



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

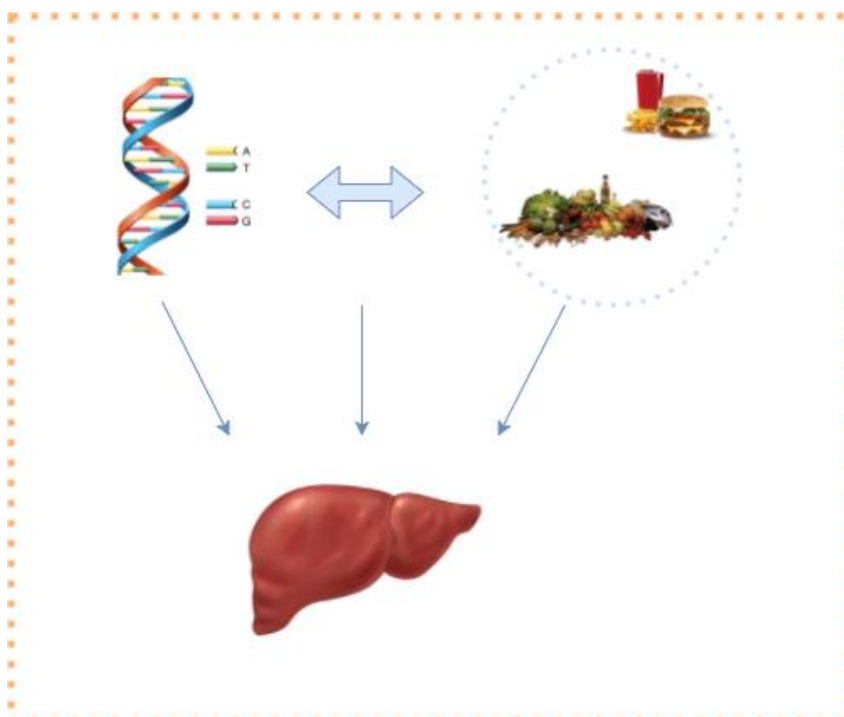
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

Διπλωματική Εργασία

**Τίτλος «Αποτίμηση των διατροφικών συνηθειών και της αλληλεπίδρασης
τους με πολυμορφισμούς γονιδίων στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του
ήπατος. Ελληνική NAFLD μελέτη»**

Μπόρσα Δήμητρα



Αθήνα, 2017

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δεδούσης Γεώργιος (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τσίγκος Κωνσταντίνος

Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Καλιώρα Ανδριάννα

**Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**«Αποτίμηση των διατροφικών συνηθειών και της
αλληλεπίδρασης τους με πολυμορφισμούς γονιδίων
στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος.
Ελληνική NAFLD μελέτη.»**

Η Μπόρσα Δήμητρα

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

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κ. Δεδούση Γεώργιο για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ένα ειλικρινές ευχαριστώ οφείλω και στην κ. Καλαφάτη Ιωάννα-Παναγιώτα για τη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου καθώς και το Μελάκη Αλέξανδρο για την τεράστια υπομονή και την ειλικρινή και συνεχή υποστήριξη αυτά τα χρόνια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	14
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
1.1 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)	15
1.1.1 Ορισμός	15
1.1.2 Επιδημιολογία	17
1.1.3 Κλινική εικόνα	19
1.1.4 Εργαστηριακή εκτίμηση	19
1.1.5 Διάγνωση.....	20
1.1.6 Παθοφυσιολογία	24
1.1.7 Παράγοντες κινδύνου.....	34
1.2 Ο ρόλος της διατροφής ως προς τη NAFLD	36
1.2.1 Ενεργειακή πρόσληψη	36
1.2.2 Μακροθρεπτικά συστατικά	36
1.2.3 Μικροθρεπτικά συστατικά	42
1.2.4 Ομάδες τροφίμων	43
1.2.5 Διατροφικά πρότυπα.....	47
1.2.6 Ανάγκη για αξιολόγηση του ρόλου των διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD	51
1.3 Ο ρόλος των γενετικών πολυμορφισμών ως προς τη NAFLD	52
1.3.1 Γονίδιο PNPLA3	53
1.3.2 Γονίδιο TM6SF2	55
1.3.3 Γονίδιο GCKR	57
1.3.4 Γονίδιο MBOAT7.....	57
1.3.5 Γονίδια PPP1R3B και LYPLAL1	58
1.3.6 Γονίδια GC και LCP1.....	59
1.3.7 Γονίδιο TNFα.....	60
1.3.8 Γονίδιο APOC3	60

1.4 Αλληλεπίδραση γενετικών πολυμορφισμών και διατροφής ως προς τη NAFLD	61
1.4.1 Μελέτες σε ανθρώπους	61
1.4.2 Μελέτες σε ζωικά μοντέλα	64
1.4.3 Ανάγκη για αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης γενετικών πολυμορφισμών και διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD	65
1.5 Βιβλιογραφικό κενό	66
2.ΣΚΟΠΟΣ	67
3.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	68
3.1 Σχεδιασμός	68
3.2 Συλλογή δείγματος	68
3.3 Αξιολόγηση	69
3.3.1 Αιμοληψία	69
3.3.2 Διάγνωση NAFLD	73
3.3.3 Δημογραφικά χαρακτηριστικά και ιστορικό	74
3.3.4 Ανθρωπομετρία	75
3.3.5 Εκτίμηση αρτηριακής πίεσης	75
3.3.6 Αξιολόγηση διατροφικών συνηθειών	76
3.3.7 Αξιολόγηση σωματικής δραστηριότητας	76
3.4 Στατιστική ανάλυση	77
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	114

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή-Σκοπός: Η αιτιολογία της NAFLD συνδέεται με συμπεριφοριστικούς παράγοντες και με διαφορές στη γενετική σύσταση. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αποτίμηση των διατροφικών συνηθειών υπό μορφή διατροφικών προτύπων σε ασθενείς με NAFLD και η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των διατροφικών προτύπων αυτών με τους πιο σημαντικούς πολυμορφισμούς για τη νόσο.

Υλικά-Μέθοδος: Η μελέτη περιελάμβανε 134 NAFLD ασθενείς και 217 μάρτυρες. Η διάγνωση της NAFLD έγινε με υπερηχογράφημα υπό απουσία δευτεροπαθών αιτιών. Η διατροφή αξιολογήθηκε με ημιποσοτικό FFQ και έγινε ανάλυση PCA για εξαγωγή διατροφικών προτύπων. Ακολούθησε ομαδοποίηση σε τεταρτημόρια για κάθε διατροφικό πρότυπο. Η γενετική ανάλυση έγινε με γονοτύπηση για τους πολυμορφισμούς rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και rs58542926 του γονιδίου TM6SF2 και τα άτομα διαχωρίστηκαν σε μη φορείς και φορείς των αλληλόμορφων κινδύνου. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε βιοχημική και αιματολογική ανάλυση, καταγραφή δημογραφικών χαρακτηριστικών, ατομικού και οικογενειακού ιστορικού, ανθρωπομετρία, εκτίμηση αρτηριακής πίεσης και αξιολόγηση σωματικής δραστηριότητας.

Αποτελέσματα: Η ανάλυση διατροφικών προτύπων έδειξε πως τα άτομα με υψηλότερη υιοθέτηση ενός Δυτικού προτύπου είχαν υψηλότερη πιθανότητα για τη NAFLD σε σχέση με τα άτομα με τη χαμηλότερη υιοθέτηση (OR:2.104, p: 0.045). Αντίθετα, η υψηλότερη υιοθέτηση ενός προτύπου πλούσιου σε πρωτεΐνη, μείωνε το NAFLD Fibrosis Score (NFS) (r:-0.116, p:0.037). Η γενετική ανάλυση έδειξε ότι οι ομοζυγώτες για τα συχνά αλληλόμορφα των rs738409 και rs58542926 πολυμορφισμών με την υψηλότερη υιοθέτηση του Δυτικού προτύπου είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες με τη χαμηλότερη υιοθέτησή του (OR:3.078, p: 0.043 και OR:2.292, p: 0.041 αντίστοιχα). Επιπλέον, στους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3, η υψηλότερη υιοθέτηση προτύπου πλούσιου σε πρωτεΐνη μείωνε το NFS (r:-0.168, p:0.041). Τα αποτελέσματα παρέμειναν στατιστικά σημαντικά έπειτα από διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες.

Συμπεράσματα: Ταυτοποιήθηκαν διατροφικά πρότυπα που σχετίζονται με τη NAFLD. Η υιοθέτηση ενός Δυτικού προτύπου διατροφής σχετίζεται θετικά με τη NAFLD ενώ η υιοθέτηση προτύπου πλούσιου σε πρωτεΐνη φαίνεται να είναι προστατευτική. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε πως το πρότυπο πλούσιο σε πρωτεΐνη είναι προστατευτικό και για τους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3. Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν τη διατροφική και γενετική αιτιολογία της NAFLD και την αλληλεπίδραση της διατροφής με τους πιο σημαντικούς πολυμορφισμούς για τη νόσο.

Λέξεις-κλειδιά: μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, διατροφικά πρότυπα, γονίδιο PNPLA3, γονίδιο TM6SF2, αλληλεπίδραση γονιδίων-διατροφής

ABSTRACT

Introduction-Objective: The onset of NAFLD is associated with lifestyle factors and variation in genetic make-up. The purpose of the present study is to evaluate the dietary habits in the form of dietary patterns in NAFLD patients and to investigate the interaction between these dietary patterns and the most NAFLD-related genetic polymorphisms.

Methods: The study included 134 NAFLD patients and 217 controls. The diagnosis of NAFLD was conducted with ultrasonography in the absence of secondary causes. Diet was evaluated by FFQ and PCA analysis was conducted for the identification of dietary patterns. Dietary pattern scores were analyzed in quartiles. The genetic analysis was conducted with genotyping for the polymorphisms rs738409 of PNPLA3 gene and rs58542926 of TM6SF2 gene. The sample was divided in non-carriers and carriers for the risk alleles. In addition, there was analysis of biochemical and hematological parameters as well as assessment of demographic characteristics, individual and family medical history, anthropometric measurements, blood pressure and physical activity level.

Results: The analysis of dietary patterns indicated that subjects with the highest adherence to Western pattern had greater likelihood for NAFLD compared with those with the lowest adherence (OR: 2.104, p:0.045). However, a higher adherence to a pattern with high protein, reduced NAFLD Fibrosis Score (NFS) (r :-0.116, p:0.037). Genetic analysis revealed that the homozygous for the major alleles of rs738409 and rs58542926 polymorphisms who reported the highest adherence to Western pattern had greater likelihood for NAFLD compared to those with the lowest adherence (OR:3.078, p:0.043 and OR:2.292, p:0.041 respectively). Additionally, in carriers of risk allele of the polymorphism rs738409 of PNPLA3 gene, higher adherence to the pattern with high protein reduced NFS (r :-0.168, p:0.041). The results remained statistically significant after adjustment for confounding factors.

Conclusion: Dietary patterns associated with NAFLD were identified. Adherence to a Western pattern is positively associated with NAFLD whereas adherence to a pattern with high protein seems to be protective. Further analysis indicated that the pattern with high protein seems to be

protective also for the carriers of risk allele of PNPLA3 rs738409. The results shed light on the dietary and genetic etiology of NAFLD and the interaction between diet and the most important NAFLD-related genes.

Key-words: non-alcoholic fatty liver disease, dietary patterns, gene PNPLA3, gene TM6SF2, gene-diet interaction

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Διαγνωστικά κριτήρια για το μεταβολικό σύνδρομο	16
Πίνακας 1.2. Δευτεροπαθή αίτια για ηπατική στεάτωση	23
Πίνακας 1.3. Κυριότεροι γενετικοί πολυμορφισμοί για τη NAFLD	53
Πίνακας 4.1. Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος	78
Πίνακας 4.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος.....	81
Πίνακας 4.3. Δείκτες εκτίμησης της NAFLD στο δείγμα.....	82
Πίνακας 4.4. Δείκτης Goldberg στο δείγμα	83
Πίνακας 4.5. Βάρη (factor loadings) των ομάδων τροφίμων για τα 4 διατροφικά πρότυπα	84
Πίνακας 4.6. Κατανάλωση από τα διατροφικά πρότυπα στο δείγμα.....	85
Πίνακας 4.7. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο	88
Πίνακας 4.8. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS.....	90
Πίνακας 4.9. Γενετικοί πολυμορφισμοί στο δείγμα.....	91
Πίνακας 4.10. Γενετικοί πολυμορφισμοί και μοντέλο πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των γενετικών πολυμορφισμών ως προς τη νόσο.....	92
Πίνακας 4.11. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3	93
Πίνακας 4.12. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3	95
Πίνακας 4.13. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.....	97

Πίνακας 4.14. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.....	99
Πίνακας 4.15. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3	101
Πίνακας 4.16. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3	102
Πίνακας 4.17. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.....	104
Πίνακας 4.18. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.....	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα α. Η φυσική πορεία της NAFLD	15
Σχήμα β. Η υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων για την εμφάνιση της NAFLD.....	26

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

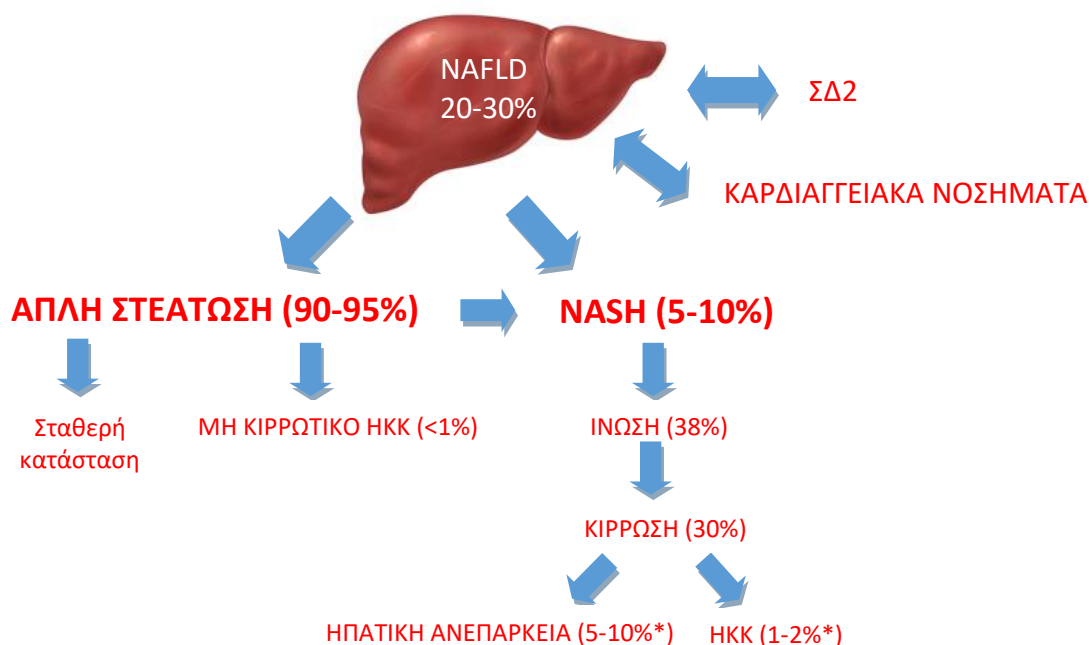
AFLD	Αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος
ALP	Αλκαλική φωσφατάση
ALT	Αμινοτρανσφεράση αλανίνης
AST	Αμινοτρανσφεράση ασπαρτικού οξέος
DNL	De novo λιπογένεση
FFAs	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
GC	Γλυκοκινάση
GGT	γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση
GI	Γλυκαιμικός δείκτης
GWAS	Μελέτη ανάλυσης όλου του γονιδιώματος
HFCS	Σιρόπι καλαμποκιού υψηλής φρουκτόζης
IL6	Ιντερλευκίνη 6
IR	Ινσουλινοαντίσταση
LPS	Λιποπολυσακχαρίτες
MUFA	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NAFL	Απλή ηπατική στεάτωση
NAFLD	Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος
NASH	Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RCTS	Τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες
ROS	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
TG	Τριγλυκερίδια
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης α
UPR	Ξεδιπλωμένη πρωτεϊνική απόκριση
ΔΜΣ	Δείκτης μάζας σώματος
ΜΣ	Μεταβολικό σύνδρομο
ΣΔ2	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)

1.1.1. Ορισμός

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease-NAFLD) είναι η νόσος που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λίπους στο ήπαρ σε περισσότερο από το 5% των ηπατοκυττάρων υπό απουσία δευτεροπαθών αιτιών όπως η ιογενής λοίμωξη, τα ηπατοτοξικά φάρμακα, άλλες χρόνιες ηπατικές νόσοι και η υπερβολική πρόσληψη αλκοόλ [1]. Περιλαμβάνει ευρύ φάσμα ηπατικών παθολογικών καταστάσεων, από την απλή στεάτωση (Non Alcoholic Fatty Liver-NAFL) έως τη στεατοηπατίτιδα (Non Alcoholic Steatohepatitis-NASH), η οποία χαρακτηρίζεται επιπλέον από ηπατοκυτταρικό τραυματισμό και φλεγμονή, καθώς και την ίνωση και την κίρρωση με τις ακόλουθες κλινικές συνέπειες τους [2]. Η απλή στεάτωση δε σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα ενώ η NASH αυξάνει κατά πολύ τον κίνδυνο για ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [3].



Σχήμα α. Η φυσική πορεία της NAFLD [3]

Η πλειοψηφία των ασθενών με NAFLD εμφανίζει απλή ηπατική στεάτωση η οποία δε σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα. Μόνο το 5-10% των ασθενών με NAFLD θα εμφανίσουν NASH εκ των οποίων το 30% θα εμφανίσει κίρρωση. (*σε 10 χρόνια από την εμφάνιση της κίρρωσης, ΗΚΚ ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα)

Η NAFLD συχνά αναγνωρίζεται ως η ηπατική έκφραση του μεταβολικού συνδρόμου (ΜΣ) [4]. Πρόκειται για ομάδα παραγόντων κινδύνου, η παρουσία των οποίων αυξάνει την πιθανότητα για καρδιαγγειακά νοσήματα, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και τις επιπλοκές τους [5]. Όλο και περισσότερα δεδομένα δείχνουν πως η σχέση μεταξύ της νόσου και του ΜΣ είναι αμφίδρομη καθώς η NAFLD προδιαθέτει για την εμφάνιση των χαρακτηριστικών του ΜΣ, ενώ αυτά δύναται να οξύνουν τη νόσο ή να αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης σε άτομα που προηγουμένως δεν εμφάνιζαν NAFLD. Κοινός παθογενετικός μηχανισμός είναι η ινσουλινοαντίσταση (insulin resistance-IR) [4]. Η εμφάνιση της νόσου σχετίζεται ισχυρά με τα επιμέρους χαρακτηριστικά του ΜΣ ανεξάρτητα από την παχυσαρκία [6].

Πίνακας 1.1 Διαγνωστικά κριτήρια για το ΜΣ [5]

Παρουσία τουλάχιστον 3 από τα παρακάτω:	
Κριτήρια	Τιμή
Αυξημένη Περιφέρεια Μέσης	Αντίστοιχα με τον ορισμό για κάθε πληθυσμό, μέχρι να υπάρξουν σαφή δεδομένα: >94 cm για τους άνδρες >80 cm για τις γυναίκες
Αυξημένα Τριγλυκερίδια	>150mg/dl ή υπολιπιδαιμική θεραπεία
Μειωμένη HDL Χοληστερόλη	<40mg/dl για τους άνδρες <50mg/dl για τις γυναίκες ή υπολιπιδαιμική θεραπεία
Αρτηριακή Υπέρταση	>130/85 mm Hg ή αντιυπερτασική θεραπεία
Αυξημένη Γλυκόζη Νηστείας	>100mg/dl ή αντιδιαβητική θεραπεία

Αξιοσημείωτο, ωστόσο, είναι ότι σε κάποιες περιπτώσεις, η εμφάνιση της NAFLD δε συνδέεται με την IR και τα χαρακτηριστικά του ΜΣ, κάτι το οποίο οφείλεται στην παρουσία συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών οι οποίοι διαμεσολαβούν με διαφορετικό μηχανισμό την εμφάνιση της NAFLD [4].

1.1.2. Επιδημιολογία

Η NAFLD είναι όλο και συχνότερη νόσος παγκοσμίως. Αποτελεί την κύρια αιτία για χρόνια ηπατική νόσο και είναι η δεύτερη πιο συχνή ένδειξη για ηπατική μεταμόσχευση [7]. Σχετίζεται στενά με την παχυσαρκία και το ΣΔ, καταστάσεις οι οποίες έχουν λάβει επιδημικές διαστάσεις, και υπολογίζεται ότι 1 δισεκατομμύριο άτομα παγκοσμίως εμφανίζουν NAFLD [8].

Μετά-ανάλυση έδειξε πως η συχνότητα εμφάνισης της νόσου με απεικονιστική διάγνωση στον ενήλικο πληθυσμό είναι 25%. Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός της NAFLD είναι 24%, παρόμοιος με αυτόν στις ΗΠΑ [9]. Ειδικότερα στην Ελλάδα, μελέτη έδειξε πως η NAFLD έχει συχνότητα εμφάνισης 31% [10]. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να αναφερθεί πως, παρόλο την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της NAFLD, ένα μικρό ποσοστό (5-10%) των ατόμων θα οδηγηθεί σε NASH με τον επακόλουθο αυξημένο κίνδυνο για επιπλοκές και θνησιμότητα [3].

Ο επιπολασμός της NAFLD διαφέρει ανά φυλή και εθνικότητα καθώς οι Ισπανόφωνοι εμφανίζουν την υψηλότερη συχνότητα (45%) και οι μη Ισπανόφωνοι Λευκοί και οι Αφρικανοί ακολουθούν (33% και 24% αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή πιθανότατα είναι αποτέλεσμα διαφορετικών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων [11]. Όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο, ο πιο σημαντικός γενετικός πολυμορφισμός για τη NAFLD, ο οποίος είναι το αλληλόμορφο I148M του γονιδίου PNPLA3, έχει εξίσου διαφορετική συχνότητα εμφάνισης στις 3 εθνικότητες. Σε αντιστοιχία με τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, οι Ισπανόφωνοι έχουν την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού (49%) και οι μη Ισπανόφωνοι Λευκοί και οι Αφρικανοί ακολουθούν (23% και 17% αντίστοιχα) αναδεικνύοντας το ρόλο του γενετικού υποβάθρου [12].

Η NAFLD εμφανίζεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και η συχνότητα εμφάνισης της όπως και η σοβαρότητα της αυξάνουν όσο αυξάνει η ηλικία, με τους άνδρες σε ηλικία 40-65 έτη να έχουν την υψηλότερη εμφάνιση [1]. Όσον αφορά τα παιδιά και τους εφήβους, μετά-ανάλυση πρόσφατα έδειξε πως στο γενικό πληθυσμό η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι 7.6% ενώ είναι πολύ υψηλότερη, 34.2% σε παιδιά και εφήβους με κλινική παχυσαρκία, αναδεικνύοντας πως για την ηλικία 1-19 έτη η NAFLD σχετίζεται πολύ ισχυρά με την παχυσαρκία [13].

Σχετικά με το φύλο, ο επιπολασμός της νόσου έχει φανεί να είναι διπλάσιος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες αλλά υπάρχουν και αντιφατικά δεδομένα [1]. Είναι πολύ πιθανό ότι η νόσος επηρεάζει τα δύο φύλα με διαφορετικό τρόπο [14].

Η παχυσαρκία είναι ο πιο κοινός και καλά μελετημένος ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για τη NAFLD [1]. Σύμφωνα με μετά-ανάλυση, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας στους NAFLD ασθενείς και NASH ασθενείς είναι 51% και 82% αντίστοιχα [9]. Η συχνότητα εμφάνισης της NAFLD αυξάνεται από 16.4% στα άτομα με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) σε 75.8% στα παχύσαρκα άτομα [15].

Ο ΣΔ επίσης σχετίζεται στενά με τη NAFLD. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση η συχνότητα εμφάνισης του στους NAFLD ασθενείς και NASH ασθενείς είναι 23% και 47% αντίστοιχα, κάτι το οποίο υπερβαίνει τον επιπολασμό για το γενικό πληθυσμό και είναι παρόμοιος με αυτόν που έχει ο ΣΔ στα παχύσαρκα άτομα [9].

Η NAFLD επιπλέον σχετίζεται με τη δυσλιπιδαιμία και την αρτηριακή υπέρταση. Σύμφωνα με μετά-ανάλυση από τους NAFLD ασθενείς το 69% παρουσιάζει δυσλιπιδαιμία, το 41% υπερτριγλυκεριδαιμία και το 39% αρτηριακή υπέρταση [9].

Όσον αφορά το ΜΣ, το 90% των ασθενών με NAFLD έχει τουλάχιστον ένα χαρακτηριστικό του και το 33% έχει όλα τα χαρακτηριστικά του. Προτείνεται πως η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των χαρακτηριστικών του ΜΣ που έχει το άτομο [16].

1.1.3. Κλινική εικόνα

Η NAFLD αποτελεί ασυμπτωματική νόσο στην πλειοψηφία των ασθενών. Η διάγνωση της συμβαίνει κυρίως τυχαία έπειτα από μη φυσιολογικά ευρήματα σε εξετάσεις ρουτίνας, κατά τη διεξαγωγή υπερηχογραφήματος άνω κοιλίας αλλά μπορεί επίσης να διαγνωσθεί κατά την αξιολόγηση για το ΜΣ και κατά την εκτίμηση του κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα [17].

Η συμπτωματολογία, όταν υπάρχει, περιλαμβάνει κόπωση και ελαφρά ενόχληση στο πάνω δεξί τεταρτημόριο της κοιλιακής χώρας. Το πιο συχνό κλινικό εύρημα είναι η ηπατομεγαλία. Σε προχωρημένη κίρρωση, ως εξέλιξη της NAFLD, η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με αυτή που γενικά προκαλεί η κίρρωση και περιλαμβάνει μώλωπες, σπληνομεγαλία, ασκίτη και ίκτερο [17].

1.1.4. Εργαστηριακή εκτίμηση

Η υπερβαρότητα ή η παχυσαρκία μαζί με αυξημένη γλυκόζη νηστείας, χαμηλή HDL χοληστερόλη και αυξημένα τριγλυκερίδια (TG) οδηγούν σε αυξημένη πιθανότητα για τη NAFLD με το φαινότυπο αυτό να είναι πολύ συχνός στους ασθενείς με τη νόσο [17]. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η εμφάνιση της NAFLD δε συνδέεται με την IR και τα μεταβολικά χαρακτηριστικά, κάτι που οφείλεται στην παρουσία συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών οι οποίοι διαμεσολαβούν με διαφορετικό μηχανισμό την εμφάνιση της NAFLD [4].

Τα ηπατικά ένζυμα κατά τη NAFLD είναι πιθανό να είναι σε μη φυσιολογικά επίπεδα. Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ορού της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) και της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού οξέος (AST). Ωστόσο, από τους ασθενείς με NAFLD, το 78% έχει φυσιολογικά ηπατικά ένζυμα και η πιθανή αύξηση είναι ήπια και με μέγιστη τιμή που φτάνει έως το πενταπλάσιο του ανώτερου φυσιολογικού ορίου [18] με την ALT σπάνια να ξεπερνά το τριπλάσιο της ανώτερου φυσιολογικού ορίου [15]. Ο λόγος AST/ALT τυπικά είναι < 1 αλλά κατά την κίρρωση, η συγκέντρωση της AST μπορεί να είναι υψηλότερη από τη συγκέντρωση της ALT. Επομένως σε ασθενείς με NAFLD, αύξηση στην συγκέντρωση της AST και αντιστροφή του λόγου AST/ALT είναι μια δυνητικά αρνητική προγνωστική ένδειξη [17]. Επιπλέον, βελτίωση στα ηπατικά ένζυμα με το χρόνο συχνά υποδεικνύει επιδείνωση και όχι ευνοϊκή εξέλιξη.

Στην πραγματικότητα, κατά την εξελισσόμενη ηπατική ίνωση χάνονται ηπατοκύτταρα και το ήπαρ έχει μειωμένη ικανότητα για απελευθέρωση ενζύμων στην κυκλοφορία [15].

Τα επίπεδα της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης (GGT) και της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) δύνανται να είναι αυξημένα στη NAFLD. Η αύξηση, όμως, η οποία δεν συμβαίνει σε όλους τους ασθενείς, είναι ήπια και έτσι τα επίπεδα των ενζύμων αυτών θεωρούνται κυρίως συμπληρωματικοί δείκτες της ένδειξης για ηπατική στεάτωση [17].

1.1.5 Διάγνωση

Η διάγνωση για τη NAFLD γίνεται όταν υπάρξει ένδειξη για ηπατική στεάτωση υπό την απουσία δευτεροπαθών αιτιών όπως είναι η ιογενής λοίμωξη, τα ηπατοτοξικά φάρμακα, άλλες χρόνιες ηπατικές νόσοι και η συστηματική πρόσληψη αλκοόλ [1].

Ένδειξη για ηπατική στεάτωση

Η διάγνωση για ηπατική στεάτωση γίνεται είτε με βιοψία είτε με απεικονιστικές μεθόδους λαμβάνοντας υπόψη τα εκάστοτε οφέλη και μειονεκτήματα. Καθώς όμως οι απεικονιστικές μέθοδοι έχουν περιορισμούς και η βιοψία του ήπατος είναι επεμβατική, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για εναλλακτικούς μη επεμβατικούς δείκτες, οι κυριότεροι από τους οποίους θα αναφερθούν παρακάτω [19].

Επεμβατική μέθοδος

Η βιοψία ήπατος είναι η πρότυπη μέθοδος για διάγνωση της NAFLD καθώς επιτρέπει τον αποκλεισμό δευτεροπαθών αιτιών και την εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου. Είναι η μόνη μέθοδος η οποία διαφοροποιεί την απλή ηπατική στεάτωση από τη NASH και εκτιμά το μέγεθος της φλεγμονής, του ηπατοκυτταρικού τραυματισμού και της ίνωσης [19]. Πρόκειται όμως για δαπανηρή μέθοδο η οποία είναι επεμβατική και φέρει κάποιο μικρό κίνδυνο για επιπλοκές όπως ο πόνος, η αιμορραγία και σπάνια ο θάνατος. Επιπλέον, κατά τη βιοψία, σφάλμα στη δειγματοληψία μπορεί να φέρει λανθασμένη διάγνωση κατά ένα στάδιο ίνωσης σε 24-37% των βιοψιών αλλά σπάνια κατά περισσότερα στάδια. Αν και ο διαχωρισμός μεταξύ ηπατικής στεάτωσης και NASH με εκτεταμένη φλεγμονή και ίνωση είναι ξεκάθαρος, ο διαχωρισμός της

νόσου σε στάδια δυσχεραίνει όταν υφίστανται μικρές ιστολογικές αλλαγές στο ευρύ ιστολογικό φάσμα της NAFLD. Επομένως, τα οφέλη και οι περιορισμοί της βιοψίας του ήπατος είναι απαραίτητο να συνυπολογίζονται με την εξατομίκευση να έχει σημαντικό ρόλο [18].

