ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ Επιστημών Υγείας & Αγωγής

ΤΜΗΜΑ Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής

Διδακτορική Διατριβή

Η Επίδραση του Μεσογειακού Τρόπου Ζωής σε Βιοχημικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά Ασθενών με Μη-Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του Ήπατος

Χριστίνα Ν. Κατσαγώνη

Αθήνα, 2016

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ Επιστημών Υγείας & Αγωγής

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Η Διδακτορική Διατριβή εξετάστηκε από την κάτωθι Επταμελή Επιτροπή:

Μερόπη Δ. Κοντογιάννη (Επιβλέπουσα), Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γεώργιος Παπαθεοδωρίδης, Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Ελισάβετ Φραγκοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Δημοσθένης Παναγιωτάκος, Καθηγητής Βιοστατιστικής, Μεθοδολογίας της Έρευνας, και Επιδημιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Κωνσταντίνος Τσίγκος, Καθηγητής Διατροφής και Μεταβολισμού, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μαρία Γιαννακούλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διατροφής και Διαιτητικής Συμπεριφοράς, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αλεξάνδρα Αλεξοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου δεν υποδηλώνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

Η Χριστίνα Ν. Κατσαγώνη έλαβε υποτροφία αριστείας για μεταπτυχιακές σπουδές στην Ελλάδα από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ) - Πρόγραμμα Siemens (2013-2016).

Η Χριστίνα Ν. Κατσαγώνη

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Στον Νίκο...

Ευχαριστίες

…αυτό το ταξίδι δεν θα μπορούσε να είναι τόσο μαγικό και συναρπαστικό χωρίς συγκεκριμένους ανθρώπους στο πλάι μου…

Ευχαριστώ από καρδιάς την μέντορά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια και επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής, κα. *Μερόπη Κοντογιάννη*. Στις λέξεις δεν χωρά η ευγνωμοσύνη και η χαρά που αισθάνομαι από τη συνεργασία μας... Την ευχαριστώ που ήταν συνεχώς δίπλα μου και με συντρόφευε σε όλη τη διάρκεια του διδακτορικού, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδινε απλόχερα και αδιάκοπα, για την ενθάρρυνση και καθοδήγηση κάθε φορά που την χρειαζόμουν, την εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου. Εύχομαι να έχω την τιμή να πραγματοποιήσουμε και άλλα τέτοια μαγικά ταξίδια μαζί…

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. *Γεώργιο Παπαθεοδωρίδη*, χωρίς την πολύτιμη στήριξη και βοήθεια του οποίου, ο σχεδιασμός, η υλοποίηση και η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν δυνατή και επιπλέον στην Επίκουρη Καθηγήτρια κα. *Ελισάβετ Φραγκοπούλου*, για τη συνεχή καθοδήγηση και στήριξή της στη διεξαγωγή όλων των εργαστηριακών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της διατριβής. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διατριβής για τα εύστοχα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη οφείλω σε όλους εκείνους τους γιατρούς, συνεργάτες, καθηγητές, συναδέλφους, εθελοντές και φίλους που συμμετείχαν, εργάστηκαν σκληρά και με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Τους ευχαριστώ όλους και έναν-έναν προσωπικά από καρδιάς!

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στον σύζυγό μου, την οικογένειά μου και στους δικούς μου ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε όλες τις όμορφες, αλλά και τις δύσκολες στιγμές στην πορεία της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **xviii**
ABSTRACT ..... **xxiv**
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΑ **28**
1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ **28**
1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ **29**
1.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ **31**
1.3.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες **31**
Ηλικία **31**
Εθνικότητα **31**
Φύλο **31**
1.3.2. Κλινικοί παράγοντες **32**
Παχυσαρκία και δείκτης μάζας σώματος **32**
Μεταβολικό σύνδρομο **32**
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ινσουλινοαντίσταση, δυσλιπιδαιμία **33**
1.3.3. Γενετικοί παράγοντες κινδύνου **33**
1.3.4. Άλλοι παράγοντες **34**
1.3.5. Συμπεριφορικοί παράγοντες **34**
Κάπνισμα **34**
Ύπνος **34**
1.3.6. Συνήθειες φυσικής δραστηριότητας ως παράγοντας κινδύνου για NAFLD **35**
1.3.7. Συνήθειες διατροφής ως παράγοντας κινδύνου για NAFLD **36**
Η πρόσληψη μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών ως παράγοντας κινδύνου ή προστασίας για τη νόσο **37**
Η πρόσληψη τροφίμων και ομάδων τροφίμων ως παράγοντας κινδύνου ή προστασίας για τη νόσο **41**
Επίδραση διαιτητικών ινών και λιγότερων επεξεργασμένων δημητριακών **42**
Επίδραση αλκοόλ **42**
Επίδραση καφέ, καφεΐνης και φαινολικών οξέων **43**

Η προσκόλληση σε διάφορα διατροφικά πρότυπα ως παράγοντας κινδύνου ή προστασίας για τη νόσο 43
1.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ 45
Θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων 46
Αντίσταση στην ινσουλίνη και λιποτοξικότητα 46
Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και στρες ενδοπλασματικού δικτύου 47
Φλεγμονή 47
Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας 48
1.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ NAFLD 50
Κλινικά σημεία και συμπτώματα 50
Διάγνωση 50
Εργαστηριακός – βιοχημικός έλεγχος 50
Απεικονιστικές μέθοδοι διάγνωσης και βιοψία ήπατος 51
Μη επεμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης της ίνωσης 52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΑ 54
2.1. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD ΜΕΣΩ ΥΓΙΕΙΝΟΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΩΝ 54
Απώλεια βάρους ως σημαντική παράμετρος αντιμετώπισης της NAFLD 54
Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην απώλεια βάρους μόνο με δίαιτα 55
Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην απώλεια βάρους παράλληλα με τροποποίηση της σύστασης της δίαιτας 56
Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην απώλεια βάρους με συνδυασμό δίαιτας και άσκησης 59
Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην τροποποίηση των συνηθειών άσκησης με ή χωρίς απώλεια βάρους 60
Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην τροποποίηση της σύστασης της δίαιτας χωρίς απώλεια βάρους 61
Παρεμβάσεις βασισμένες σε συγκεκριμένα διατροφικά πρότυπα 62
Η δίαιτα DASH στην αντιμετώπιση της NAFLD 62
Η Μεσογειακή δίαιτα στην αντιμετώπιση της NAFLD 63
2.2. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD ΜΕΣΩ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ 67
Χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων 67

Χορήγηση Βιταμίνης Ε **67**

Προβιοτικά και Πρεβιοτικά **69**

Ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) **69**

Φάρμακα απώλειας βάρους **69**

Αντιδιαβητικά φάρμακα **70**

Υπολιπιδαιμικά φάρμακα **71**

Αντιφλεγμονώδεις παράγοντες **71**

2.3. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD **72**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΑ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ **73**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: **76**

1η ΜΕΛΕΤΗ: Συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής και της παρουσίας μη-αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος: μελέτη ασθενών-μαρτύρων **76**

Εισαγωγή **76**

Μεθοδολογία **77**

Αξιολόγηση τρόπου ζωής **79**

Ανθρωπομετρικοί δείκτες **80**

Βιοχημικοί και φλεγμονώδεις δείκτες **80**

Ελαστογραφία ήπατος (Share-wave Elastography) **81**

Βιοψία Ήπατος **82**

Στατιστική ανάλυση **82**

Αποτελέσματα **83**

Πίνακας 4.1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και υγιών εθελοντών 83

Πίνακας 4.2: Διαφορές σε χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής μεταξύ ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και υγιών εθελοντών. 85

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής και της πιθανότητας παρουσίας NAFLD 88

Συζήτηση **89**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: **95**

2η ΜΕΛΕΤΗ: Συσχέτιση του βαθμού υιοθέτησης προτύπων του τρόπου ζωής με την ηπατική ακαμψία και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε δείγμα ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος **95**

Εισαγωγή **95**

Μεθοδολογία **97**

Στατιστική ανάλυση **97**

Αποτελέσματα **98**

Πίνακας 5.1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά δείγματος της μελέτης 99

Πίνακας 5.2: Συντελεστές προτύπων τρόπου ζωής που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες 102

Πίνακας 5.3: Τάσεις συσχέτισης μεταξύ των τριτημορίων των προτύπων τρόπου ζωής 1 και 3 και των χαρακτηριστικών των ασθενών με NAFLD. 103

Πίνακας 5.4: Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των προτύπων τρόπου ζωής 1 και 3 με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ηπατική ακαμψία. 106

Συζήτηση **107**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: **111**

3η ΜΕΛΕΤΗ: Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των επιδράσεων παρεμβάσεων τροποποίησης του τρόπου ζωής σε κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD **111**

Εισαγωγή **111**

Μεθοδολογία **112**

Πηγές δεδομένων **112**

Κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού στη μελέτη **113**

Εξαγωγή δεδομένων **114**

Μετρούμενα καταληκτικά σημεία **114**

Σύνθεση δεδομένων και στατιστική ανάλυση **114**

Σχήμα 6.1: Διάγραμμα ροής 115

Αξιολόγηση της ποιότητας των μελετών και του σφάλματος δημοσίευσης **116**

Αποτελέσματα **117**

Παρεμβάσεις μόνο με άσκηση **118**

Επίδραση σε ηπατικά χαρακτηριστικά **120**

Επίδραση σε ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά **122**

Επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης **122**

Πίνακας 6.1: Συγκεντρωτική επίδραση παρεμβάσεων μόνο με άσκηση, δίαιτα και άσκηση ή διαιτών με μέτρια περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες έναντι χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια σε δείκτες που σχετίζονται με τη NAFLD. 123

Σχήμα 4.3.2: Συγκεντρωτική επίδραση της άσκησης μόνο, στα επίπεδα Α) τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT), Β) ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST), Γ) γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT) και Δ) ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων (IHTG)...125

Παρεμβάσεις με δίαιτα και άσκηση 126

Επίδραση σε ηπατικά χαρακτηριστικά..... 126

Επίδραση σε ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά 126

Επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης..... 127

..... 127

Σχήμα 6.3: Συγκεντρωτική επίδραση της δίαιτας σε συνδυασμό με την άσκηση στα επίπεδα Α) τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT), Β) ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST), Γ) γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT) και Δ) NAFLD activity score (NAS score).....129

Παρεμβάσεις σύγκρισης της σύστασης της δίαιτας 129

Επίδραση στα ηπατικά χαρακτηριστικά..... 130

Επίδραση σε ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά 130

Επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης 130

Συζήτηση..... 130

..... 131

Σχήμα 6.4: Συγκεντρωτική επίδραση των διαιτών μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες έναντι των χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια στα επίπεδα 131

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: 138

4η ΜΕΛΕΤΗ: Η επίδραση της μεσογειακής δίαιτας και του μεσογειακού τρόπου ζωής σε βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος 138

Εισαγωγή 138

Μεθοδολογία 140

Πληθυσμός της μελέτης..... 140

Σχεδιασμός της μελέτης..... 142

Παραπομπτή ασθενών 142

Τυχαιοποίηση των ασθενών στις ομάδες παρέμβασης 142

Σχήμα 7.1: Διάγραμμα ροής της κλινικής μελέτης 143

Διαιτητική παρέμβαση και παρακολούθηση στις ομάδες ενταντικής παρέμβασης 144

Σχήμα 7.2: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της μελέτης. 145

Πίνακας 7.1: Στόχοι των ομάδων παρέμβασης επιγραμματικά.....146
Δομή συνεδριών.....148
Περιεχόμενο επόμενων συνεδριών: 149
Ανθρωπομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά.....149
Αξιολόγηση της διαιτητικής πρόσληψης.....150
Εκτίμηση φυσικής δραστηριότητας.....151
Προσδιορισμός διάρκειας και ποιότητας ύπνου.....152
Βιοχημικές και κλινικές παράμετροι.....153
Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC), διέγερση τους με LPS και προσδιορισμών φλεγμονωδών κυτταροκινών.....154
Ελαστογραφία ήπατος (Share-wave Elastography).....155
Κύρια καταληκτικά σημεία παρέμβασης.....156
Στατιστική ανάλυση.....156
Αποτελέσματα.....159
Πίνακας 7.2: Περιγραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών ανάλογα με την ομάδα παρέμβασης στην αρχή της μελέτης. 161
Πίνακας 7.3: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση. 162
Πίνακας 7.4: Συνήθειες σωματικής δραστηριότητας των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.....163
Πίνακας 7.4: Συνήθειες σωματικής δραστηριότητας των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.....164
Πίνακας 7.5: Συνήθειες τρόπου ζωής των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.....165
Πίνακας 7.6: Κατανάλωση ομάδων τροφίμων στους ασθενείς των τριών ομάδων παρέμβασης, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση. 167
Πίνακας 7.7: Πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την παρέμβαση. 170
Πίνακας 7.8: Δείκτες ηπατικής λειτουργίας των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.....173
Πίνακας 7.9: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.....175
Πίνακας 7.10: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.....177

Πίνακας 7.11: Δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση. 180

Πίνακας 7.12: α). Επίπεδα έκκρισης της ιντερλευκίνης 1β από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 4 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης. 181

Πίνακας 7.12: β). Επίπεδα έκκρισης της ιντερλευκίνης 1β από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 24 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης. 182

Πίνακας 7.13: α). Επίπεδα έκκρισης της TNF-α από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 4 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης..... 183

Πίνακας 7.13: β). Επίπεδα έκκρισης της TNF-α από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 24 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης..... 184

Συζήτηση..... 186

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΣΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ 194

Βιβλιογραφία 196

Παράρτημα Α: 224

Δημοσιευμένες εργασίες..... 224

Παράρτημα Β..... 271

Συντμήσεις – Συντομογραφίες

ΔΜΣ	Δείκτης μάζας σώματος	*Body mass index*
ΔΕ	Διάστημα εμπιστοσύνης	*Confidence interval*
ΜΔ	Μεσογειακή δίαιτα	*Mediterranean diet*
MET	Μεταβολική μονάδα παραγωγής έργου	*Metabolic equivalent of task*
ΜΣ	Μεταβολικό σύνδρομο	*Metabolic syndrome*
ΜΤΖ	Μεσογειακός τρόπος ζωής	*Medieterranean lifestyle*
ΟΕ	Ομάδα ελέγχου	*Control group*
ΣΑΑΥ	Σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας ύπνου	*Obstructive sleep apnea*
ΣΔτ2	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	*Diabetes type 2*
ΣΛ	Λόγος σχετικών πιθανοτήτων	*Odds ratio*
ΦΔ	Φυσική δραστηριότητα	*Physical activity*
ΗΚΚ	Ηπατοκυτταρικός Καρκίνος	*Hepatocellular cancer*
^{1}H-MRS	*Proton magnetic resonance Spectroscopy*	Μαγνητική φασματοσκοπία συντονισμού πρωτονίων
AKT/PKB	*Protein Kinase B*	Πρωτεϊνική κινάση Β
ALP	*Alkaline phosphatase*	Αλκαλική φωσφατάση
ALT	*Alanine transaminase*	Τρανσαμινάση της αλανίνης
ApoB	*Apolipoprotein B*	Απολιποπρωτεΐνη Β
AST	*Aspartate aminotransferase*	Ασπαρτική τρανσαμινάση
BLS	*Bright liver score*	Δείκτης υπερηχογένειας ήπατος
CT	*Computed tomography*	Αξονική τομογραφία
DHA	*docosahexaenoic acid*	Δοκοσαεξανοϊκό οξύ
DNL	*De novo lipogenesis*	Εξ'υπαρχής λιπογένεση
EPA	*Eicosapentaenoic acid*	Εικοσαπεντανοϊκό οξύ
FFAs	*Free fatty acids*	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
GGT	*Gamma-glutamyl transpeptidase*	γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση
GSH	*Glutathione*	Γλουταθειόνη
HDL-C	*High density lipoprotein*	Χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών
HMG CoA	*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*	3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλο-συνένζυμο Α - αναγωγάση
HOMA-IR	*Homeostatic model assessment-insulin resistance*	Ομοιοστατικό μοντέλοεκτίμησης της ινσουλινοαντίστασης
HSL	*Hormone-sensitive lipase*	Ορμονοευαίσθητη λιπάση
IL-1	*Interleukine-1*	Ιντερλευκίνη-1
IL-1β	*Interleukin-1β*	Ιντερλευκίνη-1β
IL-2	*Interleukine-2*	Ιντερλευκίνη-2

IL-6	*Interleukine-6*	Ιντερλευκίνη-6
IL-8	*Interleukine-8*	Ιντερλευκίνη-8
IHTG	*Intra-hepatic triglycerides*	Ενδοηπατικά τριγλυκερίδια
IQR	*Interquartile range*	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος
IR	*Insulin resistance*	Αντίσταση στην ινσουλίνη
JNK1	*Jun N-terminal kinase 1*	JNK1 κινάση
LDL-C	*Low density lipoprotein*	Χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών
MedDietScore	*Mediterranean diet score*	Δείκτης βαθμού υιοθέτησης της μεσογειακής δίαιτας
MEDLIFE	*Mediterranean lifestyle index*	Δείκτης βαθμού υιοθέτησης του Μεσογειακού τρόπου ζωής
MIT	*Moderate intensity training*	Μέτριας έντασης προπόνηση
MRC	*Mitochondrial respiratory chain*	Μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα
MRI	*Magnetic resonance imaging*	Μαγνητική τομογραφία
mtDNA	*Mitochondrial DNA*	Μιτοχονδριακό DNA
MUFA	*Monounsaturated fatty acids*	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NAFLD	*Non alcoholic fatty liver disease*	Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος
NASH	*Non alcoholic steatohepatitis*	Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα
NEFA	*Non-esterified fatty acids*	Μη-εστεροποιημένα λιπαρά οξέα
NF-kB	*Nuclear factor kappa B*	Πυρηνικός παράγοντας kappa B
PAI-1	*Plasminogen activator inhibitor-1*	Αναστολέας της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου 1
PAL	*Physical activity level*	Επίπεδο φυσικής δραστηριότητας
PCA	*Principal component analysis*	Ανάλυση σε κύριες συνιστώσες
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*	Κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3
PKCe	*Protein kinase Ce*	Πρωτεϊνική κινάση Ce
PNPLA3 gene	*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*	Γονίδιο παλατίν όπως φωσφολιπάση-3
PPAR-α	*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*	Υποδοχέας που επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων α
PPAR-γ	*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*	Υποδοχέας που επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων γ
PRISMA	*Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*	Προτεινόμενα σημεία αναφοράς για συστηματικές ανασκοπήσεις και μετα-ανάλυσεις
PUFA	*Polyunsaturated fatty acids*	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RAS	*Renin angiotensin system*	Σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης ΙΙ
RBP-4	*Retinol binding protein 4*	Πρωτεΐνη δέσμευσης της ρετινόλης 4
RCT	*Randomized clinical trial*	Τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη
ROS	*Reactive oxygen species*	Ελεύθερες μορφές οξυγόνου

RXR	*Retinoid X receptor*	Υποδοχέας Χ του ρετινοϊκού οξέος
SC	*Stellate cells*	Αστεροειδή κύτταρα
SFA	*Saturated fatty acids*	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
SMD	*Standardized mean difference*	Τυποποιημένη μέση διαφορά
TAG	*Triacylglycerols*	Τριακυλογλυκερόλες
TE	*Transient elastography*	Ελαστογραφία
TNF-α	*Tumor necrosis factor-alpha*	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
TNFα-R	*TNFα-receptor*	Υποδοχέας του TNF-α
TZDs	*Thiazolidinediones*	Θειαζολιδινεδιόνες
US	*Ultrasound*	Υπερηχογράφημα
VLDL	*Very low density lipoprotein*	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
HIIT	*High intensity interval training*	Υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση
HIT	*High intensity training*	Υψηλής έντασης προπόνηση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) αποτελεί τη συχνότερη αιτία ηπατικής διαταραχής στις δυτικές κοινωνίες. Σχετίζεται ισχυρά με την παρουσία μεταβολικού συνδρόμου (ΜΣ) και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (ΣΔτ2). Πληθώρα μελετών υποστηρίζουν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ μεμονωμένων ομάδων τροφίμων και τον κίνδυνο ή την πιθανότητα εμφάνισης NAFLD, ωστόσο ο ρόλος της επίδρασης των διαφόρων διατροφικών προτύπων στην NAFLD, είναι λιγότερο μελετημένος. Από την άλλη, η διαθέσιμη βιβλιογραφία αφορά κυρίως σε συσχετίσεις μεταξύ μιας πτυχής του τρόπου ζωής, όπως είναι η δίαιτα ή η φυσική δραστηριότητα, ενώ αναφορές σε άλλες πτυχές, όπως είναι το κάπνισμα ή η διάρκεια και η ποιότητα του ύπνου, παραμένουν αποσπασματικές. Όσον αφορά στην αντιμετώπιση της νόσου, επί του παρόντος, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής (μέσω διατροφής και άσκησης) παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος για τη θεραπεία των ασθενών. Παρόλα αυτά, σαφώς διατυπωμένες συστάσεις δίαιτας και άσκησης για τη διαχείριση της NAFLD δεν υπάρχουν, και υπάρχει ανάγκη για ισχυρά και λεπτομερή στοιχεία αναφορικά με την επίδραση της άσκησης και της διατροφής. Παράλληλα, η μεσογειακή δίαιτα (ΜΔ) είναι ένα διατροφικό πρότυπο, ευρέως σχετιζόμενο με ευνοϊκά αποτελέσματα για την υγεία. Περιορισμένα, επιδημιολογικά κυρίως δεδομένα, φαίνεται να συνδέουν τη ΜΔ με ευνοϊκές επιδράσεις και στη NAFLD. Πρόσφατα, η πυραμίδα της ΜΔ έχει αναθεωρηθεί, συμπεριλαμβάνοντας, μεταξύ άλλων, εκτός από τις συνήθειες φαγητού και ποτού, και οδηγίες για επαρκή ανάπαυση και φυσική δραστηριότητα.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνήσει τη θέση των διαφόρων συνιστωσών του τρόπου ζωής ως παραγόντων κινδύνου της NAFLD, και βάσει των δεδομένων αυτών να σχεδιάσει και να υλοποιήσει ένα πρωτόκολλο αντιμετώπισης της νόσου, βασισμένο σε μία παρέμβαση που αφορούσε στον τρόπο ζωής των ασθενών. Γι αυτόν τον λόγο διενεργήθηκαν 4 μελέτες στο πλαίσιο των οποίων: α) διερευνήθηκε η επίδραση των διαφόρων χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής διεξάγοντας δύο επιδημιολογικές μελέτες (μία συγχρονική και μία ασθενών-υγιών), β)

διεξήχθη μία συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των παρεμβάσεων που εφάρμοσαν πρωτόκολλα τροποποίησης του τρόπου ζωής, και στη συνέχεια λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, γ) σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της ΜΔ ή του MTZ, παράλληλα με απώλεια βάρους, στην αντιμετώπιση της νόσου.

Στην πρώτη μελέτη, συμπεριελήφθησαν 100 ασθενείς με υπερηχογραφική διάγνωση NAFLD και 55 υγιείς εθελοντές, σταθμισμένοι ως προς την ηλικία, το φύλο και τον δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ). Οι διαιτητικές συνήθειες των συμμετεχόντων, καθώς και το επίπεδο σωματικής δραστηριότητας αξιολογήθηκαν μέσω κατάλληλων ερωτηματολογίων. Επιπλέον, καταγράφηκαν το σύνολο των ωρών ύπνου κατά τη διάρκεια της νύχτας και η διάρκεια μεσημεριανής σιέστας. Ως συνιστώμενη διάρκεια ύπνου ορίστηκε η διάρκεια ύπνου ≥7 και ≤9 ώρες/ημέρα. Οι ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές κατανάλωναν λιγότερα λαχανικά και ξηρούς καρπούς, περισσότερα γλυκά, έπιναν λιγότερο καφέ και αλκοόλ (όλα τα P <0,05), ενώ παρουσίασαν χαμηλότερο επίπεδο φυσικής δραστηριότητας (P=0,006). Σε πολυμεταβλητή ανάλυση, το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας [Λόγος σχετικών πιθανοτήτων (ΣΛ) ανά 100 μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό ανά ημέρα (MET-min/ημέρα) = 0,74, 95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ): 0,61-0,89, P=0,002] συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, ενώ η κατανάλωση γλυκών (ΣΛ=2,13, 95% ΔΕ: 1,22-3,71, P=0,008) με αυξημένη πιθανότητα, ανεξάρτητα της κατάστασης του σωματικού βάρους και της θερμιδικής πρόσληψης και λαμβάνοντας υπόψη διάφορους άλλους συγχυτικούς παράγοντες. Η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου συσχετίστηκε οριακά και αντίστροφα με την παρουσία NAFLD (ΣΛ=0,38, 95% ΔΕ: 0,14-1,01, P=0,05).

Στη δεύτερη μελέτη, συμπεριελήφθησαν οι 100 ασθενείς της πρώτης μελέτης, και 36 ακόμη με υπερηχογραφική διάγνωση NAFLD. Οι διαιτητικές συνήθειες των ασθενών, το επίπεδο σωματικής δραστηριότητας και οι ώρες ύπνου καταγράφηκαν με τον ίδιο τρόπο. Τα πρότυπα τρόπου ζωής ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PCA). Η επιλογή των συνιστωσών βασίστηκε στο ποσοστό συνολικής διακύμανσης που ερμηνευόταν από τις συνιστώσες. Ειδικότερα, επιλέχθηκαν 8 συνιστώσες που εξηγούσαν το

67% της αρχικής μεταβλητότητας των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής που χρησιμοποιήθηκαν. Εξ΄αυτών, το πρότυπο 3, χαρακτηριζόμενο από υψηλή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλών λιπαρών, λαχανικών, ψαριών και ακολουθία της συνιστώμενης διάρκειας ύπνου, συσχετίστηκε αρνητικά με το δείκτη ινσουλινοαντίστασης HOMA-IR (τυποποιημένος συντελεστής β=-1,66, P=0,008) και τα επίπεδα ηπατικής ακαμψίας (τυποποιημένος συντελεστής β=-1,62, P=0,05), μετά από έλεγχο για συγκεκριμένους συγχυτικούς παράγοντες. Αντίθετα, το πρότυπο 1, χαρακτηριζόμενο από υψηλή κατανάλωση ολόπαχων γαλακτοκομικών, επεξεργασμένων δημητριακών, πατάτας, κόκκινου κρέατος, και υψηλή τηλεθέαση, ως μία έκφανση του καθιστικού τρόπου ζωής, συσχετίστηκε θετικά με τον δείκτη HOMA-IR (τυποποιημένος συντελεστής β=1,66, P=0,005). Ωστόσο η συσχέτιση αυτή αποδυναμώθηκε λαμβάνοντας υπόψη το επίπεδο φλεγμονής, δηλαδή τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α (P=0,14).

Στην τρίτη μελέτη, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση όλων των τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών (RCTs) που έγιναν σε ενήλικες ασθενείς με NAFLD, διαγνωσμένης μέσω απεικονιστικής μεθόδου ή βιοψίας, και δημοσιεύτηκαν από 01/01/2005 έως 31/08/2016. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Scopus (*www.scopus.com*) και η Εθνική Ιατρική βιβλιοθήκη των ΗΠΑ (*PubMed.gov*). Η ετερογένεια μεταξυ των μελετών ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας το *Cochran's Q test* και αποτιμήθηκε μέσω I^2. Για την εκτίμηση του συγκεντρωτικού αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη μέση διαφορά (ΤΜΔ), ενώ το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις όπου οι τιμές ετερογένειας I^2 ήταν ≥50%. Η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις συστάσεις της PRISMA (Προτεινόμενα σημεία αναφοράς για συστηματικές ανασκοπήσεις και μετα-ανάλυσεις, *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses).* Αναλύθηκαν 20 RCTs με συνολικά 1073 ασθενείς με NAFLD. Συγκριτικά με τη συνήθη κλινική πρακτική, οι παρεμβάσεις με άσκηση βελτίωσαν τα επίπεδα της τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT), της ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST) και της γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT) (όλα τα P<0,05). Επίσης, βελτιώθηκαν τα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους ανεξάρτητα των αλλαγών σωματικού βάρους (ΤΜΔ= -0,98, 95% ΔΕ: -1,30 έως -0,66). Όσον αφορά στον τύπο της

άσκησης, η απευθείας σύγκριση της αερόβιας άσκησης με την άσκηση αντοχής, δεν ανέδειξε κανέναν εκ των δύο τύπων άσκησης ανώτερο του άλλου ως προς τη βελτίωση των ηπατικών χαρακτηριστικών, ενώ η μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας, μέτριας έντασης προπόνηση (MIT), φάνηκε πιο ευεργετική συγκριτικά με τη χαμηλής-προς-μέτριας διάρκειας MIT, ή την υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση (HIIT). Οι παρεμβάσεις από το συνδυασμό άσκησης και δίαιτας βελτίωσαν τα επίπεδα της ALT (P<0,01), αλλά και τον δείκτη δραστηριότητας της νόσου NAS (NAFLD activity score) (ΤΜΔ= -0,61, 95% ΔΕ: -1,09 έως -0,13). Επιπλέον, αναφορικά με τη σύσταση της δίαιτας, οι μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες δίαιτες (δηλαδή, περιεκτικότητα υδατάνθρακων ≤45% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) όσο και οι χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια (δηλαδή, περιεκτικότητα λιπιδίων ≤30% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) φάνηκε ότι μπορούν να βελτιώσουν εξίσου τη λειτουργία του ήπατος, όπως απεικονίζεται από τις μειώσεις των ALT και AST.

Στην τέταρτη μελέτη, 63 ασθενείς υπέρβαροι/παχύσαρκοι (50±11ετών, ΔΜΣ=31,8±4,5 kg/m^2, 70% άντρες) με υπερηχογραφική διάγνωση NAFLD (και αυξημένα επίπεδα ALT και /ή GGT), τυχαιοποιήθηκαν ισάριθμα σε μία από τις παρακάτω τρεις ομάδες: (Α) ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21), (Β) ομάδα της μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21) ή (Γ) ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21). Οι συμμετέχοντες των ομάδων Β και Γ παρακολούθησαν ένα εντατικό πρόγραμμα παρέμβασης, αποτελούμενο από επτά 60λεπτες ομαδικές συνεδρίες (3-5 ατόμων) για 6 μήνες, με στόχο την απώλεια βάρους και την αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ. Στην ομάδα ΜΤΖ δόθηκαν επιπλέον οδηγίες για αύξηση της φυσικής δραστηριότητας και συμμόρφωση στη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου. Οι ασθενείς της ΟΕ έλαβαν μόνο γραπτές γενικές οδηγίες για έναν υγιεινό τρόπο ζωής. Στη αρχή της μελέτης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Στο τέλος της 6μηνης παρέμβασης, οι ομάδες ΜΔ και ΜΤΖ παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους [ΜΔ: διάμεσος -5,4% (ενδοτεταρτημοριακό εύρος -8,2 με -3,3), ΜΤΖ: -6,3% (-8,2 με 1,1), P=0,047] και μείωσαν περισσότερο το ΔΜΣ ($P_{MΔ}$=0,006 και P_{MTZ}=0,013, αντίστοιχα) συγκριτικά με την ΟΕ, η οποία παρουσίασε μικρή απώλεια της τάξης του 2% (-3,6 με 0,31). Παράλληλα, μόνο οι ομάδες Β και Γ αύξησαν την προσκόλληση στη ΜΔ σε σχέση με την ΟΕ (P=0,001), χωρίς ωστόσο σημαντικές

διαφορές μεταξύ των ομάδων εντατικής παρακολούθησης (P>0,05). Επιπλέον, μόνο η ομάδα MTZ αύξησε σημαντικά τα επίπεδα έντονης άσκησης, συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες της μελέτης (P_{MTZ}=0,007), ενώ παρά την αύξηση των ωρών ύπνου ($P_{εντός\ MTZ}$=0,03), δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (P=0,19). Ως προς την κύρια έκβαση της μελέτης, οι ομάδες ΜΔ και MTZ παρουσίασαν, μεταξύ άλλων, σημαντική βελτίωση στα επίπεδα της ALT, GGT και ηπατικής ακαμψίας σε σύγκριση με την ΟΕ (όλα τα P<0,05) και μάλιστα οι βελτιώσεις στα επίπεδα ALT και ηπατικής ακαμψίας ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους. Επιπλέον, σημαντικές βελτιώσεις παρατηρήθηκαν στο λιπιδαιμικό προφίλ και τα επίπεδα οξειδωτικού στρες των ασθενών των ομάδων εντατικής παρακολούθησης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, οι οποίες διατηρήθηκαν όταν λήφθηκε υπόψη η απώλεια βάρους ως συγχυτικός παράγοντας (P<0,05). Ωστόσο η ομάδα MTZ δεν παρουσίασε κάποιο πλεονέκτημα ως προς τα καταληκτικά σημεία της μελέτης συγκριτικά με την ομάδα ΜΔ.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, που αρχικά, είχε ως στόχο να διερευνήσει την επίδραση των διαφόρων χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής στην πιθανότητα παρουσίας NAFLD, το υψηλότερο επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου συσχετίστηκαν με χαμηλότερη πιθανότητα, ενώ η κατανάλωση γλυκών με υψηλότερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD. Επιπλέον, η υψηλή προσκόλληση σε ένα υγιεινό πρότυπο, πλούσιο σε γαλακτοκομικά χαμηλών λιπαρών, λαχανικά και ψάρια, παράλληλα με την ακολουθία της συνιστώμενης διάρκειας ύπνου, συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη και ηπατική ακαμψία σε ασθενείς με NAFLD, ανεξάρτητα της κατάστασης βάρους και της ενεργειακής πρόσληψης. Ως προς την αντιμετώπιση της νόσου, τα αποτελέσματα της συστηματικής μετα-ανάλυσης έδειξαν ότι οι παρεμβάσεις μόνο με άσκηση ή συνδυασμού δίαιτας και άσκησης μπορούν να βελτιώνουν τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων, ενδοηπατικού λίπους, καθώς και τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με NAFLD. Η άσκηση μάλιστα φάνηκε ότι μπορεί να ασκεί ευεργετική επίδραση στα ενδοηπατικά τριγλυκερίδια ακόμη και επί απουσίας απώλειας βάρους. Από τη διεξαγωγή της ελεγχόμενης τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης, φάνηκε ότι μία εντατικοποιημένη παρέμβαση διάρκειας 6 μηνών, βασισμένη σε μία υποθερμιδική μεσογειακού τύπου δίαιτα μπορεί να βελτιώσει τα

επίπεδα ηπατικών ενζύμων και ηπατικής ακαμψίας, καθώς και το επίπεδο οξειδωτικού στρες των ασθενών με NAFLD, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, συγκριτικά με τη συνήθη πρακτική αντιμετώπισης. Συνεπώς, η συμμόρφωση στη μεσογειακή δίαιτα αποτελεί έναν αποτελεσματικό, αποδοτικό και εφικτό τρόπο διαχείρισης των ασθενών με NAFLD στην καθημερινή κλινική πρακτική.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of liver disease in Western societies. It is strongly associated with the presence of the metabolic syndrome (MetS) and type 2 diabetes. Numerous studies suggest a strong correlation between individual food groups and the risk or the likelihood of having NAFLD. However, studies exploring the role of different dietary patterns in NAFLD, are sparse. On the contrary, the available literature mainly suggests relations between one lifestyle aspect, such as diet or physical activity, while data regarding other aspects, such as smoking or duration and quality of sleep, are fragmentary. Regarding NAFLD treatment lifestyle changes (through diet and exercise) currently remain the cornerstone therapy. Nevertheless, there is lack of clearly stated diet and exercise recommendations for NAFLD management, while the need for strong and detailed information regarding the effect of exercise and diet is imperative. At the same time, Mediterranean diet (MD) is a pattern, widely associated with beneficial effects on health. Limited, mainly epidemiological, data seem to also link MD with favorable effects on NAFLD. Recently, the MD pyramid has been revised to include, apart from dietary and drinking habits, recommendations related to adequate sleep and physical activity.

Taking under consideration all the above, the main aim of this thesis was to investigate the effect of several lifestyle components as risk factors for NAFLD, and by using these data to design and implement a disease management protocol, based on a lifestyle intervention. For this reason, four studies have been conducted, including: a) the examination of the effects of lifestyle habits on the likelihood of having NAFLD by conducting two epidemiological studies (one cross-sectional and one case-control study), b) a systematic review and a meta-analysis of interventions related to lifestyle modification, and then based on the results of the above studies, c) a randomized controlled clinical trial designed and implemented in order to investigate the effect of increased adherence to the MD, along with weight loss, in NAFLD treatment.

In the first study, 100 patients with ultrasonographic diagnosis of NAFLD and 55 healthy controls, matched for age, sex and body mass index (BMI) were included. The dietary habits of

participants as well as the level of physical activity were assessed through appropriate questionnaires. Moreover, total sleep hours during night and midday siesta were recorded. Optimal sleep duration was defined as sleep duration ≥7 and ≤9 hours / day. Patients compared to controls consumed less vegetables and nuts, more sweets, drank less coffee and alcohol (all P <0.05), while exhibited lower levels of physical activity (PA) (P = 0.006). In multivariate analysis, the PA level [odds ratio (OR) per 100 metabolic units (MET) per minute per day (MET-min / day) = 0.74, 95% confidence interval (CI): 0.61 -0.89, P = 0.002] was associated with lower likelihood of NAFLD presence, while sweets consumption (OR = 2.13, 95% CI: 1.22-3.71, P = 0.008) was associated with an increased likelihood, irrespective of body weight status and caloric intake, and taking into account several other confounders. The optimal sleep duration was marginally correlated and inversely linked to NAFLD presence (OR = 0.38, 95% CI: 0.14-1.01, P = 0.05).

In the second study, the 100 patients of the first study and 36 more with ultrasound based NAFLD diagnosiswere included. The patient's dietary habits, physical activity level and sleeping hours were assessed by the same way. Lifestyle patterns were detected using principal component analysis (PCA). Eight components were selected, explaining the 67% of the initial variation of the lifestyle characteristics used. Out of these, component 3, characterized by a high consumption of low fat dairy, vegetables, fish and optimal sleep duration was negatively associated with the insulin resistance index, i.e. HOMA-IR (standardized factor b = -1.66, P = 0.008) and liver stiffness levels (standardized factor b = -1.62, P = 0.05), after controlling for certain confounders. On the contrary, component 1, characterized by high consumption of high fat dairy, refined cereals, potatoes, red meat, and high TV-hours viewing, as a facet of sedentary lifestyle, was positively associated with HOMA-IR (standardized b = 1.66, P = 0.005). However this association was weakened, when the level of inflammation was taken into consideration, ie. adiponectin levels and TNF-a (P = 0.14).

In the third study, a systematic review and meta-analysis of RCTs in adult patients with NAFLD, diagnosed through biopsy or imaging, and published from 01/01/2005 to 31/08/2016 was conducted. The databases used were Scopus (www.scopus.com) and the National Library of Medicine US (PubMed.gov). Heterogeneity among studies was tested using Cochran's Q test and

was assessed by I^2. In order to estimate the effect size, the standardized mean difference (SMD) was used, while in cases where the heterogeneity I^2 values were ≥50%, the random effects model was used. The meta-analysis was performed according to the recommendations of the PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). Twenty RCTs were analyzed with a total of 1073 NAFLD patients. Compared to usual care, exercise only interventions improved levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) (all P <0.05). Also, levels of intrahepatic fat were improved regardless of weight changes (SMD = -0.98, 95% CI: -1.30 to -0.66). Regarding exercise type, direct comparisons between aerobic and resistance exercise, showed similar results in improving hepatic characteristics, while moderate-to-high volume, moderate training (MIT) seemed more beneficial than low-to-moderate volume MIT, or high-intensity interval training (HIIT). Diet plus exercise interventions also improved ALT levels (P <0.01), and NAFLD activity score (SMD = -0.61, 95% CI: -1.09 to -0.13). Moreover, regarding diet composition, moderate carbohydrate diets (i.e., carbohydrates ≤45% of daily energy intake) and low / moderate fat diets (i.e., fat ≤30% of daily energy intake) showed similar improvements in liver function, as this was illustrated by the ALT and AST reductions.

In the fourth study, 63 overweight / obese patients (50±11years, BMI = 31.8±4.5kg/m^2, 70% men) with ultrasonographic proven NAFLD (and elevated ALT and / or GGT levels), were equally randomized in one of the following three groups: (A) control group (CG) (n = 21), (B) Mediterranean diet group (MD) (n = 21) or (C) Mediterranean lifestyle group (MDL) (n = 21). Participants of groups B and C attended an intensive intervention program, consisting of seven 60-minute group sessions (3-5 people) for 6 months, aimed at weight loss and increasing adherence to the MD. In MDL group additional guidance for increasing physical activity and improving sleep habits were given. Patients in CG received only written information for a healthy lifestyle. At baseline, there were no significant differences between groups. At the end of the 6 month intervention, the MD and MDL groups showed greater weight loss [MD: median: -5.4 % (interquartile range: -8.2 to -3.3), MDL: -6.3% (-8.2 to 1.1), P = 0.047] and higher reduction in BMI (PMD=0.006 and PML=0.013, respectively) compared to the CG, which showed a small loss of 2% (-3.6 to 0.31). Moreover, only B and C groups increased the adhrerence to the

MD compared to CG (P = 0.001), but without significant differences between intensive care groups (P> 0.05). Furthermore, only the MDL group showed a significant increase in vigorous exercise levels, compared to the other two study groups (P_{MDL} = 0.007), while despite the increase in sleep hours ($P_{within\ MDL}$ = 0.03), there were no significant differences between groups (P = 0.19). Regarding the main outcome of the study, the MD and MDL groups showed significant improvements in ALT, GGT and liver stiffness levels compared to the CG (all P <0.05), and interestingly the improvements in ALT and liver stiffness were independent of weight loss. Furthermore, significant improvements were observed in the lipid profile and oxidative stress levels of patients in the intensive care groups, compared to the CG, which were maintained when weight loss was taken into consideration as a confounding factor (P<0.05). However, the MDL group did not show any advantage regarding the study endpoints compared to MD group.

According to the results of the present thesis, the higher level of physical activity and optimal sleep duration were associated with a lower NAFLD likelihood, while sweets consumption was linked to a higher likelihood of NAFLD presence. Moreover, high adherence to a healthy lifestyle pattern, rich in low-fat dairy, vegetables and fish, along with optimal sleep duration, was associated with reduced levels of insulin resistance and liver stiffness in patients with NAFLD, regardless of weight status and energy intake. Regarding the disease treatment, the results of the systematic review and meta-analysis showed that exercise only or diet plus exercise interventions can improve liver enzyme levels, intrahepatic fat, and the histological features of NAFLD patients. Namely, exercise was found to exert beneficial effects on intrahepatic triglycerides even in the absence of weight loss. Furthermore, according to the results of the controlled randomized clinical study, it was shown that an intensive 6-month intervention based on a hypocaloric MD can improve liver enzymes and liver stiffness, as well as oxidative stress levels in patients with NAFLD, independently of weight loss, compared to common clinical practice. Hence, interventions aiming at increasing the adherence to the MD can serve as an effective, efficient and feasible way to manage NAFLD patients in daily clinical practice.

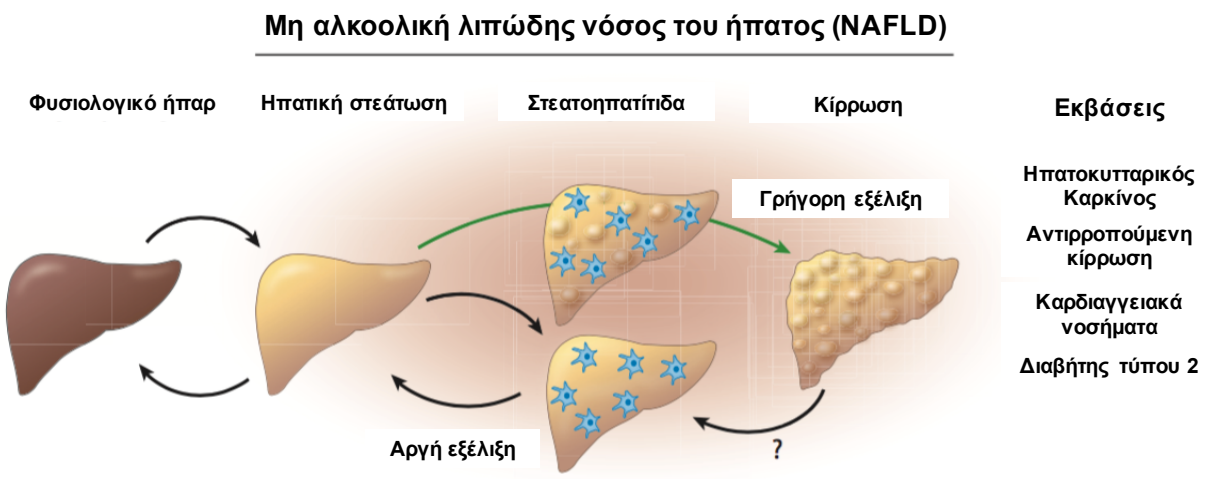
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΑ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) συσχετίζεται ισχυρά με την παρουσία παχυσαρκίας, σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (ΣΔτ2), μεταβολικού συνδρόμου (ΜΣ) και τις συνιστώσες αυτού και για το λόγο αυτό αναφέρεται συχνά ως η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου. Αποτελεί τη συχνότερη αιτία ηπατικής διαταραχής στις δυτικές κοινωνίες, ακολουθώντας τον ολοένα αυξανόμενο επιπολασμό της παχυσαρκίας. Επί του παρόντος, επίσημος θεραπευτικός αλγόριθμος δεν υπάρχει και η αντιμετώπιση της νόσου βασίζεται στη θεραπεία των σχετιζόμενων με τη νόσο κλινικών καταστάσεων, μέσω της αλλαγής του τρόπου ζωής και της απώλειας βάρους.

1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή εταιρεία μελέτης ήπατος (European Association for the Study of Liver Disease, EASL), ως μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος ορίζεται η συσσώρευση λίπους, που σχετίζεται με την παρουσία ινσουλινοαντίστασης, σε ποσοστό >5% του συνολικού βάρους του ήπατος (ηπατική στεάτωση), που δεν οφείλεται σε υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ, εξαιρουμένων άλλων αιτιών στεάτωσης, όπως φαρμακευτικής ή ιογενούς αιτιολογίας. Η ηπατική στεάτωση μπορεί να οριστεί είτε ιστολογικά, είτε απεικονιστικά (≥ 5% μέσω μαγνητικής φασματοσκοπίας συντονισμού πρωτονίων (^{1}H-MRS) ή ποσοτικά μέσω μαγνητικής τομογραφίας) (EASL-EASD-EASO, 2016).

Η νόσος περιλαμβάνει όλο το φάσμα που εκτείνεται από την απλή στεάτωση και τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (non alcoholic steatohepatitis, NASH) με προοδευτική ίνωση ως την κίρρωση ήπατος με ενδεχόμενη την εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ). Ιστολογικά, ως NASH ορίζεται η παρουσία ηπατικής στεάτωσης μαζί με φλεγμονή και ηπατοκυτταρικό τραύμα (ballooning) με ή χωρίς ίνωση (Chalasani et al., 2012). Η διαφορική διάγνωση μεταξύ μη αλκοολικής και αλκοολικής αιτιολογίας ηπατικής στεάτωσης ή στεατοηπατίτιδας μπορεί να τεθεί ελλείψει σημαντικής κατανάλωσης αλκοόλ, που ορίζεται ως λιγότερο από 30 γρ./ ημέρα αλκοόλ για τους άνδρες και 20 γρ./ ημέρα για τις γυναίκες (Dowman et al., 2010).



Σχήμα 1.1: Φυσική εξέλιξη της NAFLD. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα στάδια και οι κλινικές οντότητες που συμπεριλαμβάνονται υπό τον όρο NAFLD (Haas et al., 2016).

Λόγω της υψηλής συσχέτισης της NAFLD με την παρουσία ΜΣ και τον ΣΔτ2, η νόσος εξελίσσεται ακολουθώντας τις ολοένα αυξανόμενες τάσεις της παχυσαρκίας (Fazel et al.). Στα περισσότερα άτομα με NAFLD, η νόσος είναι σταθερή χωρίς κλινικά επακόλουθα, ενώ είναι και αναστρέψιμη κατά τα πρώτα στάδια (***Σχήμα 1.1***). Ωστόσο, παρουσιάζει ιδιαίτερη κλινική σημασία, καθότι από το σύνολο των ασθενών με NAFLD, το 30% θα εμφανίσει NASH, με ή χωρίς ίνωση, εκ των οποίων το 20% θα εξελιχθεί σε κίρρωση ήπατος. Από τους ασθενείς με κίρρωση, το 30% - 40% αναπτύσσουν ηπατική ανεπάρκεια και τελικά θα καταλήξουν μέσα στα επόμενα 10 χρόνια (Levene and Goldin, 2012).

1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο επιπολασμός και η επίπτωση της NAFLD, καθώς και ο ακριβής αριθμός ασθενών είναι δύσκολο να εκτιμηθούν, εξαιτίας της έλλειψης μη επεμβατικών αξιόπιστων δεικτών και της ανάγκης ιστολογικής εξέτασης, του υψηλού άμεσου και έμμεσου κόστους των εξετάσεων αλλά

και της απουσίας αποτελεσματικών θεραπειών (Schuppan and Schattenberg, 2013). Θεωρείται ότι ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται από 6,3% έως 33%, με μία διάμεσο περίπου στο 20% στον γενικό πληθυσμό. Αντίθετα, ο εκτιμώμενος επιπολασμός της NASH είναι μικρότερος και κυμαίνεται στο 3 με 5%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ασθενών με κίρρωση δεν είναι γνωστό (Chalasani et al., 2012, Obika and Noguchi, 2012).

Στις δυτικές κοινωνίες, ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 17 και 46% του πληθυσμού, ακολουθώντας τα αυξανόμενα ποσοστά παχυσαρκίας και ΣΔτ2, και με διακύμανση που εξαρτάται από την ηλικία, το φύλο και την εθνικότητα του πληθυσμού που μελετάται (EASL-EASD-EASO, 2016). Στη Νότιο και Νοτιοανατολική Ασία, το αντίστοιχο ποσοστό κυμαίνεται μεταξύ 9 - 45%, αγγίζοντας σχεδόν ανάλογα ποσοστά με αυτά των δυτικών χωρών (Farrell et al., 2013b), ενώ παρατηρείται μια σημαντική διαφορά μεταξύ αγροτικών και αστικών περιοχών, υποδηλώνοντας ότι ο καθιστικός τρόπος ζωής στα αστικά κέντρα συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη της NAFLD/NASH στην Ασία (Schuppan and Schattenberg, 2013). Στην Ευρώπη, περίπου το ¼ του πληθυσμού (25%) πάσχει από NAFLD (Blachier et al., 2013), ενώ αντίστοιχα δεδομένα από πληθυσμιακές μελέτες για τον Ελληνικό πληθυσμό δεν υπάρχουν (Giannousis et al., 2010).

Το ποσοστό NAFLD σε ασθενείς με ΣΔτ2 είναι επίσης υψηλό και κυμαίνεται από 49% μέχρι 62%, ενώ ο αντίστοιχος επιπολασμός της NASH αυξάνει στα 12,2% σε σχέση με το περίπου 5% που είναι σε μη διαβητικούς ασθενείς (Obika and Noguchi, 2012). Επιπλέον, σύμφωνα με μία πρόσφατη μετα-ανάλυση 86 μελετών συνολικού δείγματος 8.515.431 ασθενών με NAFLD από 22 χώρες, φάνηκε ότι το 51% των ασθενών με NAFLD και το 82% των ασθενών με NASH είναι παχύσαρκοι (Younossi et al., 2016).

Η νόσος είναι, επίσης, παρούσα σε ένα ποσοστό περίπου 7% σε άτομα φυσιολογικού βάρους, κυρίως γυναίκες σε νεαρή ηλικία, με φυσιολογικά ηπατικά ένζυμα (EASL-EASD-EASO, 2016, Younossi et al., 2012). Μάλιστα, τα αποτελέσματα μιας μεγάλης πολυκεντρικής προοπτικής μελέτης των De la Cruz et al. ανέφεραν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας στα άτομα φυσιολογικού βάρους, συγκριτικά με τα υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα με NAFLD (Wattacheril and Sanyal, 2016).

1.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

1.3.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες

Ηλικία

Η προχωρημένη ηλικία είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ηπατικής στεάτωσης, ωστόσο η νόσος μπορεί να εμφανιστεί και κατά την παιδική ηλικία. Οι Frith et al. μελετώντας 351 ασθενείς με NAFLD πιστοποιημένη με βιοψία, βρήκαν ότι οι μεγαλύτεροι σε ηλικία ασθενείς (οι γηραιότεροι ≥60 ετών & οι μεσήλικες ≥50 ετών και <60 ετών) είχαν σημαντικά μεγαλύτερου βαθμού ίνωση ήπατος και παρουσίαζαν μεγαλύτερο ποσοστό κίρρωσης (Frith et al., 2009). Οι ηλικιωμένοι δεν έχουν μόνο αυξημένο επιπολασμό της νόσου, αλλά και αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης της νόσου σε ίνωση, κίρρωση και ΗΚΚ (Ong et al., 2008). Ωστόσο, δεν είναι βέβαιο εάν το γεγονός αυτό είναι αποτέλεσμα της μεγαλύτερης διάρκειας της νόσου και του αυξημένου επιπολασμού των παραγόντων κινδύνου για NAFLD στα ηλικιωμένα άτομα ή της ηλικίας αυτής καθ' αυτής (Tiniakos et al., 2010).

Εθνικότητα

Ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να διαφοροποιείται ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα των ατόμων. Οι λόγοι δεν έχουν καθοριστεί πλήρως, αν και η γενετική προδιάθεση και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Σύμφωνα με τη μελέτη *Dallas Heart Study* στις ΗΠΑ (Browning et al., 2004) φαίνεται ότι οι Ισπανόφωνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά ηπατικής στεάτωσης (45%) αν και νεότεροι, ακολουθούμενοι από τους Λευκούς (33%) και τους Αφρικανούς (24%).

Φύλο

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η NAFLD και η NASH είναι περισσότερο συχνές στους άνδρες (Williams et al., 2011, Browning et al., 2004, Caballeria et al., 2010). Ωστόσο, ο επιπολασμός και η σοβαρότητα της NASH αυξάνουν στις γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακά (Ruhl and Everhart, 2004, Yatsuji et al., 2007), γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με την αυξημένη

συσσώρευση σπλαχνικού λίπους και την εγκατάσταση ΜΣ που παρατηρείται στις μεσήλικες γυναίκες (Ley et al., 1992), ενώ και τα χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων φαίνεται επίσης να παίζουν σημαντικό ρόλο (Kamada et al., 2011, Hagymasi et al., 2009). Το ανδρικό φύλο έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών, σοβαρότερου βαθμού ηπατική ίνωση και υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε ασθενείς με NAFLD (Papatheodoridis et al., 2007, Ong et al., 2008).

1.3.2. Κλινικοί παράγοντες

Παχυσαρκία και δείκτης μάζας σώματος

Η παχυσαρκία και ιδιαιτέρα η κεντρικού τύπου παχυσαρκία, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης και εξέλιξης της NAFLD (Macias-carballo and Romanque, 2013). Τόσο ο αυξημένος ΔΜΣ, όσο και τα αυξημένα επίπεδα σπλαχνικού λίπους έχουν συσχετισθεί θετικά με τη νόσο (Chalasani et al., 2012). Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο επιπολασμός της νόσου μπορεί να φτάσει έως το 80% ανάμεσα σε παχύσαρκους ασθενείς (ΔΜΣ ≥ 30 kg / m^2) (Younossi et al., 2016). Ωστόσο, μία ενδιαφέρουσα πτυχή στην αναφορά των Younossi et al. ήταν η μειωμένη δυνατότητα πρόβλεψης του ποσοστού παχυσαρκίας και της περίσσειας των ημερίσιων θερμίδων που θα μπορούσε να εξηγήσει τον επιπολασμό της νόσου, άποψη που υπαινίσσεται τη σημασία άλλων παραγόντων εκτός της παχυσαρκίας που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου (Younossi et al., 2016, Rinella and Charlton, 2016).

Μεταβολικό σύνδρομο

Η παρουσία ΜΣ και η υποκείμενη αυτού ινσουλινοαντίσταση είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου της νόσου (Lonardo et al., 2015). Σχεδόν το 90% των ασθενών με NAFLD εμφανίζει τουλάχιστον μία συνιστώσα του ΜΣ, ενώ το 33% έχει τρεις ή περισσότερες συνιστώσες (Almeda-Valdes et al., 2009). Επιπλέον, χαρακτηριστικά της NAFLD μπορεί να παρουσιάζονται και σε «μεταβολικά παχύσαρκα» φυσιολογικού βάρους άτομα,

δηλαδή άτομα με αυξημένη περιφέρεια μέσης, ιστορικό πρόσφατης αύξησης βάρους, χωρίς ωστόσο να ταξινομούνται στην κατηγορία των παχύσαρκων (Larter et al., 2010). Επιπλέον, υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν αναπτύσσουν όλα τα άτομα με ΜΣ NAFLD, αλλά ούτε και όλα τα άτομα με NAFLD έχουν ΜΣ (Vanni et al., 2010, Green, 2003). Μάλιστα φαίνεται ότι ο βαθμός ινσουλινοναντίστασης, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της νόσου μόνο στα άτομα με NAFLD που πληρούν τα κριτήρια του ΜΣ. Στα άτομα με NAFLD χωρίς ΜΣ, δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο.

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ινσουλινοαντίσταση, δυσλιπιδαιμία

Ο ΣΔτ2 και η NAFLD συχνά συνυπάρχουν, καθότι μοιράζονται κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς, όπως είναι η ινσουλινοαντίσταση. Οι ασθενείς με NAFLD που είναι διαβητικοί παρουσιάζουν αυξημένη θνητότητα, υψηλότερο ποσοστό καρδιαγγειακής νόσου απ' ό,τι οι μη διαβητικοί ασθενείς (Adams et al., 2010), ενώ έχει φανεί ότι όσο πιο σοβαρή είναι η ινσουλινοαντίσταση, τόσο πιο σοβαρό μπορεί να είναι και το στάδιο της νόσου (Kang et al., 2006). Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (TG) και τα χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL-C) είναι πολύ συχνά σε ασθενείς με NAFLD. Το ποσοστό της NAFLD σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία μπορεί να φτάσει και το 50% (Chalasani et al., 2012).

1.3.3. Γενετικοί παράγοντες κινδύνου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο βαθμός ηπατικής στεάτωσης μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ ατόμων που έχουν τα ίδια ποσοστά λίπους. Προοπτικές μελέτες σε μεγάλες οικογένειες έχουν δείξει ότι ο βαθμός ηπατικής στεάτωσης μπορεί να κληρονομείται σε ποσοστό που φτάνει το 27% (Feldstein, 2010). Κυριότερος αναγνωρισμένος γενετικός παράγοντας για τη NAFLD είναι το I148M αλλήλιο του *PNPLA3* γονιδίου (*patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 ή αλλιώς adiponutrin*). Πολυμορφισμοί του I148M αλληλίου οδηγούν στη σύνθεση πρωτεΐνης με ελαττωμένη λιπολυτική δράση και σε επακόλουθη αυξημένη κυτταρική εναπόθεση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (Vernon et al., 2011). Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα,

το αλληλόμορφο αυτό είναι πιο διαδεδομένο στους Ισπανόφωνους και λιγότερο στους Καυκάσιους και τους Αφρικανοαμερικανούς (Vernon et al., 2011).

1.3.4. Άλλοι παράγοντες

Ολοένα και περισσότερα επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η παρουσία συνδρόμου αποφρακτικής άπνοιας ύπνου (ΣΑΑΥ) συνδέεται στενά με την NAFLD ανεξάρτητα από τους κοινούς παράγοντες κινδύνου (Musso et al., 2013, Minville et al., 2014, Sookoian and Pirola, 2013). Ως επιβεβαίωση, πρόσφατη μετα-ανάλυση κατέληξε ότι οι ασθενείς με ΣΑΑΥ είχαν υψηλότερες τιμές ηπατικών ενζύμων καθώς και μεγαλύτερο ποσοστό παρουσίας NAFLD και ηπατικής ίνωσης σε σύγκριση με άτομα δίχως ΣΑΑΥ (Sookoian and Pirola, 2013). Επιπλέον, η παρουσία συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (Ramezani-Binabaj et al., 2014).

1.3.5. Συμπεριφορικοί παράγοντες

Κάπνισμα

Δεδομένα από πειραματικές μελέτες αναφέρουν ότι το κάπνισμα ενισχύει την ηπατοκυτταρική απόπτωση που προκαλείται μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες (Azzalini et al., 2010). Εντούτοις, τα δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους αναφορικά με την επίδραση του ενεργητικού ή του παθητικού καπνίσματος στην εμφάνιση και ιδίως στην εξέλιξη της NAFLD είναι συγκεχυμένα και απαιτείται περισσότερη έρευνα για τον σκοπό αυτό (Zein et al., 2011a, Liu et al., 2013, Yilmaz et al., 2010).

Ύπνος

Τα δεδομένα της επίδρασης του ύπνου στον κίνδυνο ή την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD είναι περιορισμένα, συσχετίζοντας τη μικρή διάρκεια ύπνου (<5 ώρες), την κακή ποιότητα ύπνου και την υπνηλία (>9 ώρες), που είναι επίσης χαρακτηριστική του ΣΑΑΥ, με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας της νόσου (Kim et al., 2013, Bernsmeier et al., 2015). Η υπνηλία έχει συσχετιστεί επίσης θετικά με αντίσταση στην ινσουλίνη και ορισμένα ιστολογικά

χαρακτηριστικά της NAFLD (Bernsmeier et al., 2015). Μάλιστα, η επίδραση του ύπνου στην NAFLD πιθανώς να διαμεσολαβείται από τον ΔΜΣ, υπογραμμίζοντας με αυτόν τον τρόπο το ρόλο της παχυσαρκίας στους ασθενείς αυτούς (Kim et al., 2013). Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί, ότι σε πρόσφατη μετα-ανάλυση 8 επιδημιολογικών μελετών σε 97.371 ασθενείς με NAFLD (Shen et al., 2016b), η διάρκεια ύπνου (μικρή ή μεγάλη) δεν φάνηκε να επηρεάζει την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD.

1.3.6. Συνήθειες φυσικής δραστηριότητας ως παράγοντας κινδύνου για NAFLD

Διάφοροι παράγοντες κινδύνου για τη νόσο έχουν διερευνηθεί, μεταξύ αυτών και οι συνήθειες άσκησης. Υπάρχουν σαφή δεδομένα ότι οι ασθενείς με NAFLD, συγκρινόμενοι με υγιείς εθελοντές ίδιας ηλικίας, είναι λιγότερο δραστήριοι, έχουν χειρότερη φυσική κατάσταση και συμμετέχουν περισσότερο σε χαμηλής έντασης δραστηριότητες (Williams, 2012, Gerber et al., 2012a, Krasnoff et al., 2008), ενώ μόλις το 20% των ασθενών φαίνεται να ακολουθεί τις συνιστώμενες κατευθυντήριες γραμμές για τη φυσική δραστηριότητα (Hannah and Harrison, 2016).

Στη μελέτη των *Gerber* και *συν*. (Gerber et al., 2012a) όπου αναλύθηκαν τα δεδομένα 3056 ατόμων από την πληθυσμιακή μελέτη NHANES (2003-2006), το 41% του συνόλου του δείγματος παρουσίαζε NAFLD έναντι του 59% που δεν είχε, ενώ το 9,4% πληρούσε τα κριτήρια για ΣΔτ2. Το επίπεδο φυσικής δραστηριοτητας αξιολογήθηκε με επιταχυνσιόμετρο. Οι ασθενείς με NAFLD εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερες καταγραφές άσκησης οποιουδήποτε επιπέδου συγκριτικά με τα υγιή άτομα, ενώ οι ασθενείς που είχαν ταυτόχρονα NAFLD και ΣΔτ2, βρίσκοταν στο χαμηλότερο εκατοστημόριο του μέσου όρου του επιπέδου άσκησης και της μέτριας-έντονης άσκησης. Σε μία άλλη μελέτη (Hallsworth et al., 2015c) 37 ασθενών με NAFLD και 37 υγιών εθελοντών ταιριασμένων ως προς το φύλο, την ηλικία και τον ΔΜΣ με τους ασθενεις, το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας αξιολόγηθηκε μέσω ενός συστήματος πολλαπλών αισθητήρων για 7 ημέρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι ασθενείς με NAFLD αφιέρωναν μισή ώρα την ημέρα περισσότερο σε καθιστικές δραστηριότητες και περπατούσαν κατά 18% λιγότερα βήματα σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Ως εκ τούτου,

η ενεργειακή δαπάνη κατά την άσκηση ήταν κατά 40% μικρότερη στους ασθενείς, ενώ και το σύνολο της ενεργειακής δαπάνης ήταν σημαντικά χαμηλότερο συγκριτικά με τους υγιείς. Επιπλέον, σε μία πρόσφατη συγχρονική μελέτη που διεξήχθη στην Κίνα (Wei et al., 2016a) σε 2054 άτομα, υψηλότερο ποσοστό ασθενών με NAFLD (11,1% vs. 6,4%), όπως αξιολογήθηκε με τον δείκτη *fatty liver index,* αφιέρωνε πάνω από 7 ώρες έναντι 2,2 - 5,0 ωρών, σε καθιστικές δραστηριότητες.

Η μειωμένη φυσική δραστηριότητα έχει συσχετιστεί με την παρουσία και τη σοβαρότητα διαφόρων καρδιο-μεταβολικών διαταραχών και ηπατικής βλάβης, λόγω αύξησης των διαθέσιμων ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids, FFAs), ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την ηπατική λιπογένεση και κατ΄ επέκταση την παροχή προφλεγμονωδών λιποκυτταροκινών στο ήπαρ (Kistler et al., 2011, Perseghin et al., 2007, Zelber-Sagi et al., 2008, Rabol et al., 2011).

1.3.7. Συνήθειες διατροφής ως παράγοντας κινδύνου για NAFLD

Το σταθερά θετικό ισοζύγιο ενέργειας, που προκύπτει από έναν συνδυασμό αυξημένης ενεργειακής κατανάλωσης και μειωμένης σωματικής δραστηριότητας, οδηγεί, μεταξύ άλλων, σε παχυσαρκία, αυξημένο σπλαχνικό λίπος, ινσουλινοαντίσταση, ΜΣ που όπως έχει ήδη αναφερθεί συσχετίζονται ισχυρά με τη νόσο (Larter et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η υψηλή θερμιδική πρόσληψη μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης (Brons et al., 2009), μέσω αύξησης των ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων (intra-hepatic triglycerides, IHTG) μετά από 3 μόλις ημέρες υπερκατανάλωσης τροφής, ανεξάρτητα από τη σύσταση της δίαιτας σε μακροθρεπτικά συστατικά και πριν από την αύξηση του σωματικού βάρους. Ομοίως, ο περιορισμός των θερμίδων μπορεί να μειώσει τα IHTG κατά 20%, εντός 48 ωρών (Kirk et al., 2009). Επιπλέον, τα αποτελέσματα μίας μεγαλης προοπτικής μελέτης σε Κινεζικό πληθυσμό 565 ατόμων χωρίς NAFLD στην αρχή της μελέτης, έδειξαν ότι το 13,5% του πληθυσμού ανέπτυξε NAFLD μέσα σε 3 με 5 χρόνια παρακολούθησης. Η επίπτωση της NAFLD

σχετίστηκε με την επίπτωση της κεντρικού τύπου παχυσαρκίας που εμφανίστηκε στο 31% των ασθενών με NAFLD (Wong et al., 2015).

Η πρόσληψη μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών ως παράγοντας κινδύνου ή προστασίας για τη νόσο

Ο κύριος όγκος της πληροφόρησης σχετικά με την επίδραση της κατανάλωσης μακροθρεπτικών συστατικών στην παρουσία της NAFLD, προέρχεται κυρίως από μελέτες ασθενών-μαρτύρων. Συνοπτικά, δεν αναδεικνύεται κάποια ξεκάθαρη και επαναλαμβανόμενη επιβαρυντική σχέση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών ή υπο-κατηγοριών αυτών με την παρουσία της νόσου. Αρκετές μελέτες ωστόσο υποστηρίζουν ότι οι ασθενείς με NAFLD, λαμβάνουν σημαντικά περισσότερες θερμίδες, ακολουθώντας μία δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και λιπίδια, και κυρίως σε κορεσμένα λιπαρά οξέα σε σύγκριση με υγιή άτομα, γεγονός που συντελεί στην αύξηση του ενδοηπατικού λίπους και της υποκείμενης ινσουλινοαντίστασης και μάλιστα ανεξάρτητα συνήθως της ηλικίας, του φύλου, του ΔΜΣ ή της παρουσίας παχυσαρκίας (Zelber-Sagi et al., 2016).

Σε μία συγχρονική μελέτη που διεξήχθη στην Κίνα (Cheng et al., 2016), σε 19 γυναίκες με NAFLD και 17 υγιείς εθελόντριες, μέσω της χρήσης ημερολογίων συχνότητας κατάναλωσης τροφίμων (food frequency questionnaire, FFQ), φάνηκε ότι οι ασθενείς λάμβαναν περισσότερες θερμίδες, ενώ παρουσίαζαν υψηλότερη πρόσληψη πρωτεϊνών και λιπιδίων, σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Μάλιστα, η υψηλή πρόσληψη ενέργειας και λίπους, συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους, όπως αξιολογήθηκε μέσω ^{1}H-MRS, ανεξάρτητα της ηλικίας και του ΔΜΣ. Εντούτοις, σε μία άλλη μελέτη στη Γερμανία 55 ασθενών με NAFLD και 88 υγιών εθελοντών, έπειτα από αξιολόγηση των διαιτητικών συνηθειών μέσω FFQ, ενώ οι ασθενείς παρουσίαζαν υψηλότερη θερμιδική πρόσληψη συγκριτικά με τους υγιείς, ανά 1000kcal θερμιδικής πρόσληψης, μόνο η πρόσληψη πρωτεΐνών ήταν σημαντικά υψηλότερη, ενώ δεν υπήρχαν διαφορές ως προς την πρόσληψη λιπιδίων και υδατανθράκων. Παρόλα αυτά, σε ένα δείγμα 14913 ατόμων από την Κορέα, από τη βάση δεδομένων της επιδημιολογικής

μελέτης KNHANES (Kwon et al., 2012), η πρόσληψη υδατανθράκων φάνηκε να συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα των ηπατικών τρανσαμινασών, ενώ η συνολική πρόσληψη λιπιδίων αρνητικά. Πιο συγκεκριμένα, η σχέση μεταξύ κατανάλωσης υδατανθράκων και επιπέδων ηπατικών ενζύμων φάνηκε να εμφανίζει γραφικά μια καμπύλη σχήματος J, με το χαμηλότερο επίπεδο ηπατικών ενζύμων να παρατηρείται σε πρόσληψη υδατανθράκων που αντιστοιχεί στο 50-60% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης. Πάντως, και στις διατροφικές συνήθειες 20 ασθενών με NAFLD που αξιολογήθηκαν μέσω ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και συγκρίθηκαν με αυτές 10 υγιών εθελοντών (Volynets et al., 2012), οι ασθενείς με NAFLD εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη πρόσληψη υδατανθράκων και μάλιστα σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης (και όχι σύνθετων υδατανθράκων) και πρωτεϊνών ιδιαίτερα ζωικής προέλευσης συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές, ενώ η πρόσληψη λιπιδίων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων. Τέλος, στη μελέτη των *Sathiaraj* και *συν*. (Sathiaraj et al., 2011), σε δείγμα 98 ασθενών με NAFLD και 102 υγιών μαρτύρων, ο δείκτης μάζας σώματος, η περίμετρος μέσης και το ποσοστό πρόσληψης λιπιδίων επί της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης συσχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας της νόσου. Η υψηλή πρόσληψη λιπιδίων αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση και εξέλιξη της NAFLD και έχει συσχετιστεί με αυξημένη ινσουλινοαντίσταση και διαταραχή της μεταγευματικής λιπαιμίας (McCarthy and Rinella, 2012). Επιπλέον, ο συνδυασμός μίας δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια και σακχαρόζη έχει προταθεί ότι επάγει την εμφάνιση στεατοηπατίτιδας, οξειδωτικού στρες και ίνωσης (Ishimoto et al., 2013).

Η ποιότητα του προσλαμβανόμενου λίπους της διατροφής έχει επίσης συσχετιστεί με την εμφάνιση της NAFLD. Οι ασθενείς με NAFLD τείνουν να καταναλώνουν υψηλότερα ποσοστά κορεσμένων λιπαρών οξέων (saturated fatty acids, SFA) (Gadd et al.) και χαμηλότερα πολυακόρεστων και κυρίως ω-3 λιπαρών οξέων (Allard et al., 2008). Στη μελέτη των *Cheng* και *συν*., (Cheng et al., 2016) που αναφέρθηκε παραπάνω, τα μεγαλύτερα ποσοστά κορεσμένων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που κατανάλωναν οι ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς, συσχετίστηκαν με μεγαλύτερα ποσοστά ενδοηπατικού λίπους, ανεξάρτητα της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας και του ΔΜΣ. Ως προς τον μηχανισμό δράσης, η υψηλή

κατανάλωση SFA φαίνεται να επηρεάζει την ομοιοστασία γλυκόζης, ενώ συσχετίζεται θετικά με την παρουσία ΜΣ (McCarthy and Rinella, 2012). Επιπλέον, στην επιδημιολογική μελέτη των *Oya* και *συν*. (Oya et al., 2010) που πραγματοποιήθηκε σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό της Ιαπωνίας με δείγμα 296 ανδρών και 496 γυναικών, η υψηλή πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων [εικοσαπενταενοϊκού οξέος (eicosapentaenoic acid, EPA) ή EPA και δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (docosahexaenoic acid, DHA) μαζί] συσχετίστηκε αρνητικά με την πιθανότητα παρουσίας NAFLD στους άνδρες της μελέτης. Σε μία παλαιότερη μελέτη των *Musso* και *συν*. (Musso et al., 2003), στην οποία αξιολογήθηκαν οι διαιτητικές συνήθειες 25 ασθενών με NASH και 25 υγιών εθελοντών μέσω επταήμερων ημερολογίων καταγραφής τροφίμων, βρέθηκε ότι οι ασθενείς κατανάλωναν σημαντικά χαμηλότερη ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και μεγαλύτερη ποσότητα κορεσμένων λιπαρών οξέων και διαιτητικής χοληστερόλης σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές, ενώ η συνολική πρόσληψη λιπιδίων δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων. Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φαίνεται να επιδρούν ευεργετικά στην NAFLD πιθανόν μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες και του επιπέδου φλεγμονής, παράγοντες που σχετίζονται με την εξέλιξη και τη βαρύτητα της νόσου (Papandreou and Andreou, 2015).

Περιορισμένος αριθμός μελετών έχει διερευνήσει τη συσχέτιση της πρόσληψης μικροθρεπτικών συστατικών με την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD. Τα περισσότερα επιδημιολογικά δεδομένα έχουν επικεντρωθεί στα συστατικά με αντιοξειδωτική δράση αναφέροντας χαμηλότερες προσλήψεις βιταμινών A, C και E σε άτομα με NAFLD (Musso et al., 2003, Musso et al., 2007, Wei et al., 2016b) συγκριτικά με εκείνες αντίστοιχων υγιών εθελοντών (Li et al., 2016). Επιπλέον, οι ασθενείς με NASH φαίνεται να παρουσιάζουν χαμηλότερη πρόσληψη βιταμίνης E, ακόμα και όταν συγκρίνονται με ασθενείς με απλή ηπατική στεάτωση (Canbakan et al., 2007). Ο ρόλος της βιταμίνης D στη NAFLD έχει επίσης αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D έχουν συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD διαγνωσμένης είτε μέσω βιοψίας (Targher et al., 2007) είτε μέσω υπερήχου (Jablonski et al., 2013) σε σύγκριση με υγιή άτομα σταθμισμένα ως προς την ηλικία και το φύλο. Μάλιστα σε μία πληθυσμιακή προοπτική μελέτη 2649 ατόμων, τα μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ηπατικής νόσου, ενώ τα άτομα με

αυξημένες συγκεντρώσεις ALT εμφάνισαν τάση μειωμένων επιπέδων καλσιτριόλης σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικές συγκεντρώσεις ALT (Skaaby et al., 2014).

Εκτός από τις μελέτες που συγκρίνουν τις διαιτητικές συνήθειες ασθενών και υγιών εθελοντών, υπάρχουν και δεδομένα μελετών σε ομάδες ασθενών με διαφορετική βαρύτητα της νόσου, που παρέχουν πληροφόρηση σχετικά με το ρόλο της κατανάλωσης μακροθρεπτικών συστατικών στην εξέλιξη και τη βαρύτητα της NAFLD. Πιο συγκεκριμένα, η σύγκριση των διαιτητικών συνηθειών 28 ατόμων με NASH και 18 με απλή στεάτωση πραγματοποιήθηκε σε μία Ιαπωνική μελέτη (Toshimitsu et al., 2007) και μετά από ανάλυση τριήμερων διατροφικών καταγραφών, προέκυψε ότι τα άτομα με NASH ανέφεραν υψηλότερη πρόσληψη υδατανθράκων, χαμηλότερη πρόσληψη πρωτεϊνών και χαμηλότερο λόγο πρόσληψης πολυακόρεστων/κορεσμένων λιπαρών οξέων σε σχέση με τους ασθενείς με απλή στεάτωση. Επιπλέον, στη μελέτη των *Solga* και *συν*. (Solga et al., 2004), αξιολογήθηκε η διαιτητική πρόσληψη μέσω ανακλήσεων εικοσιτετραώρου, 74 παχύσαρκων ατόμων που θα υποβάλλονταν σε βαριατρική χειρουργική και συσχετίστηκε με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του ήπατος μετά από βιοψία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων (>54% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης) συσχετίστηκε με μεγαλύτερο βαθμό φλεγμονής του ήπατος, ενώ η υψηλή πρόσληψη λιπιδίων με μικρότερο. Οι *Vilar* και *συν*. (Vilar et al., 2008), αξιολογώντας τις διαιτητικές συνήθειες 25 ασθενών με NAFLD μέσω τριών ανακλήσεων εικοσιτετράωρου σε διάστημα 12 μηνών, διαπίστωσαν σημαντικά υψηλότερη πρόσληψη λιπιδίων και μάλιστα όλων των τύπων λιπαρών οξέων και χαμηλότερη πρόσληψη υδατανθράκων και πρωτεϊνών στους ασθενείς με NASH, συγκριτικά με τους ασθενείς με απλή στεάτωση. Τέλος, στη συγχρονική μελέτη των *Ricci* και *συν*. (Ricci et al., 2011) σε 63 παχύσαρκους Ιταλούς, η αυξημένη πρόσληψη ενέργειας και ζωϊκής πρωτεΐνης συσχετίστηκε με μεγαλύτερο βαθμό ινσουλινοαντίστασης, ενώ η αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων και ολικού λίπους συσχετίστηκε με μεγαλύτερο βαθμό ηπατικής ίνωσης, όπως αυτή αξιολογήθηκε από σχετικό δείκτη (NAFLD Fibrosis Score).

Η πρόσληψη τροφίμων και ομάδων τροφίμων ως παράγοντας κινδύνου ή προστασίας για τη νόσο

Οι πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στην κατανάλωση τροφίμων και ομάδων τροφίμων και την πιθανότητα παρουσίας ή τη βαρύτητα της νόσου, έχουν διερευνηθεί στο πλαίσιο επιδημιολογικών μελετών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, οι ασθενείς με NAFLD καταναλώνουν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες σακχαρούχων αναψυκτικών, ροφημάτων και γλυκών (Assy et al., 2008, Abid et al., 2009), επεξεργασμένων δημητριακών προϊόντων (Georgoulis et al., 2014), κόκκινου κρέατος και κρεατοσκευασμάτων (Zelber-Sagi et al., 2007), συγκριτικά με υγιείς εθελοντές ταιριασμένους ως προς την ηλικία, το φύλο και τον ΔΜΣ.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί αναφορικά με την επίδραση των συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων στην NAFLD. Η κατανάλωση ταχέως απορροφούμενων υδατανθράκων, συνοδευόμενη από υψηλή θερμιδική πρόσληψη, αυξάνει τη συγκέντρωση ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων, κυρίως επηρεάζοντας την ομοιοστασία γλυκόζης και την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων προς το ήπαρ (Nseir et al., 2014), προωθώντας με αυτόν τον τρόπο την εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD. Το κόκκινο κρέας πιστεύεται ότι λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε αιμικό σίδηρο, ω-6 και κορεσμένα λιπαρά οξέα ενισχύει τη φλεγμονή, την ινσουλινοαντίσταση και το οξειδωτικό στρες, συμβάλλοντας στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικής βλάβης (Ley et al., 2014a, Pisano et al., 2016).

Επιπλέον, στο πλαίσιο επιδημιολογικών μελετών, οι ασθενείς με NAFLD, συγκριτικά με υγιείς εθελοντές, φαίνεται να καταναλώνουν λιγότερα ελάχιστα επεξεργασμένα δημητριακά (Georgoulis et al., 2014, Ross et al., 2013), λιπαρά ψάρια, λαχανικά και φρούτα, ξηρούς καρπούς και καφέ (Shi et al., 2012), τρόφιμα με κατεξοχήν αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Sears, 2015), που έχουν επανειλημμένως συσχετιστεί με μειωμένη ινσουλινοαντίσταση σε φαινομενικά υγιείς πληθυσμούς (Rideout et al., 2013, Torris et al., 2016), καθώς και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (Zelber-Sagi et al., 2007, Finelli and Tarantino, 2012).

Επίδραση διαιτητικών ινών και λιγότερων επεξεργασμένων δημητριακών

Η ευεργετική επίδραση της υψηλής κατανάλωσης λιγότερο επεξεργασμένων δημητριακών και διαιτητικών ινών στην υγεία είναι πλέον αναγνωρισμένη, με τα δεδομένα να εστιάζουν κυρίως στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης παχυσαρκίας, ΜΣ, ΣΔτ2 και καρδιαγγειακής νόσου (Jones and Anderson, 2008). Δεδομένης της στενής σχέσης της NAFLD με το ΜΣ και τον ΣΔτ2, η κατανάλωση δημητριακών προϊόντων ολικής άλεσης και η οδηγία για αύξηση της πρόσληψης διαιτητικών ινών περιλαμβάνεται συνήθως στις υγειονοδιαιτητικές συστάσεις αντιμετώπισης της νόσου, συνιστώντας περίπου το ήμισυ του συνόλου των μερίδων δημητριακών ανά ημέρα να είναι ελάχιστα επεξεργασμένα, και η πρόσληψη των διαιτητικών ινών να κυμαίνεται από 20-40γρ. /ημέρα (Ross et al., 2013). Ωστόσο, σε επίπεδο τροφίμων, υπάρχει μόνο μία σχετική μελέτη. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των *Georgoulis* και *συν*. (Georgoulis et al., 2014), σε δείγμα 73 ασθενών η κατανάλωση ελάχιστα επεξεργασμένων αμυλούχων τροφίμων συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα κοιλιακού λίπους και αντίστασης στην ινσουλίνη, καθώς και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NASH. Όταν 58 από τους ασθενείς συγκρίθηκαν με 58 υγιείς εθελοντές (ταιριασμένοι ως προς την ηλικία, το φύλο και τον ΔΜΣ), η κατανάλωση επεξεργασμένων αμυλούχων τροφίμων συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας της νόσου μετά από διόρθωση για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες.

