1038/nrgastro.2009.33
- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., & Oh, B. J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 55(7), 434-438.
- Ma, Y. Y., Li, L., Yu, C. H., Shen, Z., Chen, L. H., & Li, Y. M. (2013). Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 19(40), 6911-6918. doi:10.3748/wjg.v19.i40.6911
- Machado, M. V., & Cortez-Pinto, H. (2012). Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*, 11(4), 440-449.
- Machado, M. V., & Cortez-Pinto, H. (2013). Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol*, 58(5), 1007-1019. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.021
- Maki, K. C., Beiseigel, J. M., Jonnalagadda, S. S., Gugger, C. K., Reeves, M. S., Farmer, M. V., . . . Rains, T. M. (2010). Whole-grain ready-to-eat oat cereal, as part of a dietary program for weight loss, reduces low-density lipoprotein cholesterol in adults with overweight and obesity more than a dietary program including low-fiber control foods. *J Am Diet Assoc*, 110(2), 205-214. doi:10.1016/j.jada.2009.10.037
- Makishima, S., Boonvisut, S., Ishizuka, Y., Watanabe, K., Nakayama, K., & Iwamoto, S. (2015). Sin3A-associated protein, 18 kDa, a novel binding partner of TRIB1, regulates MTTP expression. *J Lipid Res*, 56(6), 1145-1152. doi:10.1194/jlr.M057802
- Makkonen, J., Pietiläinen, K. H., Rissanen, A., Kaprio, J., & Yki-Järvinen, H. (2009). Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol*, 50(5), 1035-1042. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.025
- Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., & Gores, G. J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*, 281(17), 12093-12101. doi:10.1074/jbc.M510660200
- Marchesini, G., Bianchi, G., Amodio, P., Salerno, F., Merli, M., Panella, C., . . . cirrhosis, I. S. G. f. q. o. l. i. (2001). Factors associated with poor health-related quality of life of patients with cirrhosis. *Gastroenterology*, 120(1), 170-178.
- Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., . . . Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 50(8), 1844-1850.

- Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., . . . Melchionda, N. (1999). Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*, 107(5), 450-455.
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., . . . Rizzetto, M. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 37(4), 917-923. doi:10.1053/jhep.2003.50161
- Marchesini, G., & Forlani, G. (2002). NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology*, 35(2), 497-499. doi:10.1053/jhep.2002.31551
- Margariti, E., Deutsch, M., Manolakopoulos, S., & Papatheodoridis, G. V. (2012). Non-alcoholic fatty liver disease may develop in individuals with normal body mass index. *Ann Gastroenterol*, 25(1), 45-51.
- Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., & McCullough, A. J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116(6), 1413-1419.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Mazzella, N., Ricciardi, L. M., Mazzotti, A., & Marchesini, G. (2014). The role of medications for the management of patients with NAFLD. *Clin Liver Dis*, 18(1), 73-89. doi:10.1016/j.cld.2013.09.005
- McCarthy, E. M., & Rinella, M. E. (2012). The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic Fatty liver disease. *J Acad Nutr Diet*, 112(3), 401-409. doi:10.1016/j.jada.2011.10.007
- McCormack, L., Dutkowski, P., El-Badry, A. M., & Clavien, P. A. (2011). Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol*, 54(5), 1055-1062. doi:10.1016/j.jhep.2010.11.004
- McKeown, N. M., Yoshida, M., Shea, M. K., Jacques, P. F., Lichtenstein, A. H., Rogers, G., . . . Saltzman, E. (2009). Whole-grain intake and cereal fiber are associated with lower abdominal adiposity in older adults. *J Nutr*, 139(10), 1950-1955. doi:10.3945/jn.108.103762
- McKimmie, R. L., Daniel, K. R., Carr, J. J., Bowden, D. W., Freedman, B. I., Register, T. C., . . . Wagenknecht, L. E. (2008). Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Am J Gastroenterol*, 103(12), 3029-3035. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02188.x
- McPherson, S., Stewart, S. F., Henderson, E., Burt, A. D., & Day, C. P. (2010). Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 59(9), 1265-1269. doi:10.1136/gut.2010.216077
- Meisamy, S., Hines, C. D., Hamilton, G., Sirlin, C. B., McKenzie, C. A., Yu, H., . . . Reeder, S. B. (2011). Quantification of hepatic steatosis with T1-independent, T2-corrected MR imaging with spectral modeling of fat: blinded comparison with MR spectroscopy. *Radiology*, 258(3), 767-775. doi:10.1148/radiol.10100708
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 77(5), 1146-1155.