Απεικονιστικές μέθοδοι

Το υπερηχογράφημα (US) είναι η πιο οικονομική, συχνή και διαθέσιμη μέθοδος διάγνωσης για την ηπατική στεάτωση. Έχει ευαισθησία 60-94% και ειδικότητα 66-95%. Χρησιμοποιείται για την περαιτέρω κατηγοριοποίηση της ηπατικής στεάτωσης σε 3 ή και περισσότερα στάδια (ήπια, μέτρια και σοβαρή). Περιορισμοί της μεθόδου είναι η χαμηλή ευαισθησία σε ήπια στεάτωση, η αδυναμία της ακριβούς ποσοτικοποίησης της ηπατικής στεάτωσης καθώς και του διαχωρισμού ανάμεσα στη στεάτωση και την ήπια ίνωση, η περιορισμένη διαγνωστική αξία σε σοβαρή παχυσαρκία και τέλος η υποκειμενικότητα που ενέχει η εφαρμογή της από διάφορους χειριστές με τη συμφωνία μεταξύ των χειριστών να είναι 72% [19].

Η αξονική τομογραφία (CT) χαρακτηρίζεται από καλή διαγνωστική αξία για την ποιοτική διάγνωση της στεάτωσης όταν αυτή ξεπερνά το 30% των ηπατοκυττάρων. Υπό αυτή τη συνθήκη, έχει ευαισθησία 82% και ειδικότητα 100%. Περιορισμοί της μεθόδου, οι οποίοι αναστέλλουν την ευρεία χρήση της, είναι η έκθεση σε ακτινοβολία, η μικρή ακρίβεια υπό την παρουσία άλλης διάχυτης ηπατικής νόσου και το υψηλό κόστος [19].

Η μαγνητική τομογραφία (MRI) είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος εκτίμησης της ηπατικής στεάτωσης και επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της. Εμφανίζει καλή συσχέτιση με την ιστολογική εξέταση, με 100% ευαισθησία και 92.3% ειδικότητα. Στην κλινική πρακτική, ωστόσο, η χρήση της δεν είναι εφικτή λόγω υψηλού κόστους και χαμηλής διαθεσιμότητας [19].

Άλλες μέθοδοι

Το NAFLD Fibrosis Score (NFS) βασίζεται σε 6 μεταβλητές οι οποίες είναι η ηλικία, ο ΔΜΣ, η διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας ή ο ΣΔ, τα αιμοπετάλια, η αλβουμίνη και ο λόγος AST/ALT. Είναι ο πιο επικυρωμένος δείκτης και δημιουργήθηκε σε μεγάλη μελέτη με NAFLD ασθενείς, διαγνωσμένους με βιοψία, ώστε να προβλέψει την προχωρημένη ίνωση. Τιμή του NFS < -1.455 αποκλείει την προχωρημένη ίνωση ενώ τιμή του NFS > 0.675 προβλέπει την προχωρημένη ίνωση [20]. Σε μετα-ανάλυση 13 μελετών, Fibrosis Score < -1.455 είχε 90% ευαισθησία και 60% ειδικότητα για αποκλεισμό προχωρημένης ίνωσης ενώ Fibrosis Score > 0.676 είχε 67% ευαισθησία και 97% ειδικότητα για πρόβλεψη προχωρημένης ίνωσης [21]. Ωστόσο, σημαντικός περιορισμός του δείκτη είναι ότι από τους ασθενείς ένα ποσοστό 20-58% βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές-κατώφλια και έτσι έχει ακαθόριστο αποτέλεσμα. Φαίνεται ότι ο NFS λειτουργεί πολύ καλά στον αποκλεισμό της προχωρημένης ίνωσης και έχει μεγάλη χρησιμότητα για την ταυτοποίηση των ατόμων με χαμηλό κίνδυνο για προχωρημένη νόσο [22].

Το fatty liver index (FLI) είναι πολύπλοκος αλγόριθμος ο οποίος βασίζεται σε 4 απλές και συνήθεις παραμέτρους όπως ο ΔΜΣ, η περιφέρεια μέσης, τα TG ορού και τα επίπεδα GGT. Προβλέπει την ύπαρξη NAFLD με ακρίβεια 84%. Φέρει τιμές από το 0 έως το 100 και FLI < 30 (αρνητικός λόγος πιθανοφάνειας:0.2) αποκλείει την ύπαρξη της NAFLD ενώ FLI > 60 (θετικός λόγος πιθανοφάνειας:4.3) επιβεβαιώνει την ύπαρξη της. Χρησιμοποιείται επιτυχώς για το διαχωρισμό των ατόμων σε υψηλό κίνδυνο για NAFLD για τα οποία απαιτείται υπερηχογράφημα και εντατικοποίηση της αλλαγής του τρόπου ζωής [19].

Το NASH score βασίζεται σε 3 μεταβλητές, το γονότυπο για το γονίδιο PNPLA3 ως προς τον πολυμορφισμό rs738409, τα επίπεδα AST και την ινσουλίνη νηστείας. Δημιουργήθηκε και επικυρώθηκε σε φινλανδική μελέτη, με NAFLD ασθενείς, διαγνωσμένους με βιοψία, ώστε να προβλέψει τη NASH. Τιμή > -1.054 προβλέπει τη NASH με ευαισθησία 71.6% και ειδικότητα 73.5%. Καθώς ο δείκτης φαίνεται να υπereκτιμά σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης της NASH, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ασθενών για τους οποίους απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση [23].

Απουσία δευτεροπαθών αιτιών

Πίνακας 1.2 Δευτεροπαθή αίτια για ηπατική στεάτωση [15], [24]

Αυτοάνοση ηπατική νόσος

αυτοάνοση ηπατίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, κοιλιοκάκη

Λοίμωξη

ηπατίτιδα A, B, C, D και E

Μεταβολικές διαταραχές

έλλειψη α-1 αντιθρυψίνης, αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson

Ηπατοτοξικότητα από φάρμακα

αμιοδαρόνη, μεθοτρεξάτη, ισονιαζίδη, περεξιλίνη, κορτικοστεροειδή, οιστρογόνα

Διατροφή

ολική παρεντερική διατροφή, καχεξία, απώλεια πρωτεϊνών σε εντεροπάθεια, τοξικότητα από βιταμίνη A

Απουσία συστηματικής πρόσληψης αλκοόλ

Εξ' ορισμού η NAFLD προϋποθέτει την απουσία τρέχουσας ή πρόσφατης συστηματικά υπερβολικής πρόσληψης αλκοόλ. Ωστόσο, το ακριβές όριο μεταξύ υπερβολικής και φυσιολογικής πρόσληψης δεν είναι καθορισμένο με σαφήνεια [1]. Στην κλινική πράξη, ημερήσια πρόσληψη αλκοόλ η οποία ξεπερνά τα 20γρ για τις γυναίκες και τα 30γρ για τους άνδρες θεωρείται υπερβολική και αποτελεί κριτήριο για αποκλεισμό της διάγνωσης για NAFLD. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό, η αξιολόγηση της πρόσληψης αλκοόλ είναι πολύ σημαντική καθώς καμία μέθοδος δε μπορεί να διαχωρίσει αξιόπιστα ανάμεσα στη NAFLD και την αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (Alcoholic Fatty Liver Disease-AFLD) [24]. Επομένως, προτείνεται η χρήση κατάλληλων και έγκυρων ερωτηματολογίων και εάν η αυτό-αναφερόμενη πρόσληψη αλκοόλ δε συνάδει με την κλινική υποψία, απαιτείται επιβεβαίωση από το κοντινό περιβάλλον του ασθενή [1].

1.1.6 Παθοφυσιολογία

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός για την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD είναι πολύπλοκος και πολυπαραγοντικός και ακόμη και σήμερα δεν είναι πλήρως γνωστός. Διάφορες θεωρίες έχουν διαμορφωθεί, με αρχική την υπόθεση των 2 χτυπημάτων. Σύμφωνα με αυτή, η ηπατική συσσώρευση λίπους ως αποτέλεσμα καθιστικής ζωής, υψηλής σε λίπος διατροφής, παχυσαρκίας και IR αποτελεί το 1^ο χτύπημα, ευαισθητοποιώντας το ήπαρ σε άλλους παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν το 2^ο χτύπημα. Το 2^ο χτύπημα υποστηρίζεται ότι ενεργοποιεί φλεγμονώδη μονοπάτια και ινωδογένεση και περιλαμβάνει παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, το στρες ενδοπλασματικού δικτύου, τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και τις εντερικές ενδοτοξίνες [25]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε από ζωικά μοντέλα παχυσαρκίας με ηπατική συσσώρευση λίπους, τα οποία απαιτούν ένα 2^ο χτύπημα για την εμφάνιση φλεγμονής και ίνωσης [26].

Ωστόσο, σύντομα, έγινε προφανές ότι η υπόθεση αυτή ήταν πολύ απλοποιημένη για να εξηγήσει την πολυπλοκότητα της ανθρώπινης NAFLD όπου πολλαπλοί ταυτόχρονα παράγοντες, δρώντας συνεργιστικά σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα, εμπλέκονται στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου [3]. Επιπλέον, αναγνωρίστηκε πως η συσσώρευση TG στο ήπαρ πιθανότατα αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό από την ηπατική βλάβη και πως η φλεγμονή μπορεί να προηγείται της απλής ηπατικής στεάτωσης και επιπλέον μπορεί να αποτελεί και αιτία για ηπατική στεάτωση [27]. Έτσι, η παρωχημένη υπόθεση των 2 χτυπημάτων αντικαταστάθηκε πρόσφατα από την υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων η οποία δίνει πιο έγκυρη και ολοκληρωμένη επεξήγηση για την παθοφυσιολογία της νόσου [3].

Υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων

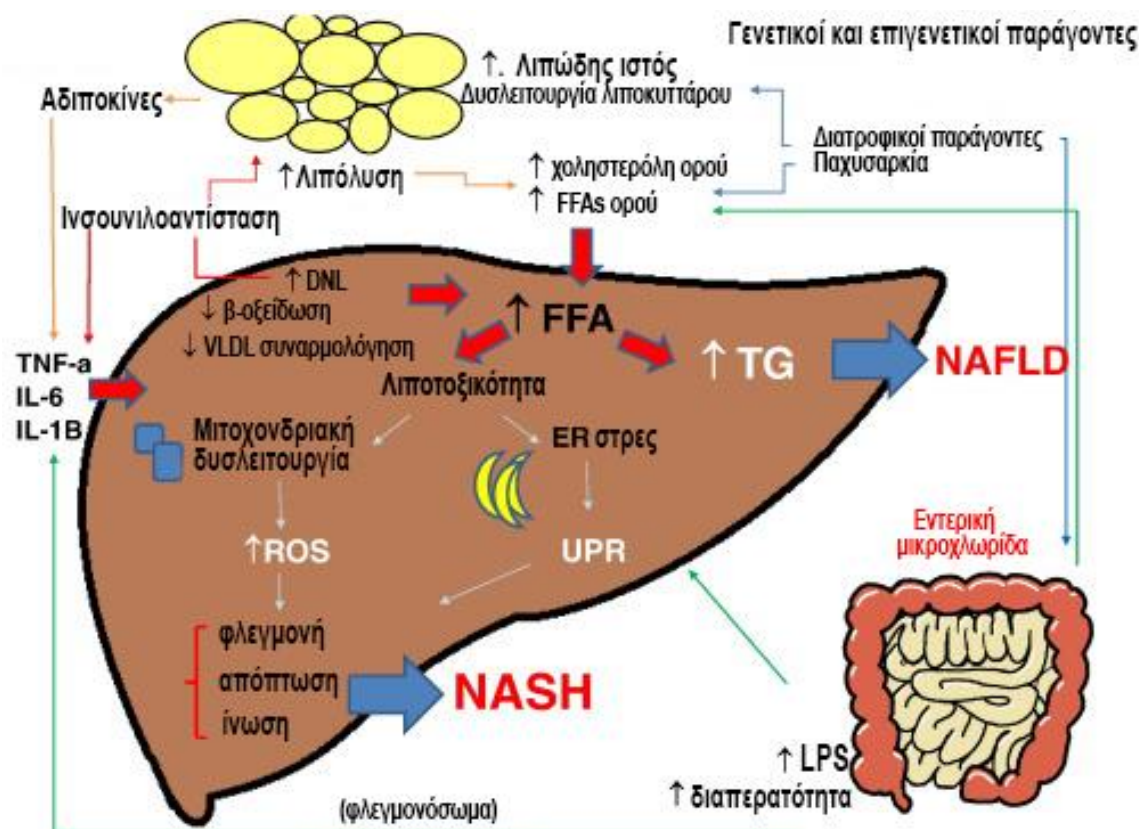
Η υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων υποστηρίζει πως πολλαπλοί παράγοντες όπως η IR, η λιποτοξικότητα, η φλεγμονή του λιπώδους ιστού, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το στρες ενδοπλασματικού δικτύου, η εντερική μικροχλωρίδα, τα φλεγμονοσώματα και διατροφικοί παράγοντες, δρουν ταυτόχρονα σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα και ωθούν προς τη NAFLD [3].

Οι διατροφικές συνήθειες, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες δύνανται να οδηγήσουν στην εμφάνιση της IR και της παχυσαρκίας με τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων καθώς και στην αλλαγή της εντερικής μικροχλωρίδας [3].

Η IR είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την εμφάνιση της ηπατικής στεάτωσης και της NASH και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της λιπόλυσης, με επακόλουθο την αυξημένη ροή λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Η IR επίσης προάγει τη δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού με αποτέλεσμα τη διαφορετική παραγωγή και έκκριση λιποκινών και φλεγμονώδων κυτοκινών [28]. Το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ υπό μορφή TG και αυτό συμβαίνει συγχρόνως με αυξημένη λιποτοξικότητα από τα υψηλά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids-FFAs), ελεύθερης χοληστερόλης και άλλων μεταβολιτών. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιούνται μηχανισμοί οι οποίοι σχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, οξειδωτικό στρες, παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) και στρες ενδοπλασματικού δικτύου [29].

Επιπλέον, η μεταβολή στην εντερική μικροχλωρίδα οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή λιπαρών οξέων στο έντερο και σε αύξηση της διαπερατότητας του. Επακόλουθα, παρατηρείται αύξηση στην απορρόφηση των λιπαρών οξέων και αύξηση στα επίπεδα των μορίων τα οποία συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση φλεγμονώδων μονοπατιών και στην απελευθέρωση προφλεγμονώδων κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης α (TNF- α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) [30].

Σε άτομα προδιατεθειμένα από γενετικούς παράγοντες ή από επιγενετικές μεταβολές, όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τη συσσώρευση λίπους και τη φλεγμονή στο ήπαρ, οδηγώντας σε μια χρόνια ηπατική φλεγμονή μέσω ετερογενών μονοπατιών ηπατοκυτταρικής βλάβης, με πιθανή εξέλιξη τον ηπατοκυτταρικό θάνατο (μέσω άμεσης τοξικότητας ή ενεργοποίησης μηχανισμών απόπτωσης), την ενεργοποίηση ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και την εναπόθεση ινώδους πλάκας [3].



Σχήμα β. Η υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων για την εμφάνιση της NAFLD. [3]

(FFAs: free fatty acids, DNL: DNL, VLDL: λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας, CH: χοληστερόλη, TNFα: παράγοντας νέκρωσης α, IL6: ιντερλευκίνη 6, TG: τριγλυκερίδια, ROS: ενεργές ρίζες οξυγόνου, ER: ενδοπλασματικό δίκτυο, UPR: ξεδιπλωμένη πρωτεϊνική απόκριση, LPS: λιποπολυσακχαρίτες)

Μεταβολισμός λίπους-λιποτοξικότητα-ινσουλινοαντίσταση

Το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ των ασθενών με NAFLD υπό μορφή TG. Τα TG προέρχονται από εστεροποίηση γλυκερόλης και FFAs. Όταν συντίθενται προορίζονται είτε για αποθήκευση είτε για έκκριση. Τα FFAs δύναται να προέρχονται από τη διατροφή, από το λιπώδη ιστό μέσω λιπόλυσης και/ή από την ηπατική de novo λιπογένεση (DNL). Μόλις εισέλθουν στα λιποκύτταρα, μετατρέπονται σε μόρια άκυλο-CoA, τα οποία επακόλουθα είτε εστεροποιούνται είτε οξειδώνονται [31].

Η συσσώρευση των TG δεν είναι η ίδια ηπατοτοξική και, όπως φαίνεται από ζωικά μοντέλα, αποτελεί αμυντικό μηχανισμό για την εξισορρόπηση της αύξησης στα FFAs [32]. Η αναστολή της ενσωμάτωσης των TG στα νεοσχηματιζόμενα μόρια VLDL μέσω αναστολής του MTP,

εμποδίζει την έκκριση των TG και επομένως οδηγεί στη συσσώρευση τους χωρίς ηπατικό τραύμα [33]. Η αυξημένη συσσώρευση TG είναι ένα επιφαινόμενο το οποίο συμβαίνει ταυτόχρονα με την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών, τη λιποτοξικότητα και το ηπατικό τραύμα [34].

Η ηπατική DNL μπορεί να αυξηθεί από την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο SREBP-1, ο ChREBP και ο PPAR-γ. Ο SREBP-1 έχει 3 ισομορφές. Ο SREBP-1c ρυθμίζει την ενεργοποίηση της DNL και διεγείρεται από την ινσουλίνη και ο SREBP-2 συμμετέχει στην κυτταρική ομοιόσταση της χοληστερόλης. Επομένως, η απορρύθμιση αυτών των παραγόντων εμπλέκεται στην ηπατική συσσώρευση λίπους. Επιπλέον, ο ChREBP αυξάνει τη DNL και ενεργοποιείται από τη γλυκόζη αλλά παρέχει και πρόσθετο υπόστρωμα για τη σύνθεση FFA και TG [35]. Είναι γεγονός πως οι ασθενείς με NAFLD χαρακτηρίζονται από αυξημένη DNL, η οποία δεν καταστέλλεται κατά τη νηστεία, αλλά και από υψηλότερα νυχτερινά επίπεδα FFA στο πλάσμα σε σχέση με τους υγιείς [36].

Μεταξύ των υποδοχέων της ινσουλίνης, ο IRS-2 λειτουργεί ως ρυθμιστής του SREBP-1c, όταν ενεργοποιείται, επηρεάζοντας τη DNL. Κατά την IR, μειώνεται η δραστικότητα του IRS-2, οπότε και ο SREBP-1c υπερεκφράζεται και η DNL ενεργοποιείται. Επιπλέον, υπό τις ίδιες συνθήκες, η β-οξείδωση των FFA αναστέλλεται και έτσι προωθείται ακόμη περισσότερο η ηπατική συσσώρευση λίπους [37]. Τα FFA στα ηπατοκύτταρα μπορεί να προκαλούν ελλείματα στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και έτσι να επιδεινώνουν την υπάρχουσα IR. Επιπλέον, η ινσουλίνη έχει ως κύρια δράση την αναστολή της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό. Ωστόσο, κατά την IR, αυτή η αναστολή διαταράσσεται, οδηγώντας σε αυξημένη ροή FFA στο ήπαρ [38]. Άλλα μονοπάτια αυξημένης διάθεσης λίπους όπως η διαταραγμένη ηπατική οξείδωση λίπους και η μειωμένη σύνθεση ή έκκριση των VLDL είναι μικρότερης σημασίας για τον καθορισμό της συσσώρευσης λίπους και της λιποτοξικότητας στη NAFLD [3].

Η IR είναι βασικό χαρακτηριστικό της NAFLD και είναι πιο συχνή στη NASH σε σχέση με την απλή ηπατική στεάτωση. Η IR είναι ένα από τα πολλαπλά χτυπήματα που προδιαθέτουν για την εμφάνιση της NAFLD και την εξέλιξη σε NASH, και είναι σημαντική για την εμφάνιση λιποτοξικότητας και οξειδωτικού στρες αλλά και για την ενεργοποίηση φλεγμονώδους καταρράκτη. Σε NAFLD ασθενείς, γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες επιπλέον

παρεμβαίνουν στα μονοπάτια σηματοδότησης της ινσουλίνης και επομένως συνεισφέρουν στη διατήρηση και επιδείνωση της IR [3].

Φλεγμονή λιπώδους ιστού

Ο ακριβής αρχικός μηχανισμός ο οποίος ωθεί στη φλεγμονή του λιπώδους ιστού είναι ακόμη αβέβαιος αλλά θεωρείται ότι η υποξία και η νέκρωση των ταχύτατα αναπτυσσόμενων λιποκυττάρων έχει σημαντικό ρόλο. Κατά τη φλεγμονή, προωθείται η έκκριση προφλεγμονώδων κυτοκινών και χυμοκινών όπως ο TNF- α , η IL-6 και η χυμοκίνη CCL2 και επίσης μειώνεται η έκκριση αντιφλεγμονώδων αδιποκινών, όπως η αδιπονεκτίνη [39]. Ο TNF- α είναι η πρώτη προφλεγμονώδη κυτοκίνη η οποία ανακαλύφθηκε στο λιπώδη ιστό και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της IR. Η IL-6 εκκρίνεται από διάφορα κύτταρα στον οργανισμό συμπεριλαμβανομένων των λιποκυττάρων. Τα επίπεδα ορού και των δυο σχετίζονται αξιοσημείωτα καλά με την IR [40]. Επιπλέον, ο TNF- α και η IL-6 που προέρχονται από τα λιποκύτταρα φαίνεται πως προωθούν την ηπατική IR μέσω της ενεργοποίησης του SOCS3, ενός καταστολέα της σηματοδότησης των κυτοκινών [41]. Επιπρόσθετα, η CCL2 συγκεντρώνει τα μακροφάγα στο λιπώδη ιστό, με αποτέλεσμα την ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή κυτοκινών και τη διαίωνιση του φλεγμονώδους κύκλου [42].

Ο TNF- α και η IL-6 προωθούν την IR στα λιποκύτταρα, η οποία κινητοποιεί τη λιπόλυση των TG και την απελευθέρωση των λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία. Παράλληλα, μειώνεται η φυσική ικανότητα των λιποκυττάρων για έκκριση αδιπονεκτίνης, μιας αντιφλεγμονώδης αδιποκίνης. Η αδιπονεκτίνη διευκολύνει τη φυσιολογική κατανομή των λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα με στόχο την αποθήκευση τους και ρυθμίζει την ηπατική β -οξειδωση στην κυκλοφορία μέσω της σηματοδότησης της AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) και της ακετυλ-CoA καρβοξυλάσης (ACC) [42]. Ως αποτέλεσμα όλων των μεταβολών αυτών, τελικά προωθείται η απελευθέρωση λίπους από τα λιποκύτταρα και η έκτοπη συσσώρευση του στο ήπαρ [3].

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας, με κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του λίπους. Η μεταβολή στη δομή και τη λειτουργία τους εμπλέκεται στην παθογένεση της NAFLD. Οι δομικές μεταβολές αφορούν την ελάττωση του

μιτοχονδριακού DNA και τις μορφολογικές και εσωτερικές αλλαγές ενώ οι λειτουργικές μεταβολές την αναπνευστική αλυσίδα και τη μιτοχονδριακή β-οξείδωση [43].

Σε συνθήκες που η μιτοχονδριακή ή υπεροξυσωματική λειτουργία αδυνατεί να διαχειριστεί την αυξημένη ροή λιπαρών οξέων, η αναπνευστική οξείδωση μπορεί να γίνει δυσλειτουργική με αποτέλεσμα τη διαταραχή του μεταβολισμού του λίπους, την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών από τα λιπίδια και την υπερπαραγωγή ROS [44]. Τα μόρια αυτά ενεργοποιούν φλεγμονώδη μονοπάτια συνεισφέροντας στην ηπατοκυτταρική νεκροφλεγμονή και την επιδείνωση της μιτοχονδριακής βλάβης [29]. Έχει αναγνωριστεί συσχέτιση μεταξύ της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της IR, της παχυσαρκίας και των επιπέδων TNF-α [45]. Επιπλέον, οι ROS και τα οξειδωμένα μόρια LDL, είναι πιθανό να ενεργοποιούν τα Kupffer και τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, οδηγώντας σε φλεγμονή και ίνωση [29]. Παραμένει όμως άγνωστο εάν η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι παράγοντας-κλειδί στην παθογένεση της NAFLD ή εάν είναι συνέπεια του διαταραγμένου μεταβολισμού του λίπους [3].

Στρες ενδοπλασματικού δικτύου

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα απέραντο, δυναμικό, σωληνοειδές δίκτυο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση, αναδίπλωση, επιδιόρθωση και μετακίνηση μεγάλου εύρους πρωτεϊνών [46]. Η αυξημένη εισαγωγή νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, η πρωτοπαθής δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου και η έλλειψη ATP μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση ξεδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενεργοποιώντας την αποκαλούμενη ξεδιπλωμένη πρωτεϊνική απόκριση (UPR), η οποία είναι προσαρμοστικός μηχανισμός με στόχο τη μείωση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Η ενεργοποίηση της εμπεριέχει μηχανισμούς όπως η μείωση της σύνθεσης πρωτεϊνών, η αύξηση της ικανότητας διέλευσης τους μέσω του δικτύου, η αύξηση του διπλώματος και της μεταφοράς των πρωτεϊνών και η ενεργοποίηση μονοπατιών αποικοδόμησης τους, οι οποίοι βοηθούν στην επιδιόρθωση του μειωμένου ξεδιπλώματος των πρωτεϊνών το οποίο διαφορετικά θα οδηγούσε στην έναρξη της απόπτωσης [47].

Κατά τη NAFLD, παράγοντες οι οποίοι προωθούν τη UPR είναι η υπεργλυκαιμία, ο μιτοχονδριακός τραυματισμός που εξαντλεί το ATP, η υπερχοληστερολαιμία, η εξάντληση της

φωσφατιδυλοχολίνης και το οξειδωτικό στρες [48]. Η UPR οδηγεί στην ενεργοποίηση της c-jun τερματικής κινάσης (JNK), η οποία ενεργοποιεί τη φλεγμονή και την απόπτωση [49]. Η δραστηριότητα της έχει φανεί να είναι από τα χαρακτηριστικά τα οποία διαφοροποιούν τους NASH ασθενείς από τους ασθενείς με απλή ηπατική στεάτωση [50]. Μια άλλη συνέπεια της UPR είναι η ενεργοποίηση των μονοπατιών του SREBP-1c με αποτέλεσμα τη διατήρηση του συσσωρευμένου λίπους και την περαιτέρω επιδείνωση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και της UPR [51].

Φλεγμονοσώματα

Τα φλεγμονοσώματα είναι κυτταροπλασματικά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από κασπάσες και μόρια προερχόμενα από παθογόνους μικροοργανισμούς ή απελευθερωμένα από τραυματισμένα κύτταρα, τα οποία μπορούν να προωθήσουν τη φλεγμονή. Δρουν σαν ανιχνευτές ενδογενών ή εξωγενών μοριακών προτύπων συσχετιζόμενων με παθογόνα (PAMPs) ή μοριακών προτύπων συσχετιζόμενων με κίνδυνο (DAMPs). Καθώς τα φλεγμονοσώματα είναι μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του, ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα [52]. Ρυθμίζουν τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιώντας οικογένειες από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs), όπως είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (TRLs), οι υποδοχείς τύπου NOD (NRLs) και οι υποδοχείς λεκτίνης τύπου C (CRLs). Η απελευθέρωση των DAMPs μπορεί να προωθηθεί από διάφορους μηχανισμούς όπως η κυτταρική νέκρωση, τα αποπτωτικά κύτταρα τα οποία δεν απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα και το οξειδωτικό στρες [25].

Η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων ως απόκριση στα FFAs, το οξειδωτικό στρες και άλλους προφλεγμονώδεις μεταβολίτες, παράγοντες οι οποίοι υπάρχουν στη NAFLD, και η επακόλουθη παραγωγή της ιντερλευκίνης 1-β (IL-1β), μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της NASH, καταστέλλοντας τον πυρηνικό υποδοχέα PPAR-α και επιδρώντας έμμεσα στον προκαλούμενο από το TNF-α κυτταρικό θάνατο [53]. Επιπλέον, τα φλεγμονοσώματα επιδρούν άμεσα στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και προωθούν την ίνωση [54]. Μάλιστα, η έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα φλεγμονοσώματα (NLRP3, pro-IL-1β και pro-IL-18) είναι αυξημένη σε NASH ασθενείς σε σχέση με NAFLD ασθενείς [55].

Εντερική μικροχλωρίδα (Εντερο-ηπατικός κύκλος)

Η εντερική μικροχλωρίδα αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ότι εμπλέκεται στην παθογένεση και την εξέλιξη της NAFLD, μέσω του εντερο-ηπατικού κύκλου [3]. Οι σχετικοί μηχανισμοί αφορούν την αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου από τη μικροχλωρίδα, την αλλαγή στο μεταβολισμό της χολίνης και των χολικών οξέων από τη μικροχλωρίδα, την αυξημένη μεταφορά αιθανόλης από το έντερο στο ήπαρ, την αυξημένη εντερική διαπερατότητα και παραγωγή ενδοτοξινών και τέλος την αλληλεπίδραση μεταξύ διατροφής και μικροχλωρίδας [27].