Επίδραση αλκοόλ

Ενώ η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ αποτελεί την κύρια αιτία για αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, η χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να ωφελεί τους ασθενείς με NAFLD. Στη μελέτη των *Dunn* και *συν*. (Dunn et al., 2008) έγινε μια προσπάθεια αξιολόγησης της κατανάλωσης αλκοόλ και συσχέτισής της με την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD, όπως αυτή αξιολογήθηκε μέσω των τιμών της τρανσαμινάσης της αλανίνης ορού (ALT). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μόνο η μέτρια κατανάλωση κρασιού (115 ml/ ημέρα) συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD. Σε μία άλλη συγχρονική μελέτη στην Ιαπωνία, η

κατανάλωση αλκόολ συσχετίστηκε με μικρότερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, ενώ η λήψη <20 γρ. αλκοόλ 1-3 ημ/εβδ. συσχετίστηκε με χαμηλότερα ποσοστά NAFLD (Moriya et al., 2011).

Επίδραση καφέ, καφεΐνης και φαινολικών οξέων

Η καφεΐνη είναι το κύριο συστατικό του καφέ. Ο προστατευτικός ρόλος της καφεΐνης στην ηπατική νόσο έχει διερευνηθεί εδώ και αρκετά χρόνια, με τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές να προτείνουν ότι η κατανάλωση καφεΐνης συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο αύξησης των ηπατικών τρανσαμινασών (Ruhl and Everhart, 2005) και εμφάνισης κίρρωσης του ήπατος (Klatsky et al., 2006). Πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις συσχετίζουν την κατανάλωση καφεΐνης με μείωση της εξέλιξης της ηπατικής ίνωσης σε ασθενείς με ηπατίτιδα C (Modi et al., 2010) και με μειωμένο κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο (Gelatti et al., 2005). Τα φαινολικά οξέα που επίσης περιέχονται στον καφέ έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (Yesil and Yilmaz, 2013). Η κατανάλωση καφέ έχει συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου (Shang et al., 2016) και ΣΔτ2 (Jiang et al., 2014). Αντίστοιχα, σε ασθενείς με NAFLD έχει συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών, φλεγμονής, ίνωσης καθώς και με μειωμένη βαρύτητα της νόσου (Oliveira et al., 2016). Ωστόσο, λόγω της ετερογένειας των μελετών ως προς την ποσότητα του καφέ, το είδος, τη μέθοδο παρασκευής και τη συγκέντρωση καφεΐνης ή των φαινολικών οξέων, καθώς και του επιδημιολογικού χαρακτήρα των μελετών τα δεδομένα δεν είναι επαρκή ώστε να υποστηρίξουν το ενδεχόμενο χορήγησης καφεΐνης ή καφέ ως συμπληρωματική θεραπεία στη NAFLD (Oliveira et al., 2016).

Η προσκόλληση σε διάφορα διατροφικά πρότυπα ως παράγοντας κινδύνου ή προστασίας για τη νόσο

Εκτός από τη διερεύνηση σε επίπεδο θρεπτικών συστατικών και τροφίμων, ένας περιορισμένος αριθμός μελετών, έχει διερευνήσει την επίδραση της διατροφής στη NAFLD, ακολουθώντας μία πιο ολιστική προσέγγιση μέσω της μελέτης των διατροφικών προτύπων. Τα δεδομένα προέρχονται κυρίως από *a posteriori ή a priori* αναλύσεις. Φαίνεται ότι η

προσκόλληση σε διατροφικά πρότυπα πλούσια σε απλούς υδατάνθρακες και γλυκά, κόκκινο κρέας και κρεατοσκεύασματα, αυξάνει την πιθανότητα παρουσίας της νόσου, ενώ αντίθετα η υψηλή προσκόλληση σε διατροφικά πρότυπα πλούσια σε λαχανικά, όσπρια και προϊόντα δημητριακών ολικής άλεσης, μείωνει την αντίστοιχη πιθανότητα.

Σε μια συγχρονική μελετη σε Κινεζικό πληθυσμό (Jia et al., 2015), που συμπεριέλαβε 4206 ασθενείς με NAFLD, η υψηλή προσκόλληση σε ένα διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε σάκχαρα, γλυκά και αναψυκτικά, συσχετίστηκε με 2,19 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, μόνο στο γυναικείο πληθυσμό της μελέτης, σε σχέση με τα άτομα που βρίσκονταν μακριά από αυτό το πρότυπο. Ομοίως, τα αποτελέσματα μίας συγχρονικής μελέτης (Yang et al., 2015) σε 999 Κινέζους ασθενείς με NAFLD, ηλικίας 45-60 ετών, έδειξαν ότι η υιοθέτηση ενός κρεατοφαγικού προτύπου χαρακτηριζόμενου από υψηλή κατανάλωση χοιρινού ή βόειου κρέατος ή κρεατοσκευασμάτων αυτών, αύξησε την πιθανότητα παρουσίας NAFLD, συγκριτικά με τα άτομα που ήταν μακριά από αυτό το πρότυπο. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν τα αποτελέσματα μιας προοπτικής μελέτης (Oddy et al., 2013) σε εφήβους, όπου η υψηλότερη προσκόλληση σε μία Δυτικού τύπου δίαιτα στην ηλικία των 14 ετών, συσχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου για NAFLD στην ηλικία των 17 ετών κατά 1,5 φορά. Η σχέση αυτή ωστόσο δεν παρέμεινε στατιστικά σημαντική όταν λήφθηκε υπόψη ο ΔΜΣ στην ηλικία των 14 ετών.

Τα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα αναφορικά με την επίδραση συγκεκριμένων υγιεινών διατροφικών προτύπων στον κίνδυνο ή την πιθανότητα εμφάνισης NAFLD είναι επίσης περιορισμένα. Συγκεκριμένα, οι *Adriano* και *συν*. (Adriano et al., 2016), μέσω μίας συγχρονικής μελέτης 229 ηλικιωμένων, έδειξαν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ ενός υγιεινού διατροφικού προτύπου, πλούσιου σε λαχανικά / όσπρια, λευκό κρέας, ελαιόλαδο, μαργαρίνη και ολικής άλεσης δημητριακά προϊόντα και την πιθανότητα παρουσίας NAFLD στους ηλικιωμένους. Επιπλέον, στη συγχρονική μελέτη των *Yang* και *συν*. (Yang et al., 2015), που αναφέρθηκε και παραπάνω, η υψηλή προσκόλληση, σε σχέση με τη χαμηλή, σε ένα πρότυπο πλούσιο σε ελάχιστα επεξεργασμένα σιτηρά, λαχανικά, μανιτάρια, φύκια και φασόλια συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας της νόσου.

Επιπλεόν, ένα αρκετά διαδεδομένο διατροφικό πρότυπο, που είχε σχεδιαστεί αρχικά για την αντιμετώπιση της αρτηριακής πίεσης, αλλά έχει ελεγχθεί και στην πρόληψη και την αντιμετώπιση και άλλων χρόνιων μεταβολικών διαταραχών, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο ΣΔτ2 (Siervo et al., 2014, Liese et al., 2009) είναι η δίαιτα DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*). Σε μία πρόσφατη μελέτη 102 ασθενών και 204 μαρτύρων, η δίαιτα DASH συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD σε ενήλικες μέσης ηλικίας, όμως η σχέση αυτή χάθηκε όταν λήφθηκε υπόψη ο ΔΜΣ και το επίπεδο δυσλιπιδαιμίας των ασθενών (Hekmatdoost et al., 2016).

Δεδομένης, της στενής σχέσης της NAFLD με τον ΣΔτ2 και το ΜΣ, η επίδραση της μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (Βλ. σελίδα 61) στην εμφάνιση, εξέλιξη και την αντιμετώπιση της NAFLD, έχει αποτελέσει πεδίο νέου επιστημονικού και ερευνητικού ενδιαφέροντος, με δεδομένα που προέρχονται κυρίως από *a priori* αναλύσεις. Συγκεκριμένα, σε μία επιδημιολογική μελέτη 73 ασθενών και 58 υγιών εθελοντών (Kontogianni et al., 2014), υψηλότερη προσκόλληση στη ΜΔ, όπως εκτιμήθηκε από τον δείκτη MedDietScore συσχετίστηκε με 36% μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης NASH. Η βαρύτητα της νόσου εκτιμήθηκε μέσω ελαστογραφίας σε 58 ασθενείς και μέσω ηπατικής βιοψίας σε 34 ασθενείς. Παράλληλα, ο δείκτης MedDietScore συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα της ALT, της ινσουλίνης, καθώς και του δείκτη αντίστασης στην ινσουλίνη HOMA-IR. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη αύξηση κατά μία μονάδα στον δείκτη MedDietScore, συσχετίστηκε με 13% μειωμένη πιθανότητα παρουσίας μεταβολικού συνδρόμου στους ασθενείς του δείγματος (Georgoulis et al., 2015).

Περισσότερα δεδομένα σχετικά με τη θέση της δίαιτας ως μέσο διαχείρισης της NAFLD παρατίθενται στο Κεφάλαιο 2.

1.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ο υποκείμενος μηχανισμός για την ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD είναι πολύπλοκος και πολυπαραγοντικός. Μεταξύ των επικρατέστερων θεωριών ήταν και η θεωρία «**2 χτυπημάτων**». Βάσει της συγκεκριμένης θεωρίας, (Day, 2002, Day and James, 1998), το πρώτο

χτύπημα αντανακλά στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων με τη μορφή λιποσταγόνων στα ηπατοκύτταρα και τη δημιουργία ηπατικής στεάτωσης, με κύριο παθογενετικό μηχανισμό την ινσουλινοαντίσταση. Το λιπώδες πλέον ήπαρ γίνεται πιο ευάλωτο στο «δεύτερο χτύπημα», το οξειδωτικό στρες, μέσω του οποίου ενεργοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί ηπατοκυτταρικής βλάβης, ίνωσης και φλεγμονής. Γρήγορα όμως κατέστη φανερό, ότι αυτή η άποψη ήταν πολύ απλοϊκή για να περιγράψει την πολυπλοκότητα της ασθένειας. Η θεωρία των **''πολλαπλών χτυπημάτων''** (*multiple-hit hypothesis*) αποτελεί πλέον την πιο αποδεκτή υπόθεση σχετικά με την κατανόηση της παθογένειας της NAFLD. Σύμφωνα με αυτή, πολλαπλά ''χτυπήματα'' (hits) προερχόμενα από το έντερο και τον λιπώδη ιστό, είναι υπεύθυνα για την δημιουργία φλεγμονής και την περαιτέρω βλάβη του ήπατος (Tilg and Moschen, 2010) (***Σχήμα 1.2***).

Θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων

Αντίσταση στην ινσουλίνη και λιποτοξικότητα

Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η επακόλουθη υπερινσουλιναιμία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD. Μάλιστα, η σοβαρότητα της ινσουλινοαντίστασης έχει συσχετιστεί με τη βαρύτητα της νόσου (Marchesini et al., 2003). Στους ασθενείς με NAFLD, το λίπος συσσωρεύεται στο ήπαρ υπό τη μορφή τριακυλογλυκερολών. Σε συνθήκες ινσουλινοαντίστασης, προκαλείται αύξηση της δεξαμενής των μη-εστεροποιημένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids, FFAs) ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιπόλυσης από τον λιπώδη ιστό (Clark et al., 2002, Tilg and Moschen, 2008). Επιπλέον, η αυξημένη εκτροπή γλυκόζης στο ήπαρ επάγει την de novo λιπογένεση μέσω της αύξησης των μεταγραφικών παραγόντων. Παράλληλα, με τα λιπαρά οξέα της δίαιτας, παρατηρείται μεγάλη διαθεσιμότητα FFAs στο ήπαρ. Αυτά τα FFAs μπορούν είτε να οξειδωθούν μέσω της β-οξείδωσης για την παραγωγή ενέργειας, είτε να επαναεστεροποιηθούν σε TAG και να αποθηκευτούν ή να εξέλθουν του ήπατος ως VLDL (Neuschwander-Tetri, 2010). Στους ασθενείς με NAFLD, η μειωμένη εξαγωγή TAG μέσω των VLDL από το ήπαρ, λόγω μεταβολών στην σύνθεση-έκκριση VLDL εκ του συστήματος MTP-apoB, καθώς και η αναστολή

της β-οξείδωδης λόγω ινσουλινοαντίστασης, έχει φανεί ότι οδηγεί στη συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα (Musso et al., 2010).

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και στρες ενδοπλασματικού δικτύου

Η αυξημένη ηπατική συσσώρευση των FFAs, προκαλεί αλλοιώσεις στη δομή και την λειτουργία των μιτοχονδρίων του ήπατος, διαταράσσοντας την οξειδωτική τους ικανότητα (Buzzetti et al., 2016). Στις διαταραχές των μιτοχονδρίων περιλαμβάνονται η εξάντληση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), η μειωμένη δραστικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας και η διαταραχή της μιτοχονδριακής β-οξείδωσης (Sanyal et al., 2001). Η κατάρρευση του μηχανισμού της ομοιαστασίας του λίπους στο ήπαρ, προάγει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και άλλων τοξικών μεταβολιτών (Rolo et al., 2012), καθώς και την ενεργοποίηση του συστήματος UPR (Unfolded Protein Response, UPR) του ενδοπλασματικού δικτύου, ως απάντηση του στρες που προκαλείται. Η ενεργοποίηση του συστήματος UPR ουσιαστικά αποσκοπεί στη μείωση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης και αύξησης της αποδόμησης των πρωτεϊνών, γεγονός που ευνοεί την απόπτωση (Buzzetti et al., 2016). Συνέπεια όλων των παραπάνω αλλαγών, είναι τελικά η ενεργοποίηση των μηχανισμών απόπτωσης και νέκρωσης των ηπατοκυττάρων που οδηγούν στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικού τραύματος (Abdelmegeed et al., 2012).

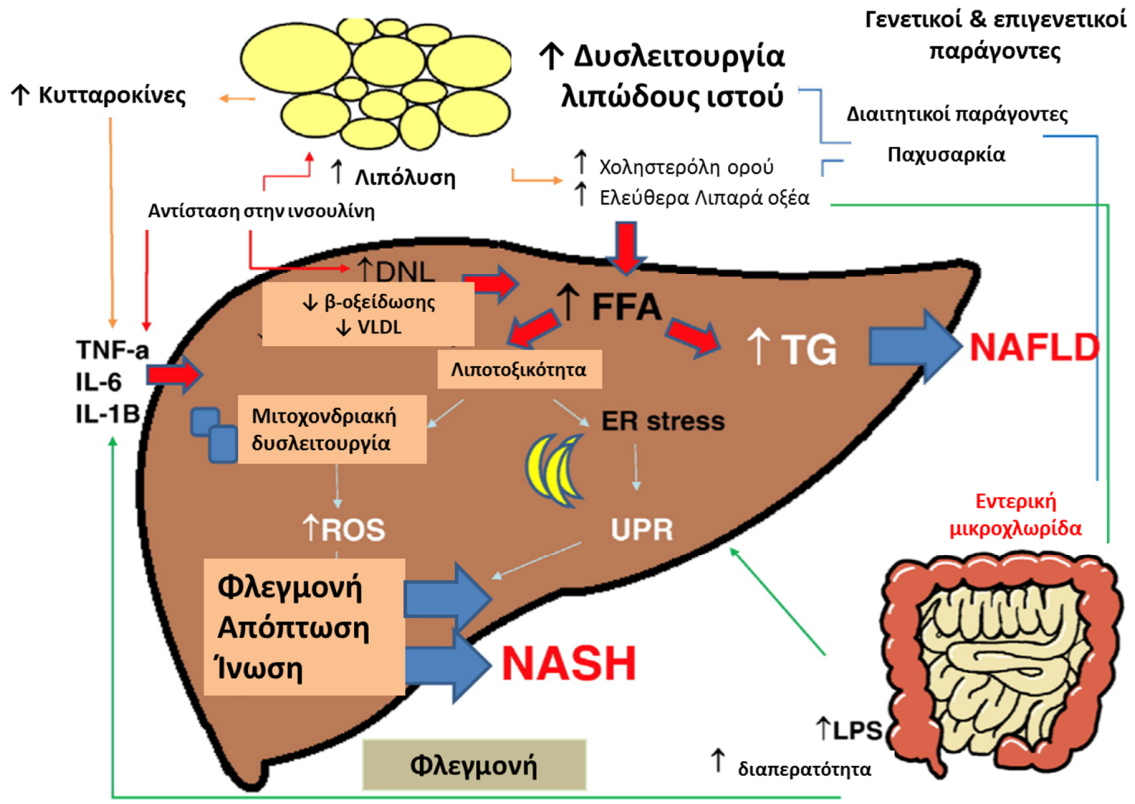
Φλεγμονή

Η συσσώρευση FFAs και η επακόλουθη λιποτοξικότητα, η ινσουλινοαντίσταση και η δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού επάγουν την ελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer, οδηγεί σε επιπλέον αύξηση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και IL-1β (Bilzer et al., 2006) προάγοντας με αυτόν τον τρόπο τη φλεγμονή και την ίνωση. Η απορρύθμιση της ισορροπίας αδιποκινών/κυτταροκινών έχει βαθέως συσχετιστεί με την παθογένεια της NAFLD και του ΜΣ (Watanabe et al., 2008), ενώ ο ρόλος των TNF-α και αδιπονεκτίνης έχει μελετηθεί περισσότερο από όλες τις κυτταροκίνες. Η αδιπονεκτίνη επάγει το μεταβολισμό της γλυκόζης και του ηπατικού λίπους μέσω των υποδοχέων της *AdipoR1* and

AdipoR2. Στους ασθενείς με NAFLD, παρατηρούνται ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης, αφενώς λόγω της υποβόσκουσας ινσουλινοαντίστασης και αφετέρου λόγω της εναπόθεσης ενδοηπατικού λίπους (Giby and Ajith, 2014). Η αδιπονεκτίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη NAFLD, λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης που ασκεί, αναστέλλοντας την έκφραση του TNF-α στο ήπαρ και μειώνοντας τα επίπεδά του στο πλάσμα (Berlanga et al., 2014). Σε παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD έχει φανεί αυξημένη έκφραση του TNF-α και του υποδοχέα TNFR2, και μάλιστα υψηλότερη σε ασθενείς με NASH από ότι σε ασθενείς με απλή στεάτωση (Crespo et al., 2001). Υψηλές συγκεντρώσεις TNF-α και χαμηλές αδιπονεκτίνης έχουν συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης NAFLD, ανεξάρτητα της παρουσίας ινσουλινοαντίστασης (Polyzos et al., 2011). Όλα τα παραπάνω, έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των "*inflammasomes*", δηλαδή συμπλεγμάτων πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος που έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη της NAFLD σε NASH (Buzzetti et al., 2016).

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας

Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD βρίσκεται στο μικροσκόπιο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Καθώς πάνω από 50% της αιματικής παροχής του ήπατος, προέρχεται από το έντερο μέσω της πυλαίας φλέβας, το ήπαρ αποτελεί ένα από τα πιο εκτεθειμένα όργανα σε τοξικούς παράγοντες του εντέρου, αντιπροσωπεύοντας την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε βακτηριακά υποπροϊόντα (Compare et al., 2012). Οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν αυξημένη εντερική διαπερατότητα και βακτηριακή υπερανάπτυξη συγκριτικά με τα υγιή άτομα (Miele et al., 2009), ενώ η βακτηριακή ενδοτοξίνη [γνωστή ως λιποπολυσακχαρίτης (LPS)] είναι ένα από τα κύρια τοξικά βακτηριακά παράγωγα που επάγει έναν καταρράκτη φλεγμονωδών παραγόντων με συνέπεια την ενίσχυση της ινσουλινοαντίστασης, της συσσώρευσης λίπους και την εξέλιξη της νόσου (Ceccarelli et al., 2015). Άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την εντερική μικροχλωρίδα και συμβάλλουν στην ανάπτυξη NASH είναι η αυξημένη παραγωγή ενδογενούς αιθανόλης, η μετατροπή της διαιτητικής χολίνης σε μεθυλαμίνη και η ρύθμιση του μεταβολισμού των χολικών οξέων (Machado and Cortez-Pinto, 2012).



Σχήμα 1.2: Θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων: Συνοπτικά, συμπεριφορικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, παράλληλα με την παρουσία παχυσαρκίας, οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs), χοληστερόλης (CHOL) και στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης, προκαλώντας δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού και αλλαγές στην εντερική μικροχλωρίδα. Η αντίσταση στην ινσουλίνη δρα περαιτέρω προκαλώντας λιπόλυση και απελευθέρωση αδιποκινών και προ-φλεγμονωδών κυτοταρκινών, όπως του TNF-α και της IL-6, οι οποίες συμβάλλουν επίσης στην διατήρηση της ινσουλινοαντίστασης. Στο ήπαρ, η αντίσταση στην ινσουλίνη ενισχύει τη de novo λιπογένεση (DNL), μειώνοντας παράλληλα την εξαγωγή τριακυλογλυκερολών (TG) μέσω των VLDL από το ήπαρ. Η αυξημένη ηπατική ροή FFAs η οποία προκύπτει από τις παραπάνω διαδικασίες και την αλλαγή στην εντερική μικροχλωρίδα, οδηγεί σε δύο διαφορετικές καταστάσεις: τη σύνθεση και τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων (TG) και FFAs σε «τοξικά» επίπεδα, ελεύθερης χοληστερόλης και άλλων μεταβολιτών, τα οποία προκαλούν μιτοχονδριακή διαταραχή και αύξηση του οξειδωτικού στρες μέσω των παραγόμενων ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), οδηγώντας στην εμφάνιση ηπατικής φλεγμονής. Επιπλέον, η αυξημένη διαπερατότητα του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου σε μικρά μόρια, όπως είναι οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, έχει ως επακόλουθο περαιτέρω ενίσχυση της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες (Buzzetti et al., 2016).

1.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ NAFLD

Κλινικά σημεία και συμπτώματα

Η πλειονότητα των ασθενών με NAFLD ή NASH είναι ασυμπτωματικοί, τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της νόσου. Όταν υπάρχουν συμπτώματα περιορίζονται στην εμφάνιση γενικής κόπωσης και δυσφορίας στο άνω δεξιό τεταρτημόριο, υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας, ηπατομεγαλία, ναυτία, ωστόσο παραμένουν αναξιόπιστα για τη διάγνωση της νόσου (Torres et al., 2012). Παρά την ήπια συμπτωματολογία, η κλινική εικόνα των ασθενών με NAFLD έχει συνδεθεί με μειωμένη ποιότητα ζωής, η οποία φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο παρουσία κίρρωσης (Sayiner et al.). Ένα μικρότερο ποσοστό ασθενών, σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου μπορεί να εμφανίζει ασκίτη ή σπληνομεγαλία, μώλωπες, ίκτερο ή ακόμα και ηπατική εγκεφαλοπάθεια (Paschos and Paletas, 2009).

Διάγνωση

Υποψία της νόσου τίθεται όταν σε τυχαίο βιοχημικό έλεγχο εντοπιστούν αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων (Preiss and Sattar, 2008, Farrell et al., 2013a). Η νόσος στη συνέχεια πιστοποιείται με διενέργεια υπερηχογραφήματος, ενώ για τη διαφορική διάγνωση της νόσου απαιτείται ο αποκλεισμός άλλων αιτιών και η διερεύνηση της κατανάλωσης αλκοόλ (Glen et al., 2016).

Εργαστηριακός – βιοχημικός έλεγχος

Τα αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών του ορού [(τρανσαμινάση της αλανίνης (ALT>55 IU/L) & ασπαρτική τρανσαμινάση (AST>34 IU/L)] αποτελούν την κύρια και συχνά τη μόνη κλινική διαταραχή των ασθενών με NAFLD/NASH. Συνήθως, τα επίπεδα της ALT είναι υψηλότερα της AST, ενώ οι αυξήσεις των επιπέδων τους, δε ξεπερνούν το τριπλάσιο του ανώτερου φυσιολογικού ορίου (Dowman et al., 2011). Παρόλα αυτά, έχει φανεί ότι έως και 78% των ασθενών με NAFLD μπορεί να παρουσιάζουν φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανφερασών (Obika and Noguchi, 2012). Επιπρόσθετα, δε φαίνεται να υπάρχει

συσχέτιση μεταξύ του βαθμού αύξησης των αμινοτρανσφερασών στον ορό και της ιστολογικής βαρύτητας της φλεγμονής ή της ίνωσης που εμφανίζεται σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Στους ασθενείς με NAFLD/NASH ο λόγος AST:ALT είναι συνήθως μικρότερος της μονάδας (Sass et al., 2005). Τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών τείνουν να πέφτουν με την πάροδο του χρόνου, καθώς η ηπατική στεάτωση και η φλεγμονή βελτιώνονται, ενώ η ίνωση μπορεί να εξελίσσεται. Υπό την ανάπτυξη κίρρωσης, ο λόγος ALT:AST συνήθως αντιστρέφεται (Adams and Feldstein, 2011). Επίσης, τα επίπεδα της γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT) είναι συνήθως αυξημένα σε ασθενείς με NAFLD, και έχουν συσχετισθεί με αυξημένη θνησιμότητα (Haring et al., 2009, Ruhl and Everhart, 2009) και προχωρημένη ίνωση (Tahan et al., 2008). Τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) είναι ελαφρώς αυξημένα στο 1/3 των ασθενών, αλλά σπάνια αποτελούν το μοναδικό εύρημα ηπατικής δυσλειτουργίας (Sass et al., 2005).

Απεικονιστικές μέθοδοι διάγνωσης και βιοψία ήπατος

Το υπερηχογράφημα (ultrasound, US) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αξιολόγηση ασυμπτωματικών ασθενών με αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών και υποψία NAFLD. Η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία χωρίς όμως να επιτρέπεται η ποσοτικοποίηση του βαθμού ηπατικής στεάτωσης, γεγονός που αποτελεί και τον μεγαλύτερο περιορισμό της. Επιπλέον, η παχυσαρκία μειώνει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου (Obika and Noguchi, 2012). Η αξονική τομογραφία (computed tomography, CT) είναι μέθοδος που, επίσης, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ηπατικής στεάτωσης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ποσοτικοποιήσει τη βαρύτητα της ηπατικής στεάτωσης, αλλά με χαμηλή ευαισθησία, ενώ δεν μπορεί να διακρίνει την παρουσία ίνωσης. Η μαγνητική τομογραφία (magnetic resonance imaging, MRI) και η μαγνητική φασματοσκοπία (magnetic resonance spectroscopy, MRS) είναι άλλες μη παρεμβατικές μέθοδοι διάγνωσης της νόσου, που διαθέτουν μεγάλη αξιοπιστία ως προς την ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης ηπατικού λίπους, ωστόσο το υψηλό τους κόστος αποτελεί βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών (Paschos and Paletas, 2009). Η ελαστογραφία (transient elastography, TE) μετρά τον βαθμό της ηπατικής ακαμψίας (*liver stiffness*) ως συνάρτηση του βαθμού της ηπατικής διήθησης (Koplay et al., 2015). Η εγκυρότητά

της αυξάνει όσο αυξάνει η ίνωση του ήπατος (στάδιο 3-4) (Paschos and Paletas, 2009). Αν και παρουσιάζει την καλύτερη διαγνωστική ικανότητα ως προς την ανίχνευση της προχωρημένης ίνωσης σε σύγκριση με άλλες μη επεμβατικές μεθόδους (Wong et al., 2010), κύριο μειονέκτημά της είναι το υψηλό σφάλμα που παρουσιάζεται όσο αυξάνεται ο ΔΜΣ του εξεταζόμενου (25% σφάλμα σε ΔΜΣ>30 kg/m^2 και 41% σε ΔΜΣ >35 kg/m^2) (Ratziu et al., 2010). Ωστόσο, η χρήση άλλων εμπορικά διαθέσιμων ελαστογραφικών μεθόδων έχει βοηθήσει στην αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού. Συγκεκριμένα, η ελαστογραφία ήπατος εγκάρσιων κυμάτων παρέχει βελτιωμένη διαγνωστική ακρίβεια σε σύγκριση με τις άλλες ελαστογραφικές μεθόδους, περιορίζοντας διάφορους φυσικούς περιορισμούς της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας παχυσαρκίας (Papagianni et al., 2015).

Μέχρι σήμερα, καμία από τις χρησιμοποιούμενες μη επεμβατικές μεθόδους δε μπορούν να διακρίνουν την απλή στεάτωση από την στεατοηπατίτιδα και ως εκ τούτου η βιοψία ήπατος παραμένει η μέθοδος αναφοράς. Μέσω της βιοψίας ήπατος επιτρέπεται η αξιολόγηση του βαθμού φλεγμονής, καθώς και του σταδίου της ίνωσης, ενώ χρησιμεύει επιπλέον και στη διαφορική διάγνωση μεταξύ των νοσημάτων που συχνά συγχέονται με τη NAFLD/NASH. Εντούτοις, λόγω του υψηλού κόστους και της παρεμβατικότητας της μεθόδου, χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική μόνο εφόσον κρίνεται απολύτως απαραίτητη (Attar and Van Thiel, 2013).

Μη επεμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης της ίνωσης

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μη επεμβατικές μεθόδοι αξιολόγησης της ίνωσης των ασθενών με NAFLD. Σύμφωνα με τις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και Φροντίδας της Μεγάλης Βρετανίας (National Institute for Health and Care Excellence, NICE) για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση των ασθενών με NAFLD ή τον εντοπισμό των ασθενών με NASH, δεν υπάρχουν ισχυρά επιστημονικά δεδομένα που να υποστηρίζουν κάποιον συγκεκριμένο μη επεμβατικό δείκτη (Glen et al., 2016). Ωστόσο, βάσει του ίδιου οργανισμού, ο δείκτης *Enhanced liver fibrosis* (ELF) θεωρείται ο πλέον αποτελεσματικότερος και οικονομικότερος δείκτης για την πρόβλεψη της προχωρημένης ηπατικής ίνωσης. Υπολογίζεται

από τον προσδιορισμό 3 μεταβλητών στον ορό του αίματος (υαλουρονικό οξύ, προκολλαγόνο III, αναστολέας της μεταλοπρωτεϊνάσης 1), ενώ η διάγνωση προχωρημένης ηπατικής ίνωσης τίθεται όταν ο δείκτης λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες ή ίσες του 10,51. Ανάμεσα στους πιο γνωστούς μη επεμβατικούς δείκτες πρόβλεψης της ηπατικής ίνωσης είναι και ο δείκτης *NAFLD Fibrosis Score* (NFS) (Musso et al., 2011). Ο NFS μπορεί να υπολογιστεί εύκολα με τη χρήση 6 μεταβλητών (ηλικία, ΔΜΣ, λόγος AST:ALT, αιμοπετάλια και αλβουμίνη) (Angulo et al., 2007) και αποτελεί χρήσιμο κλινικό εργαλείο για τον εντοπισμό των ασθενών που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο προχωρημένης ίνωσης ή/και κίρρωσης. Μάλιστα, στις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής εταιρείας μελέτης ήπατος (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) που δημοσιεύτηκαν το 2012 προτείνεται η χρήση του στην απόφαση διενέργειας ή όχι ηπατικής βιοψίας (Chalasani et al., 2012). Ο δείκτης αυτός παρουσιάζει υψηλή αρνητική προγνωστική αξία για τον αποκλεισμό προχωρημένης ίνωσης με σκόρ NFS < -1,455, ενώ σκορ NFS >0,676 προβλέπει προχωρημένη ίνωση. Παρά την ευρεία χρήση του, περίπου 25-30% των ασθενών εμφανίζουν τιμές, μεταξύ των δύο προαναφερόμενων τιμών, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αποκλειστεί ή να διαγνωστεί με ακρίβεια η προχωρημένη ίνωση και η ηπατική βιοψία να παραμένει αναπόφευκτη (Musso et al., 2011).

Άλλοι δείκτες που έχουν επίσης αξιολογηθεί για την μη επεμβατική εκτίμηση της ίνωσης σε ασθενείς με NAFLD, είναι ο δείκτης *FIB-4* (Sterling et al., 2006), το *Fibrotest* (Poynard et al., 2010), ο δείκτης *BARD* (Harrison et al., 2008), ο δείκτης An*twerp NAFLD significant fibrosis score* (Francque et al., 2012), χωρίς ωστόσο η εγκυρότητα των περισσότερων από αυτών να έχει ελεγχθεί μέσω προοπτικών μελετών (Chalasani et al., 2012). Επιπλέον, ένας πρόσφατος βιοδείκτης με ικανοποιητικά αποτελέσματα για τη διάγνωση της NASH είναι τα θραύσματα της κυτταροκερατίνης 18 (cytokeratin-18, CK-18). Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Chen et al., 2014, Shen et al., 2012), η CK-18 χρησιμοποιείται επί του παρόντος κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο, ενώ η χρήση της σε επίπεδο κλινικής πρακτικής δεν ενδείκνυται (Chalasani et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΑ

Αναφορικά με την αντιμετώπιση της νόσου, μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει επίσημος θεραπευτικός αλγόριθμος. Οι υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στη διαχείριση των σχετιζόμενων με τη νόσο παραγόντων κινδύνου, μέσω τροποποίησης του τρόπου ζωής, ενώ η φαρμακοθεραπεία περιορίζεται μόνο στους ασθενείς με προχωρημένη ίνωση (Glen et al., 2016).

2.1. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD ΜΕΣΩ ΥΓΙΕΙΝΟΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΩΝ

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1, τα δεδομένα για τον επιβαρυντικό ή τον προστατευτικό ρόλο των διαφόρων διατροφικών παραγόντων στην πιθανότητα παρουσίας ή τον κίνδυνο εμφάνισης της NAFLD, προέρχονται κυρίως από συγχρονικές μελέτες ή μελέτες ασθενών υγιών και λιγότερο από προοπτικές μελέτες. Το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο, οι ανθυγιεινές διατροφικές επιλογές, όπως η υψηλή πρόσληψη απλών υδατανθράκων και λίπους, κυρίως κορεσμένου, μέσω της υψηλής κατανάλωσης επεξεργαμένων δημητριακών και γλυκών, κόκκινου κρέατος και κρεατοσκευασμάτων, και η μειωμένη κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, προϊόντων ολικής άλεσης, ψαρικών, ξηρών καρπών και καφέ, απουσία παράλληλα ενός δραστήριου τρόπου ζωής είναι χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο. Ως εκ τούτου, οι παρεμβάσεις που στοχεύουν στην τροποποίηση των παραπάνω διατροφικών παραγόντων και γενικότερα του τρόπου ζωής των ασθενών με NAFLD, αποτελούν το αντικείμενο συζήτησης στο παρόν κεφάλαιο.

Απώλεια βάρους ως σημαντική παράμετρος αντιμετώπισης της NAFLD

Παρόλο που δεν είναι όλοι οι ασθενείς με NAFLD παχύσαρκοι, η παχυσαρκία θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου. Η απώλεια βάρους μέσω μείωσης της θερμιδικής πρόσληψης θεωρείται το πρώτο βήμα αντιμετώπισης της NAFLD. Ποσοστό μείωσης περίπου 5% στον ΔΜΣ έχει συνδεθεί με 25% πτώση του ενδοηπατικού λίπους

μετρημένο με MRI (Patel et al., 2015). Η απώλεια βάρους έχει συνδεθεί με αύξηση της ινσουλινοευαισθησίας, μείωση της φλεγμονής, καθώς και με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου και των συνιστωσών αυτού (Kim and Younossi, 2008, Yamaoka and Tango, 2012). Το ακριβές ποσοστό απώλειας βάρους που απαιτείται για την βελτίωση της NAFLD δεν έχει ωστόσο πλήρως καθοριστεί. Από την άλλη, η υπερβολική απώλεια βάρους (>2 Kg / εβδομάδα) λόγω ασιτίας μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση της ιστολογίας του ήπατος, συμπεριλαμβανομένης και της ίνωσης. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η ταχεία κινητοποίηση του λίπους αυξάνει τη διαθεσιμότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων οδηγώντας σε επιτάχυνση της διαδικασίας της φλεγμονής, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τους ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο ή κίρρωση (Rafiq and Younossi, 2008). Σύμφωνα με την Αμερικανική εταιρεία μελέτης ήπατος (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) απώλεια σωματικού βάρους, της τάξης του 3 - 5% μπορεί να βελτιώσει την ηπατική στεάτωση, με παράλληλη βελτίωση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων (ALT, AST, γGT) και της ινσουλινοαντίστασης (HOMA-IR) (McCarthy and Rinella, 2012, Elias et al., 2010, Yamamoto et al., 2007, de Luis et al., 2008, Musso et al., 2012). Ωστόσο, για τη βελτίωση των ιστολογικών χαρακτηριστικών της νόσου ή την πλήρη ύφεση απαιτείται μεγαλύτερη απώλεια (έως και πάνω από 10%) (Vilar-Gomez et al., 2015, Wong et al., 2013), ποσοστό όμως που φαίνεται ότι μόλις το 50% των ασθενών μπορεί να επιτύχει (Hossain et al., 2016).

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην απώλεια βάρους μόνο με δίαιτα

Οι περισσότερες μελέτες που ελέγχουν την επίδραση μίας υποθερμιδικής δίαιτας σε ασθενείς με NAFLD είναι μικρού μεγέθους, μη τυχαιοποιημένες, χωρίς ομάδα ελέγχου, ενώ στερούνται ιστολογικής ανάλυσης (Hossain et al., 2016, Lin et al., 2009, Yamamoto et al., 2007, de Luis et al., 2010) ενώ δύο μελέτες (Yamamoto et al., 2007, Lin et al., 2009) που παρουσιάζουν κάποια τυχαιοποίηση παρουσιάζονται παρακάτω. Στις παρεμβάσεις απώλειας βάρους μέσω δίαιτας σε ασθενείς με NAFLD, το μέσο ενεργειακό έλλειμμα που εφαρμόζεται αντιστοιχεί σε 500 – 750 Kcal / ημέρα (Hannah and Harrison, 2016). Εντούτοις, το ιδανικό ενεργειακό έλλειμμα που απαιτείται για να επιτευχθεί επαρκής απώλεια βάρους

αποτελεσματική για την βελτίωση των χαρακτηριστικών των ασθενών με NAFLD δεν έχει διασαφηνιστεί (Hossain et al., 2016).

Οι *Lin* και *συν.* (Lin et al., 2009) τυχαιοποίησαν 132 Ταϊβανέζους παχύσαρκους ασθενείς με ΔΜΣ≥30kg/m^2 σε μία πολύ χαμηλής σε θερμίδες δίαιτα είτε 800 Kcal είτε 450 Kcal για 12 εβδομάδες. Στην αρχή της μελέτης, το 89,3% των ασθενών έπασχε από NAFLD, όπως διεγνώσθη μέσω υπερήχου. Στο τέλος της μελέτης, παρατηρήθηκαν ανάλογα ποσοστά απώλειας βάρους μεταξύ των δύο ομάδων (~9%), ενώ δεν υπήρχαν διαφορές και ως προς την βελτίωση της άλιπης μάζας σώματος (μέση βελτίωση ~20% και στις δύο ομάδες). Επιπλέον, περίπου το 50% των ατόμων σε κάθε ομάδα παρέμβασης παρουσίασε υπερηχογραφική βελτίωση της NAFLD, ενώ ένα ποσοστό περίπου 16% παρουσίασε πλήρη επίλυση της NAFLD . Στη μελέτη των *Yamamoto* και *συν*. (Yamamoto et al., 2007) 12 ασθενείς (9 με NASH και 3 με απλή στεάτωση) έλαβαν υποθερμιδική δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος και σίδηρο για 6 μήνες, ενώ σε 6 ασθενείς (2 με NASH και 4 με απλή στάτωση) δεν χορηγήθηκε κάποια ειδική θεραπεία. Η δίαιτα απέδιδε 30 Kcal/ kg σωματικού βάρους (ΣΒ) / ημέρα, με 20% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης σε λιπίδια, 1,1-1,2 γρ. πρωτεΐνης/ kg ΣΒ/ ημέρα και πρόσληψη διατροφικού σιδήρου σε ≤6mg/ ημέρα. Η προσκόλληση στη δίαιτα αξιολογήθηκε με 3ήμερα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων. Στο τέλος του εξαμήνου, η ομάδα που έλαβε τη δίαιτα παρουσίασε απώλεια βάρους της τάξης των 4,8%, με παράλληλα μείωση των επιπέδων των αμινοτρανσφερασών ALT και AST και φερριτίνης, χωρίς ωστόσο αλλαγές στα επίπεδα τριγλυκεριδίων, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και χωρίς να ελεγχθεί η επίδραση της απώλειας βάρους ως συγχυτικός παράγοντας.

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην απώλεια βάρους παράλληλα με τροποποίηση της σύστασης της δίαιτας

Η επίδραση της σύστασης της δίαιτας στους ασθενείς με NAFLD ή NASH αποτελεί πεδίο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος, καθότι οι ασθενείς αυτοί καλούνται να ακολουθήσουν αλλαγές στη δίαιτα τους επί μακρόν. Λίγες καλά σχεδιασμένες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν αξιολογήσει την επίδραση του είδους της δίαιτας σε ασθενείς με NAFLD, παράλληλα με

απώλεια βάρους (de Luis et al., 2010, Tendler et al., 2007, Arefhosseini SR, 2011, Browning et al., 2011, Musso et al., 2012). Συγκρινόμενες, μία υποθερμιδική δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (μέση ενέργεια από υδατάνθρακες ~ 40%) και υψηλής σε λιπίδια (μέση ενέργεια από λιπίδια ~ 40%) με μία υποθερμιδική δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (~ 60%) και χαμηλής σε λιπίδια (~ 25%) σε ασθενείς με NAFLD, έδειξαν ότι και οι δύο τύποι υποθερμιδικών διαιτών, ανεξαρτήτως της σύστασης σε μακροθρεπτικά συστατικά, μπορούν να βελτιώσουν την ηπατική λειτουργία (Arefhosseini SR, 2011, de Luis et al., 2010). Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των *Musso* και *συν.* (Musso et al., 2012), η σύγκριση μίας δίαιτας χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες με μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια, με ταυτόχρονη θερμιδική μείωση, είχε ως αποτέλεσμα παρόμοια επίπεδα λίπους στο ήπαρ και ανάλογη μείωση στα επίπεδα της ALT. Ωστόσο, το δείγμα της μετα-ανάλυσης αυτής βασίστηκε σε μελέτες χωρίς καλά χαρακτηρισμένο πληθυσμό NAFLD δημοσιευμένες έως το 2012.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πλούσιες σε υδατάνθρακες (CHO) δίαιτες οδηγούν σε αύξηση της κυκλοφορούσας ινσουλίνης, γεγονός που συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων τριακυλογλυκερολών και στη μείωση των επιπέδων HDL-C (McLaughlin et al., 2000). Υπό το πρίσμα των συνεπειών αυτών, δύο μικρού δείγματος μελέτες, (Tendler et al., 2007, Browning et al., 2011) έχουν διερευνήσει την επίδραση κετογονικού τύπου δίαιτας (υδατάνθρακες <20 γρ./ημέρα) σε ασθενείς με NAFLD. Στη μία μη ελεγχόμενη πιλοτική μελέτη (Tendler et al., 2007) 5 ασθενών με NAFLD διαγνωσμένης μέσω βιοψίας, η συμμόρφωση σε μία δίαιτα με < 20 γρ. υδατανθράκων / ημέρα για 6 μήνες, οδήγησε σε σημαντικές ιστολογικές βελτιώσεις της νόσου, μείωση της φλεγμονής και της ίνωσης. Στη δεύτερη μελέτη (Browning et al., 2011), 18 ασθενείς έλαβαν είτε μία δίαιτα με < 20 γρ. υδατανθράκων / ημέρα, είτε μία υποθερμιδική δίαιτα βασισμένη στις συνήθειες των ασθενών για 2 εβδομάδες. Τα επίπεδα ενδοηπατικών τριγλυκεριδιών μειώθηκαν περισσότερο στην ομάδα ασθενών που ελαβε την χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες δίαιτα σε σύγκριση με την ομάδα υποθερμιδικής δίαιτας. Ωστόσο, η χρησιμότητα και η σκοπιμότητα τέτοιου τύπου διαιτών φαίνεται να αμφισβητείται

σε ασθενείς με NAFLD, λαμβάνοντας υπόψη ότι η μακρόχρονη συμμόρφωση των ασθενών αυτών στις υγιεινοδιαιτητικές συστάσεις είναι σημαντική (Le and Bortolotti, 2008).

Επίσης, ο ρόλος της υψηλής πρόσληψης πρωτεϊνών στη θεραπεία της NAFLD έχει δοκιμαστεί παράλληλα με απώλεια βάρους, με περιορισμένα δεδομένα. Σε μία μη-ελεγχόμενη μελέτη (Bezerra Duarte et al., 2014) 48 ασθενών με NAFLD (εκ των οποίων το 85,4% ήταν γυναίκες), δόθηκε μία υποθερμιδική δίαιτα (1200Kcal για τις γυναίκες και 1400 Kcal για τους άντρες) για 75 ημέρες. Η σύσταση της δίαιτας περιελάμβανε 35% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης (ΣΕΠ) από πρωτεΐνες (φυτικής και ζωϊκής προέλευσης), 40% της ΣΕΠ από υδατάνθρακες (50% από προϊόντα ολικής άλεσης) και 25% της ΣΕΠ από λιπαρά. Στο τέλος της παρέμβασης, παρόλο που ο ΔΜΣ, η ΠΜ και η λιπώδης μάζα σώματος παρέμειναν σταθερά, οι ασθενείς βελτίωσαν σημαντικά το λιπιδαιμικό τους προφίλ, τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων, γλυκόζης, και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαίρινης. Σε μία πρόσφατη πιλοτική μελέτη (Arslanow et al., 2016) 60 ασθενών με NAFLD, δόθηκε για 14 ημέρες μία υποθερμιδική, υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και διαιτητικές ίνες, υγρή φόρμουλα. Το διατροφικό αυτό σκεύασμα απέδιδε 786 Kcal με ποσοστιαία ανάλυση μακροθρεπτικών συστατικών 41% πρωτεΐνες, 29% υδατάνθρακες, 24% λιπίδια και 6% διαιτητικές ίνες (21 γρ. διαιτητικών ινών συνολικά/ ημέρα) της ΣΕΠ. Στο τέλος της μελέτης, οι ασθενείς έχασαν περίπου 4,6% του αρχικού τους βάρους, εκ του οποίου το 61,9% ήταν λιπώδης μάζα σώματος. Επιπλέον, ενώ ο βαθμός ηπατικής ακαμψίας και τα επίπεδα της GGT και αλκαλικής φωσφατάσης μειώθηκαν σημαντικά, τα επίπεδα ALT και AST δεν άλλαξαν. Τέλος, σε 15 υπέρβαρους / παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD, δόθηκε για 3 εβδομάδες μία υποθερμιδική δίαιτα 1000 Kcal που απέδιδε 125 γρ. πρωτεϊνών, 38 γρ. υδατανθράκων και 42,3 γρ. λιπιδίων ανά ημέρα. Τα γεύματα δίνονταν έτοιμα στους εθελοντές. Στο τέλος της παρέμβασης, το βάρος των ασθενών μειώθηκε κατά 3,6% προσφέροντας μείωση στα ποσοστά ηπατικού λίπους κατά 65,1%, που μετρήθηκε μέσω MRI (Pataky et al., 2016).

Επιπλέον, υποθερμιδικές δίαιτες πλούσιες σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) ή ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ή συμπληρωματική χορήγηση ω-3 PUFA, έχουν δοκιμαστεί σε ασθενείς με NAFLD και έχουν συσχετιστεί με μείωση του ηπατικού λίπους (Bian et al., 2014).

Τα δεδομένα επιπλέον δείχνουν ότι η υπερκατανάλωση θερμίδων για σύντομο (~3 ημέρες) ή μεγαλύτερο (~7 εβδομάδες) χρονικό διάστημα μέσω SFA ή ω-6 λιπαρών οξέων συσχετίζεται με αύξηση του ενδοηπατικού λίπους, ανεξάρτητα της πρόσληψης βάρους, με μεγαλύτερη αύξηση μάλιστα να προκαλείται στην περίπτωση κορεσμένου λίπους (Green and Hodson, 2014).

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην απώλεια βάρους με συνδυασμό δίαιτας και άσκησης

Σε παχύσαρκους ασθενείς, ο συνδυασμός δίαιτας και άσκησης αποφέρει μεγαλύτερη απώλεια βάρους συγκριτικά με τη δίαιτα ή την άσκηση μεμονωμένα. Μάλιστα, σύμφωνα με τη μετα-ανάλυση 18 RCTs των *Wu* και *συν*. (Wu et al., 2009), οι παρεμβάσεις δίαιτας και άσκησης σε παχύσαρκα ή υπέρβαρα ατομα, προσφέρουν ένα σχετικά πιο αργό αλλά σταθερό αποτέλεσμα συγκριτικά με τις παρεμβάσεις απώλειας βάρους μόνο με δίαιτα, γεγονός που θα μπορούσε να έχει νόημα και στους ασθενείς με NAFLD. Αντίστοιχες μετα-αναλύσεις που να συγκρίνουν τη μεμονωμένη επίδραση της δίαιτας ή της άσκησης, ή τον συνδυασμό δίαιτας και άσκησης σε καλά διαγνωσμένο NAFLD πληθυσμό, δεν υπάρχουν. Ωστόσο, σύμφωνα με μία πρόσφατη ανασκόπηση (Bradford et al., 2014) 14 μελετών παρέμβασης δίαιτας και άσκησης σε NAFLD ασθενείς, όλες σχεδόν οι συμπεριλαμβανόμενες μελέτες έδειξαν βελτιώσεις σε όλα τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία της νόσου, σε σχέση με τις μελέτες μόνο άσκησης που έδειξαν βελτίωση κατά κύριο λόγο στα ενδοηπατικά τριγλυκερίδια. Επιπλέον, οι μελέτες που έχουν εξετάσει ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, είναι συνήθως μικρού δείγματος, εφαρμόζοντας γενικές οδηγίες αύξησης φυσικής δραστηριότητας, χωρίς όμως συγκεκριμένα πρωτόκολλα άσκησης. Στην ανασκόπηση των *Thoma* και *συν*. (Thoma et al., 2012), από τις 7 συμπεριλαμβανόμενες μελέτες, 5 εφάρμοσαν συγκεκριμένα προγράμματα δίαιτας και άσκησης (Sreenivasa Baba et al., 2006, Fraser et al., 2008, Kelley et al., 2004, Vilar Gomez et al., 2009, Ueno et al., 1997), από τις οποίες μόνο 2 έκαναν αναφορά σε ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου (Ueno et al., 1997, Vilar Gomez et al., 2009). Όλες οι μελέτες αποσκοπούσαν στην απώλεια βάρους επιτυγχάνοντας μέση απώλεια 4,2 - 10,6%.

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην τροποποίηση των συνηθειών άσκησης με ή χωρίς απώλεια βάρους

Η επίδραση της άσκησης στην απώλεια βάρους είναι λιγότερο σημαντική, αφού το ενεργειακό έλλειμμα που μπορεί να επιτευχθεί μέσω της άσκησης είναι μικρότερο συγκριτικά με αυτό της υποθερμιδικής δίαιτας (Marchesini et al., 2016). Εντούτοις, η διερεύνηση του είδους της άσκησης, της διάρκειας και της έντασης της άσκησης, χωρίς παράλληλη απώλεια βάρους, αποτελεί αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος, λόγω κάποιων ενδείξεων ότι η άσκηση μπορεί να ωφελεί ακόμη και σε συνθήκες διατήρησης του σωματικού βάρους (Keating and Adams, 2016). Το όφελος της φυσικής δραστηριότητας αυτής καθ΄αυτής για τους ασθενείς με NAFLD, προέρχεται από την αύξηση της ινσουλινοευαισθησίας και τη μείωση του ηπατικού λίπους, ειδικά στα άτομα που δεν μπορούν να ακολουθήσουν αλλαγές στη δίαιτα (Oliveira et al., 2016). Στη μετα-ανάλυση των *Musso* και *συν*. (Musso et al., 2012) 5 τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών (RCTs), 2 εκ των οποίων δε στόχευαν στην απώλεια βάρους, φάνηκε ότι η φυσική δραστηριότητα βελτιώνει τα επίπεδα ηπατικής στεάτωσης καθώς και τα επίπεδα της ALT πλάσματος, χωρίς ωστόσο δεδομένα για τα υπόλοιπα ηπατικά ένζυμα ή το είδος της άσκησης. Σε μία άλλη μετα-ανάλυση των *Keating* και *συν*. (Keating et al., 2012), στην οποία αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της άσκησης στη βελτίωση της ηπατικής στεάτωσης και στη μείωση των επιπέδων της ALT σε ενήλικες, η ευεργετική επίδραση της άσκησης φάνηκε μόνο όταν αποκλείστηκαν από την ανάλυση οι μελέτες που συνδύαζαν άσκηση με δίαιτα ή δίαιτα μόνο. Η άσκηση δε φάνηκε να έχει κάποιο όφελος στα επίπεδα της ALT. Παρόλα αυτά, σε πρόσφατη μετα-ανάλυση 28 κλινικών μελετών των *Orci* και *συν*. (Orci et al., 2016), η άσκηση βελτίωσε σημαντικά τα ηπατικά ένζυμα ALT και AST και τα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους, ανεξάρτητα των αλλαγών στη δίαιτα, χωρίς ωστόσο οι ερευνητές να κάνουν αναφορά στην επίδραση της απώλειας βάρους. Ωστόσο κατέληξαν, ότι η βελτίωση του ενδοηπατικού λίπους ήταν μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερος ήταν ο ΔΜΣ στην αρχή της κάθε παρέμβασης. Η ένταση της άσκησης, όπως αξιολογήθηκε με βάση τη συχνότητα της άσκησης, τον αριθμό των συνεδριών και τη διάρκεια της άσκησης, δε φάνηκε να συσχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της άσκησης.

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην τροποποίηση της σύστασης της δίαιτας χωρίς απώλεια βάρους

Υπό το φως των δυσκολιών που παρατηρούνται για την επίτευξη απώλειας βάρους, αλλά και τη διατήρηση της απώλειας μακροπρόθεσμα (Katan 2009), η τροποποίηση των διατροφικών συνηθειών χωρίς κατ' ανάγκη να συνοδεύεται από μείωση της θερμιδικής πρόσληψης, φαίνεται να προσφέρει μια πιο ρεαλιστική και εφικτή εναλλακτική λύση για τη θεραπεία των ασθενών με NAFLD. Είναι ενδιαφέρον ότι ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών περιγράφουν ασθενείς που πάσχουν από NAFLD, χωρίς να είναι παχύσαρκοι, έχοντας απόλυτα φυσιολογικό ΔΜΣ (Wattacheril and Sanyal, 2016), γεγονός που ενισχύει ακόμα περισσότερο την ανάγκη διεξαγωγής παρεμβάσεων με αλλαγές στη σύσταση της δίαιτας χωρίς απώλεια βάρους.

Σε μία πρόσφατη κλινική μελέτη (Markova et al., 2016) στη Γερμανία, 44 ασθενείς, ηλικίας 49 – 78 ετών, με ΣΔτ2 και NAFLD, ταιριασμένοι ως προς την ηλικία, το φύλο, τον ΔΜΣ, τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και τη λήψη αντιδιαβητικών φαρμάκων, τυχαιοποιήθηκαν για 6 εβδομάδες, είτε στην ομάδα υψηλής πρόσληψης ζωϊκής πρωτεΐνης, είτε στην ομάδα υψηλής πρόσληψης φυτικής πρωτεΐνης. Οι δύο τύποι διαιτών ήταν ισοθερμιδικές μεταξύ τους, αποδίδοντας το 30% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης (ΣΕΠ) σε πρωτεΐνες, 40% της ΣΕΠ σε υδατάνθρακες και 30% της ΣΕΠ σε λιπίδια. Στο τέλος της παρέμβασης, τα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους, όπως αξιολογήθηκαν μέσω ^{1}H-MRS, μειώθηκαν σημαντικά και στις δύο ομάδες, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους (που ήταν κλινικά μη σημαντική και δε διέφερε μεταξύ των ομάδων), ενώ η μείωση συσχετίστηκε με αρνητική ρύθμιση της λιπόλυσης, όπως αξιολογήθηκε από τα επίπεδα FFA.

Επιπλέον, ισοθερμιδική πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) έναντι ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), σε περίπου 20% της ΣΕΠ, έχει συνδεθεί με βελτίωση βιοχημικών και ηπατικών δεικτών, και ομοίως της ηπατικής στεάτωσης σε ασθενείς με NAFLD (Nigam et al., 2014, Oliveira et al., 2016). Επιπλέον, η προσκόλληση σε μία δίαιτα πλούσια σε ω-6 PUFA φυτικής προέλευσης, για 10 εβδομάδες σε σχέση με μία ισοθερμιδική δίαιτα

πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα προερχόμενα από βούτυρο, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους, όπως αξιολογήθηκαν μέσω MRI και ^{1}H-MRS σε ασθενείς με κεντρικού τύπου παχυσαρκία, χωρίς απώλεια βάρους (Bjermo et al., 2012).

Παρεμβάσεις βασισμένες σε συγκεκριμένα διατροφικά πρότυπα

Η δίαιτα DASH στην αντιμετώπιση της NAFLD

Η διαιτητική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της αρτηριακής υπάρτασης (Dietary Approaches to Stop Hypertension, DASH) είναι ένα διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε φρούτα, και λαχανικά, ολικής άλεσης τρόφιμα, γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλών λιπαρών, άπαχα κρέατα, πουλερικα και ψάρια και έχει σχεδιαστεί να παρέχει χαμηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπιδίων και χοληστερόλης (NHLBI, 2006). Εκτός από τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης (Saneei et al., 2014) και τη μείωση κατ΄επέκταση του καρδιαγγειακού κινδύνου (Siervo et al., 2015), έχει φανεί ότι μπορεί να βελτιώνει τα επίπεδα ινσουλινοευαισθησίας, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους (Shirani et al., 2013), ενώ πρόσφατη μετα-ανάλυση 13 τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών, έδειξε ότι η εφαρμογή ενός προγράμματος που βασίζεται στη δίαιτα DASH για 8 έως 24 εβδομάδες, μπορεί να βελτιώνει το σωματικό βάρος και τον ΔΜΣ, σε σύγκριση με τη μη παρέμβαση, με ή χωρίς συνδυασμό με θερμιδικό περιορισμό. Σε αυτή τη λογική, η δίαιτα DASH έχει αρχίσει να δοκιμάζεται και σε ασθενείς με NAFLD. Σε μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη (Razavi Zade et al., 2016), οι ερευνητές θέλησαν να ερευνήσουν την επίδραση της προσκόλλησης στη δίαιτα DASH σε ανθρωπομετρικούς και βιοχημικούς δείκτες των ασθενών έναντι μιας δίαιτας ελέγχου με την ίδια αναλογία σε μακροθρεπτικά συστατικά και προκαλώντας ενεργειακό έλλειμμα και στις δύο ομάδες περίπου 300-750Kcal. Συπεριελήφθησαν προοπτικά 60 υπέρβαροι ασθενείς με υπερηχογραφική διάγνωση NAFLD. Η ομάδα ασθενών που τυχαιοποιήθηκε στην παρέμβαση με ενίσχυση της προσκόλλησης στη δίαιτα DASH, μείωσε περισσότερο τα επίπεδα σωματικού βάρους και τον ΔΜΣ, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ στο τέλος της μελέτης, αναφορικά με τα χαρακτηριστικά της δίαιτας, οι δύο ομάδες διέφεραν μόνο ως προς την πρόσληψη κορεσμένων και πολυακόρεστων

λιπιδίων, χοληστερόλης, διαιτητικών ινών, νατρίου, καλίου, μαγνησίου και ασβεστίου. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, η ομάδα DASH παρουσίασε σημαντική μείωση των επιπέδων αμινοτρασφερασών, τριγλυκεριδίων και ινσουλίνης, του δείκτη αντίστασης στην ινσουλίνη HOMA-IR, ενώ σημαντική μείωση επετεύχθη και σε επίπεδο φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία και τον ΔΜΣ που είχαν οι ασθενείς στην αρχη της μελέτης, τα αποτελέσματα παρέμειναν γενικά αμετάβλητα. Το διατροφικό πρότυπο DASH θεωρείται ότι επιδρά ευεργετικά στα άτομα με NAFLD ενεργώντας άμεσα στους παράγοντες κινδύνου της νόσου και ιδίως στην δυσλιπιδαιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη (Hekmatdoost et al., 2016).

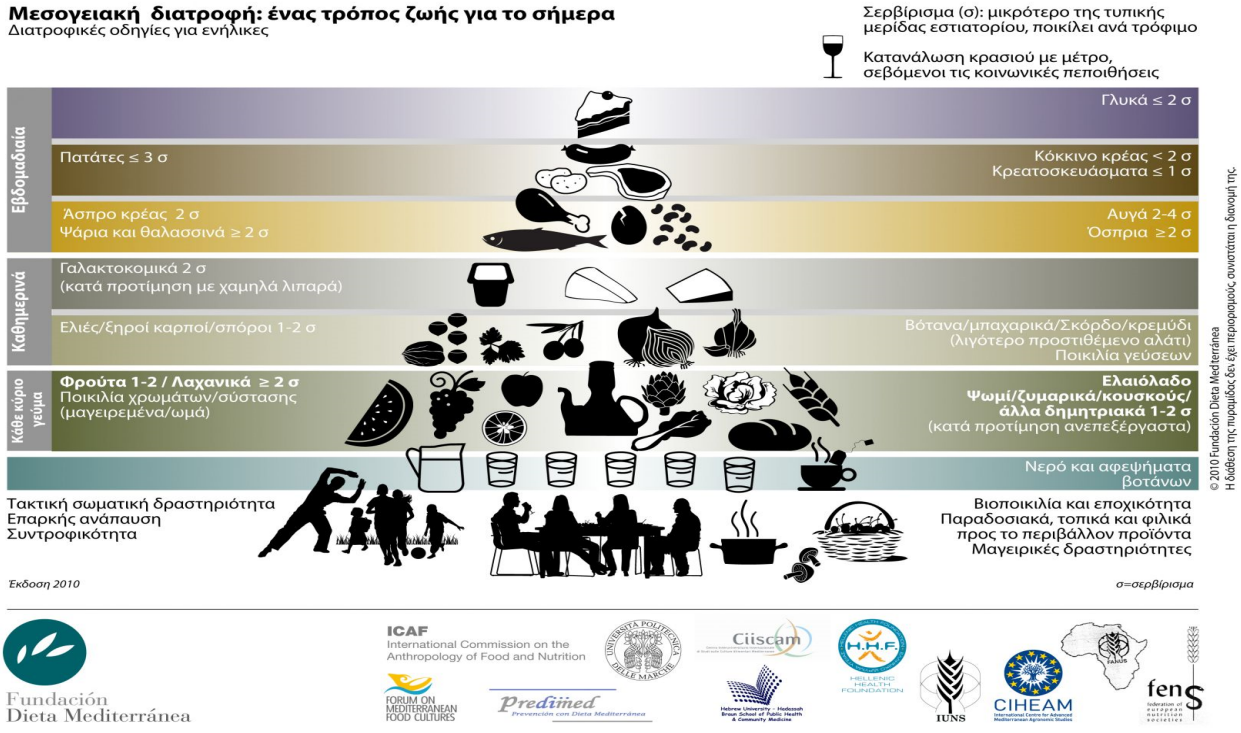
Η Μεσογειακή δίαιτα στην αντιμετώπιση της NAFLD

Η ΜΔ είναι ένα σύνολο διατροφικών συνηθειών που ακολουθούν παραδοσιακά οι πληθυσμοί των χωρών που συνορεύουν με τη Μεσόγειο. Η σύγχρονη εκδοχή της δίαιτας αυτής χαρακτηρίζεται από υψηλή ημερήσια κατανάλωση ελάχιστα επεξεργασμένων δημητριακών, λαχανικών, φρούτων, ξηρών καρπών και ελαιολάδου (ως κύρια πηγή λίπους), μέτρια εβδομαδιαία κατανάλωση οσπρίων, πουλερικών και ψαριών και χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος και γλυκών. Επίσης, παρέχει μέτριες ποσότητες κρασιού κυρίως ως συνοδευτικό των γευμάτων (Trichopoulou, 2007, Υπουργείο Υγείας 1999). Το 2011, δημοσιεύτηκε η νέα αναθεωρημένη πυραμίδα ΜΔ, ενσωματώνοντας συμβουλές πέραν της δίαιτας. Συγκεκριμένα, δόθηκε έμφαση σε πολιτιστικά και κοινωνικά χαρακτηριστικά του μεσογειακού τρόπου ζωής, όπως στην επαρκή ανάπαυση και φυσική δραστηριότητα, στην κοινωνικότητα κατά την διάρκεια του γεύματος, στην εποχικότητα των τροφίμων, στη βιοποικιλότητα. Ενθαρρύνει επίσης την επαρκή ενυδάτωση, καθώς και τη χρήση μυρωδικών, μπαχαρικών, σκόρδου και άλλων βοτάνων, προκειμένου να μειωθεί η προσθήκη αλατιού κατά το μαγείρεμα και την κατανάλωση του φαγητού (Bach-Faig et al., 2011) (***Σχήμα 2.1***).

Η συμβολή της ΜΔ στην πρόληψη και την αντιμετώπιση διαφόρων χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων, είναι πλέον καλά αναγνωρισμένη από την επιστημονική κοινότητα.

Ήδη δύο μετα-ανάλυσεις έχουν αναδείξει τη ΜΔ ως το βέλτιστο διατροφικό πρότυπο για τη διατήρηση καλής υγείας (Sofi et al., 2008, Sofi et al., 2010), ενώ άλλες υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητά της στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου (Martinez-Gonzalez and Bes-Rastrollo, 2014) και του ΣΔτ2 (Koloverou et al., 2014, Schwingshackl et al., 2015).

Επιπρόσθετα, η ευεργετική επίδραση της ΜΔ στον κίνδυνο εμφάνισης ΜΣ έχει μελετηθεί αρκετά (Babio et al., 2009, Kesse-Guyot et al., 2013, Esposito et al., 2013). Σε σχετικά πρόσφατη μετα-ανάλυση 50 μελετών με διάφορο σχεδιασμό των *Kastorini* και *συν.* (Kastorini et al., 2011), φάνηκε ότι η υιοθέτηση ενός τέτοιου διατροφικού προτύπου, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης τόσο του ΜΣ αλλά και των συνιστωσών αυτού, ενώ παράλληλα ευνοεί τη λύση του. Τα αντίστοιχα δεδομένα σε NAFLD πληθυσμό είναι περιορισμένα. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1 από την παρουσίαση των διαθέσιμων επιδημιολογικών δεδομένων, η ηψηλότερη προσκόλληση στη ΜΔ, όπως εκτιμήθηκε μέσω του δείκτη MedDietScore, σχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας ΜΣ σε ασθενείς με NAFLD (Georgoulis et al., 2015), καθώς και με μειωμένη βαρύτητα της νόσου (Kontogianni et al., 2014). Επιπλέον, υπάρχουν και κάποια δεδομένα που προέρχονται από κλινικές μελέτες, με αρκετά ενδιαφέροντα ευρήματα.



Σχήμα 2.1: Αναθεωρημένη πυραμίδα μεσογειακής διατροφής και τρόπου ζωής (Bach-Faig et al., 2011).

Συγκεκριμενα, σε μία μη-ελεγχόμενη μελέτη παρέμβασης (Trovato et al., 2015) διάρκειας 6 μηνών, που είχε σκοπό την αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ, συμμετείχαν 90 ασθενείς μέσης ηλικίας με υπερηχογραφική διάγνωση NAFLD. Στο τέλος της παρέμβασης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ενδοηπατικού λίπους, όπως εκτιμήθηκε από το δείκτη *bright liver score* (BLS), αλλαγές που ήταν ορατές μονάχα μετά τη συμπλήρωση του εξαμήνου και όχι κατά τον πρώτο ή τρίτο μήνα παρακολούθησης. Η διακύμανση στη μείωση του δείκτη BLS φάνηκε να εξηγείται μέσω πολυμεταβλητών μοντέλων ανάλυσης, από την αύξηση στην προσκόλληση στη ΜΔ και τη μείωση του ΔΜΣ (Trovato et al., 2015).

Καλύτερου σχεδιασμού αλλά μικρότερου δείγματος ήταν η μελέτη των *Ryan* και *συν*. (Ryan et al., 2013). Πρόκειται για μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη, όπου συμμετείχαν 12 υπέρβαροι ασθενείς με NAFLD, διαγνωσμένη με βιοψία. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν με διασταυρούμενο τρόπο, είτε σε μία μεσογειακού τύπου δίαιτα, είτε σε μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (ομάδα ελέγχου) για 6 εβδομάδες, χωρίς θερμιδικό περιορισμό. Ο βαθμός ηπατικής στεάτωσης προσδιορίστηκε μέσω μαγνητικής φασματοσκοπίας συντονισμού πρωτονίων (^{1}H-MRS). Στο τέλος της παρέμβασης, αν και οι δύο ομάδες παρουσίασαν μικρή απώλεια βάρους, αυτή δε διέφερε τελικά μεταξύ των ομάδων, ωστόσο η ομάδα ΜΔ βελτίωσε σημαντικά τον βαθμό ηπατικής στεάτωσης, ινσουλινοευαισθησίας και τον βαθμό ίνωσης, χωρίς αντίστοιχες αλλαγές στην ομάδα ελέγχου (Ryan et al., 2013). Σε εξέλιξη βρίσκεται η μελέτη MEDINA, της ίδιας ερευνητικής ομάδας. Πρόκειται για μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή που θα συμπεριλάβει προοπτικά 94 ασθενείς με ινσουλινοαντίσταση και NAFLD διαγνωσμένη μέσω υπερήχου ή βιοψίας. Οι ασθενείς θα τυχαιοποιηθούν είτε στην ομάδα ΜΔ είτε στην ομάδα χαμηλού λίπους (ομάδα ελέγχου) για 3 μήνες. Ο βαθμός ηπατικής στεάτωσης θα προσδιοριστεί μέσω ^{1}H-MRS, ο βαθμός ίνωσης μέσω ελαστογραφίας, ενώ η ινσουλινοαντίσταση μέσω του δείκτη HOMA-IR (Papamiltiadous et al., 2016).

Σε μία πρόσφατα δημοσιευμένη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη παρέμβασης των *Misciagna* και *συν.* (Misciagna et al., 2016) σε 98 Ιταλούς ασθενείς με NAFLD διαγνωσμένη μέσω υπερήχου, οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για 6 μήνες είτε στην ομάδα παρέμβασης, όπου

έλαβαν μία χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη ΜΔ χωρίς θερμιδικό περιορισμό, είτε στην ομάδα ελέγχου που έλαβαν συστάσεις για μία υγιεινή δίαιτα βασισμένες στις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Έρευνας Τροφίμων και Διατροφής της Ιταλίας. Το κύριο καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν αλλαγές στον δείκτη NAFLD score, και στη σοβαρότητα της νόσου όπως αξιολογήθηκε μέσω υπερήχου. Από τα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε μεγαλύτερη βελτίωση του δείκτη NAFLD score, τόσο στους 3 όσο και στους 6 μήνες της παρέμβασης, στην ομάδα χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη ΜΔ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι οι όποιες ευεργετικές επιδράσεις της δίαιτας στην ομάδα παρέμβασης, αφορούσαν του συμμετέχοντες μέχρι την ηλικία των 55 ετών. Εντούτοις, διαβάζοντας το άρθρο, δεν είναι ξεκάθαρο ποιες διαφορές στη δίαιτα είχαν οι δύο ομάδες στο τέλος της παρέμβασης και συνεπώς δεν είναι ξεκάθαρο αν τα όποια οφέλη αποδίδονται στον χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, στη ΜΔ καθ΄ αυτή ή σε συνδυασμό αυτών.

Η ευεργετική δράση της ΜΔ στην NAFLD, όσο και στα υπόλοιπα εκφυλιστικά νοσήματα, φαίνεται ότι μπορεί να εξηγηθεί μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αν και πρόκειται για μία αποτελεσματική διαιτητική προσέγγιση απώλειας βάρους όταν συνδυάζεται με θερμιδικό περιορισμό και φυσική δραστηριότητα (Esposito et al., 2011), αυτό που κάνει τη ΜΔ τόσο ευεργετική, είναι η θρεπτικότητα των τροφίμων που περιέχονται σε αυτή. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα φαινολικά οξεά και τα αντιοξειδωτικά που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο (Assy et al., 2009), τα φυτοχημικά, οι βιταμίνες, τα ιχνοστοιχεία από τα φρούτα και τα λαχανικά, και η χαμηλή γλυκαιμική απάντηση εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε τρόφιμα πλούσια σε διαιτητικές ίνες, φαίνεται να είναι κάποιοι από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η ΜΔ βελτιώνει τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, καθώς και τον βαθμό ηπατικής στεάτωσης, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με NAFLD (Godos et al., 2016).

2.2. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD ΜΕΣΩ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων

Τα ω-3 λιπαρά οξέα μακράς αλύσου έχουν δοκιμαστεί ως δυνητικοί θεραπευτικοί παράγοντες στην NAFLD σε πολλές κλινικές δοκιμές, καθώς έχει φανεί ότι μειώνουν την ηπατική λιπογένεση με παράλληλη αύξηση της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων, ενώ ασκούν και αντιφλεγμονώδη δράση (Spadaro et al., 2008). Εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης που παρατηρείται μεταξύ των μελετών ως προς τη διάρκεια των παρεμβάσεων, τις θεραπευτικές δόσεις και το είδος των σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται, αρκετοί συγγραφείς αναφέρουν ότι τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή (Masterton et al., 2010). Άλλοι ερευνητές φτάνουν στο σημείο ορισμού ιδανικών δόσεων, προτείνοντας ότι περίπου 1 γρ. / ημέρα ω-3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, μειώνει τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ, ενώ στα 2 γρ. /ημέρα επιτυγχάνεται μείωση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων, της γλυκόζης, των τριγλυκεριδίων έως και του βαθμού της ηπατικής στεάτωσης (Capanni et al., 2006, Spadaro et al., 2008). Σύμφωνα με την Αμερικανική γαστρεντερολογική εταιρεία, η χορήγηση ω3 λιπαρών οξέων, δεν συνιστάται ως μία ειδική συμπληρωματική θεραπεία για τους ασθενείς με NAFLD. Ωστόσο, σε περιπτώσεις ασθενών με σοβαρή υπερτριγλυκεριδαιμία (TG > 500 mg/dL), που αυξάνει τον κίνδυνο παγκρεατίτιδας, επιτρέπεται η χρήση τους σε δόσεις 2 - 4 γρ. / ημέρα (Chalasani et al., 2012, Oliveira et al., 2016). Τα ω-3 λιπαρά οξέα φαίνεται ότι δρουν ως ισχυροί ενεργοποιητές συγκεκριμένων πυρηνικών πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στη διαδικασία οξείδωσης των λιπαρών οξέων αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων, όπως του TNF-α και και της IL-6 (Stienstra et al., 2007).

Χορήγηση Βιταμίνης Ε

Η βιταμίνη Ε έχει ερευνηθεί για την αποτελεσματικότητά της στην αντιμετώπιση της NAFLD λόγω της αντιοξειδωτικής της ικανότητας. Η χορήγηση βιταμίνης Ε έχει συσχετιστεί με βελτίωση του βαθμού ηπατικής στεάτωσης, φλεγμονής, αλλά και βελτίωση των επίπεδων αμινοτρανσφερασών, με αντικρουόμενες απόψεις αναφορικά με την επίδρασή της στην ίνωση

(Oliveira et al., 2016). Στη μελέτη PIVENS, μία πολυκεντρική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη των *Sanyal* και *συν.* (Sanyal et al., 2010) σε 84 ασθενείς με NASH χορηγήθηκαν 800 IU / ημέρα βιταμίνης Ε για 96 ημέρες. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου που λάμβανε εικονική αγωγή, παρατηρήθηκε βελτίωση των επιπέδων των αμινατρανσφερασών και μείωση της ηπατικής στεάτωσης, αλλά όχι της ηπατικής ίνωσης και της φλεγμονής που συνδέεται με την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ιστολογική βελτίωση μόνο στο 43% των ασθενών που έλαβαν τη θεραπεία, ενώ η NASH θεραπεύτηκε μόνο στο 36% (σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με άλλη ομάδα που έλαβε το φάρμακο πιογλιταζόνη). Έκτοτε, τουλάχιστον 2 πρόσφατες μετα-ανάλυσεις (Xu et al., 2015, Sato et al., 2015) αναφέρουν ότι η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης Ε σε ασθενείς με NASH μπορεί να βελτιώσει, εκτός των άλλων, και την ίνωση. Αντίθετα, η μετα-ανάλυση των *Singh* et *συν.,* επικαλούμενη υψηλής ποιότητας δεδομένα, κατέληξε ότι η βιταμίνη Ε μπορεί να επιδρά μειώνοντας τις διαδικασίες ηπατοκυτταρικού τραύματος (μείωση ballooning) στους ασθενείς με NASH, αλλά όχι την ίνωση. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της NICE (Glen et al., 2016), η χορήγηση βιταμίνης Ε συνιστάται μόνο στις περιπτώσεις προχωρημένης ηπατικής ίνωσης, ενώ η Αμερικανική εταιρεία μελέτης ήπατος προβλέπει τη χορήγηση της σε δόση των 800 IU / ημέρα μόνο σε ασθενείς με NASH διαγνωσμένη μέσω βιοψίας και όχι για την θεραπεία της NASH σε διαβητικούς ασθενείς, σε ασθενείς με διάγνωση NAFLD χωρίς βιοψία, σε NASH με κίρρωση ή κρυψιγενή ηπατική κίρρωση (Chalasani et al., 2012).

Πεδίο ενδιαφέροντος αποτελεί και ο συνδυασμός της βιταμίνης Ε με άλλες βιταμίνες ή στοιχεία. Ο συνδυσμός βιταμίνης Ε με βιταμίνη C έναντι της λήψης εικονικού σκευάσματος οδήγησε σε βελτίωση της ίνωσης των ασθενών με NASH, όπως αξιολογήθηκε μέσω βιοψίας, αλλά χωρίς αλλαγές στα επίπεδα φλεγμονής και ALT των ασθενών (Harrison et al., 2003). Επιπλέον, ο συνδυασμός βιταμίνης Ε με ουρσοδεοξυχολικό οξύ βελτίωσε τα επίπεδα ALT και AST, καθώς και το βαθμό ηπατικής στεάτωσης σε ασθενείς με NASH, έναντι της λήψης μόνο ουρσοδεοξυχολικού ή εικονικού φαρμάκου (Dufour et al., 2006). Σε γενικές γραμμές ωστόσο δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο εάν το όφελος προέρχεται από επίδραση του συνδυασμού των ουσιών ή της μεμονωμένης χορήγησης βιταμίνης Ε (Harrison et al., 2003, Foster et al., 2011).

Προβιοτικά και Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά είναι μη ζυμώσιμοι υδατάνθρακες που διεγείρουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα ορισμένων ειδών βακτηρίων στο παχύ έντερο, των προβιοτικών, δηλαδή ζωντανών μικροοργανισμών που είναι κυρίως γαλακτοβάκιλλοι και μπιφιντοβακτήρια. Δεδομένης της σχέσης μεταξύ εντερικής μικροχλωρίδας και NAFLD, τα δεδομένα είναι αρκετά ελπιδοφόρα ως προς τη χρήση τους για τη θεραπεία της ηπατικής στεάτωσης και βελτίωσης των αμινοτρανσφερασών (Ma et al., 2013). Τα προ- και πρεβιοτικά φαίνεται ότι ασκούν πολλές άμεσες και έμμεσες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων στην τοπική μικροχλωρίδα, βελτιώσεις του φραγμού των επιθηλιακών κυττάρων και μείωση της προκαλούμενης από το έντερο φλεγμονής (Paolella et al., 2014). Η διαθέσιμη πληροφόρηση, ωστόσο, δεν είναι αρκετή για την υποστήριξη της χρήσης τους ως εναλλακτική θεραπεία της NAFLD (Buss et al., 2014).

Ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA)

Τα ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) έχει προταθεί ότι βελτιώνει την ηπατική στεάτωση και τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών σε ασθενείς με NAFLD (Ratziu et al., 2011). Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα και είναι ασαφή. Πολυκεντρικές κλινικές μελέτες που έχουν συμπεριλάβει μεγάλο δείγμα ασθενών με NAFLD και NASH κατέληξαν σε ασυνεπή και απογοητευτικά αποτελέσματα αναφορικά με τη συμπληρωματική χορήγηση UDCA (Mouzaki and Allard, 2012). Ως εκ τούτου το UDCA δε συμπεριλαμβάνεται μέχρι στιγμής στις κατευθυντήριες γραμμές της Αμερικανικής ή την Ευρωπαϊκής εταιρείας μελέτης ήπατος για την αντιμετώπιση της NAFLD ή της NASH (Nascimbeni et al., 2013, Chalasani et al., 2012).

Φάρμακα απώλειας βάρους

Η χορήγηση ορλιστάτης έχει αξιολογηθεί ως προς την αποτελεσματικότητά της στην αντιμετώπιση της νόσου. Αποτελεί αναστολέα της γαστρικής και της παγκρεατικής λιπάσης και

δρα μειώνοντας την πρόσληψη διαιτητικού λίπους. Κύρια αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί είναι η μείωση των αμινοτρανσφερασών του ορού (Harrison and Neuschwander-Tetri, 2004), η βελτίωση της ηπατικής στεάτωσης (Harrison and Neuschwander-Tetri, 2004, Zelber-Sagi et al., 2006), καθώς και η βελτίωση του βαθμού φλεγμονής και ίνωσης (Hussein et al., 2007) σε ορισμένους από τους ασθενείς που έλαβαν τη θεραπεία.