- Michelotti, G. A., Machado, M. V., & Diehl, A. M. (2013). NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(11), 656-665. doi:10.1038/nrgastro.2013.183

- Miele, L., Beale, G., Patman, G., Nobili, V., Leathart, J., Grieco, A., . . . Reeves, H. L. (2008). The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 135(1), 282-291.e281. doi:10.1053/j.gastro.2008.04.004
- Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2011). Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med*, 364(25), 2392-2404. doi:10.1056/NEJMoa1014296
- Mureddu, G. F., Brandimarte, F., & De Luca, L. (2012). High-density lipoprotein levels and risk of cardiovascular events: a review. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 13(9), 575-586. doi:10.2459/JCM.0b013e32834bb3c8
- Musso, G., Cassader, M., Rosina, F., & Gambino, R. (2012). Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia*, 55(4), 885-904. doi:10.1007/s00125-011-2446-4
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., & Pagano, G. (2010). A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 52(1), 79-104. doi:10.1002/hep.23623
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., & Pagano, G. (2011). Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*, 43(8), 617-649. doi:10.3109/07853890.2010.518623
- Méndez-Sánchez, N., Arrese, M., Zamora-Valdés, D., & Uribe, M. (2007). Treating nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 27(9), 1157-1165. doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01567.x
- Nabeshima, Y., Tazuma, S., Kanno, K., Hyogo, H., Iwai, M., Horiuchi, M., & Chayama, K. (2006). Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl4-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(3), 658-664. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.183
- Naik, A., Košir, R., & Rozman, D. (2013). Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics*, 102(2), 84-95. doi:10.1016/j.ygeno.2013.03.007
- Namikawa, C., Shu-Ping, Z., Vyselaar, J. R., Nozaki, Y., Nemoto, Y., Ono, M., . . . Onishi, S. (2004). Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 40(5), 781-786. doi:10.1016/j.jhep.2004.01.028
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, E. a., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106(25), 3143-3421.
- Nelson, J. E., Bhattacharya, R., Lindor, K. D., Chalasani, N., Raaka, S., Heathcote, E. J., . . . Kowdley, K. V. (2007). HFE C282Y mutations are associated with advanced hepatic fibrosis in Caucasians with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 46(3), 723-729. doi:10.1002/hep.21742
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2009). Lifestyle modification as the primary treatment of NASH. *Clin Liver Dis*, 13(4), 649-665. doi:10.1016/j.cld.2009.07.006
- Nigam, P., Bhatt, S., Misra, A., Chadha, D. S., Vaidya, M., Dasgupta, J., & Pasha, Q. M. (2014). Effect of a 6-month intervention with cooking oils containing a high concentration of monounsaturated fatty acids (olive and canola oils) compared with control oil in male Asian Indians with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Technol Ther*, 16(4), 255-261. doi:10.1089/dia.2013.0178

- Nseir, W., Nassar, F., & Assy, N. (2010). Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 16(21), 2579-2588.
- Obika, M., & Noguchi, H. (2012). Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res*, 2012, 145754. doi:10.1155/2012/145754
- Oh, M. K., Winn, J., & Poordad, F. (2008). Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 28(5), 503-522. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03752.x
- Orlando, R., Azzalini, L., Orlando, S., & Lirussi, F. (2007). Bile acids for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD005160. doi:10.1002/14651858.CD005160.pub2
- Oya, J., Nakagami, T., Sasaki, S., Jimba, S., Murakami, K., Kasahara, T., . . . Iwamoto, Y. (2010). Intake of n-3 polyunsaturated fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study in Japanese men and women. *Eur J Clin Nutr*, 64(10), 1179-1185. doi:10.1038/ejcn.2010.139
- Palmer, C. N., Maglio, C., Pirazzi, C., Burza, M. A., Adiels, M., Burch, L., . . . Romeo, S. (2012). Paradoxical lower serum triglyceride levels and higher type 2 diabetes mellitus susceptibility in obese individuals with the PNPLA3 148M variant. *PLoS One*, 7(6), e39362. doi:10.1371/journal.pone.0039362
- Park, S. H., Kim, P. N., Kim, K. W., Lee, S. W., Yoon, S. E., Park, S. W., . . . Cho, E. Y. (2006). Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment. *Radiology*, 239(1), 105-112. doi:10.1148/radiol.2391050361
- Paschos, P., & Paletas, K. (2009). Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*, 13(1), 9-19.