Αρχικά, η εντερική μικροχλωρίδα, μέσω της ζύμωσης του ανθεκτικού αμύλου και των μη αμυλούχων πολυσακχαριτών σε λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA) και μέσω της απορρόφησης αυτών από το εντερικό επιθήλιο, επιδρά στην ενεργειακή ισορροπία του ξενιστή [56]. Σχετικά με το μεταβολισμό της χολίνης, η εντερική μικροχλωρίδα παράγει ένζυμα τα οποία καταλύουν τη μετατροπή της χολίνης από τη διατροφή σε τοξικά παράγωγα, κυρίως μεθυλαμίνες. Οι αμίνες αυτές παραλαμβάνονται από το ήπαρ, μετατρέπονται σε τριμεθυλάμινο-N-οξείδια και προωθούν τη φλεγμονή και το ηπατικό τραύμα. Φαίνεται πως η μη ευνοϊκή μικροχλωρίδα μπορεί να προωθεί τη NASH είτε μειώνοντας τα επίπεδα της χολίνης είτε αυξάνοντας τα επίπεδα των μεθυλαμινών [3]. Όσον αφορά τα χολικά οξέα, η αλλαγή στο μεταβολισμό τους μπορεί να προωθήσει τη NAFLD μέσω της επίδρασης στις διεργασίες της DNL και της εξαγωγής των VLDL [57]. Σχετικά με την αιθανόλη, η εντερική μικροχλωρίδα είναι η κύρια πηγή ενδογενούς παραγωγής [3]. Μελέτη σε παιδιά έδειξε πως η μικροχλωρίδα στη NASH διαφέρει από τη μικροχλωρίδα στην παχυσαρκία και το φυσιολογικό βάρος ως προς το ότι έχει άφθονα βακτήρια που παράγουν αιθανόλη με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της στο αίμα [58].

Καθώς το ήπαρ λαμβάνει περισσότερο από το 50% της αιματικής κυκλοφορίας από τη σπλαχνική περιοχή, είναι ένα από τα πιο έντονα εκτιθέμενα όργανα στις εντεροηπατικές τοξίνες και επίσης αποτελεί τη πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στα βακτηριακά προϊόντα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή και του μικροβιώματος στον εντερικό βλεννογόνο είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη και ομοίωση του έμφυτου και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) είναι ένα από τα κύρια τοξικά προϊόντα και είναι πιθανό να δρουν ενεργοποιώντας φλεγμονώδη καταρράκτη μέσα από μονοπάτια τα οποία

εμπλέκονται με την IR, την παχυσαρκία, την ηπατική συσσώρευση λίπους και την εμφάνιση και εξέλιξη της NASH [59]. Μάλιστα, ορισμένα μοντέλα μικροχλωρίδας ενισχύουν τη διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου και μπορούν να οδηγήσουν σε λιποπολυσακχαριδαιμία. Οι ασθενείς με NAFLD έχουν σημαντικά αυξημένη εντερική διαπερατότητα και συχνότητα εμφάνισης βακτηριακής υπερανάπτυξης σε σχέση με υγιή άτομα [60]. Η σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής υπερανάπτυξης και της NASH παρατηρείται ακόμη υπό την απουσία αυξημένης εντερικής διαπερατότητας [61].

Η διατροφή μπορεί να επηρεάσει τη σύσταση και την ποικιλία της εντερικής μικροχλωρίδας. Συγκεκριμένα, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα αλληλεπιδρούν με την εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζοντας την εξέλιξη του ηπατικού τραύματος [27]. Σε ζωικό μοντέλο υπό υψηλή σε κορεσμένα λιπαρά οξέα δίαιτα, φάνηκε πως η αυξημένη ροή κορεσμένων λιπαρών οξέων στο έντερο μείωσε την ποικιλία της εντερικής μικροχλωρίδας και αύξησε το λόγο Firmicutes/Bacteroidetes στο έντερο. Ένα τέτοιο τυπικό μοντέλο μικροβιώματος που σχετίζεται με την παχυσαρκία και προωθείται από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ευνοεί την εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης [62]. Όσον αφορά τη φρουκτόζη, σε ζωικό μοντέλο όπου η NAFLD προάχθηκε από δίαιτα υψηλή σε φρουκτόζη, φάνηκε πως υπήρξε μείωση στα επίπεδα των Bifidobacterium και Lactobacillus και τάση για αύξηση της ενδοτοξιναιμίας [63]. Μάλιστα, προβιοτικά με Lactobacillus προστατεύουν από τη NAFLD σε δίαιτα υψηλή σε φρουκτόζη [64].

Γενετικοί παράγοντες

Οι γενετικές παράγοντες, υπό τη μορφή των απλών γενετικών πολυμορφισμών έχουν καθοριστικό ρόλο για την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD καθώς αυξάνουν τον κίνδυνο για τη νόσο. Η προδιάθεση είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των επιδράσεων από πολλαπλούς σχετικά κοινούς αιτιολογικούς γενετικούς πολυμορφισμούς με συχνότητα εμφάνισης αλληλόμορφου 1-5% οι οποίοι είναι κληρονομήσιμοι. Δεκάδες γονίδια με πολλαπλούς πολυμορφισμούς έχουν ήδη αναγνωριστεί σε μελέτες ανάλυσης όλου του γονιδιώματος (GWAS μελέτες), τα οποία είναι υπεύθυνα για τον αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο στον πληθυσμό και αναμένεται όλο και περισσότερα γονίδια να αναγνωριστούν με την υλοποίηση επιπρόσθετων εκτεταμένων GWAS μελετών [27].

Επιγενετικοί παράγοντες

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι σταθερές μεταβολές σε μεταγραφικό επίπεδο, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις ιστονών και η δραστηριότητα των microRNAs (miRNAs), οι οποίες δεν επιδρούν στις βασικές αλληλουχίες DNA και συμβάλλουν στην ομοίωση των κυττάρων εμφανίζοντας υψηλού βαθμού εξελικτική και περιβαλλοντική πλαστικότητα [65].

Πρόσφατα υπάρχει έντονα η υπόθεση πως η μεταβολή αυτής της ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη προδιάθεση για τη NAFLD και επακόλουθα άρχισαν να υλοποιούνται κλινικές μελέτες με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού στη NASH [3]. Σε ζωικό μοντέλο όπου η NASH προωθήθηκε από τη διατροφή, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της NASH και επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η έντονη απώλεια γονιδιωματικών και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεθυλιωμένης κυτοσίνης [66].

Διατροφικοί παράγοντες

Η διατροφή έχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της NAFLD και της NASH καθώς τόσο η συνολική ενεργειακή πρόσληψη όσο και η ποιότητα της διατροφής εμπλέκονται με τη νόσο [67]. Η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη οδηγεί σε θετικό ισοζύγιο ενέργειας και επομένως βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα σε υπερβαρότητα και παχυσαρκία, παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου [68]. Επιπλέον, η ποιότητα της διατροφής μπορεί να επηρεάσει ποικιλοτρόπως την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD [67].

1.1.7 Παράγοντες κινδύνου

Γενετικοί παράγοντες

Η γενετική προδιάθεση έχει καίριο ρόλο στην τάση για εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD και της NASH [69]. Οι εμπλεκόμενοι γενετικοί παράγοντες αφορούν είτε σπάνιες κληρονομήσιμες διαταραχές είτε γενετικούς πολυμορφισμούς με την ηπατική στεάτωση να αναγνωρίζεται ως κληρονομήσιμη κατά 26-27% [70].

Οι σπάνιες κληρονομήσιμες διαταραχές που προκαλούν τη NAFLD ακολουθούν το Μενδελικό μοντέλο κληρονομικότητας και χαρακτηρίζονται από μια μοναδική, εξαιρετικά διεισδυτική αλλά όχι συχνή μετάλλαξη σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο η οποία είναι απαραίτητη και επαρκής για να εμφανιστεί η νόσος [27].

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί αυξάνουν τον κίνδυνο για τη NAFLD και η προδιάθεση που δημιουργείται είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των επιδράσεων από πολλαπλούς σχετικά κοινούς αιτιολογικούς γενετικούς πολυμορφισμούς [27]. Μεταξύ όλων των γενετικών πολυμορφισμών που έχουν αναγνωριστεί, δύο έχουν ξεχωρίσει, ο rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και ο rs58542926 του γονιδίου TM6SF2. Ανάλογα με το γονότυπο για τα δύο γονίδια και την ινσουλινοευαισθησία, οι ασθενείς με NAFLD μπορούν να διαχωριστούν σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς. Οι ασθενείς με γονότυπο που προδιαθέτει για τη νόσο φαίνεται πως διαφοροποιούνται από τους ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν ταυτόχρονα παχυσαρκία και IR [27].

Κλινικοί παράγοντες

Η NAFLD συνυπάρχει συνήθως με άλλες κλινικές καταστάσεις οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο για τη νόσο. Σχετίζεται ανεξάρτητα με την IR και την κεντρική παχυσαρκία και θεωρείται συχνά η ηπατική έκφραση του ΜΣ [9].

Η IR σχετίζεται στενά με τη NAFLD και τη σοβαρότητα της [71]. Το 1999, για πρώτη φορά, αναγνωρίστηκε ανεξάρτητη σχέση μεταξύ της IR υπό μορφή του HOMA-IR και της NAFLD σε μη διαβητικούς ασθενείς [72] και από τότε αυτή η σχέση έχει ευρέως επιβεβαιωθεί [71].

Η παχυσαρκία είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για τη NAFLD, με την πιθανότητα για εμφάνιση της NASH να αυξάνεται αναλογικά με το βαθμό της παχυσαρκίας [73]. Ειδικότερα, η

κεντρική παχυσαρκία κυρίως συσχετίζεται με τη NAFLD και η παρουσία της σε NAFLD ασθενείς αυξάνει την πιθανότητα για προχωρημένη ηπατική νόσο [74].

Η NAFLD αναγνωρίζεται συχνά ως η ηπατική έκφραση του ΜΣ καθώς συνήθως συνυπάρχει με υπερινσουλιναιμία ή IR και σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά του ΜΣ [9]. Σε μελέτη με 3.147 Ιάπωνες, τα άτομα με ΜΣ είχαν 4-11 φορές υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν NAFLD σε σχέση με τους υγιείς [75]. Σε άλλη μελέτη, ο αριθμός των χαρακτηριστικών του ΜΣ φάνηκε να προβλέπει την εμφάνιση της νόσου καθώς τα άτομα με ένα χαρακτηριστικό είχαν 3.6 φορές υψηλότερο κίνδυνο για τη NAFLD σε σχέση με τα άτομα με κανένα χαρακτηριστικό [76].

Συμπεριφοριστικοί παράγοντες

Ο τρόπος ζωής του ατόμου ο οποίος περικλείει τη διατροφή και τη σωματική δραστηριότητα επηρεάζει τον κίνδυνο για εμφάνιση της NAFLD. Αρχικά, η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη σε συνδυασμό με καθιστικές συμπεριφορές και χαμηλά επίπεδα σωματικής δραστηριότητας οδηγούν σε θετικό ισοζύγιο ενέργειας και επομένως βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα σε υπερβαρότητα και παχυσαρκία, παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται άρρηκτα με την εμφάνιση της νόσου [68]. Πέρα όμως από το μηχανισμό που αφορά το ισοζύγιο ενέργειας, τόσο η διατροφή όσο και η σωματική δραστηριότητα επηρεάζουν και με διαφορετικό τρόπο.

Όσον αφορά τη διατροφή, η συνολική ποιότητα είναι μεγάλης σημασίας. Περιλαμβάνει τη σύσταση σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά, τις ομάδες τροφίμων που καταναλώνονται και τα διατροφικά πρότυπα που ακολουθούνται, παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν με διάφορους μηχανισμούς την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD [67].

Σχετικά με τη σωματική δραστηριότητα, η καθιστική ζωή έχει συσχετιστεί με την παχυσαρκία, το σπλαγχνικό λίπος, την IR, τον κίνδυνο για ΜΣ, τη NAFLD και τη σοβαρότητα της NASH [77]. Επιπλέον, οι NAFLD ασθενείς φαίνεται πως έχουν χαμηλότερα συνολικά επίπεδα σωματικής δραστηριότητας, τόσο αερόβιου όσο και αναερόβιου τύπου [78]. Έχει μάλιστα παρατηρηθεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της σωματικής δραστηριότητας κατά τον ελεύθερο χρόνο ή της καρδιοαναπνευστικής ευρωστίας και της συχνότητας εμφάνισης της NAFLD ή του ηπατικού λίπους ανεξάρτητα από το ΔΜΣ [79].

1.2 Ο ρόλος της διατροφής ως προς τη NAFLD

1.2.1 Ενεργειακή πρόσληψη

Η συνολικά αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη οδηγεί σε θετικό ισοζύγιο ενέργειας και επομένως βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα σε υπερβαρότητα και παχυσαρκία με τις συνοδές μεταβολικές διαταραχές τους [68]. Ο φαινότυπος αυτός σχετίζεται με τη NAFLD με την πιθανότητα για τη νόσο να αυξάνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός παχυσαρκίας [73]. Μάλιστα, ασθενείς με NAFLD φαίνεται πως έχουν σημαντικά υψηλότερη μέση ενεργειακή πρόσληψη κατά 500-600 Kcal σε σχέση με υγιή άτομα [80].

1.2.2 Μακροθρεπτικά συστατικά

Λίπος

Η πρόσληψη λίπους είναι υψηλότερη σε ασθενείς με NAFLD [81] και επιπλέον οι NASH ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς με απλή ηπατική στεάτωση έχουν υψηλότερη πρόσληψη, προτείνοντας κάποιο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD [82].

Ειδικότερα, μια πηγή λιπαρών οξέων για τη συσσώρευση TG στο ήπαρ είναι το διατροφικό λίπος. Είναι πιθανό οι NAFLD ασθενείς να εμφανίζουν διαφορές στον μεταγευματικό ηπατικό μεταβολισμό του λίπους [83]. Σε μελέτη χορήγησης λίπους σε NASH ασθενείς και υγιείς, οι ασθενείς είχαν αυξημένη ηπατική πρόσληψη TG κατά την μεταγευματική περίοδο και μειωμένη ηπατική έκκριση VLDL σε σχέση με τους υγιείς, κάτι που προωθεί την ηπατική στεάτωση [84]. Επιπρόσθετα, η συσχέτιση μεταξύ του συνολικού διατροφικού λίπους και της ηπατικής στεάτωσης διερευνήθηκε σε μελέτη όπου παχύσαρκες γυναίκες ακολούθησαν 2 ισοθερμιδικές δίαιτες με το 16% και το 50% της ενέργειας αντίστοιχα να προέρχεται από λίπος για 2 εβδομάδες. Το ηπατικό λίπος μειώθηκε κατά 20% έπειτα από τη χαμηλή σε λίπος δίαιτα και αυξήθηκε κατά 35% έπειτα από την υψηλή σε λίπος δίαιτα. Αλλαγή παρατηρήθηκε και στα επίπεδα της ινσουλίνης νηστείας η οποία ήταν ανεξάρτητη από το σωματικό βάρος το οποίο δεν μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης [85]. Η ποιότητα του λίπους, όμως, θεωρείται πιο σημαντική για την εμφάνιση της NAFLD.

Κορεσμένα λιπαρά οξέα

Η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι υψηλότερη στους NASH ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς [84]. Η αυξημένη παρουσία κορεσμένων λιπαρών οξέων στο ήπαρ λόγω της υψηλής τους πρόσληψης σχετίζεται με αύξηση των δεικτών που σχετίζονται με το στρες ενδοπλασματικού δικτύου, την ηπατική δυσλειτουργία και με το πιο έντονο ηπατικό τραύμα, προτείνοντας ότι εμπλέκονται στην εξέλιξη της απλής ηπατικής στεάτωσης σε NASH [86].

Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA)

Για την πρόσληψη των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται κάτω από το συνιστώμενο επίπεδο στους NAFLD ασθενείς [87] ενώ άλλες μελέτες δεν έχουν δείξει διαφορά [84], [88]. Κύριοι εκπρόσωποι είναι το ελαιόλαδο και οι ξηροί καρποί. Τα MUFA δρουν ευνοϊκά στο λιπιδαιμικό προφίλ μειώνοντας το λόγο LDL/HDL χοληστερόλη και το λόγο ολική/HDL χοληστερόλη [83]. Σε μελέτη για τη NAFLD, φάνηκε ότι διατροφή με περισσότερο από 20% της συνολικής ημερήσιας πρόσληψης σε MUFA, αποδίδει όφελος για τη NAFLD καθώς αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων μέσω ενεργοποίησης των PPAR α και PPAR γ καθώς και μειώνει τη λιπογένεση μέσω μειωμένης ενεργοποίησης του SREBP [89].

Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)

Μια διατροφή χαμηλή σε PUFA, με υψηλή πρόσληψη ω -6 λιπαρών οξέων και υψηλό λόγο ω -6 λ.ο/ ω -3 λ.ο χαρακτηρίζει τους ασθενείς με NASH [90]. Επιπλέον, οι NAFLD ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς καταναλώνουν περισσότερο κρέας το οποίο περιέχει ω -6 λιπαρά οξέα και τείνουν να καταναλώνουν λιγότερο ψάρι το οποίο είναι πλούσιο σε ω -3 λιπαρά οξέα [88]. Λαμβάνοντας υπόψη την αντιφλεγμονώδη δράση των PUFA, την προφλεγμονώδη και προθρομβωτική δράση των ω -6 λιπαρών οξέων και τη φλεγμονή η οποία συνυπάρχει στην προχωρημένη NAFLD, αυτή η ανισορροπία μπορεί να εμπλέκεται στην εξέλιξη της νόσου. Μάλιστα, υψηλή πρόσληψη λίπους σε συνδυασμό με υπερβολική πρόσληψη ω -6 λιπαρών οξέων μπορεί να εμπλέκεται στην προώθηση της νεκροφλεγμονής [91].

Σχετικά με τα ω -3 λιπαρά οξέα, ο ρόλος τους στην εμφάνιση της NAFLD είναι προστατευτικός [83]. Είναι μόρια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του ηπατικού μεταβολισμού του

λίπους και δρουν σε πυρηνικό επίπεδο προσδεδεμένα σε πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι PPARα και SREBP. Προωθούν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην οξείδωση του λίπους και αναστέλλουν αυτά που εμπλέκονται στη σύνθεση του [92]. Σύμφωνα με συστηματική ανασκόπηση, η συμπληρωματική χορήγηση PUFA επηρεάζει ευνοϊκά το ηπατικό λίπος χωρίς να έχει αρνητικές επιδράσεις, προτείνοντας κάποιο ρόλο στη μείωση της ηπατικής στεάτωσης [93]. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση, επιπλέον αναγνωρίστηκε πως η συμπληρωματική χορήγηση των PUFA είναι μια αποτελεσματική πρακτική για τη NAFLD με στόχο τη μείωση των επιπέδων της ALT, της ολικής χοληστερόλης και των TG και την αύξηση της HDL χοληστερόλης [94].

Trans λιπαρά οξέα

Ο ρόλος των trans λιπαρών οξέων στο ηπατικό τραύμα σε ασθενείς με NAFLD δεν είναι πλήρως καθορισμένος. Η συσχέτιση μεταξύ των trans λιπαρών οξέων και του αυξημένου κινδύνου για IR και καρδιαγγειακά νοσήματα η οποία άγεται μέσω αύξησης της LDL χοληστερόλης, των TG, της CRP και μέσω μείωσης της HDL χοληστερόλης και της προώθησης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, προτείνει πως τα trans λιπαρά οξέα μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση της NAFLD [83]. Δεδομένα από ζωικό μοντέλο δείχνουν πως ποντίκια που τρέφονται με trans λιπαρά οξέα έχουν εντονότερη ηπατική στεάτωση και ηπατικό τραύμα λόγω υψηλότερης ηπατικής λιπογένεσης σε σχέση με ποντίκια που τρέφονται είτε με μονοακόρεστα είτε με κορεσμένα λιπαρά οξέα [95].

Χοληστερόλη

Η αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης προωθεί τη DNL στα ηπατοκύτταρα και μπορεί να οδηγεί σε ηπατική στεάτωση, ακόμη και υπό ενεργειακό ισοζύγιο. Μάλιστα, προτείνεται πως η συσσώρευση χοληστερόλης στο ήπαρ έχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της NAFLD, πιθανότατα λόγω αυξημένης ευαισθησίας του ήπατος στον οξειδωτικό κυτταρικό θάνατο [96].

Υδατάνθρακες

Η πρόσληψη υδατανθράκων είναι αυξημένη στους NAFLD ασθενείς [81] και οι NASH ασθενείς έχουν υψηλότερη πρόσληψη σε σχέση με τους ασθενείς με απλή ηπατική στεάτωση [97]. Η υπερβολική πρόσληψη μπορεί να είναι επιζήμια για τους ασθενείς αυτούς και φαίνεται να σχετίζεται με φλεγμονή και εξέλιξη της νόσου [67]. Σε παχύσαρκα άτομα, πρόσληψη υδατανθράκων στο υψηλότερο συνιστώμενο όριο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ίνωση. Η επίδραση αυτή διαμεσολαβείται μέσω προώθησης της IR [98]. Αντίθετα, δίαιτες χαμηλές σε υδατάνθρακες (<45% της ΗΕΠ), δείχνουν θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την απώλεια βάρους, τη μείωση του ηπατικού λίπους και τη βελτίωση των μεταβολικών παραμέτρων σε παχύσαρκα άτομα [99]. Μια μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών (randomized controlled trials-RCTs), στην οποία έγινε σύγκριση μεταξύ δίαιτας χαμηλής σε λίπος και δίαιτας χαμηλής σε υδατάνθρακες σε 2800 άτομα, έδειξε πως η δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες φέρνει σημαντική μείωση των TG και αύξηση της HDL [100]. Προτείνεται όμως πως πέρα από την ποσότητα των υδατανθράκων, είναι πιο σημαντική η ποιότητα και το είδος.

Σύνθετοι υδατάνθρακες

Η κατάλληλη πρόσληψη σύνθετων υδατανθράκων από τρόφιμα χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη (glycemic index-GI) είναι πιθανό πως δρα ευνοϊκά ως προς τη NAFLD ενώ η κατανάλωση υδατανθράκων από τρόφιμα υψηλού GI φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση [101]. Σε μελέτη, μια διατροφή υψηλού GI σε ασθενείς με IR, συσχετίστηκε με υψηλό βαθμό ηπατικής στεάτωσης με τους ασθενείς σε δίαιτα υψηλού GI να έχουν διπλάσια επίπεδα ηπατικής στεάτωσης σε σχέση με τους ασθενείς σε δίαιτα χαμηλού ή μέτριου GI [102]. Υπάρχει βέβαια πιθανότητα άλλα συστατικά των τροφίμων αυτών ή οι συνολικές διατροφικές συνήθειες των ατόμων να έχουν επίσης κάποιο ρόλο σε αυτή τη σχέση [102]. Πιθανά, ο GI των τροφίμων δρα μέσω πολλαπλών μηχανισμών οι οποίοι σχετίζονται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και του λίπους στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς. Τα τρόφιμα υψηλού GI απαιτούν την κινητοποίηση υψηλών επιπέδων ινσουλίνης, η οποία μειώνει τη δραστηριότητα των περιφερικών υποδοχέων της ινσουλίνης και αυξάνει την IR. Υπό αυτές τις συνθήκες, μειώνεται η δραστηριότητα του μεταβολικού μονοπατιού το οποίο ελέγχει τη μιτοχονδριακή οξείδωση του λίπους, κάτι το οποίο

επίσης προκαλεί ενδοκυτταρική συσσώρευση λίπους. Από την άλλη πλευρά, τα τρόφιμα χαμηλού GI φαίνεται πως βελτιώνουν τη μεταγευματική γλυκαιμία, πιθανά μειώνοντας τη συγκέντρωση των FFAs και τον ανταγωνισμό γλυκόζης-FFAs και διατηρώντας τη δράση της ινσουλίνης στους ιστούς [101].

Απλοί υδατάνθρακες

Οι NASH ασθενείς έχουν υψηλότερη πρόσληψη απλών υδατανθράκων σε σχέση με τους ασθενείς με απλή ηπατική στεάτωση [97] και για τη φρουκτόζη ειδικά έχει φανεί πως η πρόσληψη της είναι 2-3 φορές υψηλότερη στους NAFLD ασθενείς [103]. Η υπερκατανάλωση των απλών υδατανθράκων και κυρίως της φρουκτόζης, επηρεάζει την εμφάνιση της NAFLD και αυξάνει ραγδαία τα επίπεδα γλυκόζης [103]. Η πιο άφθονη διατροφική πηγή φρουκτόζης είναι το σιρόπι καλαμποκιού υψηλής φρουκτόζης (high fructose corn syrup-HFCS) το οποίο χρησιμοποιείται στα αναψυκτικά και υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως αυτή η βιομηχανοποιημένη μορφή φρουκτόζης έχει μια πιο ειδική επιβλαβή επίδραση στο ήπαρ. Σε συμφωνία με αυτό, η μείωση στην πρόσληψη της βελτιώνει τα χαρακτηριστικά του ΜΣ σε παχύσαρκα άτομα, ανεξάρτητα από την κατανάλωση φρουκτόζης από φρούτα. Η διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών πηγών πιθανά προέρχεται από τα θρεπτικά συστατικά που περιέχουν τα φρούτα τα οποία έχουν κυτταροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σε σχέση με το ανθυγιεινό διατροφικό πρότυπο, το οποίο συνδυάζεται με τα αναψυκτικά [104].

Η υπερκατανάλωση της φρουκτόζης σχετίζεται στενά με την παχυσαρκία και τη στεάτωση, πιθανά μέσω ενεργοποίησης του SREBP-1c, ενός μεταγραφικού παράγοντα που προωθεί την έκφραση ενζύμων τα οποία σχετίζονται με τη DNL [103]. Μάλιστα, η φρουκτόζη προωθεί τη DNL και υπό συνθήκες IR καθώς δεν απαιτεί την ινσουλίνη για το μεταβολισμό της. Επιπλέον, η φρουκτόζη οδηγεί σε εξάντληση του ATP και καταστολή της μιτοχονδριακής οξείδωσης των λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS. Τέλος, έχει ρόλο και στην προώθηση του στρες ενδοπλασματικού δικτύου και του σχηματισμού του ουρικού οξέος, καταστάσεις οι οποίες επίσης οδηγούν στη DNL ανεξάρτητα από την ινσουλίνη [104]. Ωστόσο, δεδομένα από μια συστηματική ανασκόπηση μελετών παρέμβασης και παρατήρησης σε ενήλικες και παιδιά έδειξαν ότι η εμφανής συσχέτιση μεταξύ δεικτών ηπατικής υγείας και της

κατανάλωσης φρουκτόζης ή γλυκόζης εμφανίζεται μόνο όταν συνυπάρχει υπερθερμιδική διατροφή [105]. Λαμβάνοντας, επομένως, υπόψη πως η υπερβολική ενεργειακή πρόσληψη είναι συγχυτικός παράγοντας, κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω διερεύνηση για να καθοριστεί εάν οι απλοί υδατάνθρακες και κυρίως η φρουκτόζη, όπως καταναλώνεται σε επίπεδο πληθυσμού, επηρεάζει την ηπατική DNL και την εμφάνιση της NAFLD ανεξάρτητα από την υπερβολική θερμιδική πρόσληψη.

Πρωτεΐνη

Η πρόσληψη πρωτεϊνών στους ασθενείς με NAFLD δεν είναι καθορισμένη. Έχει αναφερθεί να είναι χαμηλότερη αλλά επαρκής [90], όμως υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως οι ασθενείς έχουν υψηλότερη πρόσληψη σε σχέση με τους υγιείς [88]. Έως τώρα, η επίδραση της ποσότητας και της ποιότητας των πρωτεϊνών στην εμφάνιση της NAFLD και το ηπατικό λίπος δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη.

Σε κλινική μελέτη, μια υποθερμιδική δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνη φάνηκε να βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ, το μεταβολισμό της γλυκόζης και τα ηπατικά ένζυμα ακόμη και χωρίς ταυτόχρονη απώλεια βάρους [106]. Επιπρόσθετα, άλλη κλινική μελέτη, έδειξε πως μια διατροφή υψηλή σε πρωτεΐνη είχε ωφέλιμη επίδραση στη σύσταση του σώματος και την ινσουλινοευαισθησία [107]. Η πρωτεΐνη φαίνεται να δρα θετικά στο μεταβολισμό της γλυκόζης και την παραγωγή ινσουλίνης. Είναι απαραίτητη για την αναγέννηση των ηπατοκυττάρων και παρέχει απαραίτητα αμινοξέα για την ένταξη των λιπαρών οξέων στις λιποπρωτεΐνες και την εξαγωγή τους από το ήπαρ, έχοντας πιθανό ρόλο στην πρόληψη της στεάτωσης [108]. Επιπλέον, σε ζωικά μοντέλα φαίνεται πως μια υψηλή σε πρωτεΐνη και χαμηλή σε υδατάνθρακες διατροφή μειώνει την εναπόθεση λίπους στο λιπώδη ιστό, βελτιώνει την ομοιοστάση της γλυκόζης και μειώνει τη στεάτωση μέσω αναστολής της de novo λιπογένεσης [109]. Από την άλλη πλευρά, σε μελέτη, η πρόσληψη πρωτεϊνών συσχετίστηκε με τη νόσο. Η πρωτεΐνη ταξινομήθηκε σε 6 κατηγορίες (πρωτεΐνη από κρέας πλούσιο σε λίπος, από άπαχο κρέας, από ψάρι, από ψάρι πλούσιο σε ω-3 λιπαρά οξέα, από πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα και από άπαχα γαλακτοκομικά προϊόντα). Οι NAFLD ασθενείς κατανάλωναν κατά 27% περισσότερο πρωτεΐνη προερχόμενη από

κρέας (πλούσιο σε λίπος και άπαχο) σε σχέση με τους υγιείς. Στην ίδια μελέτη, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ και την ενεργειακή πρόσληψη, η πρόσληψη πρωτεΐνης η οποία προερχόταν από όλες τις πηγές συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για NAFLD ενώ η πρόσληψη πρωτεΐνης από ψάρια πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα είχε τάση να μειώνει τον κίνδυνο για τη νόσο [88].

1.2.3 Μικροθρεπτικά συστατικά

Βιταμίνη Ε

Οι NAFLD ασθενείς έχουν χαμηλή πρόσληψη βιταμίνης Ε [84] και χαμηλά επίπεδα πλάσματος [98]. Η χαμηλή πρόσληψη βιταμίνης Ε σε συνδυασμό με την υπεροξείδωση λίπους και το οξειδωτικό στρες μπορεί να συνεισφέρει στο ηπατοκυτταρικό τραύμα, τη φλεγμονή και την ίνωση σε NASH ασθενείς [84]. Για αυτό, η βιταμίνη Ε με την αντιοξειδωτική της δράση έχει μελετηθεί ως θεραπευτική λύση στη NASH. Αν και οι μελέτες έχουν περιορισμούς, προτείνεται ότι η βιταμίνη Ε μπορεί να βελτιώνει τη στεάτωση, τη φλεγμονή και τα ηπατικά ένζυμα. Μετα-ανάλυση RCTs η οποία αξιολόγησε διαφορετικές δόσεις χορήγησης σε άτομα με ηπατική νόσο, κατέληξε πως η συμπληρωματική χορήγηση σημαντικά βελτιώνει την ηπατική λειτουργία και τις ιστολογικές αλλαγές σε NAFLD και NASH ασθενείς [110].

