ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

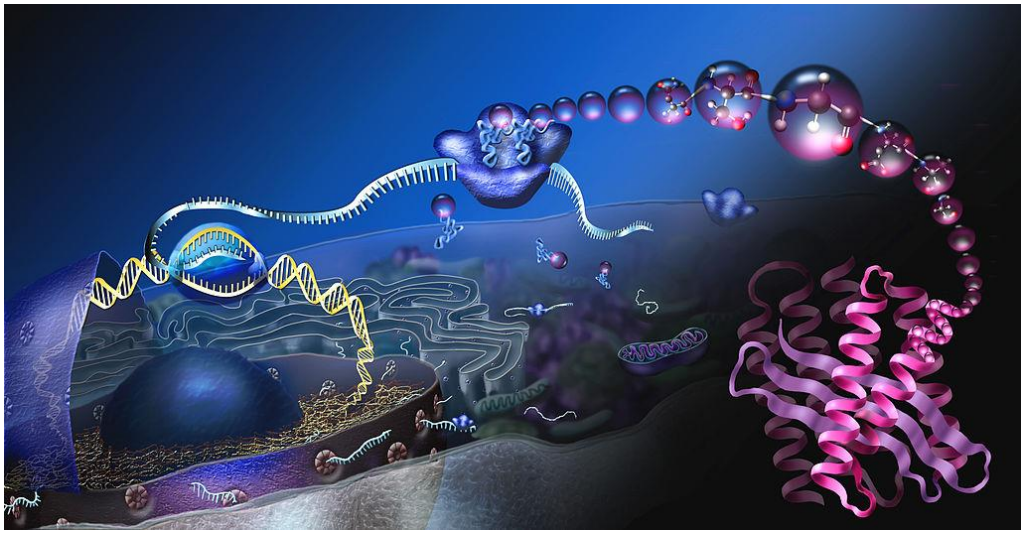
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Μοριακοί βιοδείκτες μετά από παρέμβαση με μαστίχα σε ασθενείς με NASH

Διπλωματική εργασία

Δαργινίδου Κατερίνα



Αθήνα, 2019

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Δεδούσης

Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ανδριάνα Καλιώρα

Επίκουρη Καθηγήτρια στη Διατροφή του Ανθρώπου και Τρόφιμα
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γεώργιος Παπανικολάου

Επίκουρος καθηγητής στην Παθοφυσιολογία – Γενετική του Ανθρώπου
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Δαργινίδου Κατερίνα

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπη αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει 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

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Γεώργιο Δεδούση για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη καθοδήγησή του και την εκτίμηση που μου έδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ επίσης την κα Ανδριάννα Καλιώρα για τη βοήθειά της καθ΄ όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και τον κο Γιώργο Παπανικολάου που δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ από καρδιάς, την υποψήφια διδάκτορα Χαρά Αμερικάνου για την πολύτιμη βοήθειά της και τις συμβουλές που μου έδινε πάντα πρόθυμα και φιλικά παρά το φόρτο της εργασίας της.

Ευχαριστώ επίσης, την οικογένειά μου Νίκο, Δημήτρη και Κώστα, που χωρίς την αγάπη και την υπομονή τους δε θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω αυτή την εργασία. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην πεθερά μου Κυριακή, που πιστεύει σε μένα όσο κανείς, με στηρίζει με όλους τους δυνατούς τρόπους και το λιγότερο που μπορώ να κάνω είναι να της αφιερώσω αυτή την εργασία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 8

ABSTRACT 9

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ 11

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ 12

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ 14

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 16

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ NAFLD 16

1.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ 18

1.3 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ 18

1.4 LEAN NAFLD 20

1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 21
1.5.1. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΟΙ 21
1.5.2.ΚΛΙΝΙΚΟΙ 22
1.5.3 ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ - ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ 25
1.5.4. ΓΟΝΙΔΙΑ 26

1.6 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ 27

1.7 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ 30
1.7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ MicroRNAs 31
1.7.2.ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ miRNAs 31
1.7.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ 33

1.7.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ NAFLD 33

1.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ 38
1.8.1. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ 38
1.8.2.ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ 39
1.8.3 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ 39

1.9 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ NAFLD 39
1.9.1. ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ 39
1.9.2.ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ 40

1.10 ΜΑΣΤΙΧΑ 41
1.10.1. Η ΠΟΛΥΤΙΜΗ ΡΗΤΙΝΗ 41
1.10.2.ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ 42

2. ΣΚΟΠΟΣ 43

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 44

3.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 44

3.2. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ - ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ 44

3.3 ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ MAST4HEALTH 46

3.4 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΜΜΟΡΦΩΣΗΣ 46

3.5 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ 46

3.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ NAFLD 47

3.7 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ microRNAs 48

3.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 50

3.9 ΒΙΟΗΘΙΚΗ 50

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 51

4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 51

4.2 ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ miRNA-21 ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ NAFLD ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ MAST4HEALTH 55

4.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ miRNA – 21 ΜΕ ΤΑ ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ NAFLD ΚΑΙ MAST4HEALTH 57

4.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ miRNA- 21 ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ MAST4HEALTH..... 60

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 62

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) είναι μία σύνθετη μεταβολική διαταραχή. Λόγω της αύξησης του επιπολασμού της παγκοσμίως, αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές η κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης και εξέλιξης της νόσου. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί παρέχουν μια νέα προοπτική στην παθογένεση και διαχείριση της NAFLD. Το miRNA -21 επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον ηπατικό μεταβολισμό και την ανάπτυξη φλεγμονής στο ήπαρ. Η μαστίχα Χίου είναι μια φυσική, αρωματική ρητίνη που περιέχει πληθώρα βιοδραστικών συστατικών όπως φαινολικές ενώσεις, φυτοστερόλες και τερπένια με επιβεβαιωμένη αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και καρδιοπροστατευτική δράση.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να συγκριθούν τα επίπεδα του miRNA-21 σε ασθενείς με NAFLD/NASH με βάση το στάδιο της νόσου και να συσχετιστούν με βιοχημικές, ανθρωπομετρικές και κλινικές παραμέτρους. Σε δεύτερο επίπεδο σκοπός είναι να αξιολογηθούν οι αλλαγές στα επίπεδα του miRNA-21 στο πλάσμα ασθενών με NAFLD/NASH, μετά από διατροφική παρέμβαση με φυσικό συμπλήρωμα μαστίχας Χίου.

Μεθοδολογία: Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιολογήθηκαν παράμετροι 148 ατόμων. 83 ήταν εθελοντές της μελέτης MAST4HEALTH και 65 εθελοντές της μελέτης NAFLD. Η διάγνωση της νόσου έγινε μέσω μαγνητικής τομογραφίας ήπατος για τους εθελοντές της μελέτης MAST4HEALTH και με τη χρήση υπερηχογραφήματος άνω κοιλίας για τους εθελοντές της μελέτης NAFLD. Για τη μέτρηση των επιπέδων του miRNA -21 στο πλάσμα των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Για την εξέταση της συσχέτισης των βιοχημικών δεικτών, των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών και του NFS score με τα επίπεδα του miRNA -21 πραγματοποιήθηκαν γραμμικές παλινδρομήσεις. 38 άτομα της μελέτης MAST4HEALTH τυχαιοποιήθηκαν σε 2 ομάδες (Placebo και Verum). Σε κάθε ομάδα (A= 17 άτομα, B=21 άτομα) χορηγήθηκε το σκεύασμα σε δόση των 2,1γρ ημερησίως για 6 μήνες και μετρήθηκαν τα επίπεδα του miRNA -21 πριν και μετά την παρέμβαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS statistics έκδοση 21.0.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του miRNA -21 με τα επίπεδα της ινσουλίνης και του HOMA-IR, όμως η σχέση χάθηκε μετά από διόρθωση για την ηλικία, το φύλο και το BMI. Τα επίπεδα του miRNA -21 σχετίστηκαν θετικά με το BMI και το NFS score σε 13 άτομα της μελέτης NAFLD με βαθμό υπερήχου 3. Η στατιστική

σημαντικότητα δε διατηρήθηκε μετά από προσαρμογή με συγχυτικούς παράγοντες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του miRNA -21 σε καμία απ' τις 2 ομάδες (Α και Β) της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση.

Συμπέρασμα: Στους ασθενείς με NAFLD/NASH δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του miRNA -21 με τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και με το NFS score. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε ήταν μεταξύ των επιπέδων του miRNA -21 και των επιπέδων της ινσουλίνης και του HOMA-IR. Η κλινική μελέτη φάνηκε να μην έχει κάποια επίδραση στα επίπεδα του miRNA -21 σε καμία από τις 2 ομάδες της παρέμβασης. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος για την περαιτέρω διερεύνηση των αποτελεσμάτων.
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: NAFLD, miRNA -21, ΜΑΣΤΙΧΑ, MAST4HEALTH

ABSTRACT

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a complex metabolic disorder. Its prevalence is increasing worldwide and it's a challenge for researchers to understand the mechanisms underlying the development and evolution of the disease. Epigenetic mechanisms provide a new perspective on the pathogenesis and management of NAFLD. mRNA-21 affects the expression of genes related to liver metabolism and the development of inflammation in the liver. Chios mastic is a natural, aromatic resin that contains a multitude of bioactive ingredients such as phenolic compounds, phytosterols and terpenes with confirmed antimicrobial, anticancer and cardioprotective activity.

Aim: The purpose of this thesis is to evaluate miRNA-21 levels in patients with NAFLD / NASH based on disease level and to assess disease-related anthropometric, biochemical and clinical parameters in patients with NAFLD / NASH and their correlation with the levels of miRNA-21. The second aim is to evaluate the effect of a clinical trial with natural supplement of Chios Mastic on the levels of miRNA-21.

Methods: In this diploma thesis, parameters of 148 persons were evaluated. 83 were volunteers of the study MAST4HEALTH and 65 volunteers of the NAFLD study. Magnetic resonance imaging was performed on volunteers of MAST4HEALTH study and upper abdomen ultrasound on volunteers of the NAFLD study. The measurement of the levels of miRNA-21 in the

participant's plasma was conducted with real time PCR. To examine the correlation of various biochemical, anthropometric factors and NFS score to the miRNA-21 levels linear regressions was conducted. 38 subjects of the MAST4HEALTH study were randomized to 2 groups (Placebo and Verum). In each group (A= 17 people, B = 21 people) each group received the formulation at a dose of 2.1 g per day for 6 months and the miRNA-21 levels were measured before and after intervention. The statistical analysis was conducted with the program SPSS statistics version 21.0

Results: A correlation of miRNA-21 levels with insulin and HOMA-IR levels was observed, but the relation was lost after correction for several covariates, including age, sex and BMI. miRNA-21 levels were positively correlated with BMI and NFS score in 13 subjects in the NAFLD study with ultrasound grade 3. Statistical significance was not maintained after adjustment for confounders. There was no statistically significant difference in miRNA-21 expression levels in either of the 2 groups (A and B) of the MAST4HEALTH study before and after the intervention.

Conclusion: In patients with NAFLD/NASH there is no statistically significant correlation of miRNA-21 levels with the anthropometric characteristics and with NFS score. The only statistically significant correlation observed was between miRNA-21 levels and insulin and HOMA-IR levels. The results of the clinical study indicated that miRNA-21 levels were not affected in any of the 2 groups of intervention. More and larger studies are needed in order to further investigate our results.
KEYWORDS: NAFLD, miRNA -21, CHIOS MASTIC, MAST4HEALTH

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Η εξέλιξη της NAFLD 17

Εικόνα 2. Ο Παγκόσμιος Επιπολασμός της NAFLD 19

Εικόνα 3. Εμφάνιση της NAFLD στην παχυσαρκία και το διαβήτη τύπου 2 23

Εικόνα 4. Παθογένεση της NAFLD 29

Εικόνα 5. Βιοσύνθεση των miRNAs 32

Εικόνα 6. miRNAs που συμμετέχουν στα στάδια της NAFLD 34

Εικόνα 7. miRNA - 21 35

Εικόνα 8. Οι στόχοι του miRNA - 21 που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την καρκινογένεση στο ήπαρ 37

Εικόνα 9. Το μαστιχόδεντρο 41

Εικόνα 10. Το miRNA - 21 στοχεύει το γονίδιο FoxO1 και την πρωτεΐνη PTEN 64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Αιτίες δευτεροπαθούς εναπόθεσης λίπους στο ήπαρ 16

Πίνακας 2. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά μελέτης NAFLD 52

Πίνακας 3. Βιοχημικά χαρακτηριστικά μελέτης NAFLD 53

Πίνακας 4. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά μελέτης MAST4HEALTH 54

Πίνακας 5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά μελέτης MAST4HEALTH 54

Πίνακας 6. Τα επίπεδα του δείκτη NFS score στις ομάδες M4H και LLS της μελέτης MAST4HEALTH 55

Πίνακας 7. Σύγκριση των επιπέδων του miRNA - 21 στις 4 ομάδες της μελέτης NAFLD με βάση τους βαθμούς του υπερήχου (0, 1, 2 και 3) 55

Πίνακας 8. Σύγκριση των επιπέδων του miRNA - 21 των ατόμων με βαθμούς υπερήχου 0 και 1 (Ομάδα Control) και αυτών με βαθμούς υπερήχου 2 και 3 (Ομάδα Cases) της μελέτης NAFLD 56

Πίνακας 9. Σύγκριση των επιπέδων του miRNA - 21 μεταξύ των ομάδων M4H και LLS της μελέτης MAST4HEALTH 56

Πίνακας 10. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH ανάλογα με την κατηγορία του NFS score 57

Πίνακας 11. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH 57

Πίνακας 12. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με τις βιοχημικές παραμέτρους στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH 58

Πίνακας 13. Γραμμική παλινδρόμηση ελέγχου επίδρασης του miRNA - 21 (ανεξάρτητη μεταβλητή) στο επίπεδο της % μεταβολής των τιμών της ινσουλίνης και του HOMA -IR 58

Πίνακας 14. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με το NFS score στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH 59

Πίνακας 15. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με το BMI και το NFS score στα άτομα με βαθμό υπερήχου 3 (σοβαρή λιπώδης διήθηση) 59

Πίνακας 16. Γραμμική παλινδρόμηση ελέγχου επίδρασης του miRNA - 21 (ανεξάρτητη μεταβλητή) στο επίπεδο της % μεταβολής των τιμών του BMI και του NFS score 60

Πίνακας 17. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στις ομάδες A και B της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση 60

Πίνακας 18. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στα άτομα με LIF score < 2,25 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση 61

Πίνακας 19. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στα άτομα με LIF score > 2,25 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση 61

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BMI	Body Mass Index
FIB-4	Fibrosis-4
FOXO1	Forkhead box protein O1
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HMGCR	3-Hydroxy3-Methylglutaryl-Coa Reductase
HOMA-IR	Homeostatic model assessment-Insulin Resistance
IL-6	Interleukin 6
LDL	Low Density Lipoprotein
LIF	Liver Inflammation and Fibrosis
LPS	Lipopolysaccharide
mRNA	Messenger RNA
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NAS	NAFLD Activity Score
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NFS	NAFLD Fibrosis Score
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	Serum glutamic-pyruvic transaminase
TC	Total Cholesterol
TG	Total Triglycerides
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily 2
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha

TNF-β	Tumor Necrosis Factor beta
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
WHR	Waist to hip ratio
MX	Μαστίχα Χίου

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ NAFLD

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) ορίζεται ως η συσσώρευση λίπους υπό τη μορφή τριγλυκεριδίων μέσα στο κυτταρόπλασμα των ηπατικών κυττάρων σε ποσοστό > 5% του βάρους του ήπατος αποδεδειγμένη είτε με απεικόνιση ή με βιοψία (1). Επιπλέον, ο ορισμός απαιτεί την απουσία δευτεροπαθούς εναπόθεσης λίπους στο ήπαρ (2) (Πίνακας 1):

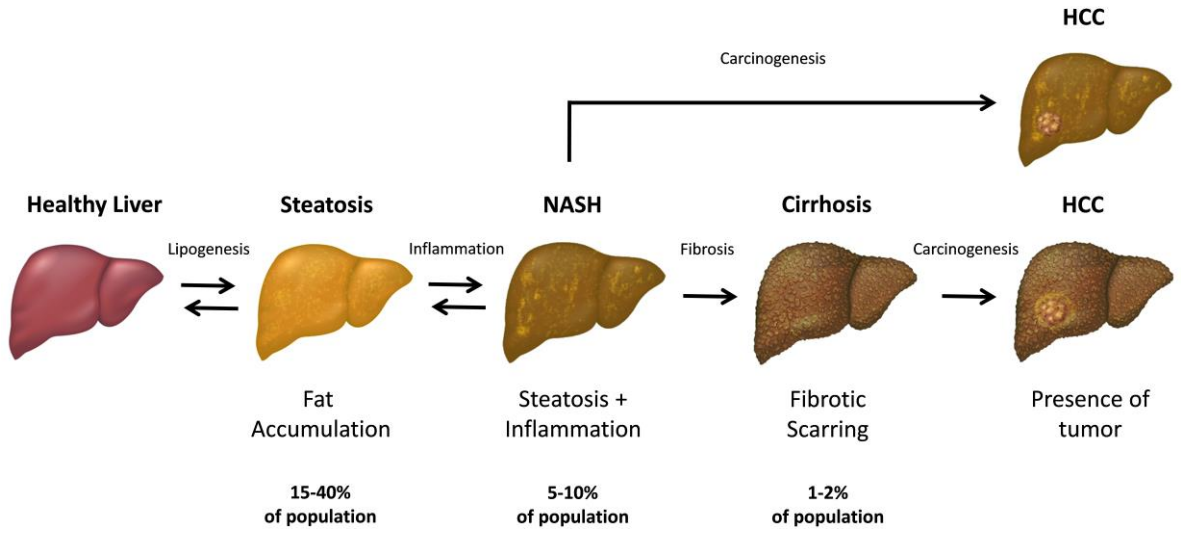
i. είτε λόγω σημαντικής κατανάλωσης αλκοόλ
ii. είτε χρήσης φαρμάκων που προκαλούν στεάτωση
iii. είτε λόγω κληρονομικών μεταβολικών διαταραχών

Πίνακας 1. Αιτίες δευτεροπαθούς εναπόθεσης λίπους στο ήπαρ

Κατηγορίες	Περιγραφή
Πρόσληψη αλκοόλ	<30 γρ την ημέρα στον άνδρα και <20 γρ στη γυναίκα
Ιογενής ηπατίτιδα	Ορολογική αιτία για λοίμωξη απ' τον ιό της ηπατίτιδας Β ή C
Στεαγονικά φάρμακα	Βαλπροϊκό οξύ, ταμοξιφαίνη, τετρακυκλίνη, αμιωδαρόνη, μεθοτρεξάτη, μιπομερένη κλπ.
Αυτοάνοση διαταραχή	Αυτοάνοση ηπατίτιδα, κοιλιοκάκη
Κληρονομικές ηπατικές παθήσεις	Αιμοχρωμάτωση, ασθένεια Wilson, ανεπάρκεια α1- αντιθρυψίνης, λιποδυστροφία
Άλλες	Υποβεταλιποπρωτεϊναιμία, χειρουργικά τροποποιημένη ανατομία του εντέρου, εκτομή του παγκρέατος κ.α.

Η περιορισμένη κατανάλωση αλκοόλ για τους άντρες ορίζεται ως λιγότερο ή ίσο των 30 γρ/ ημέρα και για τις γυναίκες 20 γρ / ημέρα (3).

Εικόνα 1. Η εξέλιξη της NAFLD



Η NAFLD είναι μια αργά εξελισσόμενη κατάσταση και περιλαμβάνει ένα φάσμα διαταραχών του ήπατος, από την καλοήθη ηπατική στεάτωση (NAFL) που είναι συνήθως ασυμπτωματική και την πιο σοβαρή μορφή της νόσου τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) (1). Η NASH είναι μια προοδευτική μορφή της NAFLD και χαρακτηρίζεται από στεάτωση, ηπατοκυτταρική φλεγμονή, διογκωμένα ηπατοκύτταρα και σχεδόν πάντα ίνωση (4). Καθώς η NASH εξελίσσεται τα ηπατοκύτταρα, αντικαθίστανται από ιστούς κολλαγόνου τύπου (I) που παράγονται από αστεροειδή κύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται από τραυματισμό του ήπατος και παίζουν ρόλο στην αναγέννησή του (5). Η NASH οδηγείται προοδευτικά σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) (6).

Εκτιμάται ότι το 10 - 15 % των ατόμων με NAFL θα αναπτύξουν NASH και 25 % των ατόμων με NASH θα οδηγηθούν σε ίνωση (7). Η NASH με ήπια ηπατική φλεγμονή μπορεί επίσης να εξελιχθεί σε ηπατικό καρκίνο χωρίς όμως να προηγηθούν τα στάδια της ίνωσης και της κίρρωσης (8) (Εικόνα 1 Front. Physiol. 2018; 9:1256.)

1.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η NAFLD είναι μια σιωπηλή νόσος που εξελίσσεται ασυμπτωματικά, μέχρις ότου αρχίσει η αποικοδόμηση του ήπατος (9). Ωστόσο μερικές φορές μπορεί να εμφανιστούν σημεία και συμπτώματα όπως αλωπεκία, υπόταση και περιφερειακό οίδημα. Τα πιο διαδεδομένα αρχικά συμπτώματα είναι η κόπωση και η κακουχία (10). Η ηπατοσπληνομεγαλία παρουσιάζεται σε ποσοστό έως και 50 % των ασθενών. Ωστόσο, καθώς η ασθένεια προχωρά, το ήπαρ συρρικνώνεται σε μέγεθος, ενώ η σπλήνα συνεχίζει να μεγεθύνεται (11). Η μελανίζουσα ακάνθωση αποτελεί σπάνιο εύρημα και συνήθως απαντάται σε παχύσαρκους ασθενείς με σοβαρού βαθμού αντίσταση στην ινσουλίνη. Η παρουσία ίκτερου, ηπατικών παλμών, αραχνοειδών ευρυαγγειών ή ασκίτη υποδηλώνει την παρουσία κίρρωσης. Επίσης συχνή είναι η συνύπαρξη NAFLD και αποφρακτικής άπνοιας ύπνου, με αδιευκρίνιστο παθοφυσιολογικό μηχανισμό.

1.3 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ

Ο επιπολασμός της NAFLD (4 - 46%) ποικίλει ανά τον κόσμο με βάση τα δημογραφικά στοιχεία, τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους και την επιδημιολογία. Ο ορισμός της NAFLD απαιτεί την πολύ μικρή κατανάλωση αλκοόλ, κάτι που είναι δύσκολο να αξιολογηθεί, ώστε να διαχωριστεί απ' την αλκοολική λιπώδη νόσο (AFL). Οι περισσότερες μελέτες δε βασίζουν τα αποτελέσματα τους στην βιοψία που θεωρείται η καλύτερη μέθοδος για τη διάγνωση της νόσου, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού των επιδημιολογικών ερευνών προέρχεται από ασθενείς νοσοκομείων (12, 13). Για τους λόγους αυτούς φαίνεται να υποτιμάται η παρουσία της NASH στα πρώτα στάδια της νόσου και να υπερεκτιμάται η εμφάνιση της NAFLD στο γενικό πληθυσμό (14).