Αντιδιαβητικά φάρμακα

Το διγουανίδιο μετφορμίνη και οι θειαζολιδινεδιόνες (TZDs) είναι αντιδιαβητικά φάρμακα που αυξάνουν την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη και χρησιμοποιούνται εκτενώς στη θεραπεία της NAFLD. Η κύρια δράση της μετφορμίνης στο ήπαρ είναι η μείωση της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης αναστέλλοντας τις διαδικασίες της γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης (Mehta, 2010). Η χορήγηση μετφορμίνης σε ασθενείς με NAFLD / NASH έχει φανεί ότι βελτιώνει τα επίπεδα ινσουλίνης και C-πεπτιδίου του ορού (Uygun et al., 2004), μειώνει τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών του ορού, καθώς και την ηπατική στεάτωση με βελτιώσεις και στην ιστολογική δραστηριότητα του ήπατος (Nair et al., 2004, Schwimmer et al., 2005, Bugianesi et al., 2005, Duseja et al., 2004). Οι TZDs μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη με ενίσχυση της δράσης της ινσουλίνης στον λιπώδη ιστό, δρώντας ως αναστολείς του υποδοχέα του PPAR-γ. Διάφορες μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση των TZDs στη NAFLD/NASH, αναφέροντας πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο όσον αφορά ορολογικούς δείκτες ηπατικής λειτουργίας, όσο και την ιστολογίας του ήπατος (Sanyal et al., 2004, Belfort et al., 2006, Promrat et al., 2004, Neuschwander-Tetri et al., 2003). Παρόλα αυτα, για τη διατήρηση των ευεργετικών δράσεων των TZDs, απαιτείται η μακρόχρονη χορήγησή τους (Lutchman et al., 2007), που όμως μπορεί να επιφέρει ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως αύξηση του σωματικού βάρους, οίδημα, καρδιακή ανεπάρκεια και αύξηση του κίνδυνου εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, εάν η χορήγηση διατηρείται πάνω από 2 χρόνια (Lewis et al., 2011). Σύμφωνα με τις συστάσεις τις NICE (Glen et al., 2016), η χορήγηση πιογλιταζόνης ενδείκνυται μόνο σε περιπτώσεις προχωρημένης ίνωσης, σε άτομα με ή χωρίς σακχαρώδη διαβήτη.

Υπολιπιδαιμικά φάρμακα

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στη θεραπεία της NAFLD (Kotronen and Yki-Jarvinen, 2008). Συγκεκριμένα οι στατίνες μειώνουν την ενδογενή παραγωγή της χοληστερόλης αναστέλλοντας την δράση του ενζύμου HMG-CoA με κύριους εκπροσώπους την ατορβαστατίνη και ροσουβαστατίνη, ενώ η εζετιμίμπη λειτουργεί αναστέλλοντας την απορρόφηση χοληστερόλης τόσο στο λεπτό έντερο και όσο και στο ήπαρ (Watanabe et al., 2015). Η χρήση στατινών στους ασθενείς με NAFLD ή NASH επιτρέπεται στις περιπτώσεις συνυπάρχουσας δυσλιπιδαιμίας, ενώ δεν ενδείκνυται σε ασθενείς που παρουσιάζουν αποκλειστικά NASH ανεξαρτήτου δυσλιπιδαιμίας, λόγω των ανεπαρκών δεδομένων σχετικά με τις δράσεις τους, από καλά σχεδιασμένες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες (Attar and Van Thiel, 2013). Η ροσουβαστατίνη θεωρείται ότι μπορεί να προσφέρει μεγάλη βοήθεια σε ασθενείς NAFLD και μεταβολικό σύνδρομο (Kargiotis et al., 2015), λόγω των πλειοτροπικών δράσεων που ασκεί στον μεταβολισμό της γλυκόζης και ακόμα περισσότερο όταν συνδυάζεται με πιογλιταζόνη (Riche et al., 2014). Ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός παράγοντας για την NAFLD είναι και η εζετιμίμπη. Μελέτες σε πειραματόζωα, έχουν ήδη τεκμηριώσει την αντι-φλεγμονώδη, αντι-αποπτωτική και αντι-ινωτική της δράση. Έχει δοκιμαστεί και σε κλινικές μελέτες μόνη της ή σε συνδυασμό με απώλεια βάρους ή ορλιστάτη, αλλά περισσότερες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές απαιτούνται για την επιβεβαίωση της δράσης της (Filippatos and Elisaf, 2011).

Αντιφλεγμονώδεις παράγοντες

Η πεντοξυφυλλίνη (*Pentoxifylline)* είναι ένα παράγωγο ξανθίνης που αναστέλλει την έκκριση του TNF-α, μια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη, που όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της παθοφυσιολογίας, εμπλέκεται στις διαδικασίες φλεγμονής, υπεροξείδωσης των λιπιδίων και απόπτωσης. Αν και κάποια αποτελέσματα τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών είναι αντιφατικά (Van Wagner et al., 2011, Zein et al., 2011b), μία πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι η πεντοξυφυλλίνη μειώνει σημαντικά τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών και γλυκόζης νηστείας, τον ΔΜΣ, αλλά και την ηπατική στεάτωση και τη φλεγμονή (Zeng et al., 2014), ενώ

φαίνεται ότι βελτιώσεις επιτυγχάνονται και σε επίπεδο ίνωσης (Zeng et al., 2014, Singh et al., 2015).

2.3. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ NAFLD

Στους ασθενείς με NAFLD/NASH που πάσχουν από νοσογόνο παχυσαρκία (ΔΜΣ > 40 kg / m^2) ή έχουν ΔΜΣ > 35 kg / m^2 με συνύπαρξη δύο ή περισσότερων παραγόντων κινδύνου) αλλαγές μόνο στον τρόπο ζωής τις περισσότερες φορές δεν επαρκούν και συχνά η βαριατρική χειρουργική αποτελεί πιο αποτελεσματική επιλογή. Η γαστρική παράκαμψη κατά Roux-en-Y φαίνεται να βελτιώνει σημαντικά την ηπατική ιστολογία με ίαση έως και στο 89% των ασθενών με NASH (Clark et al., 2005, Barker et al., 2006, Liu et al., 2007). Ανάλογα θετικά αποτελέσματα παρατηρούνται μετά από γαστροπλαστική σε ασθενείς με NAFLD, χωρίς όμως ξεκάθαρα αποτελέσματα αναφορικά με την ιστολογική βελτίωση (Jaskiewicz et al., 2006, Stratopoulos et al., 2005). Η λαπαροσκοπική τοποθέτηση γαστρικού δακτυλίου δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Σε δύο μελέτες των *Dixon* και *συν*. φάνηκε ότι ενώ βελτιώθηκε η ηπατική στεάτωση, η ίνωση επιδεινώθηκε (Dixon et al., 2004, Dixon et al., 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΑ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η NAFLD αποτελεί τη συχνότερη αιτία ηπατικής διαταραχής στις δυτικές κοινωνίες (Ratziu et al., 2010). Λόγω της υψηλής συσχέτισής της με την παρουσία ΜΣ και το ΣΔτ2, ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να ακολουθεί τις ολοένα αυξανόμενες τάσεις της παχυσαρκίας (Fazel et al.), γεγονός ιδιαίτερα ανησυχητικό, καθώς οι ασθενείς εμφανίζουν αυξημένη θνητότητα από τα σχετιζόμενα ή μη με το ήπαρ νοσήματα, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, προκαλώντας, ως εκ τούτου και σημαντική οικονομική επιβάρυνση στα συστήματα υγείας (Levene and Goldin, 2012).

Εκτός από τους καλά τεκμηριωμένους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, όπως είναι η παχυσαρκία και το ΜΣ, άλλοι συμπεριφορικοί παράγοντες, που αντανακλούν τον τρόπο ζωής των ασθενών με NAFLD, είναι λιγότερο μελετημένοι. Η διαθέσιμη βιβλιογραφία αφορά κυρίως συσχετίσεις μεταξύ μιας πτυχής του τρόπου ζωής, όπως είναι η δίαιτα ή η φυσική δραστηριότητα, ενώ αναφορές σε άλλες πτυχές, όπως είναι το κάπνισμα ή η διάρκεια και η ποιότητα του ύπνου, απαντώνται αποσπασματικά στη βιβλιογραφία. Επιπρόσθετα, αν και υπάρχει πληθώρα δημοσιευμένων μελετών που υποστηρίζουν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ μεμονωμένων ομάδων τροφίμων (Assy et al., 2008, Abid et al., 2009, Georgoulis et al., 2014, Μ. Γεωργούλης, 2012) και τον κίνδυνο εμφάνισης ή την παρουσία NAFLD, η διερεύνηση της επίδρασης των διαφόρων διατροφικών προτύπων στη NAFLD είναι περιορισμένη. Όπως ανασκοπήθηκε στα κεφάλαια 1 & 2, τα λιγοστά δεδομένα προέρχονται, κυρίως, από *a posteriori* ή *a-priori* επιδημιολογικές αναλύσεις και μικρές κλινικές μελέτες, και πιστοποιούν την επιβαρυντική δράση των διατροφικών προτύπων που στηρίζονται σε απλούς υδατάνθρακες, και κυρίως γλυκά, κόκκινο κρέας ή κρεατοσκεύασματα, παράλληλα με υψηλή θερμιδική πρόσληψη (Jia et al., 2015, Yang et al., 2015), καθώς και την ευνοϊκή επίδραση της τήρησης ενός μεσογειακού προτύπου διατροφής (Kontogianni et al., 2014).

Αναφορικά με την αντιμετώπιση της νόσου, όπως ήδη ανασκοπήθηκε στο κεφάλαιο 2, επί του παρόντος, επίσημος θεραπευτικός αλγόριθμος δεν υπάρχει. Η έγκαιρη διάγνωση και παρέμβαση, καθώς και η μείωση και πρόληψη των σοβαρών επιπλοκών έχουν προταθεί ως μια αποτελεσματική και οικονομικά συμφέρουσα στρατηγική για την αντιμετώπιση της NAFLD.

Μέχρι σήμερα, καμία φαρμακευτική ή χειρουργική αγωγή δεν έχει εγκριθεί για την αντιμετώπιση της νόσου. Οι προτεινόμενες θεραπείες περιλαμβάνουν αλλαγές στον τρόπο ζωής (Teede et al., 2010, Preiss and Sattar, 2008), με τη μείωση του βάρους να αποτελεί την πιο σταθερή και σημαντική παράμετρο για τη βελτίωση της νόσου. Το ακριβές ποσοστό της απώλειας βάρους και του θερμιδικού ελλείμματος που απαιτείται για τη βελτίωση της NAFLD δεν έχουν καθοριστεί πλήρως. Ελλιπή είναι επίσης τα στοιχεία σχετικά με τη βέλτιστη σύσταση της δίαιτας για τη NAFLD. Επιπλέον, οι ασθενείς με NAFLD συγκρινόμενοι με υγιείς εθελοντές ίδιας ηλικίας είναι λιγότερο δραστήριοι και έχουν χειρότερη φυσική κατάσταση (Williams, 2012, Gerber et al., 2012a, Krasnoff et al., 2008). Η οδηγία για αύξηση της φυσικής δραστηριότητας συμπεριλαμβάνεται σχεδόν σε όλες τις προτεινόμενες συστάσεις για την αντιμετώπιση της NAFLD, ειδικά για τα άτομα που δεν μπορούν να ακολουθήσουν ένα πιο εντατικοποιημένο πρόγραμμα απώλειας βάρους μόνο με δίαιτα (Marchesini et al., 2016). Ωστόσο, παραμένει ασαφές ποιο είδος άσκησης και σε ποια ένταση, χρονική διάρκεια ή συχνότητα μπορούν να αποφέρουν τα βέλτιστα στη διαχείριση της νόσου.

Τέλος, δεδομένης της σχέσης της NAFLD με το ΜΣ και το γεγονός ότι οι υγειονοδιαιτητικές αλλαγές που προτείνονται, στοχεύουν στην αντιμετώπιση των εκάστοτε μεταβολικών διαταραχών, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αναφορικά με την αντιμετώπιση της νόσου, έχει στραφεί προς το πιθανό όφελος που μπορεί να προσφέρει η μεσογειακή δίαιτα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υιοθέτηση ενός μεσογειακού διατροφικού προτύπου έχει ευνοϊκό αποτέλεσμα τόσο στην πρόληψη και τη λύση του ΜΣ, όσο και στις επιμέρους συνιστώσες αυτού (Kastorini et al., 2011). Αναφορικά με την NAFLD, τα δεδομένα είναι περιορισμένα και προέρχονται κυρίως από μικρές επιδημιολογικές μελέτες που συσχετίζουν τη προσκόλληση στη μεσογειακή δίαιτα με μείωση των επιπέδων ινσουλίνης και ινσουλινοαντίστασης , καθώς και με μειωμένη βαρύτητα της νόσου (Kontogianni et al., 2012, Georgoulis et al., 2015), ενώ η υψηλότερη προσκόλληση στο διατροφικό αυτό πρότυπο έχει συσχετιστεί και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας ΜΣ σε ασθενείς με NAFLD (Georgoulis et al., 2015). Στην προσπάθεια επιβεβαίωσης των παραπάνω σε επίπεδο κλινικών μελετών, υπάρχουν ελάχιστες κλινικές μελέτες, με σημαντικά ωστόσο μεθοδολογικά προβλήματα. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των *Trovato* και *συν*. (Trovato et al., 2015), παρόλο που φάνηκε

βελτίωση στο βαθμό ηπατικής στεάτωσης επί αύξησης της προσκόλλησης στη ΜΔ με παράλληλη απώλεια βάρους, ήταν μία μελέτη μη-ελεγχόμενη. Επιπλέον, δεδομένα σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις της ΜΔ ανεξάρτητα της απώλειας βάρους έρχονται από 2 κλινικές δοκιμές. Η διασταυρούμενη κλινική μελέτη των *Ryan* και *συν*. έχει αναδείξει ιστολογικές βελτιώσεις της νόσου μετά τη συμμόρφωση σε μία μεσογειακού τύπου δίαιτα για 6 εβδομάδες, συγκριτικά με μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (ομάδα ελέγχου) (Ryan et al., 2013), ενώ η μελέτη των *Misciagna* και *συν*. ανέδειξε υπερηχογραφική βελτίωση της νόσου μετά από αύξηση της προσκόλλησης σε μία *ad libidum* χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη μεσογειακή δίαιτα. Επομένως, η ανάγκη περισσότερων τυχαιοποιημένων καλά ελεγχόμενων κλινικών μελετών είναι αναγκαία. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, η πυραμίδα ΜΔ έχει πρόσφατα αναθεωρηθεί (Bach-Faig et al., 2011) συμπεριλαμβάνοντας, εκτός από τις συνήθειες φαγητού και ποτού, και οδηγίες για επαρκή ανάπαυση και φυσική δραστηριότητα, προωθώντας έτσι ένα συνολικό πρότυπο τρόπου ζωής.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνήσει τη θέση των διαφόρων συνιστωσών του τρόπου ζωής ως παράγοντες κινδύνου της NAFLD, και βάσει των δεδομένων αυτών να σχεδιάσει και να υλοποιήσει ένα πρωτόκολλο αντιμετώπισης της νόσου, βασισμένο σε μία παρέμβαση που αφορούσε τον τρόπο ζωής των ασθενών.

Γι’ αυτό το λόγο διενεργήθηκαν 4 μελέτες στο πλαίσιο των οποίων:

α) Διερευνήθηκε η επίδραση των διαφόρων χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής διεξάγοντας δύο επιδημιολογικές μελέτες (μία συγχρονική και μία ασθενών-μαρτύρων),

β) διεξήχθη μία συστηματική ανασκόπηση-μετα-ανάλυση των παρεμβάσεων που εφάρμοσαν πρωτόκολλα τροποποίησης του τρόπου ζωής,

και στη συνέχεια λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών,

γ) σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της ΜΔ ή του MTZ, παράλληλα με απώλεια βάρους, σε κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

1η ΜΕΛΕΤΗ: Συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής και της παρουσίας μη-αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος: μελέτη ασθενών-μαρτύρων

Εισαγωγή

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, είναι μία παθολογική κατάσταση συσσώρευσης λίπους σε ποσοστό > 5% του συνολικού βάρους του ήπατος, που δεν οφείλεται στην υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ ή άλλες αιτίες ηπατικής στεάτωσης (EASL-EASD-EASO, 2016). Η νόσος εκτείνεται από την απλή στεάτωση έως την εμφάνιση νεκροφλεγμονώδους NASH, αποτελώντας την κύρια αιτία ηπατικής νόσου στις δυτικές κοινωνίες (Ratziu et al., 2010). Θεωρείται ως η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου (Marchesini et al., 2001) με την αντίσταση στην ινσουλίνη να αποτελεί τον κύριο παθογενετικό μηχανισμό. Οι ασθενείς με NAFLD βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Miele and Targher, 2015) και ΣΔτ2 (Kasturiratne et al., 2013), εμφανίζοντας παράλληλα αυξημένα ποσοστά θνητότητας από τα σχετιζόμενα ή μη με το ήπαρ νοσήματα, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (Levene and Goldin, 2012).

Όσον αφορά στις ομάδες τροφίμων, η υψηλή κατανάλωση ροφημάτων με ζάχαρη και αναψυκτικών σε συνδυασμό με την υψηλή πρόσληψη ενέργειας (Madero et al., 2011, Chiu et al., 2014), επεξεργασμένων δημητριακών (Georgoulis et al., 2014), κόκκινου κρέατος και επεξεργασμένων κρεάτων (Zelber-Sagi et al., 2007, Zelber-Sagi et al., 2011) έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD. Αντίθετα, η υψηλή κατανάλωση λιγότερο επεξεργασμένων δημητριακών (Georgoulis et al., 2014), φρούτων και λαχανικών, καθώς και η κατανάλωση καφέ (Oliveira et al., 2016) έχουν συνδεθεί με ευεργετικές επιδράσεις έναντι της νόσου. Πιθανοί εμπλεκόμενοι μηχανισμοί φαίνεται να είναι η επίδραση των συγκεκριμένων τροφίμων στην αντίσταση στην ινσουλίνη, στο επίπεδο φλεγμονής, το λιπιδαιμικό προφίλ και τον έλεγχο του σωματικού βάρους (Marchesini et al., 2016).

Επιπλέον, οι ασθενείς με NAFLD φαίνεται να περνούν περισσότερο χρόνο σε καθιστικές δραστηριότητες (Hallsworth et al., 2015b, Ryu et al., 2015) και να έχουν χαμηλότερα επίπεδα

σωματικής δραστηριότητας συγκρινόμενοι με υγιείς (Gerber et al., 2012b). Το υψηλότερο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας σε υγιή άτομα, έχει συσχετιστεί TG, καλύτερο έλεγχο του σωματικού βάρους και υψηλότερες συγκεντρώσεις HDL-C, καθιστώντας τους παράγοντες αυτούς, σημαντικούς διαμεσολαβητές στην εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD (Oliveira et al., 2016). Όσον αφορά τις συνήθειες ύπνου, πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα έχουν συσχετίσει τις διαταραχές ύπνου με αυξημένη πιθανότητα για παχυσαρκία (Nielsen et al., 2011), αντίσταση στην ινσουλίνη (Mesarwi et al., 2013) και καρδιομεταβολικά προβλήματα (Badran et al., 2015), ενώ οι μελέτες που εξετάζουν την επίδραση των συνηθειών του ύπνου στην πιθανότητα παρουσίας NALFD είναι περιορισμένες (Imaizumi et al., 2015, Bernsmeier et al., 2015, Kim et al., 2013).

Τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα που διερευνούν συσχετίσεις ανάμεσα στον τρόπο ζωής και τη NAFLD έχουν επικεντρωθεί κυρίως στη διερεύνηση μεμονωμένων πτυχών του τρόπου ζωής, π.χ. της διαιτητικής πρόσληψης ή της σωματικής δραστηριότητας, ενώ αναφορές σε άλλες πτυχές του τρόπου ζωής, όπως για παράδειγμα στον ύπνο παραμένουν αποσπασματικές. Έτσι, ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνήσει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής, δηλαδή της διαιτητικής πρόσληψης, της σωματικής δραστηριότητας και των συνηθειών του ύπνου, και της παρουσίας NAFLD, λαμβάνοντας υπόψη παράλληλα και άλλους σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για τη νόσο, όπως είναι το υπερβάλλον σωματικό βάρος.

Μεθοδολογία

Στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν 100 ενήλικες ασθενείς (18 - 67 ετών) με NAFLD που επισκέφθηκαν ένα από τα δύο συνεργαζόμενα εξωτερικά ηπατολογικά ιατρεία [α) τη Γαστρεντερολογική κλινική της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό» και β) τη 2^{η} Παθολογική Κλινική της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο»] από τον Μάιο του 2013 έως τον Δεκέμβριο του 2015. Η διάγνωση της NAFLD βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια: αυξημένα επίπεδα της ALT και / ή της GGT, ένδειξη ηπατικής στεάτωσης σε υπέρηχο και / ή

συμβατή ιστοπαθολογία μέσω βιοψίας ήπατος, αποκλεισμός άλλων αιτιών ηπατικής βλάβης ή στεάτωσης. Οι ασθενείς εξαιρούνταν από τη μελέτη εφόσον παρουσίαζαν θετικούς ορολογικούς δείκτες ηπατίτιδας Β (HBsAg), ηπατίτιδας C (anti-HCV) και του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (anti-HIV), δήλωναν εβδομαδιαία κατανάλωση αλκοόλ πάνω από 210 γρ. για τους άνδρες ή 140 γρ. για τις γυναίκες, έκαναν χρήση δυνητικά ηπατοτοξικών φαρμάκων ή είχαν ενδείξεις μεταβολικής ή αυτοάνοσης ηπατικής νόσου, αλλά και επί παρουσίας συστηματικής νόσου με πιθανή ηπατική συμμετοχή. Επιπλέον, αποκλείονταν τα άτομα με ΔΜΣ> 40 kg / m^2. Όλοι οι ασθενείς με τροποποίηση των διατροφικών τους συνηθειών από τη στιγμή της διάγνωσης ή υπό τήρηση υποθερμιδικού διαιτολογίου, ασθενείς με παρουσία σακχαρώδους διαβήτη ή διάγνωση κακοήθειας εξαιρούνταν επίσης από τη μελέτη. Πληροφορίες για τους δείκτες HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, anti-HCV, anti-HIV, καθώς και τους δείκτες ηπατικών αυτοαντισωμάτων [(*antinuclear* (ANA), *anti-smooth muscle* (ASMA), *anti-mitochondrial* (AMA) και *anti-liver-kidney microsome antibodies* (anti-KLM)] ανακτήθηκαν από τους ιατρικούς φακέλους των ασθενών ή από πρόσφατα εργαστηριακά δεδομένα. Το ιστορικό λήψης αλκοόλ λήφθηκε από τους ασθενείς και επιβεβαιώθηκε από τους συγγενείς ή τους φίλους αυτών. Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε σε καθιστή θέση και ως αρτηριακή υπέρταση ορίστηκε η συστολική πίεση ≥140mmHg και / ή διαστολική πίεση ≥90mmHg ή λήψη αντιυπερτασικής αγωγής.

Επιπλέον, στη μελέτη συμπεριελήφθησαν, κατά τη διάρκεια της προαναφερθείσας περιόδου, 55 υγιή άτομα ως ομάδα ελέγχου. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από άτομα που είτε επισκέφτηκαν άλλα εξωτερικά ιατρεία των ίδιων νοσοκομείων για εξετάσεις ρουτίνας, είτε ήταν υπάλληλοι του νοσοκομείου ή του πανεπιστημίου που διεξήχθη η μελέτη. Τα άτομα αυτά παρουσίαζαν φυσιολογικό μεταβολισμό γλυκόζης, φυσιολογική ηπατική βιοχημεία, καμία ένδειξη ηπατικής στεάτωσης σε υπερηχογράφημα ήπατος, καθώς και σταθερό σωματικό βάρος και σταθερές συνήθειες διατροφής και άσκησης κατά τη διάρκεια του περασμένου έτους. Η ομάδα ελέγχου δε διέφερε συγκριτικά με την ομάδα ασθενών ως προς την ηλικία (± 3 χρόνια), και την κατανομή ως προς το φύλο και τον ΔΜΣ (± 1 kg / m^2). Η στάθμιση μεταξύ ασθενών και υγιών ως προς τον ΔΜΣ θεωρήθηκε πολύ σημαντική, καθώς το υπερβάλλον σωματικό βάρος

και ιδιαίτερα το σωματικό λίπος έχουν αποδειχθεί σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για την NAFLD. Ωστόσο η εύρεση παχύσαρκων ατόμων χωρίς στεάτωση ήταν πολύ δύσκολη και αυτός ήταν και ο λόγος που δεν επιτεύχθηκε η στάθμιση 1:1.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας και Ερευνών του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» και την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι (1997).

Αξιολόγηση τρόπου ζωής

Η αξιολόγηση της συνήθους διατροφικής πρόσληψης ασθενών και υγιών εθελοντών κατά τους τελευταίους έξι μήνες πριν την εισαγωγή στη μελέτη, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός ημι-ποσοτικού ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ) σταθμισμένο για τον Ελληνικό πληθυσμό (Bountziouka et al., 2012). Από τα ερωτηματολόγια αυτά υπολογίστηκε η κατανάλωση διαφόρων ομάδων τροφίμων (πλήρη και ημιάπαχα γαλακτοκομικά προϊόντα, επεξεργασμένα και ελάχιστα επεξεργασμένα αμυλούχα τρόφιμα, κόκκινο κρέας, πουλερικά, ψάρια, όσπρια, λαχανικά, φρούτα, γλυκά, αναψυκτικά και ξηροί καρποί) η οποία και εκφράστηκε σε μερίδες ανά ημέρα. Οι μερίδες καθορίστηκαν με βάση τις διατροφικές οδηγίες για τους Έλληνες πολίτες που δημοσιεύθηκαν το 1999 (Υπουργείο Υγείας, 1999). Επιπρόσθετα, η κατανάλωση αλκοόλ ορίστηκε σε γραμμάρια αιθανόλης ανά ημέρα, η κατανάλωση καφέ σε συχνότητα κατανάλωσης καφέ ανά ημέρα, η κατανάλωση γλυκών σε μερίδες ανά ημέρα (1 μερίδα = 1 τεμάχιο παγωτό, 60γρ. σοκολάτας, 3-4 κομμάτια μπισκότου κ.λπ.) και των αναψυκτικών επίσης σε μερίδες ανά ημέρα [(1 μερίδα = 1 συσκευασία των 330ml)]. Η διαιτητική πρόσληψη αξιολογήθηκε, επίσης, μέσω δύο μη-συνεχόμενων ανακλήσεων 24-ωρου, οι οποίες αναλύθηκαν ως προς την ημερήσια πρόσληψη ενέργειας, μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Nutritionist Pro, έκδοση 2.2 (Axxya Systems, USA).

Το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας εκτιμήθηκε μέσω ενός έγκυρου ερωτηματολογίου σταθμισμένο για τον Ελληνικό πληθυσμό [*Athens Physical Activity Questionnaire- APAQ*]

(Kavouras et al., 2016)]. Η συνολική φυσική δραστηριότητα προσδιορίστηκε μετρώντας τις συνολικές μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό ανά ημέρα (MET-min/ ημ.). Επιπλέον, υπολογίστηκαν και τα MET-min/ ημ. που δαπανήθηκαν σε μέτριας έντασης δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα το τένις ή η γιόγκα. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η συνολική διάρκεια καθιστικών δραστηριοτήτων κατά τον ελεύθερο χρόνο, όπως είναι η παρακολούθηση τηλεοπτικών προγραμμάτων, τα ηλεκτρονικά παιχνίδια και το διάβασμα.

Επίσης καταγράφηκαν, η συνολική διάρκεια ύπνου, η διάρκεια μεσημεριανού ύπνου, καθώς και η διάρκεια μεσημεριανής ανάπαυσης (π.χ. ανάπαυση βλέποντας τηλεόραση ή ξαπλώνοντας στον καναπέ), για τις καθημερινές και τα Σαββατοκύριακα. Ως σύντομη σιέστα ορίστηκε μεσημεριανός ύπνος ή ανάπαυση ≤1 ώρας, ενώ ως συνιστώμενη διάρκεια βραδινού ύπνου ορίστηκε η διάρκεια ≥7 και ≤ 9 ώρες / εικοσιτετράωρο (Mukherjee et al., 2015).

Επίσης καταγράφηκαν πληροφορίες σχετικά με τις συνήθειες καπνίσματος και τη συστηματική χρήση φαρμάκων τόσο για τους ασθενείς, όσο και για τους υγιείς εθελοντές.

Ανθρωπομετρικοί δείκτες

Το σωματικό βάρος μετρήθηκε με ψηφιακή ζυγαριά (Seca Robusta 813, Hamburg, Germany), με ακρίβεια ± 100 γρ., ενώ το ύψος με αναστημόμετρο τύπου seca ακρίβειας ± 0,5 εκ. Ο ΔΜΣ υπολογίστηκε ως βάρος (kg) διαιρούμενο με το τετράγωνο του ύψους (m^2). Η περιφέρεια μέσης (ΠΜ) μετρήθηκε με μη-εκτατή ταινία (seca) με ακρίβεια ± 0,1 εκ. Τιμές >102 εκ. για τους άνδρες και >88 εκ. για τις γυναίκες ορίστηκαν ως αυξημένη ΠΜ.

Βιοχημικοί και φλεγμονώδεις δείκτες

Η συλλογή αίματος στους ασθενείς και τους υγιείς, πραγματοποιήθηκε μετά από 12-ώρη νηστεία. Τα δείγματα ορού και πλάσματος καταψύχθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή τους, στους -80°C. Τα επίπεδα γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και HDL-C μετρήθηκαν μέσω ενζυμικής χρωματομετρικής ανάλυσης (COBAS® 8000 αναλυτής, Roche), ενώ τα επίπεδα της χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL-C) υπολογίστηκαν

χρησιμοποιώντας τον τύπο Friedewald (Friedewald et al., 1972). Τα επίπεδα ινσουλίνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (E170 modular αναλυτή, Roche). Ο δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο των *Matthews* και *συν.* (Matthews et al., 1985). Η παρουσία μεταβολικού συνδρόμου ορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια που δημοσιεύτηκαν από τους *Alberti* και *συν.* (Alberti et al., 2009). Τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων ALT, AST και GGT μετρήθηκαν μέσω ενζυμικής χρωματομετρικής μεθόδου (COBAS® 8000 αναλυτή, Roche). Η υψηλής ευαισθησίας CRP (hsCRP) μετρήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας (BN II νεφελομετρητής, Siemens). Οι συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και της αδιπονεκτίνης μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA (ELISA, kit Quantikine / ανοσοδοκιμασίας, R&D Systems, Minneapolis, USA). Ο συντελεστής ενδο-διακύμανσης ήταν <7% για τον TNF-α και <5% για την αδιπονεκτίνη, ενώ οι συντελεστές δια-διακύμανσης ήταν <8% τόσο για τον TNF-α, όσο και για την αδιπονεκτίνη.

Ελαστογραφία ήπατος (Share-wave Elastography)

Ογδόντα πέντε από τους 100 ασθενείς είχαν αξιόπιστες μετρήσεις ηπατικής ακαμψίας (liver stiffness measurments, LSM) (σε kPa) χρησιμοποιώντας εγκάρσια κύματα 2 διαστάσεων, που εφαρμόστηκαν με τη χρήση του συστήματος υπερήχων Aixplorer MultiWave ™ (Supersonic Imagine S.A., Aix-en-Provence, France) σε συχνότητες 1-6MHz. Η εξέταση θεωρήθηκε αξιόπιστη, αν είχαν ληφθεί τουλάχιστον 5 έγκυρες μετρήσεις βασισμένες σε καλό υπερηχοτομογραφικό σήμα, σε συνδυασμό με χαμηλό κλάσμα της διακύμανσης προς τη μέση τιμή όλων των έγκυρων μετρήσεων ανά εξέταση (<25%). Οι ασθενείς με NAFLD, βάσει των δημοσιευμένων ορίων από τους *Abenavoli* και *Beaugrand* (Abenavoli and Beaugrand, 2012), χωρίστηκαν σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ελαστογραφίας τους, σε εκείνους με LSM $\leq$ 6,6 και LSM > 6,6, υποδηλώνοντας την απουσία ίνωσης ή την παρουσία σημαντικής ίνωσης.

Βιοψία Ήπατος

Οι βιοψίες ήπατος ήταν διαθέσιμες μόνο για 32 ασθενείς. Τα ιστοτεμάχια αξιολογήθηκαν από τον ίδιο ηπατολόγο, ο οποίος δε γνώριζε τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η βιοψία ήπατος θεωρήθηκε επαρκής, αν εντοπίζονταν τουλάχιστον 6 πυλαία σημεία και το μήκος του δείγματος ήταν ≥1,5 εκ. Η διάγνωση της NASH βασίστηκε στα κριτήρια κατά *Brunt* και *συν*. (Brunt et al., 1999) τροποποιημένα κατά *Kleiner* και *συν*. (Kleiner et al., 2005).

Στατιστική ανάλυση

Από την ανάλυση στατιστικής ισχύος, για τον ορισμό του μεγέθους του δείγματος, προέκυψε ότι για να επιτευχθεί ένα αποτέλεσμα επίδρασης ίσο με 0,5, παράλληλα με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%, και στατιστική ισχύ μεγαλύτερη του 80%, απαιτούνταν 55 άτομα σε κάθε ομάδα [οι υπολογισμοί εκτελέστηκαν στο λογισμικό STATA software (Texas, USA)].

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση (SD) και οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτες ή σχετικές συχνότητες. Η κανονικότητα των δεδομένων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Shapiro-Wilk και γραφικά μέσω ιστογράμματος. Για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμασία X^2, το κριτήριο t-τεστ του student για δύο ανεξάρτητα δείγματα και η δοκιμασία Mann–Whitney U, ανάλογα με το αν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική ή όχι κατανομή. Η ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων του τρόπου ζωής και της πιθανότητας παρουσίας της NAFLD, καθώς και της βαρύτητας της νόσου, όπως αξιολογήθηκε μέσω ελαστογραφίας, μετά τον έλεγχο για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως λόγος σχετικών πιθανοτήτων (ΣΛ) με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%, και όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 21.0, SPSS 2012, Chicago, USA).

Αποτελέσματα

Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά τόσο των ασθενών όσο και των υγιών εθελοντών φαίνονται στον ***Πίνακα 4.1.*** Η μέση ηλικία ασθενών και υγιών ήταν τα 45 έτη, ενώ η πλειονότητα των συμμετεχόντων ήταν άντρες και υπέρβαροι (***Πίνακας 4.1***). Παρόλο που οι δύο ομάδες δε διέφεραν ως προς την ηλικία, το φύλο και τον ΔΜΣ, οι ασθενείς είχαν μεγαλύτερη ΠΜ, υψηλότερη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, υψηλότερο δείκτη HOMA-IR και επίπεδα ινσουλίνης, υψηλότερες συγκεντρώσεις TG, TNF-α και hsCRP, ενώ παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα αδιπονεκτίνης και HDL-C (όλα τα P<0,05) συγκριτικά με τους υγιείς. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ηπατικά ένζυμα ALT, AST και GGT ήταν υψηλότερα στους ασθενείς (όλα τα P<0,05). Ηπατικές βιοψίες ήταν διαθέσιμες για 32 ασθενείς και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, 10 ασθενείς διαγνώστηκαν με απλή στεάτωση (SS), 21 με NASH και ένας ασθενής με κίρρωση ήπατος. Οι ασθενείς με NASH συγκρινόμενοι με εκείνους με SS είχαν υψηλότερο ΔΜΣ (29,11±3,02 έναντι 27,05±2,73 Kg/ m^2) και ΠΜ (102,6±10,0 έναντι 96,2±7,8 εκ.), και υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης (15,33±5,15 έναντι 10,0±5,34 μIU/ml) και HOMA-IR (3,51±1,33 έναντι 2,19±1,25), (όλα τα P<0,05).

Πίνακας 4.1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και υγιών εθελοντών

Μεταβλητές	**NAFLD ασθενείς (n=100)**	**Υγιείς εθελοντές (n =55)**	**P-value***
Ηλικία (έτη)	45,5 ± 11,6	44,8 ± 12,1	0,73
Φύλο, άντρες, n (%)	72, (72,0)	34, (62,0)	0,21
Σωματικό βάρος (kg)	84,0 ± 12,1	81,8 ± 12,2	0,29
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m^2)	28,3 ± 2,6	27,9 ± 3,5	0,11
Περιφέρεια μέσης (εκ.)			
Άνδρες	101 ± 8	97 ± 8	0,02
Γυναίκες	96 ± 8	96 ± 11	0,89
Αυξημένη περιφέρεια μέσης [a], n (%)	56, (56,0)	22, (40,0)	0,04
Κάπνισμα (ναι), n (%)	27, (27,0)	24, (43,6)	0,05
Πρώην καπνιστές, n (%)	26, (26,0)	12, (21,8)	0,15

Μορφωτικό επίπεδο n (%)			
≤ 9 έτη σπουδών	17, (17,0)	7, (12,7)	0,57
10-12 έτη σπουδών	38, (38,0)	25, (45,5)	
>12 έτη σπουδών	45, (45,0)	23, (41,8)	
Κλινικά και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά			
Αρτηριακή υπέρταση, n (%)	31, (31,0)	5, (9,1)	0,002
Μεταβολικό σύνδρομο n (%)	33, (33,0)	5, (9,1)	0,001
Λήψη αντι-υπερτασικών φαρμάκων (ναι) n, (%)	25, (26,9)	6, (10,9)	0,02
Λήψη υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (ναι) n, (%)	12, (13,3)	5, (9,3)	0,59
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	208 ± 40,9	205± 44,4	0,73
HDL-C (mg/dL)	37,8 ± 18,1	49,8 ± 16,6	<0,001
LDL-C (mg/dL)	144 ± 39,8	135 ± 36,7	0,25
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	126 ± 55,7	102± 59,3	0,001
Γλυκόζη (mg/dL)	89,2 ± 10,7	87,2 ± 10,9	0,30
Ινσουλίνη(μIU/mL)	12,9 ± 7,4	8,7 ± 6,1	<0,001
HOMA-IR	2,90 ± 1,84	1,92 ± 1,55	<0,001
ALT (IU/L)	69,2 ± 46,0	15,3 ± 5, 8	<0,001
AST (IU/L)	37,8 ± 19,4	24,8 ± 6,9	<0,001
GGT (IU/L)	105 ± 113	20,2 ± 12,2	<0,001
Αδιπονεκτίνη (μg/mL)	6,16 ± 4,73	9,87 ± 7,83	0,001
TNF-α (pg/mL)	4,21 ± 2,98	2,35 ± 3,52	<0,001
hsCRP (mg/L)	1,95 ± 2,63	1,24 ± 1,14	0,02
Ηπατική ακαμψία (kPa) (n=85)	7,2 ± 4,7	-	-

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± SD ή απόλυτες (n) ή σχετικές (%) συχνότητες.

*P-value, όπως προέκυψε χρησιμοποιώντας είτε το στατιστικό κριτήριο X^2 για κατηγορικές μεταβλητές, είτε το κριτήριο student t-τεστ για 2 ανεξάρτητα δείγματα για τις μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική κατανομή ή Mann–Whitney U τεστ για μη-παραμετρικές μεταβλητές. [a]>102 εκ. για άντρες & > 88 εκ. για γυναίκες, P≤0,05. **ALT:** τρανσαμινάση της αλανίνης, **AST:** ασπαρτική τρανσαμινάση, **GGT:** γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπιδάση, **HDL-C:** χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **HOMA-IR**: Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη, **hsCRP:** υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, **LDL-C:** χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **NAFLD:** μη αλκοολική λιπώδη νόσος του ήπατος, **TNF-α:** παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α.

Οι συγκρίσεις των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών παρουσιάζονται στον ***Πίνακα 4.2***. Οι ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές κατανάλωναν λιγότερα λαχανικά και ξηρούς καρπούς, περισσότερα γλυκά και έπιναν λιγότερο καφέ και αλκοόλ (όλα τα P <0,05). Σύμφωνα με τα συνολικά MET-min / ημέρα, οι ασθενείς δήλωσαν σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας (P=0,006) και μειωμένη ενασχόληση με μέτριας έντασης δραστηριότητες (P=0,004) συγκριτικά με τους υγιείς. Τόσο οι ασθενείς όσο και οι υγιείς δεν ανέφεραν ενασχόληση με έντονη σωματική δραστηριότητα. Ωστόσο, οι ασθενείς ανέφεραν μεγαλύτερη διάρκεια σε καθιστικές δραστηριότητες συγκριτικά με τους υγιείς (P=0,04). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις συνήθειες ύπνου, αν και οι ασθενείς παρουσίαζαν μία τάση να κοιμούνται λιγότερο σε σύγκριση με τους υγιείς (P=0,12).

Πίνακας 4.2: Διαφορές σε χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής μεταξύ ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και υγιών εθελοντών.

Μεταβλητές	**NAFLD ασθενείς (n=100)**	**Υγιείς εθελοντές (n =55)**	**P-value[a]**
Φυσική δραστηριότητα			
Συνολικά MET-min/ημ.	2045 ± 286	2165 ± 259	0,006
MET-min/ημ. μέτριας έντασης φυσική δραστηριότητα	229 ± 273	330 ± 269	0,004
Καθιστικές δραστηριότητες/ημ. (ώρες)	3,3 ± 1,8	2,6 ± 1,4	0,044
Συνήθειες Ύπνου			
Συνολική διάρκεια ύπνου (ώρες)	7,3 ± 1,4	7,8± 1,9	0,12
Σύντομη σιέστα (ναι) [b], n (%)	79 (79,0)	42 (76,4)	0,69
Συνιστώμενη διάρκεια ύπνου[c], n (%)	69 (69,0)	32 (58,0)	0,21
Ομάδες τροφίμων και πρόσληψη αναψυκτικών			
Πλήρη γαλακτομικά (μερ./ημ.)	2,11 ± 2,20	2,95 ± 2,62	0,03
Ημιάπαχα γαλακτοκομικά (μερ./ημ.)	1,28 ± 1,50	0,90 ± 1,02	0,13
Επεξεργασμένα δημητριακά (μερ./ημ.)	5,85 ± 4,32	5,84 ± 3,38	0,39
Ελάχιστα επεξεργασμένα δημητριακά (μερ./ημ.)	1,01 ± 1,37	1,15 ± 1,35	0,24
Κόκκινο κρέας & επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος (μερ./ημ.)	1,77 ± 1,19	1,61 ± 1,54	0,14

Πουλερικά (μερ./ημ.)	0,61 ± 0,44	0,57 ± 0,57	0,55
Ψάρια & θαλασσινά (μερ./ημ.)	0,70 ± 0,58	0,66 ± 0,55	0,89
Όσπρια (μερ./ημ.)	0,50 ± 0,36	0,40 ± 0,31	0,05
Λαχανικά (μερ./ημ.)	3,06 ± 1,96	3,72 ± 1,81	0,006
Φρούτα (μερ./ημ.)	1,98 ± 1,76	2,25 ± 2,20	0,67
Ξηροί καρποί (μερ./ημ.)	0,36 ± 0,48	0,93 ± 1,60	0,03
Ελαιόλαδο (μερ./ημ.)	2,9 ± 2,0	3,1 ± 1,8	0,44
Γλυκά (μερ./ημ.)	1,51 ± 1,33	0,90 ± 0,79	0,003
Αναψυκτικά (μερ./ημ.)	0,15 ± 0,29	0,12 ± 0,27	0,25
Κατανάλωση αλκοόλ (γρ. αιθανόλης/ημ.)	7,47 ± 11,10	13,23 ± 17,75	0,01
Κατανάλωση καφέ (φορές/ημ.)	1,62 ± 1,09	2,17 ± 1,59	0,01

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± SD ή ως απόλυτες (n) και σχετικές (%) συχνότητες.

*P-value χρησιμοποιώντας είτε το στατιστικό κριτήριο X^2 για κατηγορικές μεταβλητές, είτε το κριτήριο student t-τεστ για 2 ανεξάρτητα δείγματα για τις μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική ή Mann–Whitney U τεστ για μη-παραμετρικές μεταβλητές, [b] ≤1 ώρα/ ημ., [c] ≥7 και ≤9 ώρες / ημ., P≤0,05.

MET-min/ημ.: μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό ανά ημέρα, **NAFLD:** μη-αλκοολική λιπώδη νόσος του ήπατος, **μερ./ημ.:** μερίδες ανά ημέρα σύμφωνα με τις συστάσεις για τον Ελληνικό πληθυσμό (Υπουργείο Υγείας, 1999).

Όσον αφορά τις συνήθειες καπνίσματος, το 43,6% των υγιών ήταν καπνιστές σε σύγκριση με το 27% των ασθενών (P=0,049), ενώ το ποσοστό των πρώην καπνιστών στην ομάδα των ασθενών (26%) έτεινε να είναι υψηλότερο από εκείνο της ομάδας ελέγχου (21,8%) (P = 0,15). Σχετικά με τις διαφορές στον τρόπο ζωής μεταξύ των ασθενών με SS και NASH, οι ασθενείς με NASH παρουσίαζαν μία τάση να παρακολουθούν τηλεόραση περισσότερες ώρες ανά ημέρα (3,81 έναντι 2,61 ώρες, P = 0,09 συγκριτικά με τους ασθενείς με SS.

Η επίδραση των συνηθειών του τρόπου ζωής στην παρουσία NAFLD διερευνήθηκε περαιτέρω με αναλύσεις πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης. Από τις μεταβλητές του τρόπου ζωής που εξετάστηκαν, το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας, η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, καθώς και η κατανάλωση ξηρών καρπών και καφέ συσχετίστηκαν με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, ενώ η κατανάλωση γλυκών συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα, μετά από προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο (***Πίνακας 4.3, Μοντέλο 1***). Όταν

το υπόδειγμα της παλινδρόμησης προσαρμόστηκε επίσης και ως προς την ΠΜ, τον δείκτη HOMA-IR και τους δείκτες φλεγμονής (αδιπονεκτίνη και TNF-α), το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και η κατανάλωση γλυκών διατήρησαν τη σημαντική συσχέτιση με την παρουσία NAFLD (όλα τα P <0,05). Επιπλέον, η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου συσχετίστηκε οριακά με μικρότερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (P=0,05), ωστόσο η συσχέτιση της πρόσληψης καφέ αποδυναμώθηκε (P=0,07) (***Πίνακας 4.3, Μοντέλο 3***). Όταν στις ανεξάρτητες μεταβλητές της ανάλυσης συμπεριλήφθηκε και η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη, τα αποτελέσματα παρέμειναν αμετάβλητα.

Επιπλέον, διερευνήθηκε πιθανή συσχέτιση των συνηθειών του τρόπου ζωής με τις τιμές ηπατικής ακαμψίας στο υποδείγμα των ασθενών για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμες ελαστογραφίες. Η μέση τιμή LSM, για τους 85 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ελαστογραφία ήπατος ήταν 7,2±4,7 kPa. Οι ασθενείς με NAFLD, χρησιμοποιώντας τα δημοσιευμένα όρια των *Abenavoli* και *Beaugrand* (Abenavoli and Beaugrand, 2012), χωρίστηκαν βάσει των τιμών ελαστογραφίας τους, σε εκείνους με LSM $\leq$ 6,6 kPa (n=47) και LSM > 6,6 kPa (n=38), και διερευνήθηκαν πιθανές διαφορές στις παραμέτρους του τρόπου ζωής. Μεταξύ των διαιτητικών συνηθειών, των συνηθειών ύπνου και φυσικής δραστηριότητας που εξετάστηκαν, μόνο το ποσοστό των ασθενών που ακολουθούσε τη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (76,6% με χαμηλή ηπατική ακαμψία έναντι 55,3% με υψηλή ηπατική ακαμψία, P=0.04). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι οι ασθενείς που ακολουθούσαν τη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, ήταν λιγότερο πιθανό να έχουν υψηλή ηπατική ακαμψία σε σύγκριση με εκείνους που κοιμόντουσαν λιγότερο ή περισσότερο από τις συνιστώμενες ώρες (ΣΛ=0,25, 95% ΔΕ: 0,09-0,74, P=0,012), μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, τον ΔΜΣ, τον HOMA-IR, την κατανάλωση γλυκών και των συνολικών MET-min / ημέρα. Λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος και της άνισης κατανομής μεταξύ των ασθενών με SS και NASH, δεν ήταν δυνατή περαιτέρω διερεύνηση των αποτελεσμάτων της μελέτης, ανάλογα με το στάδιο της νόσου.

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής και της πιθανότητας παρουσίας NAFLD (n=100 ασθενείς και 55 υγιείς εθελοντές).

	Μοντέλο 1 [a]			Μοντέλο 2 [b]			Μοντέλο 3 [c]		
	ΣΛ	**95% ΔΕ**	**P***	**ΣΛ**	**95% ΔΕ**	**P***	**ΣΛ**	**95% ΔΕ**	**P***
Φυσική δραστηριότητα (ανά 100 MET-min)	0,78	0,67 – 0,91	0,001	0,77	0,66 – 0,91	0,002	0,74	0,61 – 0,89	0,002
Συνιστώμενη διάρκεια ύπνου [d]	0,50	0,15 – 0,97	0,04	0,52	0,22 – 1,24	0,14	0,38	0,14 – 1,01	0,05
Ξηροί καρποί (μερ./ημ.)	0,56	0,33 – 0,94	0,03	0,61	0,38 – 0,98	0,04	0,72	0,41 – 1,25	0,24
Λαχανικά (μερ./ημ.)	0,94	0,77 – 1,15	0,57	0,95	0,77 – 1,18	0,64	1,01	0,79 – 1,29	0,96
Γλυκά (μερ./ημ.)	2,13	1,30 – 3,48	0,003	2,24	1,33 – 3,78	0,003	2,13	1,22 – 3,71	0,008
Καφές (φορές/ημ.)	0,67	0,48 – 0,93	0,01	0,68	0,49 – 0,94	0,02	0,72	0,49 – 1,04	0,07

[a]Μοντέλο 1: διόρθωση για ηλικία, φύλο.
[b] Μοντέλο 2: διόρθωση για ηλικία, φύλο, περιφέρεια μέσης, HOMA-IR
[c] Μοντέλο 3: διόρθωση για ηλικία, φύλο, περιφέρεια μέσης, HOMA-IR, συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης και TNF-α
[d] Συνιστώμενη διάρκεια ύπνου: ≥7 και ≤9 ώρες ύπνου/ημέρα.
*P≤0,05.

ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης, **ΣΛ**: λόγος σχετικών πιθανοτήτων, **HOMA-IR:** Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη, **MET-min:** μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό, **NAFLD:** μη αλκοολική λιπώδη νόσος του ήπατος;, **TNF-α:** παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α.

Συζήτηση

Η παρούσα έρευνα είχε ως στόχο να διερευνήσει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής, και συγκεκριμένα της φυσικής δραστηριότητας, των συνηθειών ύπνου και της διατροφικής πρόσληψης και της παρουσίας NAFLD. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η φυσική δραστηριότητα συσχετίστηκε με μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης NAFLD, ενώ η κατανάλωση γλυκών συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα. Οι εν λόγω συσχετισμοί, διατηρήθηκαν ακόμα και μετά τη συνεκτίμηση σημαντικών συγχυτικών παραγόντων, όπως η περιφέρεια μέσης και η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη. Η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου (δηλαδή ≥7 και ≤9 ώρες ανά ημέρα) συσχετίστηκε οριακά και αντιστρόφως με την παρουσία NAFLD στα πολυμεταβλητά μοντέλα, ενώ η αρχικώς παρατηρούμενη αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης καφέ και της παρουσίας NAFLD, εξασθένησε μετά από προσαρμογή για τους δείκτες φλεγμονής, αδιπονεκτίνη και TNF-α.

Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς δήλωσαν χαμηλότερο επίπεδο συνολικής φυσικής δραστηριότητας, καθώς και μειωμένη ενασχόληση με μέτριας έντασης δραστηριότητες και ανέφεραν μεγαλύτερης διάρκειας καθιστική δραστηριότητα από ότι οι υγιείς. Συγκεκριμένα, αύξηση της φυσικής δραστηριότητας κατά 100 MET-min/ημέρα, που αντιστοιχεί για παράδειγμα σε 20 λεπτά χαλαρό περπάτημα ανά ημέρα, συσχετίστηκε με 26% μικρότερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD. Αρκετές έρευνες έχουν καταδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις των παρεμβάσεων φυσικής δραστηριότητας στη θεραπεία της NAFLD ως προς τη μείωση του ενδοηπατικού λίπους και των επιπέδων των αμινοτρανσφερασών (Orci et al., 2016), με ορισμένες εκ των οποίων να δείχνουν προστασία ανεξαρτήτως της παρουσίας παχυσαρκίας (Bae et al., 2012). Επιπρόσθετα, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η άσκηση έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη βελτίωση του ενδοηπατικού λίπους, ακόμη και επί απουσίας απώλειας βάρους (Keating et al., 2012, Hallsworth et al., 2011, Sullivan et al., 2012). Ο υποκείμενος μηχανισμός της άμεσης ηπατικής επίδρασης της άσκησης στο ενδοηπατικό λίπος και τα ηπατικά ένζυμα δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Πέρα από τις γνωστές επιδράσεις της στα επίπεδα γλυκόζης και την ευαισθησία στην ινσουλίνη (van der Heijden et al., 2009, Borghouts and Keizer, 2000), δεδομένα από πειραματόζωα υποστηρίζουν ότι η άσκηση προκαλεί πολλές ηπατικές μεταβολικές προσαρμογές (Trefts et al., 2015b). Συγκεκριμένα, η τακτική σωματική δραστηριότητα μειώνει τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων αυξάνοντας τη μιτοχονδριακή οξείδωση των λιπιδίων και μειώνοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη λιπογένεση, όπως η συνθάση λιπαρών οξέων και η ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (Trefts et al., 2015b).

Στην παρούσα μελέτη, αν και επί της ουσίας, ασθενείς και υγιείς εθελοντές δεν διέφεραν όσον αφορά στις συνήθειες ύπνου, οι ασθενείς έτειναν να κοιμούνται λιγότερο σε σύγκριση με τους υγιείς. Επιπλέον, η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας υψηλών τιμών ηπατικής ακαμψίας (δηλαδή> 6,6 kPa). Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να διερευνηθεί περαιτέρω ο συσχετισμός της συνιστώμενης διάρκειας ύπνου με την παρουσία NAFLD, μέσω πολυπαραγοντικών αναλύσεων. Η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου δε συσχετίστηκε σημαντικά με την πιθανότητα παρουσίας NAFLD, όταν ο δείκτης HOMA-IR συμπεριλήφθηκε στο πολυπαραγοντικό μοντέλο, αλλά συσχετίστηκε οριακά με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD ανεξάρτητα της κατάστασης του σωματικού βάρους, όταν στο μοντέλο συμπεριελήφθησαν οι δείκτες φλεγμονής (δηλαδή αδιπονεκτίνη και TNF-α). Τα διαθέσιμα δεδομένα συσχέτισης των συνηθειών του ύπνου με την παρουσία NAFLD είναι περιορισμένα. Στη συγχρονική μελέτη των *Kim* και *συν*. (Kim et al., 2013), αναλύοντας 45.293 ασθενείς με NAFLD, η μικρή διάρκεια ύπνου (<5 ώρες έναντι >7 ώρες) καθώς και η κακή ποιότητα ύπνου (όπως αξιολογήθηκε μέσω της κλίμακας Pittsburgh Sleep Quality Index score >5) συσχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, λαμβάνοντας υπόψη μεταξύ άλλων την παρουσία υπνικής άπνοιας και την παρουσία ροχαλητού. Ωστόσο οι συσχετισμοί αυτοί, φάνηκε να εξαρτώνται από την κατάσταση του σωματικού βάρους στους άνδρες, αλλά όχι στις γυναίκες. Παρομοίως, στη συγχρονική μελέτη των *Imaizumi* και *συν.* (Imaizumi et al., 2015), η μικρή διάρκεια ύπνου (<6 ώρες έναντι 6 έως ≤7 ώρες) συχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD μόνο σε Γιαπωνέζες γυναίκες, λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία

και διάφορους συμπεριφορικούς παράγοντες, αλλά η συσχέτιση αυτή χάθηκε μετά από προσαρμογή ως προς τον ΔΜΣ. Επιπλέον, στη μελέτη των *Bernsmeier* και *συν*. (Bernsmeier et al., 2015) η παρουσία υπνηλίας κατά τη διάρκεια της ημέρας, συσχετίστηκε με αντίσταση στην ινσουλίνη και με ιστολογικά χαρακτηριστικά της NAFLD.

Διάφορες μελέτες (Ju and Choi, 2013, Cappuccio et al., 2011) έχουν καταδείξει ότι η διάρκεια του ύπνου μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση παχυσαρκίας, καθώς και για άλλα προβλήματα υγείας, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο ΣΔτ2 και η αντίσταση στην ινσουλίνη (Cappuccio et al., 2010a), καθώς και ότι τόσο η μικρή διάρκεια (<7 ώρες) όσο και η μεγάλη διάρκεια (>9 ώρες) ύπνου συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας (σχέση σχήματος U) (Cappuccio et al., 2010b). Επιπλέον, δεδομένα υποστηρίζουν ότι η μείωση του ύπνου, όχι μόνο αυξάνει την πρόσληψη τροφής μέσω τροποποίησης ειδικών ορμονικών εκκρίσεων που επηρεάζουν την όρεξη, όπως είναι η λεπτίνη και η γκρελίνη (Copinschi et al., 2014), αλλά αυξάνει επίσης και την προτίμηση για τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και ενέργεια, συμπεριλαμβανομένων των γλυκών, των αλμυρών σνακ και των αμυλούχων τροφίμων (Dashti et al., 2015). Η στέρηση ύπνου φαίνεται επίσης να μοιράζεται κοινούς μεταβολικούς δρόμους με το σύστημα του στρες, καθώς προκαλεί ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hirotsu et al., 2015). Επιπλέον, οι περισσότερες ώρες ύπνου πέρα των συνηθισμένων ωρών ή του σύντομου ύπνου, έχουν συσχετισθεί με υψηλότερα επίπεδα φλεγμονής (Patel et al., 2009). Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, εικάζουμε ότι η πιθανή ευεργετική επίδραση του ύπνου στην πιθανότητα παρουσίας NAFLD ίσως να σχετίζεται με την κατάσταση της φλεγμονής των ασθενών, ενώ μελλοντικές μελέτες απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν και να διαφωτίσουν περαιτέρω τις παρατηρήσεις αυτές.

Όσον αφορά στους διατροφικούς παράγοντες, η κατανάλωση γλυκών παρουσίασε την ισχυρότερη συσχέτιση με την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD, συγκριτικά με τα υπόλοιπα τρόφιμα ή ομάδες τροφίμων που διερευνήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη. Η συσχέτιση αυτή ήταν επίσης ανεξάρτητη της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης και της περιφέρειας μέσης, αλλά

και του ΔΜΣ. Αρκετές μελέτες (Abdelmalek et al., 2010a, Chung et al., 2014) έχουν δείξει ότι η υπερβολική κατανάλωση υδατανθράκων, κυρίως με τη μορφή αναψυκτικών και ζαχαρούχων ροφημάτων, πλούσιων σε φρουκτόζη ή σιρόπι καλαμποκιού με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη και σακχαρόζη, συνοδευόμενη με αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη, συσχετίζεται με υψηλότερες συγκεντρώσεις ενδοηπατικού λίπους, ηπατική στεάτωση και ίνωση (Marchesini et al., 2016). Η υπερτριγλυκεριδαιμία που προκαλείται από τους προσλαμβανόμενους υδατάνθρακες, καθώς και η αύξηση της de novo ηπατικής λιπογένεσης που προκαλείται από την απορρόφηση σακχαρόζης και φρουκτόζης, μπορεί να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της NAFLD (Moore et al., 2014). Επιπλέον, ενώ η γλυκόζη, μετά την απορρόφησή της από το έντερο, προσλαμβάνεται από τους περιφερικούς ιστούς, η φρουκτόζη παραμένει και μεταβολίζεται κυρίως από το ήπαρ, παρακάμπτοντας το σημείο ελέγχου της φωσφοφρουκτοκινάσης, παρέχοντας ενέργεια και λίπος, που δεν ρυθμίζεται από την ινσουλίνη (Moore et al., 2014, Griffin, 2015).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη η κατανάλωση καφέ συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, μια σχέση που φάνηκε να συνδέεται με μηχανισμούς φλεγμονής, καθώς περαιτέρω προσαρμογή του πολυπαραγοντικού μοντέλου ως προς τις συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης και TNF-α αποδυνάμωσε αυτή τη συσχέτιση. Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, η τακτική πρόσληψη καφεΐνης μέσα από την κατανάλωση καφέ συσχετίστηκε με μειωμένη ηπατική ίνωση σε ασθενείς με NAFLD (Shen et al., 2016a). Ο καφές έχει βρεθεί ότι μειώνει τις συγκεντρώσεις του TNF-α και αυξάνει την αντι-φλεγμονώδη αδιπονεκτίνη σε ζωικά μοντέλα NASH (Vitaglione et al., 2010). Επιπλέον, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του καφέ μπορεί να συνεισφέρουν στην προστατευτική του δράση κατά της NAFLD, μέσω μείωσης της συγκέντρωσης των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA προκαλώντας ηπατική ίνωση (Yesil and Yilmaz, 2013).

Η παρούσα μελέτη δε στερείται περιορισμών. Κυρίως, η συγχρονική της φύση δεν επιτρέπει των εντοπισμό αιτιολογικών σχέσεων ή την αναζήτηση υποκείμενων μηχανισμών. Δεδομένου ότι οι ασθενείς και οι υγιείς διέφεραν σημαντικά σε διάφορα κλινικά και βιοχημικά

χαρακτηριστικά, και παρόλο που αρκετοί παράγοντες επιλέχθηκαν προσεκτικά για τις προσαρμογές στην ανάλυση, η πιθανότητα συγχυτικής δράσης δε μπορεί να αποκλειστεί. Επιπλέον, η μελέτη ήταν επίσης ευάλωτη στο σφάλμα ανάκλησης. Τα FFQs, αν και εύκολα στην εφαρμογή τους και οικονομικά, απαιτούν ανάκληση της πληροφορίας ως προς την κατανάλωση τροφίμων κατά το προηγούμενο χρονικό διάστημα, γεγονός που αποτελεί μια δύσκολη γνωσιακή εργασία για τους ερωτηθέντες. Παράλληλα, δεν ποσοτικοποιούν τα τρόφιμα με μεγάλη ακρίβεια, ενώ ομαδοποιούν τα τρόφιμα σε κατηγορίες και κλειστούς καταλόγους που περιορίζουν τη συνήθη ποικιλομορφία της διαιτητικής πρόσληψης (EFSA, 2009). Επιπρόσθετα, η αξιολόγηση της βαρύτητας της NAFLD βασίστηκε ως επί το πλείστον στην ελαστογραφία αντί στη βιοψία ήπατος που αποδεδειγμένα θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς (Papagianni et al., 2015). Ωστόσο, επειδή η βιοψία ήπατος είναι μια παρεμβατική διαδικασία που εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους από τις εμπλεκόμενες πιθανές επιπλοκές, η χρήση των μη επεμβατικών μεθόδων για την αξιολόγηση της ηπατικής ακαμψίας και επομένως της ίνωσης, έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλής, ιδιαίτερα με τη χρήση των εμπορικά διαθέσιμων συσκευών ελαστογραφίας. Ειδικότερα, η χρήση ελαστογραφίας με τη μεθοδο «share-wave elastography» παρέχει βελτιωμένη διαγνωστική ακρίβεια σε σύγκριση με τις άλλες ελαστογραφικές μεθόδους, περιορίζοντας διάφορους φυσικούς περιορισμούς της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας παχυσαρκίας (Papagianni et al., 2015). Τέλος, η ανεπαρκής διαθεσιμότητα βιοψιών ήπατος δεν μας επέτρεψαν τη διερεύνηση μεταξύ των συνηθειών του τρόπου ζωής και του σταδίου της νόσου. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που συνδύασε την αξιολόγηση τριών διαφορετικών πτυχών του τρόπου ζωής, δηλαδή της διατροφής, της σωματικής δραστηριότητας και των συνηθειών ύπνου και διερεύνησε τη δυνητική συσχέτιση αυτών με την πιθανότητα παρουσίας NAFLD σε ένα δείγμα ενηλίκων ασθενών.

Εν κατακλείδι, το υψηλότερο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα, ενώ αντίστοιχα η κατανάλωση γλυκών με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, ανεξάρτητα από την κατάσταση του σωματικού βάρους και την ενεργειακή πρόσληψη. Η συνιστώμενη διάρκεια του ύπνου παρουσίασε οριακή αντίστροφη συσχέτιση με την παρουσία NAFLD, ενώ συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα αυξημένης ηπατικής

ακαμψίας σε ασθενείς με NAFLD. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να διερευνηθούν περαιτέρω ώστε να ενσωματωθούν σε μελλοντικές παρεμβάσεις αλλαγής του τρόπου ζωής με στόχο την πρόληψη της NAFLD.

Τα αποτελέσματα της 1^{ης} μελέτης δημοσιεύτηκαν με τη μορφή πρωτότυπης εργασίας στο περιοδικό Metabolic Syndrome and Related Disorders [Katsagoni CN, Georgoulis M, Papatheodoridis GV, Fragopoulou E, Ioannidou P, Papageorgiou M, Alexopoulou A, Papadopoulos N, Deutsh M, Kontogianni MD. Associations Between Lifestyle Characteristics and the Presence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case-Control Study. Metab Syndr Relat Disord. 2016 Nov 21. [Epub ahead of print]].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

2η ΜΕΛΕΤΗ: Συσχέτιση του βαθμού υιοθέτησης προτύπων του τρόπου ζωής με την ηπατική ακαμψία και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε δείγμα ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος.

Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 1, η NAFLD θεωρείται ως η ηπατική εκδήλωση του ΜΣ (Marchesini et al., 2001) με την αντίσταση στην ινσουλίνη να αποτελεί τον κύριο παθογενετικό μηχανισμό. Προκαλείται από τη συσσώρευση λίπους (>5% του συνολικού βάρους του ήπατος), η οποία δεν οφείλεται στην υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ ή άλλες αιτίες στεάτωσης, ενώ σήμερα αποτελεί την πιο κοινή αιτία χρόνιας ηπατικής νόσου στις δυτικές χώρες (Ratziu et al., 2010), ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης τάσης της παχυσαρκίας (Masarone et al., 2014).

Διάφορες πτυχές του τρόπου ζωής μπορούν να επηρεάσουν τον κίνδυνο ή την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD, όπως το θετικό ισοζύγιο ενέργειας, οι ανθυγιεινές διατροφικές επιλογές και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας (EASL–EASD–EASO, 2016). Επιπλέον, διάφορες επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν ότι το κάπνισμα συσχετίζεται με την εμφάνιση NAFLD (Zein et al., 2011a, Liu et al., 2013), ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, ιδίως όσον αφορά στο ρόλο του καπνίσματος στην εξέλιξη της νόσου (Yilmaz et al., 2010, Zein et al., 2011a). Αναφορικά με τις διατροφικές συνήθειες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ολοένα και περισσότερα δεδομένα αναδεικνύουν την επίδραση διαφόρων μεμονωμένων ομάδων τροφίμων στον κίνδυνο ή την πιθανότητα εμφάνισης της NAFLD (Marchesini et al., 2016). Ωστόσο, λιγοστά δεδομένα φαίνεται να υπάρχουν σχετικά τον ρόλο της προσκόλλησης σε συγκεκριμένα διατροφικά πρότυπα στην εμφάνιση/παρουσία της νόσου. Τα αποτελέσματα από *a-posteriori* αναλύσεις δείχνουν ότι η υψηλή προσκόλληση σε ένα διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε υδατάνθρακες και ζαχαρούχα ροφήματα συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (Jia et al., 2015), ενώ, αντίθετα, η προσκόλληση σε ένα υγιεινό πρότυπο, πλούσιο σε φρούτα, λαχανικά και άλλα τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας

σε διαιτητικές ίνες συσχετίζεται αντίστροφα με την παρουσία της νόσου (Yang et al., 2015, Adriano et al., 2016). Ομοίως, δεδομένα κυρίως από *a-priori* αναλύσεις δείχνουν ότι η υψηλή προσκόλληση στη μεσογειακή δίαιτα συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας ΜΣ (Georgoulis et al., 2015) σε άτομα με NAFLD, αλλά και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας στεατοηπατίτιδας (Kontogianni et al., 2014) και επιπλέον μείωση των επιπέδων ινσουλίνης και αύξηση της ινσουλινοευασθησίας και βελτίωση του ενδοηπατικού λίπους (Ryan et al., 2013).

Επιπλέον, άλλα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής, όπως το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και οι συνήθειες ύπνου, έχουν επίσης προταθεί ως παράγοντες που επηρεάζουν τον κίνδυνο ή τη βαρύτητα της NAFLD. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με NAFLD φαίνεται να αφιερώνουν περισσότερο χρόνο σε καθιστικές δραστηριότητες, ενώ είναι λιγότερο δραστήριοι συγκριτικά με υγιή άτομα (Ryu et al., 2015, Hallsworth et al., 2015b). Επιπλέον, ενώ οι διαταραχές του ύπνου έχουν συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα για παχυσαρκία (Nielsen et al., 2011), αντίσταση στην ινσουλίνη (Mesarwi et al., 2013) και καρδιομεταβολικά προβλήματα (Badran et al., 2015), οι μελέτες που εξετάζουν την επίδραση των συνηθειών του ύπνου στην παρουσία NALFD είναι περιορισμένες, συνδέοντας τόσο τη διάρκεια όσο και την ποιότητα του ύπνου με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας της νόσου (Kim et al., 2013, Bernsmeier et al., 2015).

Η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PCA) είναι μια πολυπαραγοντική στατιστική μέθοδος που αποσκοπεί στη δημιουργία νέων μεταβλητών (δηλαδή συνιστωσών), χρησιμοποιώντας τις πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών του δείγματος, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διακύμανση των υπό ανάλυση μεταβλητών (Holand, 2008). Μέσω της ομαδοποίησης των μεταβλητών, αντί της ανεξάρτητης ανάλυσής τους, δημιουργείται ένα σύνολο συνιστωσών, που μπορούν να συσχετιστούν με τα διάφορα χαρακτηριστικά του δείγματος της μελέτης (Holand, 2008). Συνεπώς, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ομαδοποίηση των διαφόρων συμπεριφορών του τρόπου ζωής, και συγκεκριμένα των διαιτητικών συνηθειών, των συνηθειών άσκησης και ύπνου, με σκοπό τη δημιουργία προτύπων τρόπου ζωής, καθώς και η διερεύνηση των πιθανών συσχετίσεών τους με κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με NAFLD.

Μεθοδολογία

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 136 ασθενείς (18–72 ετών) με πρόσφατη διάγνωση NAFLD (εντός 6μήνου). Οι ασθενείς επισκέφτηκαν ένα από τα δύο συνεργαζόμενα εξωτερικά ηπατολογικά ιατρεία (α) τη Γαστρεντερολογική κλινική της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό» και β) τη 2^{η} Παθολογική Κλινική της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο»). Η συλλογή του δείγματος ξεκίνησε τον Μάιο του 2013 και ολοκληρώθηκε τον Δεκέμβριο του 2015.

Ο ορισμός της NAFLD, τα κριτήρια εισόδου και αποκλεισμού στη μελέτη, καθώς και η αξιολόγηση του τρόπου ζωής, των ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και φλεγμονωδών δεικτών ήταν όμοια με εκείνα της μελέτης 1 (***Μελέτη 1: σελ. 75-80***).

Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτες ή σχετικές συχνότητες. Ο έλεγχος της κανονικότητας των μεταβλητών πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας Shapiro-Wilk και γραφικά μέσω ιστογραμμάτων. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων τροφίμων έγιναν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία t του Student.

Τα πρότυπα τρόπου ζωής ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας την PCA (Cureton E, 1983). Οι ομάδες τροφίμων και τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση φαίνονται στον ***Πίνακα 5.2***. Κατά την ανάλυση εφαρμόστηκαν το κριτήριο Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), για την εξασφάλιση ενδοσυσχέτισης μεταξύ των αναλυόμενων μεταβλητών και των προς ανάλυση συνιστωσών (προτύπων), και η επιλογή Varimax, ώστε να αυξηθεί η εκπροσώπηση της κάθε αναλυόμενης μεταβλητής σε κάθε πρότυπο. Η επιλογή των συνιστωσών βασίστηκε στο ποσοστό συνολικής διακύμανσης που ερμηνευόταν από τις συνιστώσες. Ειδικότερα, επιλέχθηκαν 8 συνιστώσες που εξηγούσαν το 67% της αρχικής διακύμανσης των χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής που χρησιμοποιήθηκαν. Για την ερμηνεία

των συνιστωσών, χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι μεταβλητές που παρουσίαζαν ισχυρούς συντελεστές συσχετίσεις, και συγκεκριμένα > 0,40.

Στη συνέχεια, τα πρότυπα του τρόπου ζωής που επιλέχθηκαν, χωρίστηκαν σε τριτημόρια (χαμηλή, μέση και υψηλή προσκόλληση σε κάθε τριτημόριο), ανάλογα με τα σκορ των συντελεστών συσχέτισής τους, γεγονός που αντικατοπτρίζει το βαθμό προσκόλλησης σε κάθε πρότυπο. Για περαιτέρω αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των τριτημορίων των προτύπων και των βιοχημικών χαρακτηριστικών των ασθενών με NAFLD χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο *Jonckheere-Terpstra* (Ali, 2015). Η ανάλυση της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση όλων των σχετικών συσχετίσεων μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη, των δεικτών ηπατικής λειτουργίας (δηλαδή ALT, AST, GGT και ηπατικής ακαμψίας) και των διαφόρων προτύπων του τρόπου ζωής, όπως προέκυψαν από τη μέθοδο PCA, μετά από διόρθωση για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες, όπως είναι η ηλικία, το φύλο, ο ΔΜΣ, η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη, το κάπνισμα, τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α. Η λογαριθμοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών, δηλαδή των HOMA-IR και LSM, έγινε για την επίτευξη κανονικής κατανομής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται έπειτα από την απολογαριθμοποίηση τους.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%, και όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 21.0, SPSS 2012, Chicago, USA).

Αποτελέσματα

Τα χαρακτηριστικά του δείγματος της μελέτης φαίνονται στον ***Πίνακα 5.1***. Η πλειονότητα των ασθενών ήταν άντρες, παχύσαρκοι με αυξημένη ΠΜ. Μόνο το 63,2% των ασθενών συνήθιζε να κοιμάται τις συνιστώμενες ώρες (δηλαδή ≥7 και ≤9 ώρες/ ημέρα). Όσον αφορά στις ομάδες τροφίμων, οι ασθενείς κατανάλωναν περισσότερες μερίδες επεξεργασμένων δημητριακών από ότι ελάχιστα επεξεργασμένων (P<0,001) και περισσότερο

κόκκινο κρέας από ότι πουλερικά ή ψαρικά (P<0,001). Αναφορικά με τα ηπατικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως ήταν αναμενόμενο, είχαν αυξημένα ηπατικά ένζυμα.

Πίνακας 5.1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά δείγματος της μελέτης

Μεταβλητές	**Συνολικό δείγμα (n=136)**
Ηλικία (έτη)	47,0 ± 11,6
Φύλο (άντρες), n (%)	91, (66,9)
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m^2)	30,6 ± 4,86
Αυξημένη περιφέρεια μέσης[a], n (%)	92 (67,6)
Οικογενειακή κατάσταση *Παντρεμένοι, n (%)*	95, (69,9)
Κάπνισμα (ναι), n (%)	34, (25)
Συνήθειες φυσικής δραστηριότητας	
Συνολικά MET-min/day	2017 ± 304
Ώρες τηλεθέασης/ημέρα	2,53 ± 1,6
Συνήθειες ύπνου	
Σύντομης διάρκειας σιέστα (ναι)[b], n (%)	105, (77,2)
Συνιστώμενη διάρκεια ύπνου (ναι) [c], n (%)	86, (63,2)
Διαιτητικές συνήθειες	
Ενεργειακή πρόσληψη (Kcal/ημ)	1874 ± 622
Πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα (μερ./ημ)	1,97 ± 2,16
Ημιάπαχα γαλακτοκομικά προϊόντα (μερ./ημ)	1,31 ± 1,61
Επεξεργασμένα δημητριακά (μερ./ημ)	5,71 ± 4,21
Ελάχιστα επεξεργασμένα δημητριακά (μερ./ημ)	0,84 ± 1,24
Κόκκινο κρέας και επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος (μερ./ημ)	1,79 ± 1,21

Πουλερικά (μερ./ημ)	0,62 ± 0,44
Ψάρια (μερ./ημ)	0,62 ± 0,49
Όσπρια (μερ./ημ)	0,51 ± 0,39
Λαχανικά (μερ./ημ)	3,12 ± 2,58
Φρούτα (μερ./ημ)	2,03 ± 1,81
Πατάτες (μερ./ημ)	0,66 ± 0,77
Γλυκά (μερ./ημ)	1,56 ± 1,27
Αναψυκτικά (μερ./ημ)	0,13 ± 0,26
Ξηροί καρποί (μερ./ημ)	0,37 ± 0,68
Ελαιόλαδο (μερ./ημ)	3,0 ± 2,1
Κατανάλωση καφέ (φορές/ημ)	1,58 ± 1,11
Βιοχημικά χαρακτηριστικά	
Γλυκόζη (mg/dL)	91,0 ± 11,5
Ινσουλίνη (μIU/mL)	15,6 ± 9,5
HOMA-IR	3,6±2,5
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	204±40,8
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	134±61
HDL-C (mg/dL)	37,4±18,1
LDL-C (mg/dl)	140±40,8
ALT (IU/L)	68,5±42,0
AST (IU/L)	38,7±19,4
GGT (IU/L)	98,8±105
TNF-α (pg/mL)	4,7±3,7
Αδιπονεκτίνη (μg/mL)	6,5±4,8

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± SD ή απόλυτες (n) & σχετικές συχνότητες (%).

ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, **AST:** ασπαρτική τρανσαμινάση, **GGT:** γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάση, **HDL-C:** χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **HOMA-IR**: Ομοιοστατικό μοντέλο

αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη; **LDL-C:** χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **MET-min**: μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό, **NAFLD**: μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, **μερ./ημ**: μερίδες ανά ημέρα σύμφωνα με τις διατροφικές συστάσεις για Έλληνες πολίτες, TNF-α: παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α. [a] >102 εκ. για άντρες & > 88 εκ. για γυναίκες, [b]Σιέστα ή ανάπαυση ≤1 ώρες/ ημέρα, [c] ≥7 και ≤9ώρες/ ημέρα.

Από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες, προέκυψαν 8 πρότυπα τρόπου ζωής, εξηγώντας το 67% της συνολικής διακύμανσης των μεταβλητών που εξετάστηκαν [***Πίνακας 5.2***: με έντονα γράμματα περιγράφονται οι μεταβλητές με το μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης (> 0,40) μέσα σε κάθε πρότυπο]. Το κριτήριο ΚΜΟ ήταν 0,571, γεγονός που σημαίνει ότι υπήρχαν ισχυρές ενδοσυσχετίσεις μεταξύ των αναλυόμενων μεταβλητών. Οι αντίστοιχες μεταβλητές που χαρακτηρίζουν κάθε πρότυπο περιγράφονται παρακάτω: 1 = πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα, επεξεργασμένα δημητριακά, πατάτες, κόκκινο κρέας, ώρες τηλεθέασης/ημέρα, 2 = φρούτα, λαχανικά, καφές, ξηροί καρποί, 3 = ημίαπαχα γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, ψάρια, συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, 4 = όσπρια, πουλερικά, μη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, 5 = συνολικά MET-min/ημέρα, σύντομη σιέστα, 6= ελάχιστα επεξεργασμένα δημητριακά, καφές, 7 = γλυκά, 8 = κάπνισμα.

Από τα διάφορα πρότυπα τρόπου ζωής που προέκυψαν, μόνο τα πρότυπα 1 και 3 συσχετίστηκαν σημαντικά με τα χαρακτηριστικά των ασθενών με NAFLD, όπως φαίνεται στον ***Πίνακα 5.3***. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη ήταν η προσκόλληση στο πρότυπο 1, τόσο μεγαλύτερη τάση παρατηρήθηκε για μείωση των επιπέδων HDL-C και αδιπονεκτίνης, και τόσο μεγαλύτερη τάση για αύξηση της ALT. Προς έκπληξη, υψηλότερη προσκόλληση σε αυτό το πρότυπο, συνδέθηκε με αρνητική τάση στα επίπεδα GGT (P=0,019). Αντίθετα, υψηλότερη προσκόλληση στο πρότυπο 3 συνδέθηκε με μεγαλύτερη τάση μείωσης των επιπέδων ινσουλίνης και LSM (όλα τα P≤0,05).

Πίνακας 5.2: Συντελεστές προτύπων τρόπου ζωής που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες [a].

	Συνιστώσες							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Πλήρη γαλακτοκομικά	**0,819**	0,113	0,001	-0,040	0,045	-0,041	-0,170	0,036
Ημιάπαχα γαλακτοκομικά	-0,199	0,231	**0,771**	-0,040	-0,068	-0,042	0,150	-0,148
Ελάχιστα επεξεργασμένα δημητριακά	-0,096	0,081	0,181	0,179	0,029	**0,818**	-0,178	-0,059
Επεξεργασμένα δημητριακά	**0,887**	0,118	-0,032	-0,054	0,035	0,019	-0,108	-0,022
Φρούτα	-0,031	**0,791**	0,173	0,177	-0,009	-0,013	-0,077	-0,211
Λαχανικά	0,325	**0,428**	**0,513**	0,230	-0,163	-0,066	-0,246	-0,075
Πατάτες	**0,781**	-0,040	-0,008	0,120	-0,100	0,004	0,046	0,026
Όσπρια	0,036	0,126	-0,010	**0,681**	-0,023	0,061	-0,078	-0,102
Ψάρια	0,077	-0,168	**0,530**	0,173	-0,117	0,316	0,112	0,044
Κόκκινο κρέας	**0,644**	-0,104	0,099	0,315	0,124	0,078	0,194	0,014
Πουλερικά	0,159	-0,044	0,101	**0,732**	0,086	0,060	0,068	0,211
Καφές	0,242	**0,463**	-0,151	-0,255	-0,055	**0,553**	0,265	0,093
Γλυκά	-0,060	0,065	0,068	-0,002	0,035	-0,097	**0,896**	-0,036
Ξηροί καρποί	0,064	**0,731**	-0,034	-0,021	0,035	0,113	0,104	0,141
Συνολικά MET-min/ημέρα	0,059	0,116	0,015	0,054	**0,827**	-0,210	-0,025	0,185
Συνιστώμενη διάρκεια ύπνου [b]	0,147	-0,119	**0,483**	**-0,421**	0,273	0,183	-0,175	0,241
Σιέστα[c]	-0,012	-0,111	-0,228	-0,032	**0,666**	0,218	0,101	-0,234
Ώρες τηλεθέασης/ημέρα	**0,410**	0,055	-0,112	-0,039	-0,320	-0,115	-0,324	0,068
Κάπνισμα	0,017	-0,012	-0,058	0,034	-0,010	-0,021	-0,041	**0,902**
Ερμηνεία Διακύμανσης (%)	**16,5**	**11,0**	**7,9**	**7,6**	**6,9**	**5,9**	**5,7**	**5,4**

[a]Τα σκορ συντελεστών είναι όμοια των συντελεστών συσχέτισης. Με έντονα γράμματα περιγράφονται οι μεταβλητές με το μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης (> 0,40) μέσα σε κάθε πρότυπο.