Χολίνη

Η χολίνη είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό, άφθονο στη διατροφή [111]. Η ανεπάρκεια της οδηγεί σε ηπατική συσσώρευση λίπους και οργανική δυσλειτουργία στην πλειοψηφία των ατόμων, καταστάσεις οι οποίες είναι αναστρέψιμες έπειτα από χορήγηση της [112]. Η επίδραση της ανεπάρκειας εκτείνεται από την ηπατική στεάτωση έως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [111].

Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες, με κυριότερες τις κατεχίνες και τις ανθοκυανίνες, είναι μια ομάδα φυτοχημικών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση οι οποίες περιέχονται στα φρούτα και τα λαχανικά [113]. Οι ανθοκυανίνες είναι πιθανό να προστατεύουν τα ηπατοκύτταρα από το τραύμα το οποίο προκαλείται από το οξειδωτικό στρες βελτιώνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού και αναστέλλοντας τα μονοπάτια απόπτωσης των μιτοχονδρίων [114]. Για τις κατεχίνες έχει βρεθεί ότι μειώνουν το οξειδωτικό στρες και έχουν αντι-υπεργλυκαιμική δράση [115].

1.2.4 Ομάδες τροφίμων

Έτοιμο φαγητό (τύπου fast food)

Η κατανάλωση έτοιμου φαγητού σχετίζεται με συνολικά υψηλή ενεργειακή πρόσληψη, φτωχή πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και υψηλή κατανάλωση σακχαρούχων αναψυκτικών και τηγανητών τροφίμων καθώς και με αυξημένο σωματικό βάρος και IR [116]. Σε μελέτη, η οποία αξιολόγησε την επίδραση του έτοιμου φαγητού στην ηπατική λειτουργία, 18 υγιείς μαθητές ακολούθησαν δίαιτα με 2 τουλάχιστον έτοιμα γεύματα/ημέρα για 4 εβδομάδες. Η ενεργειακή πρόσληψη, το ηπατικό λίπος και τα επίπεδα της ALT αυξήθηκαν καθώς και η IR διπλασιάστηκε [117]. Επιπρόσθετα, στη μελέτη «Cardia», η συνήθης κατανάλωση έτοιμου φαγητού αξιολογήθηκε σε νεαρούς ενήλικες στην αρχή και έπειτα από 15 χρόνια με στόχο τη διερεύνηση της σχέσης της συχνότητας κατανάλωσης έτοιμου φαγητού με το σωματικό βάρος και την IR. Η υψηλή συχνότητα κατανάλωσης έτοιμου φαγητού στην αρχή και μετά από 15 χρόνια οδήγησε σε αυξημένη IR και σε υψηλότερη πρόσληψη βάρους, ανεξάρτητα από την εθνικότητα, με τη συχνότητα να σχετίζεται θετικά με την μέση ενεργειακή πρόσληψη [118].

Σακχαρούχα αναψυκτικά

Τα σακχαρούχα αναψυκτικά είναι η κύρια πηγή πρόσθετων σακχάρων όπως η γλυκόζη και κυρίως η φρουκτόζη. Για τους NAFLD ασθενείς έχει φανεί πως η ημερήσια κατανάλωση σακχαρούχων αναψυκτικών και η μέση συχνότητα κατανάλωσης είναι τουλάχιστον 2 φορές υψηλότερη σε σχέση με τους υγιείς [103]. Πολλές μελέτες παρατήρησης υποστηρίζουν τη θετική συσχέτιση της κατανάλωσης σακχαρούχων αναψυκτικών και της NAFLD. Μάλιστα, οι αλλαγές στο επίπεδο της ηπατικής στεάτωσης έχει φανεί πως συσχετίζονται με τον αριθμό των μπουκαλιών με σακχαρούχα αναψυκτικά που καταναλώνονται, αναδεικνύοντας πως πρόκειται για ένα ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για ηπατική στεάτωση [119]. Σε άλλη μελέτη, η κατανάλωση αναψυκτικών φάνηκε να είναι ο μόνος ανεξάρτητος παράγοντας που ήταν ικανός να προβλέψει την παρουσία της NAFLD στο 82.5% του συνόλου του δείγματος, με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 76% [120].

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα σακχαρούχα αναψυκτικά σχετίζονται με τη NAFLD αφορά την υψηλή τους περιεκτικότητα σε HFCs και επακόλουθα σε φρουκτόζη με όλες τις αρνητικές της επιδράσεις όπως προαναφέρθηκε [104]. Όσον αφορά το μονοπάτι μέσω του οποίου τα σακχαρούχα αναψυκτικά μπορεί να οδηγήσουν σε ίνωση και πάλι σχετίζεται με τη φρουκτόζη η οποία εκτός των άλλων μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων ουρικού οξέος με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [121]. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση, σε NAFLD ασθενείς η υπερουριχαιμία σχετίζεται με μεγαλύτερη ιστολογική ηπατική βλάβη [122].

Ολ.άλεσης τρόφιμα

Τα ολ.άλεσης τρόφιμα φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στην πρόληψη και/ή την εξέλιξη της NAFLD [113]. Σύμφωνα με μετα-αναλύσεις μελετών παρατήρησης, η αυξημένη κατανάλωση ολ.αλέσης τροφίμων συμβάλει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ΣΔ2 και της πιθανότητας για παχυσαρκία, στη μείωση της LDL χοληστερόλης και την πρόληψη της επιδείνωσης της δυσανοχής στη γλυκόζη, όλοι παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την παθογένεση της NAFLD [123], [124].

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα ολ.άλεσης τρόφιμα δρουν ευνοϊκά στη NAFLD είναι πολλαπλοί και σχετίζονται με τα διάφορα συστατικά τους. Τα τρόφιμα αυτά είναι πιο πλούσια σε

αντιοξειδωτικές βιταμίνες, φυτικές ίνες και μέταλλα σε σχέση με τα αντίστοιχα επεξεργασμένα τρόφιμα. Ειδικότερα, τα ολ.άλεσης τρόφιμα έχουν χαμηλή ενεργειακή πυκνότητα, προωθούν το αίσθημα του κορεσμού και επακόλουθα οδηγούν σε μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη. Επιπλέον, συμβάλουν θετικά στη διαμόρφωση της εντερικής μικροχλωρίδας λόγω πρεβιοτικής δράσης και επηρεάζουν ευνοϊκά μέσω των ευεργετικών δράσεων των φυτοχημικών τους ουσιών [113]

Φρούτα και λαχανικά

Η κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και φυτικών ινών έχει φανεί να είναι χαμηλότερη στους NAFLD ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς [113]. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια σε διάφορες παθήσεις, όπως ο ΣΔ2 και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα λαχανικά μειώνουν τη συνολική ενεργειακή πυκνότητα της διατροφής, συμβάλουν στο αίσθημα του κορεσμού και επακόλουθα μειώνουν την ενεργειακή πρόσληψη, κάτι που μπορεί να συμβάλει στη διαχείριση του βάρους [113]. Σε μελέτη, η κατανάλωση μη αμυλούχων λαχανικών συσχετίστηκε με μειωμένη ηπατική εναπόθεση λίπους, αυξημένη ινσουλινοευαισθησία και μειωμένο σπλαγνικό λίπος [125]. Σε άλλη μελέτη, η κατανάλωση φρέσκων και αποξηραμένων φρούτων, λαχανικών και οσπρίων συσχετίστηκε αρνητικά με την πιθανότητα εμφάνισης της NAFLD. Ειδικότερα, τα άτομα που κατανάλωναν ποσότητα 200 γρ/ημέρα από το κάθε τρόφιμο είχαν κατά 50% μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης της NAFLD σε σχέση με τα άτομα σε χαμηλότερη κατανάλωση [126]. Σε μετα-ανάλυση 19 μελετών με 1 εκατομμύρια άτομα, ο κίνδυνος για ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μειώθηκε κατά 8% για κάθε αύξηση κατά 100 γρ/ημέρα στην κατανάλωση λαχανικών, έπειτα από έλεγχο για πρόσληψη αλκοόλ, κάπνισμα και ενεργειακή πρόσληψη. Ωστόσο, η κατανάλωση φρούτων δε συσχετίστηκε με κάποια μείωση στον κίνδυνο αυτό, πιθανά λόγω του περιεχομένου τους σε φρουκτόζη [127].

Ψάρια

Τα ψάρια αποτελούν την κύρια πηγή των PUFA τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, έχουν ωφέλιμη επίδραση στη NAFLD και τη NASH με διάφορους μηχανισμούς, αναδεικνύοντας τη σημασία της επαρκούς κατανάλωσης ψαριών [113].

Κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας

Οι NAFLD ασθενείς έχει φανεί πως καταναλώνουν κατά 27% περισσότερο κρέας (πλούσιο σε λίπος και άπαχο) σε σχέση με τους υγιείς έπειτα από έλεγχο για συγχυτικούς παράγοντες [88]. Η επίδραση της κατανάλωσης κρέατος δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ως προς τη NAFLD με κάποιες μελέτες βέβαια να δείχνουν συσχέτιση. Ωστόσο, εντατικά η κατανάλωση κρέατος έχει αξιολογηθεί ως προς το ΣΔ2 και τα καρδιαγγειακά νοσήματα [113]. Σε μετα-ανάλυση προοπτικών μελετών, αναγνωρίστηκε συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης επεξεργασμένου κρέατος και του κινδύνου για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και ΣΔ2 καθώς και της συνολικής και καρδιαγγειακής θνησιμότητας. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε κάποια αντίστοιχη συσχέτιση με το μη επεξεργασμένο κρέας [128]. Στη μελέτη Women's Health, η κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔ2. Σε πολυεθνική μελέτη, η πρόσληψη κόκκινου κρέατος συσχετίστηκε θετικά με το ΣΔ2, αναδεικνύοντας επίσης πως η συσχέτιση για τα επεξεργασμένα πουλερικά είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτή για το επεξεργασμένο κόκκινο κρέας. Επιπλέον, η κατανάλωση φρέσκων πουλερικών δεν συσχετίστηκε με τον κίνδυνο για ΣΔ2 [129].

Το κόκκινο κρέας περιέχει κορεσμένα λιπαρά οξέα και χοληστερόλη, τα οποία σχετίζονται όπως προαναφέρθηκε με τη NAFLD, καθώς και άλλα δυνητικά επιζήμια συστατικά όπως το νάτριο, τα νιτρώδη-νιτρικά και τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (advanced glycation products-AGEs), τα οποία εμπεριέχονται πολύ περισσότερο στο επεξεργασμένο κρέας. Τα συστατικά αυτά έχει φανεί ότι επηρεάζουν τον κίνδυνο για ΣΔ2 και δυνητικά μπορεί να έχουν ρόλο και για τη NAFLD [113].

1.2.5 Διατροφικά πρότυπα

Η αξιολόγηση του ρόλου της διατροφής στην εμφάνιση της NAFLD, όπως αναλύθηκε, παραδοσιακά εστιάζει στην επίδραση των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών και της κατανάλωσης ομάδων τροφίμων. Ωστόσο, καθώς η διατροφή είναι συνδυασμός πολλών τροφίμων και συστατικών, η ανάλυση σε διατροφικά πρότυπα αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ της διατροφής και του κινδύνου για τη νόσο σε επιδημιολογικές μελέτες. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει την αξιολόγηση της διατροφής στο σύνολο της και συνυπολογίζει τη πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση ανάμεσα στα τρόφιμα και τα θρεπτικά συστατικά και επομένως καταλήγει σε μια πιο αποτελεσματική και ρεαλιστική διερεύνηση της σχέσης της διατροφής και της εμφάνισης της NAFLD [130].

Μελέτες ανάλυσης των διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD

Σε προοπτική μελέτη σε εφήβους της μελέτης Raine, αξιολογήθηκε η σχέση μεταξύ των διατροφικών προτύπων στα 14 έτη με την εμφάνιση της NAFLD στα 17 έτη. Ένα Δυτικού τύπου πρότυπο το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, προϊόντα ζαχαροπλαστικής, κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας, επεξεργασμένα αμυλούχα τρόφιμα, πατατάκια, σως, γαλακτοκομικά υψηλά σε λιπαρά και αναψυκτικά συσχετίστηκε με την εμφάνιση της NAFLD ανεξάρτητα από το φύλο, την υποεκτίμηση ή την υπερεκτίμηση της ενεργειακής πρόσληψης, το εισόδημα και τη σωματική δραστηριότητα. Ειδικότερα, οι έφηβοι στο υψηλότερο τεταρτημόριο του δυτικού τύπου προτύπου στα 14 έτη είχαν 2.6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για τη NAFLD στα 17 έτη σε σχέση με τους εφήβους στο χαμηλότερο τεταρτημόριο. Η σχέση όμως δεν ήταν ανεξάρτητη από το ΔΜΣ στα 14 έτη, προτείνοντας πως το πρότυπο επιδρά στη NAFLD μέσω της παχυσαρκίας. Επιπλέον, ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο στα 14 έτη ήταν προστατευτικό ως προς τη NAFLD στα 17 έτη σε κεντρικά παχύσαρκους εφήβους ενώ στην ίδια ομάδα ένα δυτικού τύπου πρότυπο στα 14 έτη αύξανε τον κίνδυνο ως προς τη NAFLD στα 17 έτη [131].

Σε συγχρονική μελέτη στην Κίνα, αξιολογήθηκε η σχέση μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της NAFLD. Ένα πρότυπο με υψηλή κατανάλωση σε ζωικά τρόφιμα όπως και ένα

πρότυπο με υψηλή κατανάλωση σε σπόρους και λαχανικά συσχετίστηκε με τη NAFLD. Έπειτα από έλεγχο για συγχυτικούς παράγοντες, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο του ζωικού προτύπου είχαν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης για τη NAFLD σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο. Επιπλέον, έπειτα από έλεγχο για το ΔΜΣ, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο του προτύπου με τους σπόρους και τα λαχανικά είχαν μικρότερη συχνότητα εμφάνισης για τη NAFLD σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο, κάτι που προτείνει πως αυτή η επίδραση δρα ανεξάρτητα από την παχυσαρκία [132].

Σε άλλη συγχρονική μελέτη στην Κίνα, αξιολογήθηκε η σχέση μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της NAFLD. Ένα πρότυπο το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση υδατανθράκων και γλυκών συσχετίστηκε θετικά με τη NAFLD στις γυναίκες. Οι γυναίκες στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης είχαν 2.19 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της NAFLD σε σχέση με αυτές στο χαμηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης, έπειτα από έλεγχο για συγχυτικούς παράγοντες [133].

Σε συγχρονική μελέτη σε άτομα τρίτης ηλικίας, αξιολογήθηκε η σχέση μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της NAFLD. Η μεγαλύτερη προσκόλληση με ένα υγιεινό πρότυπο συσχετίστηκε αντίστροφα με τη NAFLD, έπειτα από έλεγχο για συγχυτικούς παράγοντες [134].

Τέλος, σε συγχρονική μελέτη, αξιολογήθηκε η σχέση μεταξύ προτύπων του τρόπου ζωής και των κλινικών χαρακτηριστικών ατόμων με NAFLD. Ένα πρότυπο που χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε χαμηλά σε λιπαρά γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, ψάρια και από βέλτιστη διάρκεια ύπνου, συσχετίστηκε αρνητικά με την IR και την ακαμψία του ήπατος, ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία, το ΔΜΣ, την ενεργειακή πρόσληψη, το κάπνισμα και τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNFa [135].

Μεσογειακό πρότυπο διατροφής

Το μεσογειακό πρότυπο διατροφής παραδοσιακά χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, ολ.άλεσης αμυλούχων τροφίμων και καρπών, από μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και ψαριών, από χαμηλή κατανάλωση πουλερικών, κόκκινου κρέατος και κορεσμένου λίπους και από έμφαση στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί. Τα οφέλη της μεσογειακής διατροφής στις διάφορες παθήσεις οφείλονται στη σύσταση της στα τρόφιμα αυτά και στα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά [113].

Η μεσογειακή διατροφή έχει ένα καλά καθορισμένο όφελος στην πρόληψη του ΣΔ2 και των καρδιαγγειακών νοσημάτων, παθήσεις που σχετίζονται ισχυρά με τη NAFLD. Επομένως, η μεσογειακή διατροφή έχει θετική επίδραση σε παράγοντες που σχετίζονται με τη νόσο, όπως η δυσλιπιδαιμία, η IR και η σπλαγχνική παχυσαρκία [101].

Ειδικότερα για τη NAFLD, η μεσογειακή διατροφή έχει προταθεί ως η κατάλληλη για τους NAFLD ασθενείς από τις EASL-EASD-EASO κατευθυντήριες οδηγίες [136]. Έχει εγκαθιδρυμένη υπεροχή στη μακροπρόθεσμη μείωση του σωματικού βάρους σε σχέση με δίαιτα χαμηλού λίπους, αλλά βελτιώνει το μεταβολικό προφίλ και την ηπατική στεάτωση ακόμη και χωρίς παράλληλη απώλεια βάρους [113].

Σε ελληνική συγχρονική μελέτη, αξιολογήθηκε η σχέση της προσκόλλησης στη μεσογειακή διατροφή μέσω του MedDietScore με την εμφάνιση και τη σοβαρότητα της NAFLD. Το MedDietScore συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα της ALT και της ινσουλίνης, του HOMA-IR και της σοβαρότητας της ηπατικής στεάτωσης και θετικά με τα επίπεδα της αδιπνονεκτίνης. Οι NASH ασθενείς είχαν χαμηλότερη προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή σε σχέση με τους NAFLD ασθενείς. Αύξηση στο MedDietScore κατά 1 μονάδα συσχετίστηκε με 36% μικρότερη πιθανότητα για τη NASH έπειτα από έλεγχο για το φύλο και το σπλαγχνικό λίπος. Σε συμφωνία με αυτό, και άλλες μελέτες παρατήρησης, έχουν δείξει πως η υψηλότερη προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή έχει προστατευτική δράση ως προς τη σοβαρότητα της NAFLD και την εξέλιξη σε NASH [137].

Επιπρόσθετα, σε μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, ασθενείς με ΣΔ2 ακολούθησαν για 8 εβδομάδες είτε υψηλή σε υδατάνθρακες και φυτικές ίνες δίαιτα είτε υψηλή σε MUFA δίαιτα με

ισοθερμιδικό περιεχόμενο. Τα ηπατικό λίπος μειώθηκε περισσότερο κατά τη δίαιτα με τα MUFA σε σχέση με την άλλη δίαιτα (29% vs 4%), με το βάρος να μένει σταθερό και στις 2 περιπτώσεις [138]. Σε συμφωνία με αυτό, σε μια άλλη RCT, ασθενείς με NAFLD ακολούθησαν για 6 εβδομάδες, είτε μεσογειακή διατροφή είτε χαμηλή σε λίπος και υψηλή σε υδατάνθρακες δίαιτα. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στην ηπατική στεάτωση κατά τη μεσογειακή διατροφή σε σχέση με την άλλη δίαιτα (39% vs 7%), με παράλληλη μικρή απώλεια βάρους η οποία όμως δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων [139].

Δείκτες ποιότητας διατροφής

Σε μελέτη, ο δείκτης ποιότητας διατροφής DQI-I (Diet Quality Index-International) συσχετίστηκε με τη συχνότητα εμφάνισης της NAFLD. Μείωση στο δείκτη DQI-I κατά 10 μονάδες και επομένως μια λιγότερο ποιοτική διατροφή συσχετίστηκε με 24% αύξηση στην πιθανότητα εμφάνισης της νόσου έπειτα από έλεγχο για το φύλο, την ηλικία, περιβαλλοντικούς, μεταβολικούς και γενετικούς παράγοντες. Η σχέση ήταν πιο ισχυρή στα άτομα με υπερβαρότητα ή παχυσαρκία σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους [126]. Σε άλλη μελέτη, οι δείκτες ποιότητας διατροφής HEI (healthy eating index) και MAR (mean adequacy ratio of nutrients) ήταν σε υψηλότερο επίπεδο στους υγιείς σε σχέση με τους NAFLD ασθενείς [140].

1.2.6 Ανάγκη για αξιολόγηση του ρόλου των διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD

Η ανάλυση των διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD έχει μεγάλη αξία καθώς αξιολογεί τη διατροφή στο σύνολο της, συνεκτιμά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τροφίμων και των θρεπτικών συστατικών και βασίζεται στη συνήθη κατανάλωση των τροφίμων η οποία ομοιάζει με τη πραγματική διατροφή δίνοντας τη δυνατότητα για διεξαγωγή συστάσεων. Πρόκειται για την πιο αναγνωρισμένη προσέγγιση στην επιδημιολογία της διατροφής. Όπως, αναλύθηκε παραπάνω, για τη NAFLD υπάρχουν λίγες μελέτες οι οποίες έχουν πραγματοποιήσει ανάλυση διατροφικών προτύπων, κυρίως σε χώρες με διαφορετικές συνήθειες από την Ελλάδα. Επομένως, λόγω σχετικής ένδειας δεδομένων παγκόσμια και στον ελληνικό χώρο, προκύπτει η αναγκαιότητα για την αξιολόγηση του ρόλου της διατροφής υπό μορφή διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD.

1.3 Ο ρόλος των γενετικών πολυμορφισμών ως προς τη NAFLD

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί αυξάνουν τον κίνδυνο για τη NAFLD και η προδιάθεση που δημιουργείται είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των επιδράσεων από πολλαπλούς σχετικά κοινούς αιτιολογικούς γενετικούς πολυμορφισμούς [27].

Την τελευταία δεκαετία, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για το γενετικό υπόβαθρο της νόσου μέσα από μελέτες γονοτύπησης και GWAS μελέτες κάτι που έχει συμβάλει στην αναγνώριση δεκάδων γενετικών πολυμορφισμών οι οποίοι σχετίζονται με τη νόσο. Οι πολυμορφισμοί αυτοί, κατά κύριο λόγο, εμπλέκονται με την ηπατική ροή των λιπαρών οξέων, το μεταβολισμό των TG και της γλυκόζης, τη ρύθμιση της ινσουλίνης, το οξειδωτικό στρες, την απόκριση στις ενδοτοξίνες, την παραγωγή και δραστηριότητα των κυτοκινών και την ίνωση. Αναμένεται όμως όλο και περισσότεροι γενετικοί πολυμορφισμοί να αναγνωριστούν με την υλοποίηση επιπρόσθετων εκτεταμένων GWAS μελετών [69].

Έως τώρα, μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών που έχουν αναγνωριστεί, δύο έχουν ξεχωρίσει έντονα, ο rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και ο rs58542926 του γονιδίου TM6SF2. Sookian 2017 [69]. Άλλοι σημαντικοί γενετικοί πολυμορφισμοί οι οποίοι έχουν αναγνωριστεί είναι ο rs780094 του γονιδίου GCKR, ο rs641738 του γονιδίου MBOAT7, ο rs12137855 του γονιδίου LYPLAL1, ο rs 4240624 του γονιδίου PPP1R3B, ο rs222054 του γονιδίου GC, ο rs7324845 του γονιδίου LCP-1, ο πολυμορφισμός 238 του γονιδίου TNFa και οι rs2854116 και rs2854116 του γονιδίου APOC3 [69, 141, 142].

Πίνακας 1.3 Κυριότεροι γενετικοί πολυμορφισμοί για τη NAFLD [69, 141, 142]

Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Αλληλόμορφο κινδύνου	Χρωμόσωμα
PNPLA3	rs738409	G	22
TM6SF2	rs58542926	A	19
GCKR	rs780094	A	2
MBOAT7	rs641738	T	19
LYPLAL1	rs12137855	C	1
PPP1R3B	rs4240624	A	8
GC	rs222054	C	4
LCP-1	rs7324845	A	13
TNF-a	Variant 238	A	19
APOC3	rs2854116	C	11
APOC3	rs2854117	T	11

1.3.1 Γονίδιο PNPLA3

Το γονίδιο PNPLA3 κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 481 αμινοξέα, την αδιπονουτρίνη η οποία εκφράζεται στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό [142].

Η πρώτη GWAs ανάλυση για τη NAFLD έγινε στη μελέτη «Dallas Heart» όπου έγινε αξιολόγηση 9000 απλών γενετικών πολυμορφισμών σε 2111 άτομα. Ο μόνος που συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το ενδοηπατικό λίπος ήταν ο rs738409 του γονιδίου PNPLA3 [12]. Ο πολυμορφισμός προκύπτει από αντικατάσταση της ισολευκίνης από μεθειονίνη στο κωδικόνιο 148 και προκύπτει το αλληλόμορφο I148M [142].

Από τότε ο ρόλος του αλληλόμορφου G του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3 στην εμφάνιση της NAFLD έχει επιβεβαιωθεί και έτσι θεωρείται ως ο κύριος γενετικός παράγοντας για την εμφάνιση της NAFLD και της NASH. Η επίδραση του στον κίνδυνο για την

ηπατική στεάτωση είναι η ισχυρότερη που έχει αναφερθεί για ένα κοινό πολυμορφισμό, κάτι που τροποποιεί τη γενετική προδιάθεση για τη NAFLD (5.3% της συνολικής διακύμανσης) [143].

Ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται στατιστικά σημαντικά και έντονα με την ηπατική συσσώρευση λίπους. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση οι φορείς για το G αλληλόμορφο έχουν 73% περισσότερο ηπατικό λίπος, 3.2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για νεκροφλεγμονή και 3.2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για ίνωση σε σχέση με τους μη φορείς [144]. Όπως φαίνεται, το αλληλόμορφο G σχετίζεται και με την ιστολογική σοβαρότητα και την εξέλιξη της NAFLD σε NASH, ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [141, 145]. Αξιοσημείωτο είναι ότι συνολικά οι μελέτες έχουν δείξει πως ο πολυμορφισμός δεν σχετίζεται με το ΜΣ, την παχυσαρκία, το ΣΔ και την IR [4] με μετα-ανάλυση να επιβεβαιώνει περαιτέρω αυτή την παρατήρηση [144], αναδεικνύοντας πως το γονίδιο PNPLA3 διαμεσολαβεί τη νόσο με διαφορετικό μηχανισμό [4].

Εκτεταμένη γνώση για το ρόλο που έχει η πρωτεΐνη του γονιδίου PNPLA3 στη ρύθμιση της μεταβολικής λειτουργίας του ήπατος και στην ηπατική συσσώρευση λίπους έχει αποκτηθεί τα τελευταία χρόνια μέσα από in vitro μελέτες και μελέτες σε ζωικά μοντέλα. Πρόκειται για πολυλειτουργικό ένζυμο με δραστηριότητα λιπάσης TG και ακυλοτρανσφεράσης της ακυλογλυκερόλης το οποίο συμμετέχει στην υδρόλυση των TG και την ανεξάρτητη τρυσάκετυλίωση της ακυλογλυκερόλης. Η έκφραση του επηρεάζεται από την πρόσληψη τροφής και συγκεκριμένα από τους υδατάνθρακες και το λίπος [141, 146].

Δεδομένα από κάποιους ερευνητές προτείνουν πως το αλληλόμορφο I148M είναι μετάλλαξη με απώλεια λειτουργίας και οδηγεί σε μειωμένη υδρόλυση των TG και επακόλουθα στη συσσώρευση των TG στο ήπαρ. Αντίθετα, άλλα δεδομένα προτείνουν πως πρόκειται για μετάλλαξη με απόκτηση λειτουργίας η οποία οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση TG. Μελέτες οι οποίες αξιολόγησαν την επίδραση της υπερέκφρασης του αλληλόμορφου C έχουν αποτύχει να δείξουν μείωση στο ηπατικό λίπος [69, 141].

Αντίθετα, μελέτες οι οποίες αξιολόγησαν την επίδραση της υπερέκφρασης του αλληλόμορφου G έδειξαν μια αύξηση στη ηπατική συσσώρευση λίπους και προτείνουν πως το γονίδιο PNPLA3 διαμεσολαβεί την αναδιαμόρφωση των λιποσταγονιδίων [147]. Επιπλέον, σε ποντίκια, η υπερέκφραση του αλληλόμορφου G οδήγησε σε ηπατική στεάτωση στα

ηπατοκύτταρα, αλλά όχι στα λιποκύτταρα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε φλεγμονή ή ίνωση [69, 141].

Συμπερασματικά, ενώ υπάρχει γνώση σχετικά με το ρόλο του γονιδίου PNPLA3, την ενζυμική δραστηριότητα και την επίδραση του στην ηπατική στεάτωση, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για το πώς ακριβώς επιδρά στην εξέλιξη της NAFLD [141].

1.3.2 Γονίδιο TM6SF2

Το γονίδιο TM6SF2 κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τη φυσιολογική έκκριση των VLDL από το ήπαρ. Η πρωτεΐνη εκφράζεται έντονα στο ήπαρ, τους νεφρούς και το λεπτό έντερο [142].

Η πρώτη ανάλυση EWAS (exome-wide association study) η οποία έγινε στη μελέτη «Dallas Heart» έδειξε πως το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs5854926 του γονιδίου TM6SF2 σχετίζεται με υψηλό ηπατικό περιεχόμενο TG και υψηλά επίπεδα ηπατικών ενζύμων [148]. Ο πολυμορφισμός προκύπτει από αντικατάσταση του γλουταμινικού από λυσίνη στο κωδικόνιο 167 και προκύπτει το αλληλόμορφο 167K [142]. Από τότε, πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το εύρημα σε διαφορετικούς πληθυσμούς [149]. Ο Kozlitina και συνεργάτες έδειξαν πως ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το ηπατικό περιεχόμενο σε λίπος και μάλιστα η επίδραση του ήταν ανεξάρτητη από την επίδραση του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3, της παχυσαρκίας και της IR [150]. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση οι φορείς του αλληλόμορφου A είχαν 2.13 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για τη NAFLD [151]. Ωστόσο, αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ιστολογία της νόσου, τη NASH και την ίνωση πιθανά λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισης του αλληλόμορφου A, κάτι που όμως απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση [149]. Μια μετα-ανάλυση η οποία αξιολόγησε τη σχέση του πολυμορφισμού και των ηπατικών ενζύμων, κατέληξε πως τα επίπεδα της ALT και της AST είναι σημαντικά αυξημένα στη NAFLD όταν υπάρχει το αλληλόμορφο A. Ωστόσο, η αύξηση αυτή είναι μικρή σε σχέση με την έντονη επίδραση την οποία ασκεί το αλληλόμορφο G του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3 [152]. Αξίζει εδώ να αναφερθεί πως κάποιες μελέτες έχουν αναδείξει αθροιστική επίδραση μεταξύ των αλληλόμορφων κινδύνου των

πολυμορφισμών των γονιδίων TM6SF2 και PNPLA3 ως προς το μεταβολισμό του λίπους και τη NAFLD [149, 153].