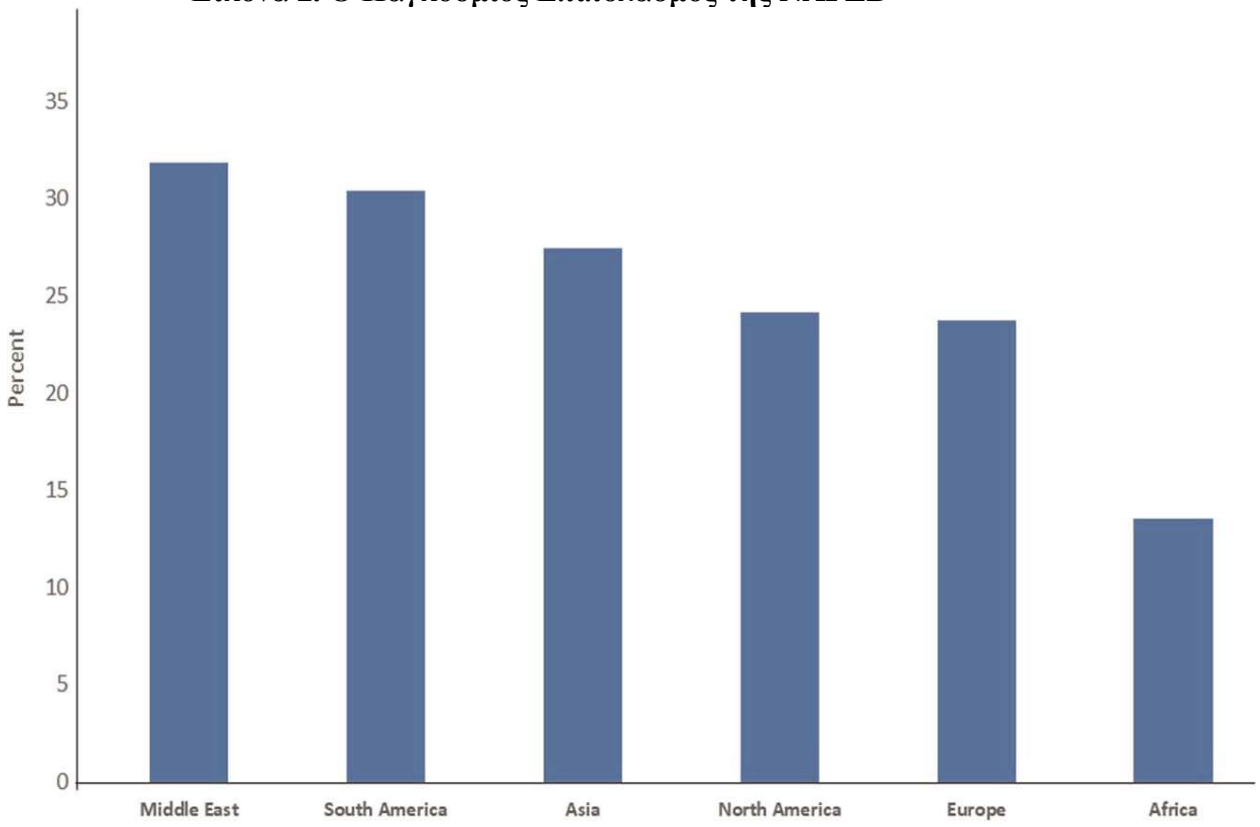
Η εκτιμώμενη παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της NAFLD στο γενικό πληθυσμό αυξάνεται συνεχώς τις τελευταίες 2 δεκαετίες (15). Σε μια πρόσφατη μετανάλυση ο παγκόσμιος επιπολασμός της NAFLD ήταν 25.2 %, με τα μεγαλύτερα ποσοστά να εμφανίζονται στη Μέση Ανατολή (31.8%) και τη Βόρεια Αμερική (30.4%), ενώ τα χαμηλότερα στην Αφρική (13.5%) (15) (Εικόνα 2 Transplantation. 2019 Jan;103(1):22-27).

Σε μια πρόσφατη έρευνα εκτιμήθηκε ότι ο επιπολασμός της NASH στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής θα εκτοξευτεί στο 63%, έως το 2030 και θα προκαλέσει το θάνατο περίπου 800,000 ατόμων (16). Σήμερα ο επιπολασμός της NASH στο γενικό πληθυσμό παγκοσμίως κυμαίνεται

μεταξύ 1.5% και 6.45% (17). Τα υψηλά ποσοστά εμφάνισης της NAFLD/ NASH σχετίζονται άμεσα με τη υιοθέτηση του δυτικού τρόπου ζωής – διατροφής, καθώς και με την αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου 2 και του μεταβολικού συνδρόμου (15).

Η αλλαγή του τρόπου ζωής σε παγκόσμιο επίπεδο, έκανε εμφανή τα τελευταία χρόνια την NAFLD και στα παιδιά απ' την ηλικία μόλις των 2 ετών (18). Ο παγκόσμιος επιπολασμός της NAFLD στα παιδιά κυμαίνεται από 3 – 10 %, ενώ αυξάνεται έως και 80% σε παχύσαρκα παιδιά και χώρες με υψηλά ποσοστά παχυσαρκίας όπως η ΗΠΑ και η Ιαπωνία (19, 20).

Εικόνα 2. Ο Παγκόσμιος Επιπολασμός της NAFLD



1.4 LEAN NAFLD

Η NAFLD ατόμων φυσιολογικού Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ/ BMI) είναι ιδιαίτερη μορφή, που αφορά το 5% του πληθυσμού στον δυτικό κόσμο. Αφορά άτομα νεότερων ηλικιών, μη παχύσαρκα, μη δραστήρια, με καθιστική ζωή. Στους περισσότερους έχει αναπτυχθεί ινσουλινοαντίσταση και εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, στοιχεία που χαρακτηρίζουν τη λιποτοξικότητα (21).

Το σημαντικότερο ποσοστό ασθενών ανήκει στους «μεταβολικά παχύσαρκους», έχοντας φαινότυπο φυσιολογικού σωματικού βάρους. Οι ασθενείς με φυσιολογικό βάρος παρουσιάζουν μικρότερο επιπολασμό μεταβολικού συνδρόμου (Met-S) 2% - 48%, έναντι των παχύσαρκων 22% - 64 %. Εν τούτοις, ο κίνδυνος καρδιοαγγειακών εκδηλώσεων είναι σημαντικός.

Ο επιπολασμός της LEAN NAFLD εκτιμάται στο 7% στις ΗΠΑ και στο 19% στην Ασία (22,23).

Μια πρόσφατη μετανάλυση σε 2,000 ασθενείς με NAFLD έδειξε ότι ανεξάρτητα από το ΔΜΣ τους είχαν τον ίδιο κίνδυνο να αναπτύξουν διαβήτη ή καρδιαγγειακή νόσο (24).

Η αύξηση του καρδιομεταβολικού κινδύνου στην LEAN NAFLD οφείλεται κυρίως στην κατανομή του σωματικού λίπους και ιδιαίτερα του συσσωρευμένου σπλαχνικού λίπους όπως μετράται από την περιφέρεια μέσης ή από τη σχέση μέσης προς ισχίο (24).

Παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της LEAN NAFLD είναι η υψηλή πρόσληψη φρουκτόζης και λίπους, γενετικοί παράγοντες, συγγενείς ανωμαλίες του μεταβολισμού, ορμονικές διαταραχές και πρόσληψη φαρμάκων (21).

1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

1.5.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΟΙ

1.5.1.1. Εθνικότητα

Ο επιπολασμός της NAFLD ποικίλει ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα (25). Στην Αμερική, τα στοιχεία των ερευνών δείχνουν ότι οι Ισπανόφωνοι εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά NAFLD, ακολουθούν οι Καυκάσιοι, ενώ οι Αφροαμερικανοί εμφανίζουν τα χαμηλότερα ποσοστά, παρά το γεγονός ότι έχουν τα υψηλότερα επίπεδα παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου (26).

Η χώρα ή ο τόπος διαμονής επηρεάζει σημαντικά τα ποσοστά επιπολασμού της NAFLD σε άτομα της ίδιας φυλής. Ο επιπολασμός των Ισπανόφωνων που κατοικούν στο Μεξικό εκτιμάται στο 33% ενώ των κατοίκων του Πουέρτο Ρίκο στο 18% (27).

Υψηλά ποσοστά NAFLD καταγράφονται και στην Ασία και ιδιαίτερα στην Ινδία. Οι Ινδοί παρόλο πουν έχουν χαμηλά ποσοστά παχυσαρκίας εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου σε σχέση με τους Καυκάσιους σύμφωνα με τις ελάχιστες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην περιοχή (28, 29).

Η γενετική προδιάθεση και περιβαλλοντικοί παράγοντες οφείλονται για τη διακύμανση που εμφανίζει η NAFLD σε εθνικότητες ανά τον κόσμο (25).

1.5.1.2 Φύλο

Ο επιπολασμός της νόσου εμφανίζεται υψηλότερος στους άντρες σε σχέση με γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (30). Οι άντρες εμφανίζουν σοβαρότερη μορφή στεάτωσης και ίνωσης, υψηλότερα ποσοστά φλεγμονής και υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης ηπατικών όγκων σε σχέση με τις γυναίκες (31). Μετά την εμμηνόπαυση η NAFLD εξελίσσεται γρηγορότερα στις γυναίκες, γεγονός που συνδέεται με την προστατευτική επίδραση των οιστρογόνων (32).

Μεγάλες προοπτικές έρευνες σε ασθενείς με NASH έδειξαν ότι οι άντρες είχαν 2πλάσιο με 7πλάσιο κίνδυνο ν' αναπτύξουν καρκίνο του ήπατος (HCC) σε σχέση με τις γυναίκες. Οι γυναίκες όμως εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης από HCC, γεγονός που σταματά να ισχύει μετά την εμμηνόπαυση (33, 34).

Σε ηλικίες έως 12 ετών τα αγόρια εμφανίζουν 40% υψηλότερο επιπολασμό σε σχέση με τα κορίτσια (35).

1.5.1.3 Ηλικία

Ο επιπολασμός της NAFLD και της NASH αυξάνεται με την ηλικία και στα δύο φύλα. Με το πέρας της ηλικίας εμφανίζονται υψηλότερα ποσοστά ίνωσης και καρκίνου του ήπατος που σχετίζονται με την εμφάνιση μεταβολικών διαταραχών και διαβήτη τύπου 2 (36). Ωστόσο η NAFLD εμφανίζεται από την παιδική ακόμη ηλικία. Από NAFLD πάσχει το 7.6% των παιδιών στον γενικό πληθυσμό και το 34.2% των παχύσαρκων παιδιών (37)

1.5.2 ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1.5.2.1 Παχυσαρκία

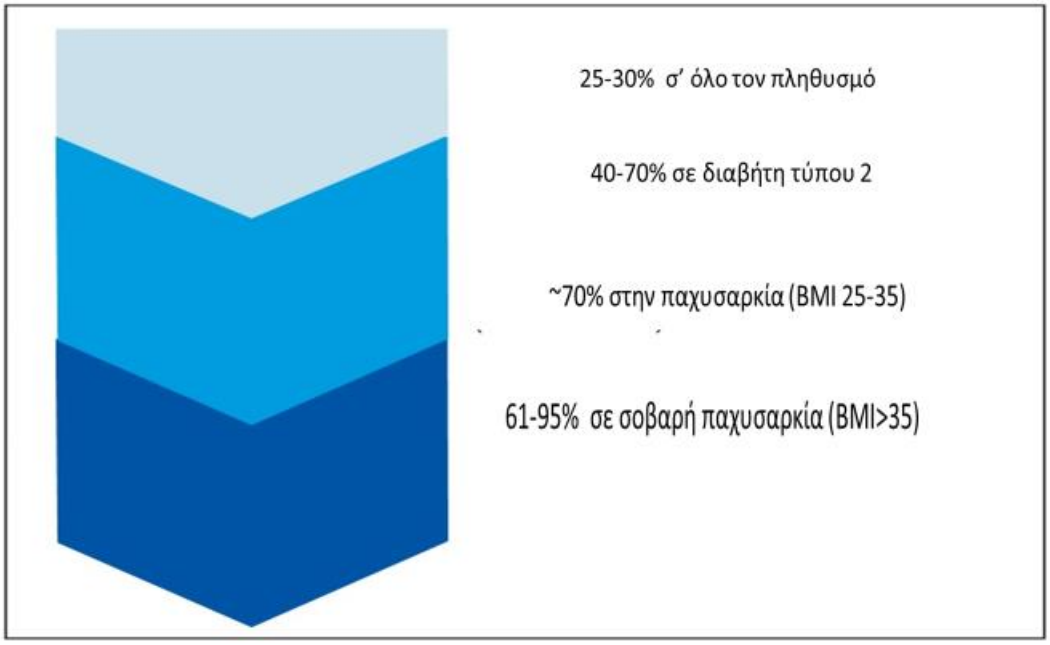
Η παχυσαρκία είναι ο κυριότερος τροποποιήσιμος παράγοντας για την εμφάνιση της NAFLD. Τα στοιχεία των ερευνών δείχνουν ότι ο επιπολασμός της νόσου διπλασιάζεται στους υπέρβαρους (BMI > 25) και τετραπλασιάζεται στους παχύσαρκους (BMI > 30) (38) (Εικόνα 3 τροποποίηση από Fed Pract. 2019 January;36(1):20-29). Στην πρώτη πληθυσμιακή μελέτη που έγινε στην Ιταλία (Dionysos Study) σε φαινομενικά υγιείς ενήλικες που τους παρακολούθησαν για 10 χρόνια, διαπιστώθηκε με βάση υπερηχογραφικά ευρήματα πως η συνολική επίπτωση της ηπατικής στεάτωσης ανεξαρτήτου αιτιολογίας ήταν 61%. Οι παχύσαρκοι είχαν στεάτωση σε ποσοστό 91%, οι υπέρβαροι 67% και οι φυσιολογικού βάρους 24.5% (39).

Σε ασθενείς με BMI ≥35 kg/m^2 που πρόκειται να υποβληθούν σε βαριατρική χειρουργική επέμβαση, ο επιπολασμός της NAFLD φτάνει το 76%, της NASH 23% και της κίρρωσης 5.8% (40). Η παχυσαρκία αυξάνει επίσης τον κίνδυνο για NASH, ίνωση και καρκίνο του ήπατος, όμως πρόσφατα στοιχεία δε σχετίζουν την παχυσαρκία με την ίνωση.

Η διανομή του σωματικού λίπους και όχι τόσο το ποσοστό του επηρεάζουν την εξέλιξη της NAFLD. Το κοιλιακό λίπος σχετίζεται με ινσουλινοαντίσταση και αυξημένο λίπος στο συκώτι (41). Μελέτες σε Ασιατικούς πληθυσμούς επιβεβαιώνουν τα παραπάνω. Οι Ασιάτες με υψηλά ποσοστά επιπολασμού της νόσου, παρόλο που έχουν χαμηλό BMI (<23 kg/m^2), εμφανίζουν υψηλά ποσοστά σπλαχνικού λίπους (42).

Η παχυσαρκία είναι ο λόγος που εμφανίζονται και υψηλά επίπεδα επιπολασμού της νόσου στα παιδιά (37).

Εικόνα 3. Εμφάνιση της NAFLD στην παχυσαρκία και το διαβήτη τύπου 2



1.5.2.2 Διαβήτης τύπου 2

Η NAFLD είναι μια πολύπλοκη ασθένεια που επηρεάζει τη λειτουργία εξωηπατικών οργάνων μέσω πολλών μεταβολικών οδών. Η νόσος συνδέεται άμεσα με την αιτιολογία και την παθογένεση του T2DM μέσω της απελευθέρωσης ηπατοκινών που επηρεάζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης και συμβάλουν στην ινσουλινοαντίσταση.

Ο επιπολασμός του T2DM αυξάνεται παγκοσμίως παράλληλα με αυτού της παχυσαρκίας. Ο WHO εκτιμά ότι το 90 % των ατόμων με διαβήτη έχει T2DM (43). Ο επιπολασμός της NAFLD σε ασθενείς με T2DM είναι πολύ υψηλότερος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και κυμαίνεται μεταξύ 30 και 75%, ανάλογα με την εθνικότητα (44). Οι υπέρβαροι και παχύσαρκοι ασθενείς με T2DM κινδυνεύουν ακόμα περισσότερο να εμφανίσουν τη νόσο (44). Οι διαβητικοί με T2DM διατρέχουν επίσης υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν NASH και σοβαρές επιπλοκές που σχετίζονται με τη νόσο, όπως κίρρωση του ήπατος (45, 46).

1.5.2.3 Μεταβολικό Σύνδρομο

Η NAFLD εκτός από την παχυσαρκία και το T2DM συνδέεται και με την παρουσία δυσλιπιδαιμίας και αρτηριακής υπέρτασης που στο σύνολό τους αποτελούν συνιστώσες του Mets. Σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια NCEP - National Cholesterol Educational Program -ATP III, ένα άτομο θεωρείται ότι έχει Μεταβολικό Σύνδρομο όταν φέρει τουλάχιστον τρεις εκ των πέντε ακόλουθων μεταβολικών παραγόντων κινδύνου:

- κεντρικού τύπου παχυσαρκία (περιφέρεια μέσης > 102 cm για τους άνδρες και > 88 για τις γυναίκες),
- αυξημένα τριγλυκερίδια ορού (>150 mg/dl ή θεραπεία για τις υψηλές τιμές τριγλυκεριδίων),
- μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης (<40 mg/dl στους άνδρες, <50 mg/dl για τις γυναίκες ή λήψη φαρμακευτικής αγωγής για τα χαμηλά επίπεδα HDL),
- υπέρταση (συστολική αρτηριακή πίεση >130 mmHg ή διαστολική >85 mmHg ή λήψη αντιυπερτασικής αγωγής) και
- διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (≥ 100 mg/dL ή λήψη αντιδιαβητικής αγωγής).

Επειδή η NAFLD και το Mets μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ο επιπολασμός των ατόμων με Mets που πάσχουν από NAFLD. Το μόνο σίγουρο είναι ότι τα άτομα με NAFLD εμφανίζουν κατά 99% κάποιο απ' τα χαρακτηριστικά του Mets (47). Μια έρευνα στην Ιταλία έδειξε ότι το 80% των ασθενών με NASH έπασχαν και από Mets σε σύγκριση με το 53% με απλή στεάτωση. Το μεταβολικό σύνδρομο φαίνεται ότι αυξάνει τον κίνδυνο για NASH και σοβαρή ίνωση ανεξάρτητα από παράγοντες όπως η ηλικία, το BMI και το φύλο. Στοιχεία από την Framingham Heart Study στην Αμερική δείχνουν ότι το 63% των ασθενών με NAFLD εμφανίζει Mets (48). Στην Κίνα το Mets εμφανίζεται στο 36.1%, 46.6% και 54.5% σε φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD (49).

Το 50% των υπερτασικών εμφανίζουν NAFLD. Όσον αφορά τη δυσλιπιδαιμία η NAFLD εμφανίζεται στο 50% των νοσούντων, ενώ η υπερτριγλυκεριδαιμία στο 40 % των ατόμων που πάσχουν από NAFLD και στο 83% από NASH (50).

1.5.2.4 Άλλοι κλινικοί παράγοντες

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ενδοκρινικές καταστάσεις (υποθυροειδισμός, υπογοναδισμός), το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και το σύνδρομο υπνικής άπνοιας, φαίνεται ότι αποτελούν

παράγοντες κινδύνου για την NAFLD. Τελευταίες έρευνες επίσης, συνδέουν και ψυχολογικούς παράγοντες όπως αγχώδεις διαταραχές και κατάθλιψη με την εμφάνιση της νόσου (51).

1.5.3 ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ – ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ

1.5.3.1 Διατροφή

Η διατροφή είναι ένας απ' τους σημαντικότερους παράγοντες που συντελούν στην παθογένεση της νόσου. Διαφορετικά θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν την εξέλιξη και την ανάπτυξη της NAFLD.

Εκτός απ' την υψηλή πρόσληψη θερμίδων που ευθύνεται για την εμφάνιση παχυσαρκίας και μεταβολικών διαταραχών όπως η NAFLD, η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων (>54% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης) φαίνεται να σχετίζεται με μεγαλύτερο βαθμό φλεγμονής του ήπατος (52). Επιπλέον, οι υδατάνθρακες προέρχονται κυρίως από επεξεργασμένες τροφές (όπως γλυκά), υποδηλώνοντας ότι ο τύπος των υδατανθράκων επηρεάζει την παθογένεια της νόσου.

Η πρόσληψη φρουκτόζης μέσω κυρίως της κατανάλωσης αναψυκτικών πάνω από 3 g/kg σωματικού βάρους την ημέρα αυξάνει το ηπατικό λίπος, τα τριγλυκερίδια ορού και μειώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε ενήλικες άντρες (53). Οι περισσότερες έρευνες συγκλίνουν στο γεγονός ότι η κατανάλωση πάνω από 1 αναψυκτικό (360ml) την ημέρα αυξάνει τον κίνδυνο για μεταβολικό σύνδρομο (54).

Όσο αφορά τα λίπη, η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 14% της συνολικής πρόσληψης ενέργειας καθημερινά συντελεί στην αυξημένη παρουσία NASH, ενώ η υψηλή πρόσληψη trans λιπαρών αυξάνει τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής σε γυναίκες και αλλάζει το λιπιδαιμικό προφίλ αυξάνοντας τους λόγους ολικής χοληστερόλης προς HDL (TC/HDL) και LDL χοληστερόλης προς HDL (LDL/HDL) (55,56).

Λίγες έρευνες συσχετίζουν την πρόσληψη πρωτεϊνών με την NAFLD. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η υποθρεψία και η μειωμένη πρόσληψη πρωτεϊνών προκαλούν ηπατική στεάτωση και NASH (57).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και μελέτες που έχουν συσχετίσει την πρόσληψη χολίνης με την πιθανότητα εμφάνισης NAFLD. Υγιείς εθελοντές με χαμηλά επίπεδα πρόσληψης χολίνης,

εμφάνισαν λιπώδες ήπαρ και ηπατοκυτταρικό τραυματισμό, ενώ τα αποτελέσματα αυτά άρθηκαν όταν η χολίνη επανεισήχθη στη διατροφή τους (58).