[b] ≥7 και ≤9 ώρες/ ημέρα, [c]Σιέστα ή ανάπαυση ≤1ώρα/ ημέρα. **MET-min:** μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό, **NAFLD:** μη-αλκοολική λιπώδη νόσος του ήπατος. **Περιγραφή συνιστωσών:** 1 = πλήρη γαλακτοκομικά, επεξεργασμένα δημητριακά, πατάτες, κόκκινο κρέας, τηλεθέαση ανά ημέρα, 2 = φρούτα, λαχανικά, καφές, ξηροί καρποί, 3 = ημιάπαχα γαλακτοκομικά, λαχανικά, ψάρια, συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, 4 = όσπρια, πουλερικά, μειωμένη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, 5 = συνολικά MET-min/ημέρα, σύντομη διάρκεια ύπνου, 6 = ελάχιστα επεξεργασμένα δημητριακά, καφές, 7 = γλυκά, 8 = κάπνισμα.

Πίνακας 5.3: Τάσεις συσχέτισης μεταξύ των τριτημορίων των προτύπων τρόπου ζωής 1 και 3 και των χαρακτηριστικών των ασθενών με NAFLD.

	Πρότυπο τρόπου ζωής 1: Ανθυγιεινή δίαιτα-καθιστική ζωή			P value[a]	**Πρότυπο τρόπου ζωής 3**: Υγιεινή δίαιτα-συνιστώμενη διάρκεια ύπνου			P value[a]
	Προσκόλληση				**Προσκόλληση**			
	Χαμηλή	**Μέτρια**	**Υψηλή**		**Χαμηλή**	**Μέτρια**	**Υψηλή**	
Ηλικία (έτη)	49,2±11,2	49,1±11,6	42,8±11,2	**0,01**	45,3±11,7	47,6±10,9	48,1±12,2	0,20
Φύλο, άντρες (n,%)	27, (58,7)	26, (57,8)	38, (84,4)	**0,01**	31,(68,9)	30, (66,7)	30, (65,2)	0,93
ΔΜΣ (kg/m^2)	31,0±5,0	31,0±5,4	29,9±4,1	0,40	30,1±4,50	31,3±5,59	30,5±4,46	0,73
ΠΜ (εκ.)	103±12,0	104±12,1	104±9,6	0,99	102±10,4	105±12,9	105±10,3	0,51
Γλυκόζη (mg/dl)	88,6±9,6	92,8±11,1	91,7±13,5	0,08	91,2±12,9	90,4±11,7	91,5±10,1	0,28
Ινσουλίνη (μIU/ml)	13,9±7,6	15,8±10,7	17,1±9,84	0,08	16,2±8,65	17,6±11,9	12,9±6,68	**0,05**
HOMA-IR	2,9±1,8	3,7±2,8	4,0±2,7	0,06	3,6±2,4	4,1±3,1	2,9±1,8	0,11
TCHOL (mg/dl)	205±41,8	208±36,5	201± 44,5	0,63	201±47,9	212±36,6	201±36,7	0,95
LDL-C (mg/dl)	136±41,5	139±39,7	145± 41,6	0,33	137±46,2	146±36,6	138±39,2	0,94
HDL-C (mg/dl)	41,9±16,3	42,5±20,3	27,4±13,0	**<0,001**	36,3±20,0	37,9±16,3	38,0±18,0	0,33
TG (mg/dl)	132±68,9	129±55,2	142±58,9	0,24	138±54,9	141±76,7	124±48,7	0,31

ALT (IU/L)	65,2±40,9	59,8±32,7	80,5±48,9	**0,03**	73,6±42,1	66,0±32,5	65,8±50,1	0,17
AST (IU/L)	36,4±14,8	37,0±20,3	42,9±22,0	0,21	40,6±20,1	39,8±20,4	35,8±17,6	0,29
GGT (IU/L)	110±98,9	111±129	75,0±80,5	**0,02**	101±133	105±90,9	90,8±91,7	0,86
Αδιπονεκτίνη (μg/ml)	7,31±5,27	7,55±6,01	4,99±2,97	**0,05**	5,99±3,41	6,56±5,16	6,74±5,67	0,88
TNF-α (pg/ml)	4,43±4,50	4,60±2,94	4,96±3,63	0,18	4,94±3,06	4,51±3,78	4,64±4,16	0,36
Ηπατική ακαμψία (kPa)	10,06±12,75	9,09±6,29	8,10±5,72	0,59	10,0±7,66	9,87±12,7	7,41± 5,22	**0,04**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± SD.

[α]Οι τιμές P-value αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές τάσεις μεταξύ των τριτημορίων των προτύπων τρόπου ζωής 1 και 3 και των χαρακτηριστικών των ασθενών με NAFLD, όπως προέκυψαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό κριτήριο Jonckheere-Terpstra.

ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, **AST:** ασπαρτική τρανσαμινάση, **ΔΜΣ:** δείκτης μάζας σώματος, **GGT:** γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάση**, HDL-C:** χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **HOMA-IR:** Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη, **LDL-C:** χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **NAFLD:** μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, **TNF-α:** παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α, **TCHOL:** ολική χοληστερόλη, **ΠΜ:** περιφέρεια μέσης.

Πρότυπο τρόπου ζωής 1: Πλήρη γαλακτοκομικά, επεξεργασμένα δημητριακά, πατάτες, κόκκινο κρέας, ώρες τηλεθέασης/ημέρα
Πρότυπο τρόπου ζωής 3: Ημιάπαχα γαλακτοκομικά, λαχανικά, ψάρια, συνιστώμενη διάρκεια ύπνου

Περαιτέρω διερεύνηση των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των δύο προαναφερθέντων προτύπων του τρόπου ζωής και των επιπέδων ινσουλίνης, HOMA-IR, HDL-C, αδιπονεκτίνης, των ηπατικών ενζύμων (ALT και GGT) και της ηπατικής ακαμψίας, πραγματοποιήθηκε μέσω πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, λαμβάνοντας υπόψη διάφορους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο, ο ΔΜΣ, η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη, το κάπνισμα, καθώς και τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α (***Πίνακας 5.4***). Το πρότυπο 3, χαρακτηριζόμενο από υγιεινές διατροφικές επιλογές και συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, συσχετίστηκε αρνητικά με τον δείκτη HOMA-IR (τυποποιημένος συντελεστής β=-1,66, P=0,008) και LSM (τυποποιημένος συντελεστής β=-1,62, P=0,05), μετά από έλεγχο των προαναφερθέντων συγχυτικών παραγόντων. Αντίθετα, το πρότυπο 1, χαρακτηριζόμενο από ανθυγιεινές διατροφικές επιλογές και υψηλή τηλεθέαση, ως μία έκφανση του καθιστικού τρόπου ζωής, συσχετίστηκε θετικά με τον δείκτη HOMA-IR (τυποποιημένος συντελεστής β=1,66, P=0,005), ωστόσο η συσχέτιση αυτή αποδυναμώθηκε λαμβάνοντας υπόψη το επίπεδο φλεγμονής, δηλαδή διορθώνοντας ως προς τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α (P=0,14) (***Πίνακας 5.4, Μοντέλο 3***). Τα επίπεδα αδιπονεκτίνης συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη σε αυτό το μοντέλο (τυποποιημένος συντελεστής β=-2,39, P <0,001).

Επιπλέον, μία αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων HDL-C (τυποποιημένος συντελεστής β= -2,29, P<0,001) και του προτύπου 1, μετά από διόρθωση ως προς την ηλικία, το φύλο, τον ΔΜΣ, την ενεργειακή πρόσληψη, το κάπνισμα, καθώς και τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α. Ωστόσο, η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του προτύπου 1 και της αδιπονεκτίνης χάθηκε, όταν λήφθηκε υπόψη η ηλικία και το φύλο, ενώ για την GGT μετά από έλεγχο μόνο για την ηλικία. Καμία άλλη συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των υπό διερεύνηση χαρακτηριστικών του δείγματος και των δύο αυτών ή των υπόλοιπων προτύπων που προέκυψαν από την ανάλυση PCA.

Πίνακας 5.4: Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των προτύπων τρόπου ζωής 1 και 3 με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ηπατική ακαμψία.

Πρότυπα τρόπου ζωής	Εξαρτημένη μεταβλητή: HOMA-IR‡		Εξαρτημένη μεταβλητή: LSM‡	
	Τυποποιημένοι συντελεστές β†	P*	Τυποποιημένοι συντελεστές β†	P*
Μοντέλο 1[a]				
Πρότυπο 1	1,62	0,005	1,23	0,27
Πρότυπο 3	-1,17	0,02	-1,54	0,02
Μοντέλο 2[b]				
Πρότυπο 1	1,66	0,005	1,23	0,30
Πρότυπο 3	-1,48	0,02	-1,48	0,05
Μοντέλο 3[c]				
Πρότυπο 1	1,31	0,14	1,28	0,34
Πρότυπο 3	-1,66	0,008	-1,62	0,05

[a]Μοντέλο 1: διόρθωση για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ.
[b]Μοντέλο 2: διόρθωση για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, ενεργειακή πρόσληψη, κάπνισμα.
[c]Μοντέλο 3: διόρθωση για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, ενεργειακή πρόσληψη, κάπνισμα, επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α.
*P-value όπως προέκυψε από τα μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης παρουσιάζοντας τη σχέση μεταξύ των προτύπων τρόπου ζωής και του HOMA-IR ή LSM, P≤0,05.
†τυποποιημένοι συντελεστές β (standardized beta coefficients) μετά την απολογαριθμοποίηση τους.
‡ Λογαριθμοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών έγινε για την επίτευξη κανονικότητας.
Πρότυπο τρόπου ζωής 1: Πλήρη γαλακτοκομικά, επεξεργασμένα δημητριακά, πατάτες, κόκκινο κρέας, ώρες τηλεθέασης/ ημέρα.
Πρότυπο τρόπου ζωής 3: Ημιάπαχα γαλακτοκομικά, λαχανικά, ψάρια, συνιστώμενη διάρκεια ύπνου.
ΔΜΣ: δείκτης μάζας σώματος, **HOMA-IR:** Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη, **LSM:** αξιόπιστες μετρήσεις ηπατικής ακαμψίας, **NAFLD:** μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος.

Συζήτηση

Στη παρούσα συγχρονική μελέτη, διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ διαφόρων προτύπων του τρόπου ζωής και των κλινικών και εργαστηριακών χαρακτηριστικών ασθενών με NAFLD. Χρησιμοποιώντας την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες, το πρότυπο 3, χαρακτηριζόμενο από υγιεινές διατροφικές επιλογές (δηλαδή κατανάλωση ημιάπαχων γαλακτοκομικών προϊόντων, λαχανικών, ψαριών και προσκόλληση στη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου) συσχετίστηκε αρνητικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ηπατική ακαμψία, ανεξάρτητα από τον ΔΜΣ και την ενεργειακή πρόσληψη, και λαμβάνοντας υπόψη και άλλους συγχυτικούς παράγοντες.

A-posteriori δεδομένα συσχέτισης μεταξύ προτύπων τρόπου ζωής και της αντίστασης στην ινσουλίνη ή της ηπατικής ακαμψίας, σε ασθενείς με NAFLD, δε φαίνεται να έχουν μέχρι σήμερα δημοσιευθεί. Στη συγχρονική μελέτη των *Adriano* και *συν.* η προσκόλληση σε ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο, πλούσιο σε λαχανικά, όσπρια, λευκό κρέας, ελαιόλαδο και μαργαρίνη, συσχετίστηκε με μειωμένη παρουσία NAFLD σε ηλικιωμένους (Adriano et al., 2016). Επιπλέον, σε μια συγχρονική μελέτη σε Κινεζικό πληθυσμό (Yang et al., 2015), η προσκόλληση σε ένα διατροφικό πρότυπο με υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες από λαχανικά, φασόλια, μανιτάρια, φύκια, συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης NAFLD. Άλλες μελέτες, χρησιμοποιώντας *a-priori* ανάλυση έχουν συσχετίσει τη μεγαλύτερη προσκόλληση στη μεσογειακή δίαιτα με μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης και αντίστασης στην ινσουλίνη, καθώς και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NASH (Kontogianni et al., 2014) και ΜΣ (Georgoulis et al., 2015) σε δείγμα ατόμων με NAFLD. Γενικότερα, η προσκόλληση σε ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη σε δείγματα μεσήλικων γυναικών, νέων ενηλίκων και ηλικιωμένων ατόμων (Anderson et al., 2012, Esmaillzadeh et al., 2007, Deshmukh-Taskar et al., 2009). Επιπλέον, στο πρότυπο 3, όλα τα τρόφιμα που περιλαμβάνονται (δηλαδή ημιάπαχα γαλακτοκομικά, λαχανικά και ψάρια) χαρακτηρίζονται από υψηλή αντι-φλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση (Sears, 2015) και έχουν στο παρελθόν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη (Rideout et

al., 2013, Torris et al., 2016) και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (Zelber-Sagi et al., 2007, Finelli and Tarantino, 2012).

Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει ότι ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο σε συνδυασμό με την προσκόλληση στη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου (δηλαδή ≥7 και ≤9ώρες / ημέρα) (πρότυπο 3) μπορεί να συνδέεται με ευεργετικές επιδράσεις σε σημαντικά χαρακτηριστικά των ασθενών με NAFLD, ανεξάρτητα από τον ΔΜΣ και την ενεργειακή πρόσληψη. Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση των συνηθειών του ύπνου στην εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD είναι περιορισμένα, πόσο μάλλον η συνεργιστική δράση τους με τη διατροφή. Μια πρόσφατη συγχρονική μελέτη (Kim et al., 2013) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η σύντομη διάρκεια ύπνου (5 ώρες έναντι >7 ώρες) συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης NAFLD, αλλά σύμφωνα με τους συγγραφείς η συσχέτιση αυτή διατηρήθηκε μόνο στους άνδρες, όταν λήφθηκε υπόψη ο ΔΜΣ. Επιπλέον, στη μελέτη των *Imaizumi* και *συν*. η μικρή διάρκεια ύπνου (<6 ώρες έναντι 6 έως ≤7 ώρες) συνδέθηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD μόνο στις γυναίκες και η συσχέτιση αυτή χάθηκε μετά από διόρθωση ως προς το ΔΜΣ (Imaizumi et al., 2015). Η υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας έχει επίσης συσχετιστεί με αντίσταση στην ινσουλίνη και ιστολογικά χαρακτηριστικά της NAFLD (Bernsmeier et al., 2015). Η μείωση της συνήθους διάρκειας ύπνου μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πρόσληψη τροφής μέσω αύξησης της έκκρισης των ορεξιογόνων ορμονών λεπτίνης και της γκρελίνης (Copinschi et al., 2014), καθώς και μέσω αύξησης της προτίμησης για τροφές υψηλού ενεργειακού περιεχομένου και απλών υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των γλυκών, αλμυρών σνακ και επεξεργασμένων τρόφιμων (Dashti et al., 2015). Η στέρηση ύπνου φαίνεται να μοιράζεται κοινά μεταβολικά μονοπάτια με το σύστημα του στρες, ενεργοποιώντας τον άξονα υποθαλάμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA) (Hirotsu et al., 2015). Τέλος, η υπνηλία κατά την διάρκεια της ημέρας μειώνει τη δυνατότητα συμμετοχής των ατόμων σε αθλητικές δραστηριότητες, ευνοώντας συμπεριφορές υιοθέτησης καθιστικής ζωής (Zimberg et al., 2012).

Στην παρούσα μελέτη, το πρότυπο τρόπου ζωής 1, χαρακτηριζόμενο από ανθυγιεινές διατροφικές επιλογές (δηλαδή από υψηλή κατανάλωση πλήρων σε λιπαρά γαλακτοκομικών προϊόντων, επεξεργασμένων δημητριακών, πατατών και κόκκινου κρέατος) και υψηλή

τηλεθέαση, ως μία έκφανση του καθιστικού τρόπου ζωής, συσχετίστηκε θετικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή έγινε οριακά μη στατιστικά σημαντική, όταν λήφθηκε υπόψη το επίπεδο φλεγμονής (δηλαδή τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και TNF-α). Παράλληλα, τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ήταν αντιστρόφως ανάλογα με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε αυτό το μοντέλο. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει, ότι η αντίστροφη σχέση που βρέθηκε αρχικά μεταξύ του προτύπου 1 και της αντίστασης στην ινσουλίνη, αντανακλά το υψηλό επίπεδο φλεγμονής των ασθενών αυτών, δεδομένου ότι οι ασθενείς με την υψηλότερη προσκόλληση στο πρότυπο 1 είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης και έτειναν να έχουν υψηλότερα επίπεδα TNF-α ***(Πίνακας 5.3).*** Πράγματι, η υψηλή κατανάλωση ολόπαχων γαλακτοκομικών, επεξεργασμένων δημητριακών προϊόντων, πατάτας και κόκκινου κρέατος έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα φλεγμονής (Kontogianni et al., 2006, Azadbakht and Esmaillzadeh, 2009, Ley et al., 2014b, Buyken et al., 2010), ενώ και η αυξημένη διάρκεια καθιστικών δραστηριοτήτων έχει συσχετιστεί με δυσμενέστερο φλεγμονώδες προφίλ (Leon-Latre et al., 2014, Henson et al., 2013). Επιπλέον, η αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων αδιπονεκτίνης και αντίστασης στην ινσουλίνη, που αναδείχθηκε στο μοντέλο 3 της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, ήταν αναμενόμενη δεδομένης της παθοφυσιολογίας της NAFLD. Σύμφωνα με την υπάρχουσα γνώση, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η συσσώρευση λιπιδίων αποτελούν τα πρώτα «χτυπήματα» για τη δημιουργία της NAFLD (Buzzetti et al., 2016), ενώ η ανισορροπία αδιποκινών (π.χ. χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης και υψηλές TNF-α) μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και NAFLD (Polyzos et al., 2010b), παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων, καθώς και στον έλεγχο της φλεγμονής στους ινσουλινοευαίσθητους ιστούς (Polyzos et al., 2010a).

Όσον αφορά στις συνήθειες καπνίσματος, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με χαρακτηριστικά της νόσου. Δεδομένα από πειραματόζωα προτείνουν ότι το κάπνισμα επιδεινώνει την ηπατοκυτταρική απόπτωση μέσω ενίσχυσης του οξειδωτικού στρες, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικού τραύματος (Azzalini et al., 2010). Εντούτοις, τα δεδομένα αναφορικά με την επίδραση του ενεργητικού ή του παθητικού

καπνίσματος στην εμφάνιση και την εξέλιξη της NAFLD είναι αντικρουόμενα και περισσότερες μελέτες απαιτούνται προκειμένου να ξεκαθαρίσει η σχέση αυτή (Zein et al., 2011a, Liu et al., 2013, Yilmaz et al., 2010).

Η παρούσα μελέτη έχει κάποιους περιορισμούς. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μία συγχρονική μελέτη και συνεπώς δεν είναι κατάλληλη για τον έλεγχο της σχέσης αίτιου-αιτιατού. Επιπλέον, η ανάλυση PCA εξαρτάται από διάφορες υποκειμενικές αποφάσεις που πρέπει να ληφθούν κατά την εξαγωγή των συνιστωσών. Τέλος, ο πληθυσμός που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη έχει συγκεκριμένο γενετικό και πολιτιστικό προφίλ, γι΄αυτό και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, πρέπει να επιβεβαιωθούν και σε άλλους πληθυσμούς. Παρόλα αυτά, η ομαδοποίηση των υπό ανάλυση πτυχών του τρόπου ζωής, αντί της μεμονωμένης ανάλυσης τους, οδήγησε στην αναγνώριση συγκεκριμένων προτύπων τρόπου ζωής που συσχετίστηκαν με σημαντικά χαρακτηριστικά της NAFLD, και θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν στην πρόληψη την νόσου.

Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει ότι η υψηλή προσκόλληση σε ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο, πλούσιο σε γαλακτοκομικά χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια, λαχανικά και ψάρια, παράλληλα με προσκόλληση στη συνιστώμενη διάρκεια ύπνου συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη και μειωμένη ηπατική ακαμψία σε ασθενείς με NAFLD, ανεξάρτητα της κατάστασης του σωματικού βάρους και της ενεργειακής πρόσληψης.

Τα αποτελέσματα της 2^{ης} μελέτης έχουν γίνει δεκτά προς δημοσίευση με τη μορφή πρωτότυπης εργασίας στο περιοδικό Applied Physiology Nutrition and Metabolism [Katsagoni CN, Papatheodoridis GV, Papageorgiou M, Ioannidou P, Deutsch M, Alexopoulou A, Papadopoulos N, Fragopoulou E, Kontogianni MD. A "healthy diet-optimal sleep" lifestyle pattern is inversely associated with liver stiffness and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Appl Physiol Nutr Metab, Published on the web 8 November 2016, 10.1139/apnm-2016-0492].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

3η ΜΕΛΕΤΗ: Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των επιδράσεων παρεμβάσεων τροποποίησης του τρόπου ζωής σε κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD

Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια, η NAFLD είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ (σε ποσοστό >5% του ηπατικού παρεγχύματος), το οποίο δεν οφείλεται στην υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ ή άλλη αιτία στεάτωσης (Neuschwander-Tetri and Caldwell, 2003). Περιλαμβάνει όλο το φάσμα που εκτείνεται από την απλή στεάτωση έως τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και την κίρρωση ήπατος, αντιπροσωπεύοντας τη συχνότερη αιτία ηπατικής νόσου στις δυτικές κοινωνίες (Ratziu et al., 2010), ενώ στην Ευρώπη περίπου το 25% του γενικού πληθυσμού πάσχει από NAFLD (Fazel et al., 2016). Ο αυξανόμενος επιπολασμός της NAFLD είναι ιδιαίτερα ανησυχητικός, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις (Miele and Targher, 2015), διαβήτη τύπου 2 (Kasturiratne et al., 2013) αλλά και χρόνια νεφρική νόσο (Musso et al., 2014), παρουσιάζοντας μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας από σχετιζόμενες με το ήπαρ ή μη κλινικές καταστάσεις συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό (Levene and Goldin, 2012).

Η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση της νόσου, καθώς και η βελτίωση ή η πρόληψη των σχετιζόμενων με τη νόσο παραγόντων κινδύνου έχουν προταθεί ως μία οικονομικά συμφέρουσα στρατηγική για την αντιμετώπιση της NAFLD. Προς το παρόν, οι υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν επικεντρωθεί στη διαχείριση των παραγόντων κινδύνου της νόσου, δηλαδή την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη, την υπεργλυκαιμία, τη δυσλιπιδαιμία, καθώς και το επίπεδο φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Δεδομένου ότι κανένα φάρμακο ή χειρουργική επέμβαση δεν έχει εγκριθεί ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση της NAFLD, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής (μέσω διατροφής και άσκησης) παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος για τη θεραπεία των ασθενών, στοχεύοντας κυρίως στον έλεγχο του σωματικού βάρους και των καρδιομεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με τη νόσο (Teede

et al., 2010, Preiss and Sattar, 2008, Mahady and George, 2016).

Οι παρεμβάσεις που στοχεύουν στην αλλαγή του τρόπου ζωής των ασθενών με NAFLD είναι συνεπώς ιδιαίτερα σημαντικές στην κλινική πράξη, ωστόσο, τα στοιχεία σχετικά με το βέλτιστο είδος παρέμβασης, την πιθανή επίδραση της σύστασης της δίαιτας στην NAFLD, ή την επίδραση του είδους ή της έντασης της άσκησης για τη διαχείριση της νόσου παραμένουν ασαφή (Mahady and George, 2016). Συνεπώς, σκοπός της παρούσας μετα-ανάλυσης τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών μελετών (Randomized Clinical Trial(s), RCTs) ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των παρεμβάσεων άσκησης ή / και δίαιτας, σε ηπατικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, καθώς και σε παραμέτρους του μεταβολισμού της γλυκόζης σε ασθενείς με NAFLD. Επιπλέον διερευνήθηκαν και παράμετροι σχετιζόμενες με την επίδραση του τύπου, της έντασης και της διάρκειας της άσκησης, καθώς και του είδους της δίαιτας.

Μεθοδολογία

Πηγές δεδομένων

Πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση των RCTs που δημοσιεύτηκαν από 01/01/2005 έως 31/08/2016. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Scopus (*www.scopus.com*) και η Εθνική Ιατρική βιβλιοθήκη των ΗΠΑ (*PubMed.gov*). Η αναζήτηση της βιβλιογραφίας έγινε από δύο ανεξάρτητους ερευνητές (ΧΝΚ & ΜΓ). Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, NAFLD, NASH, λιπώδες ήπαρ, ηπατική στεάτωση, μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, αερόβια άσκηση, άσκηση αντοχής, αερόβια προπόνηση, προπόνηση αντοχής, διατροφή, απώλεια βάρους, δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια, δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, καθώς και συνδυασμοί των ανωτέρω όρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ο κατάλογος βιβλιογραφικών αναφορών των ανακτημένων άρθρων για την εύρεση άλλων σχετικών μελετών. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μια ιεραρχική προσέγγιση με βάση τον τίτλο, την περίληψη και το πλήρες κείμενο. Στην όλη τη διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν οι συστάσεις

«Προτεινόμενα στοιχεία αναφοράς για συστηματικές ανασκοπήσεις – μετα-ανάλυσεις (the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses-PRISMA) (Moher et al.)

Κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού στη μελέτη

Κριτήρια ένταξης: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν RCTs που αφορούσαν παρεμβάσεις με άσκηση ή / και δίαιτα σε ενήλικες (ηλικίας >18 ετών) ασθενείς με NAFLD, οποιουδήποτε φύλου ή εθνικότητας, οι οποίες δημοσιεύθηκαν στην αγγλική γλώσσα. Ο ορισμός της NAFLD βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια: ενδείξεις ηπατικής στεάτωσης, είτε απεικονιστικά [ενδοηπατικό λίπος (IHTG) ≥ 5%, όπως εκτιμήθηκε με μαγνητική φασματοσκοπία συντονισμού πρωτονίων (^{1}H-MRS) ή υπερηχογράφημα], είτε μέσω βιοψίας, επί αποκλεισμού άλλων αιτιών δευτερογενούς συσσώρευσης ηπατικού λίπους (Chalasani et al., 2012). Όσον αφορά στον έλεγχο της επίδρασης της σύστασης της δίαιτας στην NAFLD, μία δίαιτα μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες ορίστηκε ως η πρόσληψη υδατανθράκων ≤ 45% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης, ενώ μια δίαιτα χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια ορίστηκε ως η πρόσληψη λιπιδίων ≤ 30% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης.

Κριτήρια αποκλεισμού: μελέτες σε πειραματόζωα, μη τυχαιοποιημένες μελέτες, μελέτες περίπτωσης, πιλοτικές μελέτες, μελέτες με λιγότερα από 10 άτομα ή με διάρκεια παρέμβασης μικρότερη του ενός μήνα (λόγω της πιθανής έλλειψης στατιστικής ισχύος), δοκιμές με δευτερογενή αίτια ηπατικής στεάτωσης (π.χ. λόγω κατάχρησης αλκοόλ, λήψης φαρμάκων, ηπατίτιδας C ή νόσο του Wilson, λιποδυστροφία, υποθρεψία, παρεντερική διατροφή, αβηταλιποπρωτεϊναιμία, ενδογενή μεταβολικά νοσήματα), καθώς και άρθρα ανασκόπησης, εξαιρέθηκαν από την ανάλυση. Μελέτες όπου η διαιτητική παρέμβαση θεωρήθηκε ως ομάδα ελέγχου ή συμπληρωματική της ομάδας χορήγησης φαρμάκων ή συμπληρωμάτων βιταμινών, αποκλείστηκαν από τη μελέτη, καθώς η όλη παρέμβαση επικεντρωνόταν στις επιδράσεις των φαρμάκων ή/και των βιταμινών. Επιπλέον αποκλείστηκαν όλες εκείνες οι μελέτες, των οποίων το δείγμα δεν ήταν αποκλειστικά ασθενείς με NAFLD.

Εξαγωγή δεδομένων

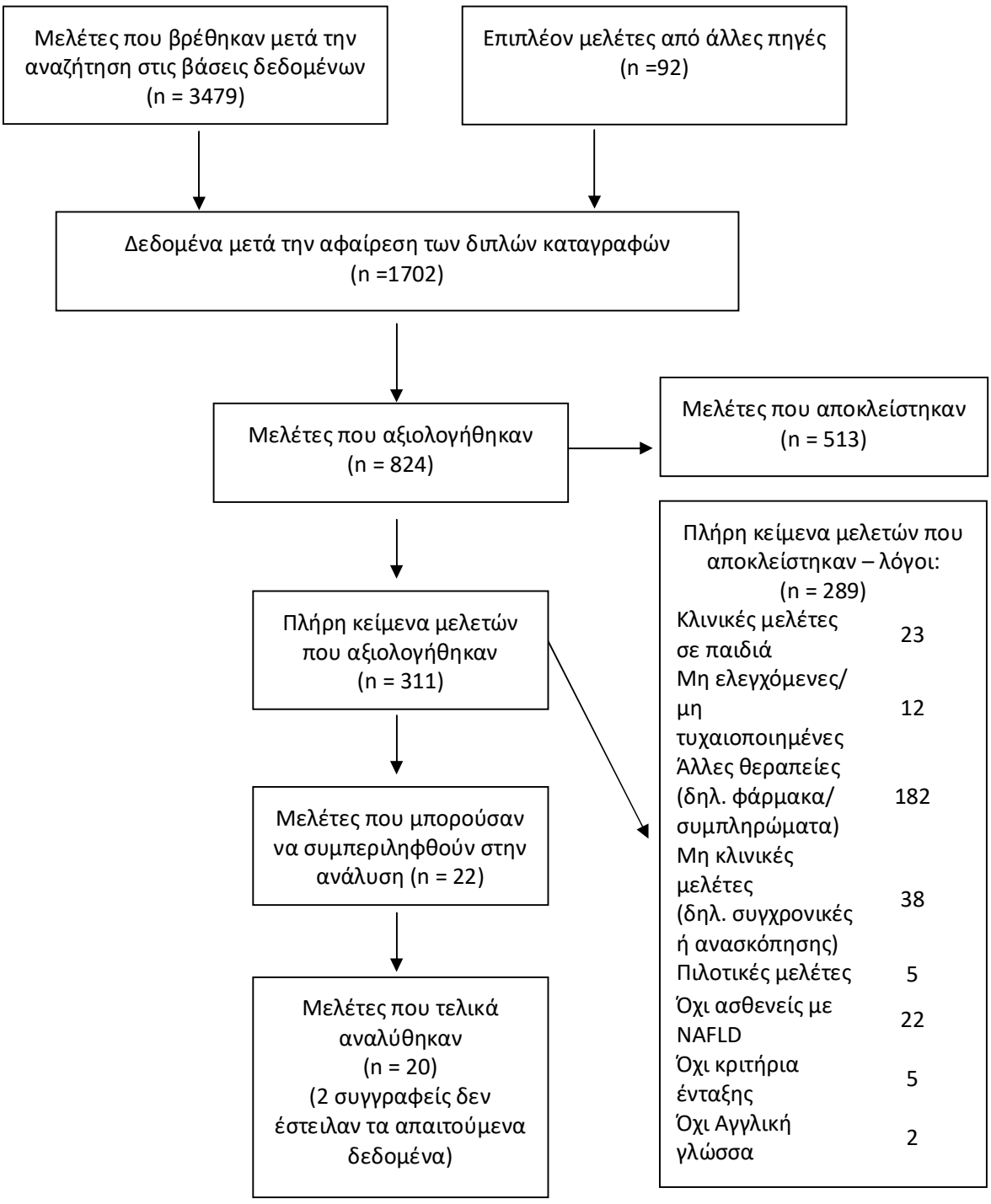
Δύο ερευνητές (ΧΝΚ & ΜΓ) εξήγαγαν, εις διπλούν και ανεξάρτητα, όλες τις κατάλληλες RCTs. Σε περίπτωση διαφωνίας, βοηθούσε ένας τρίτος ερευνητής (ΜΔΚ). Σε 6 κλινικές μελέτες (Sullivan et al., 2012, Hallsworth et al., 2011, Hallsworth et al., 2015a, Bacchi et al., 2013, Sun et al., 2012, St George et al., 2009), όπου δεν παρέχονταν όλες οι απαιτούμενες πληροφορίες στη δημοσιευμένη μορφή του άρθρου, η ερευνητική μας ομάδα ήρθε σε επαφή με τους συντάκτες για να αποκτήσει τα ελλείποντα στοιχεία. Επίσης, κατάλληλοι στατιστικοί τύποι χρησιμοποιήθηκαν για τη μετατροπή των διαθέσιμων δεδομένων στη απαιτούμενη μορφή για την ανάλυση της παρούσας μελέτης. Οι συντάκτες 2 μελετών (Sun et al., 2012, St George et al., 2009) δεν απάντησαν και οι συγκεκριμένες μελέτες εξαιρέθηκαν από την ανάλυση εξαιτίας στατιστικών ασαφειών.

Μετρούμενα καταληκτικά σημεία

Τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία που αξιολογήθηκαν ήταν τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων [ALT, AST και GGT], τα επίπεδα ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων (IHTG) όπως αξιολογήθηκαν μέσω ^{1}H-MRS ή υπερηχογράφημα ήπατος και η βελτίωση της ηπατικής ιστολογίας σύμφωνα με τον δείκτη NAFLD activity score (NAS) (Angulo et al., 2007). Στα μετρούμενα χαρακτηριστικά συμπεριελήφθησαν, επίσης, οι αλλαγές στο σωματικό βάρος, ο δείκτης μάζας σώματος, η περιφέρεια μέσης (ΠΜ), καθώς και παράμετροι του μεταβολισμού της γλυκόζης, δηλαδή το ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR) και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c).

Σύνθεση δεδομένων και στατιστική ανάλυση

Συνολικά αξιολογήθηκαν 311 πλήρη κείμενα μελετών. Από αυτά, 20 RCTs πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού και συμπεριελήφθησαν στη παρούσα μετα-ανάλυση (Βλ. διάγραμμα ροής, ***Σχήμα 6.1***). Η συμφωνία μεταξύ των δύο ερευνητών για την επιλογή της κάθε μελέτης ήταν 0,92. Τα πλήρη χαρακτηριστικά των μελετών παρουσιάζονται στον ***Πίνακα 1 του παραρτήματος Α***.



Σχήμα 6.1: Διάγραμμα ροής: Αλγόριθμος διαδικασίας επιλογής μελετών.

Η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε όταν υπήρχαν δεδομένα από τουλάχιστον δύο ή περισσότερες RCTs. Η ετερογένεια ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *Cochran's Q test* και αποτιμήθηκε μέσω της δοκιμασίας I^2. Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του συγκεντρωτικού αποτελέσματος στην περίπτωση που οι τιμές ετερογένειας I^2 ήταν ≥ 50%. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις δοκιμάστηκαν και τα δύο σενάρια, δηλαδή είτε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, είτε το μοντέλο σταθερών επιδράσεων για την εκτίμηση του συγκεντρωτικού αποτελέσματος (ΣΑ). Το ΣΑ υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την τυποποιημένη μέση διαφορά (ΤΜΔ). Η στάθμιση του μεγέθους της επίδρασης του ΣΑ πραγματοποιήθηκε μέσω αντιστροφής της διακύμανσης. Επειδή η κλινική σημασία των αποτελεσμάτων μέσω ΤΜΔ ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί (Faraone, 2008), για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας χρησιμοποιήθηκε η ερμηνεία που προτείνεται από τους Cohen et al. (Cohen, 1988). Σύμφωνα με την ερμηνεία αυτή, όρια ΤΜΔ < 0,2, ≥ 0,2 και < 0,5, ≥ 0,5 και < 0,8 ή ≥ 0,8 αντιστοιχούν σε ασήμαντη, μικρή, μέτρια ή μεγάλη επίδραση, αντίστοιχα. Για τη διερεύνηση των πηγών ετερογένειας, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε υπο-ομάδες με βάση την απώλεια βάρους, την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης. Η ισχύς του μοντέλου των τυχαίων επιδράσεων ελέγχθηκε με ανάλυση ευαισθησίας, χρησιμοποιώντας την επιρροή της κάθε μελέτης σχετικά με τους εκτιμώμενους συντελεστές παλινδρόμησης, αφαιρώντας κάθε φορά μία-μία μελέτη. Η απόσταση του Cook χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνεύσει πιθανές ακραίες τιμές (Cook's d > 0,20 χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των μελετών που ήταν υπεύθυνες για τη μη κανονικότητα των υπολοίπων). Για την ανίχνευση του σφάλματος δημοσίευσης δημιουργήθηκε η γραφική παράσταση των ΤΜΔ στον οριζόντιο άξονα και του τυπικού σφάλματος στον κάθετο άξονα. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Stata 13 χρησιμοποιώντας τις σχετικές εντολές, δηλαδή, Metan, metareg, metafunnel και metabias (StataCorp, College Station, Texas, ΗΠΑ).

Αξιολόγηση της ποιότητας των μελετών και του σφάλματος δημοσίευσης

Για την αξιολόγηση της ποιότητας των μελετών χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο *Cochrane Risk of Bias Tool* και η διαδικασία βασίστηκε στα ακόλουθα στοιχεία (+ 1 μονάδα αποδόθηκε σε

κάθε στοιχείο με μέγιστη βαθμολογία 8): 1) τυχαιοποίηση, 2) τυφλή κατανομή των ασθενών στις ομάδες παρέμβασης, 3) τυφλή συμμετοχή των εθελοντών, 4) τυφλή λειτουργία ερευνητικού προσωπικού, 5) τυφλή λειτουργία αξιολογητών, 6) την πληρότητα των αποτελεσμάτων, 7) την έκβαση αποτελεσμάτων χωρίς σφάλματα και 8) την έλλειψη άλλων πηγών σφαλμάτων. Οι μελέτες χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής ποιότητας, εάν η συνολική βαθμολογία της ποιότητας των μελετών (QS) ήταν ≥ 5 ή χαμηλής ποιότητας αν η QS ήταν < 5. Τα αποτελέσματα της ποιότητας των RCTs που συμπεριελήφθησαν στη μετα-ανάλυση παρουσιάζονται στο ***Πίνακα 2 του παραρτήματος Α.*** Συγκεκριμένα, 11 RCTs χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής ποιότητας και 9 RCTs ως χαμηλής ποιότητας. Η συμφωνία μεταξύ των δύο ερευνητών για την αξιολόγηση της ποιότητας των μελετών ήταν 0,90. Το στατιστικό κριτήριο Egger test εκτελέστηκε για την αξιολόγηση του σφάλματος δημοσίευσης (Egger et al., 1997). Για την ερμηνεία των αποτελέσματα της δοκιμασία *Egger*, η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως P<0,1.

Αποτελέσματα

Μόνο μία μελέτη αξιολόγησε την επίδραση της δίαιτας σε σύγκριση με τη μη παρέμβαση (Yamamoto et al., 2007), για το λόγο αυτό, η μετα-ανάλυση των παρεμβάσεων που εφάρμοσαν παρέμβαση μόνο με δίαιτα δεν ήταν εφικτή. Στη μελέτη των *Yamamoto* και *συν*. (Yamamoto et al., 2007) 12 ασθενείς (9 με NASH και 3 με απλή στεάτωση) έλαβαν υποθερμιδική δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια και σίδηρο για 6 μήνες, ενώ σε 6 ασθενείς (2 με NASH και 4 με απλή στάτωση) δε χορηγήθηκε κάποια ειδική θεραπεία. Η δίαιτα απέδιδε 30 Kcal/ kg σωματικού βάρους (ΣΒ) / ημέρα, με 20% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης να προέρχεται από λιπίδια, 1,1-1,2 γρ. πρωτεΐνης/ kg ΣΒ/ ημέρα και πρόσληψη διατροφικού σιδήρου σε ≤ 6 mg / ημέρα. Η προσκόλληση στη δίαιτα αξιολογήθηκε με 3ήμερα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων. Στο τέλος του εξαμήνου, η ομάδα που έλαβε τη δίαιτα παρουσίασε απώλεια βάρους της τάξης των 4,8%, ενώ επιπλέον μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών ALT και AST και τα επίπεδα φερριτίνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς όμως να ελεγχθεί η επίδραση της απώλειας βάρους ως συγχυτικός παράγοντας.

Παρεμβάσεις μόνο με άσκηση

Δώδεκα μελέτες (Eckard et al., 2013, Sullivan et al., 2012, Hallsworth et al., 2011, Zelber-Sagi et al., 2014, Cuthbertson et al., 2016, Hallsworth et al., 2015a, Pugh et al., 2014, Bacchi et al., 2013, Shamsoddini et al., 2015, Houghton et al., 2016, Zhang et al., 2016, Shojaee-Moradie, 2016), με ένα σύνολο 564 NAFLD ασθενών (341 στην ομάδα παρέμβασης και 223 στην ομάδα ελέγχου) αξιολόγησαν τη μεμονωμένη επίδραση της άσκησης στη διαχείριση της NAFLD. Τρεις μελέτες (Eckard et al., 2013, Shamsoddini et al., 2015, Zhang et al., 2016) είχαν περισσότερες από μία ομάδες παρέμβασης και άρα, κάθε ομάδα συγκρίθηκε χωριστά με την ομάδα ελέγχου και αναλύθηκε. Μία RCT (Eckard et al., 2013) είχε ως στόχο την απώλεια βάρους, αν και 5 μελέτες (Zelber-Sagi et al., 2014, Cuthbertson et al., 2016, Hallsworth et al., 2015a, Zhang et al., 2016, Shojaee-Moradie, 2016) και η ομάδα παρέμβασης με άσκηση αντοχής των *Shamsoddini* και *συν.* (Shamsoddini et al., 2015) τελικά ανέφεραν στατιστικά σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Πέντε μελέτες (Sullivan et al., 2012, Cuthbertson et al., 2016, Pugh et al., 2014, Shamsoddini et al., 2015, Zhang et al., 2016) αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα της αερόβιας άσκησης σε σύγκριση με τη μη παρέμβαση, 3 μελέτες αξιολόγησαν την επίδραση της άσκησης αντοχής σε σύγκριση με τη μη παρέμβαση (Hallsworth et al., 2011, Zelber-Sagi et al., 2014, Shamsoddini et al., 2015), 3 μελέτες (Eckard et al., 2013, Shojaee-Moradie, 2016, Houghton et al., 2016) αξιολόγησαν την επίδραση της άσκησης αντοχής, σε συνδυασμό με την αερόβια άσκηση, σε σύγκριση με τη μη παρέμβαση, και δύο μελέτες (Bacchi et al., 2013, Shamsoddini et al., 2015) αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα της αερόβιας άσκησης συγκριτικά με την άσκηση αντοχής στη διαχείριση της NAFLD.

Ανεξάρτητα του τύπου της άσκησης (αερόβια, αντοχής ή συνδυασμός αυτών), οι μελέτες κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την ένταση της άσκησης που εφαρμόστηκε στα διάφορα πρωτόκολλα, σε υψηλής έντασης προπόνηση (HIT), μέτριας έντασης προπόνηση (MIT) και υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση (HIIT). Επιπρόσθετα, όταν λήφθηκε υπόψη και η διάρκεια της άσκησης, οι μελέτες κατηγοριοποιήθηκαν σε χαμηλής-προς-μέτριας ή μέτριας-

προς-υψηλής διάρκειας προπόνηση. Μία μελέτη (Hallsworth et al., 2011) εφάρμοσε μία μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας HIT και μία μελέτη (Shamsoddini et al., 2015) μία χαμηλής-προς-μέτριας διάρκειας HIT. Επιπρόσθετα, 4 μελέτες (Eckard et al., 2013, Sullivan et al., 2012, Cuthbertson et al., 2016, Zhang et al., 2016) εφάρμοσαν χαμηλής-προς-μέτριας διάρκειας MIT, 2 μελέτες (Shojaee-Moradie, 2016, Pugh et al., 2014) εφάρμοσαν μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας MIT, και 2 μελέτες (Hallsworth et al., 2015a, Houghton et al., 2016) εφάρμοσαν υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση (HIIT). Η μελέτη των Bacchi et al. εφάρμοσε μία μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας HIT και στις δύο ομάδες παρέμβασης (αερόβια ή αντοχής). Σε μία μελέτη (Zelber-Sagi et al., 2014) δεν δόθηκαν καθόλου πληροφορίες σχετικά με τη διάρκεια ή την ένταση του πρωτοκόλλου της άσκησης που εφαρμόστηκε. Η μέτριας έντασης άσκηση για τη συνεχόμενη προπόνηση ορίστηκε ως % μέγιστος καρδιακός ρυθμός $\leq$ 60% (υπολογισμένος με τον τύπο 220- ηλικία) ή ≤ 60% του αποθεματικού της καρδιακής συχνότητας (υπολογισμένο ως μέγιστος καρδιακός ρυθμός μείον τον καρδιακό ρυθμό ηρεμίας). Για την HIIT, η υψηλής έντασης προπόνηση ορίστηκε ως ≥50% του ανώτατου ορίου σε μία επανάληψη (δηλαδή της μέγιστης δύναμης που μπορεί να καταβληθεί σε μία συστολή) ή > 16-18 της βαθμολογίας κατά Borg (δηλαδή ενός υποκειμενικού μέτρου της έντασης της προπόνησης με βάση την κλίμακα που προτείνουν οι *Borg* και *συν.*) (Borg, 1982); εύρος: 6 - 20). Η χαμηλής-προς-μέτριας διάρκειας άσκηση ορίστηκε ως ≥ 120 με < 180 λεπτά/ εβδομάδα, ενώ η μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας άσκηση ως ≥ 180 λεπτά/εβδομάδα. Η μέση διάρκεια των διαλειμμάτων της HIIT ήταν 2-3 λεπτά/διάλειμμα για ένα σύνολο 3 - 5 διαλειμμάτων. Η συνολική διάρκεια άσκησης ανά εβδομάδα υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας τη μέση συχνότητα της άσκησης με τη μέση διάρκεια του προγράμματος άσκησης που εφαρμόστηκε σε κάθε μελέτη. Αναφορικά με τη μέση συχνότητα άσκησης, 7 μελέτες (Hallsworth et al., 2011, Zelber-Sagi et al., 2014, Hallsworth et al., 2015a, Shamsoddini et al., 2015, Shojaee-Moradie, 2016, Houghton et al., 2016, Bacchi et al., 2013) ανέφεραν μία μέση συχνότητα άσκησης ≤ 3 φορές/εβδομάδα, 3 μελέτες (Eckard et al., 2013, Sullivan et al., 2012, Zhang et al., 2016) ανέφεραν πιο εντατική προπόνηση > 3 φορές/ εβδομάδα, ενώ 2 μελέτες (Pugh et al., 2014, Cuthbertson et al., 2016) εφάρμοσαν συχνότητα άσκησης 3 - 5 φορές/ εβδομάδα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στη μέση

διάρκεια παρέμβασης σε κάθε μελέτη. Συγκεκριμένα, σε 2 μελέτες (Hallsworth et al., 2011, Shamsoddini et al., 2015) η μέση διάρκεια παρέμβασης ήταν 2 μήνες, σε 3 μελέτες (Hallsworth et al., 2015a, Houghton et al., 2016, Zelber-Sagi et al., 2014) ήταν 3 μήνες, σε 5 μελέτες ήταν 4 μήνες (Bacchi et al., 2013, Pugh et al., 2016, Cuthbertson et al., 2016, Shojaee-Moradie, 2016, Sullivan et al., 2012), σε μία μελέτη (Eckard et al., 2013) ήταν 6 μήνες και τέλος σε μία άλλη μελέτη ήταν 12 μήνες (Zhang et al., 2016).

Επίδραση σε ηπατικά χαρακτηριστικά

Η άσκηση μόνο βελτίωσε τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων ALT, AST και GGT. Επιπλέον, σύμφωνα με το συγκεντρωτικό αποτελέσμα, μία σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα IHTG, αξιολογώντας τα επίπεδα αυτών, είτε μέσω ^{1}H-MRS (ΤΜΔ= -0,79, 95% ΔΕ: -1,05 με -0,53, P<0,001) ή/και μέσω υπερήχου (ΤΜΔ= -0,98, 95% ΔΕ: -1,30 με -0,66, P<0,001). Συνεπώς, όλες οι επιμέρους αναλύσεις για τα IHTG πραγματοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα τόσο από ^{1}H-MRS ή/και υπέρηχο. Δεν υπήρχαν αρκετά δεδομένα αναφορικά με το δείκτη NAS score (***Πίνακας 6.1 και σχήμα 6.2***). Παρατηρήθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών αναφορικά με την ALT (Cochran's Q= 26,86 (12), P=0,008, I^2= 55,3%), την AST (Cochran's Q=21,58 (10), P=0,017, I^2= 53,7%) και τα IHTG (Cochran's Q= 29,03 (11), P=0,002, I^2= 62,1%). Από την ανάλυση της μετα-παλινδρόμησης φάνηκε ότι υψηλή ετερογένεια στην ALT, AST και IHTG αποδόθηκε στα διαφορετικής έντασης και διάρκειας πρωτόκολλα άσκησης που εφαρμόστηκαν στις διάφορες μελέτες (P=0,042, P=0,046 and P=0,003, αντιστοίχως).

Όταν η αερόβια άσκηση συγκρίθηκε με τη μη παρέμβαση, η ανάλυση έδειξε βελτίωση των επιπέδων ALT (ΤΜΔ= -0,36, 95% ΔΕ: -0,73 με -0,001, P= 0,05, I^2= 58,4%) και IHTG (ΤΜΔ=-0.84 95% ΔΕ: -1,27 με -0,42, P<0,001, I^2=66,6%). Μία τάση μείωσης παρατηρήθηκε στα επίπεδα της AST (ΤΜΔ= -0,34, 95% ΔΕ: -0,71 με 0,03, P=0,07, I^2= 61,4%), αλλά καμία επίδραση στα επίπεδα της GGT (ΤΜΔ= -0,03, 95% ΔΕ: -0,24 με 0,17, P=0,73, I^2= 0,0%). Η υψηλή ετερογένεια τόσο στα επίπεδα της ALT όσο και στα επίπεδα των IHTG αποδόθηκε στην απώλεια βάρους (P=0,025 και P=0,05, αντιστοίχως). Επιπρόσθετα, όταν συγκρίθηκε η επίδραση της άσκησης

αντοχής με τη μη παρέμβαση, οι βελτιώσεις περιορίστηκαν μόνο στα επίπεδα IHTG (ΤΜΔ= -1,05, 95% ΔΕ: -1,87 με -0,24, P=0,011, I^2= 65,1%). Ομοίως, ο συνδυασμός αερόβιας άσκησης και άσκησης αντοχής σε σύγκριση με τη συνήθη αντιμετώπιση, βελτίωσε μόνο τα επίπεδα των IHTG (ΤΜΔ=- 1,54, 95% ΔΕ: -2,56 με -0,52, P=0,003, I^2= 60,5%). Καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα ALT (P= 0,31 και P=0,45, αντιστοίχως), AST (P=0,43 and P=0,42, αντιστοίχως) ή τα επίπεδα GGT (P= 0,17 για την αερόβια σε συνδυασμό με την άσκηση αντοχής) για τους δύο τύπους άσκησης (δηλαδή την άσκηση αντοχής ή τον συνδυασμό της με αερόβια άσκηση). Η σύγκριση αερόβιας άσκησης με την άσκηση αντοχής οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ALT (ΤΜΔ= 0,41, 95% ΔΕ: -0,15 με 0,96, P=0,15, I^2= 0,0%), AST (ΤΜΔ= -0,11, 95% ΔΕ: -0,82 με 0,60, P=0,77, I^2=3 6,6%) και IHTG (ΤΜΔ= -0,21, 95% ΔΕ: -0,77 με 0,35, P=0,46, I^2= 0,0%). Η επιμέρους ανάλυση σε υπο-ομάδες, ανεξαρτήτως του τύπου ή της διάρκειας της άσκησης έδειξε ότι η HIT, είχε την μεγαλύτερη και πιο ισχυρή επίδραση στα IHTG (ΤΜΔ= -1,90, 95% ΔΕ: -3,17 με -0,63, P=0,003, I^2= 74,3%), συγκριτικά με την MIT ή την HIIT οι οποίες επέδειξαν παρόμοιες μειώσεις (MIT: ΤΜΔ= -0,86, 95% ΔΕ -1,36 με -0,34, P=0,001, I^2= 63,5% έναντι HIIT: ΤΜΔ= -0,93, 95% ΔΕ: -1,53 με 0,32, P=0,003, I^2= 0,0%). Ωστόσο, όταν λήφθηκε υπόψη η διάρκεια της άσκησης, η μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας MIT έδειξε μεγαλύτερη βελτίωση αναφορικά με τα επίπεδα των IHTG (ΤΜΔ= -1,69, 95% ΔΕ: 2,53 με -0,85, P<0,001, I^2= 27,4%), συγκριτικά με την χαμηλής-προς-μέτριας διάρκειας MIT (ΤΜΔ=-0,50, 95% ΔΕ:-0,77 με -0,23, P<0,001, I2=0,0%) ή την HIIT (ΤΜΔ= -0,93, 95% ΔΕ: -1,53 με 0,32, P=0,003, I2= 0,0%). Δυστυχώς, συγκρίσεις περιλαμβάνοντας τον τύπο της άσκησης, όπως επίσης και συγκρίσεις μεταξύ χαμηλής-προς μέτριας ή μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας HIT δεν ήταν εφικτές λόγω ανεπαρκών δεδομένων.

Η επίδραση της άσκησης στα IHTG ήταν ανεξάρτητη της απώλειας βάρους. Αναλύοντας μόνο τις μελέτες χωρίς στατιστικά σημαντική αλλαγή στην απώλεια βάρους (μέση αλλαγή=-0,53±2,32 kg), η επίδραση της άσκησης στα IHTG παρέμεινε σημαντική (ΤΜΔ= -0,86, 95% ΔΕ: -1,32 to -0,40, P< 0,01, I^2= 0,0%). Ωστόσο, δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική η επίδραση στα επίπεδα ηπατικών ενζύμων όταν αναλύθηκαν μόνο οι μελέτες χωρίς σημαντική απώλεια βάρους [$ΤΜΔ_{ALT}$= -0,31, 95% ΔΕ:-0,76 με 0,13, P=0,17, I^2= 18,4%, $ΤΜΔ_{AST}$= -0,26, 95% ΔΕ:-0,92 με

0,40, P=0,45, I^2= 42,8%, $TM\Delta_{GGT}$= 0,09, 95% ΔΕ: -0,50 με 0,69, P=0,74, I^2 =0,0%)].

Από τις παραπάνω αναλύσεις, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικό σφάλμα δημοσίευσης αναφορικά με την επίδραση της άσκησης στα επίπεδα της ALT (P=0,015), AST (P=0,016) και IHTG (P=0,012) όπως αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *Egger's test* και τις γραφικές παραστάσεις των ΤΜΔ (*funnel plots*) (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επίσης, τα αποτελέσματα αναφορικά με το βέλτιστο χρονικό διάστημα παρέμβασης ήταν ασαφή και δεν μετα-αναλύθηκαν.

Επίδραση σε ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Αναδείχθηκε μία σημαντική επίδραση της άσκησης μόνο στην ΠΜ (***Πίνακας 6.1).*** Δεν παρατηρήθηκε ετερογένεια μεταξύ των αναλυόμενων μελετών (Cochran's Q= 5,47 (8), P= 0,71, I^2= 0,0%), αλλά ούτε και σημαντικό σφάλμα δημοσίευσης (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης

Η άσκηση φάνηκε να βελτιώνει τα επίπεδα HbA1c και HOMA-IR (***Πίνακας 6.1***). Η ετερογένεια ήταν χαμηλή αναφορικά με την HbA1c (Cochran's Q= 0,58 (3), P=0,90, I^2= 0,0%), αλλά υψηλή για τα επίπεδα HOMA-IR (Cochran's Q= 29,93 (6), P<0,001, I^2= 80,0%) (***Πίνακας 6.1***). Η μετα-παλινδρόμηση έδειξε ότι η ετερογένεια στην ανάλυση του HOMA-IR αποδόθηκε στα διαφορετικά πρωτόκολλα έντασης και διάρκειας άσκησης που εφαρμόστηκαν στις υπό ανάλυση μελέτες (P=0,048).

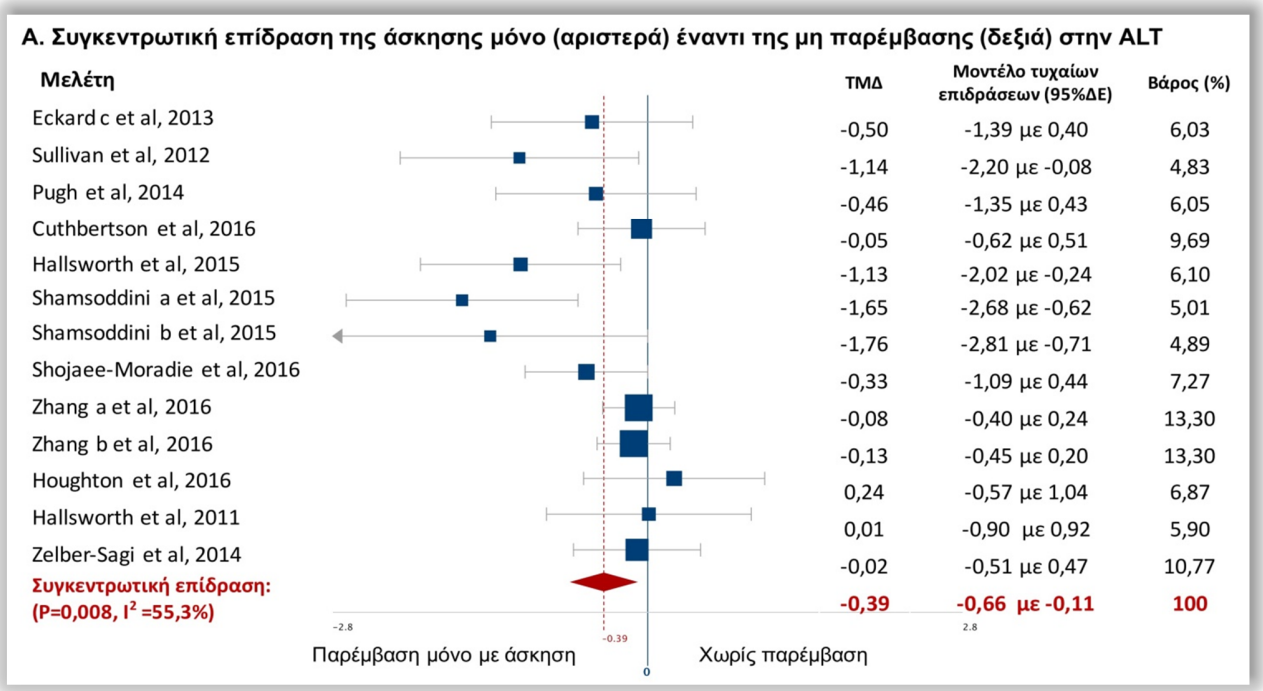
Η επίδραση της άσκησης στα επίπεδα HbA1c και HOMA-IR ήταν ανεξάρτητη της απώλειας βάρους. Αναλύοντας μόνο τις μελέτες που ανέφεραν μη στατιστικά σημαντική απώλεια βάρους, η άσκηση βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα τα επίπεδα HbA1c (ΤΜΔ= -0,66, 95% ΔΕ: -1,28 με -0,042, P=0,86, I^2= 0,0%) and HOMA-IR (ΤΜΔ= -0,61, 95% ΔΕ: -1,14 με -0,09, P=0,07, I^2= 61,1%).

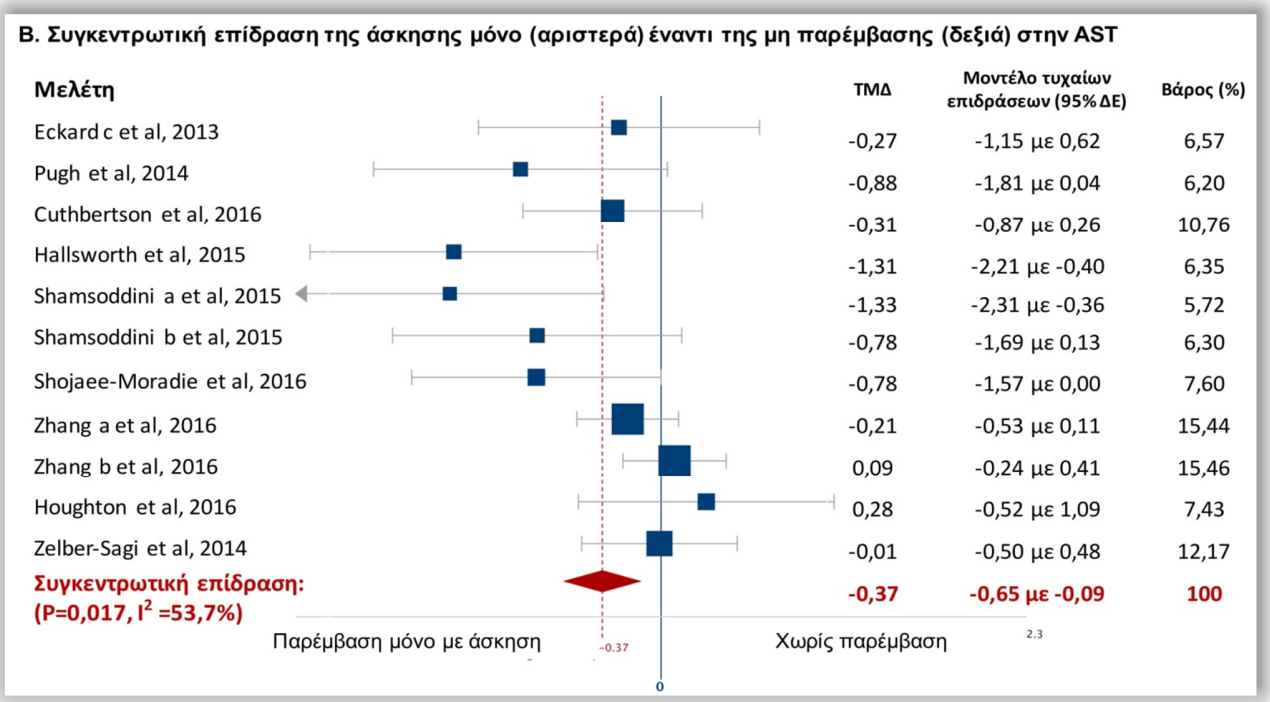
Δεν παρατηρήθηκε σημαντικό σφάλμα δημοσίευσης αναφορικά με τα επίπεδα HbA1c ή HOMA-IR (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Πίνακας 6.1: Συγκεντρωτική επίδραση παρεμβάσεων μόνο με άσκηση, δίαιτα και άσκηση ή διαιτών με μέτρια περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες έναντι χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια σε δείκτες που σχετίζονται με τη NAFLD.

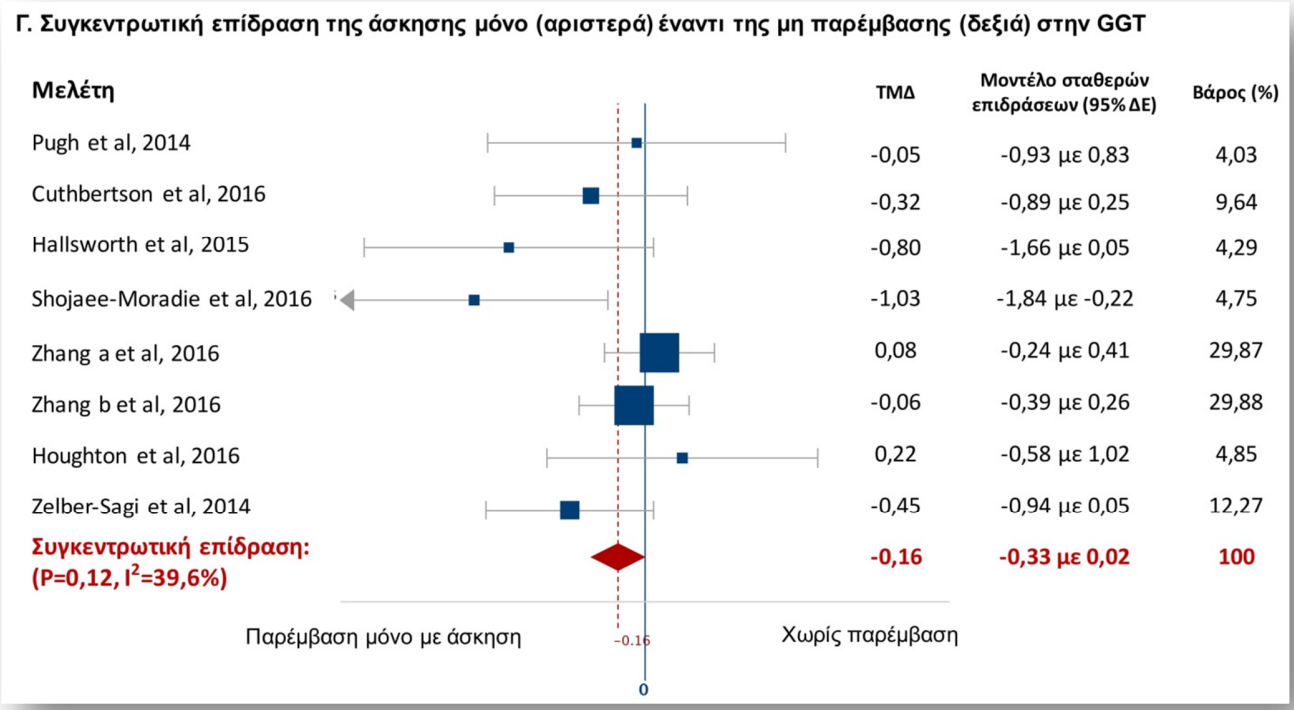
Καταληκτικά σημεία	Παρεμβάσεις μόνο με άσκηση				Παρεμβάσεις με δίαιτα & άσκηση				Μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες έναντι χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια δίαιτες			
	ΤΜΔ	**95% ΔΕ**	**P-value**	**I^2**	**ΤΜΔ**	**95% ΔΕ**	**P-value**	**I^2**	**ΤΜΔ**	**95% ΔΕ**	**P-value**	**I^2**
ALT (IU/L)	-0,39	-0,66 έως -0,11	0,006	55,3%	-0,58	-0,80 έως -0,37	<0,001	48,9%	0,05	-0,27 έως 0,36	0,78	0,0%
AST (IU/L)	-0,37	-0,65 έως -0,09	0,009	53,7%	-0,35	-0,80 έως 0,09	0,12	72,0%	0,28	-0,26 έως 0,82	0,31	55,6%
GGT (IU/L)	-0,16	-0,33 έως 0,02	0,08	39,6%	-0,32	-1,11 έως 0,47	0,43	78,2%	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ
NAS score	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	-0,61	-1,09 έως -0,13	0,01	0,0%	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ
IHTG (%)	-0,98	-1,30 έως -0,66	<0,001	62,1%	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ
Σωματικό βάρος (kg)	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	-0,56	-1,45 έως 0,32	0,21	85,2%	0,17	-0,16 έως 0,49	0,32	3,9%
ΔΜΣ (kg/m^2)	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	-0,66	-1,08 έως -0,24	0,002	64,4%	0,01	-0,31 έως 0,33	0,95	0,0%
ΠΜ (εκ.)	-0,60	-0,78 έως -0,42	<0,001	0,0%	-0,46	-0,80 έως -0,12	0,008	23,0%	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ
HOMA-IR	-0,76	-1,47 έως -0,05	0,037	80,0%	-1,17	-2,41 έως 0,07	0,06	90,8%	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ
HbA1c (%)	-0,50	-0,85 έως -0,15	0,005	0,0%	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ	ΜΕ

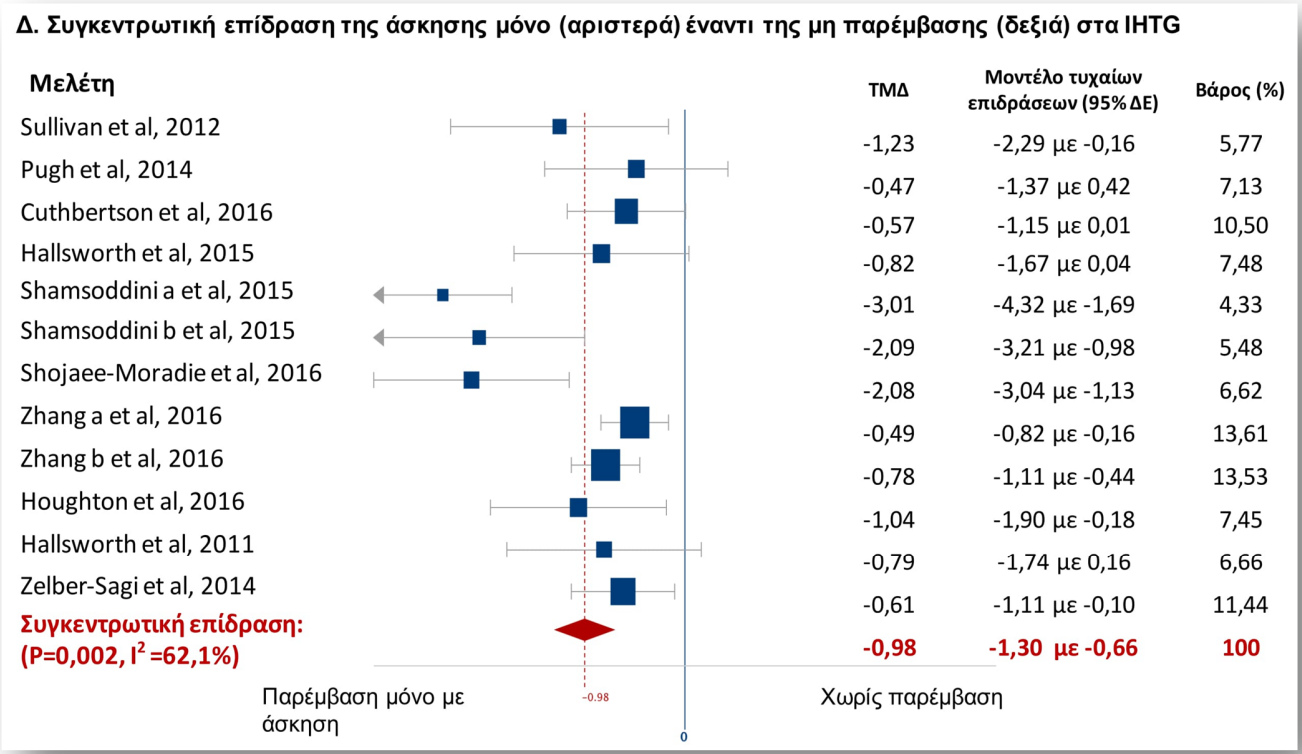
ΔΑ: δεν αξιολογήθηκε, **ΔΕ:** διάστημα εμπιστοσύνης, **ΔΜΣ:** δείκτης μάζας σώματος, **ΜΕ:** μη επαρκή δεδομένα για την ανάλυση, **ΠΜ:** περιφέρεια μέσης, **ΤΜΔ:** τυποποιημένη μέση διαφορά, **ALT**: τρανσαμινάση της αλανίνης, **AST:** ασπαρτική τρανσαμινάση, **GGT:** γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάση, **HbA1c:** γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, **HOMA-IR:** ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη, **I^2:** I squared (δείκτης ετερογένειας), **IHTG:** ενδοηπατικά τριγλυκερίδια, **NAS:** δείκτης ιστολογικής δραστηριότητας της NAFLD, **NAFLD**: μη αλκοολική λιπώδη νόσος του ήπατος.





Σχήμα 6.2: (συνέχεια)





Σχήμα 6.2: Συγκεντρωτική επίδραση άσκησης μόνο στα επίπεδα Α) τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT), Β) ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST), Γ) γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT) και Δ) ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων (IHTG).
ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης, **ΤΜΔ:** τυποποιημένη μέση διαφορά, **I^2:** I squared (δείκτης ετερογένειας).

Παρεμβάσεις με δίαιτα και άσκηση

Τέσσερις μελέτες (Promrat et al., 2010, Wong et al., 2013, Al-Jiffri et al., 2013, Rezende et al., 2016) και οι δύο ομάδες των *Eckard* και *συν.* (Eckard et al., 2013) με ένα σύνολο 357 ασθενών με NAFLD (188 στην ομάδα παρέμβασης, 169 στην ομάδα ελέγχου) αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα της δίαιτας σε συνδυασμό με την άσκηση σε χαρακτηριστικά της NAFLD. Όλες οι μελέτες στόχευαν στην απώλεια βάρους, αλλά στο τέλος μόνο 3 μελέτες (Promrat et al., 2010, Wong et al., 2013, Al-Jiffri et al., 2013) κατάφεραν στατιστικά σημαντική απώλεια βάρους συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

Επίδραση σε ηπατικά χαρακτηριστικά

Οι παρεμβάσεις που βασίστηκαν σε συνδυασμό δίαιτας και άσκησης φάνηκε να βελτιώνουν μόνο τα επίπεδα της ALT. Ωστόσο, σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε και σε ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως αυτό αποτυπώθηκε από το δείκτη NAS (***Πίνακας 6.1***). Δυστυχώς, δεν υπήρχαν δεδομένα αναφορικά με τα επίπεδα IHTG. Η ετερογένεια ήταν χαμηλή αναφορικά με τα επίπεδα της ALT (Cochran's Q= 9,79 (5), P=0,08, I^2= 48,9%) και του δείκτη NAS (Cochran's Q= 0,02, P=0,99, I^2= 0,0%) (***Πίνακας 6.1*** και ***Σχήμα 6.3***).

Επιπλέον, για τον έλεγχο της επίδρασης της απώλειας βάρους στα ηπατικά ένζυμα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε υπο-ομάδες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν βελτιώσεις στα επίπεδα ηπατικών ένζυμων μόνο κάτω από συνθήκες απώλειας βάρους (ALT: ΤΜΔ= -0,66, 95% ΔΕ: -0,90 με -0,42, P<0,001, I^2= 71,9% έναντι, ΤΜΔ= -0,34, 95% ΔΕ: -0,77 με 0,09, P=0,13, I^2= 0,0%, AST: ΤΜΔ= -0,40, 95% ΔΕ: -0,64 με -0,16, P=0,001, I^2= 85,5% έναντι, ΤΜΔ= -0,17, 95% ΔΕ: -0,61 με 0,27, P=0,16, I^2= 45,0%). Δυστυχώς, ανάλυση σε υπο-ομάδες ως προς τα επίπεδα της GGT δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί, διότι υπήρχαν μόνο σχετικές 2 μελέτες. Δεν παρατηρήθηκε σφάλμα δημοσίευσης σε κανένα από τα προαναφερθέντα ηπατικά ένζυμα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

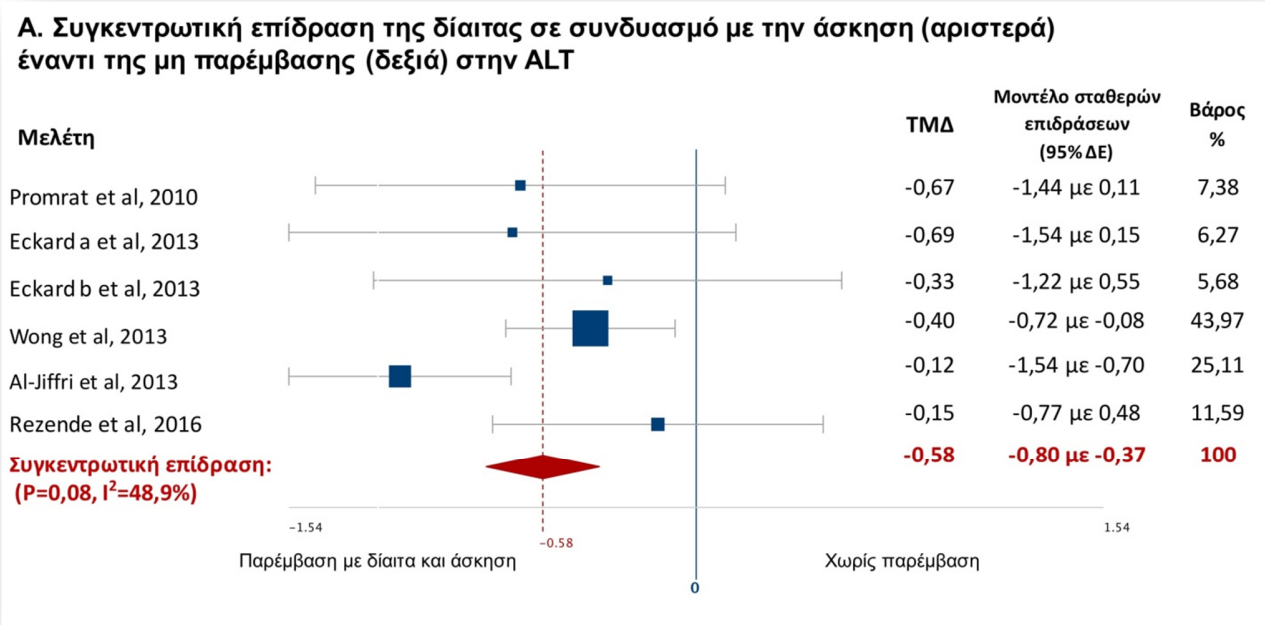
Επίδραση σε ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Οι παρεμβάσεις με δίαιτα και άσκηση φάνηκε να μειώνουν τα επίπεδα ΔΜΣ και ΠΜ.

Παρατηρήθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών ως προς τα επίπεδα ΔΜΣ (Cochran's Q= 8,44 (3), P<0,038, I^2= 64,4%), αλλά όχι για την ΠΜ (Cochran's Q= 2,60 (2), P=0,27, I^2= 23,0%) (***Πίνακας 6.1***). Δεν παρατηρήθηκε σφάλμα δημοσίευσης ως προς τα επίπεδα του ΔΜΣ και της ΠΜ (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

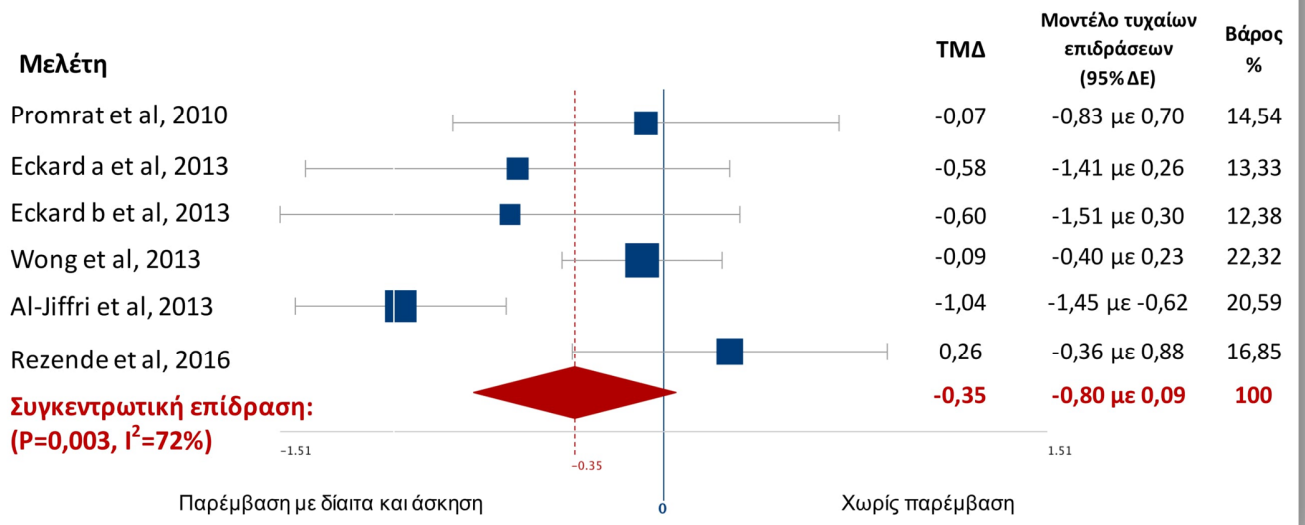
Επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Οι παρεμβάσεις δίαιτας και άσκησης φάνηκε να βελτιώνουν οριακά τα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR. Δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στα επίπεδα της HbA1c. Σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών παρατηρήθηκε ως προς τα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR (Cochran's Q= 21,65 (2), P<0,001, I^2= 90,8%). Δεν παρατηρήθηκε σφάλμα δημοσίευσης ως προς τα επίπεδα του HOMA-IR.

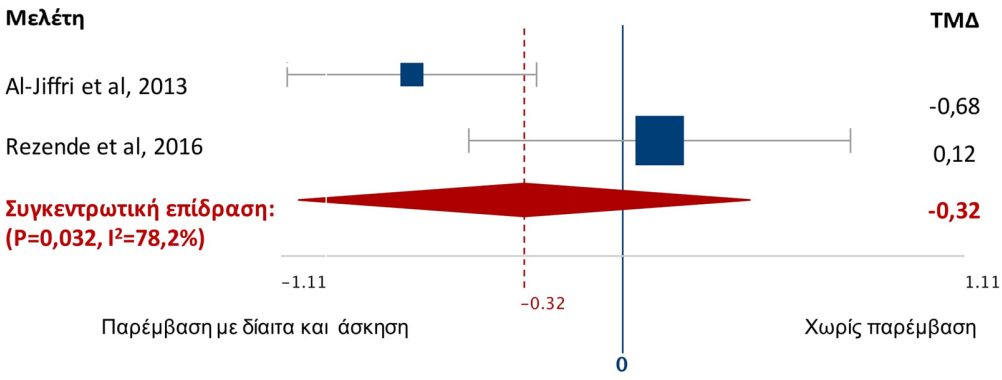


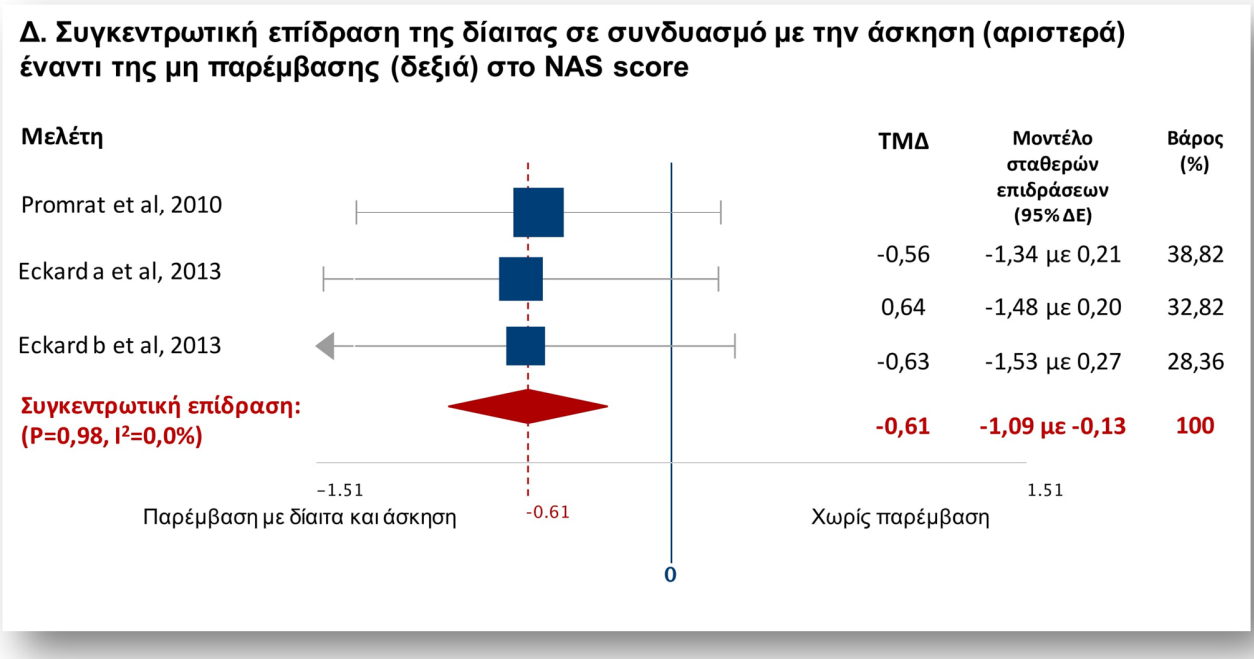
Σχήμα 6.3: (συνέχεια)

Β. Συγκεντρωτική επίδραση της δίαιτας σε συνδυασμό με την άσκηση (αριστερά) έναντι της μη παρέμβασης (δεξιά) στην AST



Γ. Συγκεντρωτική επίδραση της δίαιτας σε συνδυασμό με την άσκηση (αριστερά) έναντι της μη παρέμβασης (δεξιά) στην GGT





Σχήμα 6.3: Συγκεντρωτική επίδραση της δίαιτας σε συνδυασμό με την άσκηση στα επίπεδα Α) τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT), Β) ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST), Γ) γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάσης (GGT) και Δ) NAFLD activity score (NAS score).
ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης, **ΤΜΔ:** τυποποιημένη μέση διαφορά, **I^2:** I squared (δείκτης ετερογένειας).