- Perreault, L., Pan, Q., Mather, K. J., Watson, K. E., Hamman, R. F., & Kahn, S. E. (2012). Effect of regression from prediabetes to normal glucose regulation on long-term reduction in diabetes risk: results from the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*, 379(9833), 2243-2251. doi:S0140-6736(12)60525-X [pii] 10.1016/S0140-6736(12)60525-X
- Perseghin, G., Lattuada, G., De Cobelli, F., Ragogna, F., Ntali, G., Esposito, A., . . . Luzi, L. (2007). Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care*, 30(3), 683-688. doi:10.2337/dc06-2032
- Peter, A., Stefan, N., Cegan, A., Walenta, M., Wagner, S., Königsrainer, A., . . . Schleicher, E. (2011). Hepatic glucokinase expression is associated with lipogenesis and fatty liver in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(7), E1126-1130. doi:10.1210/jc.2010-2017
- Petersen, K. F., Dufour, S., Savage, D. B., Bilz, S., Solomon, G., Yonemitsu, S., . . . Shulman, G. I. (2007). The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(31), 12587-12594. doi:0705408104 [pii] 10.1073/pnas.0705408104
- Petta, S., Grimaudo, S., Cammà, C., Cabibi, D., Di Marco, V., Licata, G., . . . Craxì, A. (2012). IL28B and PNPLA3 polymorphisms affect histological liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 56(6), 1356-1362. doi:10.1016/j.jhep.2012.01.007
- Petta, S., Miele, L., Bugianesi, E., Cammà, C., Rosso, C., Boccia, S., . . . Craxì, A. (2014). Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 9(2), e87523. doi:10.1371/journal.pone.0087523
- Petta, S., Muratore, C., & Craxì, A. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis*, 41(9), 615-625. doi:10.1016/j.dld.2009.01.004

- Pollin, T. I., Damcott, C. M., Shen, H., Ott, S. H., Shelton, J., Horenstein, R. B., . . . Shuldiner, A. R. (2008). A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science*, 322(5908), 1702-1705. doi:10.1126/science.1161524
- Poynard, T., Ratziu, V., Charlotte, F., Messous, D., Munteanu, M., Imbert-Bismut, F., . . . group, C. s. (2006). Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholo steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*, 6, 34. doi:10.1186/1471-230X-6-34
- Puppala, J., Siddapuram, S. P., Akka, J., & Munshi, A. (2013). Genetics of nonalcoholic Fatty liver disease: an overview. *J Genet Genomics*, 40(1), 15-22. doi:10.1016/j.jgg.2012.12.001
- Puri, P., & Sanyal, A. J. (2012). Nonalacoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors and workup. *Clinical Liver Disease*, 1(4), 99-103. doi: 10.1002/cld.81
- Rametta, R., Mozzi, E., Dongiovanni, P., Motta, B. M., Milano, M., Roviario, G., . . . Valenti, L. (2013). Increased insulin receptor substrate 2 expression is associated with steatohepatitis and altered lipid metabolism in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*, 37(7), 986-992. doi:10.1038/ijo.2012.181
- Raptis, D. A., Fischer, M. A., Graf, R., Nanz, D., Weber, A., Moritz, W., . . . Clavien, P. A. (2012). MRI: the new reference standard in quantifying hepatic steatosis? *Gut*, 61(1), 117-127. doi:10.1136/gutjnl-2011-300155
- Raszeja-Wyszomirska, J., Kurzawski, G., Lawniczak, M., Miezynska-Kurtycz, J., & Lubinski, J. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and HFE gene mutations: a Polish study. *World J Gastroenterol*, 16(20), 2531-2536.
- Ratzu, V., Bellentani, S., Cortez-Pinto, H., Day, C., & Marchesini, G. (2010). A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*, 53(2), 372-384. doi:S0168-8278(10)00414-9 [pii] 10.1016/j.jhep.2010.04.008
- Ratzu, V., Charlotte, F., Heurtier, A., Gombert, S., Giral, P., Bruckert, E., . . . Group, L. S. (2005). Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 128(7), 1898-1906.
- Ratzu, V., Giral, P., Charlotte, F., Bruckert, E., Thibault, V., Theodorou, I., . . . Poynard, T. (2000). Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*, 118(6), 1117-1123.