1.5.3.2 Κάπνισμα

Το κάπνισμα φαίνεται να είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την έναρξη της νόσου. Τα αποτελέσματα μιας προοπτική μελέτης σε 2029 καπνίζοντες έδειξαν ότι το κάπνισμα πυροδοτεί την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης, ενώ σε μια έρευνα σε εφήβους στην Αμερική φάνηκε ότι η παθητική και η ενεργή έκθεση στον καπνό είναι παράγοντες προδιάθεσης για μεταβολικό σύνδρομο (59). Τα έτη καπνίσματος επίσης τόσο των νυν όσο και των πρώην καπνιστών σχετίζονται με μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου (60).

1.5.3.3 Άλλοι συμπεριφοριστικοί παράγοντες

Η καθιστική ζωή και η μειωμένη διάρκεια ύπνου σχετίζονται με παράγοντες κινδύνου που επηρεάζουν έμμεσα την εμφάνιση της νόσου, όπως η ανάπτυξη παχυσαρκίας και η υπερκατανάλωση τροφής (60).

1.5.4 ΓΟΝΙΔΙΑ

Γενετικοί παράγοντες συμβάλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD, ενώ και οι διακυμάνσεις του επιπολασμού της νόσου σε διαφορετικούς πληθυσμούς ανά τον κόσμο αποδίδονται κατά μεγάλο ποσοστό (30- 50%) σε γενετικά αίτια. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται κυρίως στη ρύθμιση του μεταβολισμού του ηπατικού λίπους.

1.5.4.1 PNPLA3

Το γονίδιο PNPLA3 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 481 αμινοξέων, η οποία είναι η κύρια υδρολάση τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό. Στον άνθρωπο εκφράζεται σε πολλούς ιστούς αλλά η μεγαλύτερη ποσότητά του βρίσκεται στο συκώτι και ακολουθούν ο αμφιβληστροειδής, το δέρμα, ο λιπώδης ιστός, τα νεφρά, ο εγκέφαλος και η σπλήνα (61). Ο πολυμορφισμός (SNP) rs 738409 C>G οδηγεί σε αντικατάσταση του 148^{ου} αμινοξέος ισολευκίνη σε μεθειονίνη λόγω της αντικατάστασης της κυτοσίνης από γουανίνη. Αυτή η αλλαγή εμποδίζει την πρόσδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα την παγίδευση των τριγλυκεριδίων σε σταγονίδια λίπους στα ηπατοκύτταρα και τα αστεροειδή κύτταρα που σταδιακά οδηγεί σε ηπατικό τραυματισμό και ίνωση (62). Οι ομοζυγώτες του πολυμορφισμού στην Ευρώπη, εμφανίζουν 10πλάσιο κίνδυνο για HCC, ενώ σύμφωνα με τη

Dallas Heart Study ο πολυμορφισμός του PNPLA3 εμφανίζεται στο 49% των Ισπανόφωνων, στο 23% των Καυκάσιων και στο 17% των Αφροαμερικανών (63, 64).

1.5.4.2 TM6SF2

Το γονίδιο TM6SF2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 351 αμινοξέων που εκφράζεται στο συκώτι και το έντερο. Ο πολυμορφισμός rs58542926 C>T (E167K) εμποδίζει την ωρίμανση λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) στα ηπατοκύτταρα και τα χυλομικρά με αποτέλεσμα την αύξηση των τριγλυκεριδίων (TG) ενδοκυτταρικά και τη μείωση τους στην κυκλοφορία. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, οι φορείς του συγκεκριμένου πολυμορφισμού κινδυνεύουν περισσότερο να αναπτύξουν NAFLD και λιγότερο καρδιαγγειακές παθήσεις (65, 66). Ο πολυμορφισμός rs58542926 C>T (E167K) αυξάνει, επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης ίνωσης, ενώ παρατηρείται συχνά και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (67).

1.5.4.3 MBOAT7

Το MBOAT7 κωδικοποιεί την ακυλοτρανσφεράση της λυσοφωσφατιδυλοινοσιτόλης, ένα ένζυμο που ρυθμίζει τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος - το αραχιδονικό πυροδοτεί την ηπατική φλεγμονή και ίνωση - στα κύτταρα μέσω της αναδιαμόρφωσης των φωσφολιπιδίων. (68). Ο πολυμορφισμός rs 641738 C>T του MBOAT7 αυξάνει τον κίνδυνο για NAFLD ενώ πρόσφατες έρευνες τον συνδέουν με γρήγορη εξέλιξη της νόσου σε HCC (69).

1.5.4.4 GCKR

Το γονίδιο GCKR κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω αναστολής του ενζύμου της γλυκοκινάσης (70). Ο πολυμορφισμός rs1260326 C>T του GCKR συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ίνωσης και αυξημένα TG σε ασθενείς με NAFLD (70), ενώ η συνύπαρξή του με τον πολυμορφισμό rs 738409 C>G του PNPLA3 φαίνεται ότι ευθύνεται σε ποσοστό πάνω από 30 %, για την εμφάνιση της NAFLD σε παχύσαρκα παιδιά (67).

Πολλά ακόμα γονίδια εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της NAFLD συμμετέχοντας σε διαδικασίες που προκαλούν στεάτωση, ίνωση και φλεγμονή.

1.6 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

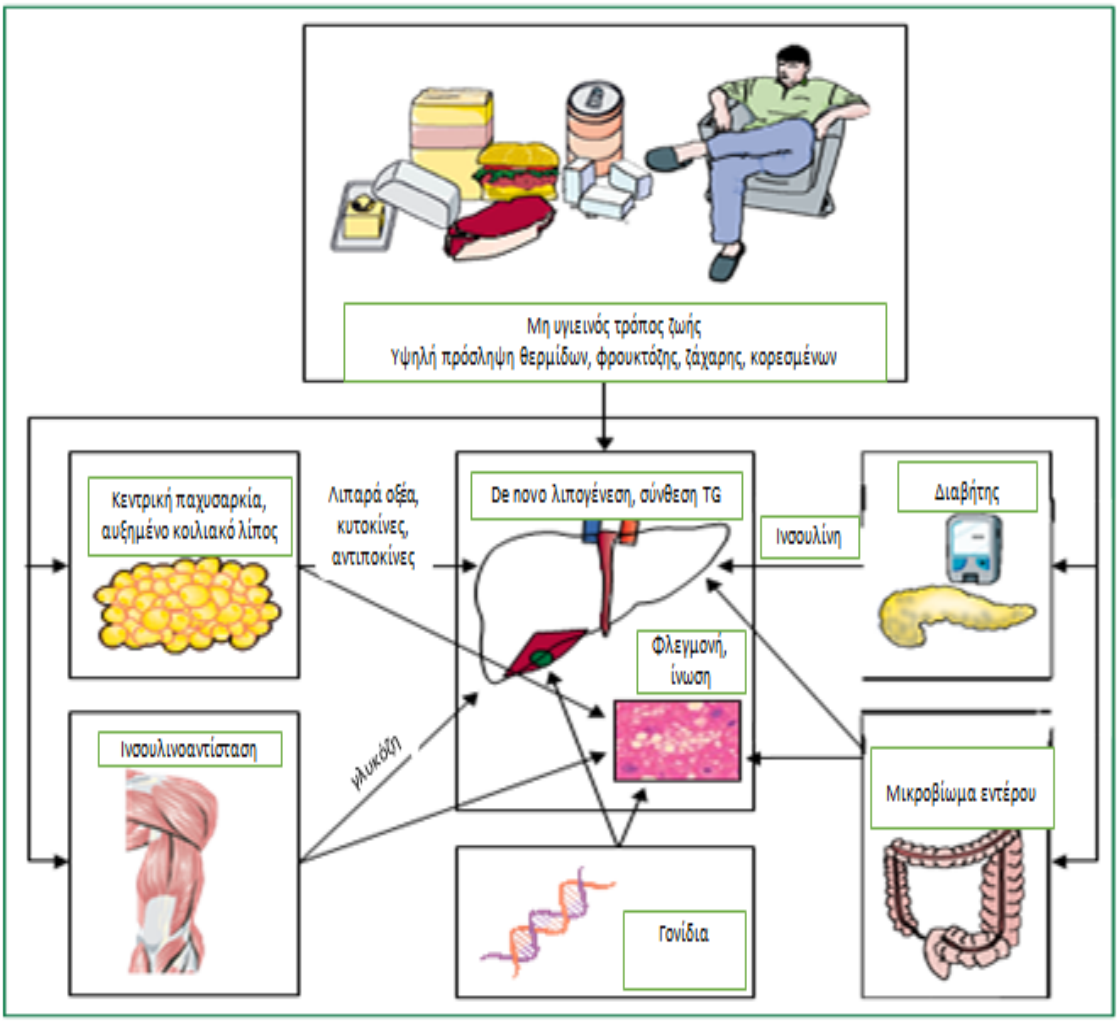
Η παθοφυσιολογία της NAFLD δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, καθώς δεν έχει εξηγηθεί ικανοποιητικά ο λόγος που ορισμένοι ασθενείς αναπτύσσουν απλή στεάτωση ενώ άλλοι στεατοηπατίτιδα και προοδευτική νόσο. Στην βιβλιογραφία αρχικά είχε επικρατήσει η θεωρία των «δύο χτυπημάτων», σύμφωνα με την οποία για την ανάπτυξη της NAFLD απαιτούνται δύο ξεχωριστά και διαδοχικά χτυπήματα: το πρώτο είναι η συσσώρευση λίπους (NAFL) και το δεύτερο το οξειδωτικό στρες που απαιτείται για την ανάπτυξη της NASH (71). Σήμερα, οι έρευνες συγκλίνουν στη θεωρία των πολλαπλών χτυπημάτων, σύμφωνα με την οποία πολλοί παράγοντες δρουν συνεργατικά με τα γονίδια και το περιβάλλον στην ανάπτυξη της νόσου (Εικόνα 4 τροποποίηση από Lancet Diabetes Endocrinol. 2019 Apr;7(4):313-324).

Ανθυγιεινές διατροφικές συνήθειες που περιλαμβάνουν θετικό ενεργειακό ισοζύγιο με αυξημένη θερμιδική πρόσληψη, ιδιαίτερα από ζάχαρη, φρουκτόζη και κορεσμένα λιπαρά σε συνδυασμό με την καθιστική ζωή οδηγούν σε αυξημένο ολικό και σπλαχνικό λίπος, αυξημένη de novo λιπογένεση και αντίσταση στην ινσουλίνη, έναν κυρίαρχο παράγοντα στην ανάπτυξη της νόσου. Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη αυξάνεται η πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων από το ήπαρ. Τα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα στη συνέχεια, είτε εκκρίνονται με τη μορφή VLDL, είτε αποθηκεύονται με τη μορφή τριγλυκεριδίων, είτε οξειδώνονται. Όταν ξεπεραστεί η ικανότητα σύνθεσης και έκκρισης VLDL, τα τριγλυκερίδια συσσωρεύονται με αποτέλεσμα τη στεάτωση. Τα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, επίσης, ενεργοποιούν προφλεγμονώδεις κινάσες και ενισχύουν την έκφραση κυτταροκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης TNF - α, ο αυξητικός παράγοντας μετατροπής, TGF- β και η ιντερλευκίνη (IL-1 β). Ο TNF– α δυσχεραίνει την κυκλοφορία ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Οι TNF - α και TGF- β ενεργοποιούν τις κασπάσες και οδηγούν στο θάνατο τα ηπατοκύτταρα. Επιπλέον ο TGF- β ενεργοποιεί την παραγωγή ινώδους από τα αστεροειδή κύτταρα και τις τρανσγλουταμινάσες που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, δημιουργώντας υαλίνη (σωμάτια Mallory). Η συσσώρευση τους επίσης σχετίζεται με τη λειτουργία πυρηνικών υποδοχέων, όπως οι PPAR α και γ, και γονιδίων που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες, την ηπατική φλεγμονή και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (72, 73).

Οι ορμόνες του λιπώδους ιστού λεπτίνη και αντιπονεκτίνη διαδραματίζουν, επίσης σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της NAFLD. Η λεπτίνη φυσιολογικά, παρεμποδίζει τη συσσώρευση λιπαρών οξέων στο ήπαρ μέσω της μείωσης της έκφρασης του παράγοντα SREB 1. Μελέτες

όμως δείχνουν ότι τόσο τα ανενεργά όσο και τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα Ob – RL της λεπτίνης, ο οποίος εκφράζεται περαιτέρω στην εξέλιξη της ίνωσης και την κίρρωση. Ως εκ τούτου, η λεπτίνη φαίνεται ότι επηρεάζει τα αστεροειδή κύτταρα και εμπλέκεται άμεσα στη δημιουργία ηπατικής ίνωσης. Η αντιπονεκτίνη φυσιολογικά, βελτιώνει την ηπατική στεάτωση, τα επίπεδα τρανσαμινασών και φλεγμονής στο ήπαρ ενώ στα παχύσαρκα με NAFLD άτομα λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη, παρατηρείται μείωση των επιπέδων αντιπονεκτίνης και αύξηση των επιπέδων λεπτίνης, με συνέπεια την επιδείνωση των συμπτωμάτων φλεγμονής και ίνωσης (74).

Εικόνα 4. Παθογένεση της NAFLD



Μια ακόμα παράμετρος που απασχολεί τελευταία τους επιστήμονες είναι το μικροβίωμα του εντέρου. Η παροχή του αίματος στο ήπαρ προέρχεται κυρίως απ' την πυλαία φλέβα (70 – 75%) και ως εκ τούτου αντανακλά τη σύνδεση μεταξύ εντέρου και ήπατος. Το ήπαρ εκτίθεται σε διάφορους εντερικούς μεταβολίτες και θρεπτικά συστατικά, ενώ το μικροβίωμα του εντέρου

εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό απ' τις διατροφικές συνήθειες και τη χρήση αντιβιοτικών (8). Έρευνες δείχνουν ότι το μικροβίωμα των ατόμων με NASH είναι λιγότερο σύνθετο απ' αυτό των ατόμων χωρίς τη νόσο. Το αλλοιωμένο μικροβίωμα επιπλέον οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων στο έντερο και αυξημένη διαπερατότητα σε εντερικά βακτήρια που καταλήγουν στο ήπαρ και προκαλούν την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-6 και ο TNf – α (72). Πιθανοί μηχανισμοί για το αλλοιωμένο μικροβίωμα σε άτομα με NAFLD περιλαμβάνουν την πιθανή πρόσδεση βακτηριακών πρωτεϊνών σε G - συζευγμένους υποδοχείς πρωτεϊνών, όπως και την απελευθέρωση του FXR παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών 19 (FGF 19), μιας ορμόνης που προέρχεται απ' το έντερο και ρυθμίζει τη σύνθεση χολικού οξέος και το μεταβολισμό γλυκόζης και λιπιδίων (72).

1.7 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η παθογένεση της NAFLD όπως αναφέρθηκε είναι στενά συνυφασμένη με την αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολικό σύνδρομο και τη δυσλιπιδαιμία. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υπερβολική πρόσληψη θερμίδων και φρουκτόζης και η καθιστική ζωή συμβάλλουν επίσης στην εμφάνιση της νόσου. Επιπλέον γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν τη λιπογένεση των ηπατοκυττάρων όπως τα γονίδια PNPLA3, TM6SF2 και MBOAT7 συντείνοντας στην εξέλιξη της νόσου σε NASH και ίνωση. Ωστόσο, δεν έχει δοθεί ακόμη σαφής απάντηση για τα αίτια εμφάνισης της νόσου.

Η επιγενετική, ένα αναστρέψιμο φαινόμενο που επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση χωρίς τροποποίηση της αλληλουχίας του DNA, παρέχει μια νέα προοπτική στην παθογένεση και διαχείριση της NAFLD. Παραδείγματα επιγενετικών τροποποιήσεων είναι : η μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών και σίγαση RNA από τα microRNAs. Η μεθυλίωση του DNA είναι η προσθήκη μιας μεθυλομάδας σε βάσεις κυτοσίνης που ακολουθούνται από νουκλεοτίδια που έχουν ως βάση τη γουανίνη και ονομάζονται σημεία CpGs. Η υπερμεθυλίωση του DNA σχετίζεται με την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων ενώ η υπομεθυλίωση φαίνεται ότι αυξάνει την έκφρασή τους. Πολλές μεθυλιώσεις λαμβάνουν χώρα στο συκώτι και η ηπατική στεάτωση συνδέεται άμεσα με το μεταβολισμό του άνθρακα που σχετίζεται με την ανεπάρκεια φυλλικού οξέος (75). Πρόσφατες μελέτες διαπίστωσαν ότι ο βαθμός μεθυλίωσης του DNA σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα χοληστερόλης στο συκώτι, όπως και με την παρουσία στεάτωσης ή NASH (76). Άλλες έρευνες δείχνουν ότι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο

συκώτι, μεθυλιώνονται διαφορετικά ανάλογα με το επίπεδο σοβαρότητας της νόσου (77). Επιπλέον η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ηπατικής ινσουλίνης με αποτέλεσμα να δημιουργείται ινσουλινοαντίσταση, ένας απ' τους κυριότερους παράγοντες παθογένεσης της NAFLD (78).

Στη συνέχεια θα εστιάσουμε στη δράση του microRNA 21 ως επιγενετικό διαμορφωτή στην NAFLD.

1.7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ MicroRnas

Τα microRNAs ή miRNAs είναι μικρά μονόκλωνα μόρια RNA με μέγεθος 21-23 νουκλεοτίδια τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά καθορίζουν σε μεγάλο ποσοστό τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (79). Για πρώτη φορά περιγράφθηκαν το 1993 απ' τον Lee και τους συναδέλφους του, ενώ ο όρος miRNAs εισήχθη το 2001 όταν μόρια miRNA αναγνωρίστηκαν σε αρκετούς οργανισμούς, περιλαμβανομένου και του ανθρώπου (80, 81). Μέχρι σήμερα υπολογίζεται ότι υπάρχουν πάνω από 2,000 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα και παρά το γεγονός ότι ποσοστό 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs, τα εν λόγω miRNAs στοχεύουν άμεσα έως το 60% όλων των ανθρώπινων γονιδίων (82). Οι στόχοι των miRNAs μπορεί να είναι πολλαπλά γονίδια ή πολλαπλά miRNAs μπορούν να στοχεύσουν σε ένα γονίδιο, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα miRNAs έχουν ρυθμιστική ικανότητα και επηρεάζουν σημαντικά την κατάσταση της υγείας και την εμφάνιση ασθενειών (83, 84).

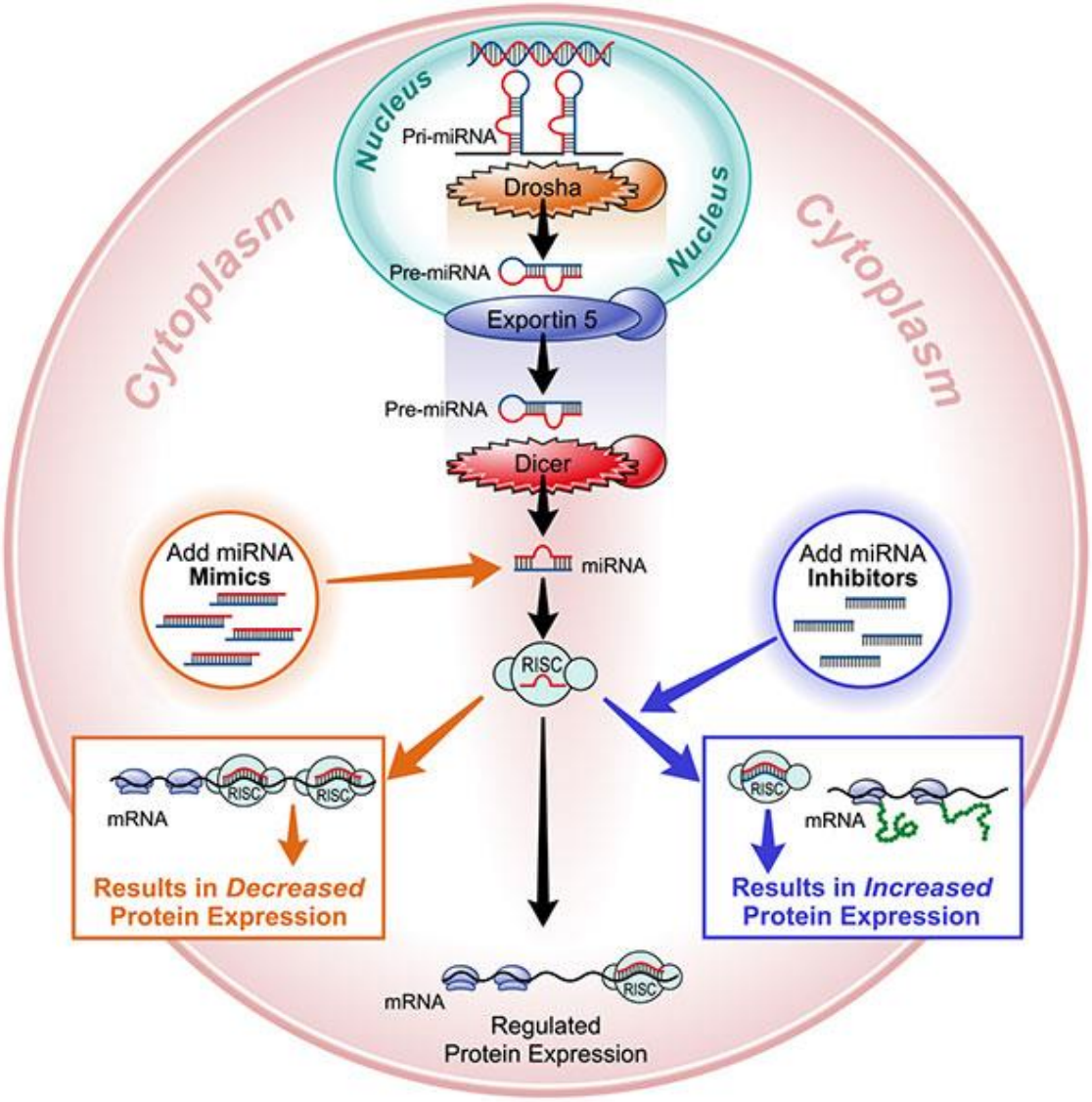
Η πλειοψηφία των ανθρώπινων miRNAs βρίσκονται είτε σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μεταγραφικές μονάδες που εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Πιο σπάνια βρίσκονται σε εξώνια mRNA γονιδίων ή στην 3΄ αμετάφραστη περιοχή (3΄- UTR) άλλων mRNA γονιδίων, είτε τέλος ομαδοποιημένα σε ειδικά γονίδια miRNA (84, 85). Τα miRNAs βρίσκονται στον ορό, το πλάσμα, το σάλιο και τα ούρα, ενώ η σύνδεσή τους με πρωτεΐνες, λιπίδια και λιποπρωτεΐνες τα καθιστά πιο σταθερά στην κυκλοφορία (86).