Παρεμβάσεις σύγκρισης της σύστασης της δίαιτας

Τέσσερις μελέτες (Ryan et al., 2013, Arefhosseini et al., 2011, Kani et al., 2014, Rodriguez-Hernandez et al., 2011) αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής διαιτών μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (77 ασθενείς) σε σύγκριση με δίαιτες χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια (75 ασθενείς) για την αντιμετώπιση της NAFLD (***Σχήμα 6.4***). Τα χαρακτηριστικά των μελετών παρουσιάζονται στον ***Πίνακα 1 του παραρτήματος Α***. Τρεις μελέτες στόχευαν παράλληλα στην απώλεια βάρους (Arefhosseini et al., 2011, Rodriguez-Hernandez et al., 2011, Kani et al., 2014).

Επίδραση στα ηπατικά χαρακτηριστικά

Η επίδραση των δύο τύπων διαιτών στη μείωση των επιπέδων ALT και AST ήταν ανάλογη (***Πίνακας 6.1***). Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών ως προς τα επίπεδα ALT (Cochran's Q= 0,23, P=0,97, I^2= 0,0%) και AST (Cochran's Q= 4,50 (2), P=0,11, I^2= 55,6%) ήταν χαμηλή. Δεν υπήρχαν αρκετά δεδομένα για τον έλεγχο της επίδρασης της σύστασης της δίαιτας στα επίπεδα IHTG, στον δείκτη NAS και στις συγκεντρώσεις GGT (***Πίνακας 6.1***). Δεν παρατηρήθηκε σφάλμα ανάκλησης σε καμία από τις υπό διερεύνηση παραμέτρους (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Επίδραση σε ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

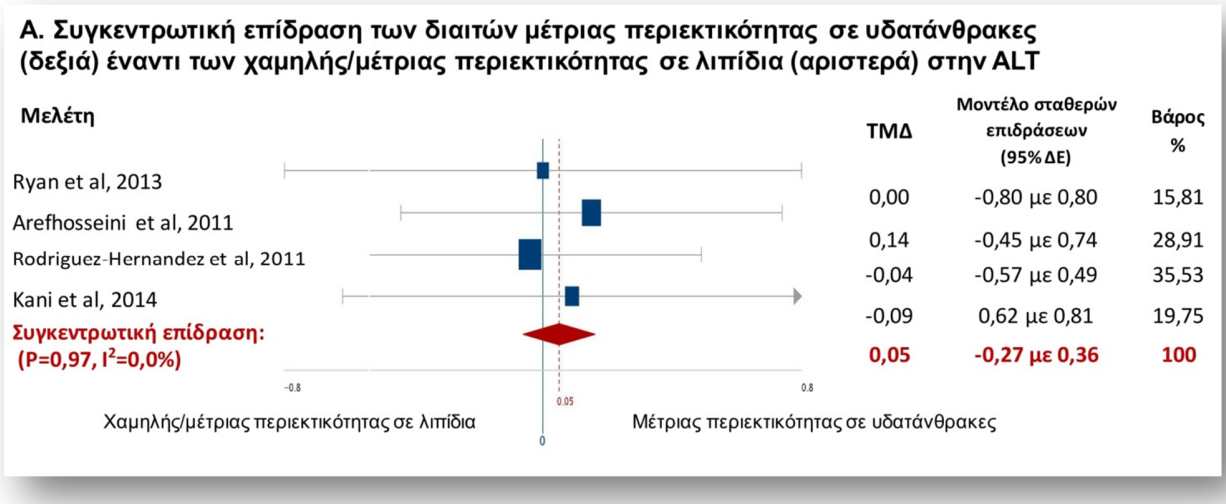
Η επίδραση των διαιτών μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια ήταν παρόμοιες όσον αοφορά τα επίπεδα σωματικού βάρους και ΔΜΣ (***Πίνακας 6.1***). Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών ήταν χαμηλή για το σωματικό βάρος (Cochran's Q= 3,12 (3), P=0,37, I^2= 3,9%) και τον ΔΜΣ (Cochran's Q= 1,11 (3), P=0,77, I^2= 0,0%). Ωστόσο, δεν υπήρχαν αρκετά δεδομένα για τη διερεύνηση της επίδραση των διαιτών στην ΠΜ. Δεν παρατηρήθηκε σφάλμα ανάκλησης (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

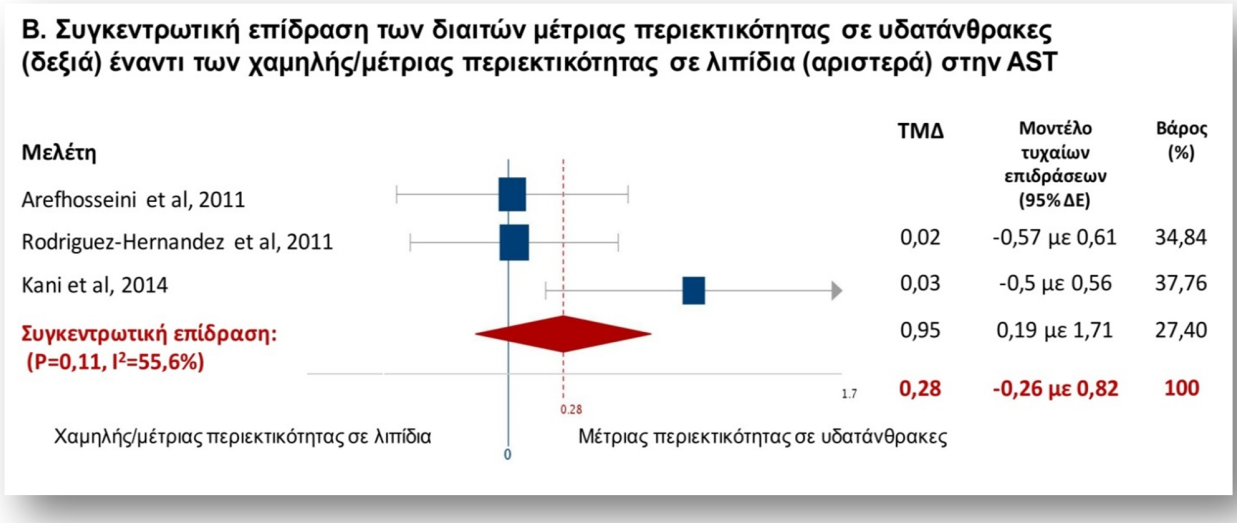
Επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης

Δεν υπήρχαν αρκετά δεδομένα για την επίδραση των δύο τύπων διαιτών στα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR και της HbA1c.

Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μετα-ανάλυσης τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών μελετών, στις οποίες η διάγνωση της NAFLD βασίστηκε σε τεχνικές απεικόνισης ή βιοψία ήπατος, υποστηρίζει την ευεργετική επίδραση της άσκησης μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με δίαιτα, στη διαχείριση της NAFLD.





Σχήμα 6.4: Συγκεντρωτική επίδραση των διαιτών μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες έναντι των χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια στα επίπεδα Α) τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT) και Β) ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST).
ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης, **ΤΜΔ:** τυποποιημένη μέση διαφορά, I^2: I squared (δείκτης ετερογένειας).

Αναφορικά με την επίδραση της σύστασης της δίαιτας, τόσο οι μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες δίαιτες, όσο και οι χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια, έδειξαν ανάλογες μειώσεις στα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων. Η απώλεια βάρους μαζί με την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης, ήταν οι κύριοι παράγοντες που συνέβαλαν στην ετερογένεια μεταξύ των μελετών παρέμβασης μόνο με πρωτόκολλα άσκησης, ενώ η απώλεια βάρους ήταν ο κύριος συντελεστής της ετερογένειας μεταξύ των μελετών που συνδύασαν τη δίαιτα με την άσκηση για την αντιμετώπιση της NAFLD.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προτείνουν ότι η άσκηση μεμονωμένα ασκεί μεγάλη επίδραση (ΤΜΔ=0,98) στα επίπεδα IHTG, η οποία παραμένει εξίσου μεγάλη ακόμα και επί απουσίας απώλειας βάρους (ΤΜΔ=0,86). Η αερόβια άσκηση σε σύγκριση με τη συνήθη αντιμετώπιση, φάνηκε να βελτιώνει τα περισσότερα ηπατικά χαρακτηριστικά, ενώ αντίστοιχα, τα οφέλη της άσκησης αντοχής ή του συνδυασμού της με την αερόβια άσκηση, φάνηκε να περιορίζονται μόνο στα IHTG. Παρόλα ταύτα, από την απευθείας σύγκριση της αερόβιας άσκησης με την άσκηση αντοχής, κανένας εκ των δύο τύπων άσκησης δεν προέκυψε ανώτερος του άλλου. Όσον αφορά την ένταση της άσκησης, η υψηλής έντασης προπόνηση φάνηκε να δρα πιο ευεργετικά στα επίπεδα IHTG, συγκριτικά με τη μέτριας έντασης προπόνηση ή την υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση. Ωστόσο, όταν λήφθηκε υπόψη και η διάρκεια της άσκησης, η μέτριας-προς-υψηλής διάρκειας μέτριας έντασης προπόνηση (δηλαδή ≥180 λεπτά/εβδομάδα) μείωσε περισσότερο τα επίπεδα IHTG συγκριτικά με την χαμηλής-προς-μέτριας διάρκειας μέτριας έντασης προπόνηση (δηλαδή ≥120 με <180 λεπτά/ εβδομάδα) ή την υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αυτή είναι η πρώτη μετα-ανάλυση που αξιολογεί την επίδραση της άσκησης στα ηπατικά χαρακτηριστικά, λαμβάνοντας υπόψη δύο βασικές παραμέτρους της άσκησης, δηλαδή την ένταση και την διάρκεια αυτής.

Επιπλέον, η άσκηση φάνηκε να επιδρά ευεργετικά στα επίπεδα όλων των ηπατικών ένζυμων (ALT, AST, GGT), καθώς και στις μεταβλητές HOMA-IR και HbA1c. Ενώ οι βελτιώσεις στον δείκτη HOMA-IR και στη HbA1c ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους, η απώλεια

βάρους φάνηκε να είναι απαραίτητη για τη βελτίωση των ηπατικών ενζύμων, καθώς αναλύοντας μόνο τις μελέτες χωρίς στατιστικά σημαντική απώλεια βάρους, δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες βελτιώσεις. Δυστυχώς δεν υπήρχαν δεδομένα για τον έλεγχο της επίδρασης της άσκησης στην ηπατική ιστολογία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μετα-ανάλυσης βρίσκονται σε ακολουθία με εκείνα παλιότερα δημοσιευμένων μετα-αναλύσεων. Η μετα-ανάλυση των *Musso* και *συν*., (Musso et al., 2012) κατάληξε σε αντίστοιχα αποτελέσματα αναφορικά με τα επίπεδα ALT, IHTG, ΠΜ και HbA1c, ωστόσο δε δόθηκαν πληροφορίες αναφορικά με τα υπόλοιπα ηπατικά ένζυμα, AST και GGT, όπως και για την επίδραση του τύπου, της έντασης ή της διάρκειας της άσκησης. Επιπλέον, οι συγγραφείς συμπεριέλαβαν RCTs δημοσιευμένες έως τον Νοέμβριο του 2011, ενώ σε κάποιες μελέτες ο ορισμός της NAFLD είχε βασιστεί μόνο στα αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων. Επιπλέον, σε μία άλλη μετα-ανάλυση που δημοσιεύτηκε την ίδια χρονιά (Keating et al., 2012), φάνηκε ότι η άσκηση μπορούσε να βελτιώσει τα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους, αλλά όχι την ALT. Ωστόσο, δεν δόθηκε καμία άλλη πληροφορία σχετικά με τα υπόλοιπα ηπατικά ένζυμα, ενώ η ανάλυση δε βασίστηκε εξ ολοκλήρου σε ασθενείς με NAFLD. Αναφορικά με τον τύπο και την ένταση της άσκησης, τα διαθέσιμα δεδομένα ήταν λιγοστά, γι' αυτό και οι ερευνητές της συγκεκριμένης μελέτης, περιορίστηκαν σε απλή ανασκόπηση αυτών. Επιπλέον, σύμφωνα με μία πρόσφατη μετα-ανάλυση και μετα-παλινδρόμηση από τους *Orci* και *συν.* (Orci et al., 2016), οι παρεμβάσεις με άσκηση συσχετίστηκαν με μείωση των ηπατικών ενζύμων ALT και AST, καθώς και του ενδοηπατικού λίπους. Ωστόσο, και σε αυτήν τη δημοσίευση το δείγμα της μελέτης δεν αποτελούνταν αποκλειστικά από ασθενείς με NAFLD. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες μελέτες που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση αφορούσαν παχύσαρκους ασθενείς, χωρίς συγκριμένη διάγνωση NAFLD, γεγονός που περιορίζει τη σημασία των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής στον υπό μελέτη πληθυσμό.

Όσον αφορά την ένταση της άσκησης, η υπάρχουσα βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η υψηλής έντασης άσκηση έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στη διατήρηση του γλυκαιμικού ελέγχου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Umpierre et al., 2013) και προσφέρει μεγαλύτερη καρδιο-

προστασία (Rankin et al., 2012), ωστόσο από τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα, δεν έχει αναφερθεί κάποιο σαφές πλεονέκτημα της μέτριας έντασης προπόνηση έναντι της υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση ή αντιστρόφως (Fisher et al., 2015, Sawyer et al., 2016). Ομοίως, η σημερινή μετα-ανάλυση υποστηρίζει ότι η άσκηση θα πρέπει να ενθαρρύνεται σε όλους τους ασθενείς με NAFLD, ειδικά στα άτομα που δεν μπορούν να ακολουθήσουν κάποια συγκεκριμένη δίαιτα ή σε συνδυασμό με δίαιτα, για καλύτερα αποτελέσματα (Marchesini et al., 2016). Καθώς δεν υπάρχουν συγκεκριμένες συστάσεις για την άσκηση (Mahady and George, 2016), αυτή η μετα-ανάλυση υποδεικνύει ότι ακόμα και με μικρότερης διάρκειας, μέτριας έντασης άσκηση, τα άτομα με NAFLD μπορούν να ωφεληθούν, παρά την υπεροχή της μεγαλύτερης διάρκειας ή έντασης άσκησης. Ωστόσο, σε περίπτωση έλλειψης χρόνου, η υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θέση της μέτριας έντασης άσκηση ως αποτελεσματική εναλλακτική λύση.

Ο υποκείμενος μηχανισμός μέσω του οποίου η άσκηση επιδρά ευεργετικά στο ενδοηπατικό λίπος και τα ηπατικά ένζυμα δεν είναι πλήρως κατανοητός. Εκτός από τις γνωστές βελτιώσεις που προκαλεί στα επίπεδα της γλυκόζης και την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Borghouts and Keizer, 2000, van der Heijden et al., 2009), πειράματα σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η άσκηση προκαλεί πολλές ηπατικές μεταβολικές προσαρμογές συμπεριλαμβανομένης (α) της μείωσης των διαθέσιμων υποστρωμάτων (τριγλυκεριδίων ορού και/ή ελεύθερων λιπαρών οξέων), (β) της αύξησης της μιτοχονδριακής οξείδωσης των λιπιδίων, (γ) της μείωσης της de novo λιπογένεσης και (δ) της μείωσης των αποθεμάτων λίπους (Trefts et al., 2015a). Επιπλέον, η άσκηση έχει συσχετιστεί με εξασθένιση του σχετιζόμενου με την NAFLD στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που έχει συνδεθεί με ηπατική στεάτωση, αντίσταση στην ινσουλίνη, φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και ηπατοκυτταρική βλάβη, παράγοντες που συμβάλλουν στην ηπατική δυσλειτουργία (Passos et al., 2015).

Οι βασισμένες στον συνδυασμό δίαιτας και άσκησης παρεμβάσεις έδειξαν βελτιώσεις όχι μόνο στα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων, αλλά επίσης και στην ιστολογία του ήπατος, όπως αυτή αξιολογήθηκε με τον δείκτη NAS. Οι βελτιώσεις στα επίπεδα της ALT από τις

παρεμβάσεις δίαιτας και άσκησης ήταν μεγαλύτερες από εκείνες που παρατηρήθηκαν από τις παρεμβάσεις άσκησης μόνο. Επιπλέον, η απώλεια βάρους φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση των ηπατικών ενζύμων, καθώς παρατηρήθηκαν ευεργετικά αποτελέσματα μόνο υπό συνθήκες απώλειας βάρους. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με εκείνα των *Musso* και *συν.* (Musso et al., 2012), γεγονός που υποδηλώνει ότι η απώλεια βάρους μέσω των παρεμβάσεων αλλαγής του τρόπου ζωής είναι ασφαλής και μπορεί να βελτιώσει ιστολογικές και μεταβολικές παραμέτρους της NAFLD. Αξίζει να σημειωθεί, ότι αν και τα αποτελέσματα των δύο πρόσφατα δημοσιευμένων παρεμβατικών μελετών φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα (Wong et al., 2013, Vilar-Gomez et al., 2015), η παρούσα μετα-ανάλυση δεν κατόρθωσε να εξάγει κάποιο συμπέρασμα αναφορικά με το ακριβές ποσοστό της απαιτούμενης απώλειας βάρους για την επίλυση της NAFLD, λόγω ανεπαρκών δεδομένων.

Όσον αφορά στην επίδραση της σύστασης της δίαιτας, παραμένει αμφιλεγόμενο κατά πόσο οι προσλαμβανόμενοι μέσω της δίαιτας υδατάνθρακες ή τα λιπίδια παρουσιάζουν αρνητικότερες συνέπειες στη λειτουργία του ήπατος. Τόσο η υπερβολική πρόσληψη λιπιδίων (Vilar et al., 2008, Ragab et al., 2015), όσο και υδατανθράκων (Abdelmalek et al., 2010b, Moore et al., 2014) (κυρίως με τη μορφή σακχάρων), που συνοδεύεται από υπερβολική πρόσληψη ενέργειας (Chung et al., 2014) έχουν προταθεί ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της NAFLD. Η παρούσα μετα-ανάλυση υποστηρίζει ότι τόσο οι μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες δίαιτες (δηλαδή, ποσοστό πρόσληψης υδατανθράκων ≤ 45% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) όσο και οι χαμηλής/μέτριας περιεκτικότητας σε λιπίδια (δηλαδή, ποσοστό πρόσληψης λίπους ≤ 30% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) μπορούν εξίσου να βελτιώσουν τη λειτουργία του ήπατος, όπως απεικονίζεται από τις μειώσεις των ALT και AST. Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ διαιτών χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (δηλαδή, ποσοστό πρόσληψης υδατανθράκων < 40% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) και διαιτών χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (δηλαδή, ποσοστό πρόσληψης λιπιδίων < 25% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) ήταν αδύνατη, επειδή δεν υπήρχαν αρκετές RCTs. Παρόλα αυτά, οι *Browning* και *συν.* (Browning et al., 2011) έδειξαν ότι μία δίαιτα πολύ χαμηλή

σε υδατάνθρακες (< 20 γρ. / ημέρα), σε σύγκριση με μία δίαιτα με περιεκτικότητα λιπιδίων στο 34% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης, θα μπορούσε να επιδρά ευεργετικά στα επίπεδα IHTG. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων, κυρίως με τη μορφή φρουκτόζης, μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για NAFLD μέσω αύξησης της ηπατικής de novo λιπογένεσης, παρακάμπτοντας το σημείο ελέγχου της φωσφοφρουκτοκινάσης, όπου ο γλυκολυτικός ρυθμός περιορίζεται λόγω έλλειψης κιτρικού και ATP (Chong et al., 2007). Στη παρούσα ανάλυση, υπήρχε μεγάλη διακύμανση στη σύσταση των διαιτών που χορηγήθηκαν στις αντίστοιχες μελέτες και γι'αυτό προχωρήσαμε στην μάλλον ευρεία κατηγοριοποίηση των «μέτριων σε υδατάνθρακες» και «χαμηλών/ μέτριων σε λιπίδια» διαιτών. Ωστόσο, μία τέτοια κατηγοριοποίηση δεν επιτρέπει σαφείς ερμηνείες για την κλινική πρακτική και περισσότερες μελέτες απαιτούνται σε αυτό το πεδίο προκειμένου μελλοντικές συγκρίσεις μεταξύ των διάφορης σύστασης διαιτών να είναι εφικτές.

Ένας περιορισμός αυτής της μετα-ανάλυσης ήταν η σημαντική ετερογένεια μεταξύ των διαθέσιμων μελετών, η οποία θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πριν τη γενίκευση των παρόντων ευρημάτων. Ωστόσο, για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, η πηγή της ετερογένειας διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση της μετα-παλινδρόμησης. Όσον αφορά το σφάλμα δημοσίευσης, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να μην έχουν συμπεριληφθεί μελέτες που αναφέρουν μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, που συχνά παραμένουν αδημοσίευτα και ως εκ τούτου το ενδεχόμενο της ανάλυσης μόνο μελετών με θετικά αποτελέσματα δεν μπορεί να αποκλειστεί. Παρ' όλα αυτά, η ποιότητα των συμπεριλαμβανομένων μελετών εκτιμήθηκε, χρησιμοποιώντας τόσο το εργαλείο *Cochrane Risk Bias Tool*, ενώ έγινε και προσπάθεια επικοινωνίας με τους συγγραφείς των μελετών για την εξακρίβωση των αποτελεσμάτων τους. Συνεπώς, θεωρείται ότι η παρουσία σφάλματος δημοσίευσης έχει αμελητέα επίδραση στα τρέχοντα ευρήματά μας. Σε άλλους περιορισμούς συμπεριλαμβάνεται και το γεγονός ότι μόνο μελέτες που δημοσιεύθηκαν στην αγγλική γλώσσα συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ανάλυση, καθώς ήταν αδύνατο να εκτιμηθούν μελέτες γραμμένες σε άλλες γλώσσες. Επιπλέον, ο έλεγχος άλλων παραγόντων κατά την

ανάλυση, όπως είναι η σύσταση σώματος, οι αλλαγές της οποίας θα μπορούσαν αναμφίβολα να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης, δεν κατέστη δυνατός λόγω έλλειψης αντίστοιχων στοιχείων. Επιπλέον, αν και οι αλλαγές στα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων έχουν μεγάλη κλινική σημασία στη διαχείριση της NAFLD, η ομαλοποίηση των επιπέδων τους, ιδίως εκείνων της ALT, είναι σίγουρα μια πιο ισχυρή ένδειξη επίλυσης της NAFLD. Ωστόσο, τέτοιου είδους δεδομένα δεν ήταν διαθέσιμα στις περισσότερες RCTs και ως εκ τούτου δεν μπορούσε δυστυχώς να εκτελεστεί μία μετα-ανάλυση με ένα τέτοιο καταληκτικό σημείο. Επιπλέον, κανένα συμπέρασμα δεν μπορούσε να εξαχθεί για τη βέλτιστη επίδραση της άσκησης, λαμβάνοντας υπόψη ταυτόχρονα τον τύπο, την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης, καθώς επίσης και για τη βέλτιστη σύσταση της δίαιτας, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας των πρωτοκόλλων δίαιτας και άσκησης των RCTs που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση.

Τα αποτελέσματα της 3^{ης} μελέτης έχουν γίνει δεκτά προς δημοσίευση με τη μορφή πρωτότυπης εργασίας στο περιοδικό Metabolism – Clinical and Experimental [Katsagoni CN, Georgoulis M, Papatheodoridis GV, Panagiotakos DB, Kontogianni MD. Effects of lifestyle interventions on clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. Metabolism (2016), doi: 10.1016/j.metabol.2016.12.006].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:

4η ΜΕΛΕΤΗ: Η επίδραση της μεσογειακής δίαιτας και του μεσογειακού τρόπου ζωής σε βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος

Εισαγωγή

Η NAFLD, καθώς και η προοδευτικά εμφανιζόμενη μορφή της, η νεκροφλεγμονώδης στεατοηπατίτιδα αποτελούν τις επικρατέστερες μορφές ηπατικής νόσου στις δυτικές κοινωνίες (EASL-EASD-EASO, 2016). Οι ασθενείς με NAFLD βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Miele and Targher, 2015) και ΣΔτ2 (Kasturiratne et al., 2013), εμφανίζοντας παράλληλα αυξημένα ποσοστά θνητότητας από τα σχετιζόμενα ή μη με το ήπαρ νοσήματα, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (Levene and Goldin, 2012). Η αντίσταση στην ινσουλίνη εμπλέκεται σημαντικά στην ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης, ενώ συμβάλλει και στην εξέλιξη της νόσου σε NASH (Marchesini et al., 2001). Προς το παρόν, δεν υπάρχει καμία αποδεδειγμένη, ασφαλής και αποτελεσματική φαρμακευτική ή χειρουργική θεραπεία για την αντιμετώπιση της NAFLD ή της NASH, και η τροποποίηση του τρόπου ζωής παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας τους.

Η δίαιτα, είναι ένας τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για την NAFLD που μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί τόσο σε επίπεδο πρόληψης όσο και σε επίπεδο αντιμετώπισης της νόσου. Παρόλο που δεν υπάρχουν σαφώς διατυπωμένες διατροφικές συστάσεις για τη διαχείριση της NAFLD, τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα προτείνουν απώλεια βάρους 5-10% (Patel et al., 2015), μείωση του κορεσμένου λίπους, περιορισμό της φρουκτόζης και άλλων απλών υδατανθράκων (Chiu et al., 2014, Neuschwander-Tetri, 2013) και αντικατάστασή τους με σύνθετους υδατάνθρακες, μέσω της αύξησης κατανάλωσης ελάχιστα επεξεργασμένων δημητριακών προϊόντων (Georgoulis et al., 2014) και των τροφίμων πλούσιων σε διαιτητικές ίνες (Ross et al., 2013), όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά.

Η μεσογειακή δίαιτα (ΜΔ) είναι ένα διατροφικό πρότυπο, ευρέως σχετιζόμενο με ευνοϊκά αποτελέσματα για την υγεία, κυρίως όσον αφορά τη θνησιμότητα, τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο και καρκίνο, και την ποιότητα ζωής (Sofi et al., 2008, Sofi et al., 2010). Επιπλέον, σύμφωνα με τους *Kastorini* και *συν*. (Kastorini et al., 2011), η υιοθέτηση ενός τέτοιου προτύπου, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης τόσο του μεταβολικού συνδρόμου αλλά και των συνιστωσών αυτού, ενώ παράλληλα ευνοεί τη λύση του. Δεδομένης της στενής σχέσης της NAFLD με το ΣΔτ2 και το ΜΣ, η επίδραση της ΜΔ στην εμφάνιση, εξέλιξη και την αντιμετώπιση της NAFLD, έχει αποτελέσει πεδίο νέου επιστημονικού και ερευνητικού ενδιαφέροντος. Τα επιδημιολογικά δεδομένα σε πληθυσμό με NAFLD αναφέρουν ότι η μεγαλύτερη υιοθέτηση της ΜΔ, όπως αποτιμάται μέσω του δείκτη MedDietScore, συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας ΜΣ σε ασθενείς με NAFLD (Georgoulis et al., 2015) καθώς με μειωμένη βαρύτητα της νόσου (Kontogianni et al., 2014). Από τα ελάχιστα δεδομένα σε επίπεδο κλινικών μελετών, στη μη-ελεγχόμενη μελέτη παρέμβασης των *Trovato* και *συν*. (Trovato et al., 2015), η αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ, παράλληλα με μείωση του ΔΜΣ και αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοηπατικού λίπους, όπως εκτιμήθηκε από το δείκτη *bright liver score*. Επίσης, σε μία μικρή τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη ελεγχόμενη κλινική μελέτη των *Ryan* και *συν*. (Ryan et al., 2013), η αύξηση του βαθμού προσκόλλησης στη ΜΔ σε σχέση με μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (ομάδα ελέγχου) για 6 εβδομάδες, χωρίς θερμιδικό περιορισμό, βελτίωσε σημαντικά τον βαθμό ηπατικής στεάτωσης, ινσουλινοευαισθησίας και τον βαθμό ίνωσης, χωρίς αντίστοιχες αλλαγές στην ομάδα ελέγχου. Τέλος, σε μία πρόσφατα δημοσιευμένη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη παρέμβασης των *Misciagna* και *συν*. (Misciagna et al., 2016) η προσκόλληση σε μία χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη ΜΔ χωρίς θερμιδικό περιορισμό, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που έλαβε συστάσεις για μία υγιεινή δίαιτα βασισμένες στις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Έρευνας Τροφίμων και Διατροφής της Ιταλίας, είχε ως αποτελέσμα μεγαλύτερη βελτίωση του δείκτη NAFLD score, όπως εκτιμήθηκε υπερηχογραφικά, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Πρόσφατα, η πυραμίδα της ΜΔ αναθεωρήθηκε (Bach-Faig et al., 2011) και πλέον δίνει έμφαση, πέρα από τις διατροφικές

επιλογές και σε άλλες πτυχές του μεσογειακού τρόπου ζώης, όπως στην επαρκή διάρκεια ύπνου και στη μεσημεριανή ξεκούραση (σιέστα), καθώς στην ενίσχυση της σωματική δραστηριότητας ως μέρος της καθημερινή οικογενειακής ζωής.

Λαμβάνοντας υπόψη τις συστάσεις αυτής της αναθεωρημένη πυραμίδας, τα αποτελέσματα των μελετών 1-2 της παρούσας διατριβής που ανέδειξαν τη συνεισφορά ενός υγιεινού διατροφικού προτύπου, των συνιστώμενων ωρών ύπνου, καθώς και της αυξημένης σωματικής δραστηριότητας έναντι μειωμένων πιθανοτήτων παρουσίας της NAFLD, ή και με βελτιωμένη αντίσταση στην ινσουλίνη και βελτιωμένη ηπατική ακαμψία, αλλά και τα αποτελέσματα της μελέτης 3 που επίσης υπογράμμισαν τη σημασία της φυσικής δραστηριότητας ως μέσο αντιμετώπισης της νόσου, ακόμη και επί απουσίας απώλειας βάρους, σχεδιάσαμε μία μελέτη παρέμβασης σε ασθενείς με NAFLD. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μελέτης ($4^{η}$ μελέτη) ήταν ο σχεδιασμός και η υλοποίηση μίας ελεγχόμενης τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής για τη διερεύνηση των πιθανών ευεργετικών επιδράσεων μιας παρέμβασης βασισμένης α) στη ΜΔ, παράλληλα με απώλεια βάρους, σε κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD, διαγνωσμένης μέσω υπερήχου, συγκριτικά με τη συνήθη πρακτική αντιμετώπισης, και β) στη διερεύνηση της επιπλέον ευνοϊκής επίδρασης που θα μπορούσε να προκύψει από την συμμόρφωση σε έναν μεσογειακό τρόπο ζωής, συγκριτικά με τη συμμόρφωση στη ΜΔ αυτή καθαυτή.

Μεθοδολογία

Πληθυσμός της μελέτης

Στη μελέτη εντάχθηκαν προοπτικά ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση NAFLD, που παρακολουθούνταν από την Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό» καθώς και την Β’ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο». Η στρατολόγηση των εθελοντών πραγματοποιήθηκε από τον Απρίλιο του 2013 έως και τον Απρίλιο του 2016. Συνολικά, αξιολογήθηκαν 76 ασθενείς, εκ των οποίων οι 63 κρίθηκαν κατάλληλοι για συμμετοχή στη μελέτη (***Βλ. διάγραμμα ροής, Σχήμα 7.1***). Η διάγνωση της

NAFLD βασίστηκε στην αυξημένη συγκέντρωση της ALT με ή χωρίς αυξημένη GGT, και στην παρουσία ηπατικής στεάτωσης που πιστοποιήθηκε μέσω υπερηχογραφήματος ή/και βιοψίας ήπατος, επί απουσίας άλλου αιτίου πρόκλησης ηπατικής στεάτωσης ή ηπατικής βλάβης.

Ειδικότερα, τα **κριτήρια εισόδου** στη μελέτη ήταν:

1) Ηλικία 18 - 65 ετών,
2) αυξημένες συγκεντρώσεις ALT με ή χωρίς αυξημένες συγκεντρώσεις GGT,
3) ευρήματα ηπατικής στεάτωσης σε υπερηχογράφημα και/ή βιοψία ήπατος,
4) ΔΜΣ: 25 - 40 Kg / m^2.

Τα **κριτήρια αποκλεισμού** από τη μελέτη ήταν:

1) Ανίχνευση αντιγόνου επιφάνειας του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg) ή αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C (anti-HCV) ή αντισωμάτων έναντι του HIV,
2) κατανάλωση αλκοόλ >210 γρ. ή >140 γρ. την εβδομάδα για άνδρες ή γυναίκες, αντίστοιχα,
3) λήψη δυνητικά ηπατοτοξικού φαρμάκου (π.χ αμιωδαρόνης, βαλπροϊκού, γλυκοκορτικοστεροειδών, ταμοξιφαίνης, μεθοτρεξάτης και άλλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων),
4) παρουσία συστηματικής πάθησης με δυνητικά ηπατική συμμετοχή,
5) παρουσία σακχαρώδους διαβήτη,
6) πρόσφατη απώλεια βάρους (τουλάχιστον 6 μήνες πριν την εισαγωγή στη μελέτη).

Κάθε άτομο που συμμετείχε στην εν λόγω έρευνα ενημερωνόταν για τις διαδικασίες της μελέτης και συμφωνούσε εγγράφως για τη συμμετοχή του (Βλ. Παράρτημα Β, έντυπο Ι). Όλα τα στοιχεία που συλλέγονταν ήταν εμπιστευτικά. Η μελέτη ακολούθησε την Κοινοτική Οδηγία 28/2005/ΕC για την προστασία των συμμετεχόντων σε «Κλινικές Δοκιμές», ενώ έλαβε έγκριση ως προς τον σχεδιασμό, τις διαδικασίες και τους στόχους της από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (Γ.Σ. 3/28.02.2013) και συγκαταλέγεται στα μητρώα του Αμερικανικού Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας *(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01894438).*

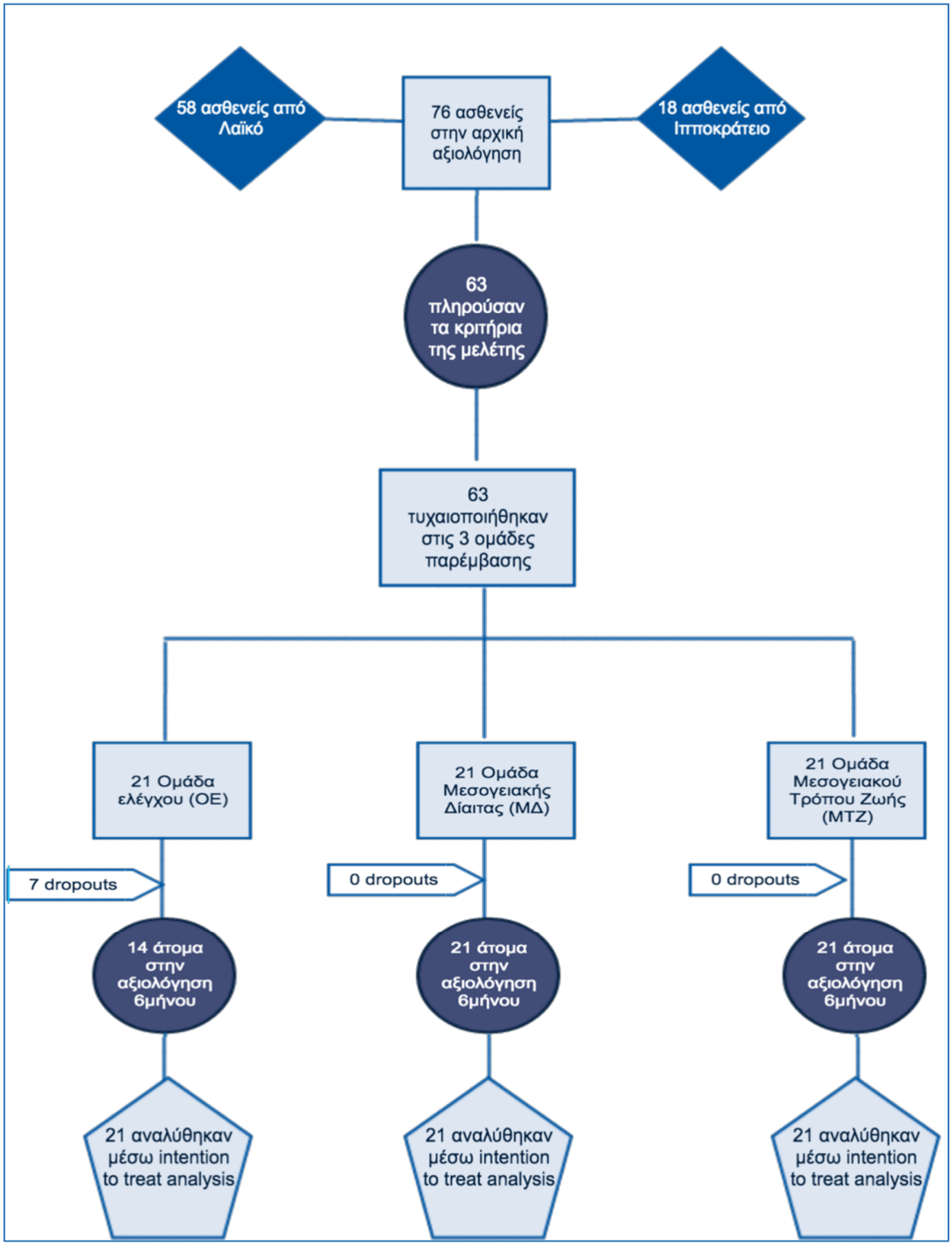
Σχεδιασμός της μελέτης

Παραπομπτή ασθενών

Όλοι οι ασθενείς κατά την αρχική εκτίμηση υποβάλλονταν σε πλήρη κλινική εξέταση, συνήθη εργαστηριακό έλεγχο και διατροφική αξιολόγηση, όπως αναλύεται διεξοδικά παρακάτω. Για κάθε εθελοντή, η ιατρική ομάδα έλεγχε τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού της μελέτης. Από τα ιατρικά αρχεία των ασθενών καταγράφονταν οι μείζονες κλινικές καταστάσεις και διαπιστωνόταν το αρνητικό της ύπαρξης αντιγόνου HBsAg, αντισωμάτων HIV & anti-HCV, σακχαρώδους διαβήτη και πάθησης με ηπατική συμμετοχή ή η λήψη ηπατοτοξικών φαρμάκων. Όσον αφορά την κατανάλωση αλκοόλ, όλοι οι συμμετέχοντες αξιολογούνταν ως προς τον αριθμό ποτών που κατανάλωναν ανά εβδομάδα, και η κατανάλωση επιβεβαιωνόταν από τους συγγενείς ή τους φίλους αυτών, με σκοπό τη διαφορική διάγνωση της αλκοολικής από τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Για την καταγραφή της φαρμακευτικής αγωγής των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ο ιατρικός φάκελος. Όλοι οι ασθενείς κλήθηκαν να αναφέρουν την αλλαγή ή λήψη τυχόν πρόσθετων φαρμάκων ή συμπληρωμάτων διατροφής, καθ' όλη τη χρονική διάρκεια της μελέτης.

Τυχαιοποίηση των ασθενών στις ομάδες παρέμβασης

Η μελέτη ήταν τυχαιοποιημένη, μονά-τυφλή και ελεγχόμενη. Οι συμμετέχοντες ασθενείς εντάσσονταν τυχαία σε μία από τις παρακάτω τρεις ομάδες: (Α) ομάδα ελέγχου (ΟΕ), (Β) ομάδα της μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) ή (Γ) ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ). Η τυχαιοποίηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα τυχαίων αριθμών. Κάθε ασθενής λάμβανε έναν μοναδικό κωδικό αριθμό που αντιστοιχούσε σε μία εκ των τριών ομάδων παρέμβασης, ενώ δεν ενημερώνονταν για τον πραγματικό σκοπό της μελέτης, ούτε για την ύπαρξη των άλλων ομάδων. Όλοι οι ερευνητές και το προσωπικό της μελέτης ήταν πλήρως ενημερωμένοι για τους σκοπούς της μελέτης.



Σχήμα 7.1: Διάγραμμα ροής της κλινικής μελέτης (**dropouts**: εγκαταλείψαντες, **intention to treat analysis**: ανάλυση «πρόθεση για θεραπεία»).

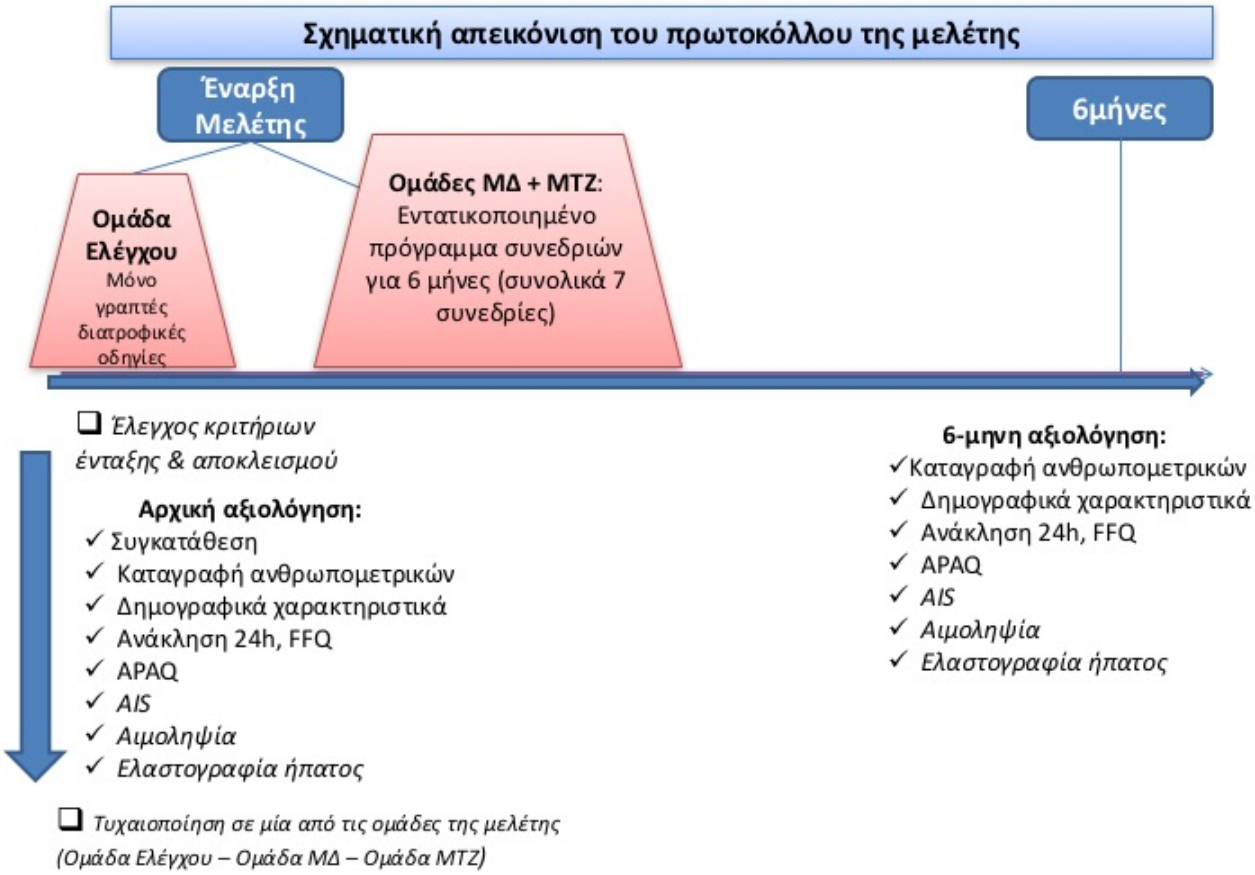
Κατά την αρχική εκτίμηση, σε όλους τους εθελοντές και των τριών ομάδων δόθηκε ενδεικτικό υποθερμιδικό διαιτολόγιο με παρόμοια ποσοστιαία ανάλυση μακροθρεπτικών συστατικών: 45% υδατάνθρακες, 20% πρωτεΐνες, 35% λιπίδια και παρείχε 1500 Kcal στις γυναίκες και 1800 Kcal στους άνδρες. Στο διαιτολόγιο των ομάδων παρέμβασης δόθηκε επιπλέον έμφαση σε τρόφιμα του μεσογειακού προτύπου σύμφωνα με τις συστάσεις της νέας μεσογειακής πυραμίδας (Bach-Faig et al., 2011) και τις Διατροφικές Οδηγίες για Έλληνες του Υπουργείου Υγείας (1999).

Η ομάδα ελέγχου, κατά την αρχική εκτίμηση, εκτός από τη χορήγηση του υποθερμιδικού διαιτολογίου, έλαβε επιπλέον γενικές γραπτές διατροφικές οδηγίες για έναν υγιεινό τρόπο ζωής, χωρίς άλλου είδους παρέμβαση μέχρι τον επανέλεγχο, έξι μήνες μετά (Βλ. Παράρτημα Β, έντυπο ΙΙ).

Το πρωτόκολλο της μελέτης περιγράφεται αναλυτικά στο ***Σχήμα 7.2*.**

Διαιτητική παρέμβαση και παρακολούθηση στις ομάδες ενταντικής παρέμβασης

Οι συμμετέχοντες ασθενείς στις ομάδες Β (ομάδα ΜΔ) και Γ (ομάδα ΜΤΖ) ακολούθησαν πιο εντατικό πρόγραμμα παρέμβασης, αποτελούμενο από επτά 60λεπτες ομαδικές συνεδρίες (3-5 ατόμων), πραγματοποιούμενες κάθε δυο εβδομάδες για τους πρώτους δύο μήνες και κάθε μήνα για τους επόμενους τέσσερις μήνες, ως την επαναξιολόγησή τους στο τέλος του εξαμήνου. Η διαιτητική παρέμβαση και παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Διατροφής & Κλινικής Διαιτολογίας στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο μέσω συμβουλευτικών συνεδριών. Η συμβουλευτική βασίστηκε στη θεωρία θέσπισης στόχων (Locke and Latham, 1994), ενώ επίσης χρησιμοποιήθηκαν στρατηγικές κινήτρων και συμπεριφοράς, δηλαδή ανίχνευση της ετοιμότητας, αμφιθυμίας και αυτο-αποτελεσματικότητας, χρήση της αυτο-παρακολούθησης, του ελέγχου του ερεθίσματος και τεχνικές επίλυσης προβλημάτων, διαχείρισης καταστάσεων υψηλού κινδύνου και εκπαίδευση της πρόληψης υποτροπών (Rollnick et al., 1999, Gable, 2007).



Σχήμα 7.2: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της μελέτης.

APAQ: Ερωτηματολόγιο εκτίμησης φυσικής δραστηριότητας (*Athens Physical Activity Questionnaire*) (Kavouras et al., 2016), **AIS:** Ερωτηματολόγιο διάρκειας & ποιότητας ύπνου (*Athens Insomnia Scale*) (Soldatos et al., 2003) **FFQ:** Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (Bountziouka et al., 2012), **Ομάδα ΜΔ**: ομάδα μεσογειακής δίαιτας, **Ομάδα MTZ**: ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής.

Εκτός από το υποθερμιδικό μεσογειακού τύπου διαιτολόγιο που δόθηκε στις ομάδες ενταντικής παρέμβασης, στην ομάδα ΜΔ δόθηκε έμφαση στα τρόφιμα που απαρτίζουν τη δίαιτα αυτή, χωρίς να δοθεί καμία οδηγία για αλλαγή του επιπέδου φυσικής δραστηριότητας. Στην ομάδα MTZ δόθηκαν επιπλέον πληροφορίες για την εποχικότητα και την εντοπιότητα των τροφίμων, καθώς και τον κοινωνικό χαρακτήρα των γευμάτων. Επιπλέον, δόθηκαν οδηγίες για

επαρκή ανάπαυση κατά τη διάρκεια της ημέρας και βελτίωση των ωρών βραδινού ύπνου με στόχο την ακολουθία της συνιστώμενης διάρκειας ύπνου, δηλαδή ≥7 και ≤9 ώρες/ημέρα. Επιπλέον, για την υιοθέτηση ενός πιο δραστήριου τρόπου ζωής συστήθηκε η ενασχόληση με μέτριας-έντονης έντασης σωματική δραστηριότητα τουλάχιστον 30 λεπτά ανά ημέρα, για παράδειγμα γρήγορο ή πολύ γρήγορο περπάτημα, αργό ή γρήγορο τρέξιμο, ενασχόληση με την κηπουρική, χορό, τένις κ.ά. Για την ενίσχυση αυτής της συμπεριφοράς, κάθε εθελοντής λάμβανε έναν βηματομετρητή (TANITA PD- 724) με σκοπό τη σταδιακή αύξηση των βημάτων του και με τελικό στόχο τα 10.000 βήματα ανά ημέρα. Οι διατροφικοί στόχοι των ομάδων παρέμβασης φαίνονται επιγραμματικά στον ***Πίνακα 7.1***.

Πίνακας 7.1: Στόχοι των ομάδων παρέμβασης επιγραμματικά

	ΟΜΑΔΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ (ΜΔ)	**ΟΜΑΔΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ (ΜΤΖ)**
Στόχοι σε κάθε συνεδρία:	- Μείωση σωματικού βάρους: - ↓ 5-10% του αρχικού βάρους	- Μείωση σωματικού βάρους: - ↓ 5-10% του αρχικού βάρους - ↑φυσικής δραστηριότητας: τουλάχιστον 30 λεπτά/ημέρα
Συνεδρία 1η : (φρούτα-λαχανικά)	- 3-6 φρούτα/ ημέρα (έμφαση σε ποικιλία και χρώμα) - Τουλάχιστον 1 σαλάτα/ημέρα [ποικιλία σε χρώμα & υφή]	- 3-6 φρούτα/ ημέρα (έμφαση σε ποικιλία και χρώμα και φρούτα εποχής) - Τουλάχιστον 1 σαλάτα/ημέρα [ποικιλία σε χρώμα, υφή και λαχανικά εποχής] - Διανομή βηματομετρητών
Συνεδρία 2η : (γαλακτοκομικά – δημητριακά)	- Τουλάχιστον 3 μερίδες ελάχιστων επεξεργασμένων δημητριακών (1 μερίδα = 1φ. ψωμί, ½ κούπα ρύζι, ζυμαρικά κ.ά.) - 2-3 μερίδες γιαούρτι, τυρί ή γάλα/ ημέρα [κατά προτίμηση (ημι-άπαχα]	- Τουλάχιστον 3 μερίδες ελάχιστων επεξεργασμένων δημητριακών (1 μερίδα = 1φ. ψωμί, ½ κούπα ρύζι, ζυμαρικά κ.ά.) - 2-3 μερίδες σε γιαούρτι, τυρί ή γάλα/ ημέρα [κατά προτίμηση ημι-άπαχα] - Έμφαση στην εποχικότητα των τροφίμων

Συνεδρία 3η : (ελαιόλαδο, ξηροί καρποί, ελιές)	- Μείωση ποσότητας του ελαιόλαδου που χρησιμοποιείται και αντικατάσταση άλλων πηγών λίπους από έξτρα παρθένο ελαιόλαδο - - 1-2 μερίδες ελιές/ ξηρούς καρπούς (ανάλατους)/ ημέρα	- Μείωση ποσότητας του ελαιόλαδου που χρησιμοποιείται και αντικατάσταση άλλων πηγών λίπους από ελαιόλαδο [Προτίμηση σε τοπικό & έξτρα παρθένο ελαιόλαδο] - 1-2 μερίδες ελιές/ ξηρούς καρπούς (ανάλατους)/ ημέρα - Οδηγία για ↑ της ξεκούρασης/ ↑ ύπνου το μεσημέρι
Συνεδρία 4η : (λευκό κρέας – ψάρια)	- 2 μερίδες κοτόπουλο ή κουνέλι ή γαλοπούλα/εβδ. [1 μερίδα = 120 γρ. μαγειρεμένου τροφίμου] - ≥2 μερίδες λιπαρού ψαριού-θαλασσινών/ εβδομάδα [1 μερίδα = 120-150 γρ. μαγειρεμένου τροφίμου]	- 2 μερίδες κοτόπουλο ή κουνέλι ή γαλοπούλα/εβδ. [1 μερίδα = 120 γρ. μαγειρεμένου τροφίμου] - ≥2 μερίδες λιπαρού ψαριού-θαλασσινών/ εβδομάδα [1 μερίδα = 120-150 γρ. μαγειρεμένου τροφίμου]
Συνεδρία 5η : (πατάτες – γλυκά)	- 3 πατάτες στο μέγεθος αυγού/ εβδομάδα - ≤2 μερίδες γλυκών/ εβδομάδα στη μικρότερη δυνατή ποσότητα [έμφαση σε γλυκά χωρίς ζωικό λίπος π.χ. γλυκά του κουταλιού, ρυζόγαλο, λουκούμια, παστέλι, μαντολάτο, χαλβά]	- 3 πατάτες στο μέγεθος αυγού/ εβδομάδα - ≤2 μερίδες γλυκών/ εβδομάδα στη μικρότερη δυνατή ποσότητα [έμφαση σε γλυκά χωρίς ζωικό λίπος π.χ. γλυκά του κουταλιού, ρυζόγαλο, λουκούμια, παστέλι, μαντολάτο, χαλβά]
Συνεδρία 6η : (κόκκινο κρέας – κρεατοσκευάσματα)	- <2 μερίδες κόκκινου κρέατος/ εβδομάδα [κατά προτίμηση άπαχα μέρη, 1 μερίδα = 60 γρ. μαγειρεμένου τροφίμου] - < 30 γρ. κρεατοσκευασμάτων/ εβδ.	- <2 μερίδες κόκκινου κρέατος/ εβδομάδα [κατά προτίμηση άπαχα μέρη, 1 μερίδα = 60 γρ. μαγειρεμένου τροφίμου] - < 30 γρ. κρεατοσκευασμάτων/ εβδ. -
Συνεδρία 7η : (όσπρια – αυγά)	- ≥2 μερίδες όσπρια/ εβδομάδα - 2-4 αυγά/ εβδομάδα -	- ≥2 μερίδες όσπρια/ εβδομάδα - 2-4 αυγά/ εβδομάδα -

Για την ενίσχυση της συμμόρφωσης των ασθενών των ομάδων παρέμβασης ακολουθήθηκε η μέθοδος της αυτοπαρακολούθησης. Ειδικότερα, οι ασθενείς συμπλήρωναν ειδικά έντυπα παρακολούθησης της συμμόρφωσης στους στόχους της μελέτης και 3-ήμερα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων. Συνεπώς, ήλεγχαν κατά πόσο εκπληρώνουν τον στόχο που είχε συζητηθεί στην εκάστοτε συνεδρία, συμπληρώνοντας κάθε φορά, για τις 4 πρώτες συνεδρίες ($1^η$ $2^η$ $3^η$ & $4^η$ συνεδρία), ειδικά έντυπα που είχαν δημιουργηθεί για τον σκοπό αυτό. Σε κάθε τέτοιο έντυπο αναγραφόταν ο στόχος της κάθε νέας συνεδρίας, παράλληλα με τους στόχους της προηγούμενης συνεδρίας. Στις υπόλοιπες 3 συνεδρίες ($5^η$ $6^η$ & $7^η$ συνεδρία), ο έλεγχος της συμμόρφωσης των ασθενών, γινόταν μέσω συμπλήρωσης ενός 3-ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων, όπου οι ασθενείς κατέγραφαν το είδος και τις ποσότητες των τροφίμων που κατανάλωναν συνολικά τρεις ημέρες της εβδομάδας, 2 καθημερινές και 1 ημέρα από το Σαββατοκύριακο. Σε κάθε συνάντηση οι ασθενείς παρουσίαζαν τα έντυπα τους, και συζητούσαν με την ερευνήτρια διαιτολόγο για τυχόν εμπόδια και προβλήματα που προέκυπταν κατά την εφαρμογή του στόχου.

Στην περίπτωση που ο ασθενής δεν ερχόταν στο προκαθορισμένο ραντεβού, η διαιτολόγος επικοινωνούσε μαζί του, για την αναπλήρωση της συνάντησης μέσα στην επόμενη εβδομάδα. Αν ο ασθενής δεν μπορούσε να αναπληρώσει τη συνεδρία, τότε η ερευνήτρια διαιτολόγος έδινε την απαραίτητη πληροφόρηση επικοινωνώντας μαζί του τηλεφωνικά. Σε περίπτωση που ο ασθενής έχανε 3 συνεχόμενες συνεδρίες θεωρούνταν ότι εγκατέλειπε το πρόγραμμα.

Δομή συνεδριών

$1^η$ συνεδρία:

- Ενημέρωση για διάρκεια & τρόπο διεξαγωγής πρωτοκόλλου (δημιουργία κλίματος εμπιστοσύνης/συνεργασίας).
- Παρουσίαση όλων των διατροφικών στόχων για κάθε αντίστοιχη ομάδα παρέμβασης (ΜΔ & ΜΤΖ) σε σχηματική απεικόνιση (Βλ. Παράρτημα Β, έντυπα ΙΙΙ και ΙV).
- Στοχοθεσία (π.χ. στόχος $1^ης$ συνεδρίας: 3-6 φρούτα/ημέρα, τουλάχιστον 1 σαλάτα/ ημ.)

- Διερεύνηση τρέχουσας κατάστασης σχετικά με τον στόχο (π.χ. πόσα φρούτα τρώτε ανά ημέρα).
- Έλεγχος ερεθισμάτων (συμπεριφορά/ στάσεις-πεποιθήσεις).
- Ανακεφαλαίωση.
- Έντυπο αυτοπαρακολούθησης.
- Παροχή/επεξήγηση υποθερμιδικού διαιτολογίου (1500 Kcal για γυναίκες – 1800 Kcal για άνδρες).
- Ορισμός επόμενης συνάντησης.

Περιεχόμενο επόμενων συνεδριών:

- Δημιουργία κλίματος εμπιστοσύνης/συνεργασίας.
- Περίληψη των όσων είχαν συζητηθεί στην προηγούμενη συνάντηση.
- Διερεύνηση για την επίτευξη του/των προηγούμενου/ων στόχου/ων.
- Διερεύνηση τρέχουσας κατάστασης σχετικά με τον στόχο/ ενίσχυση ή διεύρυνση στόχου.
- Έλεγχος ερεθισμάτων (συμπεριφορά/ στάσεις-πεποιθήσεις).
- Τεχνικές αυτοπαρακολούθησης προβλημάτων (π.χ. προετοιμασία πακέτου φαγητού απ' το σπίτι, αποφυγή τροφίμων που υπερκαταναλώνονται) - πρόληψη υποτροπών (π.χ. κατανάλωση ενός φρούτου αμέσως μετά το φαγητό προς αποφυγή κατανάλωσης γλυκού) – ενίσχυση αυτοαποτελεσματικότητας (π.χ. για την ομάδα MTZ: «Τι θα μπορούσατε να κάνετε για να αυξήσετε τη σωματική σας δραστηριότητα καθημερινά;», Πώς θα μπορούσατε να πετύχετε αυτόν τον στόχο κ.ά.).
- Ανακεφαλαίωση.
- Έντυπο αυτοπαρακολούθησης.
- Ορισμός επόμενης συνάντησης.

Ανθρωπομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά

Το ύψος των ατόμων μετρήθηκε μία φορά με αναστημόμετρο τύπου seca ακρίβειας ±0,5 εκ. Οι συμμετέχοντες ήταν χωρίς παπούτσια, με χαλαρούς ώμους, ίσια πλάτη, χέρια

ελεύθερα και με τα μάτια που κοίταζαν ίσια εμπρός (εξασφάλιση του οπτικού άξονα σε ευθεία οριζόντια νοητή γραμμή). Το σωματικό βάρος των ασθενών μετρήθηκε με ψηφιακή ζυγαριά με ακρίβεια ±100 γρ., χωρίς να φορούν παπούτσια και υπό τις ίδιες συνθήκες κάθε φορά. Η μέτρηση του βάρους πραγματοποιήθηκε στην αρχή της μελέτης και στους 6 μήνες απ' την έναρξη της μελέτης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τα δύο παραπάνω στοιχεία, υπολογίστηκε ο ΔΜΣ ως το πηλίκο του βάρους [σε χιλιογραμμάρια (kg)] προς το τετράγωνο του ύψους [σε τετραγωνικά μέτρα (m^2)]. Η παχυσαρκία ορίστηκε ως ΔΜΣ ≥ 30 kg/ m^2. Η περιφέρεια μέσης (ΠΜ) υπολογίστηκε στο μέσο μεταξύ της 12ης πλευράς και της λαγόνιας ακρολοφίας (ύψος ομφαλού) και η περιφέρεια ισχίου μετρήθηκε γύρω από τους γλουτούς, στο ύψος της μέγιστης έκτασης. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε μη-εκτατή ταινία (seca) με ακρίβεια ± 0,1 εκ. Επίσης, υπολογίστηκε και ο λόγος της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχίων (WHR). Ως παθολογική ΠΜ ορίστηκε η ΠΜ >88 εκ. ή >102 εκ. για γυναίκες και άντρες αντίστοιχα, ενώ ως παθολογικός WHR ορίστηκε ο WHR ≥0,85 ή ≥0,90 για γυναίκες και άντρες αντίστοιχα (WHO, Geneva, 8-11 December 2008).

Ως καπνιστές ορίστηκαν όσοι κάπνιζαν τουλάχιστον ένα τσιγάρο ημερησίως, πρώην καπνιστές όσοι σταμάτησαν το κάπνισμα πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη, ενώ ως μη καπνιστές όσοι δεν κάπνισαν ούτε ένα τσιγάρο κατά την διάρκεια της ζωής τους.

Το μορφωτικό επίπεδο των συμμετεχόντων καθορίστηκε από τα χρόνια εκπαίδευσης. Συγκεντρώθηκαν, επιπλέον, πληροφορίες σχετικά με την οικογενειακή κατάσταση (έγγαμος, άγαμος, διαζευγμένος ή σε χηρεία), τον αριθμό παιδιών/οικογένεια και την περιοχή κατοικίας (αστική ή ημιαστιακή).

Αξιολόγηση της διαιτητικής πρόσληψης

Κατά την εισαγωγή στη μελέτη η αποτίμηση των διαιτητικών συνηθειών των εθελοντών γινόταν μέσω ενός ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (food frequency questionnaire, FFQ) και δύο ανακλήσεων 24ώρου.

Πιο συγκεκριμένα, το ημιποσοτικοποιημένο ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη (Bountziouka et al., 2012), αποτελούνταν από 76 ερωτήσεις (69 σχετικές με τη συχνότητα κατανάλωσης όλων των κύριων ομάδων τροφίμων και ποτών και 7 ερωτήσεις σχετικά με τις διατροφικές συμπεριφορές). Το ερωτηματολόγιο αυτό και έχει ήδη ελεγχθεί για την εγκυρότητα και την επαναληψιμότητά του στον Ελληνικό πληθυσμό (Bountziouka et al., 2012). Το ερωτηματολόγιο αυτό εφαρμόστηκε στις 2 χρονικές στιγμές της μελέτης (στην αρχή και στο 6μηνο).

Σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο αυτό, οι συμμετέχοντες ανέφεραν σύμφωνα με μία εξαβάθμιας κλίμακας πόσες φορές, , κατά τη διάρκεια των τελευταίων 2 μηνών κατανάλωναν την προκαθορισμένη ποσότητα τροφίμων που αναφερόταν στο ερωτηματολόγιο. Οι πιθανές απαντήσεις συμπλήρωσης αναφορικά με τη συχνότητα κατανάλωσης ήταν «ποτέ/ σπάνια», «1-3 φορές/ μήνα», «1-2 φορές/ εβδομάδα», «3-6 φορές/ εβδομάδα», «1 φορά/ ημέρα» και «≥2 φορές/ ημέρα». Στη συνέχεια, η διατροφική πληροφορία χρησιμοποιήθηκε για να αποτιμηθεί εκ των προτέρων ο βαθμός υιοθέτησης της ΜΔ των συμμετεχόντων μέσω του σχετικού δείκτη MedDietScore (Panagiotakos et al., 2006).

Η συνέντευξη για την ανάκληση 24ώρου βασίστηκε στη μέθοδο πέντε βημάτων του Αμερικανικού Υπουργείου Γεωργίας (Moshfegh et al., 1999). Εφαρμόστηκαν δύο ανακλήσεις 24ώρου στις 2 χρονικές στιγμές της μελέτης (στην αρχή και στο 6μηνο). Η μία πραγματοποιούνταν τηλεφωνικά, ενώ η άλλη κατ' ιδίαν με τον ασθενή στους αντίστοιχους χρόνους αξιολόγησης. Τα δεδομένα από τις ανακλήσεις αναλύθηκαν ως προς την πρόσληψη ενέργειας, μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών με τη χρήση του προγράμματος Nutritionist Pro, version 2.2 (Axxya Systems, USA).

Εκτίμηση φυσικής δραστηριότητας

Για τον προσδιορισμό του επιπέδου της φυσικής δραστηριότητας (PAL), χρησιμοποιήθηκε το ερωτηματολόγιο APAQ (*Athens Physical Activity Questionnaire)* (Kavouras et al., 2016). Το APAQ συμπληρώθηκε από όλους τους συμμετέχοντες και τις 2 χρονικές

στιγμές αξιολογήσεων της μελέτης (στην αρχή και στο 6μηνο) εκτιμώντας το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας των ασθενών. Το ερωτηματολόγιο χωριζόταν σε τρεις ενότητες ανάλογα με τον αν ο εθελοντής συμμετείχε σε κάποια δραστηριότητα στο πλαίσιο της εργασίας (π.χ. χρόνος βαδίσματος από και προς τη δουλειά), στο σπίτι (π.χ. χρόνος που χρειάστηκε είτε για ελαφριές είτε για βαριές δουλειές στο σπίτι) ή για ψυχαγωγία (π.χ. χρόνος που αφιερώθηκε για χορό).

Μέσω του συγκεκριμένου ερωτηματολογίου προσδιορίστηκε η εβδομαδιαία κατανάλωση ενέργειας, η συχνότητα, η διάρκεια και η ένταση των διαφόρων αθλητικών δραστηριοτήτων ή άλλων συνηθειών που σχετίζονταν με τη φυσική δραστηριότητα. Η συνολική φυσική δραστηριότητα προσδιορίστηκε μετρώντας τις συνολικές μεταβολικές μονάδες (MET) που δαπανήθηκαν ανά λεπτό ανά ημέρα (MET-min/ ημ.). Τα συνολικά MET-min/ημ. υπολογίστηκαν ξεχωριστά για τις δραστηριότητες χαμηλής, μέτριας έντασης, και έντονης άσκησης. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η συνολική διάρκεια καθιστικών δραστηριοτήτων κατά τον ελεύθερο χρόνο. Ως καθιστικές δραστηριότητες ορίστηκαν οι δραστηριότητες με συνολικά MET $\leq$ 1,5 (Sedentary Behaviour Research, 2012), χωρίς συνυπολογισμό του ύπνου, όπως είναι για παράδειγμα η παρακολούθηση τηλεοπτικών προγραμμάτων, τα ηλεκτρονικά παιχνίδια, το διάβασμα κ.λπ.

Προσδιορισμός διάρκειας και ποιότητας ύπνου

Η διάρκεια και η ποιότητα του ύπνου των ασθενών αξιολογήθηκε μέσω κατάλληλης κλίμακας (*Athens Insomnia Scale,* AIS*)* (Soldatos et al., 2003). Μέσω της συγκεκριμένης κλίμακας αποτιμήθηκαν τα προβλήματα που εμφανίζονταν κατά τη διάρκεια του ύπνου, καθώς και οι συνέπειες αυτών την επόμενη ημέρα.

Συγκεκριμένα, το AIS είναι ένα ερωτηματολόγιο που αποτελείται από οκτώ ερωτήσεις. Τα πέντε πρώτα ερωτήματα αξιολογούν τη δυσκολία στην επέλευση ύπνου, τις αφυπνίσεις κατά τη διάρκεια της νύχτας, την τελική αφύπνιση το πρωί, τη συνολική διάρκεια ύπνου και την ποιότητα του ύπνου, ενώ οι τρεις τελευταίες ερωτήσεις αφορούν τις συνέπειες της

αϋπνίας την επόμενη ημέρα (την αίσθηση της ευρωστίας, τη λειτουργική ικανότητα και την υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας). Κάθε απάντηση στο AIS αξιολογούνταν με ένα σκορ από 0 έως 3, (το 0 αντιστοιχούσε σε κανένα πρόβλημα και το 3 σε πολύ σοβαρό πρόβλημα). Έτσι, η συνολική βαθμολογία κυμαινόταν από 0 (απουσία οποιουδήποτε προβλήματος σχετιζόμενο με τον ύπνο) έως 24 (η πιο σοβαρού βαθμού αϋπνία). Ως αϋπνία ορίστηκε το σκορ του AIS $\geq$ 6, ενώ βάσει των ωρών ύπνου ορίστηκε η συνιστώμενη διάρκεια ύπνου, ως διάρκεια ύπνου ≥7 και ≤ 9 ώρες / ημέρα (Mukherjee et al., 2015). Το AIS συμπληρώθηκε από όλους τους συμμετέχοντες τις 2 χρονικές στιγμές αξιολόγησης (στην αρχή και στο 6μηνο).

Βιοχημικές και κλινικές παράμετροι

Η φλεβοκέντηση και η συλλογή των δειγμάτων αίματος για κάθε εθελοντή γινόταν νωρίς το πρωί, από τις 8.30π.μ. έως τις 10.00π.μ., έπειτα από 12-ωρη νηστεία και με τον ίδιο τρόπο σε κάθε χρονική στιγμή της μελέτης. Τα δείγματα ορού, πλάσματος και ούρων καταψύχθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή τους στους -80°C. Τα επίπεδα γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και HDL-C μετρήθηκαν μέσω ενζυμικής χρωματομετρικής ανάλυσης (COBAS® 8000 αναλυτής, Roche), ενώ οι συγκεντρώσεις LDL-C υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο Friedewald (Friedewald et al., 1972). Ως υπερτριγλυκεριδαιμία ορίστηκε η κατάσταση, όπου τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ορού ήταν $\geq$150 mg/dl και ως διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, τα επίπεδα γλυκόζης 100-125 mg/dl. Τα επίπεδα ινσουλίνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο χημειοφωταύγειας (E170 modular αναλυτή, Roche). Ο δείκτης αντίστασης της ινσουλίνης (HOMA-IR) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο των *Matthews* και *συν.* (Matthews et al., 1985). Η παρουσία ΜΣ ορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια που δημοσιεύτηκαν από τους Alberti και *συν.* (Alberti et al., 2009). Τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων ALT, AST και GGT μετρήθηκαν μέσω ενζυμικής χρωματομετρικής μεθόδου (COBAS® 8000 αναλυτή, Roche). Ως φυσιολογική συγκέντρωση ALT ορίστηκε η ALT <40 IU/L, ενώ για την GGT η συγκέντρωση GGT <30 IU/L. Η υψηλής ευαισθησίας CRP (hsCRP) μετρήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας (BN II νεφελομετρητής, Siemens). Τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και της αδιπονεκτίνης μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA (ELISA,

kit Quantikine / ανοσοδοκιμασίας, R&D Systems, Minneapolis, USA). Ο συντελεστής ενδο-διακύμανσης ήταν <7% για τον TNF-α και <5% για αδιπονεκτίνη, ενώ οι συντελεστές δια-διακύμανσης ήταν <8% τόσο για τον TNF-α, όσο και για την αδιπονεκτίνη. Η μέτρηση των οξειδωμένων γουανοσινών πραγματοποιήθηκε στα ούρα με τη μέθοδο EIA (8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Kit, Cayman Chemical). Τα επίπεδα 8-ισοπροστανίων (8-isoprostane PGF_{2a} ELISA kit, Cayman Chemical) μετρήθηκαν στα ούρα και της κυτταροκερατίνης-18 [cytokeratin 18, (M30-apoptosense) ELISA assay, PEVIVA, Alexis, Grunwald, Germany] στον ορό των ασθενών με τη μέθοδο ELISA. Ο συντελεστής ενδο-διακύμανσης και δια-διακύμανσης για την κυτταροκερατίνη-18 ≤10%, ενώ οι συντελεστές ενδο-διακύμανσης για τα 8-ισοπροστάνια και τις οξειδωμένες γουανοσίνες ήταν 7,2% και 4,7% αντίστοιχα και δια-διακύμανσης 15,5% και 5,5% αντίστοιχα.

Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε σε όλους τους εθελοντές στην αρχή της μελέτης, και στην επαναξιολόγηση των 6 μηνών. Η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης γινόταν στο δεξί χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση. Ως αρτηριακή υπέρταση ορίστηκε η συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 mmHg και/ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 mmHg ή η λήψη αντι-υπερτασικών φαρμάκων.

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC), διέγερση τους με LPS και προσδιορισμών φλεγμονωδών κυτταροκινών

Η απομόνωση των PBMC έγινε ως εξής: 10 ml αίματος σε EDTA αραιώθηκαν με ίσο όγκο PBS (Φωσφορικό αλατούχο ρυθμυστικό διάλυμα, Phosphate-buffered saline, PBS). Στη συνέχεια έγινε επίστρωση του διαλύματος αίματος σε 15 ml φικόλης (ficol) και φυγοκέντρηση του στις 1800 rpm για 20 λεπτά στους 25 ^{o}C. Τα PBMC που παραλήφθηκαν από την ενδιάμεση στοιβάδα μεταφέρθηκαν σε 10 ml θρεπτικό υλικό RPMI, όπου φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες. ‘Εγινε αναδιασπορά του ιζήματος σε 5 ml lysis buffer (διάλυμα διάσπασης ερυθρών αιμοσφαιρίων) και ξανά φυγοκέντρηση. Πραγματοποιήθηκε αναδιασπορά του ιζήματος σε 900 μL ορό εμβρύου μόσχου (fetal cow serum, FCS) και 900 FCS με 20% διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO) και αποθήκευση τους σε υγρό άζωτο.

Η διέγερση των PMBC έγινε με τον πολυσακχαρίτη LPS συγκέντρωσης 1 mg/mL. Η διαδικασία είχε ως εξής: Αφού ξεπάγωσαν τα κύτταρα σε υδατόλουτρο στους 37 ^{o}C, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα των 50 cc που περιείχε 20 ml θρεπτικό υλικό RPMI, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 1800 rpm για 20 λεπτά στους 25 ^{o}C. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, έγινε αναδιασπορά του ιζήματος με 3 ml θρεπτικού υλικού ειδικού τύπου (αρχικό εναιώρημα). Για τον υπολογισμό του αριθμού και της βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού του αρχικού εναιωρήματος αναδιαλύθηκαν 20 μL διαλύματος κυττάρων με 20 μL χρωστικής Trypan Blue. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με αιμοκυττόμετρο, και ο πληθυσμός των κυττάρων υπολογίστηκε ως εξής: Αριθμός κυττάρων = αριθμός κυττάρων x 2 x 10^3. Με κατάλληλη αραίωση η συγκέντρωση του αρχικού εναιωρήματος ρυθμίστηκε στα 2,3 x 10^6 κύτταρα/ml. Τα κύτταρα του κάθε εθελοντή τοποθετήθηκαν σε πλάκες 12 κυψελίδων σε τελικό όγκο 0,5 ml, ανάλογα με τη χρονική στιγμή της παρέμβασης, και επωάστηκαν απουσία (χωρίς διέγερση) ή παρουσία LPS (με διέγερση) για 4 και 24ώρες, πραγματοποιώντας διπλές μετρήσεις για κάθε συνθήκη. Στις 4 και στις 24 ώρες αντίστοιχα, έγινε παραλαβή των κυττάρων και φυγοκέντρησή τους για 10 min στα 1000 g (rcf) στους 4^{o} C. Το υπερκείμενο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών ιντελευκίνης 1β και TNF-α, ενώ στο ίζημα, μετά την πλύση του με 1 ml PBS, προστέθηκαν 50 μL PBS και 50 μL διαλύματος ΝΑΟΗ 0,5 Ν για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Ο προσδιορισμός των κυτταροκινών ιντελευκίνης 1β και TNF-α, που εκκρίθηκαν από τα PBMC, με ή χωρίς διέγερση με LPS, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA (Duoset ELISA,R&D systems) στο υπερκείμενο διάλυμα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg εκκρινόμενης κυτταροκίνης/mg συνολικής προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης.

Ελαστογραφία ήπατος (Share-wave Elastography)

Όλοι οι ασθενείς σε κάθε χρονική στιγμή πραγματοποίησαν αξιόπιστες μετρήσεις ηπατικής ακαμψίας (LSM) (σε kPa) χρησιμοποιώντας εγκάρσια κύματα 2 διαστάσεων, που

εκτελέστηκαν με τη χρήση του συστήματος υπερήχων Aixplorer MultiWave ™ (Supersonic Imagine S.A., Aix-en-Provence, France) σε συχνότητες 1-6MHz. Η εξέταση θεωρήθηκε αξιόπιστη, αν είχαν ληφθεί τουλάχιστον 5 έγκυρες μετρήσεις βασισμένες σε καλό υπερηχοτομογραφικό σήμα και σε συνδυασμό με χαμηλό κλάσμα της διακύμανσης προς τη μέση τιμή όλων των έγκυρων μετρήσεων ανά εξέταση (< 25%).

Οι ασθενείς με NAFLD χωρίστηκαν σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ελαστογραφίας σε εκείνους με LSM ≤ 6,6 και LSM > 6,6, υποδηλώνοντας την απουσία ίνωσης ή την παρουσία σημαντικής ίνωσης, σύμφωνα με τα δημοσιευμένα όρια από τους Abenavoli και Beaugrand (Abenavoli and Beaugrand, 2012).

Κύρια καταληκτικά σημεία παρέμβασης

Κύριο καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν η κλινικά ωφέλιμη μείωση της ALT, που ορίστηκε ως η επάνοδος της ALT εντός φυσιολογικών ορίων.

Δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία ήταν:

1) Φυσιολογική GGT (GGT < 30 IU/L).
2) Βελτίωση ηπατικής ακαμψίας σε ελαστογραφία ήπατος (ηπατική ακαμψία ≤ 6,6 kPa).
3) Βελτίωση δεικτών φλεγμονής, οξειδωτικού στρες και μεταβολισμού λιπιδίων/ γλυκόζης).

Στατιστική ανάλυση

Εκτιμώντας ότι το κύριο καταληκτικό σημείο μπορούσε να επιτευχθεί στο 50% των ασθενών που τυχαιοποιήθηκαν στην ομάδα της διατροφικής παρέμβασης και 10% στην ομάδα ελέγχου, υπολογίστηκε ότι θα χρειασθούν 21 ασθενείς ανά θεραπευτική ομάδα για να αναδειχθεί στατιστικώς σημαντική διαφορά από την ομάδα ελέγχου (με 5% και 10% πιθανότητες στατιστικού σφάλματος τύπου I και II, αντίστοιχα).

Για έλεγχο της αποτελεσματικότητας του θεραπευτικού σχήματος που δόθηκε ανά ομάδα ασθενών και για τον περιορισμό του σφάλματος της επίδρασης της παρέμβασης στην κύρια έκβαση της μελέτης, που προέκυψε λόγω της εγκατάλειψης 7 ασθενών από την ομάδα ελέγχου, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «πρόθεση για θεραπεία» (*intention to treat analysis, ITT).* Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν όλα τα άτομα που τυχαιοποιήθηκαν αρχικά στη μελέτη (n=63), συμπεριλαμβανομένων και αυτών που εγκατέλειψαν τη μελέτη (n=7), συμπληρώνοντας τις ελλείπουσες τιμές, μέσω εκτίμησης της τάσης των μεταβλητών με γραφική παράσταση *(curve estimation).* Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν και «βάσει πρωτοκόλλου» (*per protocol analysis, PPA*), προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές με την ITT.

Οι συνεχείς παραμετρικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± την τυπική απόκλιση (mean±SD), οι συνεχείς μη παραμετρικές ως διάμεσοι (διατεταρτημοριακό εύρος), ενώ οι ποιοτικές-κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%). Ο έλεγχος της κανονικότητας των μεταβλητών πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας Shapiro-Wilk και γραφικά μέσω ιστογραμμάτων.

Οι συγκρίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών στην αρχή της παρέμβασης (Ρ αρχή) έγιναν με τη χρήση του κριτηρίου Student t-test ή Mann-Whitney U (συγκρίσεις μεταξύ δύο ομάδων) ή με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) ή Kruskal-Wallis H (συγκρίσεις μεταξύ των 3 ομάδων), ανάλογα με το αν οι μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική ή όχι κατανομή. Οι έλεγχοι μεταξύ των ποιοτικών-κατηγορικών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του κριτηρίου X^2 ή Fisher's exact test, σε περίπτωση που δεν ικανοποιούνταν οι προϋποθέσεις του X^2 κριτηρίου. Στο τέλος της 6μηνης παρέμβασης, οι συγκρίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών εντός των ομάδων, έγιναν με με τη δοκιμασία t τεστ κατά ζεύγη ή με τη δοκιμασία Wilcoxon, για τις κανονικές ή μη κανονικές μεταβλητές αντίστοιχα, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ ποιοτικών-κατηγορικών μεταβλητών εντός των ομάδων, έγιναν με τη χρήση του McNemar test. Η στατιστική σημαντικότητα εντός των ομάδων υποδεικνύεται στους πίνακες των αποτελεσμάτων με αστερίσκο (*).

Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές ελέγχθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measure ANOVA, RMANOVA). Ο χρόνος (αρχή και 6μήνες) θεωρήθηκε ως μεταβλητή εντός της κάθε ομάδας (within-subjects), ενώ η κάθε ομάδα (ΟΕ, ομάδα ΜΔ, ομάδα ΜΤΖ) ως μεταβλητή μεταξύ των ασθενών του δείγματος (between-subjects). Για την εφαρμογή της RMANOVA τηρήθηκαν οι εξής προϋποθέσεις: οι μεταβλητές να ακολουθούν κανονική κατανομή, να υπάρχει σφαιρικότητα μεταξύ των μεταβλητών (δοκιμασία Mauchly's test of shericity > 0,05) να υπάρχει ομοιογένεια στις διακυμάνσεις (δοκιμασία Box's test of equality of covariance matrices > 0,05) και ομοιογένεια στις διακυμάνσεις των καταλοίπων (δοκιμασία Levene's test of equality of error variaces > 0,05). Στις περιπτώσεις που δεν τηρούνταν οι προϋποθέσεις αυτές, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μετατρέποντας τις μεταβλητές στα αντίστοιχα «ranks». Συνολικά, τα αποτελέσματα από την RMANOVA παρουσιάζονται με τρεις τιμές Ρ: α) Ρ επίδρασης χρόνου *(Ρ χρόνου)* = δηλώνει την αλλαγή της μεταβλητής στις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο, αγνοώντας την ύπαρξη διαφορετικών ομάδων, β) Ρ μεταξύ των ομάδων *(Ρ ομάδας)* = δηλώνει εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων συνολικά για τις τιμές της μεταβλητής, αγνοώντας τις διαφορετικές χρονικές στιγμές, και γ) Ρ αλληλεπίδρασης χρόνου-ομάδας *(Ρ χρόνου x ομάδας)* = δηλώνει την διαφοροποίηση μεταξύ των τριών ομάδων ως προς τη συμπεριφορά τους στο χρόνο.

Επιπλέον, για τον έλεγχο της επίδρασης των χαρακτηριστικών της δίαιτας αυτών καθ' αυτών στα βασικά καταληκτικά σημεία της μελέτης, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σταθμίζοντας τα αποτελέσματα ως προς το ποσοστό απώλειας βάρους (coviariates) που παρατηρήθηκε στις ομάδες παρέμβασης.

Περαιτέρω ανάλυση για τις παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις των ομάδων παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς και μεταξύ των ομάδων παρέμβασης, έγινε με την εφαρμογή συγκρίσεων κατά ζεύγη, ενώ πραγματοποιήθηκαν, κατά περίπτωση, συγκρίσεις των ποσοστιαίων διαφορών των μεταβλητών σε σχέση με την αρχική κατάσταση (αρχή της μελέτης).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 23.0 for Windows, SPSS 2015, Chicago, USA).

Αποτελέσματα

Μετά την τυχαιοποίηση των ασθενών στις ομάδες παρέμβασης, κάθε ομάδα αποτελούνταν από 21 ασθενείς. Στο τέλος της παρέμβασης, 7 άτομα της ομάδας ελέγχου (ποσοστό 33%) εγκατέλειψαν τη μελέτη (*dropouts*), ενώ όλοι οι ασθενείς των ομάδων ΜΔ και ΜΤΖ ολοκλήρωσαν επιτυχώς την 6μηνη παρέμβαση (ποσοστό 100%). Η προσκόλληση των ασθενών στις ομάδες παρέμβασης, όπως αυτή αξιολογήθηκε από τη συμμετοχή των εθελοντών στις ομαδικές συνεδρίες και την 6μηνη αξιολόγηση ήταν επίσης 100%. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα της στατιστικής ανάλυσης, όλες οι παρακάτω αναλύσεις (***Πίνακες 7.2 έως 7.11***) πραγματοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη όλα τα άτομα που τυχαιοποιήθηκαν στην μελέτη (n=63), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανάλυσης ITT.

Στη αρχή της μελέτης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς το φύλο, την ηλικία, τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, τα βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και τις συνήθειες του τρόπου ζωής, όπως το επίπεδο σωματικής δραστηριότητας, τις συνήθειες καπνίσματος και διατροφής (Ρ αρχή σε ***Πίνακες 7.2 έως 7.13***).

Αναφορικά με τους κύριους στόχους της παρέμβασης, στο τέλος του 6μήνου, και οι τρεις ομάδες εμφάνισαν σημαντική βελτίωση του σωματικού βάρους (ΣΒ) (***Πίνακας 7.3***). Ωστόσο, οι ομάδες ΜΔ και ΜΤΖ παρουσίασαν μεγαλύτερη απώλεια βάρους ($P_{MΔ}$=0,014 και P_{MTZ}=0,07, αντίστοιχα), μείωσαν περισσότερο τον ΔΜΣ ($P_{MΔ}$=0,006 και P_{MTZ}=0,013, αντίστοιχα) και το παθολογικό ποσοστό WHR ($P_{MΔ}$=0,007 και P_{MTZ}=0,07, αντίστοιχα), συγκριτικά με την ΟΕ, η οποία παρουσίασε μικρή απώλεια ΣΒ της τάξης του 2% (-3,6% έως 0,31%) (***Πίνακας 7.3***). Δεν υπήρχαν σημαντικές σωματομετρικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ΜΔ και ΜΤΖ, παρόλο που

η % απώλεια ΣΒ και η % αλλαγή του ΔΜΣ, στην ομάδα ΜΤΖ ήταν υψηλότερες συγκριτικά με την ομάδα ΜΔ, (P=0,99 και P=0,99 αντίστοιχα).

Όσον αφορά το επίπεδο σωματικής δραστηριότητας, και οι δύο ομάδες παρέμβασης, ΜΔ και ΜΤΖ, μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα καθιστικής δραστηριότητας εκτός εργασίας, συγκριτικά με την ΟΕ ($P_{MΔ}$=0,004 και P_{MTZ}=0,01) (***Πίνακας 7.4***). Η ομάδα ΜΔ μείωσε παράλληλα και τις ώρες παρακολούθησης τηλεόρασης ανά ημέρα, συγκρινόμενη με την ΟΕ ($P_{MΔ}$=0,003). Παρόλα ταύτα, στο τέλος της παρέμβασης, μόνο η ομάδα ΜΤΖ αύξησε σημαντικά τα επίπεδα έντονης άσκησης, συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες της μελέτης (P_{MTZ}=0,007), χωρίς ωστόσο άλλες σημαντικές αλλαγές μεταξύ των τριών ομάδων στα συνολικά MET-min ανά ημέρα και το επίπεδο σωματικής δραστηριότητας (PAL) μεταξύ των τριών ομάδων (P =0,33 και P=0,81, αντίστοιχα) (***Πίνακας 7.4***).

Παρά την τυχαιοποίηση των ασθενών στην αρχή της μελέτης, οι ασθενείς της ομάδας ΜΤΖ, ανέφεραν σημαντικά λιγότερες ώρες ύπνου συγκριτικά με την ΟΕ (P=0,04) και την ομάδα ΜΔ (P=0,05) ($P_{αρχή}$ =0,06, ***Πίνακας 7.5***). Ωστόσο, στο τέλος της παρέμβασης, μόνο οι ασθενείς της ομάδας ΜΤΖ, αύξησαν σημαντικά τις ώρες ύπνου ($P_{εντός\ MTZ}$=0,03). Παρόλο που δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, τόσο στις ώρες ύπνου (P=0,19), όσο και στο ποσοστό συνιστώμενης διάρκειας ύπνου (P=0,71), μόνο οι ασθενείς της ομάδας ΜΤΖ παρουσίασαν σημαντικά λιγότερα ποσοστά αϋπνίας συγκριτικά με την ΟΕ στο τέλος της παρέμβασης. Συγκεκριμένα, μόνο εντός της ομάδας ΜΤΖ παρατηρήθηκε βελτίωση στα επίπεδα υπνηλίας κατά την διάρκεια της ημέρας ($P_{εντός\ MTZ}$=0,02), ενώ τάση αύξησης παρατηρήθηκε στην ΟΕ ($P_{εντός\ ΟΕ}$=0,13) (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Πίνακας 7.2: Περιγραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών ανάλογα με την ομάδα παρέμβασης στην αρχή της μελέτης.				
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**	**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**	**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**	**P[a]**
Φύλο – άνδρες, n (%)	13, (61,9)	14, (66,7)	17, (81)	0,37
Ηλικία (έτη)	47 (42-60)	44 (41-60)	48 (38-60)	0,90
Εκπαίδευση (έτη)	16 (12-16,5)	16 (12-16)	16 (12-16,5)	0,95
Οικογενειακή κατάσταση, n, (% παντρεμένοι)	15, (71,4)	20, (95,2)	13, (61,9)	0,10
Αριθμός τέκνων	2 (0-2)	2 (1-2)	1 (0-2)	0,25
Περιοχή κατοικίας, n, (%)				
Αστική	16, (76,2)	16, (76,2)	19, (90,5)	0,39
Ημιαστική	5, (23,8)	5, (23,8)	2, (9,5)	

Τα δεδομένα των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος) ή ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%).

[a]Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. Οι συγκρίσεις μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών έγιναν με X^2, ενώ για τις συνεχείς μη παραμετρικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-wallis H test. Δεν υπήρχαν μεταβλητές που ακολουθούσαν την κανονική κατανομή.

Πίνακας 7.3: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)		$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου\ x\ ομάδας}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΔ}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ MTZ}$	$P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Σωματικό βάρος (kg)	91,4± 15,9	89,0±15,1*	93,0± 13,4	87,3± 14,5*	95,2± 14,4	90,3± 14,3*	0,42	<0,001	0,79	0,032	0,02	0,08	0,31
% απώλεια βάρους	-2,1 (-3,6 με 0,3)		-5,4 (-8,2 με -3,3)		-6,3 (-8,2 με -1,1)				0,047		0,014	0,07	0,99
ΔΜΣ (kg/ m^2)	30,04 (28,2-33,1)	29,49 (27,8-32,9)	31,67 (27,4-33,6)	28,21 (25,9-31,5)*	32,44 (28,4-35,0)	30,55 (26,6-33,3)*	0,69	<0,001	0,77	0,008	0,006	0,01	0,43
% Δ ΔΜΣ	-0,67 (-1,7 με +0,6)		-5,4 (-7,9 με -3,2)		-6,3 (-8,3 με -1,1)				0,001		<0,001	0,003	0,99
% Παθολογική ΠΜ[a]	90,5%	76,2%	76,2%	47,6%*	71,4%	61,9%	0,39	0,001	0,20	0,25	0,27	0,64	0,12
% Παθολογικός WHR[b]	76,2	76,2	90,5	61,9*	90,5	76,2	0,47	0,001	0,77	0,03	0,007	0,07	0,27

Τα δεδομένα των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος) ανάλογα με την κανονικότητα των μεταβλητών, ή ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%) για τις κατηγορικές μεταβλητές.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test για τις κατηγορικές μεταβλητές, διότι δεν ικανοποιούνταν οι παραδοχές για το X^2 test. Για τις συνεχείς μη παραμετρικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t-test κατά ζεύγη για τις παραμετρικές συνεχείς μεταβλητές, και το Wilcoxon test για τις συνεχείς μη παραμετρικές. Για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το McNemar Test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA). **Δ:** διαφορά, **ΔΜΣ:** δείκτης μάζας σώματος**, ΠΜ:** περιφέρεια μέσης, **WHR**: λόγος περιφέρεια μέσης / Ισχίου. [a] **παθολογική ΠΜ:** >102 εκ. για τους άντρες και >88 εκ. για τις γυναίκες. [b] **Παθολογικός WHR:** ≥0,90 για άντρες και ≥ 0,85 για γυναίκες.

Πίνακας 7.4: Συνήθειες σωματικής δραστηριότητας των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**		**P αρχή**	**P χρόνου**	**P ομάδας**	**P χρόνου x ομάδας**	**P ΟΕ vs. ΜΔ**	**P ΟΕ vs. ΜΤΖ**	**P ΜΔ vs. ΜΤΖ**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Καθιστικές δραστηριότητες (εκτός εργασίας) ώρες/ημ.	3,2 ±1,9	3,6±1,6	3,8±1,5	3,0±1,5*	3,7±2,1	3,1±1,7*	0,37	0,009	0,95	0,01	0,004	0,014	0,99
Ώρες τηλεθέασης (μόνο TV) (ώρες/ημ.)	1,9 ±1,5	2,1 ±1,2	2,2±1,6	1,6±1,2*	1,8±1,6	1,8±1,8	0,44	0,36	0,89	0,042	0,003	0,26	0,23
MET-min/ημ.χαμηλής Φ.Δ.	672 (492-923)	603 (464-906)	705 (606-901)	768 (588-935)	762 (502-1032)	665 (611-963)	0,51	0,45	0,32	0,72	0,56	0,80	0,46
MET-min/ημ. μέτριας Φ.Δ.	154 (51-411)	153 (28-316)	180 (49-387)	205 (103-429)	154 (0-311)	171 (17-447)	0,85	>0,99	0,87	0,58	0,40	0,24	0,95
MET-min/ημ. έντονης Φ.Δ.	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-32)	0 (0-51)	0 (0-151)	103* (0-238)	0,32	0,07	0,007	0,02	0,90	0,01	0,03

Πίνακας 7.4: Συνήθειες σωματικής δραστηριότητας των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**		**$P_{αρχή}$**	**$P_{χρόνου}$**	**$P_{ομάδας}$**	**$P_{χρόνου x ομάδας}$**	**$P_{ΟΕ vs. ΜΔ}$**	**$P_{ΟΕ vs. ΜΤΖ}$**	**$P_{ΜΔ vs. ΜΤΖ}$**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Συνολικά MET-min/ημ.	1623 (1330-1875)	1531 (1365-1877)	1718 (1613-1810)	1721 (1489-1824)	1655 (1446-1880)	1718 (1613-1810)	0,61	0,70	0,33	0,25	0,55	0,08	0,33
PAL	1,30± 0,14	1,29± 0,15	1,30± 0,16	1,34± 0,18	1,29± 0,20	1,37± 0,21*	0,97	0,04	0,81	0,20	0,48	0,09	0,44

Τα δεδομένα των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος) ανάλογα με την κανονικότητα των μεταβλητών, ή ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%) για τις κατηγορικές μεταβλητές.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το X^2 για τις κατηγορικές μεταβλητές, ενώ για τις συνεχείς μη παραμετρικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το t-test κατά ζεύγη για τις παραμετρικές συνεχείς μεταβλητές, και το Wilcoxon test για τις συνεχείς μη παραμετρικές. Για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το McNemar Test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

MET-min/ημ: συνολικά μεταβολικά ισοδύναμα άσκησης ανά ημέρα, **PAL:** επίπεδο σωματικής δραστηριότητας, **TV:** τηλεθέαση, **Φ.Δ.:** φυσική δραστηριότητα.

Πίνακας 7.5: Συνήθειες τρόπου ζωής των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)**		**$P_{αρχή}$**	**$P_{χρόνου}$**	**$P_{ομάδας}$**	**$P_{χρόνου \times ομάδας}$**	**$P_{ΟΕ vs. ΜΔ}$**	**$P_{ΟΕ vs. MTZ}$**	**$P_{ΜΔ vs. MTZ}$**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Κάπνισμα (ναι), (n, %)	3, (14,3)		5, (23,8)		5, (23,8%)		0,67						
Ύπνος (ώρες/ ημέρα)	7,1 ±1,25	7,3 ±1	7,1±1,3	6,9±1	6,2±1,30	6,8±1,25*	0,06	0,31	0,19	0,09	0,57	0,19	0,11
Συνιστώμενη διάρκεια ύπνου (≥7 και ≤9 ώρες) (n, %)	12, (57,1)	11, (52,4)	11, (52,4)	12, (57,1)	9, (42,9)	10, (47,6)	0,74	0,82	0,71	0,81	0,58	0,57	>0,99
Αυπνία [a] (n, %)	5, (23,8)	6, (28,6)	7, (33.3)	6 (28,6)	8 (38,1)	5 (23,8)	0,59	0,25	0,92	0,18	0,33	0,04	0,41

Τα δεδομένα των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το X^2 για τις κατηγορικές μεταβλητές, ενώ για τις συνεχείς το t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το t-test κατά ζεύγη και το McNemar Test για τις κατηγορικές μεταβλητές. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

[a]: Athens insomnia scale ≥6.

Αναφορικά με τις διατροφικές συνήθειες των ασθενών, τόσο η ομάδα ΜΔ, όσο και η ομάδα ΜΤΖ, αύξησαν σημαντικά την προσκόλληση στη ΜΔ, όπως αυτή εκτιμήθηκε μέσω του δείκτη MedDietScore, συγκριτικά με την ΟΕ ($P_{ΜΔ}$=0,002 και $P_{ΜΤΖ}$=0,001, αντίστοιχα), χωρίς ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων εντατικής παρέμβασης (P=0,94) (***Πίνακας 7.6***). Όσον αφορά τις αλλαγές σε επίπεδο ομάδων τροφίμων μεταξύ των ομάδων, και οι δύο ομάδες ομάδες (ΜΔ και ΜΤΖ), αύξησαν σημαντικά την κατανάλωση μη επεξεργασμένων δημητριακών, φρούτων και ξηρών καρπών, ενώ μείωσαν σημαντικά την πρόσληψη επεξεργασμένων δημητριακών, πατάτας, κόκκινου κρέατος και αναψυκτικών με ζάχαρη. Η ομάδα ΜΔ αύξησε επιπλέον την κατανάλωση λαχανικών και μείωσε την πρόσληψη γλυκών, ενώ η ομάδα ΜΤΖ αύξησε επιπλέον την κατανάλωση ελιάς, σε σύγκριση με την ΟΕ (***Πίνακας 7.6***). Καθώς παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης της πρόσληψης αλκοόλ, στις ομάδες εντατικής παρέμβασης και μία τάση αύξησης στην ΟΕ, στο τέλος της παρέμβασης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην πρόσληψη αλκοόλ μεταξύ ΜΔ και ΟΕ, και τάση μεταξύ των ΜΤΖ και ΟΕ. Μεταξύ των ομάδων εντατικής παρέμβασης, φάνηκε ότι η ομάδα ΜΔ κατανάλωνε περισσότερα φρούτα συγκριτικά με την ομάδα ΜΤΖ (P=0,03), ενώ η ομάδα ΜΤΖ παρουσίασε μία τάση κατανάλωσης περισσότερων οσπρίων σε σύγκριση με την ομάδα ΜΔ (P=0,08) (***Πίνακας 7.6***).

Όσον αφορά την πρόσληψη ενέργειας, μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών, όπως αποτιμήθηκαν από τις ανακλήσεις 24ώρου, και οι 3 ομάδες της μελέτης μείωσαν σημαντικά την ενεργειακή πρόσληψη, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο τέλος της παρέμβασης (***Πίνακες 7.7***). Επιπλέον, δεν υπήρχαν και ουσιαστικές διαφορές σε επίπεδο μακροθρεπτικών συστατικών μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, μόνο οι ομάδες εντατικής παρέμβασης αύξησαν σημαντικά την πρόσληψη διαιτητικών ινών σε σύγκριση με την ΟΕ. Επιπλέον, η ομάδα ΜΤΖ μείωσε την πρόσληψη κορεσμένου λίπους, ενώ η ομάδα ΜΔ αύξησε, την πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, με την ίδια τάση να παρατηρείται και στην ομάδα ΜΤΖ, σε σύγκριση με την ΟΕ (***Πίνακας 7.7***).

Πίνακας 7.6: Κατανάλωση ομάδων τροφίμων στους ασθενείς των τριών ομάδων παρέμβασης, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)		$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times ομάδας}$	$P_{ΟΕ \text{ vs. } ΜΔ}$	$P_{ΟΕ \text{ vs. } MTZ}$	$P_{ΜΔ \text{ vs. } MTZ}$
Μερίδες/ ημέρα	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Μη επεξεργα-σμένα δημητριακά	0,21 (0-1)	0,14 (0-0,96)	0,14 (0-1,4)	2,28 (2-2,84)*	0,35 (0-2)	2,42 (2-2,56)*	0,60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,52
Επεξεργα-σμένα δημητριακά	2,56 (1-3)	2,56 (1-3)	2,56 (1-3)	0,35 (0,1-1)*	1,63 (0,59-3)	0,28 (0,14-0,5)*	0,14	0,002	<0,001	0,003	0,003	0,004	0,60
Πατάτες	0,26 (0,12-0,6)	0,42 (0,27-0,7)*	0,26 (0,21-0,52)	0,21 (0,07-0,3)*	0,26 (0,21-0,3)	0,21 (0,07-0,26)*	0,83	0,003	0,033	0,005	0,006	0,003	0,99
Φρούτα	1,06 (0,7-2)	1,28 (0,7-3)	1,49 (0,7-2,5)	3,13 (2-3,6)*	1,78 (1,3-2,7)	3,01 (2,3-3,7)*	0,12	0,005	0,02	0,006	0,002	0,04	0,03
Λαχανικά	2,01 (1,4-2,5)	2,38 (1,7-3)	1,59 (1,4-2,1)	2,66 (2-3,6)*	1,98 (1,5-2,5)	2,72 (2,3-3)*	0,22	<0,001	0,47	0,05	0,02	0,13	0,33
Όσπρια	0,52 (0,17-0,52)	0,52 (0,17-0,53)	0,52 (0,52-0,52)	0,48 (0,3-0,5)	0,51 (0,2-0,5)	0,66 (0,52-0,52)	0,30	0,42	0,42	0,11	0,07	0,27	0,08
Ψάρι	0,7 (0,3-0,9)	0,7 (0,3-0,9)	0,52 (0,3-0,9)	0,87 (0,5-1,1)	0,70 (0,5-0,9)	0,87 (0,61-1,22)*	0,69	0,05	0,32	0,34	0,17	0,19	0,88

Πίνακας 7.6: (συνέχεια)													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**		**P αρχή**	**P χρόνου**	**P ομάδας**	**P χρόνου x ομάδας**	**P ΟΕ vs. ΜΔ**	**P ΟΕ vs. ΜΤΖ**	**P ΜΔ vs. ΜΤΖ**
Μερίδες/ ημέρα	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Κόκκινο κρέας	1,66 (0,8-2,3)	1,44 (1,3-2,0)	1,96 (1,3-2,5)	1,09 (0,6-1,8)*	1,33 (1,0-1,8)	0,77 (0,4-1,0)*	0,07	<0,001	0,008	0,02	0,003	0,02	0,74
Πουλερικά	0,52 (0,52-1,60)	0,52 (0,52-1,60)	0,52 (0,52-0,52)	0,52 (0,52-1,06)	0,62 (0,17-0,52)	0,52 (0,52-0,52)	0,37	0,22	0,87	0,39	0,79	0,23	0,33
Πλήρη γαλακτοκομικά	1,28 (0,46-2,5)	1,07 (0,36-1,8)	1,49 (1,1-2,2)	0,85 (0,24-1,4)*	0,85 (0,49-1,8)	0,64 (0,21-1)	0,22	0,002	0,19	0,37	0,15	0,51	0,46
Ελιές	0,07 (0-0,64)	0,21 (0,04-0,65)	0 (0-0,42)	0,64 (0,07-0,64)	0,07 (0-0,21)	0,64 (0,21-1)*	0,54	0,49	0,57	0,12	0,14	0,04	0,48
Ξηροί καρποί	0,07 (0-0,4)	0,07 (0-0,4)	0,07 (0-0,21)	0,64 (0,21-1)*	0,07 (0,03-0,21)	0,64 (0,21-0,82)*	0,74	<0,001	0,08	0,002	0,001	0,008	0,43
Αλκοόλ	0,07 (0-0,53)	0,21 (0,06-0,63)	0,14 (0,03-0,56)	0,14 (0-0,35)	0,21 (0,03-0,45)	0,14 (0,07-0,28)	0,68	0,13	0,99	0,11	0,049	0,07	0,75
Καφές (φορές/ ημέρα)	2 (1,1-2,6)	2 (1-3)	2 (1-2,1)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,41	0,53	0,24	0,39	0,18	0,84	0,28

Πίνακας 7.6: (συνέχεια)													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)**		**P αρχή**	**P χρόνου**	**P ομάδας**	**P χρόνου x ομάδας**	**P ΟΕ vs. ΜΔ**	**P ΟΕ vs. MTZ**	**P ΜΔ vs. MTZ**
Μερίδες/ ημέρα	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Αναψυκτικά με ζάχαρη	0 (0-0,04)	0,25 (0-0,53)	0 (0-0,18)	0 (0-0,04)*	0,09 (0-0,09)	0 (0-0,04)*	0,31	0,76	0,34	0,001	<0,001	<0,001	0,76
Γλυκά	0,78 (0,45-1,59)	0,56 (0,23-1,22)	1,07 (0,84-1,52)	0,35 (0,14-0,99)*	0,49 (0,24-1,42)	0,28 (0,17-0,52)*	0,049	<0,001	0,11	0,08	0,03	0,61	0,12
Πρόσθετα σάκχαρα (ζάχαρη, μέλι, μαρμελάδα)	2 (0,42-2)	1,93 (0,64-2)	2 (0,64-2)	0,64 (0,21-1)*	1 (0,21-2)	0,64 (0,07-1)	0,24	0,003	0,048	0,25	0,09	0,22	0,65
MedDietScore (0-55)	31 (28-34)	32 (30-36)	32 (30-33)	37 (35-40)*	34 (30-35)	38 (37-41)*	0,21	<0,001	0,001	0,002	0,002	0,001	0,94

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test, καθώς όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν μη-κανονική κατανομή. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

Όλες οι ομάδες τροφίμων αναφέρονται σε μερίδες/ημέρα. Οι μερίδες καθορίστηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις του Υπουργείου Υγείας για τον Ελληνικό πληθυσμό δημοσιευμένες το 1999 (Υπουργείο Υγείας 1999), καθώς και τις συστάσεις της νέας Μεσογειακής Πυραμίδας (Bach-Faig et al., 2011).

Πίνακας 7.7: Πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την παρέμβαση.													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**		**P αρχή**	**P χρόνου**	**P ομάδας**	**P χρόνου x ομάδας**	**P ΟΕ vs. ΜΔ**	**P ΟΕ vs. ΜΤΖ**	**P ΜΔ vs. ΜΤΖ**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Ημερήσια Ενεργειακή Πρόσληψη (kcal)	2113 (1519-2485)	1864 (1460-2244)*	2163 (1464-2648)	1830 (1441-2090)*	1986 (1412-2276)	1584 (1295-2029)	0,67	0,05	0,60	0,97	0,99	0,62	0,65
Υδατάνθρακες (% ΣΕΠ)	44,9±10,3	46,2±9,8	44,6±8,8	47,4±12,1	47,2±8,4	47,1±6,7	0,62	0,86	0,52	0,88	0,98	0,68	0,87
Σάκχαρα (% ΣΕΠ)	3,7 (2,6-5,1)	3,9 (3,1-5,2)	4,0 (2,9-4,9)	4,1 (3,1-5,1)	4,2 (3,0-5,2)	4,1 (2,9-5,4)	0,82	0,27	0,64	0,73	0,37	0,36	0,96
Διαιτητικές ίνες (γρ./1000kcal)	10,5 (7,4-14,6)	7,5 (4,6-11,5)	9,0 (6,8-11,5)	14,6 (11,4-17)	9,3 (4,7-13,7)	17,0 (13,2-20,1)	0,47	0,04	0,12	<0,001	<0,001	<0,001	0,33
Πρωτεΐνες (% ΣΕΠ)	15,2±3,2	16,7±2,8*	14,7± 3,4	15,3± 3,9	15,6±5,6	17,1± 4,7	0,77	0,06	0,37	0,82	0,45	0,98	0,65
Λιπίδια (% ΣΕΠ)	40,5±9,4	39,5±8,5	42,4±9,3	38,3±10,9	38,2±6,7	36,9±5,2	0,30	0,11	0,34	0,60	0,42	0,93	0,39
Κορεσμένα Λ.Ο. (% ενέργειας)	12,1± 3,4	12,1±3,5	12,2±3,2	11,6±4,4	11,4±3,2	10,0±3,0	0,66	0,29	0,15	0,66	0,69	0,04	0,45
Πολυακόρεστα Λ.Ο. (% ενέργειας)	5,3 (4,0-6,5)	4,9 (3,8-6,0)	5,1 (4,4-7,9)	6,0 (4,9-8,8)	5,4 (4,4-6,2)	6,0 (4,5-6,6)	0,96	0,79	0,35	0,14	0,04	0,22	0,51
Μονοακόρεστα Λ.Ο. (% ενέργειας)	17,8 (15,1-22,7)	17,3 (12,9-20,7)	20,4 (12,5-23,7)	21,3 (16,3-32,7)	16,6 (14,4-20,4)	17,6 (15,4-21,2)	0,69	0,56	0,25	0,24	0,15	0,31	0,44

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test, καθώς όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν μη-κανονική κατανομή. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

Τα δεδομένα ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης και μακροθρεπτικών συστατικών προέκυψαν από την ανάλυση 2 ανακλήσεων 24ώρου με τη χρήση του προγράμματος Nutritionist Pro, version 2.2 (Axxya Systems, USA). **Λ.Ο.:** λιπαρά οξέα, **ΣΕΠ:** συνολική ενεργειακή πρόσληψη.

Αναφορικά με την κύρια έκβαση της παρέμβασης, οι ομάδες ΜΔ και MTZ παρουσίασαν σημαντική βελτίωση στους δείκτες ηπατικής λειτουργίας συγκριτικά με την ΟΕ (***Πίνακας 7.8***). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ALT, GGT και ηπατικής ακαμψίας μειώθηκαν σημαντικά στις 2 ομάδες εντατικής παρακολούθησης σε σύγκριση με την ΟΕ. Επιπλέον, το ποσοστό των ασθενών που απέκτησαν φυσιολογικές συγκεντρώσεις ALT (δηλαδή ALT<40) στο τέλος της παρέμβασης, ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα MTZ σε σχέση με την ομάδα ΜΔ (P=0,05). Επίσης, υπήρξε τάση μεγαλύτερης μείωσης της ηπατικής ακαμψίας στους ασθενείς της ομάδας MTZ σε σχέση με την ομάδα ΜΔ (P=0,10). Λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό της απώλειας σωματικού βάρους ως συγχυτικό παράγοντα, οι παρατηρούμενες βελτιώσεις μεταξύ των ομάδων ως προς στα επίπεδα ALT (P<0,001) και ηπατικής ακαμψίας (P=0,008), καθώς και οι επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων (για την ALT: $P_{ΜΔ\ vs.\ ΟΕ}$<0,001, $P_{MTZ\ vs.\ ΟΕ}$=0,04, $P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$=0,09, $P_{ALT<40\ ΜΔ\ vs.\ MTZ}$=0,06 & για την ηπατική ακαμψία: $P_{MTZ\ vs.\ ΟΕ}$=0,006, $P_{ΜΔ\ vs.\ ΟΕ}$=0,07, $P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$=0,10) διατηρήθηκαν. Αναφορικά στους δείκτες ανίχνευσης της ίνωσης της νόσου, τόσο ο δείκτης NAFLD fibrosis (P=0,68), όσο και οι δείκτες APRI (P=0,58) και BARD (P=0,58), δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές μεταξύ των ομάδων στον χρόνο, παρόλο που ο δείκτης BARD, αυξήθηκε σημαντικά εντός της ΟΕ ($P_{εντός\ ΟΕ}$=0,01) (***Πίνακας 7.8***).

Όσον αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς τα επίπεδα HOMA-IR. Εντούτοις, εντός των ομάδων ΜΔ και MTZ φάνηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα HOMA-IR ($P_{εντός\ ΜΔ}$=0,04, $P_{εντός\ MTZ}$= 0,04) στο τέλος της 6μηνης παρέμβασης, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε τάση αύξησης του ποσοστού των ασθενών με HOMA-IR κάτω του 3 ($P_{εντόςΜΔ}$=0,06, $P_{εντόςMTZ}$=0,07). Αναφορικά με το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών, η ομάδα ΜΔ βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης (P=0,02) και HDL-C (P=0,006), καθώς και τη διαφορά των επιπέδων LDL-C (P=0,01) συγκριτικά με την ΟΕ. Στην ομάδα MTZ παρατηρήθηκε βελτίωση στην αλλαγή των επιπέδων LDL χοληστερόλης (P=0,04) και τάση βελτίωσης των επιπέδων τριγλυκεριδίων (P=0,07), συγκριτικά με την ΟΕ. Μεταξύ των ομάδων ΜΔ και MTZ, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μόνο στα επίπεδα HDL-C (P=0,01) (***Πίνακας 7.9***).

Παρά τις βελτιώσεις στα ηπατικά και τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών των ομάδων παρέμβασης, δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στον επιπολασμό των διαφόρων κλινικών καταστάσεων στις ομάδες εντατικής παρέμβασης, συγκριτικά με την ΟΕ (***Πίνακας 7.10***). Τάση βελτίωσης παρατηρήθηκε μόνο στα ποσοστά υπερτριγλυκεριδαιμίας ($P_{ΜΔ}$=0,16 και P_{MTZ}=0,14) και μεταβολικού συνδρόμου στις ομάδες ΜΔ και MTZ σε σύγκριση με την ΟΕ ($P_{ΜΔ}$=0,10 και P_{MTZ}=0,11), χωρίς διαφορές μεταξύ των 2 αυτών ομάδων (P=0,79 και P=0,97, αντίστοιχα).

Πίνακας 7.8: Δείκτες ηπατικής λειτουργίας των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)		$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times ομάδας}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΔ}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ MTZ}$	$P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
ALT (IU/L)	44 (24-64)	44 (32-58)	51 (30-73)	34 (24-46)*	54 (39-81)	32 (21-41)*	0,23	<0,001	0,76	0,001	0,03	<0,001	0,09
ALT < 40 IU/L (%)	38,1	38,1	42,9	57,1	23,8	71,4*	0,40	0,004	0,60	0,02	0,41	0,006	0,05
AST (IU/L)	28 (20-36)	26 (22-35)	29 (23-38)	24 (20-30)	32 (27-43)	25 (21-34)*	0,40	0,006	0,50	0,23	0,22	0,09	0,74
GGT (IU/L)	64 (34-170)	73 (31-166)	65 (28-96)	40 (23-64)*	71 (37-178)	51 (26-173)*	0,27	0,002	0,13	0,023	0,05	0,02	0,67
GGT < 30 IU/L (%)	9,5	14,3	23,8	33,3	4,8	28,6*	0,19	0,03	0,20	0,38	0,74	0,19	0,29
Ηπατική ακαμψία (kPa)	7,8 (5,5-10,9)	8,0 (6,1-11,1)*	6,6 (5,5-9,8)	6,2 (5,1-9,9)*	7,1 (6,3-8,8)	6,1 (5,0-7,6)*	0,72	0,01	0,35	0,005	0,06	0,002	0,10
Ηπατική ακαμψία ≤ 6,6 kPa	33,3	28,6	52,4	55,0	33,3	57,1	0,44	0,19	0,27	0,16	0,42	0,08	0,26

Πίνακας 7.8: (συνέχεια)													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**		**$P_{αρχή}$**	**$P_{χρόνου}$**	**$P_{ομάδας}$**	**$P_{χρόνου\ x\ ομάδας}$**	**$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΔ}$**	**$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΤΖ}$**	**$P_{ΜΔ\ vs.\ ΜΤΖ}$**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
NAFLD fibrosis score	-2,19±1,4	-2,21±1,1	-2,36±1,3	-2,38±1,5	- 2,11±1,3	-2,09±1,3	0,85	0,95	0,77	0,68	0,45	0,75	0,58
APRI score	0,32 (0,23-0,64)	0,29 (0,24-0,33)	0,27 (0,23-0,64)	0,28 (0,22-0,35)	0,36 (0,28-0,49)	0,30 (0,23-0,42)	0,38	0,049	0,51	0,58	0,50	0,32	0,88
BARD score	1 (1-1,5)	2 (1-2,5)*	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (1-2,5)	1 (1-2,5)	0,83	0,019	0,39	0,58	0,44	0,32	0,87

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος) ή ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το X^2 ή το Fisher's exact test (μεταβλητή GGT<30 IU/L) ή Kruskal-wallis H test για τις συνεχείς μη παραμετρικές μεταβλητές. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το McNemar Test για τις κατηγορικές μεταβλητές ή Wilcoxon test για τις συνεχείς μη παραμετρικές. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, **APRI score**: >1,0 κίρρωση, >0,7 ίνωση, **AST:** ασπαρτική τρανσαμινάση**, BARD score:** <2 αρνητική προγνωστική αξία για προχωρημένη ίνωση, 2-4: στάδια ίνωσης F3 & F4, **GGT:** γ-γλουτάμυλ-τρανσπεπτιδάση**, Δ:** διαφορά, **NAFLD score:** όρια δείκτη: > 0,676 - παρουσία ίνωσης, <-1,455 – απουσία ίνωσης, -1,455 και 0,675: απροσδιόριστο εύρος.

Πίνακας 7.9: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)**		**$P_{αρχή}$**	**$P_{χρόνου}$**	**$P_{ομάδας}$**	**$P_{χρόνου \times ομάδας}$**	**$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΔ}$**	**$P_{ΟΕ\ vs.\ MTZ}$**	**$P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Γλυκόζη (mg/dL)	89 (84,5-96)	91,5 (84,2-96)	94 (83-100)	86 (80-101)	90 (79-95)	88 (80-95)	0,56	0,41	0,48	0,71	>0,99	0,85	>0,99
Ινσουλίνη (μIU/ml)	11,9 (8,0-17,0)	11,0 (6,7-16,9)	16,2 (10,0-20,6)	11,9 (8,5-17,7)*	14 (9,0-20,5)	12 (7,4-17,0)	0,59	0,03	0,77	0,83	0,63	0,53	0,91
HOMA-IR	2,55 (1,7-4,0)	2,55 (1,4-3,6)	3,4 (1,9-5,1)	2,6 (1,7-4,1) *	3,3 (2,0-5,0)	2,7 (1,4-3,8) *	0,66	0,006	0,60	0,68	0,59	0,40	0,72
HOMA-IR<3	57,1	71,4	42,9	66,7*	42,9	71,4*	0,69	<0,001	0,76	0,59	0,44	0,33	0,76
TCHOL (mg/dL)	198 (166-232)	208 (178-253) *	184 (164-230)	183 (150-215)	199 (171-230)	197 (176-239)	0,95	0,65	0,55	0,06	0,02	0,43	0,27
TG (mg/dL)	117 (76-183)	122 (84-168)	107 (72-160)	101 (66-128)	152 (108-203)	140 (79-165) *	0,19	0,05	0,49	0,21	0,22	0,07	0,77

Πίνακας 7.9: (συνέχεια)													
Μεταβλητές	**Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)**		**Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ) (n=21)**		**$P_{αρχή}$**	**$P_{χρόνου}$**	**$P_{ομάδας}$**	**$P_{χρόνου \times ομάδας}$**	**$P_{ΟΕ vs. ΜΔ}$**	**$P_{ΟΕ vs. ΜΤΖ}$**	**$P_{ΜΔ vs. ΜΤΖ}$**
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
HDL-C (mg/dL)	41 (36-58)	42 (35-64)	40 (36-58)	43 (39-62)*	42 (35-49)	42 (35-51)	0,82	0,002	0,69	0,004	0,006	0,85	0,01
LDL-C (mg/dL)	131 (96-142)	141 (110-169) *	125 (89-150)	116 (88-136)	122 (103-139)	123 (107-147)	0,89	0,59	0,35	0,04	0,008	0,29	0,17
% ΔLDL	+9,8 (+2,2 με +23,9)		-9,5 (-22,1 με +12,6)		-5,6 (-16 με +11)						0,01	0,02	0,29
Ουρικό οξύ (mg/dL)	6,1 (4,9-7,0)	6,2 (5,0-6,9)	5,5 (4,7-6,6)	5,3 (4,6-6,1)	6,2 (5,2-7,2)	5,9 (5,1-7,2)	0,22	0,15	0,13	0,80	0,47	0,84	0,69
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,78 (0,66-0,88)	0,80 (0,69-0,96)	0,76 (0,69-0,88)	0,77 (0,71-0,85)	0,83 (0,70-0,95)	0,81 (0,69-0,96)	0,43	0,62	0,62	0,33	0,66	0,14	0,36

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05.

Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test, καθώς όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν μη-κανονική κατανομή. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

Δ: διαφορά, **HDL-C:** χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **LDL-C:** χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, **TCHOL:** ολική χοληστερόλη, **TG:** τριγλυκερίδια.

Πίνακας 7.10: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)		$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times γκρουπ}$	$P_{ΟΕ vs. ΜΔ}$	$P_{ΟΕ vs. MTZ}$	$P_{ΜΔ vs. MTZ}$
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
Παχυσαρκία[a], n,(%)	11, (52,4)	9, (42,9	13, (61,9)	8, (38,1)*	13, (61,9)	10, (47,6)	0,77	0,001	0,88	0,45	0,22	0,64	0,44
Υπερτριγλυκεριδαιμία[b], n, (%)	6, (28,6)	9, (42,9)	5, (23,8)	4, (19)	11, (52,4)	9, (42,9)	0,11	>0,99	0,11	0,27	0,16	0,14	0,79
Διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας[c], n,(%)	3, (14,3)	2, (9,5)	6, (28,6)	5, (23,8)	3, (14,3)	1, (4,8)	0,55	0,11	0,21	0,85	>0,99	0,56	0,66
Αρτηριακή Υπέρταση[d], n, (%)	11, (52,4)	10, (47,6)	12, (57,1)	7, (33)*	13, (61,9)	9, (42,9)	0,82	0,01	0,93	0,39	0,18	0,36	0,69
Μεταβολικό Σύνδρομο, n, (%)	7, (33,3)	9, (42,9)	9, (42,9)	6, (28,6)	11, (52,4)	9, (42,9)	0,46	0,51	0,65	0,21	0,10	0,11	0,97

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως απόλυτες (n) ή σχετικές συχνότητες (%).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων στην αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), έγιναν με το X^2 ή το Fisher's exact test. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το McNemar Test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA).

[a]: ΔΜΣ ≥30 kg /m^2 , [b]: Τριγλυκερίδια≥150 mg/dL, [c]: Γλυκόζη ≥100-126 mg/dl, [d] Συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 και/ή Διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 ή χρήση αντιυπερτασικής αγωγής.

Όσον αφορά το επίπεδο φλεγμονής των ασθενών της μελέτης, δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές συγκριτικά με την ΟΕ ή μεταξύ των ομάδων παρέμβασης (***Πίνακας 7.11***). Ωστόσο, εντός της ομάδας ΜΔ, παρατηρήθηκε βελτίωση των επιπέδων υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) ($P_{εντός\ ΜΔ\ hsCRP}$=0,03), ενώ εντός της ομάδας MTZ μειώθηκαν τα επίπεδα TNF-α ($P_{εντός\ MTZ\ TNF\text{-}α}$=0,021) και υπήρξε τάση βελτίωσης των επιπέδων υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσας πρωτεΐνης ($P_{εντός\ MTZ\ hsCRP}$=0,08), και αδιπονεκτίνης ($P_{εντός\ MTZ\ αδιπονεκτίνη}$=0,06). Σημαντικές βελτιώσεις παρατηρήθηκαν στα επίπεδα οξειδωτικού στρες και κυτταρικής απόπτωσης των ασθενών (***Πίνακας 7.11***). Συγκεκριμένα, τόσο στην ομάδα ΜΔ όσο και στην ομάδα MTZ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων οξειδωμένων γουανοσινών και 8-ισοπροστανίων ($P_{ΜΔ}$=0,009, P_{MTZ}=0,02) σε σύγκριση με την ΟΕ. Αξίζει να σημειωθεί ότι εντός της ΟΕ αυξήθηκαν τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων ($P_{εντός\ ΟΕ\ 8\text{-}ισοπρ.}$=0,025), ενώ υπήρξε τάση αύξησης και των επιπέδων οξειδωμένων γουανοσινών ($P_{εντός\ ΟΕ\ οξειδ.γουαν.}$=0,09). Ωστόσο, μεταξύ των ομάδων εντατικής παρέμβασης δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στους παραπάνω δείκτες ($P_{8\text{-}ισοπρ.}$=0,60, $P=_{οξειδ.γουαν.}$=0,33). Οι βελτιώσεις αυτές μεταξύ των ομάδων ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους στην περίπτωση των επιπέδων 8-ισοπροστανίων ($P_{ΜΔ}$=0,02, P_{MTZ}= 0,03), αλλά και των οξειδωμένων γουανοσινών για την ομάδα ΜΔ συγκριτικά με την ΟΕ ($P_{ΜΔ.}$=0,02), με αντίστοιχη τάση να παρατηρείται και στην ομάδα MTZ συγκριτικά με την ΟΕ (P_{MTZ}=0,10), χωρίς ωστόσο στατιστική σημαντικότητα. Σημαντική, επίσης, μείωση παρατηρήθηκε στον δείκτη κυτταρικής απόπτωσης κυτταροκερατίνη-18, εντός των ομάδων εντατικής παρακολούθησης ($P_{εντός\ ΜΔ}$=0,027, $P_{εντός\ MTZ}$=0,03), αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές συγκριτικά με την ΟΕ ($P_{ΜΔ\ vs.\ ΟΕ}$=0,37 και $P_{MTZ\ vs.\ ΟΕ}$=0,11) ή μεταξύ των ομάδων ΜΔ και MTZ (P=0,67).

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της ανάλυσης «βάσει πρωτοκόλλου», δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα μετρούμενα χαρακτηριστικά στην αρχή της μελέτης (όλα τα P>0,05). Στο τέλος του 6μηνου, παρατηρήθηκαν μικρές μόνο διαφορές συγκριτικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση «πρόθεση για θεραπεία». Ως προς τους κύριους στόχους, η απώλεια βάρους που παρατηρήθηκε στην ΟΕ ήταν ακόμη μικρότερη [-0,9% (-3,4% έως 0,79%)] συγκριτικά με τις ομάδες εντατικής παρακολούθησης ($P_{ΜΔ}$=0,02 και P_{MTZ}=0,04), και συνεπώς οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς την % απώλεια βάρους (P=0,02) και την % αλλαγή του ΔΜΣ (P=0,02) διατηρήθηκαν. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς τα επίπεδα έντονης φυσικής δραστηριότητας (P=0,02) και τον δείκτη MedDietScore (P<0,001) παρέμειναν επίσης

σημαντικές. Αναφορικά με τα κύρια καταληκτικά σημεία της παρέμβασης, διατηρήθηκε η βελτίωση στους δείκτες ηπατικής λειτουργίας στην ομάδα MTZ συγκριτικά με την ΟΕ (P_{ALT}=0,001, P_{GGT}=0,033, $P_{ηπατ.\ ακαμψίας}$=0,008), ενώ στην ομάδα ΜΔ παρατηρήθηκε τάση βελτίωσης (P_{ALT}=0,08, P_{GGT}=0,35, $P_{ηπατ.ακαμψίας}$=0,09). Σε ό,τι αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης, οι παρατηρούμενες τάσεις και διαφορές στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών, διατηρήθηκαν τόσο στην ομάδα ΜΔ ($P_{ολ.\ χχοληστερ.}$=0,05 P_{LDL}=0,03, P_{HDL}=0,03), όσο και στην ομάδα MTZ (P_{TG}=0,08) συγκριτικά με την ΟΕ. Αναφορικά με το επίπεδο φλεγμονής, δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των δύο αναλύσεων. Επιπλέον, τόσο στην ομάδα ΜΔ όσο και στην ομάδα MTZ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων οξειδωμένων γουανοσινών ($P_{ΜΔ}$=0,029, P_{MTZ}= 0,05) σε σύγκριση με την ΟΕ, χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές ως προς τα επίπεδα 8-ισοπροστανίων ($P_{ΜΔ}$=0,43, P=0,48).

Σε κυτταρικό επίπεδο, με σκοπό να εξετασθεί η απόκριση των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στη φλεγμονή, επωάστηκαν τα κύτταρα 21 εθελοντών (7 ασθενείς ανά ομάδα παρέμβασης), παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη LPS, για 4 και 24 ώρες, και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκκρισης του TNF-α και της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) (***Πίνακες 7.12 και 7.13***). Όσον αφορά τα επίπεδα της IL-1β δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές εντός ή μεταξύ των ομάδων είτε στις 4, είτε στις 24ώρες επώασης (***Πίνακας 7.12***). Σημαντική αύξηση στην έκκριση TNF-α παρατηρήθηκε εντός της ΟΕ, μετά από 24ώρες επώασης των κυττάρων παρουσία (P=0,028) και απουσία (P=0,05) του LPS, καθώς και χωρίς LPS στις 4ώρες επώασης (P=0,04) (***Πίνακας 7.13***). Όπως φαίνεται και στα ***Σχήματα 7.3 και 7.4,*** αυξήσεις στην έκκριση του TNF-α, παρατηρήθηκαν και στις ομάδες παρέμβασης ΜΔ και MTZ, οι οποίες ήταν σαφώς μικρότερες από την ΟΕ, χωρίς ωστόσο σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων (***Πίνακας 7.13***).

Πίνακας 7.11: Δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες των ασθενών των τριών ομάδων, πριν και μετά την 6μηνη παρέμβαση.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=21)		Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=21)		P αρχή	P χρόνου	P ομάδας	P χρόνου x ομάδας	P ΟΕ vs. ΜΔ	P ΟΕ vs. MTZ	P ΜΔ vs. MTZ
	Αρχή	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**	**Αρχή**	**6 μήνες**							
TNF-α (pg/ml)	1,76 (0,64-3,6)	1,65 (0,65-2,6)	2,48 (1,4-3,1)	1,76 (0,74-2,9)	2,21 (1,4-3,6)	1,56 (1,0-2,2)*	0,59	0,02	0,93	0,49	0,44	0,28	0,69
hsCRP (g/dL)	1,64 (0,9-3,7)	1,52 (0,9-2,4)	2,23 (0,7-6,5)	1,41 (0,6-4,9)*	1,9 (0,93-3,6)	1,82 (0,6-3,2)*	0,93	0,02	0,43	0,64	0,35	0,73	0,57
Αδιπονεκτίνη (μg/ml)	7,2 (4,8-8,7)	7,3 (4,9-9,1)	8,4 (4,9-11,9)	8,5 (5,2 -11,6)	8,5 (3,6-10,2)	9,6 (4,4-11,3)*	0,77	0,09	0,55	0,73	0,49	0,13	0,54
8-ισοπροστάνια (ng/mmol CRE)	683 (390-944)	899 (582-1411) *	662 (351-1272)	526 (424-693) *	786 (576-1055)	575 (434-933)	0,48	0,37	0,26	0,01	0,009	0,02	0,60
Οξειδωμένες γουανοσίνες (μg/mmol CRE)	417,7 (238,8-541,5)	496,3 (341,9-712,2)*	661,2 (310,5-934,6)	350,5 (299,97-619,7)	463,2 (365,5-670,9)	410,8 (317,2-562,5) *	0,11	0,40	0,42	0,01	0,01	0,04	0,33
Κυτταρο-κερατίνη-18 (U/L)	119 (76-205)	107 (54-155)	167 (89-443)	135 (65-199)*	172 (101-285)	109 (67-165)*	0,09	<0,001	0,15	0,38	0,37	0,11	0,67

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05.

Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test, καθώς όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν μη-κανονική κατανομή. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA). **hsCRP**: υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσα πρωτεΐνη, **RMANOVA:** repeated measures analysis of variance, **TNF-α:** παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α.

Πίνακας 7.12: α). Επίπεδα έκκρισης της ιντερλευκίνης 1β από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 4 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)	Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=7)	Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=7)	$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times ομάδας}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΔ}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ MTZ}$	$P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$
IL-1β χωρίς διέγερση αρχή	14,0 (0,52-22,22)	4,3 (1,76-420)	6,63 (4,75-14,93)	0,41	0,14	0,87	0,53	0,32	0,48	0,69
IL-1β χωρίς διέγερση 6 μήνες	25,9 (13,91-60,4)	16,37 (8,19-9255)	29,4 (14,78 – 112)							
P εντός των ομάδων	0,31	0,31	0,043							
IL-1β με LPS διέγερση αρχή	1626 (27,8 – 5465)	390 (2,3-7494)	70 (17,8-334)	0,41	0,46	0,76	0,56	0,80	0,20	0,49
IL-1β με LPS διέγερση 6μήνες	1355 (25-1687)	941 (8-2900)	188 (62-1828)							
P εντός των ομάδων	0,34	0,24	0,12							

Πίνακας 7.12: β). Επίπεδα έκκρισης της ιντερλευκίνης 1β από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 24 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)	Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=7)	Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=7)	$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times ομάδας}$	$P_{ΟΕ \text{ vs. } ΜΔ}$	$P_{ΟΕ \text{ vs. } MTZ}$	$P_{ΜΔ \text{ vs. } MTZ}$
IL-1β χωρίς διέγερση αρχή	13,56 (12,55-534)	12,22 (3,3-64,2)	20,6 (2,3-187)	0,76	0,22	0,87	0,78	0,37	0,27	0,97
IL-1β χωρίς διέγερση 6 μήνες	629,31 (16,06-1845)	1738 (5,4-4156)	461 (26-2838)							
P εντός των ομάδων	0,31	0,12	0,09							
IL-1β με LPS διέγερση αρχή	2084 (25,9- 5727)	1570 (2,6-3848)	1509 (423-20290)	0,63	0,23	0,77	0,49	0,36	0,92	0,36
IL-1β με LPS διέγερση 6μήνες	2344 (15,4 – 2621)	2389 (5,7-9545)	2210 (31,9-2268)							
P εντός των ομάδων	0,24	0,18	0,25							

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test, καθώς όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν μη-κανονική κατανομή. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA). **IL-1β:** ιντερλευκίνη 1β, **LPS:** λιποπολυσακχαρίτης.

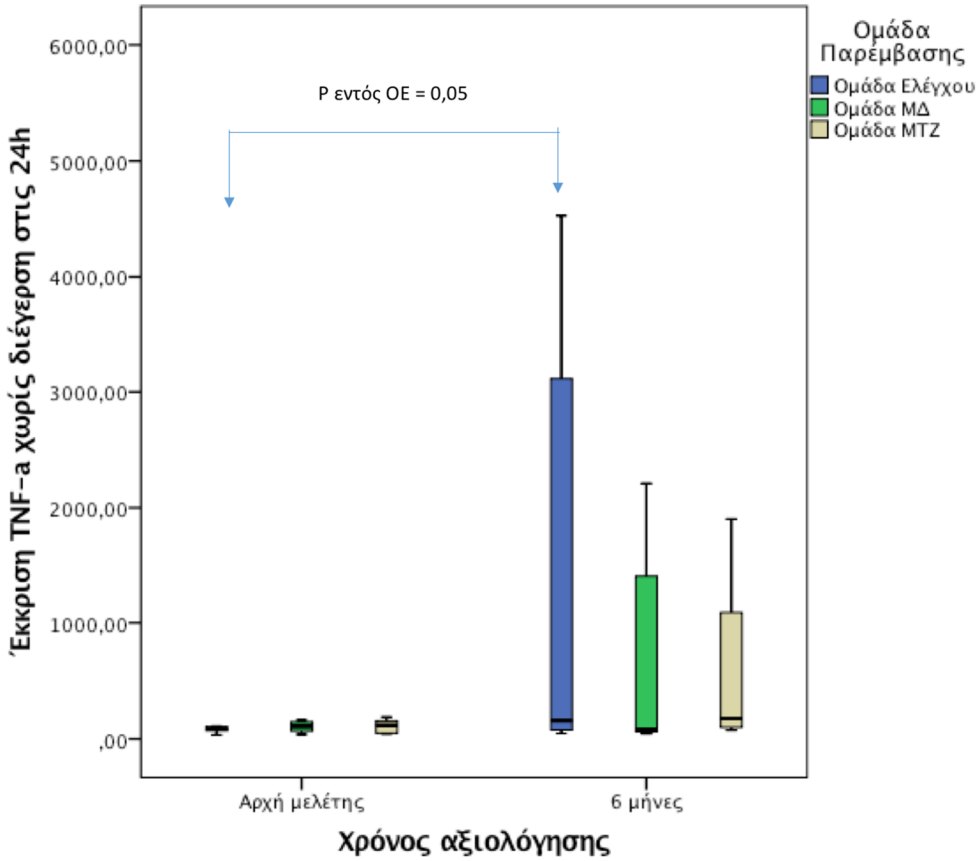
Πίνακας 7.13: α). Επίπεδα έκκρισης της TNF-α από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 4 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης.

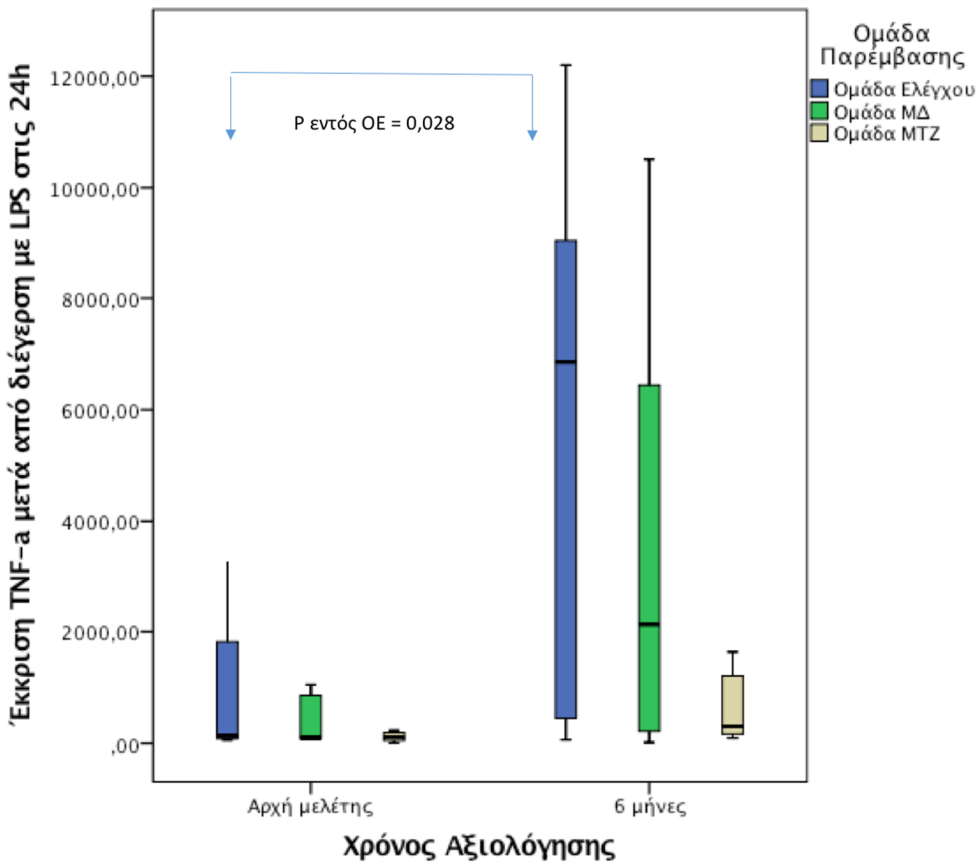
Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)	Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=7)	Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=7)	$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times ομάδας}$	$P_{ΟΕ \text{ vs. } ΜΔ}$	$P_{ΟΕ \text{ vs. } MTZ}$	$P_{ΜΔ \text{ vs. } MTZ}$
TNF-α χωρίς διέγερση αρχή	69,4 (45,3-108,5)	76,6 (65,6-603,7)	118 (52,4-142)	0,48	0,48	0,83	0,31	0,46	0,10	0,45
TNF-α χωρίς διέγερση 6 μήνες	86,8 (63,6-273)	107 (36,1-430)	73,9 (58,7-147)							
P εντός των ομάδων	0,61	0,40	0,61							
TNF-α με LPS διέγερση αρχή	155 (86,9-3156)	193,19 (76,5-3950)	92 (19,2-206)	0,40	0,045	0,37	0,71	0,36	0,92	0,53
TNF-α με LPS διέγερση 6μήνες	5513 (133-6844)*	754 (103-4017)	221 (107-1530)							
P εντός των ομάδων	0,04	0,13	0,31							

Πίνακας 7.13: β). Επίπεδα έκκρισης της TNF-α από τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών στις 24 ώρες επώασης, παρουσία και απουσία του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην αρχή και το τέλος της 6μηνης παρέμβασης.

Μεταβλητές	Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) (n=21)	Ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) (n=7)	Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ) (n=7)	$P_{αρχή}$	$P_{χρόνου}$	$P_{ομάδας}$	$P_{χρόνου \times ομάδας}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ ΜΔ}$	$P_{ΟΕ\ vs.\ MTZ}$	$P_{ΜΔ\ vs.\ MTZ}$
TNF-α χωρίς διέγερση αρχή	84 (64,3-108,5)	110 (61,1-161)	118 (48,7-187)	0,89	0,023	0,95	0,72	0,46	0,88	0,59
TNF-α χωρίς διέγερση 6 μήνες	159 (62-4075)	82,5 (51,9-2209)	176 (98-1904)							
P εντός των ομάδων	0,05	0,73	0,13							
TNF-α με LPS διέγερση αρχή	131 (77-3414)	97 (74,9-1037)	108 (43-230)	0,61	0,014	0,42	0,91	0,79	0,68	0,85
TNF-α με LPS διέγερση 6μήνες	6854 (109-9893)	2133 (115-8923)	301 (108-1638)							
P εντός των ομάδων	0,028	0,13	0,24							

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P) ορίστηκε στο 5%. * συγκρίσεις εντός ομάδων = P<0,05. Για τις συγκρίσεις στη αρχή της μελέτης ($P_{αρχή}$), χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-wallis H test, καθώς όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν μη-κανονική κατανομή. Για τις συγκρίσεις εντός των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test. Για τις συγκρίσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των μεταβλητών στο χρόνο και μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (RMANOVA). **LPS:** λιποπολυσακχαρίτης, **TNF-a:** παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α.





Σχήματα 7.3 (αριστερά) και 7.4 (δεξιά): Επίπεδα έκκρισης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (TNF-α) των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC) των εθελοντών, παρουσία (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του λιποπολυσακχαρίτη LPS μετά από 24ώρες επώασης.
ΜΔ: ομάδα μεσογειακής δίαιτας, **MTZ:** ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής, **ΟΕ:** Ομάδα ελέγχου.

Συζήτηση

Η παρούσα μονά-τυφλή ελεγχόμενη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη είχε ως στόχο να διερευνήσει τις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις μιας παρέμβασης βασισμένης, είτε στη Μεσογειακή δίαιτα αυτή καθ' αυτή, είτε στον μεσογειακό τρόπο ζωής, παραλληλα με απώλεια βάρους, σε κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD, διαγνωσμένης μέσω υπερήχου, συγκριτικά με τη συνήθη πρακτική αντιμετώπισης. Και οι δύο ομάδες παρέμβασης ακολούθησαν ένα εντατικοποιημένο πρόγραμμα με στόχο την αύξηση της συμμόρφωσης στη μεσογειακή δίαιτα, παράλληλα με απώλεια βάρους, ενώ η ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής, έλαβε επιπλέον οδηγίες για ενίσχυση της φυσικής δραστηριότητας και της συμμόρφωσης στις συνιστώμενες ώρες ύπνου. Η ομάδα ελέγχου έλαβε μόνο στην αρχή της μελέτης υποθερμιδικό διαιτολόγιο με παρόμοια σύσταση μακροθρεπτικών συστατικών με τις υπόλοιπες ομάδες, και γραπτές οδηγίες για έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής.

Κατά την εξάμηνη αξιολόγηση, όλες οι ομάδες, συμπεριλαμβανομένης της ομάδας ελέγχου μείωσαν το σωματικό βάρος, με μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας (~5%), να παρατηρείται στις ομάδες εντατικής παρέμβασης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που παρουσίασε μικρή απώλεια βάρους (περίπου 2%). Όπως φάνηκε από τις ανακλήσεις 24ώρου, όλες οι ομάδες ακολούθησαν μία δίαιτα με παρόμοια σύσταση μακροθρεπτικών συστατικών. Παρόλα αυτά, μόνο οι ομάδες εντατικοποιημένης παρέμβασης αύξησαν την προσκόλληση στη μεσογειακή δίαιτα, η οποία ήταν συνάρτηση σημαντικών αλλαγών σε επίπεδο τροφίμων (συγκεκριμένα αύξησης μη επεξεργασμένων δημητριακών, φρούτων και ξηρών καρπών και μείωσης επεξεργασμένων δημητριακών και κόκκινου κρέατος), προσδίδοντας ως εκ τούτου και αλλαγές σε επίπεδο μακροθρεπτικών συστατικών και συγκεκριμένα αύξησης της πρόσληψης διαιτητικών ινών. Η ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής, αύξησε επιπλέον την ενασχόλησή με έντονης έντασης δραστηριότητες, χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς το συνολικό επίπεδο σωματικής δραστηριότητας. Αναφορικά με την έκβαση της παρούσας μελέτης, μόνο οι ομάδες εντατικής παρέμβασης βελτίωσαν τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και ηπατικής ακαμψίας, καθώς και το επίπεδο οξειδωτικού στρες, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, αλλαγές οι οποίες ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους.

Αναφορικά με την επίδραση της παρέμβασης στα ηπατικά χαρακτηριστικά των ασθενών, τόσο τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων ALT και GGT, όσο και ο βαθμός ηπατικής ακαμψίας μειώθηκαν εξίσου στις 2 ομάδες εντατικής παρακολούθησης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μάλιστα οι παρατηρούμενες αλλαγές αναφορικά με τα επίπεδα της ALT και τα επίπεδα ηπατικής ακαμψίας παρέμειναν σημαντικές όταν λήφθηκε υπόψη η απώλεια βάρους ως συγχυτικός παράγοντας, ενώ οι δύο ομάδες εντατικής παρακολούθησης δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους παρά μόνο τάσεις ως προς τα επίπεδα ALT και τα επίπεδα ηπατικής ακαμψίας. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, αναφορικά με την επίδραση της ΜΔ, παράλληλα με απώλεια βάρους, στην ηπατική υγεία, φαίνεται να συμφωνούν με εκείνα της μη ελεγχόμενης μελέτης των *Trovato* και *συν.* (Trovato et al., 2015), σύμφωνα με την οποία παρατηρήθηκε υπερηχογραφική βελτίωση της νόσου μετά από απώλεια βάρους, αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ και αύξηση του επιπέδου σωματικής δραστηριότητας των ασθενών με NAFLD. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν επίσης 2 κλινικές μελέτες που έχουν αναδείξει την ευεργετική επίδραση της ΜΔ αυτής καθ' αυτής, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους σε ηπατικά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD. Ωστόσο υπάρχουν κάποιοι μεθοδολογικοί περιορισμοί, όπως για παράδειγμα στη διασταυρούμενη κλινική μελέτη των *Ryan* και *συν.* (Ryan et al., 2013) το δείγμα αποτελούνταν από 12 μόλις ασθενείς με NAFLD. Επιπλέον, η μελέτη διεξήχθη στην Αυστραλία, δηλαδή σε έναν πληθυσμό με διαφορετικές διατροφικές συνήθειες και μακριά από το προφίλ μεσογειακής δίαιτας, που επικρατεί στις περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο, γεγονός που ενδεχομένως εξηγεί και τη γρήγορη ιστολογική βελτίωση νόσου, καθώς και τη βελτίωση της ινσουλινοευαισθησίας μετά την 6 εβδομάδων συμμόρφωση σε μία μεσογειακού τύπου δίαιτα, συγκριτικά με μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (ομάδα ελέγχου). Παράλληλα, στην προσφάτως δημοσιευμένη μελέτη των *Misciagna* και *συν.* (Misciagna et al., 2016), αναδείχθηκε υπερηχογραφική βελτίωση της νόσου μετά από αύξηση της προσκόλλησης σε μία *ad libidum* χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη μεσογειακή δίαιτα, σε σχέση με μία δίαιτα ελέγχου, βασισμένη στις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Έρευνας Τροφίμων και Διατροφής της Ιταλίας. Εντούτοις, στη δημοσιευμένη μορφή του άρθρου, δεν ξεκαθαρίζεται ποιες διαφορές στη δίαιτα είχαν οι δύο ομάδες στο τέλος της παρέμβασης και συνεπώς δεν είναι ξεκάθαρο αν τα όποια οφέλη αποδίδονται στον χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, στη ΜΔ καθ΄ αυτή ή σε συνδυασμό αυτών. Η παρούσα εργασία καθώς και άλλες μελέτες που έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν

σε ασθενείς με NAFLD (Browning et al., 2011, Haufe et al., 2011, Kirk et al., 2009, Bian et al., 2014) υποστηρίζουν επίσης ότι μία δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια μπορεί να αποτελεί μέρος της αντιμετώπισης της NAFLD, παρόλο που στο παρελθόν οι υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια δίαιτες θεωρούνταν οι πλέον επιβλαβείς για τους ασθενείς με ηπατική διαταραχή.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα ηπατικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας ΜΔ, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αποδίδονται κυρίως στην αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ δεδομένου ότι ελέγχθηκε η επίδραση της απώλειας βάρους. Η ΜΔ είναι ένα σύνολο διατροφικών συνηθειών που ακολουθούν παραδοσιακά οι πληθυσμοί των χωρών που συνορεύουν με τη Μεσόγειο. Η σύγχρονη εκδοχή της δίαιτας αυτής χαρακτηρίζεται από υψηλή ημερήσια κατανάλωση ελάχιστα επεξεργασμένων δημητριακών, λαχανικών, φρούτων, ξηρών καρπών και ελαιολάδου (ως κύρια πηγή λίπους), μέτρια εβδομαδιαία κατανάλωση οσπρίων, πουλερικών και ψαριών και χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος και γλυκών. Αν και στην παρούσα μελέτη, η πρόσληψη ελαιολάδου, μέσω της πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, δε φάνηκε να αύξηθηκε σημαντικά στο τέλος της παρέμβασης στις ομάδες εντατικής παρακολούθησης, είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη ότι η μελέτη αυτή διενεργήθηκε σε έναν πληθυσμό που έχει κάποιου βαθμού υιοθέτηση του μεσογειακού προτύπου διατροφής, ιδίως όσον αφορά κάποια χαρακτηριστικά αυτού όπως είναι η η υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου. Από την άλλη, η σημαντική αύξηση στην κατανάλωση φρούτων, λιγότερο επεξεργασμένων δημητριακών και ξηρών καρπών, τρόφιμα με κατεξοχήν αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς και η μείωση της πρόσληψης επεξεργασμένων δημητριακών και κόκκινου κρέατος που παρατηρήθηκε στις ομάδες παρέμβασης (Sears, 2015), έχουν συσχετιστεί με μειωμένη ινσουλινοαντίσταση σε φαινομενικά υγιείς πληθυσμούς (Rideout et al., 2013, Torris et al., 2016), καθώς και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (Zelber-Sagi et al., 2007, Finelli and Tarantino, 2012). Τα φυτοχημικά, οι βιταμίνες, τα ιχνοστοιχεία από τα φρούτα και τα λαχανικά, και η χαμηλή γλυκαιμική απάντηση εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε τρόφιμα πλούσια σε διαιτητικές ίνες, φαίνεται να είναι κάποιοι από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η ΜΔ βελτιώνει τον μεταβολισμό λιπιδίων, καθώς και τον βαθμό ηπατικής στεάτωσης, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με NAFLD (Godos et al., 2016).

Η ομάδα ΜΤΖ που εκτός από την αύξηση της συμμόρφωσης στη ΜΔ ενίσχυσε τις ώρες ύπνου και παρουσίασε σημαντικά λιγότερα ποσοστά αϋπνίας συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ παράλληλα αύξησε την ενασχόληση με έντονης έντασης δραστηριότητες, όταν λήφθηκε υπόψη η απώλεια βάρους, παρουσίασε μόνο κάποιες τάσεις μεγαλύτερης μείωσης στα επίπεδα της ALT, υψηλότερου ποσοστού φυσιολογικών συγκεντρώσεων ALT (δηλαδή ALT<40 IU/L), και μεγαλύτερης βελτίωσης των επιπέδων ηπατικής ακαμψίας, συγκριτικά με την ομάδα ΜΔ, οι οποίες θα μπορούσαν να εξηγηθούν και μέσω των παραπάνω αλλαγών που πέτυχε η ομάδα αυτή συγκριτικά με την ομάδα ΜΔ. Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα και με τα αποτελέσματα των προηγούμενων δύο επιδημιολογικών μελετών της παρούσας διδακτορικής διατριβής (μελέτη 1 και 2), η ακολουθία της συνιστώμενης διάρκειας ύπνου (≥7 και ≤9 ώρες/ ημέρα) συσχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, ενώ και άλλες επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει τη μικρή διάρκεια ύπνου (<5 ώρες έναντι >7 ώρες) καθώς και την κακή ποιότητα ύπνου με αυξημένη πιθανότητα παρουσίας NAFLD (Imaizumi et al., 2015, Bernsmeier et al., 2015). Επιπλέον, ενώ θα περίμενε κανείς, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της μελέτης 3 της παρούσας διατριβής, αλλά και από τα ευρήματα άλλων μελετών (Musso et al., 2012, Bradford et al., 2014) ένα επιπρόσθετο όφελος στην ηπατική υγεία των ασθενών της ομάδας ΜΤΖ, λόγω της υιοθέτησης ενός πιο ενεργού τρόπου ζωής, κάτι τέτοιο δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Πιθανότατα, το γεγονός ότι το συνολικό επίπεδο φυσικής δραστηριότητας δε διέφερε τελικά μεταξύ των ομάδων στο τέλος της παρέμβασης, να σημαίνει ότι η αλλαγή αυτή στις συνήθειες άσκησης στην ομάδα ΜΤΖ συγκριτικά με τις άλλες ομάδες, να μην ήταν αρκετή για την εμφάνιση επιπρόσθετων αλλαγών στο ηπατικό προφίλ των ασθενών.

Όσον αφορά τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, οι ομάδες εντατικής παρέμβασης παρουσίασαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ειδικότερα, τα επίπεδα οξειδωμένων γουανοσινών και 8-ισοπροστανίων παρουσίασαν σημαντική μείωση στα ούρα των ασθενών των ομάδων ΜΔ και ΜΤΖ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, και μάλιστα ανεξάρτητα της απώλειας βάρους. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους ασθενείς με NAFLD, καθώς δεδομένου του παθογενετικού μηχανισμού της νόσου, που αναφέρει ότι η συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων, προάγει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (Rolo et al., 2012) και άρα την εξέλιξη της νόσου, η μεσογειακή δίαιτα μπορεί να συμβάλει παρεμβαίνοντας σε ένα από τα πολλά

«πολλαπλά χτυπήματα» της NAFLD, γεγονός που υποστηρίζεται και από τη μείωση των επιπέδων ηπατικής ακαμψίας που παρατηρήθηκε στους ασθενείς εντατικής παρακολούθησης της παρούσας μελέτης. Οι παραπάνω δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αποτίμηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες θεωρούνται ιδιαίτερα ευαίσθητοι και ειδικοί από άλλους, για την *in vivo* αξιολόγηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και της ανίχνευσης αλλαγών στα επίπεδα ROS (Janicka et al., 2010, Dalle-Donne et al., 2006). Αν και αντίστοιχα δεδομένα κλινικών μελετών σε NAFLD πληθυσμό δεν υπάρχουν, η προστατευτική επίδραση της ΜΔ, ανεξάρτητα της θερμιδικής πρόσληψης, στα επίπεδα οξειδωτικού στρες, μέσω των συγκεκριμένων δεικτών, έχει αναδειχθεί από ένα υπο-δείγμα 110 μεσήλικων γυναικών με μεταβολικό σύνδρομο της μεγάλης πολυκεντρικής τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης PREDIMED (Mitjavila et al., 2013). Συγκεκριμένα, η αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ, χωρίς θερμιδικό περιορισμό, συσχετίστηκε με μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων οξειδωτικού στρες συγκριτικά με την προσκόλληση σε μία υψηλού λίπους δίαιτα (ομάδα ελέγχου). Επιπλέον, σε μία προοπτική μελέτη 259 υγιών προεμμηνοπαυσιακών γυναικών ηλικιάς 18-44 ετών, μία μονάδα αύξησης της προσκόλλησης στη ΜΔ, συσχετίστηκε με 4,5% μείωση των επιπέδων 8-ισοπροστανίων και 1,39% αύξηση των επιπέδων ασκορβικού οξέος στο πλάσμα, ανεξάρτητα της ενεργειακής πρόσληψης. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της μεσογειακής δίαιτας στη μείωση του οξειδωτικού στρες δεν είναι γνωστός, η αυτή καθ' αυτή αντιοξειδωτική δράση που ασκούν τα φυτοοιστρογόνα, τα φαινολικά οξέα και οι διάφορες βιταμίνες της δίαιτας είναι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για τη μείωση του οξειδωτικού στρες (Roberts et al., 2002). Μάλιστα, η αυξημένη πρόσληψη α-τοκοφερόλης και ασκορβικού όξεος μέσω της δίαιτας, έχει συσχετιστεί με αυξημένη κάθαρση ROS τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Munteanu et al., 2004, Carr et al., 2000).

Αναφορικά με τους δείκτες φλεγμονής, δεν αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων παρέμβασης στη παρούσα μελέτη. Ωστόσο στο τέλος της εξάμηνης παρέμβασης μειώθηκαν τα επίπεδα hs-CRP στην ομάδα ΜΔ, ενώ στην ομάδα MTZ μειώθηκαν τα επίπεδα TNF-α και παρατηρήθηκε πτωτική τάση στην hs-CRP και τάση αύξησης στην αδιπονεκτίνη. Αν και είναι γνωστό, ότι η μεσογειακή δίαιτα βελτιώνει τα επίπεδα φλεγμονής και μάλιστα ανεξάρτητα της απώλειας βάρους σε σχετιζόμενες με την παχυσαρκία παθήσεις (Esposito et al., 2003, Esposito et al., 2004) η απώλεια βάρους αποτελεί σημαντική παράμετρο βελτίωσης του προφίλ φλεγμονής, όπως έχει ήδη

εντοπιστεί από αρκετές μελέτες (Huang et al., 2015). Επιπλέον, οι περισσότερες τάσεις βελτίωσης των φλεγμονωδών δεικτών που παρατηρήθηκαν εντός της ομάδας ΜΤΖ σε σχέση με την ομάδα ΜΔ, πιθανότατα οφείλονται στην ενίσχυση των ωρών ύπνου καθώς και στην αύξηση της ενασχόλησης με έντονης έντασης δραστηριότητες που παρατηρήθηκαν μόνο εντός της ομάδα ΜΤΖ και όχι στην ομάδα ΜΔ.

Παράλληλα, στη παρούσα εργασία έγινε μία προσπάθεια να εκτιμηθεί *ex vivo* η επίδραση της παρέμβασης σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (PBMC) 21 εθελοντών (7 άτομα/ομάδα), αποτιμώντας τις αλλαγές στην έκκριση των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και ιντερλευκίνης 1β, έπειτα από διέγερση ή όχι με το λιποπολυσακχαρίτη LPS. Παρόλο που η επαγωγή των PBMC με LPS είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής των κυτταροκινών, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (Monagas et al., 2009, Bertelli et al., 2002), δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος δείγματος (μόλις 7 άτομα ανά ομάδα) περιορίζει σημαντικά τη στατιστική ισχύ των αποτελεσμάτων και συνεπώς απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα στη βιβλιογραφία και η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη απόπειρα διερεύνησης μίας τέτοιου τύπου *ex vivo* παρέμβασης σε κύτταρα PBMC ασθενών με NAFLD.

Αναφορικά με το λιπιδαιμικό προφίλ, στην ομάδα ΜΔ παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση των συγκεντρώσεων ολικής, LDL-C και HDL-C χοληστερόλης, ενώ αντίστοιχες βελτιώσεις στα επίπεδα LDL-C και τάση βελτίωσης των επιπέδων τριγλυκεριδίων παρατηρήθηκαν και στην ομάδα ΜΤΖ, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Όλες οι παραπάνω αλλαγές διατηρήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη την απώλεια βάρους. Το γεγονός ότι περισσότεροι παράγοντες του λιπιδαιμικού προφίλ βελτιώθηκαν στην ομάδα ΜΔ από ότι στην ομάδα ΜΤΖ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, πιθανότατα αντανακλά διαφορές σε επίπεδο τροφίμων (μεγαλύτερη κατανάλωση φρούτων και λιγότερων γλυκών στην ομάδα ΜΔ), δεδομένου ότι και οι δύο ομάδες εντατικής παρακολούθησης παρουσίασαν ανάλογη προσκόλληση στη μεσογειακή δίαιτα, της οποίας η ευεργετική επίδραση στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ είναι ήδη γνωστή (Ros et al., 2014). Επιπλέον, όπως ήδη αναφέρθηκε, πιθανότατα οι αλλαγές των συνηθειών άσκησης που παρατηρήθηκαν στην ομάδα ΜΤΖ, να μην ήταν αρκετές για την επίτευξη κάποιου επιπρόσθετου όφελους στη

βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών. Μεταξύ των ομάδων ΜΔ και ΜΤΖ, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα HDL, αύξηση της οποίας φάνηκε μόνο στην ομάδα ΜΔ. Τα γλυκά είναι μία πλούσια πηγή απλών σακχάρων και τρανς λιπαρών οξέων και η μείωση τους μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της HDL-C, γεγονός που πιθανόν εξηγεί την παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ των ομάδων εντατικής παρέμβασης (Catapano et al., 2016).

Παρά τις βελτιώσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων και ως προς τα επίπεδα HOMA-IR, αν και αξίζει να αναφερθεί ότι μόνο εντός των ομάδων εντατικής παρακολούθησης παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση των επιπέδων HOMA-IR στο τέλος της 6μηνης παρέμβασης. Πιθανότατα άλλοι δείκτες, περισσότερο ευαίσθητοι στις αλλαγές των επιπέδων ινσουλινοαντίστασης και ινσουλινοευαισθήσιας, όπως είναι η χρήση των μεθόδων «*Hyperglycemic clamp ή Hyperinsulinemic-euglycemic clamp*», να μπορούσαν να προσδιορίσουν καλύτερα τις παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα ινσουλινοαντίστασης στη παρούσα μελέτη (Tam et al., 2012, Singh and Saxena, 2010).

Αξίζει επιπλέον να αναφερθεί ότι οι ασθενείς που εγκατέλειψαν την ομάδα ελέγχου (n=7) συγκριτικά με τα υπόλοιπα άτομα της ομάδας που παρέμειναν στην μελέτη (n=14), είχαν σημαντικά υψηλότερο βαθμό ηπατικής ακαμψίας, ενώ παρουσίαζαν μία τάση υψηλότερου ΔΜΣ. Πιθανότατα, οι συγκεκριμένοι ασθενείς να αναζητούσαν πιο ενταντική παρέμβαση, δεδομένου της σοβαρότητας της κατάστασής τους, γι΄αυτό και εγκατέλειψαν τη μελέτη. Παρόλα ταύτα, μέσω της μεθόδου «πρόθεση για θεραπεία» όλοι οι ασθενείς συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση. Ακόμα όμως και από την ανάλυση «βάσει πρωτοκόλλου», δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα μετρούμενα χαρακτηριστικά στην αρχή της μελέτης συγκριτικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση «πρόθεση για θεραπεία».