- Ratzu, V., Goodman, Z., & Sanyal, A. (2015). Current efforts and trends in the treatment of NASH. *J Hepatol*, 62(1 Suppl), S65-75. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.041
- Ratzu, V., Massard, J., Charlotte, F., Messous, D., Imbert-Bismut, F., Bonyhay, L., . . . group, C. s. (2006). Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*, 6, 6. doi:10.1186/1471-230X-6-6
- Reeder, S. B., Cruite, I., Hamilton, G., & Sirlin, C. B. (2011). Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Magn Reson Imaging*, 34(4), 729-749. doi:10.1002/jmri.22580
- Reiner, Z., Catapano, A. L., De Backer, G., Graham, I., Taskinen, M. R., Wiklund, O., . . . Committees, E. C. f. P. G. C.-a.-. (2011). 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). *Eur Heart J*, 32(14), 1769-1818. doi:10.1093/eurheartj/ehr158
- Riquelme, A., Arrese, M., Soza, A., Morales, A., Baudrand, R., Pérez-Ayuso, R. M., . . . Nervi, F. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease and its association with obesity, insulin

- resistance and increased serum levels of C-reactive protein in Hispanics. *Liver Int*, 29(1), 82-88. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01823.x
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., . . . Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, 40(12), 1461-1465. doi:10.1038/ng.257
- Rosenberg, W. M., Voelker, M., Thiel, R., Becka, M., Burt, A., Schuppan, D., . . . Group, E. L. F. (2004). Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology*, 127(6), 1704-1713.
- Ruffillo, G., Fassio, E., Alvarez, E., Landeira, G., Longo, C., Domínguez, N., & Gualano, G. (2011). Comparison of NAFLD fibrosis score and BARD score in predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 54(1), 160-163. doi:10.1016/j.jhep.2010.06.028
- Ruhl, C. E., & Everhart, J. E. (2009). Elevated serum alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase and mortality in the United States population. *Gastroenterology*, 136(2), 477-485.e411. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.052
- Ryan, M. C., Abbasi, F., Lamendola, C., Carter, S., & McLaughlin, T. L. (2007). Serum alanine aminotransferase levels decrease further with carbohydrate than fat restriction in insulin-resistant adults. *Diabetes Care*, 30(5), 1075-1080. doi:10.2337/dc06-2169
- Ryan, M. C., Itsiopoulos, C., Thodis, T., Ward, G., Trost, N., Hofferberth, S., . . . Wilson, A. M. (2013). The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 59(1), 138-143. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.012
- Saab, S., Mallam, D., Cox, G. A., & Tong, M. J. (2014). Impact of coffee on liver diseases: a systematic review. *Liver Int*, 34(4), 495-504. doi:10.1111/liv.12304
- Saadeh, S., Younossi, Z. M., Remer, E. M., Gramlich, T., Ong, J. P., Hurley, M., . . . Sheridan, M. J. (2002). The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 123(3), 745-750. doi:S001650850200166X [pii]
- Sanyal, A. J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W. B., Contos, M. J., Sterling, R. K., . . . Clore, J. N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5), 1183-1192. doi:10.1053/gast.2001.23256
- Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., . . . CRN, N. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, 362(18), 1675-1685. doi:10.1056/NEJMoa0907929
- Sanyal, A. J., Friedman, S. L., McCullough, A. J., Dimick-Santos, L., Diseases, A. A. f. t. S. o. L., & Administration, U. S. F. a. D. (2015). Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology*, 61(4), 1392-1405. doi:10.1002/hep.27678
- Sass, D. A., Chang, P., & Chopra, K. B. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci*, 50(1), 171-180.
- Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., Burt, N. P., de Bakker, P. I., Chen, H., . . . Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, L. n. U., and Novartis Institutes of BioMedical Research. (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*, 316(5829), 1331-1336. doi:10.1126/science.1142358
- Sayiner, M., Koenig, A., Henry, L., & Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis*, 20(2), 205-214. doi:10.1016/j.cld.2015.10.001

- Schwenzer, N. F., Springer, F., Schraml, C., Stefan, N., Machann, J., & Schick, F. (2009). Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol*, 51(3), 433-445. doi:10.1016/j.jhep.2009.05.023
- Schwimmer, J. B., Celedon, M. A., Lavine, J. E., Salem, R., Campbell, N., Schork, N. J., . . . Sirlin, C. B. (2009). Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 136(5), 1585-1592. doi:10.1053/j.gastro.2009.01.050
- Schwimmer, J. B., Deutsch, R., Kahen, T., Lavine, J. E., Stanley, C., & Behling, C. (2006). Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*, 118(4), 1388-1393. doi:10.1542/peds.2006-1212
- Seki, S., Kitada, T., & Sakaguchi, H. (2005). Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatol Res*, 33(2), 132-134. doi:10.1016/j.hepres.2005.09.020
- Sevastianova, K., Santos, A., Kotronen, A., Hakkarainen, A., Makkonen, J., Silander, K., . . . Yki-Järvinen, H. (2012). Effect of short-term carbohydrate overfeeding and long-term weight loss on liver fat in overweight humans. *Am J Clin Nutr*, 96(4), 727-734. doi:10.3945/ajcn.112.038695
- Sharifnia, T., Antoun, J., Verriere, T. G., Suarez, G., Wattacheril, J., Wilson, K. T., . . . Flynn, C. R. (2015). Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309(4), G270-278. doi:10.1152/ajpgi.00304.2014
- Shen, J. H., Li, Y. L., Li, D., Wang, N. N., Jing, L., & Huang, Y. H. (2015). The rs738409 (I148M) variant of the PNPLA3 gene and cirrhosis: a meta-analysis. *J Lipid Res*, 56(1), 167-175. doi:10.1194/jlr.M048777
- Shen, N., Wang, P., & Yan, W. (2016). Sleep Duration and the Risk of Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*, 6, 31956. doi:10.1038/srep31956
- Shi, L., Liu, Z. W., Li, Y., Gong, C., Zhang, H., Song, L. J., . . . Li, M. (2012). The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu. *Biomed Environ Sci*, 25(4), 383-391. doi:10.3967/0895-3988.2012.04.002
- Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., & Mizuno, Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 226(2), 561-565. doi:10.1006/bbrc.1996.1394
- Simonen, P., Kotronen, A., Hallikainen, M., Sevastianova, K., Makkonen, J., Hakkarainen, A., . . . Yki-Järvinen, H. (2011). Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol*, 54(1), 153-159. doi:10.1016/j.jhep.2010.05.037
- Singal, A. G., Manjunath, H., Yopp, A. C., Beg, M. S., Marrero, J. A., Gopal, P., & Waljee, A. K. (2014). The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 109(3), 325-334. doi:10.1038/ajg.2013.476
- Sofi, F., & Casini, A. (2014). Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: new therapeutic option around the corner? *World J Gastroenterol*, 20(23), 7339-7346. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7339
- Sofi, F., Gianfrandi, I., Cesari, F., Corsani, I., Abbate, R., Gensini, G. F., & Casini, A. (2010). Effects of a 1-year dietary intervention with n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched olive

- oil on non-alcoholic fatty liver disease patients: a preliminary study. *Int J Food Sci Nutr*, 61(8), 792-802. doi:10.3109/09637486.2010.487480
- Sookoian, S., Castaño, G. O., Burgueño, A. L., Gianotti, T. F., Rosselli, M. S., & Pirola, C. J. (2009). A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res*, 50(10), 2111-2116. doi:10.1194/jlr.P900013-JLR200
- Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2011). 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*, 53(6), 1883-1894. doi:10.1002/hep.24283
- Souza, M. R., Diniz, M. e. F., Medeiros-Filho, J. E., & Araújo, M. S. (2012). Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol*, 49(1), 89-96.
- Spadaro, L., Magliocco, O., Spampinato, D., Piro, S., Oliveri, C., Alagona, C., . . . Purrello, F. (2008). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*, 40(3), 194-199. doi:10.1016/j.dld.2007.10.003
- Sparsø, T., Andersen, G., Nielsen, T., Burgdorf, K. S., Gjesing, A. P., Nielsen, A. L., . . . Pedersen, O. (2008). The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51(1), 70-75. doi:10.1007/s00125-007-0865-z
- Speliotes, E. K., Butler, J. L., Palmer, C. D., Voight, B. F., Hirschhorn, J. N., Consortium, G., . . . CRN, N. (2010). PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology*, 52(3), 904-912. doi:10.1002/hep.23768
- Speliotes, E. K., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., Meigs, J. B., Sahani, D. V., . . . Fox, C. S. (2010). Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study. *Hepatology*, 51(6), 1979-1987. doi:10.1002/hep.23593
- Speliotes, E. K., Yerges-Armstrong, L. M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L. J., Palmer, C. D., . . . Consortium, G. (2011). Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet*, 7(3), e1001324. doi:10.1371/journal.pgen.1001324
- St George, A., Bauman, A., Johnston, A., Farrell, G., Chey, T., & George, J. (2009). Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 50(1), 68-76. doi:10.1002/hep.22940
- Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., . . . Investigators, A. C. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*, 43(6), 1317-1325. doi:10.1002/hep.21178
- Stojkovic, I. A., Ericson, U., Rukh, G., Riddestråle, M., Romeo, S., & Orho-Melander, M. (2014). The PNPLA3 Ile148Met interacts with overweight and dietary intakes on fasting triglyceride levels. *Genes Nutr*, 9(2), 388. doi:10.1007/s12263-014-0388-4
- Sung, K. C., Wild, S. H., & Byrne, C. D. (2014). Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension. *J Hepatol*, 60(5), 1040-1045. doi:10.1016/j.jhep.2014.01.009
- Szczepaniak, L. S., Nurenberg, P., Leonard, D., Browning, J. D., Reingold, J. S., Grundy, S., . . . Dobbins, R. L. (2005). Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride

- content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(2), E462-468. doi:10.1152/ajpendo.00064.2004
- Tahan, V., Canbakan, B., Balci, H., Dane, F., Akin, H., Can, G., . . . Senturk, H. (2008). Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology*, 55(85), 1433-1438.