1.7.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ miRNAs

Τα γονίδια miRNAs μεταγράφονται κυρίως μέσω της δράσης της RNA πολυμεράσης II, είτε μέσω της RNA πολυμεράσης III σε πρωτογενή miRNA μετάγραφα (pri-mRNA). Τα pri-mRNAs έχουν μια δομή μίσχου φουρκέτας (hairpin structure HPS) με μέσο μήκος 100 έως 300 νουκλεοτίδια, μια ακραία θηλιά (T-loop) και δύο μονόκλωνες περιοχές (single- stranded regions SSR) εκατέρωθεν του μίσχου (87). Τα pri-mRNAs στη συνέχεια νουκλεολύονται στον πυρήνα με τη δράση της πρωτεΐνης Drosha για τη δράση της οποίας απαιτείται η παρουσία του

συμπαράγοντα DCGR8 (DiGeorge syndrome crucial region of gene 8) σε μικρότερα (60-70 νουκλεοτίδια) διπλής έλικας RNA μόρια, γνωστά ως pre-mRNAs. Τα pre-mRNAs εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα από την εξπορτίνη 5, όπου στη συνέχεια διασπώνται απ' το ένζυμο DICER για να απομακρυνθεί η θηλιά, δημιουργώντας μόρια διπλής έλικας RNA με 2-3 νουκλεοτίδια (87). Τα μόρια διπλής έλικας ενσωματώνονται με πρωτεΐνες της οικογένειας αργοναυτών ή Ago σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών Ago. Η έλικα που είναι συμπληρωματική με το στόχο -mRNA (η πιο σταθερή έλικα) γίνεται μέρος του παραγόμενου microRNA συμπλόκου σίγασης RISC (RNA – induced silencing complex), ενώ η άλλη απελευθερώνεται και αποικοδομείται (88). Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC είναι αυτό που συμβάλλει στη σίγηση των γονιδίων (Εικόνα 5 Library - based Functional miRNA)

Εικόνα 5. Βιοσύνθεση των miRNAs



1.7.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασης, είτε μέσω προώθησης της αποδόμησης των mRNAs στόχων. Το εάν ένα miRNA προωθεί την αποδόμηση ή καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA στόχου εξαρτάται απ' τους εξής παράγοντες: 1) το βαθμό συμπληρωματικότητας με την περιοχή πρόσδεσης, 2) τον αριθμό των μοτίβων που αναγνωρίζει το 5΄άκρο του και 3) την προσβασιμότητα στις θέσεις πρόσδεσης (89). Στον άνθρωπο η πλειοψηφία των προβλεπόμενων στόχων έχουν μόνο μερική συμπληρωματικότητα και καταλήγουν σε αναστολή της μετάφρασης (88).

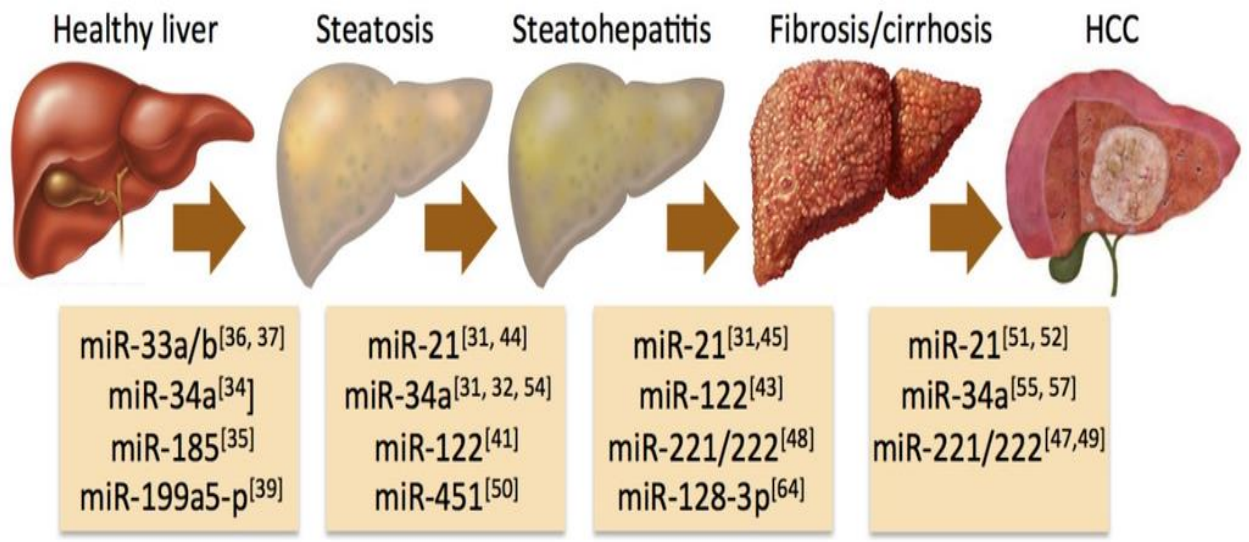
Το κάθε μονόκλωνο miRNA μπορεί να στοχεύει σε περισσότερα από 1,000 γονίδια και αντιστρόφως κάθε γονίδιο που κωδικοποιείται σε πρωτεΐνη μπορεί να ρυθμίζεται από πολλαπλά miRNAs (90). Έτσι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων για τη ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών.

1.7.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ NAFLD

Τα microRNAs συμμετέχουν σ' ένα ευρύ φάσμα διεργασιών του οργανισμού όπως του μεταβολισμού, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της απόπτωσης και της λειτουργίας των νευρωνικών κυττάρων. Ρυθμίζουν, επίσης, την έκφραση νευρωνικών γονιδίων, τη μορφογένεση του εγκεφάλου, τη διαφοροποίηση των μυών και τη διαίρεση βλαστικών κυττάρων. Οι αλλαγές στην έκφραση των microRNAs συνδέονται με την εμφάνιση ασθενειών όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις, φλεγμονώδεις νόσους, παθήσεις του νευρικού συστήματος και αυτοάνοσα νοσήματα (91).

Πολλά miRNAs συμμετέχουν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της NAFLD απ' την απλή στεάτωση ως τον καρκίνο του ήπατος. (Εικόνα 6 J. Clin. Med. **2015**, *4*(12), 1977-1988)

Εικόνα 6. miRNAs που συμμετέχουν στα στάδια της NAFLD



Το πιο γνωστό miRNA που εκφράζεται στο ανθρώπινο ήπαρ είναι το miR-122 και αντιπροσωπεύει πάνω από το 70% της συνολικής συγκέντρωσης miRNA του ήπατος (79). Το miR-122 διεγείρει την έκφραση 24 γονιδίων συγκεκριμένων ηπατοκυττάρων, ενώ αλληλοεπιδρά με πολλά γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης (91). Τα επίπεδά του είναι μειωμένα σε ασθενείς με NASH στο ήπαρ, ενώ αυξάνονται στην κυκλοφορία πιθανόν λόγω μεταφοράς του. Η αναστολή της έκφρασής του έχει σχετιστεί με μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα, αυξημένη οξείδωση των ηπατικών λιπαρών οξέων και βελτίωση της ηπατικής στεάτωσης (92).

Το miRNA-34a υπερεκφράζεται τόσο σε δείγματα ιστών όσο και στον ορό ασθενών με NAFLD/ NASH καθώς και ασθενών με διαβήτη τύπου 2 (T2DM) (93). Το miRNA-34a μειώνει την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεση της NAFLD όπως του HNFα PPARα και του SIRT1 (94). Η μειωμένη έκφραση αυτών των γονιδίων συνδέεται με υψηλή συγκέντρωση TG, ηπατική στεάτωση, οξειδωτικό στρες καθώς και απόπτωση των ηπατικών κυττάρων (95).

Στις φλεγμονώδεις διεργασίες κατά την ανάπτυξη της NAFLD συμβάλλει το miRNA-155, τα επίπεδα του οποίου εμφανίζονται μειωμένα στο συκώτι και τον ορό αίματος των νοσούντων με NAFLD, ενώ η μειωμένη έκφρασή του συνδέεται με αυξημένη ηπατική λιπογένεση μέσω της δέσμευσης του 3΄ UTR του LXRα, ενός παράγοντα που ενεργοποιεί γονίδια που αυξάνουν τη

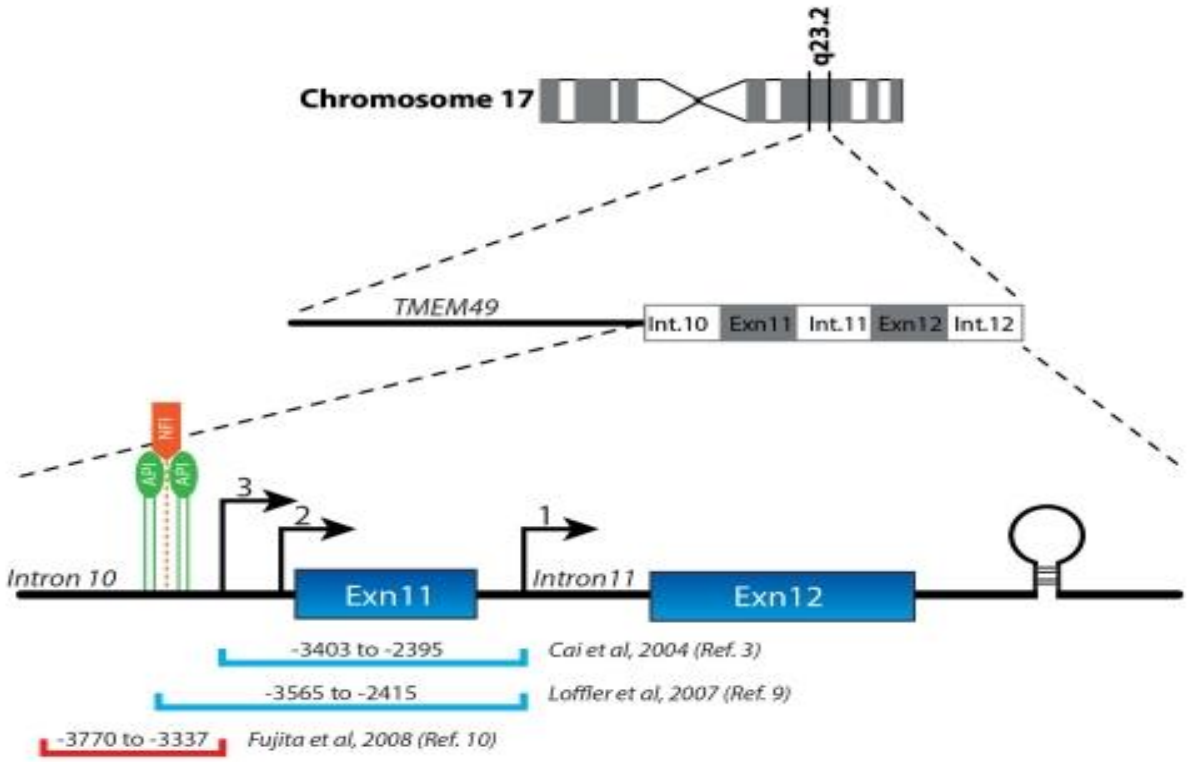
συσσώρευση ηπατικών λιπιδίων, όπως της συνθετάσης λιπαρών οξέων (FAS), της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης (ACCT) και της στεαροϋλοδεσατουράσης (SCD-1) (96).

Στη συνέχεια θα αναπτυχθεί ειδικότερα ο ρόλος του miRNA-21 στην παθογένεση της NAFLD.

1.7.4.1 miRNA-21 και Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Το miRNA-21 είναι αυτό που εκφράζεται περισσότερο στα κύτταρα των θηλαστικών σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (97). Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στο γενετικό τόπο 17q23 (Εικόνα 7 RNA Biol. 2011 Sep-Oct; 8(5): 706–713).

Εικόνα 7. miRNA - 21



Η παραγωγή του ρυθμίζεται κυρίως σε 2 επίπεδα. Αρχικά το επίπεδο μεταγραφής επηρεάζει την παραγωγή του pri-mRNA. Έχει αποδειχθεί ότι βακτηριακές και ιογενείς μολύνσεις αυξάνουν την παραγωγή pri-mRNA, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών που αυξάνουν την μεταγραφή του pri-mRNA. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η AP-1, Ets/PU, C/EPBα.

NFI, SRF, p53 και STAT3 (98, 99). Δεύτερον, στο μετα- μεταγραφικό επίπεδο επηρεάζονται τα επίπεδα του miRNA-21 κυρίως μέσω της επίδρασης του παράγοντα TGF-β (transforming growth factor beta). Ο TGF-β έχει αναγνωρισθεί ως παράγοντας που συμβάλλει στην ενεργοποίηση των ηπατικών αστρικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της ίνωσης, ο TGF-β συσσωματώνεται με πρωτεΐνες SMAD και επηρεάζει τη λειτουργία του ενζύμου DROSHA που προκαλεί αύξηση της παραγωγής του pre -miRNA -21 και κατ' επέκταση του ώριμου mRNA-21 αντιγράφου (100).

Το miRNA -21 έχει καθιερωθεί ως ογκογόνο miRNA και είναι το μόνο που υπερεκφράζεται σε καρκίνους οργάνων όπως του πνεύμονα, του στήθους, του στομάχου, του προστάτη, του κόλον και του παγκρέατος (101). Επιπλέον, έχει προταθεί ως βιοδείκτης κακοήθειας στην κυκλοφορία, το σάλιο, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τα κόπρανα (102). Τα αποτελέσματα ερευνών σε ποντίκια δείχνουν υποχώρηση των όγκων όταν το miRNA -21 αδρανοποιείται, αποδεικνύοντας έτσι την ογκογόνο δράση του (103).

Πρόσφατες έρευνες επισημαίνουν το ρόλο του miRNA -21 στη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Ο Lu και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση του miRNA -21 στους πνεύμονες επηρεάζει τη μειωμένη έκφραση της IL- 12 στο άσθμα, μιας κυτοκίνης που προέρχεται απ' τα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα και σχετίζεται με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού (104).

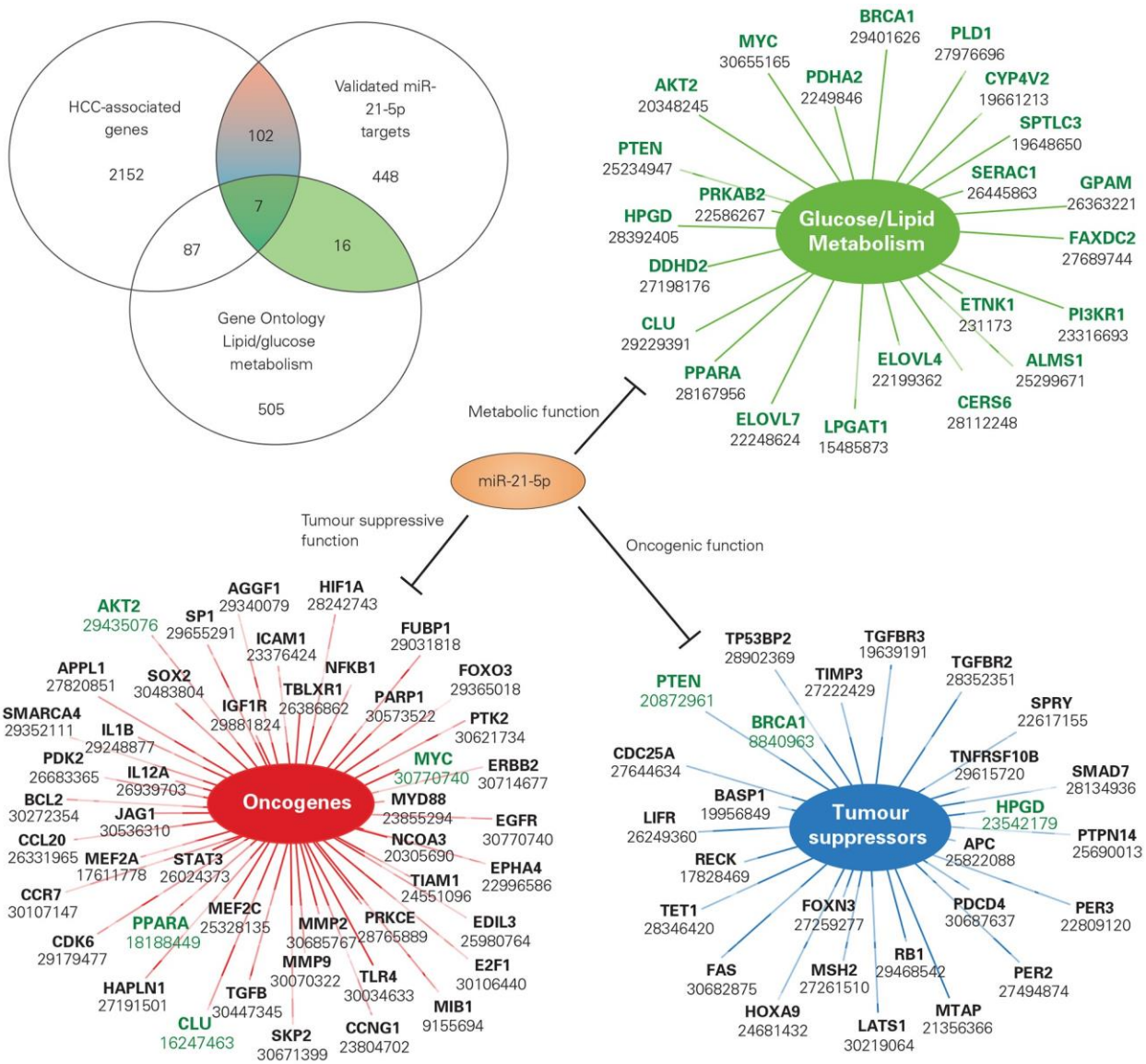
Άμεση είναι η σχέση του miRNA -21 και με την εμφάνιση καρδιοπάθειας και υπέρτασης. Γονίδια που εμπλέκονται στη λειτουργία των νεφρών και την εμφάνιση υπέρτασης όπως το COLI2AI, το ASPN και το SCN2A είναι στόχοι του miRNA -21 (105). Μελέτες υβριδισμού έδειξαν ότι το miRNA -21 αυξάνεται στην ισχαιμία και ιδιαίτερα στις περιοχές εμφράγματος (106). Στα καρδιακά μυοκύτταρα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και η συμβολή του στην καρδιακή νόσο γίνεται μέσω της ρύθμισης της μεταλλοπρωτεΐνης PTEN (107). Η υποξία και η παρουσία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) είναι οι κύριοι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του miRNA -21 στην καρδιά (108).

1.7.4.2 miRNA-21 και NAFLD

Το miRNA-21 είναι αυτό που εκφράζεται περισσότερο στα ηπατοκύτταρα τόσο ανθρώπων όσο και ζωικών μοντέλων. Τα επίπεδά του είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε ασθενείς με NASH και συνδέονται ιδιαίτερα με την παρουσία οξειδωτικού στρες (109). Στον άνθρωπο η δραστικότητα του miRNA-21 στο ήπαρ επηρεάζεται απ' την παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων και στεατογόνων στελεχών του HCV (110). Πολλές έρευνες έχουν σκιαγραφήσει τον ογκογόνο

ρόλο του στο ήπαρ και την επίδραση του στον ηπατικό μεταβολισμό και τη φλεγμονή. Οι μηχανισμοί με τους οποίους εμπλέκεται στην παθογένεση της NAFLD αφορούν στη στόχευση και στη σίγαση γονιδίων που σχετίζονται κυρίως με το μεταβολισμό και τη σύνθεση λιπιδίων. Ένας τέτοιος στόχος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας PPαRα που επάγει την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την β- οξείδωση και προάγουν τη λιπογένεση (111). Άλλοι στόχοι του miRNA-21 είναι η πρωτεΐνη SREBP-1 που ρυθμίζει την ομοιόσταση της χοληστερόλης και λιπαρών οξέων, η HMG-CoA ρεδουκτάση, ένζυμο απαραίτητο για την παραγωγή χοληστερόλης και ισοπρενοϊδών λιπαρών οξέων και η πρωτεΐνη δέσμευσης λιπαρών οξέων FABP7 που ρυθμίζει τα επίπεδα λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα (112).

Εικόνα 8. Οι στόχοι του miRNA - 21 που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την καρκινογένεση στο ήπαρ



Η εμπλοκή του miRNA-21 στον ηπατικό καρκίνο εξηγείται μέσω της μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης PTEN, έναν βασικό καταστολέα όγκων. Η μειωμένη έκφρασης της PTEN συναντάται στην ηπατική στεάτωση τόσο ανθρώπων όσο και ζωικών μοντέλων (113). Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 8 (Gut 2019;0:1–15) υπάρχουν ακόμη πολλοί στόχοι του miRNA-21 που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκινογένεσης στο ήπαρ.

1.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ NAFLD

Η διάγνωση της NAFLD γίνεται συνήθως, τυχαία σε ασυμπτωματικούς ασθενείς στα πλαίσια ενός βιοχημικού ελέγχου ρουτίνας ή ενός υπερήχου που πραγματοποιείται για άλλο λόγο. **Η βιοψία ήπατος** είναι αναμφίβολα η μέθοδος αναφοράς για τη διαπίστωση της διάγνωσης και την εκτίμηση της φλεγμονής και της ίνωσης. Αν και η βιοψία ήπατος είναι σχετικά ασφαλής όταν πραγματοποιείται από έμπειρους γιατρούς, έχει μικρή αποδοχή από τους ασθενείς, δεν είναι ακίνδυνη και είναι δύσκολα επαναλήψιμη. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μη επεμβατικές μέθοδοι διάγνωσης της νόσου που αναλύονται στη συνέχεια.

1.8.1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Στον βιοχημικό έλεγχο για NAFLD έχουν αναπτυχθεί μη επεμβατικοί δείκτες που χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: i) απλοί ή έμμεσοι δείκτες ορού που περιλαμβάνουν βιοχημικές εξετάσεις ρουτίνας και ii) άμεσοι δείκτες ορού που περιλαμβάνουν προϊόντα δημιουργίας ή αποδόμησης του κολλαγόνου όπως το υαλουρονικό οξύ, οι κολλαγενάσες και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-b (TGF-b) (114). Οι άμεσοι δείκτες παρουσιάζονται ως καλύτεροι απ' τους έμμεσους, όμως η ευαισθησία τους είναι χαμηλή στα αρχικά στάδια της ίνωσης και δεν είναι πάντα διαθέσιμοι στα περισσότερα εργαστήρια. Στους έμμεσους δείκτες ορού συγκαταλέγονται τα ένζυμα αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST), γ-γλουταμιλοτρανσπεπτιδάση (γ-GT) και αλκαλική φωσφατάση (ALP). Αυξημένα επίπεδα ALT και AST υποδηλώνουν ηπατική βλάβη. Η αύξηση δεν είναι ανάλογη της ηπατικής φλεγμονής / ίνωσης και οι ασθενείς με σημαντική ίνωση μπορεί να έχουν φυσιολογικές τρανσαμινάσες (115). Ο λόγος AST/ALT υπό φυσιολογικές συνθήκες και απουσία της νόσου είναι 0.8 κατά προσέγγιση. Τιμή της αναλογίας του λόγου AST/ALT μεγαλύτερης του 1 σχετίζεται με ηπατική βλάβη και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου. Συχνά αυξημένα επίπεδα φερριτίνης ορού,

βρίσκονται σε ασθενείς με NAFLD τα οποία όμως δεν μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστο δείκτη για τη νόσο από μόνα τους (116).