Στη παρούσα εργασία υπάρχουν περιορισμοί. Καταρχάς, το υψηλό ποσοστό εγκαταλείψαντων στην ομάδα ελέγχου αποτελεί περιορισμό της μελέτης, ωστόσο η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όλο το δείγμα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «πρόθεση για θεραπεία», χωρίς σημαντικές τροποποιήσεις στα βασικά συμπεράσματα της μελέτης από την ανάλυση «βάσει πρωτοκόλλου», γεγονός που περιορίζει την πιθανότητα σφάλματος της επίδρασης της παρέμβασης στην κύρια έκβαση της μελέτης. Επίσης, παρά την

τυχαιοποίηση των ασθενών, οι ώρες ύπνου διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων στην αρχή της μελέτης, και συνεπώς δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με αυτή την έκφανση του τρόπου ζωής, που αποτελούσε σημαντική παράμετρο για τη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ΜΔ και ΜΤΖ. Η μελέτη ήταν, επίσης, ευάλωτη στο σφάλμα ανάκλησης. Τα FFQs, αν και εύκολα στη διαχείρισή τους και οικονομικά, απαιτούν ανάκληση της πληροφορίας ως προς την κατανάλωση τροφίμων κατά το προηγούμενο χρονικό διάστημα, γεγονός που αποτελεί μια δύσκολη γνωστική εργασία για τους ερωτηθέντες (EFSA, 2009). Η αξιολόγηση της βαρύτητας της NAFLD βασίστηκε στην ελαστογραφία ήπατος «share-wave elastography», αντί στη βιοψία ήπατος που αποδεδειγμένα θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς (Papagianni et al., 2015). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή παρέχει βελτιωμένη διαγνωστική ακρίβεια σε σύγκριση με τις άλλες ελαστογραφικές μεθόδους, περιορίζοντας διάφορους φυσικούς περιορισμούς της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας παχυσαρκίας (Papagianni et al., 2015). Η παρούσα μελέτη διαθέτει και ορισμένα δυνατά σημεία. Πρόκειται για μία μονά τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη, που προσπάθησε να διερευνήσει σημαντικές παραμέτρους που εμπλέκονται στην αντιμετώπιση της NAFLD. Επιπλέον, εκτός από την έμφαση στη μεσογειακή δίαιτα, η οποία φάνηκε να έχει ευεργετικές επιδράσεις στα ηπατικά χαρακτηριστικά και σε δείκτες οξειδωτικού στρες ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε και σε άλλες πτυχές του τρόπου ζωής, όπως ήταν η προώθηση ενός ενεργού τρόπου ζωής και η βελτίωση των συνηθειών ύπνου, με σκοπό τη συνολική αποτίμηση των διαφόρων εκφάνσεων του τρόπου ζωής στο σύνολο τους, μέσω ενός προτύπου.

Συμπερασματικά, μία εντατικοποιημένη παρέμβαση διάρκειας 6 μηνών, βασισμένη είτε σε μία υποθερμιδική, υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια μεσογειακού τύπου δίαιτα βελτιώνει τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και ηπατικής ακαμψίας και το επίπεδο οξειδωτικού στρες των ασθενών με NAFLD, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, συγκριτικά με τη συνήθη πρακτική αντιμετώπισης. Παράλληλα, η παρούσα εργασία κατάφερε να αναδείξει μόνο κάποιες τάσεις για κάποιο επιπρόσθετο όφελος από την ενίσχυση της μεσογειακής δίαιτας με έντονη φυσική δραστηριότητα και συμμόρφωση σε καλές πρατικές ύπνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΣΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι μία παθολογική κατάσταση συσσώρευσης λίπους σε ποσοστό > 5% του συνολικού βάρους του ήπατος, που δεν οφείλεται στην υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ ή άλλες αιτίες ηπατικής στεάτωσης (EASL-EASD-EASO, 2016). Λόγω της υψηλής συσχέτισής της με την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και το ΣΔτ2, οι ασθενείς με NAFLD εμφανίζουν αυξημένη θνητότητα από τα σχετιζόμενα ή μη με το ήπαρ νοσήματα, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, προκαλώντας, ως εκ τούτου σημαντική οικονομική επιβάρυνση στα συστήματα υγείας. Προς το παρόν, δεν υπάρχει καμία αποδεδειγμένη, ασφαλής και αποτελεσματική φαρμακευτική ή χειρουργική θεραπεία για την αντιμετώπιση της NAFLD ή της NASH, και η τροποποίηση του τρόπου ζωής παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας τους. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνήσει τη θέση των διαφόρων συνιστωσών του τρόπου ζωής ως παράγοντες κινδύνου της NAFLD, διεξάγωντας δύο επιδημιολογικές μελέτες, στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και μετα-ανάλυση των παρεμβάσεων που εφάρμοσαν πρωτόκολλα τροποποίησης του τρόπου ζωής και τέλος βάσει των δεδομένων αυτών να σχεδιάσει και να υλοποιήσει ένα πρωτόκολλο αντιμετώπισης της νόσου, βασισμένο σε μία παρέμβαση που αφορούσε τον τρόπο ζωής των ασθενών με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της μεσογειακής δίαιτας ή του μεσογειακού τρόπου ζωής, παράλληλα με απώλεια βάρους, στην αντιμετώπιση της νόσου.

Από τη διεξαγωγή των δύο επιδημιολογικών μελετών, το υψηλότερο επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και η συνιστώμενη διάρκεια του ύπνου συσχετίστηκαν με χαμηλότερη πιθανότητα, ενώ η κατανάλωση γλυκών με υψηλότερη πιθανότητα παρουσίας NAFLD, ενώ και σε επίπεδο προτύπου τρόπου ζωής, η υψηλή προσκόλληση σε ένα υγιεινό πρότυπο, πλούσιο σε γαλακτοκομικά χαμηλών λιπαρών, λαχανικά και ψάρια, παράλληλα με την ακολουθία της συνιστώμενης διάρκειας ύπνου, συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη και ηπατική ακαμψία σε ασθενείς με NAFLD, ανεξάρτητα της κατάστασης βάρους και της ενεργειακής πρόσληψης. Ως προς την αντιμετώπιση της νόσου, τα αποτελέσματα της συστηματικής μετα-ανάλυσης, έδειξαν ότι οι παρεμβάσεις μόνο με άσκηση ή συνδυασμού δίαιτας και άσκησης, βελτιώνουν τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων, ενδοηπατικού λίπους, καθώς και τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με NAFLD. Η

άσκηση μάλιστα φάνηκε ότι μπορεί να ασκεί ευεργετική επίδραση στα ενδοηπατικά τριγλυκερίδια ακόμη και επί απουσίας απώλειας βάρους, ενώ για πρώτη φορά δημοσιεύονται δεδομένα σχετικά με την επίδραση της έντασης και της διάρκειας της άσκησης στους ασθενείς με NAFLD. Λαμβάνοτας υπόψη όλα τα παραπάνω, από τη διεξαγωγή της ελεγχόμενης τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης, φάνηκε ότι μία εντατικοποιημένη παρέμβαση διάρκειας 6 μηνών, βασισμένη είτε σε μία υποθερμιδική μεσογειακού τύπου δίαιτα είτε στον μεσογειακό τρόπο ζωής, δηλαδή τον συνδυασμό της εν λόγω δίαιτας με έντονη φυσική δραστηριότητα, μπορεί να βελτιώσει τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και ηπατικής ακαμψίας, καθώς και το επίπεδο οξειδωτικού στρες των ασθενών με NAFLD, ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, συγκριτικά με τη συνήθη πρακτική αντιμετώπισης.

Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής θα μπορούσαν να ενσωματωθούν σε μελλοντικές παρεμβάσεις αλλαγής του τρόπου ζωής με στόχο την πρόληψη και την αντιμετώπιση της NAFLD. Συγκεκριμένα, από την διεξαγωγή των τριών πρώτων μελετών, αναδείχθηκε η επίδραση των διαφόρων πτυχών του τρόπου ζωής που επηρεάζουν την πιθανότητα παρουσίας NAFLD και συνεπώς η τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση ενός αποτελεσματικού, αποδοτικού και εφικτού τρόπου παρέμβασης για όλους τους ασθενείς με NAFLD. Ο ρόλος της Μεσογειακής δίαιτας ως ένα παραδοσιακό πρότυπο διατροφής ή/ και τρόπου ζωής μπορεί να προωθηθεί και τα νέα επιστημονικά δεδομένα θα χρησιμοποιηθούν για να στηρίξουν ένα παραδοσιακό τρόπο διατροφής και ζωής. Τέλος, η εμπειρία και η γνώση που αποκτήθηκαν από τα αποτελέσματα της μελέτης θα μπορούσαν να διαχυθούν σε επαγγελματίες υγείας και να χρησιμοποιηθούν για την εκπαίδευσή τους, ώστε να εφαρμόσουν στην καθημερινή τους πρακτική ένα «νέο» θεραπευτικό εργαλείο διατροφής ή/ και τρόπου ζωής για τους ασθενείς με NAFLD.

Βιβλιογραφία

ABDELMALEK, M. F., SUZUKI, A., GUY, C., UNALP-ARIDA, A., COLVIN, R., JOHNSON, R. J. & DIEHL, A. M. 2010a. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 51**,** 1961-71.

ABDELMALEK, M. F., SUZUKI, A., GUY, C., UNALP-ARIDA, A., COLVIN, R., JOHNSON, R. J., DIEHL, A. M. & NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CLINICAL RESEARCH, N. 2010b. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 51**,** 1961-71.

ABDELMEGEED, M. A., BANERJEE, A., YOO, S.-H., JANG, S., GONZALEZ, F. J. & SONG, B.-J. 2012. Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology,* 57**,** 860-866.

ABENAVOLI, L. & BEAUGRAND, M. 2012. Transient elastography in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol,* 11**,** 172-8.

ABID, A., TAHA, O., NSEIR, W., FARAH, R., GROSOVSKI, M. & ASSY, N. 2009. Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome. *J Hepatol,* 51**,** 918-24.

ADAMS, L. A. & FELDSTEIN, A. E. 2011. Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Digestive Diseases,* 12**,** 10-16.

ADAMS, L. A., HARMSEN, S., ST SAUVER, J. L., CHARATCHAROENWITTHAYA, P., ENDERS, F. B., THERNEAU, T. & ANGULO, P. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol,* 105**,** 1567-73.

ADRIANO, L. S., SAMPAIO, H. A., ARRUDA, S. P., PORTELA, C. L., MELO, M. L., CARIOCA, A. A. & SOARES, N. T. 2016. Healthy dietary pattern is inversely associated with non-alcoholic fatty liver disease in elderly. *Br J Nutr,* 115**,** 2189-95.

AL-JIFFRI, O., AL-SHARIF, F. M., ABD EL-KADER, S. M. & ASHMAWY, E. M. 2013. Weight reduction improves markers of hepatic function and insulin resistance in type-2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver. *Afr Health Sci,* 13**,** 667-72.

ALBERTI, K. G., ECKEL, R. H., GRUNDY, S. M., ZIMMET, P. Z., CLEEMAN, J. I., DONATO, K. A., FRUCHART, J. C., JAMES, W. P., LORIA, C. M., SMITH, S. C., JR., INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE ON, E., PREVENTION, HATIONAL HEART, L., BLOOD, I., AMERICAN HEART, A., WORLD HEART, F., INTERNATIONAL ATHEROSCLEROSIS, S. & INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF, O. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation,* 120**,** 1640-5.

ALI, A., RASHEED, A., SIDDIQUI, A. A., NASEER, M., WASIM, S., AND AKHTAR, W. 2015. Non-Parametric Test for Ordered Medians: The Jonckheere Terpstra Test. *International Journal of Statistics in Medical Research,* 4**,** 203.

ALLARD, J. P., AGHDASSI, E., MOHAMMED, S., RAMAN, M., AVAND, G., ARENDT, B. M., JALALI, P., KANDASAMY, T., PRAYITNO, N., SHERMAN, M., GUINDI, M., MA, D. W. & HEATHCOTE, J. E. 2008. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol,* 48**,** 300-7.

ALMEDA-VALDES, P., CUEVAS-RAMOS, D. & AGUILAR-SALINAS, C. A. 2009. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol,* 8 Suppl 1**,** S18-24.

ANDERSON, A. L., HARRIS, T. B., TYLAVSKY, F. A., PERRY, S. E., HOUSTON, D. K., LEE, J. S., KANAYA, A. M. & SAHYOUN, N. R. 2012. Dietary patterns, insulin sensitivity and inflammation in older adults. *Eur J Clin Nutr,* 66**,** 18-24.

ANGULO, P., HUI, J. M., MARCHESINI, G., BUGIANESI, E., GEORGE, J., FARRELL, G. C., ENDERS, F., SAKSENA, S., BURT, A. D., BIDA, J. P., LINDOR, K., SANDERSON, S. O., LENZI, M., ADAMS, L. A., KENCH, J., THERNEAU, T. M. & DAY, C. P. 2007. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology,* 45**,** 846-54.

AREFHOSSEINI SR, E.-M. M., NAEIMI AF, KHOSHBATEN M, JAVAD RASHID J 2011. Lifestyle Modification through Dietary Intervention. *Health Promotion Perspectives,* 1**,** 61-68.

AREFHOSSEINI, S. R., EBRAHIMI-MAMEGHANI, M., FARSAD NAEIMI, A., KHOSHBATEN, M. & RASHID, J. 2011. Lifestyle Modification through Dietary Intervention: Health Promotion of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Health Promot Perspect,* 1**,** 147-54.

ARSLANOW, A., TEUTSCH, M., WALLE, H., GR¼NHAGE, F., LAMMERT, F. & STOKES, C. S. 2016. Short-Term Hypocaloric High-Fiber and High-Protein Diet Improves Hepatic Steatosis Assessed by Controlled Attenuation Parameter. *Clinical and Translational Gastroenterology,* 7**,** e176.

ASSY, N., NASSAR, F., NASSER, G. & GROSOVSKI, M. 2009. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol,* 15**,** 1809-1815.

ASSY, N., NASSER, G., KAMAYSE, I., NSEIR, W., BENIASHVILI, Z., DJIBRE, A. & GROSOVSKI, M. 2008. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol,* 22**,** 811-6.

ATTAR, B. M. & VAN THIEL, D. H. 2013. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *ScientificWorldJournal,* 2013**,** 481893.

AZADBAKHT, L. & ESMAILLZADEH, A. 2009. Red meat intake is associated with metabolic syndrome and the plasma C-reactive protein concentration in women. *J Nutr,* 139**,** 335-9.

AZZALINI, L., FERRER, E., RAMALHO, L. N., MORENO, M., DOMÍNGUEZ, M., COLMENERO, J., PEINADO, V. I., BARBERà, J. A., ARROYO, V., GINÈS, P., CABALLERÍA, J. & BATALLER, R. 2010. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. *Hepatology,* 51**,** 1567-1576.

BABIO, N., BULLÓ, M., BASORA, J., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A., FERNÁNDEZ-BALLART, J., MÁRQUEZ-SANDOVAL, F., MOLINA, C. & SALAS-SALVADÓ, J. 2009. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 19**,** 563-570.

BACCHI, E., NEGRI, C., TARGHER, G., FACCIOLI, N., LANZA, M., ZOPPINI, G., ZANOLIN, E., SCHENA, F., BONORA, E. & MOGHETTI, P. 2013. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). *Hepatology,* 58**,** 1287-95.

BACH-FAIG, A., BERRY, E. M., LAIRON, D., REGUANT, J., TRICHOPOULOU, A., DERNINI, S., MEDINA, F. X., BATTINO, M., BELAHSEN, R., MIRANDA, G., SERRA-MAJEM, L. & MEDITERRANEAN DIET FOUNDATION EXPERT, G. 2011. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr,* 14**,** 2274-84.

BADRAN, M., YASSIN, B. A., FOX, N., LAHER, I. & AYAS, N. 2015. Epidemiology of Sleep Disturbances and Cardiovascular Consequences. *Can J Cardiol,* 31**,** 873-9.

BAE, J. C., SUH, S., PARK, S. E., RHEE, E. J., PARK, C. Y., OH, K. W., PARK, S. W., KIM, S. W., HUR, K. Y., KIM, J. H., LEE, M. S., LEE, M. K., KIM, K. W. & LEE, W. Y. 2012. Regular exercise is associated with a reduction in the risk of NAFLD and decreased liver enzymes in individuals with NAFLD independent of obesity in Korean adults. *PLoS One,* 7**,** e46819.

BARKER, K. B., PALEKAR, N. A., BOWERS, S. P., GOLDBERG, J. E., PULCINI, J. P. & HARRISON, S. A. 2006. Non-alcoholic steatohepatitis: effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Gastroenterol,* 101**,** 368-73.

BELFORT, R., HARRISON, S. A., BROWN, K., DARLAND, C., FINCH, J., HARDIES, J., BALAS, B., GASTALDELLI, A., TIO, F., PULCINI, J., BERRIA, R., MA, J. Z., DWIVEDI, S., HAVRANEK, R., FINCKE, C., DEFRONZO, R., BANNAYAN, G. A., SCHENKER, S. & CUSI, K. 2006. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med,* 355**,** 2297-307.

BERLANGA, A., GUIU-JURADO, E., PORRAS, J. A. & AUGUET, T. 2014. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology,* 7**,** 221-239.

BERNSMEIER, C., WEISSKOPF, D. M., PFLUEGER, M. O., MOSIMANN, J., CAMPANA, B., TERRACCIANO, L., BEGLINGER, C., HEIM, M. H. & CAJOCHEN, C. 2015. Sleep Disruption and Daytime Sleepiness Correlating with Disease Severity and Insulin Resistance in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comparison with Healthy Controls. *PLoS One,* 10**,** e0143293.

BERTELLI, A. A., MIGLIORI, M., PANICHI, V., LONGONI, B., ORIGLIA, N., FERRETTI, A., CUTTANO, M. G. & GIOVANNINI, L. 2002. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Ann N Y Acad Sci,* 957**,** 295-301.

BEZERRA DUARTE, S. M., FAINTUCH, J., STEFANO, J. T., SOBRAL DE OLIVEIRA, M. B., DE CAMPOS MAZO, D. F., RABELO, F., VANNI, D., NOGUEIRA, M. A., CARRILHO, F. J. & MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA, C. P. 2014. Hypocaloric high-protein diet improves clinical and biochemical markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr Hosp,* 29**,** 94-101.

BIAN, H., HAKKARAINEN, A., LUNDBOM, N. & YKI-JARVINEN, H. 2014. Effects of dietary interventions on liver volume in humans. *Obesity (Silver Spring),* 22**,** 989-95.

BILZER, M., ROGGEL, F. & GERBES, A. L. 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int,* 26**,** 1175-86.

BJERMO, H., IGGMAN, D., KULLBERG, J., DAHLMAN, I., JOHANSSON, L., PERSSON, L., BERGLUND, J., PULKKI, K., BASU, S., UUSITUPA, M., RUDLING, M., ARNER, P., CEDERHOLM, T., AHLSTROM, H. & RISERUS, U. 2012. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr,* 95**,** 1003-12.

BLACHIER, M., LELEU, H., PECK-RADOSAVLJEVIC, M., VALLA, D.-C. & ROUDOT-THORAVAL, F. 2013. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology,* 58**,** 593-608.

BORG, G. A. 1982. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc,* 14**,** 377-81.

BORGHOUTS, L. B. & KEIZER, H. A. 2000. Exercise and Insulin Sensitivity: A Review. *Int J Sports Med,* 21**,** 1-12.

BOUNTZIOUKA, V., BATHRELLOU, E., GIOTOPOULOU, A., KATSAGONI, C., BONOU, M., VALLIANOU, N., BARBETSEAS, J., AVGERINOS, P. C. & PANAGIOTAKOS, D. B. 2012. Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: Methodological considerations. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 22**,** 659-667.

BRADFORD, V., DILLON, J. F. & MILLER, M. H. 2014. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatic Medicine : Evidence and Research,* 6**,** 1-10.

BRONS, C., JENSEN, C. B., STORGAARD, H., HISCOCK, N. J., WHITE, A., APPEL, J. S., JACOBSEN, S., NILSSON, E., LARSEN, C. M., ASTRUP, A., QUISTORFF, B. & VAAG, A. 2009. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *J Physiol,* 587**,** 2387-97.

BROWNING, J. D., BAKER, J. A., ROGERS, T., DAVIS, J., SATAPATI, S. & BURGESS, S. C. 2011. Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction. *Am J Clin Nutr,* 93**,** 1048-52.

BROWNING, J. D., SZCZEPANIAK, L. S., DOBBINS, R., NUREMBERG, P., HORTON, J. D., COHEN, J. C., GRUNDY, S. M. & HOBBS, H. H. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology,* 40**,** 1387-95.

BRUNT, E. M., JANNEY, C. G., DI BISCEGLIE, A. M., NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. & BACON, B. R. 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol,* 94**,** 2467-74.

BUGIANESI, E., GENTILCORE, E., MANINI, R., NATALE, S., VANNI, E., VILLANOVA, N., DAVID, E., RIZZETTO, M. & MARCHESINI, G. 2005. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol,* 100**,** 1082-90.

BUSS, C., VALLE-TOVO, C., MIOZZO, S. & ALVES DE MATTOS, A. 2014. Probiotics and synbiotics may improve liver aminotransferases levels in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Hepatol,* 13**,** 482-8.

BUYKEN, A. E., FLOOD, V., EMPSON, M., ROCHTCHINA, E., BARCLAY, A. W., BRAND-MILLER, J. & MITCHELL, P. 2010. Carbohydrate nutrition and inflammatory disease mortality in older adults. *Am J Clin Nutr,* 92**,** 634-43.

BUZZETTI, E., PINZANI, M. & TSOCHATZIS, E. A. 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism,* 65**,** 1038-48.

CABALLERIA, L., PERA, G., AULADELL, M. A., TORAN, P., MUNOZ, L., MIRANDA, D., ALUMA, A., CASAS, J. D., SANCHEZ, C., GIL, D., AUBA, J., TIBAU, A., CANUT, S., BERNAD, J. & AIZPURUA, M. M. 2010. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 22**,** 24-32.

CANBAKAN, B., SENTURK, H., TAHAN, V., HATEMI, I., BALCI, H., TOPTAS, T., SONSUZ, A., VELET, M., AYDIN, S., DIRICAN, A., OZGULLE, S. & OZBAY, G. 2007. Clinical, biochemical and histological correlations in a group of non-drinker subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Gastroenterol Belg,* 70**,** 277-84.

CAPANNI, M., CALELLA, F., BIAGINI, M. R., GENISE, S., RAIMONDI, L., BEDOGNI, G., SVEGLIATI-BARONI, G., SOFI, F., MILANI, S., ABBATE, R., SURRENTI, C. & CASINI, A. 2006. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther,* 23**,** 1143-51.

CAPPUCCIO, F. P., COOPER, D., D'ELIA, L., STRAZZULLO, P. & MILLER, M. A. 2011. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J,* 32**,** 1484-92.

CAPPUCCIO, F. P., D'ELIA, L., STRAZZULLO, P. & MILLER, M. A. 2010a. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care,* 33**,** 414-20.

CAPPUCCIO, F. P., D'ELIA, L., STRAZZULLO, P. & MILLER, M. A. 2010b. Sleep duration and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Sleep,* 33**,** 585-92.

CARR, A. C., ZHU, B. Z. & FREI, B. 2000. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res,* 87**,** 349-54.

CATAPANO, A. L., GRAHAM, I., DE BACKER, G., WIKLUND, O., CHAPMAN, M. J., DREXEL, H., HOES, A. W., JENNINGS, C. S., LANDMESSER, U., PEDERSEN, T. R., REINER, Ž., RICCARDI, G., TASKINEN, M.-R., TOKGOZOGLU, L., VERSCHUREN, W. M. M., VLACHOPOULOS, C., WOOD, D. A., ZAMORANO, J. L., COONEY, M.-T., BADIMON, L., FUNCK-BRENTANO, C., AGEWALL, S., BARÓN-ESQUIVIAS, G., BORÉN, J., BRUCKERT, E., CORDERO, A., CORSINI, A., GIANNUZZI, P., GUEYFFIER, F., KRSTAČIĆ, G., LETTINO, M., LIONIS, C., LIP, G. Y. H., MARQUES-VIDAL, P., MILICIC, D., PEDRO-BOTET, J., PIEPOLI, M. F., RIGOPOULOS, A. G., RUSCHITZKA, F., TUÑÓN, J., VON ECKARDSTEIN, A., VRABLIK, M., WEISS, T. W., WILLIAMS, B., WINDECKER, S., ZIMLICHMAN, R., LUIS ZAMORANO, J., ABOYANS, V., ACHENBACH, S., AGEWALL, S., BADIMON, L., BARÓN-ESQUIVIAS, G., BAUMGARTNER, H., BAX, J. J., BUENO, H., CARERJ, S., DEAN, V., EROL, Ç., FITZSIMONS, D., GAEMPERLI, O., KIRCHHOF, P., KOLH, P., LANCELLOTTI, P., LIP, G. Y. H., NIHOYANNOPOULOS, P., PIEPOLI, M. F., PONIKOWSKI, P., ROFFI, M., TORBICKI, A., VAZ CARNEIRO, A., WINDECKER, S., ZELVEIAN, P. H., SIOSTRZONEK, P., IBRAHIMOV, F., SUJAYEVA, V., CLAEYS, M. J., POJSKIĆ, B., POSTADZHIYAN, A., MILIČIĆ, D., GEORGIOU, G. C., ROSOLOVA, H., KLAUSEN, C., VIIGIMAA, M., KERVINEN, K., KEDEV, S., FERRIÈRES, J., PETRIASHVILI, S., KINTSCHER, U., RALLIDIS, L., GÁBOR KISS, R., GUÐNASON, T., MAHER, V., HENKIN, Y., FRANCESCO MUREDDU, G., MUSSAGALIYEVA, A., IBRAHIMI, P., MIRRAKHIMOV, E., LATKOVSKIS, G., BEN LAMIN, H., SLAPIKAS, R., et al. 2016. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *European Heart Journal,* 37**,** 2999-3058.

CECCARELLI, S., PANERA, N., MINA, M., GNANI, D., DE STEFANIS, C., CRUDELE, A., RYCHLICKI, C., PETRINI, S., BRUSCALUPI, G., AGOSTINELLI, L., STRONATI, L., CUCCHIARA, S., MUSSO, G., FURLANELLO, C., SVEGLIATI-BARONI, G., NOBILI, V. & ALISI, A. 2015. LPS-induced TNF-alpha factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget,* 6**,** 41434-52.

CHALASANI, N., YOUNOSSI, Z., LAVINE, J. E., DIEHL, A. M., BRUNT, E. M., CUSI, K., CHARLTON, M. & SANYAL, A. J. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for

the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol,* 107**,** 811-26.
CHEN, J., ZHU, Y., ZHENG, Q. & JIANG, J. 2014. Serum cytokeratin-18 in the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis: A meta-analysis. *Hepatol Res,* 44**,** 854-62.
CHENG, Y., ZHANG, K., CHEN, Y., LI, Y., LI, Y., FU, K. & FENG, R. 2016. Associations between Dietary Nutrient Intakes and Hepatic Lipid Contents in NAFLD Patients Quantified by (1)H-MRS and Dual-Echo MRI. *Nutrients,* 8**,** 527.
CHIU, S., SIEVENPIPER, J. L., DE SOUZA, R. J., COZMA, A. I., MIRRAHIMI, A., CARLETON, A. J., HA, V., DI BUONO, M., JENKINS, A. L., LEITER, L. A., WOLEVER, T. M., DON-WAUCHOPE, A. C., BEYENE, J., KENDALL, C. W. & JENKINS, D. J. 2014. Effect of fructose on markers of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Eur J Clin Nutr,* 68**,** 416-23.
CHONG, M. F., FIELDING, B. A. & FRAYN, K. N. 2007. Metabolic interaction of dietary sugars and plasma lipids with a focus on mechanisms and de novo lipogenesis. *Proc Nutr Soc,* 66**,** 52-9.
CHUNG, M., MA, J., PATEL, K., BERGER, S., LAU, J. & LICHTENSTEIN, A. H. 2014. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr,* 100**,** 833-49.
CLARK, J. M., ALKHURAISHI, A. R., SOLGA, S. F., ALLI, P., DIEHL, A. M. & MAGNUSON, T. H. 2005. Roux-en-Y gastric bypass improves liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Res,* 13**,** 1180-6.
CLARK, J. M., BRANCATI, F. L. & DIEHL, A. M. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology,* 122**,** 1649-57.
COHEN, J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences,* Hillsdale, N.J., L. Erlbaum Associates.
COMPARE, D., COCCOLI, P., ROCCO, A., NARDONE, O. M., DE MARIA, S., CARTENI, M. & NARDONE, G. 2012. Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis,* 22**,** 471-6.
COPINSCHI, G., LEPROULT, R. & SPIEGEL, K. 2014. The important role of sleep in metabolism. *Front Horm Res,* 42**,** 59-72.
CRESPO, J., CAYÓN, A., FERNÁNDEZ-GIL, P., HERNÁNDEZ-GUERRA, M., MAYORGA, M., DOMÍNGUEZ-DÍEZ, A., FERNÁNDEZ-ESCALANTE, J. C. & PONS-ROMERO, F. 2001. Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology,* 34**,** 1158-1163.
CURETON E, D. A. R. 1983. *Factor Analysis: An Applied Approach.*, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
CUTHBERTSON, D. J., SHOJAEE-MORADIE, F., SPRUNG, V. S., JONES, H., PUGH, C. J., RICHARDSON, P., KEMP, G. J., BARRETT, M., JACKSON, N. C., THOMAS, E. L., BELL, J. D. & UMPLEBY, A. M. 2016. Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homoeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond),* 130**,** 93-104.
DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D. & MILZANI, A. 2006. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry,* 52**,** 601-623.
DASHTI, H. S., SCHEER, F. A., JACQUES, P. F., LAMON-FAVA, S. & ORDOVAS, J. M. 2015. Short sleep duration and dietary intake: epidemiologic evidence, mechanisms, and health implications. *Adv Nutr,* 6**,** 648-59.

DAY, C. P. 2002. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology,* 16**,** 663-678.
DAY, C. P. & JAMES, O. F. W. 1998. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology,* 114**,** 842-845.
DE LUIS, D. A., ALLER, R., IZAOLA, O., GONZALEZ SAGRADO, M. & CONDE, R. 2010. Effect of two different hypocaloric diets in transaminases and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients. *Nutr Hosp,* 25**,** 730-5.
DE LUIS, D. A., ALLER, R., IZAOLA, O., SAGRADO, M. G., CONDE, R. & GONZALEZ, J. M. 2008. Effect of a hypocaloric diet in transaminases in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients, relation with insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract,* 79**,** 74-8.
DESHMUKH-TASKAR, P. R., O'NEIL, C. E., NICKLAS, T. A., YANG, S. J., LIU, Y., GUSTAT, J. & BERENSON, G. S. 2009. Dietary patterns associated with metabolic syndrome, sociodemographic and lifestyle factors in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Public Health Nutr,* 12**,** 2493-503.
DIXON, A. F., DIXON, J. B. & O'BRIEN, P. E. 2005. Laparoscopic adjustable gastric banding induces prolonged satiety: a randomized blind crossover study. *J Clin Endocrinol Metab,* 90**,** 813-9.
DIXON, J. B., BHATHAL, P. S., HUGHES, N. R. & O'BRIEN, P. E. 2004. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology,* 39**,** 1647-54.
DOWMAN, J. K., TOMLINSON, J. W. & NEWSOME, P. N. 2010. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM,* 103**,** 71-83.
DOWMAN, J. K., TOMLINSON, J. W. & NEWSOME, P. N. 2011. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics,* 33**,** 525-540.
DUFOUR, J. F., ONETA, C. M., GONVERS, J. J., BIHL, F., CERNY, A., CEREDA, J. M., ZALA, J. F., HELBLING, B., STEUERWALD, M., ZIMMERMANN, A. & SWISS ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE, L. 2006. Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 4**,** 1537-43.
DUNN, W., XU, R. & SCHWIMMER, J. B. 2008. Modest wine drinking and decreased prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 47**,** 1947-54.
DUSEJA, A., MURLIDHARAN, R., BHANSALI, A., SHARMA, S., DAS, A., DAS, R. & CHAWLA, Y. 2004. Assessment of insulin resistance and effect of metformin in nonalcoholic steatohepatitis--a preliminary report. *Indian J Gastroenterol,* 23**,** 12-5.
EASL-EASD-EASO 2016. European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity Clinical Practice: Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Facts,* 9**,** 65-90.
EASL–EASD–EASO 2016. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology,* 64**,** 1388-1402.
ECKARD, C., COLE, R., LOCKWOOD, J., TORRES, D. M., WILLIAMS, C. D., SHAW, J. C. & HARRISON, S. A. 2013. Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial. *Therap Adv Gastroenterol,* 6**,** 249-59.
EFSA 2009. General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA Journal,* 7**,** 1435-51.

EGGER, M., ZELLWEGER-ZAHNER, T., SCHNEIDER, M., JUNKER, C., LENGELER, C. & ANTES, G. 1997. Language bias in randomised controlled trials published in English and German. *Lancet,* 350**,** 326-9.

ELIAS, M. C., PARISE, E. R., DE CARVALHO, L., SZEJNFELD, D. & NETTO, J. P. 2010. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition,* 26**,** 1094-9.

ESMAILLZADEH, A., KIMIAGAR, M., MEHRABI, Y., AZADBAKHT, L., HU, F. B. & WILLETT, W. C. 2007. Dietary patterns, insulin resistance, and prevalence of the metabolic syndrome in women. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 85**,** 910-918.

ESPOSITO, K., KASTORINI, C.-M., PANAGIOTAKOS, D. B. & GIUGLIANO, D. 2013. Mediterranean diet and metabolic syndrome: an updated systematic review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders,* 14**,** 255-263.

ESPOSITO, K., KASTORINI, C. M., PANAGIOTAKOS, D. B. & GIUGLIANO, D. 2011. Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials. *Metab Syndr Relat Disord,* 9**,** 1-12.

ESPOSITO, K., MARFELLA, R., CIOTOLA, M., DI PALO, C., GIUGLIANO, F., GIUGLIANO, G., D'ARMIENTO, M., D'ANDREA, F. & GIUGLIANO, D. 2004. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA,* 292**,** 1440-6.

ESPOSITO, K., PONTILLO, A., DI PALO, C., GIUGLIANO, G., MASELLA, M., MARFELLA, R. & GIUGLIANO, D. 2003. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA,* 289**,** 1799-804.

FARAONE, S. V. 2008. Interpreting estimates of treatment effects: implications for managed care. *P T,* 33**,** 700-11.

FARRELL, G. C., MCCULLOUGH, A. J. & DAY, C. P. 2013a. What is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), and Why is it Important? *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.* Wiley-Blackwell.

FARRELL, G. C., WONG, V. W. & CHITTURI, S. 2013b. NAFLD in Asia--as common and important as in the West. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol,* 10**,** 307-18.

FAZEL, Y., KOENIG, A. B., SAYINER, M., GOODMAN, Z. D. & YOUNOSSI, Z. M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism - Clinical and Experimental,* 65**,** 1017-1025.

FAZEL, Y., KOENIG, A. B., SAYINER, M., GOODMAN, Z. D. & YOUNOSSI, Z. M. 2016. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism,* 65**,** 1017-25.

FELDSTEIN, A. E. 2010. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis,* 30**,** 391-401.

FILIPPATOS, T. D. & ELISAF, M. S. 2011. Role of ezetimibe in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol,* 3**,** 265-7.

FINELLI, C. & TARANTINO, G. 2012. Is there any consensus as to what diet or lifestyle approach is the right one for NAFLD patients? *J Gastrointestin Liver Dis,* 21**,** 293-302.

FISHER, G., BROWN, A. W., BOHAN BROWN, M. M., ALCORN, A., NOLES, C., WINWOOD, L., RESUEHR, H., GEORGE, B., JEANSONNE, M. M. & ALLISON, D. B. 2015. High Intensity Interval- vs Moderate Intensity- Training for Improving Cardiometabolic Health in Overweight or Obese Males: A Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE,* 10**,** e0138853.

FOSTER, T., BUDOFF, M. J., SAAB, S., AHMADI, N., GORDON, C. & GUERCI, A. D. 2011. Atorvastatin and antioxidants for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: the St Francis Heart Study randomized clinical trial. *Am J Gastroenterol,* 106**,** 71-7.

FRANCQUE, S. M., VERRIJKEN, A., MERTENS, I., HUBENS, G., VAN MARCK, E., PELCKMANS, P., MICHIELSEN, P. & VAN GAAL, L. 2012. Noninvasive assessment of nonalcoholic fatty liver disease in obese or overweight patients. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 10**,** 1162-8; quiz e87.

FRASER, A., ABEL, R., LAWLOR, D. A., FRASER, D. & ELHAYANY, A. 2008. A modified Mediterranean diet is associated with the greatest reduction in alanine aminotransferase levels in obese type 2 diabetes patients: results of a quasi-randomised controlled trial. *Diabetologia,* 51**,** 1616-22.

FRIEDEWALD, W. T., LEVY, R. I. & FREDRICKSON, D. S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem,* 18**,** 499-502.

FRITH, J., DAY, C. P., HENDERSON, E., BURT, A. D. & NEWTON, J. L. 2009. Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology,* 55**,** 607-13.

GABLE, J. 2007. *Counselling skills for dietitians*, Blackwell Publishing.

GADD, V. L., PATEL, P. J., JOSE, S., HORSFALL, L., POWELL, E. E. & IRVINE, K. M. 2016. Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation. *PLoS One,* 11**,** e0157771.

GELATTI, U., COVOLO, L., FRANCESCHINI, M., PIRALI, F., TAGGER, A., RIBERO, M. L., TREVISI, P., MARTELLI, C., NARDI, G. & DONATO, F. 2005. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol,* 42**,** 528-34.

GEORGOULIS, M., KONTOGIANNI, M. D., MARGARITI, A., TINIAKOS, D., FRAGOPOULOU, E., ZAFIROPOULOU, R. & PAPATHEODORIDIS, G. 2015. Associations between dietary intake and the presence of the metabolic syndrome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet,* 28**,** 409-15.

GEORGOULIS, M., KONTOGIANNI, M. D., TILELI, N., MARGARITI, A., FRAGOPOULOU, E., TINIAKOS, D., ZAFIROPOULOU, R. & PAPATHEODORIDIS, G. 2014. The impact of cereal grain consumption on the development and severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Nutr,* 53**,** 1727-35.

GERBER, L., OTGONSUREN, M., MISHRA, A., ESCHEIK, C., BIRERDINC, A., STEPANOVA, M. & YOUNOSSI, Z. M. 2012a. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther,* 36**,** 772-81.

GERBER, L., OTGONSUREN, M., MISHRA, A., ESCHEIK, C., BIRERDINC, A., STEPANOVA, M. & YOUNOSSI, Z. M. 2012b. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics,* 36**,** 772-781.

GIANNOUSIS, I. P., PAPATHEODORIDIS, G. V., DEUTSCH, M. J., MANOLAKOPOULOS, S. G., MANESIS, E. K., KOSKINAS, J. S. & ARCHIMANDRITIS, A. J. 2010. The burden and recent epidemiological changes of the main chronic liver diseases in a Greek referral tertiary centre. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 22**,** 172-9.

GIBY, V. G. & AJITH, T. A. 2014. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology,* 6**,** 570-579.

GLEN, J., FLOROS, L., DAY, C., PRYKE, R. & GUIDELINE DEVELOPMENT, G. 2016. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): summary of NICE guidance. *BMJ,* 354**,** i4428.

GODOS, J., FEDERICO, A., DALLIO, M. & SCAZZINA, F. 2016. Mediterranean diet and nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms of protection. *Int J Food Sci Nutr***,** 1-10.

GREEN, C. J. & HODSON, L. 2014. The influence of dietary fat on liver fat accumulation. *Nutrients,* 6**,** 5018-33.

GREEN, R. M. 2003. NASH—hepatic metabolism and not simply the metabolic syndrome. *Hepatology,* 38**,** 14-17.

GRIFFIN, B. A. 2015. Relevance of liver fat to the impact of dietary extrinsic sugars on lipid metabolism. *Proc Nutr Soc,* 74**,** 208-14.

HAAS, J. T., FRANCQUE, S. & STAELS, B. 2016. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Physiology,* 78**,** 181-205.

HAGYMASI, K., REISMANN, P., RACZ, K. & TULASSAY, Z. 2009. [Role of the endocrine system in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease]. *Orv Hetil,* 150**,** 2173-81.

HALLSWORTH, K., FATTAKHOVA, G., HOLLINGSWORTH, K. G., THOMA, C., MOORE, S., TAYLOR, R., DAY, C. P. & TRENELL, M. I. 2011. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut,* 60**,** 1278-83.

HALLSWORTH, K., THOMA, C., HOLLINGSWORTH, K. G., CASSIDY, S., ANSTEE, Q. M., DAY, C. P. & TRENELL, M. I. 2015a. Modified high-intensity interval training reduces liver fat and improves cardiac function in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Clin Sci (Lond),* 129**,** 1097-105.

HALLSWORTH, K., THOMA, C., MOORE, S., PLOETZ, T., ANSTEE, Q. M., TAYLOR, R., DAY, C. P. & TRENELL, M. I. 2015b. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. *Frontline Gastroenterol,* 6**,** 44-51.

HALLSWORTH, K., THOMA, C., MOORE, S., PLOETZ, T., ANSTEE, Q. M., TAYLOR, R., DAY, C. P. & TRENELL, M. I. 2015c. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of objectively measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. *Frontline Gastroenterol,* 6**,** 44-51.

HANNAH, W. N., JR. & HARRISON, S. A. 2016. Lifestyle and Dietary Interventions in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci,* 61**,** 1365-74.

HARING, R., WALLASCHOFSKI, H., NAUCK, M., DORR, M., BAUMEISTER, S. E. & VOLZKE, H. 2009. Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels. *Hepatology,* 50**,** 1403-11.

HARRISON, S. A. & NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. 2004. Pharmacologic management of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis,* 8**,** 715-28, xii.

HARRISON, S. A., OLIVER, D., ARNOLD, H. L., GOGIA, S. & NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. 2008. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut,* 57**,** 1441-7.

HARRISON, S. A., TORGERSON, S., HAYASHI, P., WARD, J. & SCHENKER, S. 2003. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol,* 98**,** 2485-90.

HAUFE, S., ENGELI, S., KAST, P., BOHNKE, J., UTZ, W., HAAS, V., HERMSDORF, M., MAHLER, A., WIESNER, S., BIRKENFELD, A. L., SELL, H., OTTO, C.,

MEHLING, H., LUFT, F. C., ECKEL, J., SCHULZ-MENGER, J., BOSCHMANN, M. & JORDAN, J. 2011. Randomized comparison of reduced fat and reduced carbohydrate hypocaloric diets on intrahepatic fat in overweight and obese human subjects. *Hepatology,* 53**,** 1504-14.

HEKMATDOOST, A., SHAMSIPOUR, A., MEIBODI, M., GHEIBIZADEH, N., ESLAMPARAST, T. & POUSTCHI, H. 2016. Adherence to the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) and risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Food Sciences and Nutrition***,** 1-6.

HENSON, J., YATES, T., EDWARDSON, C. L., KHUNTI, K., TALBOT, D., GRAY, L. J., LEIGH, T. M., CARTER, P. & DAVIES, M. J. 2013. Sedentary time and markers of chronic low-grade inflammation in a high risk population. *PLoS One,* 8**,** e78350.

HIROTSU, C., TUFIK, S. & ANDERSEN, M. L. 2015. Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Science,* 8**,** 143-152.

HOLAND, S. M. 2008. Principal components analysis (PCA). *Department of Geology, University of Georgia, Athens, GA*.

HOSSAIN, N., KANWAR, P. & MOHANTY, S. R. 2016. A Comprehensive Updated Review of Pharmaceutical and Nonpharmaceutical Treatment for NAFLD. *Gastroenterol Res Pract,* 2016**,** 7109270.

HOUGHTON, D., THOMA, C., HALLSWORTH, K., CASSIDY, S., HARDY, T., BURT, A. D., TINIAKOS, D., HOLLINGSWORTH, K. G., TAYLOR, R., DAY, C. P., MCPHERSON, S., ANSTEE, Q. M. & TRENELL, M. I. 2016. Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients with Non-alcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*.

HUSSEIN, O., GROSOVSKI, M., SCHLESINGER, S., SZVALB, S. & ASSY, N. 2007. Orlistat reverse fatty infiltration and improves hepatic fibrosis in obese patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Dig Dis Sci,* 52**,** 2512-9.

IMAIZUMI, H., TAKAHASHI, A., TANJI, N., ABE, K., SATO, Y., ANZAI, Y., WATANABE, H. & OHIRA, H. 2015. The Association between Sleep Duration and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease among Japanese Men and Women. *Obesity Facts,* 8**,** 234-242.

ISHIMOTO, T., LANASPA, M. A., RIVARD, C. J., RONCAL-JIMENEZ, C. A., ORLICKY, D. J., CICERCHI, C., MCMAHAN, R. H., ABDELMALEK, M. F., ROSEN, H. R., JACKMAN, M. R., MACLEAN, P. S., DIGGLE, C. P., ASIPU, A., INABA, S., KOSUGI, T., SATO, W., MARUYAMA, S., SANCHEZ-LOZADA, L. G., SAUTIN, Y. Y., HILL, J. O., BONTHRON, D. T. & JOHNSON, R. J. 2013. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology,* 58**,** 1632-43.

JABLONSKI, K. L., JOVANOVICH, A., HOLMEN, J., TARGHER, G., MCFANN, K., KENDRICK, J. & CHONCHOL, M. 2013. Low 25-hydroxyvitamin D level is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 23**,** 792-798.

JANICKA, M., KOT-WASIK, A., KOT, J. & NAMIESNIK, J. 2010. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci,* 11**,** 4631-59.

JASKIEWICZ, K., RACZYNSKA, S., RZEPKO, R. & SLEDZINSKI, Z. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease treated by gastroplasty. *Dig Dis Sci,* 51**,** 21-6.

JIA, Q., XIA, Y., ZHANG, Q., WU, H., DU, H., LIU, L., WANG, C., SHI, H., GUO, X., LIU, X., LI, C., SUN, S., WANG, X., ZHAO, H., SONG, K., HUANG, G., WU, Y.,

CUI, N. & NIU, K. 2015. Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults. *Eur J Clin Nutr,* 69**,** 914-21.

JIANG, X., ZHANG, D. & JIANG, W. 2014. Coffee and caffeine intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective studies. *European Journal of Nutrition,* 53**,** 25-38.

JONES, J. M. & ANDERSON, J. W. 2008. Grain foods and health: a primer for clinicians. *Phys Sportsmed,* 36**,** 18-33.

JU, S. Y. & CHOI, W. S. 2013. Sleep duration and metabolic syndrome in adult populations: a meta-analysis of observational studies. *Nutr Diabetes,* 3**,** e65.

KAMADA, Y., KISO, S., YOSHIDA, Y., CHATANI, N., KIZU, T., HAMANO, M., TSUBAKIO, M., TAKEMURA, T., EZAKI, H., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. 2011. Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology,* 301**,** G1031-G1043.

KANG, H., GREENSON, J. K., OMO, J. T., CHAO, C., PETERMAN, D., ANDERSON, L., FOESS-WOOD, L., SHERBONDY, M. A. & CONJEEVARAM, H. S. 2006. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol,* 101**,** 2247-53.

KANI, A. H., ALAVIAN, S. M., ESMAILLZADEH, A., ADIBI, P. & AZADBAKHT, L. 2014. Effects of a novel therapeutic diet on liver enzymes and coagulating factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A parallel randomized trial. *Nutrition,* 30**,** 814-21.

KARGIOTIS, K., ATHYROS, V. G., GIOULEME, O., KATSIKI, N., KATSIKI, E., ANAGNOSTIS, P., BOUTARI, C., DOUMAS, M., KARAGIANNIS, A. & MIKHAILIDIS, D. P. 2015. Resolution of non-alcoholic steatohepatitis by rosuvastatin monotherapy in patients with metabolic syndrome. *World J Gastroenterol,* 21**,** 7860-8.

KASTORINI, C. M., MILIONIS, H. J., ESPOSITO, K., GIUGLIANO, D., GOUDEVENOS, J. A. & PANAGIOTAKOS, D. B. 2011. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol,* 57**,** 1299-313.

KASTURIRATNE, A., WEERASINGHE, S., DASSANAYAKE, A. S., RAJINDRAJITH, S., DE SILVA, A. P., KATO, N., WICKREMASINGHE, A. R. & DE SILVA, H. J. 2013. Influence of non-alcoholic fatty liver disease on the development of diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol,* 28**,** 142-7.

KATAN , M. B. 2009. Weight-Loss Diets for the Prevention and Treatment of Obesity. *New England Journal of Medicine,* 360**,** 923-925.

KAVOURAS, S. A., MARAKI, M. I., KOLLIA, M., GIOXARI, A., JANSEN, L. T. & SIDOSSIS, L. S. 2016. Development, reliability and validity of a physical activity questionnaire for estimating energy expenditure in Greek adults. *Science & Sports,* 31**,** e47-e53.

KEATING, S. E. & ADAMS, L. A. 2016. Exercise in NAFLD: Just do it. *Journal of Hepatology,* 65**,** 671-673.

KEATING, S. E., HACKETT, D. A., GEORGE, J. & JOHNSON, N. A. 2012. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology,* 57**,** 157-166.

KELLEY, D. E., KULLER, L. H., MCKOLANIS, T. M., HARPER, P., MANCINO, J. & KALHAN, S. 2004. Effects of moderate weight loss and orlistat on insulin resistance, regional adiposity, and fatty acids in type 2 diabetes. *Diabetes Care,* 27**,** 33-40.

KESSE-GUYOT, E., AHLUWALIA, N., LASSALE, C., HERCBERG, S., FEZEU, L. & LAIRON, D. 2013. Adherence to Mediterranean diet reduces the risk of metabolic syndrome: a 6-year prospective study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 23**,** 677-683.

KIM, C. H. & YOUNOSSI, Z. M. 2008. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med,* 75**,** 721-8.

KIM, C. W., YUN, K. E., JUNG, H. S., CHANG, Y., CHOI, E. S., KWON, M. J., LEE, E. H., WOO, E. J., KIM, N. H., SHIN, H. & RYU, S. 2013. Sleep duration and quality in relation to non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged workers and their spouses. *J Hepatol,* 59**,** 351-7.

KIRK, E., REEDS, D. N., FINCK, B. N., MAYURRANJAN, S. M., PATTERSON, B. W. & KLEIN, S. 2009. Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. *Gastroenterology,* 136**,** 1552-60.

KISTLER, K. D., BRUNT, E. M., CLARK, J. M., DIEHL, A. M., SALLIS, J. F., SCHWIMMER, J. B. & GROUP, N. C. R. 2011. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol,* 106**,** 460-8; quiz 469.

KLATSKY, A. L., MORTON, C., UDALTSOVA, N. & FRIEDMAN, G. D. 2006. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. *Arch Intern Med,* 166**,** 1190-5.

KLEINER, D. E., BRUNT, E. M., VAN NATTA, M., BEHLING, C., CONTOS, M. J., CUMMINGS, O. W., FERRELL, L. D., LIU, Y. C., TORBENSON, M. S., UNALP-ARIDA, A., YEH, M., MCCULLOUGH, A. J., SANYAL, A. J. & NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CLINICAL RESEARCH, N. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 41**,** 1313-21.

KOLOVEROU, E., ESPOSITO, K., GIUGLIANO, D. & PANAGIOTAKOS, D. 2014. The effect of Mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants. *Metabolism,* 63**,** 903-911.

KONTOGIANNI, M., MARGARITI, E., GEORGOULIS, M., TILELI, N., DEUTSCH, M., TINIAKOS, D., FRAGOPOULOU, E., ZAFEIROPOULOU, R., MANIOS, Y. & PAPATHEODORIDIS, G. Association between adherence to the Mediterranean diet and clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease. EASL, The international liver conference., 2012 Barcelona, April18-22

KONTOGIANNI, M. D., TILELI, N., MARGARITI, A., GEORGOULIS, M., DEUTSCH, M., TINIAKOS, D., FRAGOPOULOU, E., ZAFIROPOULOU, R., MANIOS, Y. & PAPATHEODORIDIS, G. 2014. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr,* 33**,** 678-83.

KONTOGIANNI, M. D., ZAMPELAS, A. & TSIGOS, C. 2006. Nutrition and inflammatory load. *Ann N Y Acad Sci,* 1083**,** 214-38.

KOPLAY, M., SIVRI, M., ERDOGAN, H. & NAYMAN, A. 2015. Importance of imaging and recent developments in diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol,* 7**,** 769-76.

KOTRONEN, A. & YKI-JARVINEN, H. 2008. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 28**,** 27-38.

KRASNOFF, J. B., PAINTER, P. L., WALLACE, J. P., BASS, N. M. & MERRIMAN, R. B. 2008. Health-related fitness and physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 47**,** 1158-66.

KWON, O. W., JUN, D. W., LEE, S. M., LEE, K. N., LEE, H. L., LEE, O. Y., YOON, B. C. & CHOI, H. S. 2012. Carbohydrate but not fat is associated with elevated aminotransferases. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics,* 35**,** 1064-1072.

LARTER, C. Z., CHITTURI, S., HEYDET, D. & FARRELL, G. C. 2010. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol,* 25**,** 672-90.

LE, K. A. & BORTOLOTTI, M. 2008. Role of dietary carbohydrates and macronutrients in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care,* 11**,** 477-82.

LEON-LATRE, M., MORENO-FRANCO, B., ANDRES-ESTEBAN, E. M., LEDESMA, M., LACLAUSTRA, M., ALCALDE, V., PENALVO, J. L., ORDOVAS, J. M., CASASNOVAS, J. A. & ARAGON WORKERS' HEALTH STUDY, I. 2014. Sedentary lifestyle and its relation to cardiovascular risk factors, insulin resistance and inflammatory profile. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed),* 67**,** 449-55.

LEVENE, A. P. & GOLDIN, R. D. 2012. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology,* 61**,** 141-52.

LEWIS, J. D., FERRARA, A., PENG, T., HEDDERSON, M., BILKER, W. B., QUESENBERRY, C. P., JR., VAUGHN, D. J., NESSEL, L., SELBY, J. & STROM, B. L. 2011. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care,* 34**,** 916-22.

LEY, C. J., LEES, B. & STEVENSON, J. C. 1992. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 55**,** 950-4.

LEY, S. H., SUN, Q., WILLETT, W. C., ELIASSEN, A. H., WU, K., PAN, A., GRODSTEIN, F. & HU, F. B. 2014a. Associations between red meat intake and biomarkers of inflammation and glucose metabolism in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*.

LEY, S. H., SUN, Q., WILLETT, W. C., ELIASSEN, A. H., WU, K., PAN, A., GRODSTEIN, F. & HU, F. B. 2014b. Associations between red meat intake and biomarkers of inflammation and glucose metabolism in women. *Am J Clin Nutr,* 99**,** 352-60.

LI, J., CORDERO, P., NGUYEN, V. & OBEN, J. A. 2016. The Role of Vitamins in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Integrative Medicine Insights,* 11**,** 19-25.

LIESE, A. D., NICHOLS, M., SUN, X., D'AGOSTINO, R. B. & HAFFNER, S. M. 2009. Adherence to the DASH Diet Is Inversely Associated With Incidence of Type 2 Diabetes: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care,* 32**,** 1434-1436.

LIN, W.-Y., WU, C.-H., CHU, N.-F. & CHANG, C.-J. 2009. Efficacy and safety of very-low-calorie diet in Taiwanese: A multicenter randomized, controlled trial. *Nutrition,* 25**,** 1129-1136.

LIU, X., LAZENBY, A. J., CLEMENTS, R. H., JHALA, N. & ABRAMS, G. A. 2007. Resolution of nonalcoholic steatohepatits after gastric bypass surgery. *Obes Surg,* 17**,** 486-92.

LIU, Y., DAI, M., BI, Y., XU, M., XU, Y., LI, M., WANG, T., HUANG, F., XU, B., ZHANG, J., LI, X., WANG, W. & NING, G. 2013. Active Smoking, Passive Smoking, and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Population-Based Study in China. *Journal of Epidemiology,* 23**,** 115-121.

LOCKE, E. A. & LATHAM, G. P. 1994. Goal setting theory. *In:* NEIL, H. F. O. & JR, M. D. (eds.) *Motivation: Theory and research.* Hillsdale, NJ, England: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.

LONARDO, A., BALLESTRI, S., MARCHESINI, G., ANGULO, P. & LORIA, P. 2015. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis,* 47**,** 181-90.

LUTCHMAN, G., MODI, A., KLEINER, D. E., PROMRAT, K., HELLER, T., GHANY, M., BORG, B., LOOMBA, R., LIANG, T. J., PREMKUMAR, A. & HOOFNAGLE, J. H. 2007. The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology,* 46**,** 424-9.

MA, Y. Y., LI, L., YU, C. H., SHEN, Z., CHEN, L. H. & LI, Y. M. 2013. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol,* 19**,** 6911-8.

MACHADO, M. V. & CORTEZ-PINTO, H. 2012. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol,* 11**,** 440-9.

MACIAS-CARBALLO, M. & ROMANQUE, P. 2013. Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD: General Overview of a Multifactorial Disease.

MADERO, M., ARRIAGA, J. C., JALAL, D., RIVARD, C., MCFANN, K., PEREZ-MENDEZ, O., VAZQUEZ, A., RUIZ, A., LANASPA, M. A., JIMENEZ, C. R., JOHNSON, R. J. & LOZADA, L. G. 2011. The effect of two energy-restricted diets, a low-fructose diet versus a moderate natural fructose diet, on weight loss and metabolic syndrome parameters: a randomized controlled trial. *Metabolism,* 60**,** 1551-9.

MAHADY, S. E. & GEORGE, J. 2016. Exercise and diet in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism,* 65**,** 1172-82.

MARCHESINI, G., BRIZI, M., BIANCHI, G., TOMASSETTI, S., BUGIANESI, E., LENZI, M., MCCULLOUGH, A. J., NATALE, S., FORLANI, G. & MELCHIONDA, N. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes,* 50**,** 1844-50.

MARCHESINI, G., BUGIANESI, E., FORLANI, G., CERRELLI, F., LENZI, M., MANINI, R., NATALE, S., VANNI, E., VILLANOVA, N., MELCHIONDA, N. & RIZZETTO, M. 2003. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology,* 37**,** 917-23.

MARCHESINI, G., PETTA, S. & DALLE GRAVE, R. 2016. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. *Hepatology,* 63**,** 2032-43.

MARKOVA, M., PIVOVAROVA, O., HORNEMANN, S., SUCHER, S., FRAHNOW, T., WEGNER, K., MACHANN, J., PETZKE, K. J., HIERHOLZER, J., LICHTINGHAGEN, R., HERDER, C., CARSTENSEN-KIRBERG, M., RODEN, M., RUDOVICH, N., KLAUS, S., THOMANN, R., SCHNEEWEISS, R., ROHN, S. & PFEIFFER, A. F. H. 2016. Isocaloric Diets High in Animal or Plant Protein Reduce Liver fat and Inflammation in Individuals with Type 2 Diabetes. *Gastroenterology*.

MARTINEZ-GONZALEZ, M. A. & BES-RASTROLLO, M. 2014. Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol,* 25**,** 20-6.

MASARONE, M., FEDERICO, A., ABENAVOLI, L., LOGUERCIO, C. & PERSICO, M. 2014. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials,* 9**,** 126-33.

MASTERTON, G. S., PLEVRIS, J. N. & HAYES, P. C. 2010. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther,* 31**,** 679-92.

MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., NAYLOR, B. A., TREACHER, D. F. & TURNER, R. C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia,* 28.

MCCARTHY, E. M. & RINELLA, M. E. 2012. The Role of Diet and Nutrient Composition in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics,* 112**,** 401-409.

MCLAUGHLIN, T., ABBASI, F., LAMENDOLA, C., YENI-KOMSHIAN, H. & REAVEN, G. 2000. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: an insight into the link between plasma insulin and triglyceride concentrations. *J Clin Endocrinol Metab,* 85**,** 3085-8.

MEHTA, S. R. 2010. Advances in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Ther Adv Endocrinol Metab,* 1**,** 101-15.

MESARWI, O., POLAK, J., JUN, J. & POLOTSKY, V. Y. 2013. Sleep disorders and the development of insulin resistance and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am,* 42**,** 617-34.

MIELE, L. & TARGHER, G. 2015. Understanding the association between developing a fatty liver and subsequent cardio-metabolic complications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol,* 9**,** 1243-5.

MIELE, L., VALENZA, V., LA TORRE, G., MONTALTO, M., CAMMAROTA, G., RICCI, R., MASCIANA, R., FORGIONE, A., GABRIELI, M. L., PEROTTI, G., VECCHIO, F. M., RAPACCINI, G., GASBARRINI, G., DAY, C. P. & GRIECO, A. 2009. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 49**,** 1877-87.

MINVILLE, C., HILLERET, M. N., TAMISIER, R., ARON-WISNEWSKY, J., CLEMENT, K., TROCME, C., BOREL, J. C., LEVY, P., ZARSKI, J. P. & PEPIN, J. L. 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia, and endothelial function in patients with sleep apnea. *Chest,* 145**,** 525-33.

MISCIAGNA, G., DEL PILAR DÍAZ, M., CARAMIA, D. V., BONFIGLIO, C., FRANCO, I., NOVIELLO, M. R., CHILOIRO, M., ABBRESCIA, D. I., MIRIZZI, A., TANZI, M., CARUSO, M. G., CORREALE, M., REDDAVIDE, R., INGUAGGIATO, R., CISTERNINO, A. M. & OSELLA, A. R. 2016. Effect of a Low Glycemic Index Mediterranean Diet on non-alcoholic fatty liver disease. A randomized controlled clinici trial. *The journal of nutrition, health & aging***,** 1-9.

MITJAVILA, M. T., FANDOS, M., SALAS-SALVADO, J., COVAS, M. I., BORREGO, S., ESTRUCH, R., LAMUELA-RAVENTOS, R., CORELLA, D., MARTINEZ-GONZALEZ, M. A., SANCHEZ, J. M., BULLO, M., FITO, M., TORMOS, C., CERDA, C., CASILLAS, R., MORENO, J. J., IRADI, A., ZARAGOZA, C., CHAVES, J. & SAEZ, G. T. 2013. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr,* 32**,** 172-8.

MODI, A. A., FELD, J. J., PARK, Y., KLEINER, D. E., EVERHART, J. E., LIANG, T. J. & HOOFNAGLE, J. H. 2010. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology,* 51**,** 201-9.

MOHER, D., LIBERATI, A., TETZLAFF, J., ALTMAN, D. G. & GROUP, P. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *J Clin Epidemiol,* 62**,** 1006-12.

MONAGAS, M., KHAN, N., ANDRES-LACUEVA, C., URPI-SARDA, M., VAZQUEZ-AGELL, M., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. & ESTRUCH, R. 2009. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Nutr,* 102**,** 201-6.

MOORE, J. B., GUNN, P. J. & FIELDING, B. A. 2014. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients,* 6**,** 5679-703.

MORIYA, A., IWASAKI, Y., OHGUCHI, S., KAYASHIMA, E., MITSUMUNE, T., TANIGUCHI, H., IKEDA, F., SHIRATORI, Y. & YAMAMOTO, K. 2011. Alcohol consumption appears to protect against non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther,* 33**,** 378-88.

MOSHFEGH, A. J., BORRUD, L., B., P. & LACOMB, R. 1999. Improved method for the 24-hour dietary recall for use in national surveys. *FASEB J,* 13**,** A603.

MOUZAKI, M. & ALLARD, J. 2012. Non-alcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic. *Ann Gastroenterol,* 25**,** 207-217.

MUKHERJEE, S., PATEL, S. R., KALES, S. N., AYAS, N. T., STROHL, K. P., GOZAL, D., MALHOTRA, A. & AMERICAN THORACIC SOCIETY AD HOC COMMITTEE ON HEALTHY, S. 2015. An Official American Thoracic Society Statement: The Importance of Healthy Sleep. Recommendations and Future Priorities. *Am J Respir Crit Care Med,* 191**,** 1450-8.

MUNTEANU, A., ZINGG, J. M. & AZZI, A. 2004. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *J Cell Mol Med,* 8**,** 59-76.

MUSSO, G., CASSADER, M., OLIVETTI, C., ROSINA, F., CARBONE, G. & GAMBINO, R. 2013. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev,* 14**,** 417-31.

MUSSO, G., CASSADER, M., ROSINA, F. & GAMBINO, R. 2012. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia,* 55**,** 885-904.

MUSSO, G., GAMBINO, R. & CASSADER, M. 2010. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev,* 11**,** 430-45.

MUSSO, G., GAMBINO, R., CASSADER, M. & PAGANO, G. 2011. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med,* 43**,** 617-49.

MUSSO, G., GAMBINO, R., DE MICHIELI, F., BIROLI, G., PREMOLI, A., PAGANO, G., BO, S., DURAZZO, M. & CASSADER, M. 2007. Nitrosative stress predicts the presence and severity of nonalcoholic fatty liver at different stages of the development of insulin resistance and metabolic syndrome: possible role of vitamin A intake. *Am J Clin Nutr,* 86**,** 661-71.

MUSSO, G., GAMBINO, R., DE MICHIELI, F., CASSADER, M., RIZZETTO, M., DURAZZO, M., FAGà, E., SILLI, B. & PAGANO, G. 2003. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology,* 37**,** 909-916.

MUSSO, G., GAMBINO, R., TABIBIAN, J. H., EKSTEDT, M., KECHAGIAS, S., HAMAGUCHI, M., HULTCRANTZ, R., HAGSTROM, H., YOON, S. K., CHARATCHAROENWITTHAYA, P., GEORGE, J., BARRERA, F., HAFLIETHADOTTIR, S., BJORNSSON, E. S., ARMSTRONG, M. J., HOPKINS, L. J., GAO, X., FRANCQUE, S., VERRIJKEN, A., YILMAZ, Y., LINDOR, K. D., CHARLTON, M., HARING, R., LERCH, M. M., RETTIG, R., VOLZKE, H., RYU, S., LI, G., WONG, L. L., MACHADO, M., CORTEZ-PINTO, H., YASUI, K. & CASSADER, M. 2014. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med,* 11**,** e1001680.

NAIR, S., DIEHL, A. M., WISEMAN, M., FARR, G. H., JR. & PERRILLO, R. P. 2004. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther,* 20**,** 23-8.

NASCIMBENI, F., PAIS, R., BELLENTANI, S., DAY, C. P., RATZIU, V., LORIA, P. & LONARDO, A. 2013. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol,* 59**,** 859-71.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. 2010. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology,* 52**,** 774-88.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. 2013. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care,* 16**,** 446-52.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A., BRUNT, E. M., WEHMEIER, K. R., OLIVER, D. & BACON, B. R. 2003. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology,* 38**,** 1008-17.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. & CALDWELL, S. H. 2003. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology,* 37**,** 1202-19.

NHLBI 2006. Your Guide to Lowering Your Blood Pressure with DASH. *In:* PUBLICATION, N. (ed.). Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute

NIELSEN, L. S., DANIELSEN, K. V. & SORENSEN, T. I. 2011. Short sleep duration as a possible cause of obesity: critical analysis of the epidemiological evidence. *Obes Rev,* 12**,** 78-92.

NIGAM, P., BHATT, S., MISRA, A., CHADHA, D. S., VAIDYA, M., DASGUPTA, J. & PASHA, Q. M. 2014. Effect of a 6-month intervention with cooking oils containing a high concentration of monounsaturated fatty acids (olive and canola oils) compared with control oil in male Asian Indians with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Technol Ther,* 16**,** 255-61.

NSEIR, W., HELLOU, E. & ASSY, N. 2014. Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG,* 20**,** 9338-9344.

OBIKA, M. & NOGUCHI, H. 2012. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Experimental Diabetes Research,* 2012**,** 12.

ODDY, W. H., HERBISON, C. E., JACOBY, P., AMBROSINI, G. L., O'SULLIVAN, T. A., AYONRINDE, O. T., OLYNYK, J. K., BLACK, L. J., BEILIN, L. J., MORI, T. A., HANDS, B. P. & ADAMS, L. A. 2013. The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. *Am J Gastroenterol,* 108**,** 778-85.

OLIVEIRA, C. P., DE LIMA SANCHES, P., DE ABREU-SILVA, E. O. & MARCADENTI, A. 2016. Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Diabetes Res,* 2016**,** 4597246.

ONG, J. P., PITTS, A. & YOUNOSSI, Z. M. 2008. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol,* 49**,** 608-12.

ORCI, L. A., GARIANI, K., OLDANI, G., DELAUNE, V., MOREL, P. & TOSO, C. 2016. Exercise-based Interventions for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis and Meta-regression. *Clin Gastroenterol Hepatol*.

OYA, J., NAKAGAMI, T., SASAKI, S., JIMBA, S., MURAKAMI, K., KASAHARA, T., WASADA, T., SEKIGUCHI, H., HASEGAWA, M., ENDO, Y. & IWAMOTO, Y. 2010. Intake of n-3 polyunsaturated fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study in Japanese men and women. *Eur J Clin Nutr,* 64**,** 1179-85.

PANAGIOTAKOS, D. B., MILIAS, G. A., PITSAVOS, C. & STEFANADIS, C. 2006. MedDietScore: A computer program that evaluates the adherence to the Mediterranean dietary pattern and its relation to cardiovascular disease risk. *Comput. Methods Prog. Biomed.,* 83**,** 73-77.

PAOLELLA, G., MANDATO, C., PIERRI, L., POETA, M., DI STASI, M. & VAJRO, P. 2014. Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol,* 20**,** 15518-31.

PAPAGIANNI, M., SOFOGIANNI, A. & TZIOMALOS, K. 2015. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology,* 7**,** 638-648.

PAPAMILTIADOUS, E. S., ROBERTS, S. K., NICOLL, A. J., RYAN, M. C., ITSIOPOULOS, C., SALIM, A. & TIERNEY, A. C. 2016. A randomised controlled trial of a Mediterranean Dietary Intervention for Adults with Non Alcoholic Fatty Liver Disease (MEDINA): study protocol. *BMC Gastroenterol,* 16**,** 14.

PAPANDREOU, D. & ANDREOU, E. 2015. Role of diet on non-alcoholic fatty liver disease: An updated narrative review. *World Journal of Hepatology,* 7**,** 575-582.

PAPATHEODORIDIS, G. V., GOULIS, J., CHRISTODOULOU, D., MANOLAKOPOULOS, S., RAPTOPOULOU, M., ANDRIOTI, E., ALEXANDROPOULOS, N., SAVVIDOU, S., PAPACHRISTOU, A., ZERVOU, E., SEFERIADIS, K., KOUSIDOU, P., VOGIATZAKIS, E. & TSIANOS, E. 2007. High prevalence of elevated liver enzymes in blood donors: associations with male gender and central adiposity. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 19**,** 281-7.

PASCHOS, P. & PALETAS, K. 2009. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia,* 13**,** 9-19.

PASSOS, E., ASCENSAO, A., MARTINS, M. J. & MAGALHAES, J. 2015. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. *Metabolism,* 64**,** 780-92.

PATAKY, Z., GENTON, L., SPAHR, L., LAZAREVIC, V., TERRAZ, S., GAÏA, N., RUBBIA-BRANDT, L., GOLAY, A., SCHRENZEL, J. & PICHARD, C. 2016. Impact of Hypocaloric Hyperproteic Diet on Gut Microbiota in Overweight or Obese Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pilot Study. *Digestive Diseases and Sciences,* 61**,** 2721-2731.

PATEL, N. S., DOYCHEVA, I., PETERSON, M. R., HOOKER, J., KISSELVA, T., SCHNABL, B., SEKI, E., SIRLIN, C. B. & LOOMBA, R. 2015. Effect of weight loss on magnetic resonance imaging estimation of liver fat and volume in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 13**,** 561-568 e1.

PATEL, S. R., ZHU, X., STORFER-ISSER, A., MEHRA, R., JENNY, N. S., TRACY, R. & REDLINE, S. 2009. Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep,* 32**,** 200-4.

PERSEGHIN, G., LATTUADA, G., DE COBELLI, F., RAGOGNA, F., NTALI, G., ESPOSITO, A., BELLONI, E., CANU, T., TERRUZZI, I., SCIFO, P., DEL MASCHIO, A. & LUZI, L. 2007. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care,* 30**,** 683-8.

PISANO, G., LOMBARDI, R. & FRACANZANI, A. L. 2016. Vascular Damage in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Possible Role of Iron and Ferritin. *Int J Mol Sci,* 17.

POLYZOS, S. A., KOUNTOURAS, J., ZAVOS, C. & STERGIOPOULOS, C. 2010a. Adipocytokines in insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease: the two sides of the same coin. *Med Hypotheses,* 74**,** 1089-90.

POLYZOS, S. A., KOUNTOURAS, J., ZAVOS, C. & TSIAOUSI, E. 2010b. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism,* 12**,** 365-383.

POLYZOS, S. A., TOULIS, K. A., GOULIS, D. G., ZAVOS, C. & KOUNTOURAS, J. 2011. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism,* 60**,** 313-26.

POYNARD, T., LEBRAY, P., INGILIZ, P., VARAUT, A., VARSAT, B., NGO, Y., NORHA, P., MUNTEANU, M., DRANE, F., MESSOUS, D., BISMUT, F. I., CARRAU, J. P., MASSARD, J., RATZIU, V. & GIORDANELLA, J. P. 2010.

Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol,* 10**,** 40.

PREISS, D. & SATTAR, N. 2008. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond),* 115**,** 141-50.

PROMRAT, K., KLEINER, D. E., NIEMEIER, H. M., JACKVONY, E., KEARNS, M., WANDS, J. R., FAVA, J. L. & WING, R. R. 2010. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology,* 51**,** 121-9.

PROMRAT, K., LUTCHMAN, G., UWAIFO, G. I., FREEDMAN, R. J., SOZA, A., HELLER, T., DOO, E., GHANY, M., PREMKUMAR, A., PARK, Y., LIANG, T. J., YANOVSKI, J. A., KLEINER, D. E. & HOOFNAGLE, J. H. 2004. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology,* 39**,** 188-96.

PUGH, C., JONES, H., SPRUNG, V., RICHARDSON, P., SHOJAEE-MORADIE, F., MARGOT UMPLEBY, A., IRWIN, A., GREEN, D., TIMOTHY CABLE, N., KEMP, G. & CUTHBERTSON, D. 2016. Improvements In Liver Fat And Endothelial Function Following Supervised Exercise Training Are Not Sustained One-Year After The Cessation Of Supervision In Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: 1948 Board #100 June 2, 2: 00 PM - 3: 30 PM. *Med Sci Sports Exerc,* 48**,** 539.

PUGH, C. J., SPRING, V. S., KEMP, G. J., RICHARDSON, P., SHOJAEE-MORADIE, F., UMPLEBY, A. M., GREEN, D. J., CABLE, N. T., JONES, H. & CUTHBERTSON, D. J. 2014. Exercise training reverses endothelial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 307**,** H1298-306.

RABOL, R., PETERSEN, K. F., DUFOUR, S., FLANNERY, C. & SHULMAN, G. I. 2011. Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 13705-9.

RAFIQ, N. & YOUNOSSI, Z. M. 2008. Effects of weight loss on nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis,* 28**,** 427-33.

RAGAB, S. M., ABD ELGHAFFAR, S., EL-METWALLY, T. H., BADR, G., MAHMOUD, M. H. & OMAR, H. M. 2015. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids Health Dis,* 14**,** 83.

RAMEZANI-BINABAJ, M., MOTALEBI, M., KARIMI-SARI, H., REZAEE-ZAVAREH, M. S. & ALAVIAN, S. M. 2014. Are women with polycystic ovarian syndrome at a high risk of non-alcoholic Fatty liver disease; a meta-analysis. *Hepat Mon,* 14**,** e23235.

RANKIN, A. J., RANKIN, A. C., MACINTYRE, P. & HILLIS, W. S. 2012. Walk or run? Is high-intensity exercise more effective than moderate-intensity exercise at reducing cardiovascular risk? *Scott Med J,* 57**,** 99-102.

RATZIU, V., BELLENTANI, S., CORTEZ-PINTO, H., DAY, C. & MARCHESINI, G. 2010. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol,* 53**,** 372-84.

RATZIU, V., DE LEDINGHEN, V., OBERTI, F., MATHURIN, P., WARTELLE-BLADOU, C., RENOU, C., SOGNI, P., MAYNARD, M., LARREY, D., SERFATY, L., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., BASTARD, J. P., RIVIERE, M., SPENARD, J. & FRESGUN 2011. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol,* 54**,** 1011-9.

RAZAVI ZADE, M., TELKABADI, M. H., BAHMANI, F., SALEHI, B., FARSHBAF, S. & ASEMI, Z. 2016. The effects of DASH diet on weight loss and metabolic status in

adults with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. *Liver International,* 36**,** 563-571.
REZENDE, R. E., DUARTE, S. M., STEFANO, J. T., ROSCHEL, H., GUALANO, B., DE SA PINTO, A. L., VEZOZZO, D. C., CARRILHO, F. J. & OLIVEIRA, C. P. 2016. Randomized clinical trial: benefits of aerobic physical activity for 24 weeks in postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *Menopause,* 23**,** 876-83.
RICCI, G., CANDUCCI, E., PASINI, V., ROSSI, A., BERSANI, G., RICCI, E. & ALVISI, V. 2011. Nutrient intake in Italian obese patients: relationships with insulin resistance and markers of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition,* 27**,** 672-6.
RICHE, D. M., FLEMING, J. W., MALINOWSKI, S. S., BLACK, C. A., MILLER, K. H. & WOFFORD, M. R. 2014. Resistant nonalcoholic fatty liver disease amelioration with rosuvastatin and pioglitazone combination therapy in a patient with metabolic syndrome. *Ann Pharmacother,* 48**,** 137-41.
RIDEOUT, T. C., MARINANGELI, C. P., MARTIN, H., BROWNE, R. W. & REMPEL, C. B. 2013. Consumption of low-fat dairy foods for 6 months improves insulin resistance without adversely affecting lipids or bodyweight in healthy adults: a randomized free-living cross-over study. *Nutr J,* 12**,** 56.
RINELLA, M. & CHARLTON, M. 2016. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology,* 64**,** 19-22.
ROBERTS, C. K., VAZIRI, N. D. & BARNARD, R. J. 2002. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation,* 106**,** 2530-2.
RODRIGUEZ-HERNANDEZ, H., CERVANTES-HUERTA, M., RODRIGUEZ-MORAN, M. & GUERRERO-ROMERO, F. 2011. Decrease of aminotransferase levels in obese women is related to body weight reduction, irrespective of type of diet. *Ann Hepatol,* 10**,** 486-92.
ROLLNICK, S., MASON, P. & BUTLER, C. 1999. *Health Behavior Chnage: A Guide for practitioners*, Churchill Livingstone.
ROLO, A. P., TEODORO, J. S. & PALMEIRA, C. M. 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med,* 52**,** 59-69.
ROS, E., MARTINEZ-GONZALEZ, M. A., ESTRUCH, R., SALAS-SALVADO, J., FITO, M., MARTINEZ, J. A. & CORELLA, D. 2014. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv Nutr,* 5**,** 330S-6S.
ROSS, A. B., GODIN, J. P., MINEHIRA, K. & KIRWAN, J. P. 2013. Increasing whole grain intake as part of prevention and treatment of nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Endocrinol,* 2013**,** 585876.
RUHL, C. E. & EVERHART, J. E. 2004. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clinics in Liver Disease,* 8**,** 501-519.
RUHL, C. E. & EVERHART, J. E. 2005. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology,* 128**,** 24-32.
RUHL, C. E. & EVERHART, J. E. 2009. Elevated serum alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase and mortality in the United States population. *Gastroenterology,* 136**,** 477-85 e11.
RYAN, M. C., ITSIOPOULOS, C., THODIS, T., WARD, G., TROST, N., HOFFERBERTH, S., O'DEA, K., DESMOND, P. V., JOHNSON, N. A. & WILSON, A. M. 2013. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol,* 59**,** 138-43.
RYU, S., CHANG, Y., JUNG, H. S., YUN, K. E., KWON, M. J., CHOI, Y., KIM, C. W., CHO, J., SUH, B. S., CHO, Y. K., CHUNG, E. C., SHIN, H. & KIM, Y. S. 2015.

Relationship of sitting time and physical activity with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol,* 63**,** 1229-37.

SANEEI, P., SALEHI-ABARGOUEI, A., ESMAILLZADEH, A. & AZADBAKHT, L. 2014. Influence of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet on blood pressure: A systematic review and meta-analysis on randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 24**,** 1253-1261.

SANYAL, A. J., CAMPBELL-SARGENT, C., MIRSHAHI, F., RIZZO, W. B., CONTOS, M. J., STERLING, R. K., LUKETIC, V. A., SHIFFMAN, M. L. & CLORE, J. N. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology,* 120**,** 1183-92.

SANYAL, A. J., CHALASANI, N., KOWDLEY, K. V., MCCULLOUGH, A., DIEHL, A. M., BASS, N. M., NEUSCHWANDER-TETRI, B. A., LAVINE, J. E., TONASCIA, J., UNALP, A., VAN NATTA, M., CLARK, J., BRUNT, E. M., KLEINER, D. E., HOOFNAGLE, J. H., ROBUCK, P. R. & NASH, C. R. N. 2010. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med,* 362**,** 1675-85.

SANYAL, A. J., MOFRAD, P. S., CONTOS, M. J., SARGEANT, C., LUKETIC, V. A., STERLING, R. K., STRAVITZ, R. T., SHIFFMAN, M. L., CLORE, J. & MILLS, A. S. 2004. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 2**,** 1107-15.

SASS, D., CHANG, P. & CHOPRA, K. 2005. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Review. *Digestive Diseases and Sciences,* 50**,** 171-180.

SATHIARAJ, E., CHUTKE, M., REDDY, M. Y., PRATAP, N., RAO, P. N., REDDY, D. N. & RAGHUNATH, M. 2011. A case-control study on nutritional risk factors in non-alcoholic fatty liver disease in Indian population. *Eur J Clin Nutr,* 65**,** 533-7.

SATO, K., GOSHO, M., YAMAMOTO, T., KOBAYASHI, Y., ISHII, N., OHASHI, T., NAKADE, Y., ITO, K., FUKUZAWA, Y. & YONEDA, M. 2015. Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition,* 31**,** 923-30.

SAWYER, B. J., TUCKER, W. J., BHAMMAR, D. M., RYDER, J. R., SWEAZEA, K. L. & GAESSER, G. A. 2016. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on endothelial function and cardiometabolic risk markers in obese adults. *J Appl Physiol (1985),* 121**,** 279-88.

SAYINER, M., STEPANOVA, M., PHAM, H., NOOR, B., WALTERS, M. & YOUNOSSI, Z. M. Assessment of health utilities and quality of life in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ Open Gastroenterology,* 0**,** e000106.

SCHUPPAN, D. & SCHATTENBERG, J. M. 2013. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J Gastroenterol Hepatol,* 28 Suppl 1**,** 68-76.

SCHWIMMER, J. B., MIDDLETON, M. S., DEUTSCH, R. & LAVINE, J. E. 2005. A phase 2 clinical trial of metformin as a treatment for non-diabetic paediatric non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther,* 21**,** 871-9.

SCHWINGSHACKL, L., MISSBACH, B., KONIG, J. & HOFFMANN, G. 2015. Adherence to a Mediterranean diet and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr,* 18**,** 1292-9.

SEARS, B. 2015. Anti-inflammatory Diets. *Journal of the American College of Nutrition,* 34**,** 14-21.