Λειτουργικές μελέτες για το γονίδιο TM6SF2 έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός είναι σχετικός με τη βιολογία της NAFLD [69] και ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το ενδιάμεσο διαμέρισμα του συμπλέγματος Golgi των ηπατοκυττάρων [154]. Σε μελέτη όπου αξιολογήθηκε η έκφραση του γονιδίου σε NAFLD ασθενείς, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν σημαντικά μειωμένη στο ήπαρ των ασθενών. Επιπρόσθετα, η ανοσοδραστικότητα της πρωτεΐνης ήταν μειωμένη στους φορείς του αλληλόμορφου A [150]. Μάλιστα, ανάλυση του απομονωμένου cDNA από ηπατικό ιστό επιβεβαίωσε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης από το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs5854926 φτάνει το 56% της έκφρασης της πρωτεΐνης από το αλληλόμορφο G. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs5854926 σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του γονιδίου και της πρωτεΐνης στο ήπαρ των φορέων [155].

Πειραματικά δεδομένα για το ρόλο του γονιδίου TM6SF2 δείχνουν πως είναι απαραίτητο για την κινητοποίηση των ουδέτερων λιποειδών ώστε να γίνει η διαμόρφωση των VLDL [154], αλλά δεν απαιτείται για την έκκριση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν την apo-B πρωτεΐνη [156]. Η αναστολή του σχετίζεται με μειωμένη έκκριση TG, αυξημένη κυτταρική συγκέντρωση TG και αυξημένο περιεχόμενο λιποσταγονιδίων. Ουσιαστικά, το γονίδιο φαίνεται να είναι ρυθμιστής του ηπατικού μεταβολισμού του λίπους [156].

Τέλος, ο πολυμορφισμός αυτός εμφανίζει κλινικό παράδοξο καθώς το αλληλόμορφο G σχετίζεται με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο αυξάνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης ενώ το αλληλόμορφο A σχετίζεται με τη NAFLD και τη NASH. Στην πραγματικότητα, η επίδραση του πολυμορφισμού στον καρδιαγγειακό κίνδυνο εξηγείται από την προστασία που παρέχει το A αλληλόμορφο έναντι της υπερλιπιδαιμίας. Θεωρείται πως το γονίδιο TM6SF2 καθορίζει εάν το ΜΣ θα οδηγήσει σε ηπατική ή καρδιαγγειακή βλάβη [69]. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για το φυσιολογικό και παθοφυσιολογικό ρόλο του γονιδίου.

1.3.3 Γονίδιο GCKR

Το γονίδιο GCKR κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία είναι ρυθμιστής του ενζύμου γλυκοκινάση. Η πρωτεΐνη αυτή αναστέλλει τη γλυκοκινάση (GC), το ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης [142].

Ο πολυμορφισμός οδηγεί σε μείωση της συγγένειας της πρωτεΐνης GCKR με τη GK. Ως αποτέλεσμα, περισσότερα μόρια GK είναι διαθέσιμα στο κυτταρόπλασμα, κάτι που αυξάνει το ρυθμό της γλυκόλυσης και επακόλουθα την παραγωγή μορίων μηλονυλο-CoA, το πρόδρομο μόριο για τη DNL αυξάνοντας τελικά τα επίπεδα των TG [157].

GWAs μελέτες ανέδειξαν την επίδραση του πολυμορφισμού rs780094 του γονιδίου GCKR στην εμφάνιση της NAFLD και στα μεταβολικά χαρακτηριστικά [158-160]. Ειδικότερα, το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού σχετίζεται με μέτριο κίνδυνο για ηπατική στεάτωση, με τη σοβαρότητα της ίνωσης και με τα αυξημένα επίπεδα TG [161]. Σύμφωνα με μετα-αναλύση, ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με κατά 1.2 μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση της NAFLD [162].

1.3.4 Γονίδιο MBOAT7

Το γονίδιο MBOAT7 κωδικοποιεί μια ακυλοτρανσφεράση λυσοφωσφατιδυλοινοσιτόλης, ένζυμο το οποίο καταλύει την αναδιαμόρφωση της αλυσίδας των ακυλο-ομάδων στα μόρια φωσφατιδυλοινοσιτόλης. Η πρωτεΐνη εκφράζεται έντονα στο ήπαρ, ειδικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες [142].

Ο πολυμορφισμός rs641738 προκαλεί μείωση της έκφρασης του ενζύμου [142]. Σε μελέτη, ο Mancina και συνεργάτες εντόπισαν συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της εμφάνισης και εξέλιξης της NAFLD σε Ευρωπαίους. Το αλληλόμορφο κινδύνου T συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την ηπατική στεάτωση, τη σοβαρότητα του ηπατικού τραύματος και τον κίνδυνο για ίνωση. Επιπρόσθετα, συσχετίστηκε με μειωμένη ηπατική έκφραση του ενζύμου και αλλαγές στη φωσφατιδυλοινοσιτόλη πλάσματος σχετικές με τη μείωση της λειτουργίας του ενζύμου. Η σχέση αυτή φαίνεται να διαμεσολαβείται από μια διαφορετική αναδιαμόρφωση της ακυλο-αλυσίδας της φωσφατιδυλοινοσιτόλης. Επιπλέον, αναγνωρίστηκε μια προσθετική επίδραση του πολυμορφισμού rs641738 του γονιδίου MBOAT7 με τους πολυμορφισμούς στα

γονίδια PNPLA3 και TM6SF2 ως προς το ηπατικό λίπος με κάθε επιπρόσθετο αλληλόμορφο κινδύνου να αυξάνει σταδιακά το μέσο ηπατικό λίπος. Αξίζει, επίσης, να τονιστεί πως ο πολυμορφισμός δεν φάνηκε να σχετίζεται με την IR [163]. Σε άλλη μελέτη, επίσης βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs641738 του γονιδίου MBOAT7 και της σοβαρότητας της ίνωσης [164]. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν πως η διαταραγμένη λειτουργία του ενζύμου προωθεί τη συσσώρευση αραχιδονικού οξέος οδηγώντας σε εναπόθεση λίπους και φλεγμονή [142].

1.3.5 Γονίδια PPP1R3B και LYPLAL1

Το γονίδιο PPP1R3B κωδικοποιεί το ένζυμο πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), η οποία είναι ρυθμιστής της αποικοδόμησης του γλυκογόνου συμμετέχοντας στο μεταβολισμό της γλυκόζης στο ήπαρ και στο σκελετικό μυ [165]. Το γονίδιο LYPLA1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με πιθανή δράση λιπάσης στα υποστρώματα βραχείας αλυσίδας [166].

Σε μεταανάλυση 4 μελετών GWAS («Amish», «Family Heart», «Framingham Heart» και «Ages») για τη διερεύνηση συσχέτισης μεταξύ της ηπατικής στεάτωσης και 2.4 εκατομμυρίων απλών γενετικών πολυμορφισμών σε 7.176 άτομα αναγνωρίστηκε πως πολυμορφισμοί στα γονίδια PNPLA3 (rs738409), NCAN (rs2228603) και PPP1R3B (rs4240624) σχετίζονται σημαντικά με την εμφάνιση της NAFLD. Εν συνεχεία της μεταανάλυσης, έγινε γονοτύπηση των πολυμορφισμών αυτών και άλλων που έχουν συσχετιστεί με την νόσο σε 592 ασθενείς και 1405 υγιείς. Αναγνωρίστηκαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στη NAFLD και πολυμορφισμούς στα γονίδια NCAN (rs2228603), GCKR (rs780094), LYPLAL1 (rs12137855) και PNPLA3 (rs738409) αλλά όχι στο γονίδιο PPP1R3B (rs4240624). Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο LYPLAL1 δεν επηρεάζει τα μεταβολικά χαρακτηριστικά και φαίνεται πως έχει ρόλο στα διαδοχικά στάδια αποικοδόμησης των TG αποτρέποντας την αποικοδόμηση τους και έτσι προωθώντας την ηπατική στεάτωση. Αντίθετα, ο πολυμορφισμός στο γονίδιο PPP1R3B επηρεάζει και τα μεταβολικά χαρακτηριστικά [167].

1.3.6 Γονίδια GC και LCP1

Το γονίδιο GC κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σύνδεσης της βιταμίνης D, η οποία είναι η κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς της [168]. Το γονίδιο LCP1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη δέσμησης ακτίνης, η οποία κυρίως εκφράζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα. Συμμετέχει στην ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [169].

Στη μελέτη «Raine», έγινε GWAS ανάλυση σε 928 εφήβους για την εύρεση συσχέτισης μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών και της NAFLD. Έπειτα από έλεγχο για το φύλο και την παχυσαρκία, δυο πολυμορφισμοί σε γονίδια που εκφράζονται στο ήπαρ συσχετίστηκαν με τη NAFLD, ο πολυμορφισμός rs222054 του γονιδίου GC και ο πολυμορφισμός rs7324845 του γονιδίου LCP-1 [170].

Σχετικά με το γονίδιο GC, η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλόμορφου C συσχετίστηκε με 2.54 φορές υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση της NAFLD σε σχέση με την παρουσία 2 συχνών αλληλόμορφων. Η συχνότητα της NAFLD αυξήθηκε από 9.7% στους ομόζυγους για το συχνό αλληλόμορφο, σε 16.8% στους ετερόζυγους και σε 21.4% στους ομόζυγους για το αλληλόμορφο C. Η σοβαρότητα της νόσου αυξανόταν σημαντικά με κάθε αλληλόμορφο C. Επιπρόσθετα, εκτιμήθηκε η ηπατική έκφραση του mRNA και τα επίπεδα πλάσματος της πρωτεΐνης του γονιδίου GC. Οι δυο παράμετροι ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς [170]. Τα επίπεδα της βιταμίνης D στους NAFLD ασθενείς είναι γενικά χαμηλά σε σχέση με τους υγιείς και σχετίζονται με την ιστολογική σοβαρότητα της νόσου [171]. Χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένο ενδοκυττάριο ασβέστιο στα λιποκύτταρα και προώθηση της λιπογένεσης [172]. Είναι πιθανό ότι ο πολυμορφισμός rs222054 του γονιδίου GC επηρεάζει τα επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό και έτσι σχετίζεται με τη NAFLD [170].

Σχετικά με το γονίδιο LCP-1, ο πολυμορφισμός rs7324845 έχει συσχετιστεί με την προκαλούμενη από χημειοθεραπεία υπερτριγλυκεριδαίμια, προτείνοντας πως ίσως έχει κάποιο ρόλο στο μεταβολισμό του λίπους [173]. Στη μελέτη «Raine», η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλόμορφου A συσχετίστηκε με 3.29 φορές υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση της NAFLD σε σχέση με την παρουσία δυο συχνών αλληλόμορφων. Η συχνότητα της NAFLD αυξήθηκε από 11.2% στους ομόζυγους για το συχνό αλληλόμορφο, σε 21.4% στους ετερόζυγους και σε 28.6% στους ομόζυγους για το αλληλόμορφο A. Υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των

αλληλόμορφων A και της μέτριας προς σοβαρής ηπατικής στεάτωσης. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η ηπατική έκφραση του mRNA του γονιδίου LCP-1 και βρέθηκε σημαντικά αυξημένη (κατά 300%) στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς [170].

1.3.7 Γονίδιο TNFα

Το γονίδιο TNF-α κωδικοποιεί τον TNF-α, μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη η οποία αυξάνει την IR μέσω της αναστολής της δράσης της κινάσης στον υποδοχέα της ινσουλίνης. Τα υψηλά επίπεδα TNF-α συνδέονται με τη NAFLD και τη σοβαρότητα της NASH [142]. Σε μελέτη, ο Valenti και συνεργάτες έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός 238 του εκκινητή στο γονίδιο TNF-α σχετίζεται με τη NAFLD και τα χαμηλά επίπεδα ορού του TNF-α, με τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλόμορφου A να είναι 31% στους ασθενείς και 15% στους υγιείς [174]. Επιπλέον, πρόσφατη μετα-ανάλυση αναγνώρισε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού 238 του εκκινητή στο γονίδιο TNF-α και της NAFLD. Η συχνότητα των ομόζυγων και των ετερόζυγων για το αλληλόμορφο A ήταν 23.7% στους NAFLD ασθενείς και 13.9% στους υγιείς. Επομένως, προτάθηκε πως ο πολυμορφισμός αυτός αυξάνει τον κίνδυνο για τη νόσο [175].

1.3.8 Γονίδιο APOC3

Το γονίδιο APOC3 κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη C3, η οποία είναι συστατικό των VLDL και αναστέλλει την λιποπρωτεϊνική λιπάση και την κάθαρση των TG. Οι πολυμορφισμοί rs2854116 και rs2854117 του γονιδίου APOC3 έχουν συσχετιστεί με υπερτριγλυκεριδαιμία και τη NAFLD. Οι δύο πολυμορφισμοί προκαλούν αυξημένα επίπεδα APOC3 πλάσματος, ευνοώντας την αναστολή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα υπολειμμάτων χυλομικρών και TG πλάσματος [142]. Σε μελέτη, ο Petersen και συνεργάτες περιέγραψαν συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με το ηπατικό λίπος και την IR σε άνδρες με φυσιολογικό βάρος. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί αυτοί επιδρούσαν προσθετικά με τον πολυμορφισμό του PNPLA3 προκαλώντας υψηλότερη ηπατική συσσώρευση λίπους [176]. Υπάρχουν όμως και κάποια αντιφατικά δεδομένα στη βιβλιογραφία [177, 178]. Πιθανά επειδή κάποιες μελέτες είχαν ετερογενές δείγμα, με άτομα τόσο φυσιολογικού βάρους, όσο υπέρβαρα και παχύσαρκα [142].

1.4. Αλληλεπίδραση γενετικών πολυμορφισμών και διατροφής ως προς τη NAFLD

1.4.1 Μελέτες σε ανθρώπους

Γονίδιο PNPLA3

Το γονίδιο PNPLA3 με τον πολυμορφισμό rs738409 αποτελεί τον πρώτο και καλά καθορισμένο γενετικό παράγοντα για τον οποίο έχει φανεί έντονα η αλληλεπίδραση με τη διατροφή [143, 179].

Αρχικά, τα άτομα που είναι φορείς του αλληλόμορφου G έχουν μεγαλύτερη προδιάθεση για αυξημένο ηπατικό λίπος όταν συνυπάρχει διατροφή υψηλή σε υδατάνθρακες και ειδικότερα σε σάκχαρα [143]. Μια διατροφογενετική ανάλυση για τον πολυμορφισμό αυτό σε παιδιά από την Ισπανία έδειξε πως η ηπατική συσσώρευση TG συσχετιζόταν με την υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων και σακχάρων στα άτομα με ομόζυγο γονότυπο για το αλληλόμορφο κινδύνου G ενώ δε βρέθηκε κάποια συσχέτιση στα άτομα με ετερόζυγο γονότυπο και ομόζυγο γονότυπο για το αλληλόμορφο C [180]. Επιπλέον, σε μελέτη με Ιταλούς εφήβους του Nobili και συνεργατών, φάνηκε να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της κατανάλωσης σακχαρούχων αναψυκτικών πλούσιων σε φρουκτόζη ως προς τη σοβαρότητα της NAFLD. Η ισχυρότερη συσχέτιση αφορούσε τα άτομα που κατανάλωναν σακχαρούχα αναψυκτικά τουλάχιστον 1 φορά/εβδομάδα [181]. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με την αντίληψη ότι η μειωμένη ικανότητα των ατόμων με ομόζυγο γονότυπο για το G αλληλόμορφο να υδρολύουν τα TG στο ήπαρ μπορεί να επιδεινωθεί υπό συνθήκες διατροφής υψηλής σε σάκχαρα. Αυτό πιθανολογείται ότι συμβαίνει γιατί η ενεργοποίηση του γονιδίου PNPLA3 που διαμεσολαβείται από υδατάνθρακες μπορεί να ευνοήσει τη συσσώρευση της παθολογικής πρωτεΐνης στην επιφάνεια των λιποσταγονιδίων, με αποτέλεσμα την αναστολή λιπασών, κυρίως της PNPLA2 [143]. Μάλιστα, μελέτη παρέμβασης 6 ημερών έδειξε πως δίαιτα υποθερμιδική και χαμηλή σε υδατάνθρακες μειώνει το ηπατικό λίπος κατά 2.5 φορές περισσότερο στους ομόζυγους για το αλληλόμορφο G σε σχέση με τους ομόζυγους για το αλληλόμορφο C, παρότι υπήρξε παρόμοια μείωση βάρους και στις 2 ομάδες [182]. Επιπλέον, ο Nobili και συνεργάτες στη μελέτη που

προαναφέρθηκε έδειξε μια μικρότερη επίδραση του πολυμορφισμού στη σοβαρότητα της NAFLD για τα άτομα με φτωχή πρόσληψη λαχανικών [181]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως τα άτομα που είναι ομόζυγα για το G αλληλόμορφο πιθανά επωφελούνται περισσότερο από μια δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες σε σχέση με τα ετερόζυγα άτομα [143].

Επιπρόσθετα, η ηπατική συσσώρευση λίπους διαμορφώνεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και λόγου ω-6 λ.ο/ω-3 λ.ο [143]. Σε μια μελέτη, σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο G αναγνωρίστηκε αλληλεπίδραση μεταξύ της ηπατικής συσσώρευσης λίπους και των επιπέδων της ALT με τον αυξημένο λόγο ω-6 λ.ο/ω-3 λ.ο [183]. Ειδικότερα, ο πολυμορφισμός rs738409 σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα υδρόλυσης των ω-9 λιπαρών οξέων [184]. Πρόκειται για τα πιο συχνά λιπαρά οξέα στη διατροφή τα οποία επίσης συντίθεται από τα ω-6 λιπαρά οξέα. Θεωρείται πως τα νεοσυντιθέμενα TG τείνουν να συγκεντρώνονται στο ήπαρ των φορέων του αλληλόμορφου G, κάτι που οδηγεί σε ηπατική στεάτωση. Παράλληλα, η αφθονία των ω-6 λιπαρών οξέων τα οποία δεν ενσωματώνονται στα TG οδηγεί στην παραγωγή προφλεγμονώδων μορίων, τα οποία προωθούν τη NASH [183]. Πρόσφατα, δεδομένα από τη μελέτη WELCOME έδειξαν πως στη NAFLD, ο ομόζυγος γονότυπος για το G αλληλόμορφο σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό λίπους, χαμηλότερο εμπλουτισμό του ιστού με DHA και χαμηλότερη βελτίωση των ηπατικών ενζύμων έπειτα από συμπληρωματική χορήγηση DHA και EPA για 15-18 μήνες [185]. Επιπλέον, σε μια RCT μικρής διάρκειας με συμπληρωματική χορήγηση DHA σε παιδιά με NAFLD, φάνηκε πως η παρουσία του αλληλόμορφου G μείωνε την ωφέλιμη επίδραση του DHA στα ηπατικά ένζυμα και στα λιπαρά οξέα της κυκλοφορίας, προτείνοντας πως το G αλληλόμορφο σχετίζεται με μειωμένη απόκριση στη συμπληρωματική χορήγηση PUFA [186]. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν πως ο πολυμορφισμός rs738409 εμπλέκεται στην κινητοποίηση των PUFA στο ήπαρ και τα άτομα με τον ομόζυγο γονότυπο για το G αλληλόμορφο έχουν χαμηλότερα επίπεδα DHA [143]. Επιπρόσθετα, τα ω-3 λιπαρά οξέα μειώνουν την έκφραση του SREBP1c [187] αλλά οι φορείς του αλληλόμορφου G τείνουν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα DNL ως μηχανισμό για αποφυγή της συσσώρευσης ηπατικών TG [188]. Επομένως, στα ομόζυγα άτομα για το G αλληλόμορφο η έλλειψη απόκρισης ως προς τη μείωση του ηπατικού λίπους έπειτα από συμπληρωματική χορήγηση PUFA είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός πως τα άτομα αυτά έχουν ήδη χαμηλά επίπεδα DNL [143].

Άλλα γονίδια

Για άλλα γονίδια, σχετικά λίγες είναι οι μελέτες οι οποίες έχουν αξιολογήσει την αλληλεπίδραση των γενετικών πολυμορφισμών με τη διατροφή ως προς τη NAFLD.

Αρχικά, σε μελέτη αξιολογήθηκε η αλληλεπίδραση της διατροφής με γονίδια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες σε 583 NAFLD ασθενείς και υγιείς. Αυξημένος κίνδυνος για τη NAFLD βρέθηκε όταν φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τα γονίδια GSTM1, GSTT1,CYP1A1 και CYP2E1 της οικογένειας του κυτοχρώματος 450 και για το γονίδιο SUL1A1, κατανάλωναν περισσότερο από 2 φρούτα/ημέρα. Επιπλέον, οι φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τα γονίδια GSTM1, GSTT1,CYP1A1 και SUL1A1 είχαν αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο όταν η κατανάλωση ψητού κρέατος ή ψητού ψαριού ήταν περισσότερο από 1 φορά/εβδομάδα. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε πως η μέτρια πρόσληψη αλκοόλ σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για το γονίδιο CYP2E1 ήταν προστατευτική. Ωστόσο, η μελέτη αυτή είχε σχετικά μικρό δείγμα και χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων [189].

Σε άλλη μελέτη, ο Spencer και συνεργάτες πρότειναν ένα μοντέλο το οποίο θα μπορούσε να προβλέψει με ακρίβεια την πιθανότητα που έχει ένα άτομο για εμφάνιση της NAFLD όταν βρίσκεται σε δίαιτα με έλλειψη χολίνης. Το μοντέλο αυτό περιελάμβανε τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και την παρουσία του πολυμορφισμού rs12325817 του γονιδίου PEMT, αναδεικνύοντας κάποιο ρόλο για τον πολυμορφισμό αυτό υπό την έλλειψη χολίνης [190].

1.4.2 Μελέτες σε ζωικά μοντέλα

Κάποιες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν αναδείξει γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από τη διατροφή. Ωστόσο, η φύση αυτών των μελετών δίνει μια κατεύθυνση για έρευνα σε ανθρώπους αλλά δεν δίνει πληροφορίες για γενετικούς πολυμορφισμούς και την αλληλεπίδραση αυτών με τη διατροφή. Συνοπτικά παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες από αυτές τις μελέτες.

Σε μελέτη με ποντίκια, μια Δυτικού τύπου δίαιτα στη μητέρα όταν συνδυάστηκε με την ίδια δίαιτα στον απόγονο, οδήγησε σε ηπατομεγαλία, υψηλά επίπεδα ALT, AST, TG και χοληστερόλης και αυξημένη έκφραση των TNF- α , CD111, MCP1 και TGFB στον απόγονο σε σχέση με τη χαμηλή σε λίπος δίαιτα. Παράλληλα, εντοπίστηκαν επιγενετικές αλλαγές [191]. Σε άλλη μελέτη με αρουραίους, μια Δυτικού τύπου δίαιτα τροποποίησε την έκφραση 94 γονιδίων στο ήπαρ. Το πιο έντονα ενεργοποιημένο μονοπάτι ήταν αυτό της βιοσύνθεσης χοληστερόλης και το γονίδιο με τη μεγαλύτερη προώθηση στην έκφραση του ήταν το SCD [192]. Σε άλλη μελέτη, αρουραίοι σε δίαιτα υψηλή σε φρουκτόζη ή σε δίαιτα χαμηλή σε χαλκό είχαν αυξημένη ηπατική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την ινωδογένεση ενώ ο συνδυασμός τους αύξησε την έκφραση των γονιδίων της κίτρικης λυάσης (Acl γ) και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (Fasn) [193]. Μια άλλη μελέτη, χρησιμοποίησε NZ10 ποντίκια τα οποία είναι πολύ έντονα προδιατεθειμένα για παχυσαρκία, ΣΔ2 και ηπατική στεάτωση. Μια δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνη και ιχθυέλαιο φάνηκε να υπερिशύει της γενετικής προδιάθεσης και αυτό συσχετίστηκε με αναστολή γονιδίων και πιθανά micro-RNAs τα οποία εμπλέκονται με υπεργλυκαιμία, δυσλιπιδαιμία και φλεγμονή όπως τα γονίδια των ρυθμιστών των PPAR και των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης και λεπτίνης [194]. Τέλος, σε άλλη μελέτη, αρουραίοι που τρέφονταν για 2 εβδομάδες με υψηλή σε λίπος δίαιτα, επακόλουθα έλαβαν μείγμα πολυφαινολών πράσινου τσαγιού. Η αυξημένη συσσώρευση TG και κυτταροπλασματικών λιποσταγονιδίων που άχθηκε από την υψηλή σε λίπος δίαιτα μειώθηκε με το μείγμα, κάτι που συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση της AMPK, ενός ενζύμου το οποίο οδηγεί σε μειωμένη ηπατική λιπογένεση [195].

1.4.3 Ανάγκη για αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης γενετικών πολυμορφισμών και διατροφικών προτύπων ως προς τη NAFLD

Η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών και της διατροφής ως προς τη NAFLD είναι μεγάλης αξίας. Είναι σημαντικό να γίνει πλήρως κατανοητό με ποιο τρόπο η σύσταση της διατροφής, η οποία επηρεάζει συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια και τροποποιεί την έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών, θα μπορούσε να μεταβάλει την κλινική εμφάνιση της NAFLD. Καθώς το γενετικό υπόβαθρο επηρεάζει την αφομοίωση, την αποθήκευση και έκκριση των θρεπτικών συστατικών, μια εξατομικευμένη διατροφή η οποία λαμβάνει υπόψη το γενετικό υπόβαθρο, θα μπορούσε να έχει άμεση επίδραση ως θεραπευτική λύση για τη NAFLD [143].

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία για την αλληλεπίδραση μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών και της NAFLD περιλαμβάνει κάποιες μελέτες σε ανθρώπους οι οποίες έχουν αναδείξει κάποιες συσχετίσεις. Ωστόσο, η πλειονότητα των δεδομένων αφορά μελέτες σε ζωικά μοντέλα οι οποίες έχουν αναγνωρίσει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ της διατροφής και της έκφρασης γονιδίων ως προς την ηπατική στεάτωση δίνοντας κάποια κατεύθυνση για έρευνα, χωρίς όμως να είναι δυνατό αυτά τα δεδομένα να ερμηνευτούν άμεσα στους ανθρώπους. Επιπλέον, παραδοσιακά στις διαθέσιμες μελέτες για την αλληλεπίδραση μεταξύ της διατροφής και των γενετικών πολυμορφισμών, η διατροφή έχει αξιολογηθεί υπό μορφή μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών καθώς και υπό μορφή ομάδων τροφίμων κάτι το οποίο δεν ερμηνεύει τη διατροφή στο σύνολο της, υπό πραγματικές συνθήκες και δε συνεκτιμά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τροφίμων και θρεπτικών συστατικών. Επομένως, καθώς η διατροφή είναι συνδυασμός πολλών τροφίμων και συστατικών, η ανάλυση σε διατροφικά πρότυπα αποτελεί πιο αποτελεσματική προσέγγιση δίνοντας συνολική και ρεαλιστική εικόνα της διατροφής και επομένως δίνοντας μεγάλο πλεονέκτημα στην αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της διατροφής και των γενετικών πολυμορφισμών ως προς την εμφάνιση της NAFLD.

1.5 Βιβλιογραφικό κενό

Είναι γεγονός πως έως τώρα λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει το ρόλο της διατροφής ως προς τη NAFLD υπό τη μορφή των διατροφικών προτύπων και επομένως υπάρχει σχετική ένδεια δεδομένων παγκόσμια και στον ελληνικό χώρο. Επιπλέον, ενώ τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει αξιοσημείωτη προσπάθεια για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της διατροφής και των γενετικών πολυμορφισμών ως προς τη NAFLD, οι μελέτες σε ανθρώπους είναι λίγες και δεν υπάρχει έως τώρα κάποια αναφορά για την αλληλεπίδραση αυτή όταν η διατροφή αναλύεται υπό τη μορφή διατροφικών προτύπων.

2.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αποτίμηση των διατροφικών συνηθειών υπό τη μορφή των διατροφικών προτύπων σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) στην Ελλάδα και η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των διατροφικών προτύπων αυτών με τους πιο σημαντικούς γενετικούς πολυμορφισμούς οι οποίοι σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου.

3.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Σχεδιασμός

Η Ελληνική NAFLD μελέτη είναι μια συγχρονική (cross-sectional) επιδημιολογική μελέτη η οποία υλοποιήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο) σε συνεργασία με το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

3.2 Συλλογή δείγματος

Η μελέτη περιλαμβάνει 351 άτομα. Η δειγματοληψία έγινε κατά την επίσκεψη των ατόμων στα εξωτερικά ιατρεία του ηπατολογικού και της παχυσαρκίας του Λαϊκού Νοσοκομείου. Η συμμετοχή στη μελέτη ήταν εθελοντική και απαιτούσε την ενυπόγραφη συναίνεση των ατόμων. Η έγκριση για την υλοποίηση της μελέτης έγινε από την επιτροπή έρευνας του Επιστημονικού Συμβουλίου του Λαϊκού Νοσοκομείου και από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.

Κριτήρια επιλογής

Τα αρχικά κριτήρια επιλογής των συμμετεχόντων ήταν να είναι ενήλικες με ηλικία < 65 έτη. Ο περαιτέρω διαχωρισμός του δείγματος σε ασθενείς ως προς τη NAFLD και μάρτυρες έγινε έπειτα από τη διεξαγωγή υπερηχογραφήματος άνω κοιλίας.

Για τα άτομα τα οποία διαγνώστηκαν ως ασθενείς, η επιβεβαίωση συμμετοχής στη μελέτη γινόταν έπειτα από έλεγχο για απουσία δευτεροπαθών αιτιών για τη νόσο τα οποία είναι και τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη.

Κριτήρια αποκλεισμού

Τρέχουσα ή πρόσφατη συστηματική πρόσληψη αλκοόλ

(> 20 γρ/ημέρα για τις γυναίκες, > 30γρ/ημέρα για τους άνδρες)

Ηπατίτιδα A, B, C, D και E

Αυτό-άνοση ηπατική νόσος

Ηπατοτοξικά φάρμακα (αμιοδαρόνη, μεθοτρεξάτη, ισονιαζίδη, περεξιλίνη, κορτικοστεροειδή, οιστρογόνα)

Μεταβολικές διαταραχές (έλλειψη α-1 αντιθρυψίνης, αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson)

3.3 Αξιολόγηση

Η αξιολόγηση υλοποιήθηκε στα εργαστήρια του Διαβητολογικού τμήματος της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής (ΑΠΠΚ) του Λαϊκού Νοσοκομείου.