1.8.2 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Στις απεικονιστικές μεθόδους συγκαταλέγονται το υπερηχογράφημα (US), η αξονική τομογραφία (CT), η ελαστογραφία και η μαγνητική τομογραφία (MRI) – μαγνητική φασματοσκοπία (MRS). Το υπερηχογράφημα είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος διάγνωσης καθώς είναι οικονομική, δεν εκθέτει τους ασθενείς σε ακτινοβολία και είναι επαναλήψιμη . Η μέθοδος στηρίζεται στην αυξημένη ηχογένεια του ηπατικού παρεγχύματος λόγω της συσσώρευσης λίπους. Με την ελαστογραφία μετράται η δυσκαμψία του ήπατος μέσω υπερήχων. Η κύρια αδυναμία των δύο αυτών τεχνικών έγκειται στο γεγονός ότι χαρακτηρίζονται από χαμηλή ευαισθησία για την ήπια στεάτωση, και δεν μπορούν να ποσοτικοποιήσουν με ακρίβεια τη λιπώδη διήθηση. Η μαγνητική τομογραφία και η μαγνητική φασματοσκοπία αποτελούν πιο ευαίσθητες μεθόδους διάγνωσης της νόσου σε σχέση με την CT και την US καθώς μπορούν να ανιχνεύσουν και πολύ χαμηλά επίπεδα στεάτωσης (<5%)(117).

1.8.3 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ

Πρόκειται για υπολογιστικά συστήματα πρόβλεψης που συνδυάζουν εργαστηριακές (συνήθως βιοχημικές) παραμέτρους και μη εργαστηριακές για την εκτίμηση του βαθμού της ηπατικής ίνωσης. Το πιο αξιόπιστο σύστημα πρόβλεψης είναι το NAFLD Fibrosis Score (NFS) ενώ άλλα μοντέλα που χρησιμοποιούνται είναι το Fibrotest, το FIB-4, το NASH Score και το Fatty Liver Index (FLI) (115).

1.9 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD

1.9.1 ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ

Οι αλλαγές του τρόπου ζωής όπως η διατροφή, η άσκηση και η απώλεια βάρους είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης και θεραπείας της NAFLD.

Από τα δεδομένα ερευνών φαίνεται ότι η απώλεια βάρους είναι το κλειδί για τη βελτίωση των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών της NASH (118). Στους υπέρβαρους ασθενείς με NAFLD η μείωση 5 – 10 % του σωματικού βάρους προκαλεί μείωση κατά 20 – 80 % των ηπατικών τριγλυκεριδίων και των αμινοτρανσφερασών, ενώ η ιδανική απώλεια βάρους φαίνεται να είναι

0.5- 1.0 κιλό / βδομάδα καθώς μεγαλύτερη απώλεια βάρους και δίαιτες πολύ χαμηλών θερμίδων έχουν σχετιστεί με επιδείνωση της ίνωσης παρά τη μείωση της ηπατικής στεάτωσης (119).

Το περιεχόμενο της υποθερμιδικής δίαιτας όπως και η κατανάλωση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών έχουν ιδιαίτερη σημασία για τους ασθενείς με NAFLD. Μια δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και συνεπώς στην ανάπτυξη ηπατικής φλεγμονής, ενώ η υψηλή κατανάλωση trans λιπαρών οξέων αυξάνει τη συσσώρευση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Σημαντικός είναι και ο περιορισμός της κατανάλωσης απλών υδατανθράκων, ζάχαρης και φρουκτόζης που όπως έχει ήδη αναφερθεί αυξάνουν τη λιπογένεση και τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα (120, 121).

Μια βασική πτυχή της διαχείρισης της NAFLD είναι η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής όπως προβιοτικά, ω-3 λιπαρά οξέα και βιταμίνες. Σε διάφορες μεταναλύσεις η συμπλήρωση της διατροφής με προβιοτικά μείωσε τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και προφλεγμονωδών κυτοκινών και βελτίωσε την ηπατική εικόνα υπερήχων σε ασθενείς με NAFLD (122, 123). Ωστόσο η επίδραση των προβιοτικών στην NAFLD ποικίλει ανάλογα με τα βακτηριακά στελέχη και τη θεραπευτική αγωγή (123). Αντίστοιχα η πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα ηπατικής στεάτωσης, ενώ η κατανάλωση βιταμινών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη Ε και C σχετίζεται με μειωμένη δυσκαμψία ήπατος και μειωμένα επίπεδα ALT και AST στον ορό (124). Παρόλα αυτά υπάρχουν ακόμη ερωτηματικά για την κατανάλωση συμπληρωμάτων βιταμίνης Ε καθώς η μακροχρόνια πρόσληψή τους έχει τοξική επίδραση στον οργανισμό,

Η άσκηση ανεξάρτητα απ' το είδος (αερόβια / με αντιστάσεις), την ένταση και την απώλεια βάρους που προκαλεί, έχει ιδιαίτερη σημασία στη βελτίωση της NAFLD. Πολυάριθμες μελέτες συνδέουν τη φυσική δραστηριότητα με τη βελτίωση του μεταβολικού προφίλ των λιπιδίων και των ηπατικών ενζύμων, την αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και τη μείωση των χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου (Mets) (125, 126).

1.9.2 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

Η έλλειψη συγκεκριμένων φαρμακολογικών συστάσεων με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα καθιστά τη διαχείριση της NAFLD περίπλοκη διαδικασία. Ως εκ τούτου η θεραπεία επικεντρώνεται στις συνυπάρχουσες ασθένειες (διαβήτη, παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία) για τον έλεγχο της γλυκαιμίας του ασθενούς, της ηπατικής λειτουργίας και του λιπιδαιμικού προφίλ. Η φαρμακολογική θεραπεία συνιστάται για άτομα που δεν επιτυγχάνουν τους αναμενόμενους

στόχους απώλειας βάρους και για άτομα με NASH και στάδιο ίνωσης >2 (F-2) σε βιοψία ήπατος (118).

1.10 ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

1.10.1 Η ΠΟΛΥΤΙΜΗ ΡΗΤΙΝΗ

Το μαστιχόδεντρο είναι ένας αειθαλής θάμνος της οικογένειας Anacardaceal ύψους 2-3 μέτρων, που αναπτύσσεται αργά και ολοκληρώνει την πλήρη ανάπτυξή του μετά από 40 – 50 χρόνια φτάνοντας μέχρι και τα 5 μέτρα στα ηλικιωμένα φυτά. Μαστιχόδεντρα υπάρχουν σ' όλες τις παραμεσόγειες χώρες όμως μόνο στη νότια Χίο καλλιεργούνται συστηματικά και παράγουν μαστίχα, γεγονός που αποδίδεται στα ιδιαίτερα εδαφολογικά και κλιματολογικά χαρακτηριστικά της περιοχής (127) (Εικόνα 9).

Εικόνα 9. Το μαστιχόδεντρο

Η μαστίχα Χίου (ΜΧ) είναι η ρητινώδης ουσία που εξέρχεται απ' τον κορμό και τα κλαδιά του μαστιχόδεντρου κατά το χάραγμα πολλαπλών σημείων στίξης απ' τους καλλιεργητές. Περιέχει πληθώρα βιοδραστικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων φαινολικών ενώσεων, φυτοστερολών και τερπενίων. Οι θεραπευτικές ιδιότητές της είναι γνωστές εδώ και 2500 χρόνια και αρχαίοι Έλληνες γιατροί όπως ο Διοσκουρίδης και ο Γαληνός συνιστούσαν τη χρήση της μαστίχας για τη θεραπεία των διαταραχών του στομάχου (128).

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων έχει αναγνωρίσει τη μαστίχα ως φυτικό φαρμακευτικό προϊόν για τη θεραπεία ήπιων δυσπεπτικών διαταραχών, μικροφλεγμονών της επιδερμίδας και ως βοήθημα για την επούλωση τραυμάτων (128).

1.10.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

1.10.2.1 Αντιμικροβιακή δράση

Το 1995 περιγράφεται για πρώτη φορά η αντιμικροβιακή δράση του μαστιχέλαιου κατά τη διαδικασία σήψης των τροφίμων και κατά των μικροοργανισμών που απαντώνται σε τρόφιμα. Διαπιστώθηκε πως η προσθήκη ρητίνης μαστίχας ανέστειλε την ανάπτυξη βακτηρίων Gram(+) και Gram(-) (129). Αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν τη δράση της ΜΧ έναντι του *Helicobacter pylori* ενός Gram(-) αερόβιου βακτηρίου που ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας ενεργούς γαστρίτιδας, εξέλκωσης και ατροφίας του στομάχου. Ο Κοττάκης και οι συνεργάτες του έδειξαν πως οι ασθενείς- φορείς του *Helicobacter pylori* που λάμβαναν 1 γρ μαστίχας ημερησίως επί 2 μήνες επηρέασαν τη βιωσιμότητα του βακτηρίου (130).

Σήμερα λόγω της επιβεβαιωμένης αντιμικροβιακής δράσης της, η μαστίχα αποτελεί βασικό συστατικό των νημάτων για ράμματα, χρησιμοποιείται ως συστατικό στις οδοντόκρεμες και ως συστατικό του σφραγίσματος των δοντιών και των εκμαγείων.

1.10.2.2 Αντικαρκινική δράση

Αρκετές είναι οι μελέτες που επιβεβαιώνουν την προστατευτική δράση της μαστίχας έναντι του καρκίνου του προστάτη και του παχέος εντέρου. Το 2007, ο He και οι συνεργάτες του έδειξαν πως η μαστίχα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων PC-3 μέσω της παρεμπόδισης έκφρασης της πρωτεΐνης NF-kB και ενισχύει την έκφραση της μασπίνης, μιας κατασταλτικής για τους όγκους του προστάτη πρωτεΐνης, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA (131). Την ίδια χρονιά διαπιστώθηκε πως ένα αιθανολικό εκχύλισμα μαστίχας αναστέλλει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό και επάγει το θάνατο των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου HCT116 (132). Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της ΜΧ, γεγονός που ενθαρρύνει τη χρήση της ως συστατικό φαρμακευτικών και άλλων σκευασμάτων.

1.10.2.3 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή περιλαμβάνει μια σειρά μοριακών και κυτταρικών αντιδράσεων (φαγοκυττάρωση, χημειοταξία, διαχωρισμό των κυττάρων) οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, καρκίνο και αυτοάνοσες διαταραχές (128). Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αντιφλεγμονώδη δράση της MX την οποία αποδίδουν στη μεγάλη ποικιλία τερπενίων που περιέχει όπως το ολεανόνιο, το ευφάνιο, η λουπεόλη, η α-τοκοφερόλη και οι πολυφαινόλες (133). Μελέτη που διεξήχθη το 2007 σε ασθενείς με νόσο Crohn που λάμβαναν 2,2 γρ MX ημερησίως για ένα μήνα έδειξε μείωση στα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής IL-6 και CRP και βελτίωσε την κλινική εικόνα των ασθενών (134). Τα αποτελέσματα άλλων ερευνών σε ανθρώπους και ποντίκια επιβεβαιώνουν την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση της, αποδίδοντας την στην αναστολή του NF- κB ενός μορίου κλειδιού στην ανάπτυξη φλεγμονής (128).

1 .10.2.4 Καρδιοπροστατευτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των τερπενίων της MX προστατεύει το καρδιαγγειακό σύστημα των ανθρώπων μέσω της αποτελεσματικής μείωσης των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό και της αναστολής της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν σε μελέτες ασθενών με υπερλιπιδαιμία οι οποίοι μετά από κατανάλωση μαστίχας 5 γρ την ημέρα βελτίωσαν το λιπιδαιμικό τους προφίλ (135).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να συγκριθούν τα επίπεδα του miRNA-21 σε ασθενείς με NAFLD/NASH με βάση το στάδιο της νόσου και να συσχετιστούν με βιοχημικές, ανθρωπομετρικές και κλινικές παραμέτρους. Σε δεύτερο επίπεδο σκοπός είναι να αξιολογηθούν τα επίπεδα του miRNA-21 σε ασθενείς με NAFLD/NASH, μετά από διατροφική παρέμβαση με φυσικό συμπλήρωμα μαστίχας Χίου.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά δεδομένα εθελοντών από δύο μελέτες, την μελέτη MAST4HEALTH, μία πολυκεντρική διπλά τυφλή μελέτη, που αξιολόγησε την φαρμακολογική χρήση της μαστίχας σε άτομα με NASH και την μελέτη "Παχυσαρκία και μεταβολικό σύνδρομο: διατροφική παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα σε λιπώδη διήθηση του ήπατος (NAFLD/NASH) –Διερεύνηση μοριακών μηχανισμών δράσης", μία συγχρονική επιδημιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο σε συνεργασία με το Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών (μελέτη NAFLD).

Ο συνολικός πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν 148 άτομα, από τους οποίους οι 83 ήταν εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη MAST4HEALTH (από αυτούς 38 μπήκαν σε παρέμβαση με το συμπλήρωμα διατροφής μαστίχας Χίου στο ελληνικό κέντρο, 30 στο κέντρο της Σερβίας) και οι 65 αποτέλεσαν εθελοντές από την μελέτη NAFLD.

3.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ - ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ

Κριτήρια επιλογής μελέτης NAFLD

- Ύπαρξη λιπώδους νόσου του ήπατος μετά από υπερηχογραφική εξέταση
- Ενήλικες άνω των 18 χρονών
- Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ): 22-39 kg/m^2
- Σταθερό σωματικό βάρος τους τελευταίους 6 μήνες-αποχή από πρόγραμμα απώλειας βάρους

Κριτήρια αποκλεισμού μελέτης NAFLD

Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν η κατανάλωση >30g αιθανόλης την ημέρα για τους άνδρες και >20 g για τις γυναίκες, η ύπαρξη ηπατίτιδας, αυτοάνοσων νόσων του ήπατος, καθώς και η λήψη ηπατοξικών φαρμάκων. Επιπλέον, άτομα με πρώτου βαθμού συγγένεια απορρίφθηκαν από την τρέχουσα μελέτη.

Τα κριτήρια συμμετοχής και αποκλεισμού των εθελοντών στη μελέτη MAST4HEALTH είναι τα εξής:

Κριτήρια επιλογής μελέτης MAST4HEALTH

- Διαγνωσμένη NAFLD/NASH με μαγνητική τομογραφία ήπατος με τη χρήση του πρωτοκόλλου LiverMultiScan (Αν η εξατομικευμένη συνολική τιμή του LIF score είναι > 2 ή τουλάχιστον 2 εκ των εξεταζόμενων τμημάτων (slices) του ήπατος εμφανίζουν LIF score μεταξύ των τιμών 2 και 3 σε ποσοστό > 30% με ταυτόχρονη παρουσία λίπους σε ποσοστό > 5,6%, τότε ο εκάστοτε εθελοντής θεωρείται επιλέξιμος για τη μελέτη).
- Ηλικία: 18-65 ετών
- BMI: >30kg/m2

Κριτήρια αποκλεισμού μελέτης MAST4HEALTH

- Συστηματική κατανάλωση αλκοόλ (>20γρ/ημέρα για τις γυναίκες και >30γρ/ημέρα για τους άντρες) ή/και ουσιών
- Χρήση φαρμάκων που προκαλούν στεάτωση
- Διάγνωση Ηπατίτιδας Β, C, κάποιας αυτοάνοσης ηπατικής νόσου, συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, κληρονομικών ηπατικών παθήσεων (ασθένειας Wilson, αιμοχρωμάτωσης, κ.α)
- Μη ρυθμισμένος σακχαρώδης διαβήτης τους τελευταίους 3 μήνες πριν την ένταξη στη μελέτη (τιμές HbA1c > 7 %)
- Λήψη προβιοτικών, συμπληρωμάτων διατροφής, αντιφλεγμονωδών, ρυθμιστών ψυχολογικής διάθεσης κατά τη διάρκεια της μελέτης και έως 2 μήνες πριν την ένταξη στη μελέτη
- Ύπαρξη επιβεβαιωμένης συστηματικής νόσου η οποία δεν ρυθμίζεται με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή
- Λήψη αντιβιοτικών φαρμάκων κατά τη διάρκεια και έως 2 μήνες πριν την ένταξη στη μελέτη
- Πρόσφατη μεταβολή στο σωματικό τους βάρος ή προσπάθεια απώλειας βάρους κατά την παρέμβαση
- Εγκυμοσύνη, Θηλασμός
- Αυστηρή χορτοφαγία, Γαλακτο-χορτοφαγία, Ωο-γαλακτο-χορτοφαγία
- Ψυχιατρική ή πνευματική διαταραχή

3.3 ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ MAST4HEALTH

Οι εθελοντές συναντούν, κατόπιν συνεννόησης, το ερευνητικό προσωπικό στο κέντρο Μεταβολικής Μονάδας στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο μετά από 12ωρη νηστεία. Αυτοί που εξασφαλίζουν τα κριτήρια εισόδου στη μελέτη χωρίζονται σε 2 ομάδες: α) placebo και β) verum. Κάθε συμμετέχοντας λαμβάνει κατά την έναρξη της μελέτης 1 κουτί στο οποίο περιέχονται 2 συσκευασίες, με συνολική περιεκτικότητα 180 κάψουλες. Τα κουτιά είναι πανομοιότυπα, οι κάψουλες έχουν ίδιο σχήμα, μέγεθος και χρώμα και επαρκούν για 1 μήνα. Οι εθελοντές, το ερευνητικό προσωπικό και οι αναλυτές προγραμμάτων πληροφορικής αγνοούν την ταυτότητα των σκευασμάτων (placebo ή verum) τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά τη διάρκεια της μελέτης για τη διασφάλιση της τυφλοποίησης και την ενίσχυση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων. Η παρέμβαση διαρκεί έξι (6) μήνες, κατά τη διάρκεια των οποίων οι εθελοντές λαμβάνουν 2,1γρ. μαστίχας ημερησίως σε κάψουλες των 350 mg/κάψουλα.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης πραγματοποιείται λήψη του ιατρικού και οικογενειακού ιστορικού, καταγράφονται τα ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά και γίνεται αιμοληψία για τη μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων καθώς και των επιπέδων του microRNA21 πριν και μετά την παρέμβαση.

3.4 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΜΜΟΡΦΩΣΗΣ

Η παρακολούθηση συμμόρφωσης των εθελοντών της μελέτης MAST4HEALTH αξιολογήθηκε με τη συμπλήρωση ενός μηνιαίου ημερολογίου κατανάλωσης δισκίων. Η παράλειψη της λήψης του συμπληρώματος για διάστημα τουλάχιστον 7 συνεχόμενων ημερών εξαιρεί τον εθελοντή απ' τη μελέτη. Επίσης, πραγματοποιούνται τηλεφωνικές επικοινωνίες κάθε 15μέρες για την ανίχνευση τυχόν παρενεργειών του σκευάσματος, τον έλεγχο της υγείας των εθελοντών και την πιθανή λήψη φαρμάκων ή συμπληρωμάτων διατροφής μετά την έναρξη της μελέτης.

3.5 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ

Αξιολογήθηκε η μέτρηση του αναστήματος και του σωματικού βάρους για τον υπολογισμό του δείκτη μάζας σώματος, και η μέτρηση της περιφέρειας μέσης και της περιφέρειας ισχίου για τον υπολογισμό του λόγου περιφέρειας μέσης/ισχίου. Η μέτρηση του σωματικού βάρους έγινε με

τον ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας TANITA SC-330, ο οποίος χρησιμοποιείται και για την ανάλυση σύστασης σώματος. Οι περίμετροι μέσης και ισχίου μετρήθηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.

3.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ – ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ NAFLD

Η διάγνωση έγινε με την χρήση υπερηχογραφήματος άνω κοιλίας για τους εθελοντές της μελέτης NAFLD από Ακτινολόγο Ιατρό του Λαϊκού Νοσοκομείου. Η στεάτωση του ήπατος αξιολογήθηκε και ταξινομήθηκε σε 4 βαθμίδες, 17 εθελοντές είχαν βαθμό 0 στον υπέρηχο που αντιστοιχεί σε φυσιολογική ηχογένεια, 16 βαθμό 2 που αντιστοιχεί σε ήπια λιπώδη διήθηση, 19 βαθμό 2 που αντιστοιχεί σε μέτρια λιπώδη διήθηση και 13 βαθμό 3 που αντιστοιχεί σε σοβαρή λιπώδη διήθηση. Για τους εθελοντές της μελέτης MAST4HEALTH η διάγνωση έγινε με μαγνητική τομογραφία ήπατος με τη χρήση του πρωτοκόλλου LiverMultiScan. Το LiverMultiScan είναι μη επεμβατικό, μετρά το σίδηρο, το ηπατικό λίπος και ποσοτικοποιεί τη φλεγμονή και την ίνωση υπολογίζοντας ένα σκορ, το οποίο ονομάζεται LIF-score (Liver, Inflammation and Fibrosis score). Η κατηγοριοποίηση του LIF-score βασίζεται στο σύστημα σταδιοποίησης Ishak, όπου η απουσία ίνωσης αντιστοιχεί στο στάδιο F0, η ήπια ίνωση στα στάδια F1-F2, η μετρίου βαθμού ίνωση στα στάδια F3-F4 και η σοβαρού βαθμού στα στάδια F5-F6. 68 εθελοντές θεωρήθηκαν επιλέξιμοι για την παρέμβαση με συμπλήρωμα επειδή η συνολική τιμή του LIF- score τους ήταν > 2 ή τουλάχιστον 2 εκ των εξεταζόμενων τμημάτων (slices) του ήπατος εμφάνιζαν LIF- score μεταξύ των τιμών 2 και 3 σε ποσοστό > 30% με ταυτόχρονη παρουσία λίπους σε ποσοστό > 5,6%, ενώ 15 εθελοντές που το LIF- score τους ήταν μικρότερο του 2 αποκλείστηκαν απ’ την παρέμβαση και θεωρήθηκαν ως control.