- Takaki, A., Kawai, D., & Yamamoto, K. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*, 14(10), 20704-20728. doi:10.3390/ijms141020704
- Talwalkar, J. A., Yin, M., Fidler, J. L., Sanderson, S. O., Kamath, P. S., & Ehman, R. L. (2008). Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis: emerging clinical applications. *Hepatology*, 47(1), 332-342. doi:10.1002/hep.21972
- Tanaka, N., Sano, K., Horiuchi, A., Tanaka, E., Kiyosawa, K., & Aoyama, T. (2008). Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*, 42(4), 413-418. doi:10.1097/MCG.0b013e31815591aa
- Tang, C. S., Zhang, H., Cheung, C. Y., Xu, M., Ho, J. C., Zhou, W., . . . Gao, W. (2015). Exome-wide association analysis reveals novel coding sequence variants associated with lipid traits in Chinese. *Nat Commun*, 6, 10206. doi:10.1038/ncomms10206
- Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R., Rodella, S., Zoppini, G., Pichiri, I., . . . Bonora, E. (2010). Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *J Hepatol*, 53(4), 713-718. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.030
- Tenenbaum, A., Klempfner, R., & Fisman, E. Z. (2014). Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Diabetol*, 13, 159. doi:10.1186/s12933-014-0159-y
- Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., & Tiengo, A. (2009). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19(4), 291-302. doi:10.1016/j.numecd.2008.12.015
- Thoma, C., Day, C. P., & Trenell, M. I. (2012). Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol*, 56(1), 255-266. doi:10.1016/j.jhep.2011.06.010
- Tiikkainen, M., Tamminen, M., Häkkinen, A. M., Bergholm, R., Vehkavaara, S., Halavaara, J., . . . Yki-Järvinen, H. (2002). Liver-fat accumulation and insulin resistance in obese women with previous gestational diabetes. *Obes Res*, 10(9), 859-867. doi:10.1038/oby.2002.118
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5), 1836-1846. doi:10.1002/hep.24001
- TM6SF2 Gene. Retrieved from <http://www.genecards.org>
- Tokushige, K., Takakura, M., Tsuchiya-Matsushita, N., Tani, M., Hashimoto, E., & Shiratori, K. (2007). Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis. *J Hepatol*, 46(6), 1104-1110. doi:10.1016/j.jhep.2007.01.028
- Torres, D. M., Williams, C. D., & Harrison, S. A. (2012). Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(8), 837-858. doi:10.1016/j.cgh.2012.03.011
- Trovato, F. M., Martines, G. F., Brischetto, D., Catalano, D., Musumeci, G., & Trovato, G. M. (2016). Fatty liver disease and lifestyle in youngsters: diet, food intake frequency, exercise, sleep shortage and fashion. *Liver Int*, 36(3), 427-433. doi:10.1111/liv.12957
- Trovato, F. M., Martines, G. F., Brischetto, D., Trovato, G., & Catalano, D. (2016). Neglected features of lifestyle: Their relevance in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 8(33), 1459-1465. doi:10.4254/wjh.v8.i33.1459

- Tönjes, A., Scholz, M., Loeffler, M., & Stumvoll, M. (2006). Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma with Pre-diabetic phenotypes: meta-analysis of 57 studies on nondiabetic individuals. *Diabetes Care*, 29(11), 2489-2497. doi:10.2337/dc06-0513
- Ueno, T., Sugawara, H., Sujaku, K., Hashimoto, O., Tsuji, R., Tamaki, S., . . . Tanikawa, K. (1997). Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol*, 27(1), 103-107.