3.3.1 Αιμοληψία

Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε έπειτα από 12ωρη νηστεία από ιατρό. Έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος για βιοχημική, αιματολογική και γενετική ανάλυση.

Βιοχημική και αιματολογική ανάλυση

Η βιοχημική και αιματολογική ανάλυση των δειγμάτων αίματος έγινε στα εργαστήρια του Λαϊκού Νοσοκομείου. Οι βιοχημικές παράμετροι οι οποίες εκτιμήθηκαν ήταν η γλυκόζη, η ινσουλίνη, η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, η ολική χοληστερόλη, η HDL-c χοληστερόλη, η LDL-c χοληστερόλη, τα TG, η ALT, η AST, η GGT, η κρεατινίνη, η CRP, η ολική χολερυθρίνη, το νάτριο, το κάλιο, ο σίδηρος, η φερριτίνη, το ουρικό οξύ και η ουρία.

Γενετική ανάλυση

Η γενετική ανάλυση έγινε σε τρία στάδια τα οποία ήταν η απομόνωση λευκών αιμοσφαιρίων, η απομόνωση γενετικού υλικού από τα λευκά αιμοσφαίρια και η γονοτύπηση.

1. Απομόνωση λευκών αιμοσφαιρίων

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων αίματος (3000gpm, 10 λεπτά, 4°C)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και συγκέντρωση του ιζήματος με λευκά αιμοσφαίρια
- Αποθήκευση των δειγμάτων με τα λευκά αιμοσφαίρια σε βαθιά κατάψυξη (-80°C)

2. Απομόνωση γενετικού υλικού

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος έγινε με το αντιδραστήριο iPrep™Purelink™gDNA Blood Kit της Invitrogen σε αυτοματοποιημένο εξτράκτορα iPrep™Purification Instrument. Το απομονωμένο γενετικό υλικό αποθηκεύτηκε στους -20°C με σκοπό τη γονοτύπηση.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος επιτρέπει τη γρήγορη και αυτοματοποιημένη απομόνωση gDNA από ανθρώπινο αίμα (ολικό αίμα, διαλύματα λευκών αιμοσφαιρίων). Η έκλουση του gDNA βασίζεται στη χρήση των μαγνητικών μικροσφαιριδίων Dynabeads MyOne™SILANE. Το καθαρό gDNA που εκλύεται είναι κατάλληλο για εφαρμογές όπως η PCR, η γονοτύπηση και η ανάλυση του γονιδιώματος. Το αυτοματοποιημένο σύστημα εκχύλισης DNA iPrep™Purification Instrument είναι ρομποτικό σύστημα έκλουσης νουκλεϊκών οξέων. Χάρη στην ενσωματωμένη μαγνητική μονάδα και με τη χρήση τεχνολογίας μαγνητικών μικροσφαιριδίων υπάρχει δυνατότητα εκχύλισης 13 δειγμάτων ταυτόχρονα. Τα μικροσφαιρίδια Dynabeads MyOne™SILANE είναι μαγνητικά σφαιρίδια (1μm) διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) στην επιφάνεια των οποίων προσφύεται ειδικά το DNA. Η χρήση της τεχνολογίας των μικροσφαιριδίων για την έκλουση του gDNA δεν απαιτεί φυγοκέντρηση ή χρήση αντλίας κενού. Το προγραμματισμένο πρωτόκολλο, το οποίο βρίσκεται στην κάρτα iPrep™Card:gDNA blood, είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο των παραμέτρων της μεθόδου όπως ο όγκος των αντιδραστηρίων, τα βήματα ανάμειξης και οι χρόνοι επώασης.

Τεχνολογία μαγνητικών μικροσφαιριδίων

Η τεχνολογία μαγνητικών μικροσφαιριδίων παρέχει μια επιφάνεια εναλλασσόμενου φορτίου το οποίο εξαρτάται από το PH του περιβάλλοντος διαλύματος και διευκολύνει το διαχωρισμό του DNA. Σε χαμηλό PH, τα σφαιρίδια έχουν θετικό φορτίο και έτσι προσδένονται στο αρνητικά φορτισμένο DNA. Προκειμένου να παραληφθεί το DNA, το φορτίο στην επιφάνεια των σφαιριδίων εξουδετερώνεται αυξάνοντας το PH στο 8.5 με τη χρήση ενός διαλύματος έκπλυσης χαμηλής αλατότητας.

3.Γονοτύπηση

Η γονοτύπηση έγινε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών DNA με χρήση του Infinium CoreExome-24 v1.2 BeadChip της Illumina.

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου των μικροσυστοιχιών στηρίζεται στο συνδυασμό της φυσικής ιδιότητας της υβριδοποίησης του DNA και στη νανοτεχνολογία η οποία επιτρέπει την ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού μορίων σε μικροπλακίδια με εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια. Μια μικροσυστοιχία DNA περιέχει ένα πολύ μεγάλο αριθμό τμημάτων μονόκλωνου γονιδιωματικού DNA τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε ένα στερεό υπόστρωμα. Τα τμήματα αυτά έχουν τη φυσική τάση να ζευγαρώνουν με τα συμπληρωματικά τους μονόκλωνα μόρια, μέσω της υβριδοποίησης, εφόσον αυτά εντοπίζονται σε διάλυμα που διέρχεται πάνω από το υπόστρωμα (πλακίδιο ή chip). Σε ένα πείραμα γονιδιακής έκφρασης σε μικροσυστοιχία DNA, το πλακίδιο σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχει χαρακτηριστικά τμήματα DNA απ' όσο το δυνατόν περισσότερα γονίδια του υπό μελέτη οργανισμού. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται ανιχνευτές (probes) και μπορούν να υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικά τμήματα cDNA των αντίστοιχων γονιδίων. Η ποιοτική ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του mRNA γίνεται μέσω της μέτρησης του φθορισμού που εκπέμπεται από τη στιγμή που τα δύο συμπληρωματικά μόρια υβριδοποιηθούν. Ο φθορισμός προκύπτει καθώς το δείγμα, πριν περάσει πάνω από το πλακίδιο, έχει σημανθεί με μια συγκεκριμένη φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενεργοποιείται και εκπέμπει μόνο σε δίκλωνη διαμόρφωση. Το τελικό αποτέλεσμα του πειράματος συνίσταται από μια μακριά σειρά

μετρήσεων φθορισμού οι οποίες αντιστοιχούν στη σχετική αφθονία mRNA μορίων στο δείγμα και που ταυτοποιούνται με βάση τη συμπληρωματικότητά τους για συγκεκριμένους ανιχνευτές.

Illumina BeadChip

Η Illumina BeadChip είναι μια σχετικά νέα μέθοδος για πολλαπλή γονιδιακή ανάλυση. Το βασικό στοιχείο της τεχνολογίας BeadChip είναι η επισύναψη των ολιγονουκλεοτιδίων σε πυριτικά σφαιρίδια τα οποία τοποθετούνται τυχαία σε φρεάτια πάνω σε γυάλινο πλακίδιο. Η προκύπτουσα συστοιχία αποκωδικοποιείται για να καθοριστεί ο συνδυασμός ολιγονουκλεοτιδίου-σφαιριδίου που είναι σε κάθε φρεάτιο. Οι αποκωδικοποιημένες συστοιχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές όπως η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, η γονοτύπηση και η μεθυλίωση.

Η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης γίνεται με χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου που έχει δύο τμήματα. Το τμήμα 5' έχει σχεδιαστεί για να υβριδοποιείται με αλληλουχίες που διατίθενται σε κοινόχρηστα αποθετήρια δεδομένων. Το τμήμα 3' του ολιγονουκλεοτιδίου είναι η «διεύθυνση», μια μοναδική αλληλουχία της Illumina η οποία ειδικά επιτρέπει την αναμφισβήτητη ταυτοποίηση του ολιγονουκλεοτιδίου αφού έχει αποτεθεί στη συστοιχία.

Κάθε ολιγονουκλεοτίδιο συντίθεται σε μεγάλη παρτίδα χρησιμοποιώντας τυπικές τεχνολογίες και επισυνάπτεται στην επιφάνεια πυριτικού σφαιριδίου. Σε κάθε σφαιρίδιο επισυνάπτονται εκατοντάδες χιλιάδες αντίγραφα μίας ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι συστοιχίες μπορούν να έχουν μέχρι και 44.000 μοναδικά ολιγονουκλεοτίδια.

Με τυπικές λιθογραφικές τεχνικές δημιουργείται ένα κυψελοειδές πρότυπο φρεατίων στην επιφάνεια του γυάλινου πλακιδίου και το κάθε φρεάτιο μπορεί να χωρέσει ένα σφαιρίδιο. Τα σφαιρίδια μιας δεδομένης συστοιχίας αναμειγνύονται σε ίσες ποσότητες και εναποτίθενται στην επιφάνεια καταλαμβάνοντας τα φρεάτια με τυχαία κατανομή. Κάθε ολιγονουκλεοτίδιο αντιπροσωπεύεται, κατά μέσο όρο, από περίπου 20 σφαιρίδια σε κάθε συστοιχία. Η ταυτότητα του κάθε σφαιριδίου προσδιορίζεται με αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας διεύθυνσης. Έτσι, προκύπτει ένα μοναδικό αρχείο διάταξης για κάθε συστοιχία, που στη συνέχεια χρησιμοποιείται για αποκωδικοποίηση των δεδομένων κατά τη σάρωση της συστοιχίας.

Ο φωτισμός των ανιχνευτών γίνεται με δέσμη οπτικών ινών σε σαρωτή υψηλής ανάλυσης. Κάθε ίνα καλύπτεται από ένα σφαιρίδιο και φως διέγερσης διασχίζει τη δέσμη διεγείροντας τις

φθορίζουσες ουσίες που συνδέονται με τα σφαιρίδια. Στη συνέχεια, το εκπεμπόμενο φως συλλέγεται στην επιφάνεια της ίνας.

Infinium CoreExome-24

Οι μικροσυστοιχίες HumanCoreExome-24, αποτελούνται από 550.601 ανιχνευτές για κοινούς και σπάνιους απλούς γενετικούς πολυμορφισμούς. Για να γίνουν ορατοί οι γενετικοί δείκτες γίνεται σάρωση με χρήση του i-scan. Ακολουθεί αναγνώριση των γονοτύπων με τη χρήση του Illumina's Genome Studio, ενός λογισμικού που επιτρέπει την οπτικοποίηση και την ανάλυση των δεδομένων της γονοτύπησης (GenCall). Κάθε πολυμορφισμός μελετάται ξεχωριστά για την αναγνώριση του γονοτύπου συγκρίνοντας τα δεδομένα από τη γονοτύπηση με αντίστοιχα δεδομένα αναφοράς. Έπειτα από την ολοκλήρωση της αναγνώρισης, το Genome Studio επιτρέπει την εξαγωγή των γονοτυπικών δεδομένων σε μορφή κατάλληλη για ποιοτικό έλεγχο και ανάλυση με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα.

3.3.2 Διάγνωση NAFLD

Ο διαχωρισμός του δείγματος σε ασθενείς ως προς τη NAFLD και μάρτυρες έγινε με υπερηχογράφημα άνω κοιλίας το οποίο καταλήγει σε διάγνωση για λιπώδη νόσο του ήπατος με κάποια κριτήρια διάγνωσης. Με βάση αυτά τα κριτήρια, τα άτομα κατατάχθηκαν ως προς την ηπατική στεάτωση σε τέσσερις κατηγορίες (καθόλου, ήπια, μέτρια, έντονη). Σε περαιτέρω ομαδοποίηση, τα άτομα με καθόλου ή ήπια ηπατική στεάτωση κατατάχθηκαν ως μάρτυρες καθώς είχαν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους και τα άτομα με μέτρια ή έντονη ηπατική στεάτωση κατατάχθηκαν ως ασθενείς εξίσου επειδή είχαν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Παράλληλα, έγινε κλινική αξιολόγηση για παρουσία χολολιθίασης και Debris και εκτίμηση του μεγέθους του ήπατος.

Κριτήρια διάγνωσης ηπατικής στεάτωσης

Διάχυτη υπερηχογένεια ήπατος

Αυξημένη ηχογένεια ήπατος σε σύγκριση με ηχογένεια νεφρών

Ασαφopoίηση αγγειακών τοιχωμάτων

Κατάταξη ως προς την ηπατική στεάτωση με βάση τα κριτήρια

0:φυσιολογική ηχογένεια

1:ελαφρά αυξημένη ηχογένεια με φυσιολογική απεικόνιση διαφράγματος και αγγείων

2:μέτρια αύξηση ηχογένειας με ελαφρά διαταραχή απεικόνισης διαφράγματος και αγγείων

3:μεγάλη αύξηση ηχογένειας με περιορισμένη απεικόνιση τοιχώματος αγγείων και διαφράγματος

3.3.3 Δημογραφικά χαρακτηριστικά και ιστορικό

Η καταγραφή των δημογραφικών χαρακτηριστικών και η λήψη του ατομικού και του οικογενειακού ιστορικού έγινε με συνέντευξη.

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά αφορούσαν την καταγωγή, το τόπο διαμονής, τα έτη εκπαίδευσης, το μορφωτικό επίπεδο, το ετήσιο οικογενειακό εισόδημα και την επαγγελματική και οικογενειακή κατάσταση.

Κατά τη λήψη του ατομικού ιστορικού, έγινε συλλογή πληροφοριών σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες, τη λήψη κάποιας φαρμακευτικής αγωγής και πλήθους παθήσεων οι κυριότερες από τις οποίες ήταν ο ΣΔ, η υπερλιπιδαιμία, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η ηπατίτιδα, η νόσος Wilson και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Όσον αφορά το οικογενειακό ιστορικό, έγινε συλλογή πληροφοριών για πλήθος παθήσεων οι κυριότερες από τις οποίες ήταν η NAFLD, η παχυσαρκία, ο ΣΔ, η υπερλιπιδαιμία, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η υπέρταση. Σε περίπτωση που οι γονείς των ατόμων είχαν καταλήξει, σημειωνόταν η αιτία.

3.3.4 Ανθρωπομετρία

Η ανθρωπομετρία αφορούσε τη μέτρηση της περιφέρειας μέσης και της περιφέρειας ισχίου, τη ζύγιση και την εκτίμηση της σύστασης σώματος. Το ύψος ήταν αυτό-δηλούμενο.

Η εκτίμηση της σύστασης σώματος και η ζύγιση υλοποιήθηκαν με τη συσκευή BC-418 (Body composition analyzer BC-418, Japan) η οποία υπολογίζει το ποσοστό σωματικού λίπους, τη λιπώδη, άλιπη και μυϊκή μάζα του σώματος μέσω βιοηλεκτρικής εμπίδησης (BIA) με βάση δεδομένα από τη μέθοδο DXA. Η BIA εκτιμά αυτές τις παραμέτρους υπολογίζοντας την αντίσταση του σώματος. Το λίπος είναι μη 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 άλλες παράμετροι μπορούν να εκτιμηθούν υπολογίζοντας τα επίπεδα της. Είναι απλό, γρήγορο και μη επεμβατικό μέσο εκτίμησης της σύστασης σώματος. Ωστόσο, η αντίσταση του σώματος μπορεί να ποικίλει λόγω αλλαγών στη θερμοκρασία, την ποσότητα και την κατανομή του σωματικού νερού (60% του σωματικού βάρους) αλλά και να μεταβάλλεται μέσα στην ημέρα. Απαραίτητο επομένως είναι να εξασφαλίζονται ομοιόμορφες συνθήκες κατά την μέτρηση. Στην παρούσα μελέτη, για να μειωθεί το σφάλμα από τη διακύμανση, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 ώρες μετά την αφύπνιση και το τελευταίο γεύμα, τουλάχιστον 12 ώρες μετά από έντονη σωματική δραστηριότητα και έπειτα από ούρηση

3.3.5 Εκτίμηση αρτηριακή πίεσης

Η εκτίμηση της αρτηριακής πίεσης έγινε με ηλεκτρονικό πιεσόμετρο μπράτσου. Λαμβάνονταν δυο μετρήσεις και η τελική τιμή ήταν ο μέσος όρων των μετρήσεων.

3.3.6. Αξιολόγηση διατροφικών συνηθειών

Για την εκτίμηση των διατροφικών συνηθειών χρησιμοποιήθηκε ημι-ποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης 172 τροφίμων [196] το οποίο συμπληρώθηκε μέσω συνέντευξης με τα άτομα. Το ερωτηματολόγιο περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικά με τη συχνότητα και την ποσότητα με την οποία καταναλώθηκαν τρόφιμα και ποτά κατά τη διάρκεια του προηγούμενου έτους. Σε περίπτωση που οι διατροφικές συνήθειες των ατόμων είχαν αλλάξει πρόσφατα, τους ζητούταν να ανακαλέσουν τις συνήθειες πριν από την αλλαγή αυτή και να συμπληρώσουν το ερωτηματολόγιο με βάση τις παλιές συνήθειες. Από την επεξεργασία του ερωτηματολογίου προέκυψαν δεδομένα για την κατανάλωση 50 ομάδων τροφίμων και στη συνέχεια έγινε αξιολόγηση σε διατροφικά πρότυπα. Το επίπεδο υποεκτίμησης ή υπερεκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Goldberg [197, 198].

3.3.7 Αξιολόγηση σωματικής δραστηριότητας

Το επίπεδο σωματικής δραστηριότητας αξιολογήθηκε με χρήση του APAQ (Athens Physical Activity Questionnaire), ενός σύντομου αυτόσυμπληρούμενου ερωτηματολογίου το οποίο είναι έγκυρο και αξιόπιστο για την εκτίμηση της ενεργειακής δαπάνης από σωματική δραστηριότητα σε Έλληνες ενήλικες και κατάλληλο για επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες [199]. Συλλέγει πληροφορίες σχετικά με την ενεργειακή δαπάνη από σωματική δραστηριότητα που έχουν τα άτομα κατά τη διάρκεια της τελευταίας εβδομάδας και περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικά με τη δραστηριότητα στην εργασία, το σπίτι και στο πλαίσιο μετακίνησης και ψυχαγωγίας.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 21.0. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπική απόκλιση και οι ποιοτικές μεταβλητές ως απόλυτες τιμές και ποσοστά. Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών ελέγχθηκε με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov και αξιολογήθηκε γραφικά. Για τη σύγκριση των ποιοτικών μεταβλητών εφαρμόστηκε ο έλεγχος χ^2 του Pearson ενώ για τη σύγκριση των κανονικών ποσοτικών μεταβλητών ο έλεγχος t-test. Η σύγκριση των μη κανονικών συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Mann-Whitney U test και το κριτήριο Kruskal-Wallis. Για τις συνεχείς μεταβλητές, έγινε αποκλεισμός των μέγιστων και ελάχιστων τιμών (± 5 τυπική απόκλιση). Ο έλεγχος των συσχετίσεων πραγματοποιήθηκε με μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής και πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης από τα οποία προέκυψαν σχετικοί λόγοι για κάθε μεταβλητή. Η στατιστική σημαντικότητα σε όλους τους ελέγχους εκτιμήθηκε σε επίπεδο $p:0.05$.

Τα διατροφικά πρότυπα αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA). Ο έλεγχος ποιότητας των δεδομένων έγινε με τα κριτήρια Kaiser-Meyer-Olkin (>0.6) για την επάρκεια του δείγματος και το κριτήριο Barlett test ($p<0.05$) για την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των δεδομένων. Για την εξαγωγή των προτύπων, λήφθηκαν υπόψη τα scree plots και τα eigenvalues. Η περιστροφή των προτύπων (συνιστωσών) έγινε με τη μέθοδο Varimax καθώς τα πρότυπα ήταν ανεξάρτητα μεταξύ τους. Ως σημαντικές για το κάθε πρότυπο θεωρήθηκαν οι ομάδες τροφίμων (παράγοντες) με βάρος (factor loading) > 0.3 . Τα άτομα έλαβαν z-score για το κάθε πρότυπο, τα οποία περαιτέρω αναλύθηκαν σε quartiles (Q1: χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: υψηλότερη κατανάλωση). Το επίπεδο υποεκτίμησης ή υπερεκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Goldberg και μια δίτιμη κατηγορική μεταβλητή χρησιμοποιήθηκε στα μοντέλα παλινδρόμησης.

Για τους 2 γενετικούς πολυμορφισμούς οι οποίοι αξιολογήθηκαν, τον rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και τον rs58542926 του γονιδίου TM6SF2, τα άτομα διαχωρίστηκαν σε μη φορείς και φορείς των αλληλόμορφων κινδύνου.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον **πίνακα 4.1** παρουσιάζονται τα βασικά δημογραφικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά όπως και το βασικό ιατρικό ιστορικό των ατόμων του δείγματος. Η μέση ηλικία του συνόλου του δείγματος είναι 46 έτη και αποτελείται από 198 άνδρες και 141 γυναίκες. Όπως φαίνεται, ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ως προς τη νόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε για την ηλικία, το επίπεδο εκπαίδευσης, τα πακετοέτη, το ΔΜΣ, το ολικό λίπος σώματος, το λόγο περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίου, την υπερλιπιδαιμία, το ΣΔ2, την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο.

Πίνακας 4.1. Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

NAFLD N(%)			
	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
	217(61.8)	134(38.2)	
Δημογραφικά χαρακτηριστικά			
Ηλικία mean(sd)	43.75(11.22)	50.36(10.51)	0.000
Φύλο N(%)			0.241
- Θηλυκό	132(60.8)	73(54.5)	
- Αρσενικό	85 (39.2)	61(45.5)	

Επίπεδο εκπαίδευσης N(%)			0.002
-1 (δημοτικό)	5(2.3)	13(9.7)	
-2 (δευτεροβάθμια εκπαίδευση)	51(23.5)	36(26.9)	
-3 (τριτοβάθμια εκπαίδευση)	41 (18.9)	33 (24.6)	
-4 (ανώτατη εκπαίδευση)	120 (55.3)	52 (38.8)	
Πακετοέτη (packyears) mean (sd)	8.08 (13.71)	15.18(24.49)	0.024
Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	mean (sd)		
ΔΜΣ (kg/m ²)	24.91 (3.27)	31.10 (4.71)	0.000
Ολικό λίπος σώματος (%)	26.22 (8.64)	33.76(8.91)	0.000
Περιφέρεια μέσης /περιφέρεια ισχίου	0.82 (0.09)	0.91 (0.08)	0.000
Ιατρικό ιστορικό	N(%)		
Υπερλιπιδαιμία			0.000
-Όχι	134(61.8)	39 (29.1)	
-Ναι	83(38.2)	95 (70.9)	
ΣΔ2			0.000
-Όχι	215 (99.1)	121 (90.3)	
-Ναι	2 (0.9)	13 (9.7)	

Παχυσαρκία			0.001
-Όχι	175 (82.5)	84 (66.1)	
-Ναι	37 (17.5)	43 (33.9)	
Μεταβολικό σύνδρομο			0.000
-Όχι	192 (88.5)	55 (41)	
-Ναι	25 (11.5)	79 (59)	

*Πακετοέτη (packyears): αριθμός ημερήσιων πακέτων τσιγάρων Χ χρόνια καπνίσματος

Στον **πίνακα 4.2** παρουσιάζονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ατόμων του δείγματος. Όπως φαίνεται, ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ως προς τη νόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε για όλα τα βιοχημικά χαρακτηριστικά.

Πίνακας 4.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος

NAFLD			
	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
Βιοχημικά χαρακτηριστικά	mean (sd)		
AST (U/L)	21.10 (6.76)	23.75 (8.44)	0.002
ALT (U/L)	21.44 (11.73)	30.26 (14.51)	0.000
AST/ALT	1.087 (0.31)	0.835 (0.22)	0.000
GGT (U/L)	19.98 (17.58)	28.94 (21.71)	0.000
HbA1c (%)	5.24 (0.33)	5.57 (0.43)	0.000
HOMA-IR	2.19 (1.41)	3.90 (3.05)	0.000
Ουρικό οξύ (mg/dl)	4.73 (1.17)	5.64 (1.24)	0.000
TC (mg/dl)	195 (38.84)	209.19 (33.66)	0.001
TG (mg/dl)	78.50 (37.30)	127.42 (62.64)	0.000
HDL-c (mg/dl)	57.87 (14.41)	50.98 (12.41)	0.000
LDL-c (mg/dl)	120.99 (33.05)	132.77 (30.38)	0.000

Στον **πίνακα 4.3** παρουσιάζονται τα δεδομένα για τους κυριότερους δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της NAFLD και την εκτίμηση της σοβαρότητας της. Όπως φαίνεται, ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ως προς τη νόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε για όλους τους δείκτες.

Πίνακας 4.3. Δείκτες εκτίμησης της NAFLD στο δείγμα

NAFLD			
	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
Δείκτες	mean (sd)		
NFS	-2.75 (0.92)	-1.98 (1.26)	0.000
FLI	21.08 (19.91)	65.01 (24.67)	0.000
NASH_score	-1.82 (0.39)	-1.40 (0.79)	0.000

*NFS: NAFLD Fibrosis Score

*FLI: Fatty Liver Index

Στον **πίνακα 4.4** παρουσιάζονται τα δεδομένα για το δείκτη Goldberg οι οποίος χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της υποεκτίμησης και της υπερεκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης από το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων. Όπως φαίνεται, ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ως προς τη νόσο, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το δείκτη και επομένως ως προς την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης.

Πίνακας 4.4. Δείκτης Goldberg στο δείγμα

NAFLD			
	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
Δείκτης Goldberg	N(%)		
Υποεκτίμηση ή υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης N(%)			0.860
-Όχι	138 (64.8)	47(36.2)	
-Ναι	75 (35.2)	83 (63.8)	

Στον **πίνακα 4.5** παρουσιάζονται τα βάρη (factor loadings) των ομάδων τροφίμων για τα 4 διατροφικά πρότυπα τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση των συνιστωσών. Τα 4 πρότυπα εξηγούν το 46.05% της συνολικής διακύμανσης (1:13.27%, 2:12.92%, 3:10.50%, 4:9.35%). Το πρότυπο 1 χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή και το πρότυπο 2 από υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος. Το πρότυπο 3 χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας και το πρότυπο 4 από υψηλή κατανάλωση σε ξηρούς καρπούς, σοκολάτα και τρόφιμα με MUFAs.

Πίνακας 4.5. Βάρη (factor loadings) των ομάδων τροφίμων για τα 4 διατροφικά πρότυπα

Διατροφικά πρότυπα				
Ομάδες τροφίμων	1	2	3	4
Ετοιμο φαγητό	0.703	-	-	-
Σακχαρούχα αναψυκτικά	0.655	-	-	-
Τηγανητές πατάτες	0.644	-	-	-
Γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή	0.471	-	-	-
Λαδερό φαγητό	-	0.745	-	-
Όσπρια	-	0.669	-	-
Πατάτες	0.358	0.540	-	-
Φρούτα-λαχανικά	-	0.528	-	-
Ψάρι πλούσιο σε λίπος	-	0.510	-	-
Πουλερικά	-	-	0.740	-
Αυγά	-	-	0.682	-
Κόκκινο κρέας	0.460	-	0.575	-
Ξηροί καρποί	-	-	-	0.654
Σοκολάτα	-	-	-	0.604
Τρόφιμα με MUFAs (ελιές, ταχίνι, αβοκάντο, μαργαρίνη)	-	-	-	0.595

*απόλυτες τιμές < 0.3 εξαιρέθηκαν χάριν απλότητας

* για τις ομάδες τροφίμων με βάρος για 2 πρότυπα, η ομάδα τροφίμων θεωρήθηκε ως σημαντική για το πρότυπο στο οποίο είχε το υψηλότερο βάρος

Στον **πίνακα 4.6** παρουσιάζονται τα δεδομένα για την κατανάλωση των διατροφικών προτύπων από τα άτομα του δείγματος. Όπως φαίνεται, ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ως προς τη νόσο, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την κατανάλωση των διατροφικών προτύπων.