Για την αξιολόγηση της ηπατικής ίνωσης χρησιμοποιήθηκαν το NAFLD FIBROSIS SCORE (NFS) και το FIB-4. Το μοντέλο NFS λαμβάνει υπόψη 7 μεταβλητές: ηλικία, ύπαρξη διαβήτη, BMI, AST, ALT, αριθμό αιμοπεταλίων και αλβουμίνη. Τιμές μεγαλύτερες από 0,676 αντιστοιχούν σε σημαντική ίνωση (επίπεδα ίνωσης F3-F4 βάση της κατηγοριοποίησης κατά Brunt et al.), ενώ για τιμές μικρότερες από -1,455 απουσιάζει η ίνωση (επίπεδα ίνωσης F0-F2). Ο αλγόριθμος FIB-4 υπολογίζει 4 παραμέτρους: την ηλικία, τον αριθμό αιμοπεταλίων και τις τιμές ALT και AST. Τιμές μικρότερες από 1,45 υποδηλώνουν μη εμφάνιση της νόσου, με ευαισθησία 81%, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 3,25 υποδηλώνουν NAFLD.

3.7. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ microRNAs

Χρησιμοποιήθηκε πλάσμα αίματος από εθελοντές για την μέτρηση των επιπέδων του hsa-miR-21-5p με τη χρήση της τεχνικής αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

- **Διαχωρισμός και συλλογή πλάσματος**

Ο διαχωρισμός του πλάσματος και του ορού έγινε με φυγοκέντρηση του αίματος στις 3000 στροφές/λεπτό, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C με τη φυγόκεντρο Eppendorf 5810R. Με τη βοήθεια πιπέτας απομακρύνθηκε ο υπερκείμενος ορός, η ενδιάμεση στοιβάδα που περιέχει τα λευκά αιμοσφαίρια (Buffy coat) και το πλάσμα σε φιαλίδια eppendorf.. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους - 80°C μέχρι την μετέπειτα χρήση τους.

- **Απομόνωση RNA από το πλάσμα**

Η απομόνωση RNA απ' το πλάσμα έγινε με το κιτ MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (ThermoFischer Scientific) που βασίζεται στην τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων.

Αρχή της μεθόδου

i) Απομόνωση ολικού RNA

- Προσθήκη πρωτεϊνάσης Κ στα δείγματα πλάσματος. Η προσθήκη της πρωτεϊνάσης Κ απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA. Αποικοδομούνται οι κυτταρικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και οι ιστόνες, και διευκολύνεται η απομόνωση καθαρού DNA
- Λύση των κυτταρικών μεμβρανών με το μίγμα Lysis
- Ανάμειξη του διαλύματος με τα μαγνητικά σφαιρίδια τα οποία δεσμεύουν το RNA
- Συνεχείς πλύσεις του RNA επί των μαγνητικών σφαιριδίων χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια Wash Solution 1 και 2
- Προσθήκη TURBO Dnase ώστε να αποικοδομηθεί το DNA
- Επανασύνδεση του RNA στα μαγνητικά σφαιρίδια
- Συνεχείς πλύσεις του RNA επί των μαγνητικών σφαιριδίων χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Wash Solution 2
- Χρήση του αντιδραστηρίου Elution Solution και παραλαβή- απομάκρυνση του RNA, από τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Διατήρηση του RNA στους -80 °C

ii) Έλεγχος συγκέντρωσης RNA – αραίωση

Η συγκέντρωσή του απομονωμένου RNA ελέγχθηκε με το νανοφωτόμετρο Nanophotometer V2.3.0 και βρέθηκε 2 ng/μl. Το δείγμα RNA ήταν ποσότητα υψηλής ποιότητας και καθαρότητας σύμφωνα με τις οδηγίες πρωτοκόλλου ανάστροφης μεταγραφής, για τη χρησιμοποίησή του στα επόμενα πειραματικά στάδια. Ακολούθησε αραίωση των δειγμάτων με απεσταγμένο νερό.

- **Μετατροπή RNA σε cDNA**

Η μετατροπή του ολικού RNA σε συμπληρωματικό DNA διεξήχθη σε 4 στάδια με την χρήση του πακέτου TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά παρασκευάστηκε **η PolyAουρά** μέσω της αντίδρασης της πολύ-αδενυλίωσης του RNA, διαδικασία που απαιτεί 55 λεπτά χρόνο και κατάλληλες θερμοκρασίες (37 °C για 45 λεπτά και 65 °C για 10 λεπτά). Στο επόμενο στάδιο προστέθηκε ο **αντάπτορας σύνδεσης**. Στην συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται το ένζυμο RNA λιγάση, ο αντάπτορας, καθώς και ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, νερό και το PEG 8000. Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 16 °C για 60 λεπτά. Ακολούθησε η αντίδραση της **ανάστροφης μεταγραφής** PCR για την δημιουργία του συμπληρωματικού DNA. Τα αντιδραστήρια αυτού του σταδίου αποτελούν το ειδικό ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα για την RT, ένας μη ειδικός εκκινητής, μείγμα dNTP και νερό. Η αντίδραση διαρκεί 15 λεπτά στους 42°C και επιπρόσθετα 5 λεπτά για την παύση της στους 85 °C. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η **ενίσχυση των microRNAs**. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιείται ειδικό μείγμα εκκινητών για στοχευμένη ενίσχυση των micrRNAs, καθώς και ειδικό μείγμα αντιδραστηρίων και νερό. Η αντίδραση ξεκινά στους 95°C για 5 λεπτά για την ενεργοποίηση του ενζύμου και ακολουθείται από 14 κύκλους διάστασης των αλυσίδων του cDNA και επιμήκυνση των μεταγράφων. Για να σταματήσει η αντίδραση το μείγμα παραμένει στους 99 °C για 10 λεπτά.

- **Ποσοτικοποίηση του cDNA με Realtime-PCR**

Η μέτρηση των επιπέδων του hsa-miR-21-5p πραγματοποιήθηκε με την χρήση της μεθόδου RT-PCR. Με τη μέθοδο αυτή η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας**.** Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι το Step One Plus TM System της εταιρίας Thermo Fisher Scientific. Αρχικά παρασκευάστηκε ένα

μείγμα 10 μL TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 1 μL TaqMan® Advanced miRNA Assay και 4 μl νερού. Το μίγμα περιείχε ειδικούς εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του κάθε υπό μελέτη miRNA. 15 μL μίγματος τοποθετήθηκαν μαζί με 5 μL προϊόντος της ανάστροφης PCR, που έχει προηγουμένως αραιωθεί με νερό. Στη συνέχεια τα παρασκευασθέντα 20 μL μεταφέρθηκαν στο μηχάνημα της RT-PCR για ανάλυση.

Για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε 'κανονικοποίηση'' των αποτελεσμάτων για την έκφραση του hsa-miR-21-5p με την χρήση εξωγενούς microRNA, cel-miR-39-3p και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως σχετική ποσότητα (RQ) σε σύγκριση με ένα δείγμα αναφοράς (reference sample).

3.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS statistics, έκδοση 21.0. Ελέγχθηκε αν όλες οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή, με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Για όσες μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν τα παραμετρικά τεστ, ενώ για όσες μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικά τεστ. Οι κατηγορικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως ποσοστά, δηλαδή συχνότητα (%), ενώ οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Για τη συσχέτιση μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος κατά Spearman και για την περιγραφή των στατιστικά σημαντικών σχέσεων εφαρμόστηκαν μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης. Για τη σύγκριση των μέσων όρων δυο ή περισσοτέρων ποσοτικών μεταβλητών στις κατηγορίες μιας ποιοτικής μεταβλητής χρησιμοποιήθηκε το Independent sample t-test και η ANOVA αντίστοιχα. Για τη σύγκριση των επιπέδων του microRNA-155 πριν και μετά την παρέμβαση χρησιμοποιήθηκε το paired sample t-test και για τη σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων της παρέμβασης χρησιμοποιήθηκε η ANCOVA. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις αναλύσεις ορίστηκε ως $p<0,05$.

3.9 ΒΙΟΗΘΙΚΗ

Τα ερευνητικά πρωτόκολλα των παραπάνω μελετών έχουν λάβει έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

4.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ NAFLD

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των εθελοντών που έλαβαν μέρος στη συγκεκριμένη μελέτη. Ο πληθυσμός της μελέτης NAFLD είναι 65 άτομα απ' τα οποία τα 17 αποτελούν την ομάδα ελέγχου με φυσιολογική ηχογένεια (βαθμός 0 στον υπέρηχο), 16 με ήπια λιπώδη διήθηση (βαθμός 1 στον υπέρηχο), 19 με μέτρια λιπώδη διήθηση (βαθμός 2 στον υπέρηχο) και 13 με σοβαρή λιπώδη διήθηση (βαθμός 3 στον υπέρηχο).

Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 43,8 ± 9,2 έτη για την ομάδα ελέγχου, 54,0 ± 6,4 έτη για την ομάδα με ήπια λιπώδη διήθηση, 51 ± 8,2 έτη για την ομάδα με μέτρια λιπώδη διήθηση και 53 ± 9,6 έτη για την ομάδα με σοβαρή λιπώδη διήθηση. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των ομάδων με μέτρια και σοβαρή λιπώδη διήθηση.

Ως προς το BMI, ο μέσος όρος του φαίνεται να αυξάνει με την επιδείνωση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα ο μέσος όρος του στην ομάδα ελέγχου ήταν 25,8 ± 3,3, στην ομάδα με ήπια λιπώδη διήθηση 26,3 ± 3, στην ομάδα με μέτρια λιπώδη διήθηση 30 ± 8,2 και στην ομάδα με σοβαρή λιπώδη διήθηση 33,1 ± 4,9. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο BMI μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων με μέτρια και σοβαρή λιπώδη διήθηση καθώς και μεταξύ της ομάδας με ήπια λιπώδη διήθηση και των ομάδων με μέτρια και σοβαρή λιπώδη διήθηση .

Για τον λόγο της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχίου η ομάδα ελέγχου είχε μέσο όρο 0,87± 0,07, η ομάδα με ήπια λιπώδη διήθηση είχε μέσο όρο 0,86 ± 0,16, η ομάδα μέτρια λιπώδη διήθηση είχε μέσο όρο 0,95 ± 0,82 και η ομάδα με σοβαρή λιπώδη διήθηση είχε μέσο όρο 0,94 ± 0,67. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, μόνο μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με μέτρια λιπώδη διήθηση.

Πίνακας 2. Περιγραφικά χαρακτηριστικά μελέτης NAFLD

	* (0-1) ** (0-2)	*** (0-3)	* (1-2)	* (1-3) ** (2-3)	
	0 (N=17) (9Α 8Γ) (Βαθμός υπερήχου 0)	**1 (N=16)** (4Α 12 Γ) (Βαθμός υπερήχου 1)	**2(N=19)**(11Α 8Γ) (Βαθμός υπερήχου 2)	**3 (N=13)** (5Α 8Γ) (Βαθμός υπερήχου 3)	**p-value**
Ηλικία	43,8 ± 9,2 *, ***	54,0 ± 6,4 *	51,0 ± 8,2	53,0 ± 9,6 ***	**0,004**
BMI	25,8 ± 3,3 **, ***	26,3 ± 3,0 *, *	30,0 ± 2,9 **, *	33,1 ± 4,9 ***, *	**0,000**
WHR	0,85 ± 0,07 **	0,86 ± 0,16	0,95± 0,82 **	0,94 ± 0,67	**0,006**

P value< 0,05

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης NAFLD. Οι τιμές της HDL, της γ- GT και της ινσουλίνης δεν παρουσίασαν καμία στατιστικώς διαφορά μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Ο σίδηρος παρουσιάστηκε αυξημένος στην ομάδα με μέτρια λιπώδη διήθηση σε σχέση με την ομάδα με ήπια λιπώδη διήθηση ενώ η φερριτίνη αυξημένη στην ομάδα με σοβαρή λιπώδη διήθηση σε σχέση με την ομάδα με ήπια λιπώδη διήθηση. Η γλυκόζη φαίνεται να αυξάνεται με τη σοβαρότητα της νόσου, με ιδιαίτερα αυξημένη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και της ομάδας ατόμων με σοβαρή λιπώδη διήθηση. Η ολική χοληστερόλη όπως και η LDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια εμφανίζουν αυξημένη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και μέτριας λιπώδης διήθησης. Τα επίπεδα της AST και της ALT και της αλβουμίνης εμφανίζονται υψηλότερα στην ομάδα με σοβαρή λιπώδη διήθηση σε σχέση με την ομάδα με ήπια λιπώδη διήθηση, ενώ η αλβουμίνη εμφανίζεται επίσης ιδιαίτερα αυξημένη στη σοβαρή λιπώδη διήθηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος το HOMAIR παρουσιάζει σημαντική στατιστικώς αύξηση στην ομάδα με σοβαρή λιπώδη διήθηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 3. : Βιοχημικά χαρακτηριστικά μελέτης NAFLD

* (0-1) ** (0-2) *** (0-3) * (1-2) ⁑ (1-3) ⁂ (2-3)

Πίνακας 3. Βιοχημικά χαρακτηριστικά μελέτης NAFLD

	0 (N=17) (9Α 8Γ) (Βαθ. υπερήχου 0)	**1 (N=16) (4Α 12 Γ)** (Βαθ. υπερήχου 1)	**2 (N=19) (11Α 8Γ)** (Βαθ. υπερήχου 2)	**3 (N=13) (5Α 8Γ)** (Βαθ. υπερήχου 3)	**p-value**
Σίδηρος (μg/dl)	109,6 ± 32,7	84,0 ±27,0 *	114,8 ± 27,5 *	104,5 ± 29,7	**0,026**
Φερριτίνη (ng/dl)	99,0 ± 80,4	78,1 ±53,9 ⁑	101,8 ± 68,9	166,7 ± 128 ⁑	**0,050**
Γλυκόζη (mg/dl)	85,2 ± 8,2 ***	85,4 ± 4,6 ⁑	89,0 ± 8,3 ⁂	100,2 ± 12,1 ***, ⁑, ⁂	**0,000**
CHOL (mg/dl)	176,3 ± 34,5 **	200,6 ± 36,1	220,0 ± 27,7 **	199,7 ± 31,1	**0,002**
HDL (mg/dl)	52,6 ± 15,5	59,2 ± 16,1	49,7 ± 11,5	48,9 ± 11,5	0,153
LDL (mg/dl)	108,8 ± 23,8 **	124,5 ± 37,0	140,3 ± 27,3 **	119,7 ± 33,6	**0,026**
TG (mg/dl)	74,3 ± 43,8 **	84,1 ± 37,0	150,0 ±72,5 **	156,3 ± 94,3	**0,000**
AST (iu/l)	22,0 ± 3,2	18,7 ± 3,2 ⁑	21,9 ± 7,2	27,6 ± 10,5 ⁑	**0,006**
ALT (iu/l)	24,8 ± 10,1	17,0 ± 3,7 ⁑	28,0 ± 15,3	37,1 ± 19,3 ⁑	**0,002**
γ- GT(iu/l)	22,4 ± 14,8	15,9 ± 9,0	22,4 ± 11,5	26,7 ± 16,1	0,176
Αλβουμίνη (g/dl)	4,5 ± 0,20 ***	4,5 ± 0,21 ⁑	4,5 ± 0,24	4,7 ± 0,22 ***, ⁑	**0,027**
Ινσουλίνη(μU/ml)	8,4 ± 2,8	13,9 ± 14,8	14,1 ± 4,9	15,1 ± 3,5	0,090
HOMAIR	1,83 ± 0,70 ***	2,97 ± 3,22	3,14 ± 1,23	3,78 ± 1,13 ***	**0,046**

4.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ **MAST4HEALTH**

Οι εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη MAST4HEALTH χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση τα αποτελέσματα του MRI. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των ατόμων που εισήχθησαν στην παρέμβαση (M4H) σε σχέση με εκείνα των ατόμων που δεν πληρούσαν τα

κριτήρια (LLS: low LIF score) (η συνολική τιμή του LIF score τους ήταν < 2 ή τουλάχιστον 2 εκ των εξεταζόμενων τμημάτων (slices) του ήπατος εμφάνιζαν LIF score < 2 και σε ποσοστό < 30% με ταυτόχρονη παρουσία λίπους σε ποσοστό <5,6%).

Ο πληθυσμός M4H αντιστοιχεί σε 68 άτομα ενώ των ατόμων LLS σε 15 άτομα. Μεταξύ των 2 ομάδων δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά για την ηλικία και το BMI, παρατηρήθηκε όμως στατιστική διαφορά ως προς τον λόγο της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχίου με τα άτομα M4H να έχουν μεγαλύτερο λόγο (p =0,001).

Πίνακας 4. Περιγραφικά χαρακτηριστικά μελέτης MAST4HEALTH

Παράμετροι	**M4H (N=68)**	**LLS (N=15)**	**p-value**
Ηλικία	51,9 ± 7,7	55,7 ± 8,7	0,156
BMI	35,1 ± 5,3	35,2 ± 13,9	0,960
WHR	0,99 ± 0,7	0,91 ± 0,8	**0,001**

Στον πίνακα 5 απεικονίζονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ατόμων της M4H και των ατόμων με LLS. Η HDL χοληστερόλη εμφανίζεται αυξημένη στην ομάδα LLS σε σχέση με την ομάδα M4H, ενώ τα τριγλυκερίδια παρουσιάζονται αυξημένα στην ομάδα M4H σε σχέση με την ομάδα LLS. Τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά είναι στατιστικώς μη σημαντικά.

Πίνακας 5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά μελέτης MAST4HEALTH

Παράμετροι	**M4H (N=68)**	**LLS (N=15)**	**p-value**
Σίδηρος (μg/dl)	88,7 ± 26,3	95,0 ± 26,6	0,460
Φερριτίνη (ng/dl)	131,0 ± 114,3	143,9 ± 79,8	0,740
CHOL (mg/dl)	197,9 ± 42,7	177,1 ± 25,2	0,097
HDL (mg/dl)	43,6 ± 9,7	51,0 ± 12,0	**0,023**
LDL (mg/dl)	123,8 ± 38,8	108,8 ± 16,3	0,230
TG (mg/dl)	153,1 ± 66,5	112,2 ± 49,7	**0,040**
AST (iu/l)	26,8 ± 16,3	19,5 ± 4,4	0,090
ALT (iu/l)	38,7 ± 28,2	24,1 ± 9,1	0,052
γ- GT (iu/l)	47,1 ± 48,3	26,6 ± 16,1	0,169

Αλβουμίνη (g/dl)	4,59 ± 0,26	4,60 ± 0,26	0,929
Ινσουλίνη (μU/ml)	19,3 ± 13,6	18,2 ± 9,4	0,837

Στον πίνακα 6 δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στο δείκτη NFS score ανάμεσα στις ομάδες M4H και LLS της μελέτης MAST4HEALTH.

Πίνακας 6. Τα επίπεδα του δείκτη NFS score στις ομάδες M4H και LLS της μελέτης MAST4HEALTH

	M4H (N=68)	**LLS (N=15)**	**p-value**
NFS score	-2,33 ± 1,2	-1,71 ± 1,17	0,110

4.2 ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ miRNA-21 ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ NAFLD ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ MAST4HEALTH

Αρχικά συγκρίθηκαν τα επίπεδα του miRNA -21 στις 4 ομάδες της μελέτης NAFLD με βάση τους βαθμούς του υπερήχου (0, 1, 2 και 3) και όπως φαίνεται στον πίνακα 7 δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Πίνακας 7. Σύγκριση των επιπέδων του miRNA - 21 στις 4 ομάδες της μελέτης NAFLD με βάση τους βαθμούς του υπερήχου (0, 1, 2 και 3)

	0 (N=17)	**1 (N=16)**	**2 (N= 19)**	**3 (N=13)**	**p- value**
miRNA -21	0,370 ± 0,500	0,441 ± 0,324	0,420 ± 0,337	0,425 ± 0,257	0,954

Σε δεύτερο επίπεδο ενώσαμε τις ομάδες της μελέτης NAFLD με βαθμό υπερήχου 0 και φυσιολογική ηχογένεια με τα άτομα με βαθμό υπερήχου 1 και ήπια λιπώδη διήθηση και τα θεωρήσαμε σαν ομάδα ελέγχου (control). Ενώσαμε επίσης τις ομάδες με μέτρια και σοβαρή λιπώδη διήθηση με βαθμούς υπερήχου 2 και 3 αντίστοιχα και τις θεωρήσαμε ως cases (NAFLD). Όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα του miRNA -21 μεταξύ των 2 ομάδων δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά (πίνακας 8).

Πίνακας 8. Σύγκριση των επιπέδων του miRNA - 21 των ατόμων με βαθμούς υπερήχου 0 και 1 (Ομάδα Control) και αυτών με βαθμούς υπερήχου 2 και 3 (Ομάδα Cases) της μελέτης NAFLD

	Control (0+1) (N=33)	Cases (2+3) (N=32)	p-value
miRNA -21	0,403 ± 0,421	0,423 ± 0,300	0,838

Συγκρίναμε επίσης, τα επίπεδα του miRNA -21 μεταξύ των ατόμων που εισήχθησαν στη μελέτη M4HEALTH (M4H) έναντι της αντίστοιχης ομάδας (LLS). Δεν εντοπίστηκε στατιστική διαφορά στα επίπεδα του miRNA -21 μεταξύ των δειγμάτων των εθελοντών (πίνακας 9).

Πίνακας 9. Σύγκριση των επιπέδων του miRNA - 21 μεταξύ των ομάδων M4H και LLS της μελέτης MAST4HEALTH

	M4H (N=61)	LLS (N=15)	p-value
miRNA -21	0,512 ± 0,649	0,416 ± 0,841	0,648

Έπειτα το σύνολο του πληθυσμού των 2 μελετών χωρίστηκε σε τρεις κατηγορίες με βάση τα επίπεδα του NFS score και συγκρίθηκαν τα επίπεδα του miRNA -21 στις τρεις αυτές κατηγορίες:

- ✓ κατηγορία 1 με NFS score < - 1,455, τιμή που αντιστοιχεί σε ήπια ή μέτριου βαθμού ίνωση και με πληθυσμό ατόμων 80
- ✓ κατηγορία 2 με -1,455 <NFS score <0,675, τιμή που αντιστοιχεί σε απροσδιόριστη περιοχή και με πληθυσμό ατόμων 11
- ✓ κατηγορία 3 με NFS score > 0,675, τιμή που αντιστοιχεί σε σοβαρή βαθμού ίνωση και πληθυσμό ατόμων 9

Δε φάνηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα του miRNA -21 στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH ανάλογα με την κατηγορία του NFS score τους (πίνακας 10).

Πίνακας 10. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH ανάλογα με την κατηγορία του NFS score

	NFS score < - 1,455	-1,455 <NFS score <0,675	NFS score > 0,675	
	1 (N= 80)	**2 (N= 11)**	**3 (N=9)**	**p- value**
NFS score	0,458 ± 0,557	0,302 ± 0,261	0,557 ± 0,632	0,552

4.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ miRNA-21 ΜΕ ΤΑ ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ NAFLD και MAST4HEALTH

Με τον στατιστικό έλεγχο Spearman ελέγχθηκε η συσχέτιση των επιπέδων του miR-21 με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH. Με βάση τα αποτελέσματα τα επίπεδα του miRNA -21 δεν φαίνεται να σχετίζονται με το BMI και το WHR (πίνακας 11).