- Urdzik, J., Bjerner, T., Wanders, A., Weis, J., Duraj, F., Haglund, U., & Norén, A. (2012). The value of pre-operative magnetic resonance spectroscopy in the assessment of steatohepatitis in patients with colorectal liver metastasis. *J Hepatol*, 56(3), 640-646. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.006
- Valenti, L., Al-Serri, A., Daly, A. K., Galmozzi, E., Rametta, R., Dongiovanni, P., . . . Day, C. P. (2010). Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51(4), 1209-1217. doi:10.1002/hep.23622
- Valenti, L., Fracanzani, A. L., Bugianesi, E., Dongiovanni, P., Galmozzi, E., Vanni, E., . . . Fargion, S. (2010). HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 138(3), 905-912. doi:10.1053/j.gastro.2009.11.013
- Valenti, L., Fracanzani, A. L., Dongiovanni, P., Santorelli, G., Branchi, A., Taioli, E., . . . Fargion, S. (2002). Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122(2), 274-280.
- Valtueña, S., Pellegrini, N., Ardigò, D., Del Rio, D., Numeroso, F., Scazzina, F., . . . Brighenti, F. (2006). Dietary glycemic index and liver steatosis. *Am J Clin Nutr*, 84(1), 136-142; quiz 268-139.
- van der Poorten, D., Samer, C. F., Ramezani-Moghadam, M., Coulter, S., Kacevska, M., Schrijnders, D., . . . George, J. (2013). Hepatic fat loss in advanced nonalcoholic steatohepatitis: are alterations in serum adiponectin the cause? *Hepatology*, 57(6), 2180-2188. doi:10.1002/hep.26072
- van Werven, J. R., Marsman, H. A., Nederveen, A. J., Smits, N. J., ten Kate, F. J., van Gulik, T. M., & Stoker, J. (2010). Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and point-resolved 1H MR spectroscopy. *Radiology*, 256(1), 159-168. doi:10.1148/radiol.10091790
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*, 34(3), 274-285. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x
- Vuppalanchi, R., & Chalasani, N. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*, 49(1), 306-317. doi:10.1002/hep.22603
- Walsh, M. J. (2010). Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection (Br J Surg 2010; 97: 1331-1339). *Br J Surg*, 97(9), 1339. doi:10.1002/bjs.7195
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*, 14(9), 581-597. doi:10.1038/nrc3800
- Wang, R. T., Koretz, R. L., & Yee, H. F. (2003). Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review. *Am J Med*, 115(7), 554-559.

- Wang, Y., Li, Y. Y., Nie, Y. Q., Zhou, Y. J., Cao, C. Y., & Xu, L. (2013). Association between metabolic syndrome and the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med*, 6(1), 77-84. doi:10.3892/etm.2013.1090
- Wang, Z., Xu, M., Hu, Z., Hultström, M., & Lai, E. (2014). Sex-specific prevalence of fatty liver disease and associated metabolic factors in Wuhan, south central China. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 26(9), 1015-1021. doi:10.1097/MEG.0000000000000151
- Weinsier, R. L., Wilson, L. J., & Lee, J. (1995). Medically safe rate of weight loss for the treatment of obesity: a guideline based on risk of gallstone formation. *Am J Med*, 98(2), 115-117. doi:10.1016/S0002-9343(99)80394-5
- Westerbacka, J., Lammi, K., Häkkinen, A. M., Rissanen, A., Salminen, I., Aro, A., & Yki-Järvinen, H. (2005). Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(5), 2804-2809. doi:10.1210/jc.2004-1983
- WHO. (8-11 December 2008). *Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation.*, Geneva.
- Wilkins, T., Tadmok, A., Hepburn, I., & Schade, R. R. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis and management. *Am Fam Physician*, 88(1), 35-42.
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M., . . . Harrison, S. A. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140(1), 124-131. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.038
- Willner, I. R., Waters, B., Patil, S. R., Reuben, A., Morelli, J., & Riely, C. A. (2001). Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol*, 96(10), 2957-2961. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04667.x
- Wong, G. L. (2013). Update of liver fibrosis and steatosis with transient elastography (Fibroscan). *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 1(1), 19-26. doi:10.1093/gastro/got007
- Wong, V. W., Vergniol, J., Wong, G. L., Foucher, J., Chan, H. L., Le Bail, B., . . . de Lédinghen, V. (2010). Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51(2), 454-462. doi:10.1002/hep.23312
- Yamakawa-Kobayashi, K., Ishiguro, H., Arinami, T., Miyazaki, R., & Hamaguchi, H. (2002). A Val227Ala polymorphism in the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) gene is associated with variations in serum lipid levels. *J Med Genet*, 39(3), 189-191.