Πίνακας 4.6. Κατανάλωση από τα διατροφικά πρότυπα στο δείγμα

NAFLD			
	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
Διατροφικά πρότυπα	N(%)		
Πρότυπο 1			0.352
-Q1	59 (27.8)	27 (21.3)	
-Q2	55 (25.9)	30 (23.6)	
-Q3	50 (23.6)	32 (25.2)	
-Q4	48 (22.6)	38 (29.9)	
Πρότυπο 2			0.438
-Q1	46 (21.7)	37 (29.1)	
-Q2	57 (26.9)	29 (22.8)	
-Q3	53 (25)	32 (25.2)	
-Q4	56 (26.4)	29 (22.8)	

Πρότυπο 3			0.154
-Q1	51 (24.1)	34 (26.8)	
-Q2	48 (22.6)	38 (29.9)	
-Q3	62 (29.2)	24 (18.9)	
-Q4	51 (24.1)	31 (24.4)	
Πρότυπο 4			0.393
-Q1	48 (22.6)	35 (27.6)	
-Q2	58 (27.4)	28 (22)	
-Q3	50 (23.6)	36 (28.3)	
-Q4	56 (26.4)	28 (22)	

Στον **πίνακα 4.7** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της εμφάνισης της νόσου σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης του προτύπου 1 σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (ΣΛ:2.104, ΔΕ: 1.018-4.349, p : 0.045). Επιπλέον, στο ίδιο μοντέλο, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης του προτύπου 2 σε σχέση με τα άτομα στο τεταρτημόριο χαμηλότερης κατανάλωσης είχαν μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (ΣΛ:0.526, ΔΕ: 0.263-1.050, p : 0.068), ένα αποτέλεσμα που όμως δεν άγγιξε στατιστική σημαντικότητα. Για τα άλλα πρότυπα, δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.7. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο

	Μοντέλο 1^α		Μοντέλο 2^β		Μοντέλο 3^γ	
	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value
Πρότυπο 1¹						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	1.150 (0.610-2.170)	0.666	1.224 (0.623-2.405)	0.557	1.188 (0.586-2.408)	0.633
Q3	1.542 (0.826-2.879)	0.173	1.487 (0.767-2.883)	0.240	1.412 (0.702-2.841)	0.334
Q4	1.775 (0.954-3.304)	0.070	2.214 (1.140-4.298)	0.019	2.104 (1.018-4.349)	0.045
Πρότυπο 2²						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	0.632 (0.341-1.170)	0.144	0.514 (0.265-0.997)	0.049	0.544 (0.269-1.100)	0.090
Q3	0.810 (0.442-1.485)	0.496	0.779 (0.408-1.489)	0.450	0.807 (0.408-1.594)	0.537
Q4	0.699 (0.379-1.289)	0.251	0.557 (0.289-1.075)	0.081	0.526 (0.263-1.050)	0.068
Πρότυπο 3³						
Q1 (ref)	1		1		1	

Q2	1.184 (0.648-2.164)	0.583	1.228 (0.644-2.342)	0.533	1.171 (0.584-2.349)	0.656
Q3	0.555 (0.294-1.050)	0.070	0.609 (0.310-1.199)	0.152	0.560 (0.274-1.151)	0.116
Q4	0.935 (0.509-1.718)	0.828	1.042 (0.54-2.009)	0.901	0.903 (0.453-1.798)	0.771

Πρότυπο 4⁴

Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	0.662 (0.357-1.227)	0.190	0.638 (0.327-1.243)	0.187	0.626 (0.312-1.257)	0.188
Q3	0.935 (0.511-1.709)	0.827	0.898 (0.470-1.716)	0.746	0.982 (0.497-1.940)	0.957
Q4	0.697 (0.377-1.289)	0.250	0.686 (0.356-1.324)	0.262	0.712 (0.355-1.428)	0.339

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση, PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

1:υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή

2:υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος

3: υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας

4:υψηλή κατανάλωση σε ξηρούς καρπούς, σοκολάτα και τρόφιμα με MUFAs

Στον **πίνακα 4.8** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του διατροφικού προτύπου 3 και του NFS (NAFLD Fibrosis Score) σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Στο μοντέλο 2, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ, μια αύξηση της κατανάλωσης κατά μήκος των τεταρτημορίων του προτύπου συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με μείωση του NFS (β:-0.116, ΔΕ: -0.224 έως -0.007, p: 0.037). Ωστόσο, στο μοντέλο 3, έπειτα από έλεγχο και για τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής

πρόσληψης και το PAL, η συσχέτιση έγινε μη στατιστικά σημαντική (β : -0.101, ΔE : -0.211 έως 0.009, p : 0.073). Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 1,2,4 με το NFS και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Στο πλαίσιο της αξιολόγησης των κυριότερων δεικτών εκτίμησης της παρουσίας και της σοβαρότητας της NAFLD, πέρα από το NFS, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις για όλα τα διατροφικά πρότυπα με το FLI (Fatty Liver Index), το NASH_score και το λόγο AST/ALT και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.8. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS

	Μοντέλο 1 ^α		Μοντέλο 2 ^β		Μοντέλο 3 ^γ	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
	(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)	
Πρότυπο 3 ³						
Τεταρτημόρια κατανάλωσης (Q1-Q4)	-0.146	0.010	-0.116	0.037	-0.101	0.073
	(-0.257 έως -0.036)		(-0.224 έως -0.007)		(-0.211 έως 0.009)	

ΔE : διάστημα εμπιστοσύνης, ΣL : σχετικός λόγος, Q: τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α : μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β : έλεγχος για ηλικία, φύλο και $\Delta M \Sigma$

γ : έλεγχος για ηλικία, φύλο, $\Delta M \Sigma$, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

3: υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας

Στον **πίνακα 4.9** παρουσιάζονται τα δεδομένα για την παρουσία των αλληλομόρφων κινδύνου των πολυμορφισμών rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και rs58542926 του γονιδίου TM6SF2 στους μάρτυρες και ασθενείς ως προς τη NAFLD. Όπως φαίνεται, ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την παρουσία του αλληλομόρφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 ενώ για το αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 παρατηρήθηκε μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά (p:0.07).

Πίνακας 4.9. Γενετικοί πολυμορφισμοί στο δείγμα

NAFLD				
	Σύνολο	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
Γενετικοί πολυμορφισμοί	N (%)			
rs738409-G	342			0.288
-κανένα αλληλόμορφο		115 (54%)	62(48.1%)	
-τουλάχιστον 1 αλληλόμορφο		98 (46%)	67(51.9%)	
rs58542926-A	342			0.07
-κανένα αλληλόμορφο		195 (91.5%)	110 (85.3%)	
-τουλάχιστον 1 αλληλόμορφο		18 (8.5%)	19 (14.7%)	

Στον **πίνακα 4.10** παρουσιάζονται δεδομένα από τη γενετική ανάλυση για τους πολυμορφισμούς rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και rs58542926 του γονιδίου TM6SF2. Στο δείγμα, η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού rs738409 είναι 29.14% και του αλληλομόρφου A του πολυμορφισμού rs58542926 είναι 5.62%. Η γονοτύπηση έγινε επιτυχημένα και για τους 2 πολυμορφισμούς (call rate:1). Επιπλέον, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών αυτών και της εμφάνισης της νόσου έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ. Όπως φαίνεται, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών και της εμφάνισης της νόσου.

Πίνακας 4.10. Γενετικοί πολυμορφισμοί και μοντέλο πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των γενετικών πολυμορφισμών ως προς τη νόσο

Χρωμόσωμα	SNP	Effect allele (EA)	Non effect allele	EAF	HW p-value	Call rate	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value
2	rs738409	G	C	29,14%	0,2913	1	1.474 (0.921-2.359)	0.106
19	rs58542926	A	G	5,62%	1	1	1.482 (0.710-3.092)	0.295

* έπειτα από έλεγχο για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

*SNP: απλός γενετικός πολυμορφισμός, effect allele: αλληλόμορφο κινδύνου, non effect allele: συχνό αλληλόμορφο, effect allele frequency: συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφου κινδύνου στο δείγμα, HW: ισορροπία Hardy- Weinberg, call rate: ποσοστό επιτυχίας γονοτύπησης, ΣΛ:σχετικός λόγος, ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

Στον **πίνακα 4.11** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων 1 και 2 και της εμφάνισης της νόσου στους μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης του προτύπου 1 σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (ΣΛ:3.078, ΔΕ: 1.034-9.162, p: 0.043). Για το άλλο πρότυπο, δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 3 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.11. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3

	Μοντέλο 1^α		Μοντέλο 2^β		Μοντέλο 3^γ	
	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value
Πρότυπο 1¹						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	1.435 (0.557-3.696)	0.454	1.703 (0.629-4.609)	0.294	1.822 (0.612-5.424)	0.281
Q3	1.902 (0.757-4.782)	0.172	1.631 (0.615-4.321)	0.325	1.640 (0.562-4.786)	0.366

Q4	2.378 (0.971-5.822) 0.058	2.960 (1.144-7.658) 0.025	3.078 (1.034-9.162) 0.043
Πρότυπο 2²			
Q1 (ref)	1	1	1
Q2	0.561 (0.229-1.372) 0.205	0.458 (1.178-1.180) 0.106	0.430 (0.152-1.218) 0.112
Q3	1.286 (0.532-3.105) 0.576	1.034 (0.402-2.658) 0.944	1.055 (0.370-3.008) 0.920
Q4	0.695 (0.290-1.664) 0.414	0.495 (0.193-1.267) 0.142	0.416 (0.150-1.155) 0.092

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

1:υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή

2:υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος

Στον **πίνακα 4.12** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων 1 και 2 και της εμφάνισης της νόσου στους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται, δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 3 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.12. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3

	Μοντέλο 1^α		Μοντέλο 2^β		Μοντέλο 3^γ	
	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value
Πρότυπο 1¹						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	0.984 (0.411-2.355)	0.971	0.979 (0.368-2.603)	0.966	0.880 (0.299-2.589)	0.817
Q3	1.042 (0.427-2.539)	0.928	1.278 (0.490-3.332)	0.616	1.365 (0.456-4.088)	0.578
Q4	1.278 (0.528-3.095)	0.586	1.612 (0.609-4.268)	0.337	1.478 (0.498-4.384)	0.481
Πρότυπο 2²						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	0.702 (0.289-1.705)	0.435	0.573 (0.214-1.529)	0.266	0.694 (0.231-2.080)	0.514
Q3	0.445 (1.185-1.071)	0.071	0.493 (0.190-1.283)	0.147	0.587 (0.213-1.613)	0.301
Q4	0.594 (0.241-1.461)	0.256	0.603 (0.226-1.607)	0.311	0.588 (0.2-1.727)	0.334

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

1: υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή

2: υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος

Στον **πίνακα 4.13** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων 1 και 2 και της εμφάνισης της νόσου στους μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης του προτύπου 1 σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (ΣΛ:2.292, ΔΕ: 1.036-5.072, p: 0.041). Επιπλέον, στο ίδιο μοντέλο, τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης του προτύπου 2 σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης είχαν μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (ΣΛ:0.485, ΔΕ: 0.229-1.028, p: 0.059), ένα αποτέλεσμα που όμως δεν άγγιξε στατιστική σημαντικότητα. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 3 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.13. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2

	Μοντέλο 1^α		Μοντέλο 2^β		Μοντέλο 3^γ	
	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value
Πρότυπο 1¹						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	1.433 (0.712-2.884)	0.314	1.484 (0.703-3.132)	0.301	1.352 (0.616-2.965)	0.452
Q3	1.780 (0.888-3.566)	0.104	1.887 (0.900-3.957)	0.093	1.697 (0.779-3.698)	0.183
Q4	1.896 (0.961-3.739)	0.065	2.432 (1.175-5.033)	0.017	2.292 (1.036-5.072)	0.041
Πρότυπο 2²						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	0.597 (0.308-1.157)	0.127	0.495 (0.243-1.009)	0.053	0.523 (0.240-1.137)	0.102
Q3	0.609 (0.314-1.181)	0.142	0.587 (0.288-1.195)	0.142	0.574 (0.270-1.219)	0.148
Q4	0.621 (0.320-1.206)	0.160	0.498 (0.244-1.018)	0.056	0.485 (0.229-1.028)	0.059

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

1: υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή

2: υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος

Στον **πίνακα 4.14** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων 1 και 2 και της εμφάνισης της νόσου στους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2, σε 2 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται, δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 3 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.14. Μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των διατροφικών προτύπων ως προς τη νόσο σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2

	Μοντέλο 1 ^α		Μοντέλο 2 ^β		Μοντέλο 3 ^γ	
	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value	ΣΛ (95% ΔΕ)	p-value
Πρότυπο 1¹						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	0.476 (0.086-2.628)	0.395	0.661 (0.104-4.213)	0.661	-	
Q3	0.357 (0.059-2.159)	0.262	0.313 (0.046-2.144)	0.237	-	
Q4	3.571 (0.313-40.75)	0.305	3.637 (0.207-63.77)	0.377	-	
Πρότυπο 2²						
Q1 (ref)	1		1		1	
Q2	4.375 (0.156-6.420)	1	0.474 (0.054-4.176)	0.502	-	
Q3	0.833 (0.564-33.94)	0.158	4.020 (0.437-36.95)	0.219	-	
Q4	0.800 (0.134-5.167)	0.845	0.418 (0.052-3.33)	0.410	-	

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL - δεν υπήρχαν αρκετά άτομα για να γίνει η ανάλυση λόγω πολυσυγγραμμικότητας του πολυπαραγοντικού μοντέλου

1:υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή

2:υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος

Στον **πίνακα 4.15** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του διατροφικού προτύπου 3 και του NFS στους μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Όπως, φαίνεται δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 1,2 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Στο πλαίσιο αυτό, πέρα από το NFS, επίσης σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις για όλα τα διατροφικά πρότυπα με το FLI, το NASH_score και το λόγο AST/ALT και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.15. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3

	Μοντέλο 1 ^α		Μοντέλο 2 ^β		Μοντέλο 3 ^γ	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
	(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)	
Πρότυπο 3 ³						
Τεταρτημόρια κατανάλωσης (Q1-Q4)	-0.101	0.190	-0.070	0.346	-0.049	0.534
	(-0.252 έως 0.050)		(-0.218 έως 0.077)		(-0.204 έως 0.106)	

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

3: υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας

Στον **πίνακα 4.16** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του διατροφικού προτύπου 3 και του NFS στους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Στο μοντέλο 2, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, μια αύξηση της κατανάλωσης κατά μήκος των τεταρτημορίων συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τη μείωση του NFS (β :-0.168, ΔΕ: -0.329 έως -0.007, p : 0.041). Ωστόσο, στο μοντέλο 3, έπειτα από έλεγχο και για τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, η συσχέτιση έγινε μη στατιστικά σημαντική (β :-0.134, ΔΕ: -0.295 έως 0.028, p : 0.104). Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 1,2,4 με το NFS και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Στο πλαίσιο αυτό, πέρα από το NFS, επίσης σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις για όλα τα διατροφικά πρότυπα με το FLI, το NASH_score και το λόγο AST/ALT και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.16. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3

	Μοντέλο 1 ^α		Μοντέλο 2 ^β		Μοντέλο 3 ^γ	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
	(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)	
Πρότυπο 3 ³						
Τεταρτημόρια κατανάλωσης (Q1-Q4)	-0.201	0.017	-0.168	0.041	-0.134	0.104
	(-0.366 έως -0.037)		(-0.329 έως -0.007)		(-0.295 έως 0.028)	

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση, PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

3: υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας

Στον **πίνακα 4.17** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του διατροφικού προτύπου 3 και του NFS στους μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Στο μοντέλο 1, το οποίο είναι μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες, μια αύξηση της κατανάλωσης κατά μήκος των τεταρτημορίων συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τη μείωση του NFS (β : -0.139, ΔΕ: -0.255 έως -0.023, p : 0.019). Ωστόσο, στα μοντέλα 2 και 3, έπειτα από έλεγχο για παράγοντες, η συσχέτιση έγινε μη στατιστικά σημαντική (p : 0.057 και p : 0.094). Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 1,2 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Στο πλαίσιο αυτό, πέρα από το NFS, επίσης σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις για όλα τα διατροφικά πρότυπα με το FLI, το NASH_score και το λόγο AST/ALT και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.17. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε μη φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2

	Μοντέλο 1 ^α		Μοντέλο 2 ^β		Μοντέλο 3 ^γ	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
	(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)	
Πρότυπο 3 ³						
Τεταρτημόρια κατανάλωσης (Q1-Q4)	-0.139	0.019	-0.111	0.057	-0.100	0.094
	(-0.255 έως -0.023)		(-0.226 έως 0.003)		(-0.217 έως 0.017)	

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

3: υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας

Στον **πίνακα 4.18** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του διατροφικού προτύπου 3 και του NFS στους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2, σε 3 διαφορετικά μοντέλα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις και για τα διατροφικά πρότυπα 1,2 και 4 και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Στο πλαίσιο αυτό, πέρα από το NFS, επίσης σε δεδομένα που δεν παρουσιάζονται αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις για όλα τα διατροφικά πρότυπα με το FLI, το NASH_score και το λόγο AST/ALT και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Πίνακας 4.18. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης διατροφικού προτύπου ως προς το NFS σε φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2

	Μοντέλο 1 ^α		Μοντέλο 2 ^β		Μοντέλο 3 ^γ	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
	(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)		(95% ΔΕ)	
Πρότυπο 3 ³						
Τεταρτημόρια κατανάλωσης (Q1-Q4)	-0.201	0.288	-0.212	0.251	-0.184	0.432
	(-0.580 έως 0.178)		(-0.583 έως 0.159)		(-0.658 έως 0.291)	

ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης, ΣΛ: σχετικός λόγος, Q:τεταρτημόριο

Q1: τεταρτημόριο με τη χαμηλότερη κατανάλωση, Q4: τεταρτημόριο με την υψηλότερη κατανάλωση,

PAL: επίπεδο σωματικής δραστηριότητας

α: μη ελεγμένο για άλλους παράγοντες

β: έλεγχος για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ

γ: έλεγχος για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και PAL

3: υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι διατροφικές συνήθειες και το γενετικό υπόβαθρο έχει αναγνωριστεί ότι έχουν κύριο ρόλο ως προς την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD. Η αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφής στην εμφάνιση της NAFLD, παραδοσιακά εστιάζει στην επίδραση των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών και της κατανάλωσης ομάδων τροφίμων. Ωστόσο, η ανάλυση των διατροφικών προτύπων δίνει μια πιο αποτελεσματική και ρεαλιστική διερεύνηση της σχέσης της συνολικής διατροφής με τη NAFLD καθώς συνυπολογίζει τη πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση ανάμεσα στα τρόφιμα και τα θρεπτικά συστατικά. Έως τώρα, λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει τη διατροφή στη NAFLD υπό τη μορφή των διατροφικών προτύπων και επομένως υπάρχει σχετική ένδεια δεδομένων. Επιπλέον, ενώ τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει αξιοσημείωτη προσπάθεια για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της διατροφής και των γενετικών πολυμορφισμών ως προς τη NAFLD, οι μελέτες σε ανθρώπους είναι λίγες και δεν υπάρχει έως τώρα κάποια αναφορά για την αλληλεπίδραση αυτή όταν η διατροφή αναλύεται υπό τη μορφή διατροφικών προτύπων. Στην παρούσα μελέτη, σε πρώτο στάδιο έγινε διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης ανάμεσα στα διατροφικά πρότυπα και τη NAFLD καθώς και τους κυριότερους δείκτες εκτίμησης της NAFLD. Σε δεύτερο στάδιο, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της πιθανής συσχέτισης που προαναφέρθηκε στους μη φορείς και φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου για τους 2 πιο σημαντικούς πολυμορφισμούς για τη NAFLD, τον rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και τον rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.

Αρχικά, κατά την ανάλυση των κύριων συνιστωσών, αναγνωρίστηκαν 4 διατροφικά πρότυπα στο δείγμα. Το πρότυπο 1 χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε έτοιμο φαγητό, σακχαρούχα αναψυκτικά, τηγανητές πατάτες, γλυκά και αλμυρά σφολιατοειδή και το πρότυπο 2 από υψηλή κατανάλωση σε λαδερό φαγητό, όσπρια, πατάτες, φρούτα-λαχανικά και ψάρι πλούσιο σε λίπος. Το πρότυπο 3 χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγά και κόκκινο κρέας και το πρότυπο 4 από υψηλή κατανάλωση σε ξηρούς καρπούς, σοκολάτα και τρόφιμα με MUFAs όπως οι ελιές, το ταχίνι, το αβοκάντο και η μαργαρίνη.

Κατά τη διερεύνηση της συσχέτισης των 4 διατροφικών προτύπων με τη NAFLD, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL το πρότυπο 1, το οποίο ομοιάζει με το Δυτικό πρότυπο διατροφής, συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα για τη νόσο ($p:0,045$). Για τα άλλα πρότυπα δεν εμφανίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο.

Ειδικότερα, για το πρότυπο 1 το οποίο ομοιάζει με το Δυτικό πρότυπο διατροφής, αναδείχτηκε πως τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο είχαν κατά 2.1 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για εμφάνιση της νόσου. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Ειδικότερα, προοπτική μελέτη έδειξε πως έφηβοι στο υψηλότερο τεταρτημόριο ενός Δυτικού τύπου προτύπου στα 14 έτη είχαν 2.6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για τη NAFLD στα 17 έτη σε σχέση με τους εφήβους στο χαμηλότερο τεταρτημόριο. Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη προτάθηκε πως το πρότυπο επιδρά στη NAFLD μέσω της παχυσαρκίας καθώς η συσχέτιση δεν ήταν ανεξάρτητη από την παχυσαρκία [131]. Αντιθέτως, στην παρούσα μελέτη, η συσχέτιση ήταν ανεξάρτητη από την παχυσαρκία καθώς είχε γίνει έλεγχος για το ΔΜΣ. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν αναδείξει έντονα το ρόλο του έτοιμου φαγητού [117, 118] και των σακχαρούχων αναψυκτικών [103, 119, 120] στην εμφάνιση της NAFLD, ομάδες τροφίμων οι οποίες είναι σημαντικά συστατικά του προτύπου 1.

Κατά τη διερεύνηση της συσχέτισης των 4 διατροφικών προτύπων με τους κυριότερους δείκτες εκτίμησης της NAFLD (AST/ALT, NFS, FLI και NASH_score), δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των διατροφικών προτύπων και του λόγου AST/ALT, του FLI και του NASH_Score. Για το NFS παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μόνο με το πρότυπο 3 το οποίο περιέχει πρωτεϊνούχα τρόφιμα, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ. Ειδικότερα, αύξηση κατά 1 μονάδα της κατανάλωσης κατά μήκος των τεταρτημορίων του προτύπου 3 συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με μείωση του NFS κατά 0.116 ($p:0.037$). Ωστόσο, έπειτα από έλεγχο και για τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, η συσχέτιση έγινε μη στατιστικά σημαντική ($p: 0.073$). Ο NFS είναι δείκτης ο οποίος προβλέπει την προχωρημένη ίνωση. Τιμή του NFS < -1.455 αποκλείει την προχωρημένη ίνωση ενώ τιμή του NFS > 0.675 προβλέπει την προχωρημένη ίνωση [20].

Επομένως, μια μείωση στην τιμή του NFS μετακινεί το δείκτη ίσως πιο κοντά προς το κατώφλι για τον αποκλεισμό της προχωρημένης ίνωσης και επακόλουθα μπορεί να έχει ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Το πρότυπο 3 χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγό και κόκκινο κρέας, τα οποία είναι πρωτεϊνούχα τρόφιμα. Για την πρωτεΐνη, αν και η επίδραση της στο ηπατικό λίπος δεν είναι ξεκάθαρη καθώς υπάρχουν και αντιφατικά δεδομένα, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλή πρόσληψη της επιδρά θετικά στο μεταβολισμό της γλυκόζης, την ινσουλινοευαισθησία, το λιπιδαιμικό προφίλ και τα ηπατικά ένζυμα [107]. Επιπλέον, η πρωτεΐνη της διατροφής παρέχει αμινοξέα για την ένταξη των λιπαρών οξέων στις λιποπρωτεΐνες και την εξαγωγή τους από το ήπαρ, με πιθανό ρόλο στην πρόληψη της ηπατικής στεάτωσης. Τέλος, είναι απαραίτητη για την αναγέννηση των ηπατοκυττάρων [108]. Επομένως, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η υψηλή πρόσληψη πρωτεΐνης δυνητικά μπορεί να έχει κάποιο προστατευτικό ρόλο, μέσω των μηχανισμών αυτών, στην εξέλιξη της NAFLD η οποία αξιολογείται από το NFS. Αδιαμφισβήτητα όμως, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τη πρωτεΐνης στην εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD καθώς δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα όταν έγινε έλεγχος για πολλούς συγχυτικούς παράγοντες. Επίσης, πρόκειται για μια πιο πολύ πρώιμη παρατήρηση με μικρή κλινική σημασία καθώς η μείωση του NFS ήταν μικρή.

Επακόλουθα, σύμφωνα με τη γενετική ανάλυση, στο δείγμα η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου κινδύνου G του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3 είναι 29.14%, κοντά με τη συχνότητα εμφάνισης στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό η οποία είναι 23.33%. Επιπλέον, η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου κινδύνου A του πολυμορφισμού rs58542926 του γονιδίου TM6SF2 είναι 5.62%, παρόμοια με τη συχνότητα εμφάνισης στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό η οποία είναι 6.76%. Στο δείγμα, ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την παρουσία του αλληλομόρφου G για τον πολυμορφισμό rs738409 ενώ για το αλληλόμορφο A για τον πολυμορφισμό rs58542926 παρατηρήθηκε μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά ($p:0.07$). Επιπρόσθετα, κατά τις συσχετίσεις μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών αυτών και της εμφάνισης της νόσου έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση (rs738409-G με $p:0.106$, rs58542926-A με $p:0.295$). Για τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3 σε δεδομένα από τη μελέτη τα οποία δεν παρουσιάζονται με χρήση προσθετικού μοντέλου για το

αλληλόμορφο G, έχει φανεί πως υπάρχει θετική συσχέτιση με τη νόσο, δηλαδή τα άτομα με ένα αλληλόμορφο G έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα κατά 33.7% για τη νόσο σε σχέση με τα άτομα με κανένα αλληλόμορφο G. Στη συγκεκριμένη ανάλυση, πιθανότατα η συσχέτιση δεν άγγιξε στατιστική σημαντικότητα γιατί τα άτομα χωρίστηκαν σε μη φορείς και φορείς όπου οι φορείς ήταν τα άτομα με 1 τουλάχιστον αλληλόμορφο G. Η κατηγοριοποίηση αυτή, όμως, έγινε γιατί στόχος ήταν ο διαχωρισμός του δείγματος με βάση το επικρατές μοντέλο και η παρατήρηση της πιθανής διαφορετικής απόκρισης των ατόμων ανάλογα με τη διατροφή. Σχετικά με τον πολυμορφισμό rs58542926 του γονιδίου TM6SF2, πιθανότατα δεν φάνηκε κάποια συσχέτιση γιατί το δείγμα ήταν σχετικό μικρό για να αναδείξει κάποια συσχέτιση για το αλληλόμορφο A το οποίο έχει πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό.

Εν συνεχεία, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της εμφάνισης της νόσου στους μη φορείς και φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου για τους 2 πολυμορφισμούς.

Για τον πολυμορφισμό του γονιδίου PNPLA3, στους μη φορείς, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, το πρότυπο 1, το οποίο ομοιάζει με το Δυτικό πρότυπο διατροφής, συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα για τη νόσο ($p:0,043$). Ειδικότερα, αναδείχτηκε πως στους μη φορείς τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο για το πρότυπο 1 είχαν κατά 3.08 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για εμφάνιση της νόσου. Για τα άλλα πρότυπα δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Για τον ίδιο πολυμορφισμό στους φορείς, έπειτα από έλεγχο για τους ίδιους συγχυτικούς παράγοντες δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με τη νόσο για κανένα από τα πρότυπα. Επομένως, φαίνεται πως το πρότυπο 1 το οποίο ομοιάζει με το Δυτικό πρότυπο διατροφής σχετίζεται θετικά με τη νόσο στους μη φορείς αλλά όχι στους φορείς του αλληλόμορφου G του πολυμορφισμού rs7384089 του γονιδίου PNPLA3. Στη βιβλιογραφία, έχει φανεί πως στα ομόζυγα άτομα για το G αλληλόμορφο υπάρχει μεγαλύτερη προδιάθεση για αυξημένο ηπατικό λίπος όταν συνυπάρχει διατροφή υψηλή σε υδατάνθρακες και κυρίως σε σάκχαρα, κάτι που δεν παρατηρείται τόσο στα ετερόζυγα άτομα [180]. Επομένως, είναι πιθανό το πρότυπο 1 το οποίο περιέχει εκτός των άλλων σακχαρούχα αναψυκτικά σε σημαντικό βαθμό να

μην έδειξε κάποια συσχέτιση με τη νόσο στους φορείς καθώς αυτοί ήταν τόσο ομόζυγοι όσο και ετερόζυγοι για το αλληλόμορφο G, κάτι που συμπίπτει με τα δεδομένα τη βιβλιογραφίας. Επιπρόσθετα, έχει φανεί πως ο πολυμορφισμός του γονιδίου PNPLA3 διαμεσολαβεί τη NAFLD με μηχανισμό διαφορετικό από την ινσουλινοαντίσταση, την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο [4, 144], με μια πιο στοχευμένη δράση, κάτι που επίσης είναι πιθανό να επισκιάζει το ρόλο της διατροφής σε πρότυπο όπως το πρότυπο 1 το οποίο προδιαθέτει για αυτές τις κλινικές καταστάσεις. Επιπλέον, με βάση αυτό η συγκεκριμένη παρατήρηση έγινε σε φορείς οι οποίοι δεν ήταν κατηγοριοποιημένοι ως προς την ύπαρξη παχυσαρκίας, ινσουλινοαντίστασης και μεταβολικού συνδρόμου, κάτι που επίσης πιθανά έπαιξε ρόλο στην έλλειψη συσχέτισης.

Για τον πολυμορφισμό του γονιδίου TM6SF2, στους μη φορείς, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, το πρότυπο 1, το οποίο ομοιάζει με το Δυτικό πρότυπο διατροφής, συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα για τη νόσο ($p:0,041$). Ειδικότερα, αναδείχτηκε πως στους μη φορείς τα άτομα στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης σε σχέση με τα άτομα στο χαμηλότερο τεταρτημόριο για το πρότυπο 1 είχαν κατά 2.29 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για εμφάνιση της νόσου. Για τα άλλα πρότυπα δεν εμφανίστηκε κάποια συσχέτιση. Για τον ίδιο πολυμορφισμό στους φορείς, έπειτα από έλεγχο για τους ίδιους συγχυτικούς παράγοντες δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με τη νόσο για κανένα από τα πρότυπα. Επομένως, φαίνεται πως το πρότυπο 1 το οποίο ομοιάζει με το Δυτικό πρότυπο διατροφής σχετίζεται θετικά με τη νόσο στους μη φορείς αλλά όχι στους φορείς του αλληλόμορφου A του πολυμορφισμού rs58542926 του γονιδίου TM6SF2. Στη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την αλληλεπίδραση της διατροφής και του γενετικού πολυμορφισμού αυτού με τη NAFLD ώστε να γίνει προσπάθεια σύγκρισης. Ωστόσο, παρόμοια με τον πολυμορφισμό του γονιδίου PNPLA3, ο πολυμορφισμός αυτός έχει φανεί πως διαμεσολαβεί τη NAFLD με μηχανισμό διαφορετικό από την ινσουλινοαντίσταση και την παχυσαρκία [150], με μια πιο στοχευμένη δράση, κάτι που επίσης είναι πιθανό να επισκιάζει το ρόλο της διατροφής σε πρότυπο όπως το πρότυπο 1 το οποίο προδιαθέτει για αυτές τις κλινικές καταστάσεις. Επιπλέον, με βάση αυτό, και εδώ η συγκεκριμένη παρατήρηση έγινε σε φορείς οι οποίοι δεν ήταν κατηγοριοποιημένοι ως προς την ύπαρξη παχυσαρκίας και ινσουλινοαντίστασης, κάτι που επίσης

μπορεί να έπαιξε ρόλο στην έλλειψη συσχέτισης. Επιπρόσθετα, για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό, υπάρχει το κλινικό παράδοξο πως το αλληλόμορφο κινδύνου A για τη NAFLD προστατεύει από την υπερλιπιδαιμία [69], έναν παράγοντα που επίσης έχει φανεί να έχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της NAFLD σε άλλες περιπτώσεις.