Πίνακας 11. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με τις περιγραφικές παραμέτρους στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH (N=148)

	Correlation Coefficient	Sig. (2- tailed N)
Ηλικία	-0,043	0,686
BMI	0,047	0,605
WHR	0,155	0,147

Όταν μελετήθηκε η συσχέτιση του miRNA-21 με τις βιοχημικές παραμέτρους, φάνηκε να σχετίζεται θετικά με την ινσουλίνη ($p < 0,042$ και Correlation Coefficient 0,190**)** και το HOMA-IR ($p< 0,020$ και Correlation Coefficient 0,226**)** (πίνακας 12). Εφαρμόστηκε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με σκοπό την ποσοτικοποίηση της επίδρασης του miRNA-21 (ανεξάρτητη μεταβλητή) στα επίπεδα της % μεταβολής των τιμών της ινσουλίνης και του HOMA- IR (εξαρτημένες μεταβλητές). Ελέγχθηκε ακόμη η γραμμική σχέση των τιμών της ινσουλίνης και του HOMA- IR με το miRNA-21 μετά από προσαρμογή για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες. Σε κανένα απ' τα μοντέλα προσαρμογής δε διατηρήθηκε η συσχέτιση του miRNA -21 με την ινσουλίνη και το HOMA- IR (πίνακας 13).

Πίνακας 12. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με τις βιοχημικές παραμέτρους στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH (N=148)

	Correlation Coefficient	Sig. (2- tailed N)
Σίδηρος (μg/dl)	-0,049	0,663
Φερριτίνη (ng/dl)	-0,025	0,823
Γλυκόζη (mg/dl)	0,095	0,331
CHOL (mg/dl)	0,092	0,315
HDL (mg/dl)	0,045	0,627
LDL (mg/dl)	0,092	0,326
TG (mg/dl)	0,007	0,940
AST (iu/l)	0,118	0,195
ALT (iu/l)	0,037	0,687
γ- GT (iu/l)	-0,011	0,909
Αλβουμίνη (g/dl)	0,180	0,094
Ινσουλίνη (μU/ml)	0,190	**0,042**
HOMA- IR	0,226	**0,020**

Πίνακας 13. Γραμμική παλινδρόμηση ελέγχου επίδρασης του miRNA - 21 (ανεξάρτητη μεταβλητή) στο επίπεδο της % μεταβολής των τιμών της ινσουλίνης και του HOMA -IR

	Μοντέλο 1		Μοντέλο 2		Μοντέλο 3	
	βeta	p	Beta	p	βeta	p
Ινσουλίνη	0,001	0,807	0,005	0,988	0,002	0,713
HOMA- IR	0,014	0,441	0,003	0,888	0,03	0,612

Μοντέλο 1 μη προσαρμοσμένο,

μοντέλο 2 προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία, BMI

μοντέλο 3 προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία, BMI, φάρμακα για διαβήτη

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν το miRNA -21 σχετίζεται με το NFS score των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH, όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση (πίνακας 14).

Πίνακας 14. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με το NFS score στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH (N=148)

	Correlation Coefficient	Sig. (2- tailed N)
NFS score	-0,176	0,079

Όταν μελετήθηκαν ξεχωριστά οι συσχετίσεις των επιπέδων του miRNA -21 με το BMI και το NFS score στα άτομα της μελέτης NAFLD με τα διάφορα στάδια του υπερήχου (0,1,2,3) καθώς και στα άτομα που εισήχθησαν στη μελέτη MAST4HEALTH (M4H), στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις εμφανίστηκαν μόνο στα 13 άτομα της μελέτης NAFLD με βαθμό υπερήχου 3 (σοβαρή λιπώδης διήθηση). Τα επίπεδα του miRNA-21 συσχετίστηκαν θετικά με το BMI (p <0,027) και με το NFS score (p <0,007) (πίνακας 15). Εφαρμόστηκε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με σκοπό την ποσοτικοποίηση της επίδρασης του miRNA-21 (ανεξάρτητη μεταβλητή) στα επίπεδα της % μεταβολής των τιμών του BMI και του NFS score (εξαρτημένες μεταβλητές). Ελέγχθηκε ακόμη η γραμμική σχέση των τιμών του BMI και του NFS score με το miRNA-21 μετά από προσαρμογή για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες. Στο μη προσαρμοσμένο για συγχυτικούς παράγοντες πρώτο μοντέλο προσαρμογής η σχέση του miRNA-21 με το BMI και το NFS score (Μοντέλο 1) παρέμεινε σημαντική, ενώ η σχέση αυτή δε διατηρήθηκε μετά από διόρθωση της επιρροής του φύλου και της ηλικίας (Μοντέλο 2) (πίνακας 16)

Πίνακας 15. Συσχέτιση των επιπέδων του miRNA - 21 με το BMI και το NFS score στα άτομα με βαθμό υπερήχου 3 (σοβαρή λιπώδης διήθηση) (N=13)

	Correlation Coefficient	**p - value**
NFS score	0,755	**0,007**
BMI	0,634	**0,027**

P<0.05

Πίνακας 16. Γραμμική παλινδρόμηση ελέγχου επίδρασης του miRNA - 21 (ανεξάρτητη μεταβλητή) στο επίπεδο της % μεταβολής των τιμών του BMI και του NFS score

	Μοντέλο 1		Μοντέλο 2	
	βeta	p	βeta	p
NFS score	0,202	**0,015**	0,186	0,119
BMI	0,037	**0,029**	0,033	0,111

Μοντέλο 1 μη προσαρμοσμένο,

μοντέλο 2 προσαρμοσμένο για φύλο, ηλικία (και BMI στην περίπτωση του NFS)

4.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ miRNA-21 ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ MAST4HEALTH

17 άτομα έλαβαν το σκεύασμα Α και 21 το σκεύασμα Β. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα του miRNA -21 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση (πίνακας 17).

Πίνακας 17. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στις ομάδες Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση

	A (N=17)			B (N= 21)			
	time - 0	time - 6	p*	time - 0	time - 6	p*	p**
	M.O ± SD	M.O ± SD		M.O ± SD	M.O ± SD		
miRNA-21	0,622±0,151	0,535±0,130	0,490	0,588±0,825	0,333± 0,322	0,181	0,527

M.O:μέσος όρος

SD: standard deviation

p* σύγκριση των μέσων όρων πριν και μετά την παρέμβαση ανά ομάδα

p** σύγκριση των δύο ομάδων παρέμβασης

Τα 38 άτομα χωρίστηκαν με βάση τη διάμεσο του LIF score που αντιστοιχεί στην τιμή 2,25 σε 2 ομάδες:

- 8 άτομα απ' την ομάδα Α και 10 άτομα απ' την ομάδα Β είχαν LIF score < 2,25
- 9 άτομα απ' την ομάδα Α και 11 άτομα απ' την ομάδα Β είχαν LIF score > 2,25

Τα επίπεδα του miRNA -21 στα άτομα με LIF score < 2,25 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές (πίνακας 18). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα για τα επίπεδα του miRNA -21 στα άτομα με LIF score >2,25 (πίνακας 19).

Πίνακας 18. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στα άτομα με LIF score < 2,25 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση

	A (N=8)			B (N= 10)			
	time - 0	time - 6	p*	time - 0	time - 6	p*	p**
	M.O ± SD	M.O ± SD		M.O ± SD	M.O ± SD		
miRNA-21	0,615±0,217	0,160±0,095	0,227	0,417±0,576	0,247± 0,221	0,372	0,323

M.O:μέσος όρος

SD: standard deviation

p* σύγκριση των μέσων όρων πριν και μετά την παρέμβαση ανά ομάδα

p** σύγκριση των δύο ομάδων παρέμβασης

Πίνακας 19. Τα επίπεδα του miRNA - 21 στα άτομα με LIF score > 2,25 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση

	A (N=9)			B (N= 11)			
	time - 0	time - 6	p*	time - 0	time - 6	p*	p**
	M.O ± SD	M.O ± SD		M.O ± SD	M.O ± SD		
miRNA-21	0,595±0,658	0,627±0,670	0,907	0,702±1,00	0,411± 0,387	0,321	0,361

M.O:μέσος όρος

SD: standard deviation

p* σύγκριση των μέσων όρων πριν και μετά την παρέμβαση ανά ομάδα

p** σύγκριση των δύο ομάδων παρέμβασης

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η NAFLD είναι η συνηθέστερη χρόνια ηπατική νόσος στις σύγχρονες κοινωνίες και θεωρείται εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου. Το χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η έκτοπη συσσώρευση ηπατικού λίπους (καθορισμένη ως περισσότερο από 5% κατά βάρος) απουσία υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ και άλλων χρόνιων ηπατικών νόσων. Ο όρος NAFLD περιλαμβάνει ένα ιστολογικό φάσμα απ' την απλή στεάτωση ως την κίρρωση και τον καρκίνο του ήπατος. Παρά τον υψηλό επιπολασμό της νόσου, η πλειοψηφία των ασθενών έχουν απλή στεάτωση και μόνο 5-10% των ασθενών θα εξελιχθεί σε NASH. Η παθοφυσιολογία της δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη καθώς η ανάπτυξή της είναι αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί παρέχουν μια νέα προοπτική στην παθογένεση και διαχείριση της NAFLD. Πολλές πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν το ρόλο πολλών miRNAs στη ρύθμιση του ηπατικού μεταβολισμού αναδεικνύοντας την πιθανή σχέση μεταξύ miRNAs και παθογένεσης της νόσου. Οι σημερινές τεχνικές διάγνωσης της NAFLD – εκτός απ' τη βιοψία η οποία εγκυμονεί κινδύνους επιπλοκών και προκαλεί δυσφορία στους ασθενείς – αδυνατούν να διακρίνουν τα στάδια της νόσου. Το γεγονός ότι πολλά miRNAs βρίσκονται σ' όλα τα σωματικά υγρά και το ήπαρ και τα επίπεδά τους επηρεάζονται απ' την εξέλιξη της νόσου, τα καθιστά ως υποψήφιους βιοδείκτες πρόληψης και αξιολόγησης της NAFLD.

Το miRNA- 21 είναι αυτό που εκφράζεται περισσότερο στα ηπατοκύτταρα τόσο ανθρώπων όσο και ζωικών μοντέλων με τα επίπεδά του να παρουσιάζονται ιδιαιτέρως αυξημένα σε ασθενείς με NASH. Οι μηχανισμοί με τους οποίους εμπλέκεται στην παθογένεση της NAFLD αφορούν τη στόχευση και τη σίγαση γονιδίων που σχετίζονται κυρίως με το μεταβολισμό και τη σύνθεση λιπιδίων.

Η μαστίχα Χίου είναι η ρητινώδης ουσία που εξέρχεται απ' τον κορμό και τα κλαδιά του μαστιχόδεντρου. Παρουσιάζει αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και καρδιοπροστατευτική δράση λόγω των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει όπως τερπένια, φαινολικές ενώσεις και φυτοστερόλες. Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αντιφλεγμονώδη δράση της MX και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων την έχει αναγνωρίσει ως φυτικό φαρμακευτικό προϊόν για τη θεραπεία ήπιων δυσπεπτικών διαταραχών.

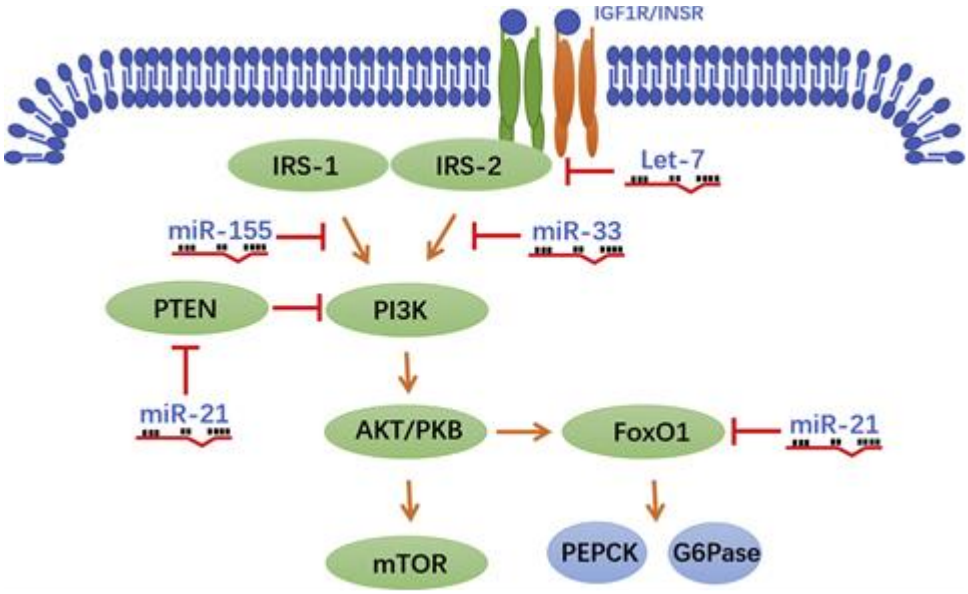
Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η σύγκριση των επιπέδων του miRNA- 21 σε ασθενείς με NAFLD/ NASH με βάση το στάδιο της νόσου και στη συνέχεια η συσχέτισή του με βιοχημικές, ανθρωπομετρικές και κλινικές παραμέτρους. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του φυσικού συμπληρώματος της μαστίχας Χίου στα επίπεδα του miRNA- 21.

Για τη διερεύνηση των επιπέδων του miRNA- 21 σε ασθενείς με NAFLD/ NASH και τη συσχέτισή του με τις διάφορες παραμέτρους χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα 148 εθελοντών από 2 μελέτες, 83 εξ' αυτών απ' τη μελέτη MAST4HEALTH και 65 απ' τη μελέτη NAFLD. Η διάγνωση της νόσου έγινε με τη χρήση υπερηχογραφήματος άνω κοιλίας για τους εθελοντές της μελέτης NAFLD και με μαγνητική τομογραφία ήπατος για τους εθελοντές της μελέτης MAST4HEALTH. Τα 65 άτομα της μελέτης NAFLD χωρίστηκαν σε 4 ομάδες με βάση τους βαθμούς στον υπέρηχο: 17 άτομα με βαθμό υπερήχου 0, 16 άτομα με βαθμό υπερήχου 1, 19 άτομα με βαθμό υπερήχου 2 και 13 άτομα με βαθμό υπερήχου 3. Τα επίπεδα του miRNA- 21 δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των 4 ομάδων. Τα άτομα της μελέτης MAST4HEALTH χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: 68 άτομα που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής με βάση το LIF score (M4H) και 15 που δεν πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής (LLS). Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στα επίπεδα του miRNA- 21 μεταξύ των ομάδων M4H και LLS της μελέτης MAST4HEALTH. Έπειτα, μελετήθηκαν τα επίπεδα του miRNA- 21 στο σύνολο του πληθυσμού των 2 μελετών με βάση το NFS score. 80 άτομα εμφάνισαν NFS score <-1,455 τιμή που αντιστοιχεί σε ήπια ή μέτριου βαθμού ίνωση, 11 άτομα με τιμή -1,455< NFS score < 0,675 που αντιστοιχεί σε απροσδιόριστο βαθμό ίνωσης και 9 άτομα NFS score> 0,675 τιμή που αντιστοιχεί σε σοβαρή βαθμού ίνωση. για Στις 3 κατηγορίες με βάση το NFS score δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα του miRNA-21. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2011 στην οποία τα επίπεδα του miRNA-21 στο πλάσμα δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ 34 ασθενών με NAFLD και 19 υγιών ατόμων (136). Όμως έρχονται σε σύγκρουση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών της υπάρχουσας βιβλιογραφίας που καταδεικνύουν την αύξηση των επιπέδων του miRNA-21 στην κυκλοφορία και στα ηπατοκύτταρα σε ασθενείς με NASH καθώς και με την πρόοδο της NAFLD (137, 138).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων του miRNA-21 με τις ανθρωπομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους στο σύνολο των 148 ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH. Τα επίπεδα του miRNA-21 σχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης και του HOMA-IR, ωστόσο η σχέση δεν παρέμεινε σημαντική όταν διορθώθηκε ως προς τους συγχυτικούς παράγοντες φύλο, ηλικία, BMI και φαρμακευτική αγωγή για διαβήτη. Σε μια πρόσφατη μελέτη ο Ghorbani και οι συνεργάτες του συσχέτισαν αρνητικά τα επίπεδα του

miRNA-21 με τα επίπεδα της ινσουλίνης, του HOMA-IR και του BMI σε μη διαβητικά και διαβητικά άτομα (139). Αντίθετα σε μια μελέτη σε 189 ασθενείς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια το miRNA-21 σχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα του HOMA-IR (140). Οι διαφορές του miRNA-21 στην κυκλοφορία σε ασθενείς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και υγιείς ανθρώπους ενίσχυσαν την πεποίθηση στον Aurora και τους συνεργάτες του ότι το miRNA-21 μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νέος ελπιδοφόρος θεραπευτικός στόχος για τη διάγνωση και τη θεραπεία του διαβήτη (141). Η σύνδεση του miRNA-21 με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα επίπεδα της ινσουλίνης εξηγείται μέσω της μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης PTEN. (142) (Εικόνα 10 Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019; 111:657-665). Η PTEN αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της AKT, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. ο οποίος σε πειραματόζωα έχει σχετιστεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη (143). Μειωμένα επίπεδα της PTEN σχετίζονται με ινσουλινοαντίσταση, ίνωση, φλεγμονή και καρκίνο του ήπατος (144). Στα ποντίκια το miRNA-21 αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου FoXO1 το οποίο επηρεάζει την έκφραση των ενζύμων G6P και PEPCK (142).

Εικόνα 10. Το miRNA - 21 στοχεύει το γονίδιο FoxO1 και την πρωτεΐνη PTEN



Στη συνέχεια, μελετώντας την πιθανή επίδραση του miRNA- 21 στο NFS score στο σύνολο των ατόμων των μελετών NAFLD και MAST4HEALTH δεν εντοπίστηκε συσχέτιση. Αντιθέτως, θετική συσχέτιση μεταξύ του miRNA- 21 και του NFS score παρουσιάστηκε μόνο στα 13 άτομα της μελέτης NAFLD με βαθμό υπερήχου 3 (σοβαρή λιπώδης διήθηση) (p= 0,007 και correlation coefficient= 0,755). Στα ίδια άτομα παρουσιάστηκε επίσης θετική συσχέτιση του

miRNA- 21 με το BMI (p= 0,027 και correlation coefficient= 0,634). Για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δυνητική σχέση του NFS score και του BMI με τα επίπεδα του miRNA-21, εφαρμόστηκαν επιπλέον δύο μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης. Στο πρώτο μοντέλο δεν έγινε διόρθωση για τις μεταβλητές που μπορεί να επηρεάζουν την συσχέτιση, ενώ στο δεύτερο πραγματοποιήθηκαν διορθώσεις για την ηλικία, το φύλο (και το BMI για το NFS score). Στο πρώτο μοντέλο διατηρήθηκαν οι συσχετίσεις των BMI και NFS score με το miRNA- 21 αλλά στο δεύτερο μοντέλο οι σχέσεις αυτές εξαλείφθηκαν.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα αποτελέσματα πολλών μελετών της βιβλιογραφίας συνδέουν την εξέλιξη της NAFLD με τα επίπεδα του miRNA- 21. Σε μία απ' αυτές που η διάγνωση της NAFLD επιβεβαιώθηκε με τη χρήση υπερήχου άνω κοιλίας – όπως δηλαδή και στα 13 άτομα που το miRNA- 21 σχετίστηκε αρχικά με το NFS score- ο Yamada H και οι συνεργάτες του βρήκαν αυξημένα τα επίπεδα του miRNA-21 στον ορό σε άτομα με NAFLD (145). Όσο αφορά τη σχέση του miRNA- 21 με το BMI τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα. Σε μία μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2016 και συγκρίθηκαν τα επίπεδα του miRNA- 21 σε 58 παχύσαρκους Κινέζους με Mets έναντι 96 ατόμων χωρίς Mets απουσία παχυσαρκίας, το miRNA- 21 σχετίστηκε αρνητικά με το BMI (146). Το 2011 όμως ο Keller και οι συνεργάτες του επισήμαναν σημαντική αύξηση στα επίπεδα του miRNA- 21 σε άτομα με BMI μεγαλύτερο του 30 (147).

Τέλος, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση του συμπληρώματος μαστίχας Χίου στα επίπεδα του miRNA-21 στα άτομα που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση της μελέτης MAST4HEALTH. Απ' αυτούς οι 17 έλαβαν το σκεύασμα Α και οι 21 το σκεύασμα Β. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του miRNA -21 και των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση. Στη συνέχεια τα 38 άτομα χωρίστηκαν με βάση τη διάμεσο του LIF score που αντιστοιχεί στην τιμή 2,25 σε 2 ομάδες. 8 άτομα απ' την ομάδα Α και 10 άτομα απ' την ομάδα Β είχαν LIF score < 2,25 και 9 άτομα απ' την ομάδα Α και 11 άτομα απ' την ομάδα Β είχαν LIF score > 2,25. Σύμφωνα με τη μελέτη μας, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα του miRNA -21 των ομάδων Α και Β της μελέτης MAST4HEALTH πριν και μετά την παρέμβαση ανεξάρτητα απ' το LIF score.

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με την επίδραση του συμπληρώματος μαστίχας Χίου στην έκφραση των ανθρώπινων miRNAs. Ένας απ' τους στόχους της μελέτης MAST4HEALTH είναι η εξέταση του επιγενετικού προφίλ των εθελοντών με σκοπό τη διερεύνηση των επιγενετικών αλλαγών, ως αποτέλεσμα της θεραπείας με μαστίχα.

Ωστόσο, τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων που διαθέτουν επίσης πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, φαίνεται μέχρι στιγμής ότι καταστέλλουν την έκφραση του miRNA -21. Η ρεσβερατρόλη μια φαινολική ένωση που βρίσκεται στο κόκκινο κρασί, τα μούρα και τα φιστίκια μειώνει τα επίπεδα του miRNA -21 σε ασθενείς με ψωρίαση. Κλινικές έρευνες επίσης αναφέρουν ότι η καθημερινή πρόσληψη κουρκουμίνης, μιας κίτρινης πολυφαινόλης που βρίσκεται στον κουρκουμά και έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, μειώνει την έκφραση των miRNA -21 και miRNA -155 (148).