- Yamamoto, M., Iwasa, M., Iwata, K., Kaito, M., Sugimoto, R., Urawa, N., . . . Adachi, Y. (2007). Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 22(4), 498-503. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04548.x
- Yeniova, A. O., Küçükazman, M., Ata, N., Dal, K., Kefeli, A., Başığit, S., . . . Beyan, E. (2014). High-sensitivity C-reactive protein is a strong predictor of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology*, 61(130), 422-425.
- Yokohama, S., Yoneda, M., Haneda, M., Okamoto, S., Okada, M., Aso, K., . . . Nakamura, K. (2004). Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 40(5), 1222-1225. doi:10.1002/hep.20420
- Yoneda, M., Fujita, K., Inamori, M., Tamano, M., Hiriishi, H., Hiraishi, H., & Nakajima, A. (2007). Transient elastography in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Gut*, 56(9), 1330-1331. doi:10.1136/gut.2007.126417
- Yoneda, M., Hotta, K., Nozaki, Y., Endo, H., Uchiyama, T., Mawatari, H., . . . Nakajima, A. (2009). Association between angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 29(7), 1078-1085. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.01988.x

- Younossi, Z. M., Gramlich, T., Matteoni, C. A., Boparai, N., & McCullough, A. J. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2(3), 262-265.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73-84. doi:10.1002/hep.28431
- Younossi, Z. M., Page, S., Rafiq, N., Birerdinc, A., Stepanova, M., Hossain, N., . . . Baranova, A. (2011). A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis. *Obes Surg*, 21(4), 431-439. doi:10.1007/s11695-010-0204-1
- Younossi, Z. M., Reyes, M. J., Mishra, A., Mehta, R., & Henry, L. (2014). Systematic review with meta-analysis: non-alcoholic steatohepatitis - a case for personalised treatment based on pathogenic targets. *Aliment Pharmacol Ther*, 39(1), 3-14. doi:10.1111/apt.12543
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., & Srishord, M. (2011). Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9(6), 524-530.e521; quiz e560. doi:10.1016/j.cgh.2011.03.020
- Yu, J., Marsh, S., Hu, J., Feng, W., & Wu, C. (2016). The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2862173. doi:10.1155/2016/2862173
- Zain, S. M., Mohamed, Z., Mahadeva, S., Rampal, S., Basu, R. C., Cheah, P. L., . . . Mohamed, R. (2013). Susceptibility and gene interaction study of the angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) gene polymorphisms with non-alcoholic fatty liver disease in a multi-ethnic population. *PLoS One*, 8(3), e58538. doi:10.1371/journal.pone.0058538
- Zein, C. O., Unalp, A., Colvin, R., Liu, Y. C., McCullough, A. J., & Network, N. S. C. R. (2011). Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 54(4), 753-759. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.040
- Zelber-Sagi, S., Lotan, R., Shlomai, A., Webb, M., Harrari, G., Buch, A., . . . Oren, R. (2012). Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol*, 56(5), 1145-1151. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.011
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Blendis, L., Halpern, Z., & Oren, R. (2007). Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol*, 47(5), 711-717. doi:10.1016/j.jhep.2007.06.020
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Zvibel, I., Goldiner, I., . . . Oren, R. (2008). Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology*, 48(6), 1791-1798. doi:10.1002/hep.22525
- Zelber-Sagi, S., Ratziu, V., & Oren, R. (2011). Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*, 17(29), 3377-3389. doi:10.3748/wjg.v17.i29.3377
- Zhang, L., You, W., Zhang, H., Peng, R., Zhu, Q., Yao, A., . . . Wu, J. (2015). PNPLA3 polymorphisms (rs738409) and non-alcoholic fatty liver disease risk and related phenotypes: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*, 30(5), 821-829. doi:10.1111/jgh.12889
- Zhang, Q. Q., & Lu, L. G. (2015). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Dyslipidemia, Risk for Cardiovascular Complications, and Treatment Strategy. *J Clin Transl Hepatol*, 3(1), 78-84. doi:10.14218/JCTH.2014.00037

- Zhu, F. S., Liu, S., Chen, X. M., Huang, Z. G., & Zhang, D. W. (2008). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids from seal oils on nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia. *World J Gastroenterol*, 14(41), 6395-6400.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., & Sanyal, A. J. (2007). Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*, 86(2), 285-300.