Σε περαιτέρω αναλύσεις, αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων και των δεικτών εκτίμησης της NAFLD (λόγος AST/ALT, NFS, FLI και NASH Score) στους μη φορείς και φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου για τους 2 πολυμορφισμούς. Κατά τη διερεύνηση της συσχέτισης των 4 διατροφικών προτύπων με τους δείκτες λόγος AST/ALT, FLI και NASH_Score στους φορείς και μη φορείς για τους 2 πολυμορφισμούς, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Όσον αφορά το NFS, για τον πολυμορφισμό του γονιδίου PNPLA3, στους μη φορείς, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ αλλά και έπειτα από επιπρόσθετο έλεγχο και για τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με τη νόσο για κανένα από τα πρότυπα. Στους φορείς του αλληλομόρφου G, μόνο για το πρότυπο 3, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ, αύξηση κατά μια μονάδα της κατανάλωσης κατά μήκος των τεταρτημορίων του προτύπου συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με μείωση του NFS κατά 0.168 (p : 0.041). Ωστόσο, έπειτα από έλεγχο και για τα άλλα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και το PAL, η συσχέτιση έγινε μη στατιστικά σημαντική (p : 0.104). Στους φορείς, μια μείωση στην τιμή του NFS μετακινεί το δείκτη ίσως πιο κοντά προς το κατώφλι για τον αποκλεισμό της προχωρημένης ίνωσης και επακόλουθα μπορεί να έχει ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου σχετίζεται με την ιστολογική σοβαρότητα και την εξέλιξη της NAFLD σε NASH, ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [141, 145]. Το πρότυπο 3 χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε πουλερικά, αυγό και κόκκινο κρέας, τα οποία είναι πρωτεϊνούχα τρόφιμα. Όπως προαναφέρθηκε, η υψηλή πρόσληψη πρωτεΐνης δυνητικά μπορεί να έχει κάποιο προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της NAFLD η οποία αξιολογείται από το NFS. Επιπλέον, για τον πολυμορφισμό του γονιδίου PNPLA3, δεδομένα προτείνουν πως το αλληλόμορφο G οδηγεί είτε σε αυξημένη σύνθεση TG είτε σε μειωμένη υδρόλυση TG [69, 141]. Σε μελέτες οι οποίες αξιολόγησαν την επίδραση της υπερέκφρασης του αλληλομόρφου G,

παρατηρήθηκε αύξηση στην ηπατική συσσώρευση λίπους [147]. Σε αυτό το πλαίσιο, η πρωτεΐνη της διατροφής παρέχει αμινοξέα για την ένταξη των λιπαρών οξέων στις λιποπρωτεΐνες και την εξαγωγή τους από το ήπαρ, με πιθανό ρόλο στην πρόληψη της ηπατικής στεάτωσης [108]. Επομένως, η υψηλή πρόσληψη πρωτεΐνης πιθανά θα μπορούσε να εμπλέκεται με αυτό το μηχανισμό στη διαμεσολάβηση της NAFLD από τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3. Αδιαμφισβήτητα όμως, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τη πρωτεΐνης στην εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD καθώς δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα όταν έγινε έλεγχος για πολλούς συγχυτικούς παράγοντες. Επίσης, πρόκειται για μια πιο πολύ πρώιμη παρατήρηση με μικρή κλινική σημασία καθώς η μείωση του NFS ήταν μικρή.

Όσον αφορά το NFS, για τον πολυμορφισμό του γονιδίου TM6SF2, στους μη φορείς αλλά και τους φορείς του αλληλόμορφου A, έπειτα από έλεγχο για την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ αλλά και έπειτα από επιπρόσθετο έλεγχο και για τα διατροφικά πρότυπα, την υποεκτίμηση και υπερεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο για κανένα από τα πρότυπα. Είναι αντιληπτό, επομένως, πως η κατανάλωση προτύπου που χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σε πρωτεϊνούχα τρόφιμα δεν σχετίζεται με το NFS στους φορείς του αλληλόμορφου A για τον rs58542926, όπως παρατηρείται στους φορείς του αλληλόμορφου G για τον rs738409. Σχετικά αντιφατικά αποτελέσματα υπάρχουν για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs58542926 με την ιστολογία της νόσου, τη NASH και την ίνωση πιθανά λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισης του αλληλόμορφου A στον πληθυσμό [149], κάτι που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Στο πλαίσιο αυτό, φαίνεται πως δεν έχει καθοριστεί πλήρως η σχέση του πολυμορφισμού αυτού με την εξέλιξη της NAFLD η οποία αξιολογείται από το NFS. Επιπλέον, το δείγμα μας ήταν μικρό για να αναδείξει κάποια συσχέτιση για το αλληλόμορφο A.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί σημαντικό βήμα για την ανάδειξη της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της NAFLD. Επιπλέον, είναι η πρώτη μελέτη η οποία επιχείρησε να προσεγγίσει τη σχέση μεταξύ των διατροφικών προτύπων και της NAFLD σε φορείς και μη φορείς των αλληλόμορφων κινδύνου των πολυμορφισμών rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και rs58542926 του γονιδίου TM6SF2. Από την άλλη πλευρά, ο συγχρονικός σχεδιασμός της μελέτης δεν επιτρέπει την ανάδειξη αιτιολογικών συσχετίσεων ανάμεσα στα διατροφικά πρότυπα και τη NAFLD. Επιπρόσθετα, το μικρό δείγμα αποτρέπει την ισχυρή ανάδειξη αλληλεπιδράσεων

και συσχετίσεων των διατροφικών προτύπων και της NAFLD σε φορείς και μη φορείς των αλληλόμορφων κινδύνου των πολυμορφισμών rs738409 του γονιδίου PNPLA3 και rs58542926 του γονιδίου TM6SF2.

Συμπερασματικά, η μελέτη αναδεικνύει πως η υιοθέτηση ενός Δυτικού προτύπου διατροφής σχετίζεται θετικά με τη NAFLD ενώ η υιοθέτηση προτύπου πλούσιου σε πρωτεΐνη φαίνεται να είναι προστατευτική. Επιπλέον, το πρότυπο πλούσιο σε πρωτεΐνη φαίνεται να είναι προστατευτικό και για τους φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3. Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να επιβεβαιωθούν από μεγαλύτερες συγχρονικές και προοπτικές μελέτες. Αδιαμφισβήτητα, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για το ρόλο των διατροφικών προτύπων στους φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου για τους 2 πιο σημαντικούς πολυμορφισμούς για τη νόσο. Μια πιθανή κατηγοριοποίηση των φορέων σε υποομάδες όσον αφορά την παχυσαρκία, την ινσουλινοαντίσταση και το μεταβολικό σύνδρομο η οποία θα ήταν δυνατή σε μεγαλύτερο δείγμα θα μπορούσε να διευκρινίσει περαιτέρω τον ακριβή ρόλο των διατροφικών προτύπων στη NAFLD σε αυτά τα άτομα.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chalasani, N., et al., *The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases*. Hepatology, 2017.
2. Benedict, M. and X. Zhang, *Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review*. World J Hepatol, 2017. **9**(16): p. 715-732.
3. Buzzetti, E., M. Pinzani, and E.A. Tsochatzis, *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1038-48.
4. Wainwright, P. and C.D. Byrne, *Bidirectional Relationships and Disconnects between NAFLD and Features of the Metabolic Syndrome*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(3): p. 367.
5. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. Circulation, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
6. Paschos, P. and K. Paletas, *Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome*. Hippokratia, 2009. **13**(1): p. 9-19.
7. Calzadilla Bertot, L. and L.A. Adams, *The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(5).
8. Loomba, R. and A.J. Sanyal, *The global NAFLD epidemic*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(11): p. 686-90.
9. Younossi, Z.M., et al., *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. Hepatology, 2016. **64**(1): p. 73-84.
10. Zois, C.D., et al., *Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(31): p. 3944-9.
11. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
12. Romeo, S., et al., *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1461-5.
13. Anderson, E.L., et al., *The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140908.
14. Vernon, G., A. Baranova, and Z.M. Younossi, *Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults*. Aliment Pharmacol Ther, 2011. **34**(3): p. 274-85.
15. Ahmed, M.H., E.O. Abu, and C.D. Byrne, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): new challenge for general practitioners and important burden for health authorities?* Prim Care Diabetes, 2010. **4**(3): p. 129-37.
16. Kotronen, A., et al., *Liver fat in the metabolic syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(9): p. 3490-7.

17. Preiss, D. and N. Sattar, *Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations*. Clin Sci (Lond), 2008. **115**(5): p. 141-50.
18. Adams, L.A. and J.A. Talwalkar, *Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40 Suppl 1**: p. S34-8.
19. Festi, D., et al., *Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease -- availability and accuracy of non-invasive methods*. Aliment Pharmacol Ther, 2013. **37**(4): p. 392-400.
20. Angulo, P., et al., *The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD*. Hepatology, 2007. **45**(4): p. 846-54.
21. Musso, G., et al., *Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity*. Ann Med, 2011. **43**(8): p. 617-49.
22. Alkhouri, N. and A.E. Feldstein, *Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet?* Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1087-95.
23. Hyysalo, J., et al., *A population-based study on the prevalence of NASH using scores validated against liver histology*. J Hepatol, 2014. **60**(4): p. 839-46.
24. Guidelines and W.G.O.G, *Nonalcoholic fatty liver disease and non alcoholic steatohepatitis*. 2012.
25. Peverill, W., L.W. Powell, and R. Skoien, *Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 8591-638.
26. Leamy, A.K., R.A. Egnatchik, and J.D. Young, *Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(1): p. 165-74.
27. Yu, J., et al., *The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background*. Gastroenterol Res Pract, 2016. **2016**: p. 2862173.
28. Bugianesi, E., et al., *Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(17): p. 1941-51.
29. Cusi, K., *Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(2): p. 141-9.
30. Kirpich, I.A., L.S. Marsano, and C.J. McClain, *Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Biochem, 2015. **48**(13-14): p. 923-30.
31. Ferramosca, A. and V. Zara, *Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1746-55.
32. Yamaguchi, K., et al., *Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1366-74.
33. Liao, W., et al., *Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER*. J Lipid Res, 2003. **44**(5): p. 978-85.
34. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 774-88.
35. George, J. and C. Liddle, *Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and potential for nuclear receptors as therapeutic targets*. Mol Pharm, 2008. **5**(1): p. 49-59.

36. Lambert, J.E., et al., *Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2014. **146**(3): p. 726-35.
37. Postic, C. and J. Girard, *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 829-38.
38. Lewis, G.F., et al., *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2002. **23**(2): p. 201-29.
39. Johnson, A.R., J.J. Milner, and L. Makowski, *The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 218-38.
40. Barbuio, R., et al., *Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet*. J Endocrinol, 2007. **194**(3): p. 539-50.
41. Tilg, H., *The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 179-85.
42. Hasenour, C.M., E.D. Berglund, and D.H. Wasserman, *Emerging role of AMP-activated protein kinase in endocrine control of metabolism in the liver*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **366**(2): p. 152-62.
43. Pessayre, D. and B. Fromenty, *NASH: a mitochondrial disease*. J Hepatol, 2005. **42**(6): p. 928-40.
44. Begrich, K., et al., *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it*. Mitochondrion, 2006. **6**(1): p. 1-28.
45. Paradies, G., et al., *Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(39): p. 14205-18.
46. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
47. Wang, M. and R.J. Kaufman, *The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 581-97.
48. Seki, S., T. Kitada, and H. Sakaguchi, *Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases*. Hepatol Res, 2005. **33**(2): p. 132-4.
49. Schattenberg, J.M., et al., *JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice*. Hepatology, 2006. **43**(1): p. 163-72.
50. Puri, P., et al., *Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 568-76.
51. Kapoor, A. and A.J. Sanyal, *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response*. Clin Liver Dis, 2009. **13**(4): p. 581-90.
52. Strowig, T., et al., *Inflammasomes in health and disease*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 278-86.
53. Miura, K., et al., *Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 β in mice*. Gastroenterology, 2010. **139**(1): p. 323-34 e7.
54. Watanabe, A., et al., *Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(6): p. G1248-57.
55. Wree, A., et al., *NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(10): p. 1069-82.
56. Topping, D.L. and P.M. Clifton, *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1031-64.

57. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
58. Zhu, L., et al., *Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 601-9.
59. Noverr, M.C. and G.B. Huffnagle, *Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?* Trends Microbiol, 2004. **12**(12): p. 562-8.
60. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1877-87.
61. Wigg, A.J., et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2001. **48**(2): p. 206-11.
62. de Wit, N., et al., *Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(5): p. G589-99.
63. Jegatheesan, P., et al., *Effect of specific amino acids on hepatic lipid metabolism in fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Nutr, 2016. **35**(1): p. 175-82.
64. Ritze, Y., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e80169.
65. Zeybel, M., D.A. Mann, and J. Mann, *Epigenetic modifications as new targets for liver disease therapies*. J Hepatol, 2013. **59**(6): p. 1349-53.
66. Pogribny, I.P., et al., *Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet*. J Hepatol, 2009. **51**(1): p. 176-86.
67. Oliveira, C.P., et al., *Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. J Diabetes Res, 2016. **2016**: p. 4597246.
68. Marchesini, G., S. Petta, and R. Dalle Grave, *Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice*. Hepatology, 2016. **63**(6): p. 2032-43.
69. Sookoian, S. and C.J. Pirola, *Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Mol Hepatol, 2017. **23**(1): p. 1-12.
70. Schwimmer, J.B., et al., *Heritability of nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. 1585-92.
71. Gaggini, M., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease*. Nutrients, 2013. **5**(5): p. 1544-60.
72. Marchesini, G., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 450-5.
73. Petta, S., C. Muratore, and A. Craxi, *Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future*. Dig Liver Dis, 2009. **41**(9): p. 615-25.
74. Finelli, C. and G. Tarantino, *What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease?* World J Gastroenterol, 2013. **19**(6): p. 802-12.
75. Hamaguchi, M., et al., *The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease*. Ann Intern Med, 2005. **143**(10): p. 722-8.

76. Wang, Y., et al., *Association between metabolic syndrome and the development of non-alcoholic fatty liver disease*. *Exp Ther Med*, 2013. **6**(1): p. 77-84.
77. Hannah, W.N., Jr. and S.A. Harrison, *Lifestyle and Dietary Interventions in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Dig Dis Sci*, 2016. **61**(5): p. 1365-74.
78. Zelber-Sagi, S., et al., *Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study*. *Hepatology*, 2008. **48**(6): p. 1791-8.
79. Zelber-Sagi, S., J. Godos, and F. Salomone, *Lifestyle changes for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a review of observational studies and intervention trials*. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016. **9**(3): p. 392-407.
80. Wehmeyer, M.H., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease is associated with excessive calorie intake rather than a distinctive dietary pattern*. *Medicine (Baltimore)*, 2016. **95**(23): p. e3887.
81. Sathiaraj, E., et al., *A case-control study on nutritional risk factors in non-alcoholic fatty liver disease in Indian population*. *Eur J Clin Nutr*, 2011. **65**(4): p. 533-7.
82. Vilar, L., et al., *High-fat diet: a trigger of non-alcoholic steatohepatitis? Preliminary findings in obese subjects*. *Nutrition*, 2008. **24**(11-12): p. 1097-102.
83. Zelber-Sagi, S., V. Ratziu, and R. Oren, *Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(29): p. 3377-89.
84. Musso, G., et al., *Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2003. **37**(4): p. 909-16.
85. Westerbacka, J., et al., *Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(5): p. 2804-9.
86. Wang, D., Y. Wei, and M.J. Pagliassotti, *Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis*. *Endocrinology*, 2006. **147**(2): p. 943-51.
87. Ferolla, S.M., et al., *Dietary patterns in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013. **68**(1): p. 11-7.
88. Zelber-Sagi, S., et al., *Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study*. *J Hepatol*, 2007. **47**(5): p. 711-7.
89. Zivkovic, A.M., J.B. German, and A.J. Sanyal, *Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(2): p. 285-300.
90. Cortez-Pinto, H., et al., *How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? Clin Nutr*, 2006. **25**(5): p. 816-23.
91. Mouzaki, M. and J.P. Allard, *The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Gastroenterol*, 2012. **46**(6): p. 457-67.
92. Clarke, S.D., *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(4): p. G865-9.
93. Parker, H.M., et al., *Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis*. *J Hepatol*, 2012. **56**(4): p. 944-51.
94. He, X.X., et al., *Effectiveness of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *PLoS One*, 2016. **11**(10): p. e0162368.

95. Machado, R.M., et al., *Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content*. J Nutr, 2010. **140**(6): p. 1127-32.
96. Enjoji, M., et al., *Nutrition and nonalcoholic Fatty liver disease: the significance of cholesterol*. Int J Hepatol, 2012. **2012**: p. 925807.
97. Toshimitsu, K., et al., *Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis*. Nutrition, 2007. **23**(1): p. 46-52.
98. Erhardt, A., et al., *Plasma levels of vitamin E and carotenoids are decreased in patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)*. Eur J Med Res, 2011. **16**(2): p. 76-8.
99. Schugar, R.C. and P.A. Crawford, *Low-carbohydrate ketogenic diets, glucose homeostasis, and nonalcoholic fatty liver disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(4): p. 374-80.
100. Hu, T., et al., *Effects of low-carbohydrate diets versus low-fat diets on metabolic risk factors: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials*. Am J Epidemiol, 2012. **176** Suppl 7: p. S44-54.
101. Godos, J., et al., *Mediterranean diet and nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms of protection*. Int J Food Sci Nutr, 2017. **68**(1): p. 18-27.
102. Valtuena, S., et al., *Dietary glycemic index and liver steatosis*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 136-42; quiz 268-9.
103. Yasutake, K., et al., *Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1756-67.
104. Jegatheesan, P. and J.P. De Bandt, *Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism*. Nutrients, 2017. **9**(3).
105. Chiu, S., et al., *Effect of fructose on markers of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials*. Eur J Clin Nutr, 2014. **68**(4): p. 416-23.
106. Bezerra Duarte, S.M., et al., *Hypocaloric high-protein diet improves clinical and biochemical markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Nutr Hosp, 2014. **29**(1): p. 94-101.
107. Arciero, P.J., et al., *Moderate protein intake improves total and regional body composition and insulin sensitivity in overweight adults*. Metabolism, 2008. **57**(6): p. 757-65.
108. Leclercq, I.A. and Y. Horsmans, *Nonalcoholic fatty liver disease: the potential role of nutritional management*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**(6): p. 766-73.
109. Blouet, C., et al., *The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control*. J Nutr, 2006. **136**(7): p. 1849-54.
110. Sato, K., et al., *Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Nutrition, 2015. **31**(7-8): p. 923-30.
111. Corbin, K.D. and S.H. Zeisel, *Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(2): p. 159-65.
112. Fischer, L.M., et al., *Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(5): p. 1275-85.
113. Zelber-Sagi, S., F. Salomone, and L. Mlynarsky, *The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms*. Liver Int, 2017. **37**(7): p. 936-949.

114. Jiang, X., et al., *Cyanidin-3-O-beta-glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **90**(2): p. 135-44.
115. Sakata, R., et al., *Green tea with high-density catechins improves liver function and fat infiltration in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients: a double-blind placebo-controlled study*. *Int J Mol Med*, 2013. **32**(5): p. 989-94.
116. Powell, L.M. and B.T. Nguyen, *Fast-food and full-service restaurant consumption among children and adolescents: effect on energy, beverage, and nutrient intake*. *JAMA Pediatr*, 2013. **167**(1): p. 14-20.
117. Kechagias, S., et al., *Fast-food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects*. *Gut*, 2008. **57**(5): p. 649-54.
118. Pereira, M.A., et al., *Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis*. *Lancet*, 2005. **365**(9453): p. 36-42.
119. Abid, A., et al., *Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome*. *J Hepatol*, 2009. **51**(5): p. 918-24.
120. Assy, N., et al., *Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors*. *Can J Gastroenterol*, 2008. **22**(10): p. 811-6.
121. Softic, S., D.E. Cohen, and C.R. Kahn, *Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease*. *Dig Dis Sci*, 2016. **61**(5): p. 1282-93.
122. Jaruvongvanich, V., et al., *Hyperuricemia is associated with nonalcoholic fatty liver disease activity score in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2017. **29**(9): p. 1031-1035.
123. Mellen, P.B., T.F. Walsh, and D.M. Herrington, *Whole grain intake and cardiovascular disease: a meta-analysis*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008. **18**(4): p. 283-90.
124. Nettleton, J.A., et al., *Interactions of dietary whole-grain intake with fasting glucose- and insulin-related genetic loci in individuals of European descent: a meta-analysis of 14 cohort studies*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(12): p. 2684-91.
125. Cook, L.T., et al., *Vegetable consumption is linked to decreased visceral and liver fat and improved insulin resistance in overweight Latino youth*. *J Acad Nutr Diet*, 2014. **114**(11): p. 1776-83.
126. Chan, R., et al., *Diet-Quality Scores and Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population Study Using Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0139310.
127. Yang, Y., et al., *Increased intake of vegetables, but not fruit, reduces risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(5): p. 1031-42.
128. Micha, R., S.K. Wallace, and D. Mozaffarian, *Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis*. *Circulation*, 2010. **121**(21): p. 2271-83.
129. Song, Y., et al., *A prospective study of red meat consumption and type 2 diabetes in middle-aged and elderly women: the women's health study*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(9): p. 2108-15.
130. Hu, F.B., *Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(1): p. 3-9.

131. Oddy, W.H., et al., *The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence*. Am J Gastroenterol, 2013. **108**(5): p. 778-85.
132. Yang, C.Q., et al., *Dietary Patterns Modulate the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Chinese Adults*. Nutrients, 2015. **7**(6): p. 4778-91.
133. Jia, Q., et al., *Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults*. Eur J Clin Nutr, 2015. **69**(8): p. 914-21.
134. Adriano, L.S., et al., *Healthy dietary pattern is inversely associated with non-alcoholic fatty liver disease in elderly*. Br J Nutr, 2016. **115**(12): p. 2189-95.
135. Katsagoni, C.N., et al., *A "healthy diet-optimal sleep" lifestyle pattern is inversely associated with liver stiffness and insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Appl Physiol Nutr Metab, 2017. **42**(3): p. 250-256.
136. European Association for the Study of the L., D. European Association for the Study of, and O. European Association for the Study of, *EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease*. Diabetologia, 2016. **59**(6): p. 1121-40.
137. Kontogianni, M.D., et al., *Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Nutr, 2014. **33**(4): p. 678-83.
138. Bozzetto, L., et al., *Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2012. **35**(7): p. 1429-35.
139. Ryan, M.C., et al., *The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2013. **59**(1): p. 138-43.
140. Hashemi Kani, A., et al., *Dietary Quality Indices and Biochemical Parameters Among Patients With Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)*. Hepat Mon, 2013. **13**(7): p. e10943.
141. Rowell, R.J. and Q.M. Anstee, *An overview of the genetics, mechanisms and management of NAFLD and ALD*. Clin Med (Lond), 2015. **15 Suppl 6**: p. s77-82.
142. Umamo, G.R., M. Martino, and N. Santoro, *The Association between Pediatric NAFLD and Common Genetic Variants*. Children (Basel), 2017. **4**(6).
143. Dongiovanni, P. and L. Valenti, *A Nutrigenomic Approach to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
144. Sookoian, S. and C.J. Pirola, *Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(6): p. 1883-94.
145. Xu, R., et al., *Association between patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease: a HuGE review and meta-analysis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9284.
146. He, S., et al., *A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6706-15.
147. Li, J.Z., et al., *Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis*. J Clin Invest, 2012. **122**(11): p. 4130-44.
148. Scott, L.J., et al., *A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1341-5.
149. Chen, L.Z., et al., *TM6SF2 E167K Variant, a Novel Genetic Susceptibility Variant, Contributing to Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. J Clin Transl Hepatol, 2015. **3**(4): p. 265-70.

150. Kozlitina, J., et al., *Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Genet, 2014. **46**(4): p. 352-6.
151. Pirola, C.J. and S. Sookoian, *The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis*. Hepatology, 2015. **62**(6): p. 1742-56.
152. Sookoian, S. and C.J. Pirola, *Meta-analysis of the influence of TM6SF2 E167K variant on Plasma Concentration of Aminotransferases across different Populations and Diverse Liver Phenotypes*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 27718.
153. Wang, X., et al., *Additive Effects of the Risk Alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in a Chinese Population*. Front Genet, 2016. **7**: p. 140.
154. Mahdessian, H., et al., *TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(24): p. 8913-8.
155. Sookoian, S., et al., *Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity*. Hepatology, 2015. **61**(2): p. 515-25.
156. Smagris, E., et al., *Inactivation of Tm6sf2, a Gene Defective in Fatty Liver Disease, Impairs Lipidation but Not Secretion of Very Low Density Lipoproteins*. J Biol Chem, 2016. **291**(20): p. 10659-76.
157. Beer, N.L., et al., *The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4081-8.
158. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of, H., et al., *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.
159. Willer, C.J., et al., *Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 161-9.
160. Hernaez, R., et al., *Association between variants in or near PNPLA3, GCKR, and PPP1R3B with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(9): p. 1183-1190 e2.
161. Petta, S., et al., *Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87523.
162. Zain, S.M., Z. Mohamed, and R. Mohamed, *Common variant in the glucokinase regulatory gene rs780094 and risk of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis*. J Gastroenterol Hepatol, 2015. **30**(1): p. 21-7.
163. Mancina, R.M., et al., *The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent*. Gastroenterology, 2016. **150**(5): p. 1219-1230 e6.
164. Krawczyk, M., et al., *Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study*. J Lipid Res, 2017. **58**(1): p. 247-255.
165. Agius, L., *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. Biochem J, 2008. **414**(1): p. 1-18.

166. Burger, M., et al., *Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity despite close relationship to acyl protein thioesterases*. J Lipid Res, 2012. **53**(1): p. 43-50.
167. Speliotes, E.K., et al., *Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits*. PLoS Genet, 2011. **7**(3): p. e1001324.
168. Speeckaert, M., et al., *Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism*. Clin Chim Acta, 2006. **372**(1-2): p. 33-42.
169. Delanote, V., J. Vandekerckhove, and J. Gettemans, *Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(7): p. 769-79.
170. Adams, L.A., et al., *Association between liver-specific gene polymorphisms and their expression levels with nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 590-600.
171. Targher, G., et al., *Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007. **17**(7): p. 517-24.
172. Takiishi, T., et al., *Vitamin D and diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(2): p. 419-46, table of contents.
173. Luo, W., et al., *Identification of polymorphisms associated with hypertriglyceridemia and prolonged survival induced by bexarotene in treating non-small cell lung cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(6): p. 2303-11.
174. Valenti, L., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 274-80.
175. Wang, J.K., et al., *Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism at sites -308 and -238 with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(4): p. 670-6.
176. Petersen, K.F., et al., *Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18273-7.
177. Niu, T.H., et al., *Lack of association between apolipoprotein C3 gene polymorphisms and risk of nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese Han population*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(13): p. 3655-62.
178. Hyysalo, J., et al., *Genetic variation in PNPLA3 but not APOC3 influences liver fat in non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(5): p. 951-6.
179. Goran, M.I., R. Walker, and H. Allayee, *Genetic-related and carbohydrate-related factors affecting liver fat accumulation*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(4): p. 392-6.
180. Davis, J.N., et al., *Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption*. Am J Clin Nutr, 2010. **92**(6): p. 1522-7.
181. Nobili, V., et al., *Influence of dietary pattern, physical activity, and I148M PNPLA3 on steatosis severity in at-risk adolescents*. Genes Nutr, 2014. **9**(3): p. 392.
182. Sevastianova, K., et al., *Genetic variation in PNPLA3 (adiponutrin) confers sensitivity to weight loss-induced decrease in liver fat in humans*. Am J Clin Nutr, 2011. **94**(1): p. 104-11.

183. Santoro, N., et al., *Hepatic fat accumulation is modulated by the interaction between the rs738409 variant in the PNPLA3 gene and the dietary omega6/omega3 PUFA intake*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37827.
184. Huang, Y., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37085-93.
185. Scorletti, E., et al., *Treating liver fat and serum triglyceride levels in NAFLD, effects of PNPLA3 and TM6SF2 genotypes: Results from the WELCOME trial*. J Hepatol, 2015. **63**(6): p. 1476-83.
186. Nobili, V., et al., *The I148M variant of PNPLA3 reduces the response to docosahexaenoic acid in children with non-alcoholic fatty liver disease*. J Med Food, 2013. **16**(10): p. 957-60.
187. Wojcik, C., et al., *Modulation of adipocyte differentiation by omega-3 polyunsaturated fatty acids involves the ubiquitin-proteasome system*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(4): p. 590-9.
188. Mancina, R.M., et al., *Paradoxical dissociation between hepatic fat content and de novo lipogenesis due to PNPLA3 sequence variant*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(5): p. E821-5.
189. Miele, L., et al., *A case-control study on the effect of metabolic gene polymorphisms, nutrition, and their interaction on the risk of non-alcoholic fatty liver disease*. Genes Nutr, 2014. **9**(2): p. 383.
190. Spencer, M.D., et al., *Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 976-86.
191. Phuis, M.G., et al., *Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring*. Acta Physiol (Oxf), 2014. **210**(1): p. 215-27.
192. Roberts, M.D., et al., *Western diet-induced hepatic steatosis and alterations in the liver transcriptome in adult Brown-Norway rats*. BMC Gastroenterol, 2015. **15**: p. 151.
193. Tallino, S., et al., *Nutrigenomics analysis reveals that copper deficiency and dietary sucrose up-regulate inflammation, fibrosis and lipogenic pathways in a mature rat model of nonalcoholic fatty liver disease*. J Nutr Biochem, 2015. **26**(10): p. 996-1006.
194. Adi, N., et al., *High protein/fish oil diet prevents hepatic steatosis in NONcNZO10 mice; association with diet/genetics-regulated micro-RNAs*. J Diabetes Metab, 2016. **7**(6).
195. Tan, Y., et al., *Green tea polyphenols ameliorate non-alcoholic fatty liver disease through upregulating AMPK activation in high fat fed Zucker fatty rats*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(21): p. 3805-3814.
196. Dimitriou, M., et al., *Exclusive olive oil consumption has a protective effect on coronary artery disease; overview of the THISEAS study*. Public Health Nutr, 2016. **19**(6): p. 1081-7.
197. Goldberg, G.R., et al., *Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology: 1. Derivation of cut-off limits to identify under-recording*. Eur J Clin Nutr, 1991. **45**(12): p. 569-81.
198. Black, A.E., *Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake:basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(9): p. 1119-30.
199. S.A., K., et al., *Development, reliability and validity of a physical activity questionnaire for estimating energy expenditure in Greek adults*. Science & Sports, 2016. **31**(3): p. e47-e53.