Συνοψίζοντας, τα επίπεδα του miRNA -21 δεν παρουσίασαν διαφορά στους ασθενείς με NAFLD/NASH με βάση το στάδιο της νόσου. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε ήταν μεταξύ των επιπέδων του miRNA -21 και των επιπέδων της ινσουλίνης και του HOMA-IR. Η κλινική μελέτη φάνηκε να μην έχει κάποια επίδραση στα επίπεδα του miRNA -21 σε καμία από τις 2 ομάδες της παρέμβασης. Ωστόσο το μέγεθος του δείγματος των εθελοντών δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ένας επίσης περιορισμός της μελέτης είναι ο τρόπος διάγνωσης της νόσου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το υπερηχογράφημα άνω κοιλίας και η μαγνητική τομογραφία ήπατος και όχι η βιοψία ήπατος η οποία θεωρείται η μέθοδος αναφοράς για τη διαπίστωση της διάγνωσης και την εκτίμηση της φλεγμονής και της ίνωσης με μεγάλη ακρίβεια. Τέλος, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο στο πλάσμα του αίματος και όχι και σε ηπατικά κύτταρα όπου το miRNA -21 εκφράζεται περισσότερο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Enoch Cobbina and Fatemeh Akhlaghi. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) - Pathogenesis, Classification, and Effect on Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. Drug Metab Rev. 2017 May; 49(2): 197–211

2. Yong-ho Lee, Yongin Cho et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Diabetes. Part I: Epidemiology and Diagnosis. Diabetes Metab J 2019; 43:31-45

3. Sattar N, Forrest E, Preiss D. Non-alcoholic fatty liver disease. BMJ. 2014 Jul 29;349:4596.

4. Kleiner DE, Makhlouf HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. Clin Liver Dis. 2015;20(2):293-312.

5. Agrawal S, Duseja AK. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: East Versus West. *J* Clin Exp Hepatol. 2012;2(2):122-34.

6. Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Pavarino ÉC, da Silva RF, da Silva RCMA, Maria Goloni-Bertollo E. Clinical, Epidemiological and Histopathological Aspects in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Liver Transplantation. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(10):2795-2802..

7. Schuppan, D. and Schattenberg, J. M. Pathogenesis and therapy of NASH. J Gastroenterol Hepatol. 2013; 28: 68-76.

8. Buzzetti, Elena et al. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism - Clinical and Experimental 2016;65(8):1038 - 1048.

9. Lucas C, Lucas G, Lucas N, Krzowska-Firych J, Tomasiewicz K. A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. Clin Exp Hepatol. 2018;4(3):165-174

10 . Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 2002; 346:1221–1231.

11. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. Gastroenterology. 1994;107:1103–1109.

12. Sherif ZA, Saeed A, Ghavimi S, et al. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Perspectives on US Minority Populations. Dig Dis Sci. 2016;61(5):1214–1225.

13. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. Aliment Pharmacol Ther. 2011;34:274–285

14. Younossi ZM, Marchesini G, Pinto-Cortez H, Petta S. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. Transplantation. 2019 Jan;103(1):22-27

15. Sporea I , Popescu A, Dumitraşcu D, Brisc C , Nedelcu L , Trifan A , Gheorghe L , Fierbinţeanu Braticevici C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Status Quo. J Gastrointestin Liver Dis. 2018 Dec;27(4):439-448

16. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonal-coholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. Hepatology 2016; 64:73–84.

17. Estes C, Razavi H, Loomba R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. Hepatology. 2018; 67:123 – 133.

18. Corte CD, Ferrari F, Villani A, Nobili V. Epidemiology and Natural History of NAFLD. J Med Biochem. 2015;34(1):13–17

19. Chan DF, Li AM, Chu WC, Chan MH, Wong EM, Liu EK, Chan IH, et al. Hepatic steatosis in obese Chinese children. Int J Obes Relat Metab Disord 2004; 28: 1257–63.

20. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. Pediatrics 2006; 118:1388-93

21. Browning, J. D.et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 2004; 40:1387–1395.

22. Anstee, Q. M., Targher, G. & Day, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatology. 2013 ;10:330–344.

23. Lazo, M.et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. Am. J. Epidemiol. 2013; 178:38-45.

24. Sookoian S, Pirola CJ. Systematic review with meta-analysis: risk factors for non-alcoholic fatty liver disease suggest a shared altered metabolic and cardiovascular profile between lean and obese patients. Aliment Pharmacol Ther 2017; 46:85-95

25. Younossi Z, Anstee Q, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2018; 15: 11–20

26. Iqbal U, Perumpail BJ, Akhtar D, Kim D, Ahmed A. The Epidemiology, Risk Profiling and Diagnostic Challenges of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Medicines (Basel). 2019;6(1):41.

27. Lonardo, Amedeo et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. Digestive and Liver Disease 2015; 47: 997 - 1006

28. Younossi Z.M., Stepanova M., Negro F., Hallaji S., Younossi Y., Lam B., Srishord M. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. Medicine. 2012; 91:319–327

29. Szanto KB, Li J, Cordero P, Oben JA. Ethnic differences and heterogeneity in genetic and metabolic makeup contributing to nonalcoholic fatty liver disease. Diabetes Metab Syndr Obes. 2019;12:357–3

30. Lonardo, A., Nascimbeni, F., Ballestri, S., Fairweather, D., Win, S., Than T. A., Abdelmalek, M. F. and Suzuki, A. Sex Differences in NAFLD: State of the Art and Identification of Research Gaps. Hepatology 2019

31. Villa, E. Role of Estrogen in Liver Cancer. Women’s Health. 2008 :41–50

32. Noureddin, Mazen et al. NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender Variances. American Journal of Gastroenterology 2018;11:1649–1659

33. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2010; 51:1972 -1978.

34. Vilar Gomez E, Calzadilla Bertot L, Wai Sun Wong V, Castellanos M, Aller de la Fuente R, Metwally M, Eslam M, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi National Cohort Study. Gastroenterology 2018; 155:443-457 e417

35. Nobili V, Alisi A, Newton KP, Schwimmer JB. Comparison of the Phenotype and Approach to Pediatric vs Adult Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology. 2016;150(8):1798–1810.

36. Mokdad AA, Lopez AD, Shahraz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. BMC Med 2014; 12:145

37. Anderson, E. L., Howe, L. D., Jones, H. E., Higgins, J. P. T., Lawlor, D. A., & Fraser, A. The Prevalence of Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta Analysis. PLOS ONE 2015; 10:10

38. Calle, E.E.; Rodriguez, C.; Walker-Thurmond, K.; Thun, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N. Engl. J. Med. 2003; 348:1625–1638.

39. Bellentani, S. & Tiribelli, C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. J. Hepatol. 2001; 35:531–537.

40. Kotronen, A. et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. Diabetes Care 2008; 31 ;165-169.

41. Kabir, M.; Catalano, K.J.; Ananthnarayan, S.; Kim, S.P.; Van Citters, G.W.; Dea, M.K.; Bergman, R.N. Molecular evidence supporting the portal theory: A causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2005; 288: 454–461.

42. Wong, R.J.; Ahmed, A. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Disparate associations among Asian populations. World J. Hepatol. 2014; 6:263–273.

43. WHO Diabetes Fact Sheets. Obtained from the world wide web at: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes

44. Type 2 Diabetes Mellitus- International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 8th ed. 2017 obtained from the world wide web at http://www.diabetesatlas.org/.

45. Portillo-Sanchez, P.; Bril, F.; Maximos, M.; Lomonaco, R.; Biernacki, D.; Orsak, B.; Subbarayan, S.; Webb, A.; Hecht, J.; Cusi, K. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015;100:2231–2238.

46. Anstee, Q.M.; Targher, G.; Day, C.P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013;10:330–344.

47. Fattahi MR, Niknam R, Safarpour A, Sepehrimanesh M, Lotfi M. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. Middle East J Dig Dis. 2016;8(2):131–137

48. Agrawal S, Duseja AK. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: East Versus West. J Clin Exp Hepatol. 2012;2(2):122–134.

49. Fan JG, Zhu J, Li XJ. Fatty liver and the metabolic syndrome among Shanghai adults. J Gastroenterol Hepatol. 2005;20:1825–1832.

50. Gomes Alviziane et al. Disease in Metabolic Syndrome, Epidemiology and Pathogenesis, Smgbooks 2016.

51. Sporea I et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Status Quo. J Gastrointestin Liver Dis. 2018 ;27(4):439-448.

52. Solga S, Alkhuraishe AR, Clark JM, Torbenson M, Greenwald A, Diehl AM et al. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. Dig Dis Sci. 2004; 49:1578–1583

53. Le K-A, Bortolotti M. Role of dietary carbohydrates and macronutrients in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2008; 11: 477-82.

54. Ullah R, Rauf N, Nabi G, et al. Role of Nutrition in the Pathogenesis and Prevention of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Recent Updates. Int J Biol Sci. 2019;15(2):265–276.

55. Kleinridders A, Schenten D, Könner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T. et al. MyD88 Signaling in the CNS Is Required for Development of Fatty Acid-Induced Leptin Resistance and Diet-Induced Obesity. Cell Metabolism. 2009;10:249–59.

56. Mensink RP. Metabolic and health effects of isomeric fatty acids. Current Opinion in Lipidology. 2005;16:27–30.

57. Leclercq IA, Horsmans Y. Nonalcoholic fatty liver disease: the potential role of nutritional management. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2008; 11:766–73.

58. Fischer LM, da Costa KA, Kwock L, Stewart PW, Lu TS, Stabler SP et al. Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. Am J Clin Nutr 2007, 85:1275–1285.

59. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. World J Hepatol. 2017;9(16):715–732.

60. Trovato, F. M., Martines, G. F., Brischetto, D., Trovato, G., & Catalano, D. Neglected features of lifestyle: Their relevance in non -alcoholic fatty liver disease. World J Hepatol, 2016; 8(33): 1459 -1465.

61. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. Hepat Med. 2017;9:55–66.

62. Eslam, Mohammed et al. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact Journal of Hepatology. 2017; 68:268 – 279.

63. Liu YL, Patman GL, Leathart JB, Piguet AC, Burt AD, Dufour JF, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepato-cellular carcinoma. J Hepatol 2013; 61:75–81

64. Danford CJ, Yao ZM, Jiang ZG. Non-alcoholic fatty liver disease: a narrative review of genetics. J Biomed Res. 2018;32(5):389–400.

65. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg- Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat Genet 2014; 46:352–356

66. Dongiovanni P,Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. Hepatology 2015; 61:506–514

67. Milano M, Aghemo A, Mancina RM, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene E167K variant impacts on steatosis and liver damage in chronic hepatitis C patients. J Hepatology 2015; 62(1): 111−117.

68. Serini S, Piccioni E, Merendino N, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. J. Apoptosis 2009; 14(2): 135 – 152.

69. Donati B, Dongiovanni P, Romeo S, Meroni M, McCain M, Miele L, et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. Sci Rep 2017; 7:4492.

70. Petta S, Miele L, Bugianesi E, et al. Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. PLoS One 2014; 9(2): e87523

71. Day, C. P. & James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? Gastroenterology 1998; 114: 842 – 845.

72. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. Nat Med. 2018;24(7):908–922.

73. Mavrogiannaki A.N., Migdalis I.N. Non-alcoholic liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease. Hellenic Journal of Atherosclerosis. 2013;4(2):96-103.

74. Kim KH, Lee MS. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis and Hormone-Based Therapeutic Approaches. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:485.

75. Del Campo JA, Gallego-Durán R, Gallego P, Grande L. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Int J Mol Sci. 2018;19(3):911

76. Stols-Gonçalves D, Tristão LS, Henneman P, Nieuwdorp M. Epigenetic Markers and Microbiota/Metabolite-Induced Epigenetic Modifications in the Pathogenesis of Obesity, Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Curr Diab Rep. 2019;19(6):31.

77. Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Saito S, Nakajima A. Identification of the genomic region under epigenetic regulation during non-alcoholic fatty liver disease progression. Hepatol Res. 2018;48(3):320–334.

78. de Mello VD, Matte A, Perfilyev A, Männistö V, Rönn T, Nilsson E, Käkelä P, Ling C, Pihlajamäki J. Human liver epigenetic alterations in non-alcoholic steatohepatitis are related to insulin action. Epigenet Taylor Francis. 2017;12(4):287–295.

79. Dongiovanni P, Meroni M, Longo M, Fargion S, Fracanzani AL. miRNA Signature in NAFLD: A Turning Point for a Non-Invasive Diagnosis. Int J Mol Sci. 2018;19(12):3966.

80. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75: 843-54

81. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 2001; 294: 853-8

82. Friedman R.C., Farh K.K.H., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 2009:92–105.

83. Baffy G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J. Clin. Med. 2015;4:1977–1988.

84. Bartel D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell. 2004;116:281–297.

85. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116: 281-97

86. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucleic Acids Res. 2011; 39:7223–7233.

87. Gregory, R.I., Chendrimada, T.P. & Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. Methods Mol Biol 2006; 342: 33-47.

88. Baek, D. et al. The impact of microRNAs on protein output. Nature 2008; 455: 64-71.

89. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? Trends Cell Biol 2007; 17: 118-26

90. John, B. et al. Human MicroRNA targets. PLoS Biol 2004; 2:363.

91. Esau, C.; Davis, S.; Murray, S.F.; Yu, X.X.; Pandey, S.K.; Pear, M.; Watts, L.; Booten, S.L.; Graham, M.; McKay, R. et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab. 2006; 3: 87–98

92. Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Nature 2008; 452:896.

93. Salvoza, N. C., Klinzing, D. C., Gopez-Cervantes, J., and Baclig, M. O. Association of circulating serum miR-34a and miR-122 with dyslipidemia among patients with non-alcoholic fatty liver disease. PLoS One 2016; 11:0153497.

94. Ding, J., Li, M., Wan, X., Jin, X., Chen, S., Yu, C., et al. (2015). Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARα expression in non- alcoholic fatty liver disease.Sci.Rep.2015; 5:13729.

95. Shan, W., Gao, L., Zeng, W., Hu, Y., Wang, G., Li, M., et al. Activation of the SIRT1/p66shc anti-apoptosis pathway via carnosic acid-induced inhibition of miR-34a protects rats against non-alcoholic fatty liver disease. Cell Death Amp. 2015; 6:1833.

96. Wang L, Zhang N, et all. Decreased MiR-155 Level in the Peripheral Blood of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients may Serve as a Biomarker and may Influence LXR Activity. Cell Physiol Biochem. 2016;39(6):2239-2248.

97. Landgraf, P. et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell. 2007; 129:1401-1414.

98. Cai, X., Hagedorn, C.H. & Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA. 2004; 10:1957-1966.

99. Mudduluru, G. et al. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. Biosci Rep. 2011; 31:185-197.

100. Noetel A, Kwiecinski M, Elfimova N, Huang J, Odenthal M. microRNA are Central Players in Anti- and Profibrotic Gene Regulation during Liver Fibrosis. Front Physiol. 2012;3:49.

101. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biol. 2011;8(5):706–713.

102. Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, Goel A. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19:1766–1774.

103. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. Nat Clin Pract Oncol. 2006;3:448–457.

104. Schier AF. The maternal-zygotic transition: Death and birth of RNAs. Science. 2007;316:406–407.

105. Parthenakis Fragiskos et all. Low Levels of MicroRNA-21 Are a Marker of Reduced Arterial Stiffness in Well-Controlled Hypertension. J Clin Hypertens. 2017 Mar;19(3):235-240.

106. Li S, Liang Z, Xu L, Zou F. MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. Mol Cell Biochem. 2012 ;360(1-2):147-58.

107. Roy S, Khanna S MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. Cardiovasc Res. 2009; 82:21–29

108. Lin Y, Liu X et al Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 2009; 284: 7903–7913.

109. Gjorgjieva Monika et all. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. Gut 2019; 0:1–15.

110. Clément S, Sobolewski C, Gomes D, et al. Activation of the oncogenic miR-21-5p promotes HCV replication and steatosis induced by the viral core 3a protein. Liver International;65.

111. Calo N, Ramadori P, Sobolewski C, et al. Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. Gut. 2016; 65: 1871–81

112. Ahn J, Lee H, Jung CH, et al. Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet. Mol Nutr Food Res 2012; 56:1665–74.

113. Meng F, Henson R, Wehbe–Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology. 2007; 133:647–58.

114. L.A. Adams, “Biomarkers of liver fibrosis,” Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2011; 26:802–809.

115. Ν. Αλεξίου, Χ. Γιαννόπουλος, Ι. Μουζακίτης, Ε. Σκούρα, Σ. Συμπάρδη. Μη επεμβατικές μέθοδοι εκτίμησης της ηπατικής ίνωσης σε ασθενείς με ΜΑΛΝΗ (μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος). Επιστημονικά Χρονικά 2018; 23(2): 158-174

116. Naim Alkhouri, MD, and Arthur J. McCullough, MD. Noninvasive Diagnosis of NASH and Liver Fibrosis Within the Spectrum of NAFLD. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2012; 8(10): 661–668.

117. Liu, Q., Bengmark, S., & Qu, S. (2010). The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Lipids in Health and Disease. 2010; 9(1), 42.

118. Jeznach-Steinhagen A, Ostrowska J, Czerwonogrodzka-Senczyna A, Boniecka I, Shahnazaryan U, Kuryłowicz A. Dietary and Pharmacological Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Medicina (Kaunas). 2019;55(5):166.

119. Promrat K., Kleiner D.E., Niemeier H.M., Jackvony E., Kearns M., Wands J.R., Fava J.L., Wing R.R. Randomized Controlled Trial Testing the Effects of Weight Lost on nonalcoholic Steatohepatitis. Hepatology. 2010; 51:121–129.

120. Sken F., Klaus S., Petzke K.J., Loddenkemper C., Pfeiffer A.F., Weickert M.O. Impairment of fat oxidation under high- vs. low-glycemic index diet occurs before the development of an obese phenotype. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2010; 298:287–295.

121. George E.S., Forsyth A., Itsiopoulos C., Nicoll A.J., Ryan M., Sood S., Roberts S.K., Tierney A.C. Practical Dietary Recommendations for the Prevention and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. Adv. Nutr. 2018; 9:30–40.

122. Ma Y.Y., Li L., Yu C.H., Shen Z., Chen L.H., Li Y.M. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. World J. Gastroenterol. 2013; 19:6911–6918.

123. Lavekar S.A., Raje V.D., Manohar T., Lavekar A.A. Role of Probiotics in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis. Euroas. J. Hepatogastroenterol. 2017; 7:130–137.

124. Fukui A., Kawabe N., Hashimoto S., Murao M., Nakano T., Shimazaki H., Kan T., Nakaoka K., Ohki M., Takagawa Y., et al. Vitamin E reduces liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease. World J. Hepatol. 2015; 7:2749–2756.

125. Winn N.C., Liu Y., Rector R.S., Parks E.J., Ibdah J.A., Kanaley J.A. Energy-matched moderate and high intensity exercise training improves nonalcoholic fatty liver disease risk

independent of changes in body mass or abdominal adiposity—A randomized trial. Metabolism. 2018; 78:128–140.

126. Keating S.E., Hackett D.A., George J., Johnson N.A. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. J. Hepatol. 2012; 57:157–166.

127. http://www.gummastic.gr

128. Papada Efstathia and Kaliora C. Andriana. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Mastiha. A Review of Preclinical and Clinical Studies. Antioxidants 2019, 8, 208.

129. Tassou C.C., Nychas G.E. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum on Gram positive and Gram-negative bacteria in both and in Model Food System. International Biodeterioration and biodegradation. 1995; 36:411-420.

130. Kottakis F, Lamari F, Matragkou Ch, Zachariadis G, Karamanos N, Choli-Papadopoulou T. Arabino-galactan proteins from Pistacia lentiscus var. chia: isolation, characterization and biological function. Amino Acids. 2008; 34(3):413-20.

131. He ML et al. Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. Acta Pharmacol Sin. 2007 Apr;28(4):567-72.

132. Balan KV[1], Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM, Pantazis P. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from Pistacia lentiscus L. var. chia. Phytomedicine. 2007 Apr;14(4):263-72.

133. Kaliora, A. C., Mylona, A., Chiou, A., Petsios, D. G., & Andrikopoulos, N. K. Detection and Identification of Simple Phenolics in Pistacia lentiscus Resin. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2004; 27(2):289–300.

134. Kaliora, A. C. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. World Journal of Gastroenterology. 2007; 13(5), 748.

135. Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergentanis, T. N., Protopapa, E., & Tsaknis, J. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 111(1): 43–49.

136. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. PLoS One. 2011;6(8):e23937

137. Ning ZW, Luo XY, Wang GZ, et al. MicroRNA-21 Mediates Angiotensin II-Induced Liver Fibrosis by Activating NLRP3 Inflammasome/IL-1β Axis via Targeting Smad7 and Spry1. Antioxid Redox Signal. 2017;27(1):1–20.

138. Noetel A, Kwiecinski M, Elfimova N, Huang J, Odenthal M. microRNA are Central Players in Anti- and Profibrotic Gene Regulation during Liver Fibrosis. Front Physiol. 2012;3:49.

139. Samira Ghorbani, Roya Mahdavi, Behnam Alipoor, Ghodratollah Panahi, Ensieh Nasli Esfahani, Farideh Razi, Mohhammad Taghikhani & Reza Meshkani (2018) Decreased serum microRNA-21 level is associated with obesity in healthy and type 2 diabetic subjects, Archives of Physiology and Biochemistry. 2018; 124:4, 300-305

140. Jiang Q, Lyu XM, Yuan Y, Wang L. Plasma *miR-21* expression: an indicator for the severity of Type 2 diabetes with diabetic retinopathy. Biosci Rep. 2017;37(2).

141. A. Mazzeo, E. Beltramo, T. Lopatina, C. Gai, M. Trento, M. Porta, Molecular and functional characterization of circulating extracellular vesicles from diabetic patients with and without retinopathy and healthy subjects, Exp. Eye Res. 176 (2018) 69–77

142. Zhang Bo-han et all. Insight into miRNAs related with glucometabolic disorder. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019; 111:657-665.

143. Li A1, Qiu M1, Zhou H2, Wang T3, Guo W2. PTEN, Insulin Resistance and Cancer. Curr Pharm Des. 2017;23(25):3667-3676

144. Peyrou M, Bourgoin L, Foti M. PTEN in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and cancer. Dig Dis. 2010;28(1):236-46

145. Yamada H et all. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. Clinica Chimica Acta 424. 2013; 99-103.

146. Qing Fang HE, Li Xin WANG, Jie Ming ZHONG, Ru Ying HU, Le FANG, Hao WANG, Wei Wei GONG, Jie ZHANG, Jing PAN, Min YU. Circulating MicroRNA-21 is Downregulated in Patients with Metabolic Syndrome[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2016, 29(5): 385-389.

147. Keller P, Gburcik V, Petrovic N, et al. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. BMC Endocr Disord. 2011;11:7

148. Kocic H, Damiani G, Stamenkovic B, et al. Dietary compounds as potential modulators of microRNA expression in psoriasis. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319864805.