SEDENTARY BEHAVIOUR RESEARCH, N. 2012. Letter to the Editor: Standardized use of the terms "sedentary" and "sedentary behaviours". *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism,* 37**,** 540-542.

SHAMSODDINI, A., SOBHANI, V., GHAMAR CHEHREH, M. E., ALAVIAN, S. M. & ZAREE, A. 2015. Effect of Aerobic and Resistance Exercise Training on Liver Enzymes and Hepatic Fat in Iranian Men With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepat Mon,* 15**,** e31434.

SHANG, F., LI, X. & JIANG, X. 2016. Coffee consumption and risk of the metabolic syndrome: A meta-analysis. *Diabetes & Metabolism,* 42**,** 80-87.

SHEN, H., RODRIGUEZ, A. C., SHIANI, A., LIPKA, S., SHAHZAD, G., KUMAR, A. & MUSTACCHIA, P. 2016a. Association between caffeine consumption and nonalcoholic fatty liver disease: a systemic review and meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol,* 9**,** 113-20.

SHEN, J., CHAN, H. L., WONG, G. L., CHOI, P. C., CHAN, A. W., CHAN, H. Y., CHIM, A. M., YEUNG, D. K., CHAN, F. K., WOO, J., YU, J., CHU, W. C. & WONG, V. W. 2012. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol,* 56**,** 1363-70.

SHEN, N., WANG, P. & YAN, W. 2016b. Sleep Duration and the Risk of Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep,* 6**,** 31956.

SHI, L., LIU, Z. W., LI, Y., GONG, C., ZHANG, H., SONG, L. J., HUANG, C. Y. & LI, M. 2012. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu. *Biomed Environ Sci,* 25**,** 383-91.

SHIRANI, F., SALEHI-ABARGOUEI, A. & AZADBAKHT, L. 2013. Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet on some risk for developing type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis on controlled clinical trials. *Nutrition,* 29**,** 939-947.

SHOJAEE-MORADIE, F., CUTHBERTSON, D.J., BARRETT, M., JACKSON, N.C., HERRING, R, THOMAS, E.L., BELL, J.D., KEMP, G.J., WRIGHT, J. AND UMPLEBY, A.M. 2016. Exercise Training Reduces Liver Fat and Increases Rates of VLDL Clearance, but not VLDL Production in NAFLD. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* In press.

SIERVO, M., LARA, J., CHOWDHURY, S., ASHOR, A., OGGIONI, C. & MATHERS, J. C. 2014. Effects of the Dietary Approach to Stop Hypertension (DASH) diet on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition,* 113**,** 1-15.

SIERVO, M., LARA, J., CHOWDHURY, S., ASHOR, A., OGGIONI, C. & MATHERS, J. C. 2015. Effects of the Dietary Approach to Stop Hypertension (DASH) diet on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition,* 113**,** 1-15.

SINGH, B. & SAXENA, A. 2010. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes,* 1**,** 36-47.

SINGH, S., KHERA, R., ALLEN, A. M., MURAD, M. H. & LOOMBA, R. 2015. Comparative effectiveness of pharmacological interventions for nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and network meta-analysis. *Hepatology,* 62**,** 1417-32.

SKAABY, T., HUSEMOEN, L. L. N., BORGLYKKE, A., JØRGENSEN, T., THUESEN, B. H., PISINGER, C., SCHMIDT, L. E. & LINNEBERG, A. 2014. Vitamin D status, liver enzymes, and incident liver disease and mortality: a general population study. *Endocrine,* 47**,** 213-220.

SOFI, F., ABBATE, R., GENSINI, G. F. & CASINI, A. 2010. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr,* 92**,** 1189-96.

SOFI, F., CESARI, F., ABBATE, R., GENSINI, G. F. & CASINI, A. 2008. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ,* 337**,** a1344.
SOLDATOS, C. R., DIKEOS, D. G. & PAPARRIGOPOULOS, T. J. 2003. The diagnostic validity of the Athens Insomnia Scale. *J Psychosom Res,* 55**,** 263-7.
SOLGA, S., ALKHURAISHE, A. R., CLARK, J. M., TORBENSON, M., GREENWALD, A., DIEHL, A. M. & MAGNUSON, T. 2004. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci,* 49**,** 1578-83.
SOOKOIAN, S. & PIROLA, C. J. 2013. Obstructive sleep apnea is associated with fatty liver and abnormal liver enzymes: a meta-analysis. *Obes Surg,* 23**,** 1815-25.
SPADARO, L., MAGLIOCCO, O., SPAMPINATO, D., PIRO, S., OLIVERI, C., ALAGONA, C., PAPA, G., RABUAZZO, A. M. & PURRELLO, F. 2008. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease,* 40**,** 194-199.
SREENIVASA BABA, C., ALEXANDER, G., KALYANI, B., PANDEY, R., RASTOGI, S., PANDEY, A. & CHOUDHURI, G. 2006. Effect of exercise and dietary modification on serum aminotransferase levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol,* 21**,** 191-8.
ST GEORGE, A., BAUMAN, A., JOHNSTON, A., FARRELL, G., CHEY, T. & GEORGE, J. 2009. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 50**,** 68-76.
STERLING, R. K., LISSEN, E., CLUMECK, N., SOLA, R., CORREA, M. C., MONTANER, J., S. SULKOWSKI, M., TORRIANI, F. J., DIETERICH, D. T., THOMAS, D. L., MESSINGER, D. & NELSON, M. 2006. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology,* 43**,** 1317-1325.
STIENSTRA, R., MANDARD, S., PATSOURIS, D., MAASS, C., KERSTEN, S. & MULLER, M. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology,* 148**,** 2753-63.
STRATOPOULOS, C., PAPAKONSTANTINOU, A., TERZIS, I., SPILIADI, C., DIMITRIADES, G., KOMESIDOU, V., KITSANTA, P., ARGYRAKOS, T. & HADJIYANNAKIS, E. 2005. Changes in liver histology accompanying massive weight loss after gastroplasty for morbid obesity. *Obes Surg,* 15**,** 1154-60.
SULLIVAN, S., KIRK, E. P., MITTENDORFER, B., PATTERSON, B. W. & KLEIN, S. 2012. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 55**,** 1738-45.
SUN, W. H., SONG, M. Q., JIANG, C. Q., XIN, Y. N., MA, J. L., LIU, Y. X., MA, L., LIN, Z. H., LI, C. Y., LIU, L., ZHANG, M., CHU, L. L., JIANG, X. J., WAN, Q., ZHOU, L., REN, R. & MENG, L. F. 2012. Lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease in Chengyang District, Qingdao, China. *World J Hepatol,* 4**,** 224-30.
TAHAN, V., CANBAKAN, B., BALCI, H., DANE, F., AKIN, H., CAN, G., HATEMI, I., OLGAC, V., SONSUZ, A., OZBAY, G., YURDAKUL, I. & SENTURK, H. 2008. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology,* 55**,** 1433-8.
TAM, C. S., XIE, W., JOHNSON, W. D., CEFALU, W. T., REDMAN, L. M. & RAVUSSIN, E. 2012. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care,* 35**,** 1605-10.
TARGHER, G., BERTOLINI, L., SCALA, L., CIGOLINI, M., ZENARI, L., FALEZZA, G. & ARCARO, G. 2007. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 17**,** 517-524.

TEEDE, H., DEEKS, A. & MORAN, L. 2010. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med,* 8**,** 41.

TENDLER, D., LIN, S., YANCY, W. S., JR., MAVROPOULOS, J., SYLVESTRE, P., ROCKEY, D. C. & WESTMAN, E. C. 2007. The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Dig Dis Sci,* 52**,** 589-93.

THOMA, C., DAY, C. P. & TRENELL, M. I. 2012. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol,* 56**,** 255-66.

TILG, H. & MOSCHEN, A. R. 2008. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab,* 19**,** 371-9.

TILG, H. & MOSCHEN, A. R. 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology,* 52**,** 1836-46.

TINIAKOS, D. G., VOS, M. B. & BRUNT, E. M. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol,* 5**,** 145-71.

TORRES, D. M., WILLIAMS, C. D. & HARRISON, S. A. 2012. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 10**,** 837-58.

TORRIS, C., MOLIN, M. & CVANCAROVA, M. S. 2016. Lean fish consumption is associated with lower risk of metabolic syndrome: a Norwegian cross sectional study. *BMC Public Health,* 16**,** 347.

TOSHIMITSU, K., MATSUURA, B., OHKUBO, I., NIIYA, T., FURUKAWA, S., HIASA, Y., KAWAMURA, M., EBIHARA, K. & ONJI, M. 2007. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition,* 23**,** 46-52.

TREFTS, E., WILLIAMS, A. S. & WASSERMAN, D. H. 2015a. Chapter Nine - Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. *In:* CLAUDE, B. (ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Academic Press.

TREFTS, E., WILLIAMS, A. S. & WASSERMAN, D. H. 2015b. Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci,* 135**,** 203-25.

TRICHOPOULOU, A. 2007. Mediterranean diet, traditional foods, and health: evidence from the Greek EPIC cohort. *Food Nutr Bull,* 28**,** 236-40.

TROVATO, F. M., CATALANO, D., MARTINES, G. F., PACE, P. & TROVATO, G. M. 2015. Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: the need of extended and comprehensive interventions. *Clin Nutr,* 34**,** 86-8.

UENO, T., SUGAWARA, H., SUJAKU, K., HASHIMOTO, O., TSUJI, R., TAMAKI, S., TORIMURA, T., INUZUKA, S., SATA, M. & TANIKAWA, K. 1997. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol,* 27**,** 103-7.

UMPIERRE, D., RIBEIRO, P. A., SCHAAN, B. D. & RIBEIRO, J. P. 2013. Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis. *Diabetologia,* 56**,** 242-51.

UYGUN, A., KADAYIFCI, A., ISIK, A. T., OZGURTAS, T., DEVECI, S., TUZUN, A., YESILOVA, Z., GULSEN, M. & DAGALP, K. 2004. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther,* 19**,** 537-44.

VAN DER HEIJDEN, G. J., TOFFOLO, G., MANESSO, E., SAUER, P. J. & SUNEHAG, A. L. 2009. Aerobic exercise increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in sedentary adolescents. *J Clin Endocrinol Metab,* 94**,** 4292-9.

VAN WAGNER, L. B., KOPPE, S. W., BRUNT, E. M., GOTTSTEIN, J., GARDIKIOTES, K., GREEN, R. M. & RINELLA, M. E. 2011. Pentoxifylline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Ann Hepatol,* 10**,** 277-86.

VANNI, E., BUGIANESI, E., KOTRONEN, A., DE MINICIS, S., YKI-JÄRVINEN, H. & SVEGLIATI-BARONI, G. 2010. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver,* 42**,** 320-330.

VERNON, G., BARANOVA, A. & YOUNOSSI, Z. M. 2011. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther,* 34**,** 274-85.

VILAR-GOMEZ, E., MARTINEZ-PEREZ, Y., CALZADILLA-BERTOT, L., TORRES-GONZALEZ, A., GRA-ORAMAS, B., GONZALEZ-FABIAN, L., FRIEDMAN, S. L., DIAGO, M. & ROMERO-GOMEZ, M. 2015. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology,* 149**,** 367-78 e5; quiz e14-5.

VILAR GOMEZ, E., RODRIGUEZ DE MIRANDA, A., GRA ORAMAS, B., ARUS SOLER, E., LLANIO NAVARRO, R., CALZADILLA BERTOT, L., YASELLS GARCIA, A. & DEL ROSARIO ABREU VAZQUEZ, M. 2009. Clinical trial: a nutritional supplement Viusid, in combination with diet and exercise, in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther,* 30**,** 999-1009.

VILAR, L., OLIVEIRA, C. P., FAINTUCH, J., MELLO, E. S., NOGUEIRA, M. A., SANTOS, T. E., ALVES, V. A. & CARRILHO, F. J. 2008. High-fat diet: a trigger of non-alcoholic steatohepatitis? Preliminary findings in obese subjects. *Nutrition,* 24**,** 1097-102.

VITAGLIONE, P., MORISCO, F., MAZZONE, G., AMORUSO, D. C., RIBECCO, M. T., ROMANO, A., FOGLIANO, V., CAPORASO, N. & D'ARGENIO, G. 2010. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology,* 52**,** 1652-61.

VOLYNETS, V., KUPER, M. A., STRAHL, S., MAIER, I. B., SPRUSS, A., WAGNERBERGER, S., KONIGSRAINER, A., BISCHOFF, S. C. & BERGHEIM, I. 2012. Nutrition, Intestinal Permeability, and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Dig Dis Sci.*

WATANABE, S., HASHIMOTO, E., IKEJIMA, K., UTO, H., ONO, M., SUMIDA, Y., SEIKE, M., TAKEI, Y., TAKEHARA, T., TOKUSHIGE, K., NAKAJIMA, A., YONEDA, M., SAIBARA, T., SHIOTA, G., SAKAIDA, I., NAKAMUTA, M., MIZUTA, T., TSUBOUCHI, H., SUGANO, K. & SHIMOSEGAWA, T. 2015. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res,* 45**,** 363-77.

WATANABE, S., YAGINUMA, R., IKEJIMA, K. & MIYAZAKI, A. 2008. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol,* 43**,** 509-18.

WATTACHERIL, J. & SANYAL, A. J. 2016. Lean NAFLD: An Underrecognized Outlier. *Curr Hepatol Rep,* 15**,** 134-139.

WEI, H., QU, H., WANG, H. & DENG, H. 2016a. Associations between sitting time and non-alcoholic fatty liver diseases in Chinese male workers: a cross-sectional study. *BMJ Open,* 6**,** e011939.

WEI, J., LEI, G.-H., FU, L., ZENG, C., YANG, T. & PENG, S.-F. 2016b. Association between Dietary Vitamin C Intake and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Cross-Sectional Study among Middle-Aged and Older Adults. *PLoS ONE,* 11**,** e0147985.

WHO Geneva, 8-11 December 2008. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation.

WILLIAMS, C. D., STENGEL, J., ASIKE, M. I., TORRES, D. M., SHAW, J., CONTRERAS, M., LANDT, C. L. & HARRISON, S. A. 2011. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely

middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology,* 140**,** 124-31.

WILLIAMS, P. T. 2012. Attenuating effect of vigorous physical activity on the risk for inherited obesity: a study of 47,691 runners. *PLoS One,* 7**,** e31436.

WONG, V. W.-S., WONG, G. L.-H., YEUNG, D. K.-W., LAU, T. K.-T., CHAN, C. K.-M., CHIM, A. M.-L., ABRIGO, J. M., CHAN, R. S.-M., WOO, J., TSE, Y.-K., CHU, W. C.-W. & CHAN, H. L.-Y. 2015. Incidence of non-alcoholic fatty liver disease in Hong Kong: A population study with paired proton-magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Hepatology,* 62**,** 182-189.

WONG, V. W., CHAN, R. S., WONG, G. L., CHEUNG, B. H., CHU, W. C., YEUNG, D. K., CHIM, A. M., LAI, J. W., LI, L. S., SEA, M. M., CHAN, F. K., SUNG, J. J., WOO, J. & CHAN, H. L. 2013. Community-based lifestyle modification programme for non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *J Hepatol,* 59**,** 536-42.

WONG, V. W., VERGNIOL, J., WONG, G. L., FOUCHER, J., CHAN, H. L., LE BAIL, B., CHOI, P. C., KOWO, M., CHAN, A. W., MERROUCHE, W., SUNG, J. J. & DE LEDINGHEN, V. 2010. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 51**,** 454-62.

WU, T., GAO, X., CHEN, M. & VAN DAM, R. M. 2009. Long-term effectiveness of diet-plus-exercise interventions vs. diet-only interventions for weight loss: a meta-analysis. *Obes Rev,* 10**,** 313-23.

XU, R., TAO, A., ZHANG, S., DENG, Y. & CHEN, G. 2015. Association between vitamin E and non-alcoholic steatohepatitis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med,* 8**,** 3924-34.

YAMAMOTO, M., IWASA, M., IWATA, K., KAITO, M., SUGIMOTO, R., URAWA, N., MIFUJI, R., KONISHI, M., KOBAYASHI, Y. & ADACHI, Y. 2007. Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol,* 22**,** 498-503.

YAMAOKA, K. & TANGO, T. 2012. Effects of lifestyle modification on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine,* 10**,** 1-10.

YANG, C. Q., SHU, L., WANG, S., WANG, J. J., ZHOU, Y., XUAN, Y. J. & WANG, S. F. 2015. Dietary Patterns Modulate the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Chinese Adults. *Nutrients,* 7**,** 4778-91.

YATSUJI, S., HASHIMOTO, E., TOBARI, M., TOKUSHIGE, K. & SHIRATORI, K. 2007. Influence of age and gender in Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology Research,* 37**,** 1034-1043.

YESIL, A. & YILMAZ, Y. 2013. Review article: coffee consumption, the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther,* 38**,** 1038-44.

YILMAZ, Y., YONAL, O., KURT, R. & AVSAR, E. 2010. Cigarette smoking is not associated with specific histological features or severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 52**,** 391-391.

YOUNOSSI, Z. M., KOENIG, A. B., ABDELATIF, D., FAZEL, Y., HENRY, L. & WYMER, M. 2016. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology,* 64**,** 73-84.

YOUNOSSI, Z. M., STEPANOVA, M., NEGRO, F., HALLAJI, S., YOUNOSSI, Y., LAM, B. & SRISHORD, M. 2012. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore),* 91**,** 319-27.

ZEIN, C. O., UNALP, A., COLVIN, R., LIU, Y.-C. & MCCULLOUGH, A. J. 2011a. Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology,* 54**,** 753-759.

ZEIN, C. O., YERIAN, L. M., GOGATE, P., LOPEZ, R., KIRWAN, J. P., FELDSTEIN, A. E. & MCCULLOUGH, A. J. 2011b. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology,* 54**,** 1610-9.

ZELBER-SAGI, S., BUCH, A., YESHUA, H., VAISMAN, N., WEBB, M., HARARI, G., KIS, O., FLISS-ISAKOV, N., IZKHAKOV, E., HALPERN, Z., SANTO, E., OREN, R. & SHIBOLET, O. 2014. Effect of resistance training on non-alcoholic fatty-liver disease a randomized-clinical trial. *World J Gastroenterol,* 20**,** 4382-92.

ZELBER-SAGI, S., GODOS, J. & SALOMONE, F. 2016. Lifestyle changes for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a review of observational studies and intervention trials. *Therapeutic Advances in Gastroenterology,* 9**,** 392-407.

ZELBER-SAGI, S., KESSLER, A., BRAZOWSKY, E., WEBB, M., LURIE, Y., SANTO, M., LESHNO, M., BLENDIS, L., HALPERN, Z. & OREN, R. 2006. A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 4**,** 639-44.

ZELBER-SAGI, S., NITZAN-KALUSKI, D., GOLDSMITH, R., WEBB, M., BLENDIS, L., HALPERN, Z. & OREN, R. 2007. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol,* 47**,** 711-7.

ZELBER-SAGI, S., NITZAN-KALUSKI, D., GOLDSMITH, R., WEBB, M., ZVIBEL, I., GOLDINER, I., BLENDIS, L., HALPERN, Z. & OREN, R. 2008. Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology,* 48**,** 1791-8.

ZELBER-SAGI, S., RATZIU, V. & OREN, R. 2011. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol,* 17**,** 3377-89.

ZENG, T., ZHANG, C. L., ZHAO, X. L. & XIE, K. Q. 2014. Pentoxifylline for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized double-blind, placebo-controlled studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 26**,** 646-53.

ZHANG, H. J., HE, J., PAN, L. L., MA, Z. M., HAN, C. K., CHEN, C. S., CHEN, Z., HAN, H. W., CHEN, S., SUN, Q., ZHANG, J. F., LI, Z. B., YANG, S. Y., LI, X. J. & LI, X. Y. 2016. Effects of Moderate and Vigorous Exercise on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med,* 176**,** 1074-82.

ZIMBERG, I. Z., DAMASO, A., DEL RE, M., CARNEIRO, A. M., DE SA SOUZA, H., DE LIRA, F. S., TUFIK, S. & DE MELLO, M. T. 2012. Short sleep duration and obesity: mechanisms and future perspectives. *Cell Biochem Funct,* 30**,** 524-9.

Μ. ΓΕΩΡΓΟΥΛΗΣ, Χ. Ν. ΚΑΤΣΑΓΩΝΗ., Ν. ΤΙΛΕΛΗ, Μ.Δ. ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ 2012. Η επίδραση της διατροφής στην παρουσία και διαχείριση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. *Ελληνική Επιθεώρηση Διαιτολογίας-Διατροφής,* 3**,** 19-33.

WHO 1997. World Medical Association declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *JAMA,* 277**,** 925-6.

Υπουργείο Υγείας 1999. Διατροφικές οδηγίες για ενήλικες στην Ελλάδα. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 16**,** 615-625.

Παράρτημα Α:

Δημοσιευμένες εργασίες

METABOLIC SYNDROME AND RELATED DISORDERS
Volume XX, Number XX, 2016
© Mary Ann Liebert, Inc.
Pp. 1–8
DOI: 10.1089/met.2016.0105

ORIGINAL ARTICLE

Associations Between Lifestyle Characteristics and the Presence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case–Control Study

Christina N. Katsagoni, MSc,[1] Michael Georgoulis, MSc,[1] George V. Papatheodoridis, MD, PhD,[2] Elisabeth Fragopoulou, PhD,[1] Panagiota Ioannidou, MD, PhD,[2] Mariviki Papageorgiou, MD, PhD,[2] Alexandra Alexopoulou, MD, PhD,[3] Nikolaos Papadopoulos, MD, PhD,[3] Melanie Deutsch, MD, PhD,[3] and Meropi D. Kontogianni, PhD[1]

Abstract

Background: Dietary and physical activity (PA) habits have been suggested as important factors for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Published data are mainly focused on the effect of either diet or exercise, whereas data on other aspects like sleep remain sparse. The aim of this study was to explore potential associations between dietary intake, PA, and sleeping habits, and the presence of NAFLD.
Methods: One hundred patients with ultrasound-proven NAFLD and 55 healthy controls matched for age, sex, and body mass index were included. Dietary habits were assessed through a semiquantitative validated food frequency questionnaire. PA level was assessed with a validated questionnaire. Total night sleep hours and duration of midday rest were also recorded. Optimal sleep duration was defined as sleep hours ≥7 and ≤9 hr/day.
Results: Patients compared to controls consumed less vegetables and nuts, more sweets, drank less coffee and alcohol (all $P<0.05$), and exhibited a lower level of PA ($P=0.006$). PA level [odds ratio (OR) per 100 metabolic equivalent of task-min/day = 0.74, 95% confidence interval (CI) 0.61–0.89, $P=0.002$] was associated with lower probability of having NAFLD, whereas sweets consumption (OR = 2.13, 95% CI 1.22–3.71, $P=0.008$) was associated with increased probability, after adjusting for several confounders, including body weight status. Optimal sleep duration was marginally and inversely associated with NAFLD presence (OR = 0.38, 95% CI 0.14–1.01, $P=0.05$).
Conclusion: Higher PA level and optimal sleep duration are associated with lower likelihood, whereas sweets consumption is associated with higher likelihood of having NAFLD. These associations are independent of body weight status and energy intake.

Keywords: NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease, physical activity, optimal sleep hours, lifestyle, diet

Background

NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD) is a pathological condition of liver fat accumulation, not caused by alcohol abuse or other steatosis causes, ranging from simple steatosis to necroinflammatory steatohepatitis (NASH).[1,2] NAFLD represents the most common cause for chronic liver diseases in Western countries,[3] following the rising obesity prevalence.[4] It is considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome,[5] having insulin resistance as the key underlying pathophysiological mechanism. NAFLD patients are at increased risk for cardiovascular diseases[6] and type 2 diabetes mellitus,[7] appearing to have higher mortality from both liver- and nonliver-related causes, compared to the general population.[8]

[1]Department of Nutrition and Dietetics, School of Health Sciences and Education, Harokopio University, Athens, Greece.
[2]Department of Gastroenterology, Medical School of National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital of Athens, Athens, Greece.
[3]Second Department of Internal Medicine, Medical School of National and Kapodistrian University of Athens, Hippokration General Hospital of Athens, Athens, Greece.

Positive energy balance, unhealthy food choices, and physical inactivity have been linked to increased NAFLD risk.[9] Regarding food groups, high consumption of sugar-sweetened beverages and soft drinks combined with high energy intake,[10,11] refined carbohydrates,[12] as well as red and processed meats[13,14] consumption have been associated with increased NAFLD likelihood. On the contrary, high consumption of whole-grain foods,[12] fruits, vegetables, and coffee drinking[15] have been linked to favorable effects on NAFLD. Possible underlying mechanisms seem to be the effect of foods on insulin resistance, inflammation, lipid profile, and weight control.[16]

In addition, NAFLD patients seem to spend more time on sedentary activities[17,18] and have lower physical activity (PA) levels compared to healthy controls.[19] Higher PA level has been associated with lower serum triglycerides (TG), weight control, and higher high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in healthy subjects, making them important factors mediating NAFLD development.[15] Recently, sleep disturbances have been linked to increased obesity,[20] insulin resistance,[21] and cardiometabolic risk,[22] whereas studies exploring the effect of sleep habits on NALFD risk are limited.[23–25]

Published data focus on associations between one aspect of lifestyle, for example, dietary intake or PA, and NAFLD. Other aspects of lifestyle such as sleep remain fragmentary. Thus, the aim of this study was to explore potential associations between lifestyle characteristics, namely dietary intake, PA, and sleep habits, and the presence of NAFLD, by considering also body weight status, an important NAFLD risk factor.

Materials and Methods

One hundred consecutive adult patients (18–67 years old) with newly diagnosed NAFLD (within 6 months), who visited two outpatient liver clinics (Department of Gastroenterology, Athens University Medical School, Laiko Hospital of Athens and Second Department of Internal Medicine, Athens University Medical School, Hippokration Hospital of Athens) between May 2013 and December 2015, and fulfilled the inclusion criteria were included in this analysis.

NAFLD diagnosis was based on the following criteria: elevated alanine aminotransferase (ALT) and/or gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) levels, evidence of hepatic steatosis on ultrasound and/or compatible liver histology, and no other causes of liver injury or steatosis. Patients were excluded in case of positive serological markers for hepatitis B (HBsAg), hepatitis C (anti-HCV), and human immunodeficiency virus (anti-HIV), weekly alcohol consumption more than 210 g for men or 140 g for women or use of potentially hepatotoxic agents, evidence of metabolic or autoimmune liver disease, and presence of known systemic disease with potential liver involvement. Moreover, patients with BMI > 40 kg/m^2 were also excluded. Equally, patients who had changed their eating habits since NAFLD diagnosis, were on a weight loss diet, and had diabetes mellitus or other diagnosed malignancy, were not enrolled.

Information regarding HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, anti-HCV, anti-HIV, and liver autoantibodies (anti-nuclear, anti-smooth muscles, anti-microsomal, anti-mitochondrial) was retrieved from medical records and recent laboratory data. The history of alcohol use was taken and confirmed by patients' relatives or friends. Blood pressure was measured in a sitting position, and hypertension was defined as systolic blood pressure ≥140 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥90 mmHg, or antihypertensive medication treatment. After baseline evaluation, NAFLD patients were encouraged to participate in an ongoing randomized clinical trial, aiming at evaluating the potential benefit of interventions based either on the Mediterranean diet or Mediterranean lifestyle compared to usual care (ClinicalTrials.gov ID: NCT01894438).

A group of 55 control subjects was also enrolled. Controls were subjects who visited other outpatient clinics of the same hospitals for routine examinations, or hospital or university employees, during the aforementioned study period. Controls had normal glucose metabolism and liver enzymes, no evidence of hepatic steatosis at ultrasonography, and stable weight, dietary, and exercise habits during the last year. The study aimed at enrolling a control group, not differing from the patients' in age (±3 years), sex distribution, and body mass index (BMI) (±1 kg/m^2). Matching controls for BMI were considered very important because body fat has been proven as an important NAFLD risk factor, however, finding obese people without steatosis was really hard and that is why a 1:1 matching was not accomplished.

The study was approved by the Ethics Committees of Laiko General Hospital of Athens and Harokopio University, and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.[26]

Lifestyle assessment

Participants' (both cases and controls) habitual dietary intake over the last 6 months was assessed through a semi-quantitative 69-item food frequency questionnaire (FFQ) validated for the Greek population.[27] Consumption of main food groups, namely total, low, and full fat dairy products; total, refined, and nonrefined cereals; red meat, poultry, fish, legumes, vegetables, fruits, sweets, soft drinks, and nuts were calculated in servings per day. Servings were determined based on the dietary guidelines for Greek adults published in 1999.[28] Alcohol consumption was expressed in grams of ethanol/day, coffee intake in times consuming coffee per day, sweets consumption in servings per day (1 serving = 1 scoop/piece ice cream, 60 g chocolate, 3–4 pieces of biscuits, etc.), and soft drinks as servings per day [(1 serving = 1 can (330 mL)]. Dietary intake was also assessed through two nonconsecutive 24-hr dietary recalls, which were analyzed in terms of energy, macronutrient, and micronutrient intakes, using Nutritionist Pro version 2.2 (Axxya Systems).

The PA level was assessed through a validated for the Greek population questionnaire [Athens Physical Activity Questionnaire—APAQ[29]]. Total volume of PA was determined by calculating total metabolic equivalent of task (MET) per minutes per day (MET-min/day). MET-min/day was also calculated for moderate intensity PA, such as playing tennis or doing yoga. Duration of leisure time sedentary activities, like TV viewing, computer games, and reading was also estimated.

Habitual total night sleep hours, as well as duration of midday naps (siesta) or other ways of midday resting (*e.g.*, watching television or lying on the couch), were recorded both for weekdays and weekends. Short siesta was defined as siesta or midday resting ≤1 hr/day and optimal sleep duration was defined as sleep hours ≥7 and ≤9 hr/day.[30]

Information regarding smoking habits and routine medication use was also recorded for both patients and healthy controls.

Anthropometric assessment

Body weight was measured with digital scale (Seca Robusta 813, Hamburg, Germany) to the nearest 100 g and height with stadiometer to the nearest 0.5 cm. BMI was calculated as weight (kg) divided by height squared (m^2). Waist circumference (WC)[31] was tape measured to the nearest 0.1 cm. Increased WC was defined as >102 cm for men and >88 cm for women.

Biochemical and inflammatory markers

Blood collection was performed in both patients and controls after a 12-hr fasting period. Serum and plasma samples were immediately frozen at −80°C. Glucose, total cholesterol, and HDL-C were measured using enzymatic colorimetric method (Cobas® 8000 analyzer; Roche), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula.[32] TG were measured with chromatometric enzymatic method (Cobas 8000 analyzer; Roche) and insulin with chemiluminescence (E170 modular analyzer; Roche). The Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula by Matthews et al.[33] Metabolic syndrome presence was defined according to the criteria published by Alberti et al.[34]

ALT, aspartate aminotransferase (AST), and GGT were measured with chromatometric enzymatic method (Cobas 8000 analyzer; Roche). High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was measured using a nephelometric assay (BN II nephelometer; Siemens). Tumor necrosis factor-a (TNF-a) and adiponectin were measured by sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Quantikine/immunoassay kit; R&D Systems, Minneapolis). The intra-assay coefficient of variation was <7% for TNF-a and <5% for adiponectin. The interassay coefficient of variation was <8% for both TNF-a and adiponectin measurements.

Shear wave elastography

Eighty five of the 100 patients had reliable liver stiffness measurements (LSM) (in kPa) by two-dimension liver shear wave elastography, performed using the Aixplorer® MultiWave™ ultrasound system (Supersonic Imagine S.A., Aix-en-Provence, France) with the single crystal curved probe at frequencies 1–6 MHz. The examination was considered reliable, if at least five valid measurements were obtained based on good sonographic signal combined with <25% ratio of SD to the mean LSM (mean value of all valid measurements per examination).

NAFLD patients were divided according to elastography results to those of LSM ≤6.6 and LSM >6.6, suggesting the presence of no fibrosis (F≥2) or significant fibrosis (F≥3 or F≥4), based on the cutoff values published by Abenavoli and Beaugrand.[35]

Liver histology

Liver biopsies were available only for 32 patients. Liver specimens were evaluated by a single hepatopathologist, who was unaware of the clinical data. A liver biopsy was considered adequate, if at least six portal tracts were identified and the specimen length was ≥1.5 cm. NASH diagnosis was based on the criteria of Brunt et al.[36] modified by Kleiner et al.[37]

Statistical analysis

Statistical power analysis for defining the adequate sample size had revealed that, to test for an effect size equal to odds ratio (OR) = 0.5 at significance level of 5% and achieving power higher than 80%, 55 subjects in each treatment group were needed [calculations performed in STATA software (Texas)].

Continuous variables are presented as mean value ± standard deviation and categorical variables as absolute frequencies. The normality of the data was assessed using Shapiro–Wilk test and graphically through histograms. Chi-squared test, two-sample independent *t* test, or Mann–Whitney *U* test was used, where appropriate, to test differences between patients and controls. Logistic regression analysis was used to estimate the association between lifestyle parameters and the likelihood of NAFLD presence and liver stiffness severity, after controlling for multiple confounders. All reported *P*-values were based on two-sided tests and compared to a significance level of 5%. Statistical Package for Social Sciences software (version 21.0; SPSS 2012, Chicago) was used for all statistical analyses.

Results

Descriptive characteristics of both patients and controls are presented in Table 1. Mean age of both patients and controls was 45 years, whereas the majority of the participants were males and overweight (Table 1). Although the two groups did not differ in age, sex, and BMI, patients exhibited higher WC, higher systolic and diastolic blood pressure, higher HOMA-IR, TGs, TNF-a, and hsCRP levels and lower adiponectin and HDL-C levels (all $P<0.05$). As expected, liver enzymes, namely ALT, AST, and GGT, were higher in patients (all $P<0.05$). Liver biopsies were available only for 32 patients. From them, 10 were diagnosed with simple fatty liver, 21 with NASH, and 1 with cirrhosis. Patients with NASH compared to patients with simple fatty liver had higher BMI ($29.11\pm3.02\,kg/m^2$ vs. $27.05\pm2.73\,kg/m^2$) and waist circumference (102.6 ± 10.0 cm vs. 96.2 ± 7.8 cm), and higher levels of insulin ($15.33\pm5.15\,\mu IU/mL$ vs. $10.0\pm5.34\,\mu IU/mL$) and HOMA-IR (3.51 ± 1.33 vs. 2.19 ± 1.25) (all $P<0.05$).

Comparisons of lifestyle characteristics between patients and controls are presented in Table 2. Patients compared to controls consumed less vegetables and nuts, more sweets, and drank less coffee and alcohol (all $P<0.05$). According to total MET-min/day, patients exhibited a lower level of total PA ($P=0.006$) as well as of moderate intensity PA ($P=0.004$) compared to controls. Both patients and controls did not report vigorous-intensity physical activities. Moreover, patients reported a higher duration of sedentary activities compared to controls ($P=0.044$). No differences were observed in sleeping habits, although patients tended to sleep less compared to controls ($P=0.12$). Regarding smoking habits, 43.6% of controls were current smokers compared to 27% of NAFLD patients ($P=0.049$), whereas percentage of former smokers in the patients group (26%)

TABLE 1. DESCRIPTIVE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND HEALTHY CONTROLS

Variables	*NAFLD patients (n = 100)*	*Controls (n = 55)*	P[a]
Age (years)	45.51 ± 11.6	44.82 ± 12.06	0.73
Gender, males, *n* (%)	72 (72.0)	34 (62.0)	0.21
Weight (kg)	84.01 ± 12.08	81.85 ± 12.25	0.29
Body mass index (kg/m^2)	28.32 ± 2.6	27.89 ± 3.51	0.11
Waist circumference (cm)			
Males	101 ± 8	97 ± 8	**0.02**
Females	96 ± 8	96 ± 11	0.89
Increased waist circumference,[b] *n* (%)	56 (56.0)	22 (40.0)	**0.04**
Smoking habits (yes), *n* (%)	27 (27)	24 (43.6)	**0.05**
Former smokers, *n* (%)	26 (26)	12 (21.8)	0.15
Education level			
≤Secondary school level	17 (17)	7 (12.7)	0.57
Primary and technical school level	38 (38)	25 (45.5)	
≥University level	45 (45)	23 (41.8)	
Clinical and biochemical characteristics			
Hypertension, *n* (%)	31 (31.0)	5 (9.1)	**0.002**
Metabolic syndrome, *n* (%)	33 (33.0)	5 (9.1)	**0.001**
Antihypertensive drugs (yes), *n* (%)	25 (26.9)	6 (10.9)	**0.02**
Hypolipidemic drugs (yes), *n* (%)	12 (13.3)	5 (9.3)	0.59
Total cholesterol (mmol/L)	5.38 ± 1.06	5.32 ± 1.15	0.73
HDL-C (mmol/L)	0.98 ± 0.47	1.29 ± 0.43	**<0.001**
LDL-C (mmol/L)	3.73 ± 1.03	3.49 ± 0.95	0.25
Triglycerides (mmol/L)	1.43 ± 0.63	1.15 ± 0.67	**0.001**
HOMA-IR	2.90 ± 1.84	1.92 ± 1.55	**<0.001**
ALT (IU/L)	69.25 ± 45.96	15.27 ± 5.78	**<0.001**
AST (IU/L)	37.79 ± 19.38	24.79 ± 6.93	**<0.001**
GGT (IU/L)	105.23 ± 113.13	20.24 ± 12.20	**<0.001**
Adiponectin (μg/mL)	6.16 ± 4.73	9.87 ± 7.83	**0.001**
TNF-a (pg/mL)	4.21 ± 2.98	2.35 ± 3.52	**<0.001**
hsCRP (mg/L)	1.95 ± 2.63	1.24 ± 1.14	**0.02**
Liver stiffness (kPa) (*n* = 85)	7.2 ± 4.7	—	—

Data are presented as mean ± SD or otherwise mentioned.

[a]*P*-value as derived by chi-square test for nominal variables, two-sample independent *t*-test for normal distribution variables, or Mann–Whitney *U* test for nonparametric variables. Figures in *bold* are statistically significant.

[b]>102 cm for males and >88 cm for females.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; TNF-a, tumor necrosis factor-a.

tended to be higher than in controls (21.8%) ($P = 0.15$). Regarding lifestyle differences between patients with simple fatty liver and NASH, patients with NASH tended to watch television for more hours per day (3.8 ± 1.9 hr vs. 2.6 ± 1.5 hr, $P = 0.09$) than patients with simple fatty liver.

The impact of lifestyle habits on NAFLD presence was further explored in logistic regression analyses models. From the lifestyle variables examined, PA level, optimal sleep duration, as well as consumption of nuts and coffee intake were associated with a lower NAFLD likelihood, whereas sweets consumption was associated with an increased likelihood, after adjustment for age and sex confounders (Table 3, model 1). When adjustment was also made for waist circumference and variables related to the pathophysiologic mechanisms of insulin resistance and inflammation (*i.e.*, HOMA-IR, adiponectin, and TNF-a), the variables PA and sweets consumption maintained a significant association with NAFLD presence (all $P < 0.05$). Moreover, optimal sleep duration was marginally associated with less likelihood of having NAFLD ($P = 0.05$), however, the association of coffee intake was weakened ($P = 0.07$) (Table 3, model 3). When energy intake was also included in the independent variables, the results remained unchanged (data not shown).

Lifestyle habits were also explored in relation to liver stiffness values. Mean LSM in 85 patients who underwent elastography was 7.2 ± 4.7 kPa. NAFLD patients were divided according to elastography results, to those with LSM ≤6.6 ($n = 47$) and LSM >6.6 kPa ($n = 38$), based on current published cutoffs, and differences in lifestyle parameters were explored. Among dietary, sleep, and PA variables examined, only percentage of patients with optimal sleep duration differed between the two groups (76.6% in those with low stiffness vs. 55.3% in those with high stiffness, $P = 0.037$). Results from logistic regression analysis showed that patients with optimal sleep duration were less likely to have high liver stiffness compared to those sleeping less or more than the optimal hours [OR = 0.25 95% confidence interval (CI) 0.09–0.74, $P = 0.012$], after adjustment for age, sex, BMI, HOMA-IR, sweets consumption, and MET-min/day. Due to the small sample and the unbalanced distribution of NAFLD stages, no further exploration of the study results, according to the stage of the disease, was possible.

TABLE 2. DIFFERENCES IN LIFESTYLE CHARACTERISTICS BETWEEN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PATIENTS AND HEALTHY CONTROLS

Variables	*NAFLD patients (n=100)*	*Control (n=55)*	P[a]
Physical activity			
Total MET-min/day	2045±286	2165±259	**0.006**
MET-min/day of moderate intensity physical activity	229±273	330±269	**0.004**
Sedentary activities/day (hr)	3.3±1.8	2.6±1.4	**0.044**
Sleep habits			
Total sleep hours	7.3±1.4	7.8±1.9	0.12
Short siesta (yes),[b] *n* (%)	79 (79.0)	42 (76.4)	0.69
Optimal sleep duration,[c] *n* (%)	69 (69.0)	32 (58.0)	0.21
Food groups and beverages intake			
Full-fat dairy (serv./day)	2.11±2.20	2.95±2.62	**0.03**
Low-fat dairy (serv./day)	1.28±1.50	0.90±1.02	0.13
Refined cereals (serv./day)	5.85±4.32	5.84±3.38	0.39
Nonrefined cereals (serv./day)	1.01±1.37	1.15±1.35	0.24
Red meat (serv./day)	1.77±1.19	1.61±1.54	0.14
Poultry (serv./day)	0.61±0.44	0.57±0.57	0.55
Fish (serv./day)	0.70±0.58	0.66±0.55	0.89
Legumes (serv./day)	0.50±0.36	0.40±0.31	**0.05**
Vegetables (serv./day)	3.06±1.96	3.72±1.81	**0.006**
Fruits (serv./day)	1.98±1.76	2.25±2.20	0.67
Sweets (serv./day)	1.51±1.33	0.90±0.79	**0.003**
Soft drinks (serv./day)	0.15±0.29	0.12±0.27	0.25
Nuts (serv./day)	0.36±0.48	0.93±1.60	**0.03**
Alcohol consumption (g ethanol/day)	7.47±11.10	13.23±17.75	**0.01**
Coffee consumption (times/day)	1.62±1.09	2.17±1.59	**0.01**

Data are presented as mean±SD or otherwise mentioned.
[a]*P*-value as derived by chi-square test for nominal variables, two-sample independent *t* test for normal distribution variables, or Mann–Whitney *U* test for nonparametric variables. $P \leq 0.05$.
[b]≤1 hr/day.
[c]≥7 and ≤9 hr/day.
MET-min/day, metabolic equivalent of task per minutes per day; serv./day, servings per day according to dietary guidelines for Greek adults.[28]

Discussion

This study aimed at exploring potential associations between lifestyle characteristics, namely PA, sleep habits, and dietary intake, and NAFLD presence in a case–control analysis. Based on the results, PA was associated with a lower likelihood of having NAFLD, whereas sweets consumption was associated with an increased likelihood. These associations remained unchanged even after taking into account important confounders such as waist circumference and energy intake. Optimal sleep duration (*i.e.*, ≥7 and ≤9 hr per day) was marginally and inversely associated with NAFLD presence in the multivariate models, whereas the inverse association between coffee intake and the presence of NAFLD, initially observed, was attenuated after adjustment for inflammatory indices, namely adiponectin and TNF-a.

In this study, patients exhibited a lower level of total PA as well as of moderate-intensity PA, and reported a higher duration of sedentary activities than controls. Furthermore, a 100 MET-min/day increase in PA, corresponding, for example, to 20 min walking per day, was associated with 26% lower likelihood of having NAFLD. Several studies have indicated the protective effect of physical exercise interventions in the treatment of NAFLD in terms of intrahepatic lipid content and aminotransferase blood levels,[38] some of them showing protection independent of the presence of obesity.[39] Moreover, recent studies have shown that exercise exerts its beneficial effects on improving intrahepatic lipid profile even without the need for weight reduction.[40–42] The underlying mechanism for the direct hepatic effect of exercise on liver fat and liver enzymes is not fully understood. Apart from well-known improvements in general measures of glucose tolerance and insulin sensitivity,[43,44] experiments in rats show that exercise induces several hepatic metabolic adaptations.[45] Specifically, regular PA decreases serum TG and free fatty acids by increasing mitochondrial oxidation of lipid and downregulating lipogenic proteins such as fatty acid synthase (Fas) and acecyl-Coa carboxylase (Acc).[45]

In this study, although patients and controls did not actually differ regarding sleeping habits, patients tented to sleep less compared to controls. Furthermore, optimal sleep duration was associated with less likelihood of having high values of liver stiffness (*i.e.*, >6.6 kPa). Therefore, we

TABLE 3. LOGISTIC REGRESSION ANALYSIS MODELS, EXPLORING THE ASSOCIATION BETWEEN LIFESTYLE CHARACTERISTICS AND THE LIKELIHOOD OF THE PRESENCE OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (*N*=100 CASES AND 55 CONTROLS)

	Model 1[a]			*Model 2*[b]			*Model 3*[c]		
	OR	*95% CI*	P	*OR*	*95% CI*	P	*OR*	*95% CI*	P
Physical activity (per 100 MET-min)	0.78	0.67–0.91	**0.001**	0.77	0.66–0.91	**0.002**	0.74	0.61–0.89	**0.002**
Optimal sleep duration[d]	0.50	0.15–0.97	**0.04**	0.52	0.22–1.24	0.14	0.38	0.14–1.01	**0.05**
Nuts (servings/day)	0.56	0.33–0.94	**0.03**	0.61	0.38–0.98	**0.04**	0.72	0.41–1.25	0.24
Vegetables (servings/day)	0.94	0.77–1.15	0.57	0.95	0.77–1.18	0.64	1.01	0.79–1.29	0.96
Sweets (servings/day)	2.13	1.30–3.48	**0.003**	2.24	1.33–3.78	**0.003**	2.13	1.22–3.71	**0.008**
Coffee (times/day)	0.67	0.48–0.93	**0.01**	0.68	0.49–0.94	**0.02**	0.72	0.49–1.04	0.07

Figures in *bold* are statistically significant.
[a]Model 1: adjusted for age, sex.
[b]Model 2: adjusted for age, sex, waist circumference, HOMA-IR.
[c]Model 3: adjusted for age, sex, waist circumference, HOMA-IR, adiponectin, and TNF-a.
[d]Optimal sleep duration: ≥7 and ≤9 hr sleep per day.
CI, confidence interval; OR, odds ratio.

decided to further explore the association of optimal sleep duration with the presence of NAFLD through multivariate analyses. Optimal sleep duration was not significantly associated with the likelihood of having NAFLD when HOMA-IR was included in the multivariate model, but it was marginally associated with less likelihood of having NAFLD independent of weight status when inflammation markers (namely adiponectin and TNF-a) were also included. Evidence regarding the association between sleep habits and the development of NAFLD is sparse. In the study of Kim et al.,[25] short sleep duration (≤5 hr vs. >7 hr) and poor sleep quality (Pittsburgh Sleep Quality Index score >5) were associated with an increased risk of NAFLD, although these associations seemed to be mediated by weight status in men, but not in women. Similarly, in the study of Imaizumi et al.,[23] short sleep duration (≤6 hr vs. 6 to ≤7 hr) was linked to an increased risk of NAFLD only in Japanese women and this association was lost after BMI adjustment. Moreover, in the study of Bernsmeier et al.[24] daytime sleepiness was further associated with insulin resistance and histologic features of NAFLD.

Several studies[46,47] have shown that sleep duration might be an important risk factor for obesity and other health-related problems, such as metabolic syndrome, cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and insulin resistance,[48] and both short (<7 hr) and long (>9 hr) sleep durations are associated with increased risk of morbidity and mortality,[49] following a U-shaped association. It has been suggested that reduced sleep not only increases food intake by altering specific hormone secretions affecting appetite, that is, leptin and ghrelin,[50] but also increases preference for high carbohydrate content, energy-rich foods, including sweets, salty snacks, and starchy foods.[51] Sleep deprivation seems to share common metabolic pathways with stress system by activating hypothalamic-pituitary-adrenal axis.[52] Moreover, increases in habitual sleep or short sleep durations have been associated with higher levels of inflammation.[53] Thus, according to our results, we speculate that the potential beneficial effect of sleep on the likelihood of having NAFLD may be associated with inflammation status, and future studies are needed to elucidate and confirm our observations.

Regarding dietary factors, sweets consumption showed the strongest and most powerful association with NAFLD presence, from all other foods or food groups explored in this study. This association was also independent of total daily energy intake and BMI. Several studies[54,55] have shown that excess carbohydrate intake, mainly as soft drinks and sugared beverages, and especially rich in fructose or high-fructose corn syrup and sucrose, accompanied with excessive energy intake is associated with higher liver fat, steatosis, and fibrosis.[16] Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia, as well as the sucrose and fructose upregulation of hepatic *de novo* lipogenesis can induce NAFLD.[56] Moreover, while glucose, after its absorption from the gut, is released to peripheral tissues, fructose retains and is metabolized by the liver, where it bypasses the inhibition feedback control point of phosphofructokinase, providing energy and fat, not regulated by insulin.[56,57]

Coffee consumption was associated with a lower likelihood of having NAFLD, an association that might be mediated through suppression of inflammation, as further adjustment for adiponectin and TNF-a weakened this association. In a recent meta-analysis, regular caffeine intake through coffee consumption was associated with reduced hepatic fibrosis in NAFLD patients.[58] Coffee has been found to decrease proinflammatory TNF-a and increase the expression of anti-inflammatory adiponectin in animal models of NASH.[59] Moreover, it is postulated that several antioxidant compounds of coffee might mediate its protective effect against NAFLD by reducing reactive oxygen species concentrations, which can otherwise damage DNA causing liver fibrosis.[60]

Our study has some limitations. Most importantly, its cross-sectional nature does not allow reaching a causal inference or elucidating underlying mechanisms. Given that patients and controls differed in several clinical and biochemical characteristics and although several confounders were carefully selected for the analysis adjustments, the possibility of residual confounding cannot be ruled out. In addition, the study was also vulnerable to recall bias. FFQs, although easy to administer and cost-effective, require recall of food use in the past, consist of a difficult cognitive task for the respondents, do not quantify foods very precisely, and aggregate foods in groups and closed lists limiting the usual diversity of dietary intake.[61]

Moreover, the assesment of NAFLD severity was mostly based on shear-wave elastography instead of liver biopsy, which is the gold standard method.[62] However, because liver biopsy is an invasive procedure carrying potential risks of several complications, the use of noninvasive methods for the assessment of liver stiffness and hence fibrosis has become increasingly popular, particularly after the recent introduction of commercially available devices of liver elastography. In particular, shear-wave elastography provides improved diagnostic accuracy compared to other elastographic methods and restricts several physical limitations, including obesity.[62] Finally, inadequate availability of liver biopsies did not allow further investigation of lifestyle habits and NAFLD stage associations. On the contrary, this is the first study combining assessment of several aspects of lifestyle, namely diet, PA, and sleep habits, while exploring their potential associations with NAFLD presence in adults.

In conclusion, a higher PA level was associated with lower likelihood, whereas sweets consumption with a higher likelihood of having NAFLD, independent of body weight status and energy intake. Optimal sleep duration showed a borderline inverse association with NAFLD presence and an inverse association with liver stiffness in NAFLD patients. Current findings could be further explored and integrated in lifestyle interventions aiming at NAFLD prevention.

Author Disclosure Statement

All authors declare that "no competing financial interests exist." C.N.K. has received a Fellowship of Excellence for Postgraduate Research in Greece-Siemens Program, awarded by the State Scholarships Foundation (IKY). However, the State Scholarships Foundation had no role in the design, analysis, or writing of this article.

References

1. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202–1219.
2. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413–1419.

3. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, et al. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010;53:372–384.
4. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, et al. Non alcoholic fatty liver: Epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials* 2014;9:126–133.
5. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844–1850.
6. Miele L, Targher G. Understanding the association between developing a fatty liver and subsequent cardio-metabolic complications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 9:1243–1245.
7. Kasturiratne A, Weerasinghe S, Dassanayake AS, et al. Influence of non-alcoholic fatty liver disease on the development of diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:142–147.
8. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 2012;61:141–152.
9. EASL–EASD–EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:1388–1402.
10. Madero M, Arriaga JC, Jalal D, et al. The effect of two energy-restricted diets, a low-fructose diet versus a moderate natural fructose diet, on weight loss and metabolic syndrome parameters: A randomized controlled trial. *Metabolism* 2011;60:1551–1559.
11. Chiu S, Sievenpiper JL, de Souza RJ, et al. Effect of fructose on markers of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Eur J Clin Nutr* 2014;68:416–423.
12. Georgoulis M, Kontogianni MD, Tileli N, et al. The impact of cereal grain consumption on the development and severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Nutr* 2014;53:1727–1735.
13. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, et al. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A population based study. *J Hepatol* 2007;47:711–717.
14. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: An overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 7 2011;17:3377–3389.
15. Oliveira CP, de Lima Sanches P, de Abreu-Silva EO, et al. Nutrition and physical activity in nonalcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Res* 2016;2016:4597246.
16. Marchesini G, Petta S, Dalle Grave R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. *Hepatology* 2016;63: 2032–2043.
17. Hallsworth K, Thoma C, Moore S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. *Frontline Gastroenterol* 2015;6:44–51.
18. Ryu S, Chang Y, Jung HS, et al. Relationship of sitting time and physical activity with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;63:1229–1237.
19. Gerber L, Otgonsuren M, Mishra A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: A population-based study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36:772–781.
20. Nielsen LS, Danielsen KV, Sorensen TI. Short sleep duration as a possible cause of obesity: Critical analysis of the epidemiological evidence. *Obesity Rev* 2011;12:78–92.
21. Mesarwi O, Polak J, Jun J, et al. Sleep disorders and the development of insulin resistance and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013;42:617–634.
22. Badran M, Yassin BA, Fox N, et al. Epidemiology of sleep disturbances and cardiovascular consequences. *Can J Cardiol* 2015;31:873–879.
23. Imaizumi H, Takahashi A, Tanji N, et al. The association between sleep duration and non-alcoholic fatty liver disease among Japanese men and women. *Obes Facts* 2015;8: 234–242.
24. Bernsmeier C, Weisskopf DM, Pflueger MO, et al. Sleep disruption and daytime sleepiness correlating with disease severity and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease: A comparison with healthy controls. *PLoS one* 2015;10:e0143293.
25. Kim CW, Yun KE, Jung HS, et al. Sleep duration and quality in relation to non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged workers and their spouses. *J Hepatol* 2013; 59:351–357.
26. World Medical Association declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *JAMA* 1997;277:925–926.
27. Bountziouka V, Bathrellou E, Giotopoulou A, et al. Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: Methodological considerations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:659–667.
28. Ministry of Health & Welfare of Greece. Dietary guidelines for adults in Greece. *Arch Hellenic Med* 1999;16:516–524.
29. Kavouras SA, Maraki MI, Kollia M, et al. Development, reliability and validity of a physical activity questionnaire for estimating energy expenditure in Greek adults. *Science Sports* 2016;31:e47–e53.
30. Mukherjee S, Patel SR, Kales SN, et al. An Official American Thoracic Society Statement: The importance of healthy sleep. Recommendations and future priorities. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:1450–1458.
31. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, et al. European guidelines for obesity management in adults. *Obesity Facts* 2015; 8:402–424.
32. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
33. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419.
34. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120:1640–1645.
35. Abenavoli L, Beaugrand M. Transient elastography in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2012;11: 172–178.
36. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467–2474.
37. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.

38. Orci LA, Gariani K, Oldani G, et al. Exercise-based interventions for nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis and meta-regression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 14:1398–1411.
39. Bae JC, Suh S, Park SE, et al. Regular exercise is associated with a reduction in the risk of NAFLD and decreased liver enzymes in individuals with NAFLD independent of obesity in Korean adults. *PLoS One* 2012;7:e46819.
40. Keating SE, Hackett DA, George J, et al. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012;57:157–166.
41. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* 2011;60:1278–1283.
42. Sullivan S, Kirk EP, Mittendorfer B, et al. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:1738–1745.
43. van der Heijden GJ, Toffolo G, Manesso E, et al. Aerobic exercise increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in sedentary adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4292–4299.
44. Borghouts LB, Keizer HA. Exercise and insulin sensitivity: A review. *Int J Sports Med* 2000;21:1–12.
45. Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Exercise and the regulation of hepatic metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;135:203–225.
46. Ju SY, Choi WS. Sleep duration and metabolic syndrome in adult populations: A meta-analysis of observational studies. *Nutr Diabetes* 2013;3:e65.
47. Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, et al. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J* 2011; 32:1484–1492.
48. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, et al. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2010;33: 414–420.
49. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, et al. Sleep duration and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Sleep* 2010;33:585–592.
50. Copinschi G, Leproult R, Spiegel K. The important role of sleep in metabolism. *Front Horm Res* 2014;42:59–72.
51. Dashti HS, Scheer FA, Jacques PF, et al. Short sleep duration and dietary intake: Epidemiologic evidence, mechanisms, and health implications. *Adv Nutr* 2015; 6:648–659.
52. Hirotsu C, Tufik S, Andersen ML. Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Sci* 2015;8:143–152.
53. Patel SR, Zhu X, Storfer-Isser A, et al. Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep* 2009;32:200–204.
54. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51: 1961–1971.
55. Chung M, Ma J, Patel K, et al. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: A systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2014;100:833–849.
56. Moore JB, Gunn PJ, Fielding BA. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 2014;6:5679–5703.
57. Griffin BA. Relevance of liver fat to the impact of dietary extrinsic sugars on lipid metabolism. *Proc Nutr Soc* 2015;74:208–214.
58. Shen H, Rodriguez AC, Shiani A, et al. Association between caffeine consumption and nonalcoholic fatty liver disease: A systemic review and meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol* 2016;9:113–120.
59. Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology* 2010;52:1652–1661.
60. Yesil A, Yilmaz Y. Review article: Coffee consumption, the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:1038–1044.
61. EFSA. General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA J* 2009;7:1435–1451.
62. Papagianni M, Sofogianni A, Tziomalos K. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015;7:638–648.

Address correspondence to:
Meropi Kontogianni, PhD
Department of Nutrition and Dietetics
School of Health Sciences and Education
Harokopio University
El. Venizelou 70
17671 Kallithea
Athens
Greece

E-mail: mkont@hua.gr



Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, e-First Article

A "healthy diet-optimal sleep" lifestyle pattern is inversely associated with liver stiffness and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

Miss Christina N. Katsagoni, Prof. George V. Papatheodoridis, Dr. Maria-Vasiliki Papageorgiou, Dr. Panagiota Ioannidou, Dr. Melanie Deutsch, Dr. Alexandra Alexopoulou, Dr. Nikolaos Papadopoulos, Dr. Elisabeth Fragopoulou, Dr. Meropi D. Kontogianni

(doi: 10.1139/apnm-2016-0492)

NRC Research Press

ARTICLE

A "healthy diet–optimal sleep" lifestyle pattern is inversely associated with liver stiffness and insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease

Christina N. Katsagoni, George V. Papatheodoridis, Maria-Vasiliki Papageorgiou, Panagiota Ioannidou, Melanie Deutsch, Alexandra Alexopoulou, Nikolaos Papadopoulos, Elisabeth Fragopoulou, and Meropi D. Kontogianni

Abstract: Several lifestyle habits have been described as risk factors for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Given that both healthy and unhealthy habits tend to cluster, the aim of this study was to identify lifestyle patterns and explore their potential associations with clinical characteristics of individuals with NAFLD. One hundred and thirty-six consecutive patients with ultrasound-proven NAFLD were included. Diet and physical activity level were assessed through appropriate questionnaires. Habitual night sleep hours and duration of midday naps were recorded. Optimal sleep duration was defined as sleep hours ≥ 7 and ≤ 9 h/day. Lifestyle patterns were identified using principal component analysis. Eight components were derived explaining 67% of total variation of lifestyle characteristics. Lifestyle pattern 3, namely high consumption of low-fat dairy products, vegetables, fish, and optimal sleep duration was negatively associated with insulin resistance ($\beta = -1.66$, $P = 0.008$) and liver stiffness ($\beta = -1.62$, $P = 0.05$) after controlling for age, sex, body mass index, energy intake, smoking habits, adiponectin, and tumor necrosis factor-α. Lifestyle pattern 1, namely high consumption of full-fat dairy products, refined cereals, potatoes, red meat, and high television viewing time was positively associated with insulin resistance ($\beta = 1.66$, $P = 0.005$), although this association was weakened after adjusting for adiponectin and tumor necrosis factor-α. A "healthy diet–optimal sleep" lifestyle pattern was beneficially associated with insulin resistance and liver stiffness in NAFLD patients independent of body weight status and energy intake.

Key words: NAFLD, insulin resistance, lifestyle pattern, sleep, diet.

Résumé : De nombreuses habitudes de vie seraient considérées comme des facteurs de risque de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Étant donné que les saines et malsaines habitudes de vie tendent à former des groupes distincts, cette étude a pour objectif d'identifier les modes de vie et d'examiner leurs associations potentielles avec des caractéristiques cliniques d'individus présentant une NAFLD. L'étude comprend 136 patients consécutifs présentant une NAFLD, ultrasonographie à l'appui. On évalue le régime alimentaire et le degré d'activité physique par des questionnaires appropriés. On note aussi le nombre d'heures habituelles de sommeil et la durée des siestes durant la journée. On définit la durée optimale de sommeil comme suit : ≥ 7 et ≤ 9 h/jour. On utilise l'analyse en composantes principales pour la détermination des modes de vie. L'analyse révèle 8 composantes qui expliquent 67 % de la variation totale des caractéristiques des modes de vie. Le mode de vie 3 (consommation élevée de produits laitiers faibles en gras, légumes, poisson et durée optimale de sommeil) est associé négativement à l'insulinorésistance ($\beta = -1{,}66$, $P = 0{,}008$) et à la dureté du foie ($\beta = -1{,}62$, $P = 0{,}05$) après la prise en compte de l'âge, du sexe, de l'IMC, de l'apport énergétique, du tabagisme, de l'adiponectine et du facteur de nécrose tumorale alpha. Le mode de vie 1 (consommation élevée de produits laitiers riches en gras, céréales raffinées, pommes de terre, viandes rouges et temps de télévision élevé) est associé positivement à l'insulinorésistance ($\beta = 1{,}66$, $P = 0{,}005$) bien que cette association soit atténuée par la prise en compte de l'adiponectine et du facteur de nécrose tumorale alpha. Un mode de vie incluant une alimentation saine et une durée optimale de sommeil est avantageusement associé à l'insulinorésistance et à la dureté du foie chez des patients présentant une NAFLD, et ce, indépendamment du statut pondéral et de l'apport énergétique. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : NAFLD, insulinorésistance, modes de vie, sommeil, régime alimentaire.

Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome (Marchesini et al. 2001) with insulin resistance representing the basic underlying pathophysiological mechanism. Caused by fat accumulation in the liver (liver fat > 5% of liver weight), which is not due to excess alcohol consumption or other causes of steatosis, NAFLD is now the most common cause of chronic liver disease in Western countries (Ratziu et al. 2010), a consequence of the rising prevalence of obesity (Masarone et al. 2014).

Several lifestyle factors can affect the risk for developing NAFLD, such as positive energy balance, unhealthy food choices,

Received 29 August 2016. Accepted 26 October 2016.

C.N. Katsagoni, E. Fragopoulou, and M.D. Kontogianni. Department of Nutrition and Dietetics, School of Health Sciences and Education, Harokopio University, 70 El. Venizelou str, 176 71, Athens, Greece.
G.V. Papatheodoridis, M.V. Papageorgiou, P. Ioannidou, M. Deutsch, A. Alexopoulou, and N. Papadopoulos. Medical School of National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital of Athens, 115 27, Athens, Greece.
Corresponding author: Christina Katsagoni (email: christina.katsagoni@gmail.com).
Copyright remains with the author(s) or their institution(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from RightsLink.

Appl. Physiol. Nutr. Metab. **00**: 1–7 (0000) dx.doi.org/10.1139/apnm-2016-0492 Published at www.nrcresearchpress.com/apnm on 8 November 2016.

and physical inactivity (EASL–EASD–EASO 2016). Moreover, epidemiological studies suggest that cigarette smoking is associated with NAFLD development (Liu et al. 2013; Zein et al. 2011), although results are still conflicting, especially in regard to its role in NAFLD progression (Yilmaz et al. 2010; Zein et al. 2011). Mounting evidence supports associations between individual food groups and NAFLD risk or presence (Marchesini et al. 2016), but data from dietary pattern analyses, consisting of a more holistic approach of dietary intake estimation, are rather limited. Results from a posteriori analysis suggest that a high-carbohydrate sugary-load dietary pattern is associated with increased likelihood of having NAFLD (Jia et al. 2015), whereas a healthier dietary pattern, characterized by fruits, vegetables, and other high-fiber foods, is inversely associated with NAFLD presence (Adriano et al. 2016; Yang et al. 2015). Similarly, data from a priori analyses have revealed potential benefits of the adherence to the Mediterranean diet both for the prevention and the treatment of NAFLD (Abenavoli et al. 2014). Specifically, higher adherence to the Mediterranean diet has been associated with less severe NAFLD (Kontogianni et al. 2014) and a lower likelihood of having metabolic syndrome in individuals with NAFLD (Georgoulis et al. 2015); according to a randomized cross-over clinical trial, adherence to the Mediterranean diet improved liver fat content, insulin levels, and insulin sensitivity (Ryan et al. 2013).

Furthermore, other behaviors such as physical activity and sleep habits have been also suggested to affect NAFLD risk or severity. NAFLD patients seem to spend more time on sedentary activities (Hallsworth et al. 2015; Ryu et al. 2015) and have a lower level of physical activity compared with healthy controls (Ryu et al. 2015). Sleep disturbances have been linked to increased risk for obesity (Nielsen et al. 2011), insulin resistance (Mesarwi et al. 2013), and cardiometabolic risk (Badran et al. 2015); however, studies that explore the effect of sleep habits on NALFD risk and that relate both sleep duration and quality with increased risk of the disease are limited (Bernsmeier et al. 2015; Kim et al. 2013).

Principal component analysis (PCA) is a multivariate statistical method used to identify potential patterns by reducing the dimensionality and variation of the analyzed variables (Holand 2008). Clustering covariables, instead of analyzing independent associations of individual lifestyle items, results in a component that can be associated with several characteristics of the study's sample (Holand 2008). Thus, the aim of this cross-sectional study was to identify clusters of several lifestyle behaviors and to explore their potential associations with clinical and laboratory characteristics of NAFLD patients.

Materials and methods

The study sample consisted of 136 consecutive adult (19–72 years old) patients with newly diagnosed NAFLD (within 6 months). All patients visited 1 of 2 outpatient liver clinics (Academic Department of Gastroenterology, Laiko General Hospital of Athens or 2ndAcademic Department of Internal Medicine, Hippokration General Hospital of Athens, Greece) between May 2013 and December 2015. Definition of NAFLD was based on the following criteria: elevated alanine aminotransferase (ALT) and (or) gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) levels, evidence of hepatic steatosis on ultrasound and (or) compatible liver histology, and no other causes of liver injury or steatosis. Patients with positive serological markers for hepatitis B (i.e., hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B surface antibody (anti-HBs), total hepatitis B core antibody (anti-HBc)), hepatitis C, and human immunodeficiency virus; weekly alcohol consumption more than 210 g for men or 140 g for women; use of potentially hepatotoxic or steatogenic agents (i.e., amiodarone, valproate, glucocorticosteroids, tamoxifen, methotrexate, and other chemotherapeutic agents); evidence of metabolic or autoimmune liver disease; diabetes; or the presence of known systemic disease with potential liver involvement were excluded. Participants who had changed their eating habits since NAFLD diagnosis or were on a weight-loss diet were also excluded from the study. Data for hepatitis B, anti-HBc, anti-HBs, hepatitis C, human immunodeficiency virus, and liver autoantibodies (antinuclear, antismooth muscles, antimicrosomal, antimitochondrial) were retrieved from medical records. Alcohol intake history was taken from the patients and was confirmed by the patients' relatives or friends. Patients, after their initial evaluation, were encouraged to participate in a randomized controlled clinical trial, aiming at evaluating the potential benefit of the Mediterranean diet or the Mediterranean lifestyle compared with usual care (ClinicalTrials.gov ID: NCT01894438).

The study was approved by the Ethics Committees of Laiko General Hospital of Athens and Harokopio University and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (Helsinki 1997).

Lifestyle assessment

Participants' dietary habits over the last 6 months were assessed through a semiquantitative 69-item food frequency questionnaire validated for the Greek population (Bountziouka et al. 2012). Based on this food frequency questionnaire, consumption of items from the main food groups (low-fat and full-fat dairy products; refined and nonrefined cereals; red meat, poultry, fish, and legumes; vegetables and fruits; sweets, soft drinks, and nuts) were calculated in servings per day. Servings were determined based on the dietary guidelines for Greek adults published in 1999 (Supreme Scientific Health Council 1999). Dietary intake was also assessed through 2 nonconsecutive 24-h dietary recalls, which were analyzed in terms of energy, macronutrient, and micronutrient intakes using Nutritionist Pro version 2.2 (Axxya Systems, USA).

Physical activity level assessment was based on a questionnaire validated for the Greek population (Athens Physical Activity Questionnaire in Greek adults) (Kavouras et al. 2016). Total volume of activity was determined by calculating total metabolic equivalent of task (MET) min per day (MET-min/day) (Kavouras et al. 2016). Mean television viewing hours (TV hours/day) was also extracted and was used as an estimate for sedentary behaviors.

Habitual total night sleep hours, as well as duration of midday naps, were self-reported and recorded both for weekdays and weekend days. Naps were defined as midday sleep or resting (≤ 1 h/day), and optimal sleep duration was defined as ≥ 7 and ≤ 9 h/day (Mukherjee et al. 2015).

Smoking habits and routine medication use were also recorded. Participants were also asked to report their marital status.

Anthropometric assessment

Body weight was measured with a digital scale (Seca Robusta 813, Hamburg, Germany) to the nearest 100 g, and height was measured with a stadiometer to the nearest 0.5 cm. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height squared (m^2). Waist circumference was tape measured to the nearest 0.1 cm. Increased waist circumference was defined as > 102 cm for men and > 88 cm for women.

Biochemical and inflammatory markers

Blood samples were collected from patients after an overnight fast (12 h) on the same day that dietary, physical activity, and sleep assessments were performed. Serum and plasma were isolated and immediately frozen at −80 °C. Glucose, total cholesterol, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured using the enzymatic colorimetric method (Cobas® 8000 analyzer, Roche, Greece), and insulin levels with the chemiluminescence method (E170 modular analyzer, Roche). The homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula by Matthews et al. (1985). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula (Friedewald et al. 1972). Triglycerides, ALT, aspartate ami-

notransferase (AST), and GGT were measured using the chromatometric enzymatic method (Cobas® 8000 analyzer, Roche). Tumor necrosis factor-α (TNF-α) and adiponectin were measured by sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Quantikine/immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Shear wave elastography

Reliable liver stiffness measurements (LSM) (in kPa) were performed in 110 of the 136 patients by 2-dimensional shear wave elastography of the liver. LSM were operated using the Aixplorer® MultiWave™ ultrasound system (Supersonic Imagine S.A., Aix-en-Provence, France) with the single crystal curved probe at frequencies 1–6 MHz. The examination was considered to be reliable if at least 5 valid measurements were obtained based on good sonographic signal, combined with < 25% ratio of standard deviation (SD) to the mean LSM (mean value of all valid measurements per examination). Patients were categorized based on the LSM results, as reviewed by Abevanoli and Beaugrand (2012), into those with LSM ≥ 7 and LSM < 7 kPa.

Statistical analysis

The normality of the data was assessed using the Shapiro–Wilk test and graphically through histograms. Qualitative variables are presented as mean values ± standard deviation or median (interquartile range, 25th–75th percentile) depending on their normality, whereas categorical variables are presented as absolute frequencies. Comparisons between food group intakes were made using the student's *t* test.

Lifestyle patterns were identified using PCA (Cureton and D'Agostino 1983). The Kaiser–Meyer–Olkin criterion was applied to ensure intercorrellations between the entered variables and pattern analysis. Furthermore, the orthogonal rotation (varimax option) was used to derive optimal noncorrelated components (lifestyle patterns). The information used was rotated to increase the representation of each food group or lifestyle pattern to a component. The selection of the retained components was based on the proportion of the variance explained by the lifestyle components used. Eight components were retained, explaining 67% of the total variation in lifestyle characteristics examined. The lifestyle components (patterns) were characterized according to the scores of dietary and lifestyle variables that correlated most with the component (scores > 0.40).

Predominant lifestyle components were thereafter divided into tertiles according to principal component scores (i.e., low, medium, and high adherence to each tertile), reflecting the degree of adherence to the lifestyle pattern. To further assess all associations across tertiles of lifestyle patterns and biochemical characteristics of NAFLD patients, the Jonckheere–Terpstra test was used (Ali et al. 2015).

Multiple linear regression analysis was used to estimate all relevant associations among insulin resistance, liver outcomes (i.e., ALT, AST, GGT, and liver stiffness), and lifestyle patterns derived from the PCA after adjustment for several confounders including age (continuous), sex (male vs. female), BMI (continuous), energy intake (continuous), smoking (yes vs. no), adiponectin (continuous), and TNF-α (continuous). Log-transformation of dependent variables, i.e., HOMA-IR and LSM, was made for achieving normality distribution. The results from the regression models are presented as standardized beta coefficients which were antilogarithm-transformed.

All reported *P* values were based on 2-sided tests and compared with a significance level of 5%. Statistical Package for Social Sciences software (version 21.0, SPSS 2012, Chicago, Illinois, USA) was used for all the statistical analyses.

Results

Demographic, dietary, lifestyle, and biochemical characteristics of NAFLD patients are shown in Table 1. The majority of the participants were obese males with an increased waist circumference. Only 63.2% of patients reported optimal sleep duration (between ≥ 7 and ≤ 9 h/day). Patients were consuming more servings of refined than nonrefined cereals per day ($P < 0.001$) and more red meat compared to poultry or fish (all $P < 0.001$) per day. Patients, as expected, had increased liver enzymes. The median LSM in the sample was 6.8 (5.3–8.3) kPa and 42.7% had LSM ≥ 7 kPa.

Table 1. Descriptive characteristics of patients with nonalcoholic fatty liver disease.

Variables	Total sample (n = 136)
Age (y)	47.0±11.6
Sex (males), no. (%)	91 (66.9)
Body mass index (kg/m²)	30.6 (27.18–32.83)
Increased waist circumference*, no. (%)	92 (67.6)
Marital status	
Married, no. (%)	95 (69.9)
Smoking (yes), no. (%)	34 (25)
Physical activity	
Total MET-min/day	1981 (1801–2205)
Television viewing h/day	3.0 (2.0–4.2)
Sleep habits	
Short nap (yes)†, no. (%)	105 (77.2)
Optimal sleep duration‡, no. (%)	86 (63.2)
Dietary habits	
Energy intake (Kcal/day)	1797 (1486–2225)
Full-fat dairy (serv./day)	1.12 (0.28–3.06)
Low-fat dairy (serv./day)	0.92 (0.15–1.9)
Refined cereals (serv./day)	4.48 (2.55–7.65)
Nonrefined cereals (serv./day)	0.21 (0.0–1.14)
Red meat (serv./day)	1.47 (0.91–2.26)
Poultry (serv./day)	0.52 (0.24–0.67)
Fish (serv./day)	1.64 (0.85–2.69)
Legumes (serv./day)	0.52 (0.28–0.52)
Vegetables (serv./day)	2.42 (1.78–3.71)
Fruits (serv./day)	1.64 (0.85–2.69)
Potatoes (serv./day)	0.43 (0.22–0.86)
Sweets (serv./day)	1.28 (0.57–2.21)
Soft drinks (serv./day)	0.0 (0.0–0.12)
Nuts (serv./day)	0.18 (0.0–0.36)
Coffee consumption (times/day)	1.50 (1.0–2.5)
Biochemical characteristics	
HOMA-IR	3.0 (1.8–4.3)
Total Cholesterol (mg/dL)	204±40.8
Triglycerides (mg/dL)	119 (90–171)
HDL-C (mg/dL)	35.0 (23.7–47.2)
LDL-C (mg/dL)	140±40.8
ALT (IU/L)	58 (44–86)
AST (IU/L)	34.0 (26–44)
GGT (IU/L)	57.0 (35–124)
TNF-a (pg/mL)	4.1 (2.1–6.0)
Adiponectin (μg/mL)	4.7 (3.2–8.2)

Note: Data are presented as mean ± SD or median (interquartile range) or otherwise mentioned. MET, metabolic equivalent of task; serv./day, servings per day according to dietary guidelines for Greek adults; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

*>102 cm for males and >88 cm for females.

†Midday sleep or resting ≤1 h/day.

‡≥7 and ≤9 hours/day.

PCA extracted 8 components explaining 67% of the total variation in lifestyle characteristics examined (Table 2); coefficients with the highest correlation (>0.40) within the component are shown in bold. The Kaiser–Meyer–Olkin criterion was 0.571 suggesting a strong intercorrelation between the variables used in the analysis. The corresponding components characterising each pattern are: 1 = full-fat dairy products, refined cereals, potatoes, red meat, TV hours/day; 2 = fruit, vegetables, coffee, nuts; 3 =

Table 2. Score coefficients derived from principal components analysis regarding dietary/lifestyle patterns of non-alcoholic fatty liver disease patients*.

	Component							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Full-fat dairy products	**0.819**	0.113	0.001	−0.040	0.045	−0.041	−0.170	0.036
Low-fat dairy products	−0.199	0.231	**0.771**	−0.040	−0.068	−0.042	0.150	−0.148
Nonrefined cereals	−0.096	0.081	0.181	0.179	0.029	**0.818**	−0.178	−0.059
Refined cereals	**0.887**	0.118	−0.032	−0.054	0.035	0.019	−0.108	−0.022
Fruit	−0.031	**0.791**	0.173	0.177	−0.009	−0.013	−0.077	−0.211
Vegetables	0.325	**0.428**	**0.513**	0.230	−0.163	−0.066	−0.246	−0.075
Potatoes	**0.781**	−0.040	−0.008	0.120	−0.100	0.004	0.046	0.026
Legumes	0.036	0.126	−0.010	**0.681**	−0.023	0.061	−0.078	−0.102
Fish	0.077	−0.168	**0.530**	0.173	−0.117	0.316	0.112	0.044
Red meat	**0.644**	−0.104	0.099	0.315	0.124	0.078	0.194	0.014
Poultry	0.159	−0.044	0.101	**0.732**	0.086	0.060	0.068	0.211
Coffee	0.242	**0.463**	−0.151	−0.255	−0.055	**0.553**	0.265	0.093
Sweets	−0.060	0.065	0.068	−0.002	0.035	−0.097	**0.896**	−0.036
Nuts	0.064	**0.731**	−0.034	−0.021	0.035	0.113	0.104	0.141
Total MET-min/day	0.059	0.116	0.015	0.054	**0.827**	−0.210	−0.025	0.185
Optimal sleep duration†	0.147	−0.119	**0.483**	**−0.421**	0.273	0.183	−0.175	0.241
Short nap‡	−0.012	−0.111	−0.228	−0.032	**0.666**	0.218	0.101	−0.234
Television viewing hours per day	**0.410**	0.055	−0.112	−0.039	−0.320	−0.115	−0.324	0.068
Current smoking	0.017	−0.012	−0.058	0.034	−0.010	−0.021	−0.041	**0.902**
Explained variance (%)	16.5	11.0	7.9	7.6	6.9	5.9	5.7	5.4

Note: Description of components: 1 = full-fat dairy, refined cereals, potatoes, red meat, TV-hours/day; 2 = fruit, vegetables, Coffee, nuts; 3 = low-fat dairy, vegetables, fish, optimal sleep duration; 4 = legumes, poultry, less optimal sleep hours; 5 = total MET-min/day, short nap; 6 = nonrefined cereals, coffee; 7 = sweets; 8 = smoking. METs, Metabolic equivalent of task(s).

*Score coefficients are similar to the correlation coefficients. Numbers in bold indicate foods/habits with the highest correlation (>0.40) within the component.

†≥7 and ≤9 hours/day.

‡Midday sleep or resting ≤1 h/day.

low-fat dairy products, vegetables, fish, optimal sleep duration; 4 = legumes, poultry, less optimal sleep hours; 5 = total MET-min/day, short nap; 6 = nonrefined cereals, coffee; 7 = sweets; 8 = smoking.

From the lifestyle patterns derived, only adherence to 2 of them (i.e., lifestyle component 1 characterised as "unhealthy diet–sedentary behavior lifestyle pattern" and lifestyle component 3 characterised as "healthy diet–optimal sleep lifestyle pattern") was associated with several patients' characteristics as shown in Table 3. Specifically, a significant negative trend was found for HDL-C and adiponectin levels and a positive trend was found for ALT levels when moving to greater adherence to lifestyle pattern 1. Unexpectedly, higher adherence to this pattern was also associated with a negative trend in GGT levels ($P = 0.019$). On the contrary, higher scores of lifestyle pattern 3 were associated with inverse trends in insulin levels and LSM (all $P \leq 0.05$).

Potential associations between lifestyle patterns and insulin, HOMA-IR, liver enzymes (ALT and GGT), HDL and adiponectin, as well as liver stiffness, were further explored using multivariate regression analysis after controlling for potential confounders, namely age, sex and BMI, energy intake and smoking, as well as adiponectin and TNF-α (Table 4). Lifestyle component 3 (i.e., healthy diet–optimal sleep lifestyle pattern), was negatively associated with HOMA-IR (standardized $\beta = -1.66$, $P = 0.008$) and LSM (standardized $\beta = -1.62$, $P = 0.05$), after controlling for the aforementioned confounding factors. Lifestyle component 1 (i.e., unhealthy diet–sedentary behavior lifestyle pattern), was positively associated with HOMA-IR (standardized $\beta = 1.66$, $P = 0.005$); however, this association was weakened after adjusting for inflammation indices, i.e., adiponectin and TNF-α levels ($P = 0.14$) (Table 4, Model 3), whereas adiponectin levels were inversely associated with insulin resistance in this model (standardized $\beta = -2.39$, $P < 0.001$). Using binary logistic regression analysis, lifestyle components were not found to be significantly associated with more severe disease, as depicted by liver stiffness ≥ 7 kPa (data not shown). Moreover, when patients were categorized as having or not having insulin resistance (defined as HOMA-IR ≥ 3), adherence to lifestyle component 3 tended to be negatively associated (OR = 0.67, $P = 0.13$), whereas lifestyle component 1 was not associated ($P = 0.61$) with the likelihood of having insulin resistance, after controlling for several confounders (i.e., age, sex, BMI, energy intake, smoking, adiponectin, and TNF-α).

A negative association was also found between HDL-C (standardized $\beta = -2.29$, $P < 0.001$) and component 1, after controlling for age, sex and BMI, energy intake and smoking, as well as adiponectin and TNF-α. The negative trend between component 1 and adiponectin was lost after controlling for age and sex, whereas for GGT after controlling for age only. No other associations were found between these 2 or the rest of the PCA components and any other assessed characteristics (data not shown).

Discussion

In this cross-sectional study, lifestyle patterns and their potential associations with clinical and laboratory characteristics of NAFLD patients were examined. Using PCA analysis, the derived lifestyle pattern 3, characterized as healthy diet–optimal sleep lifestyle pattern (i.e., low-fat dairy products, vegetables, fish, and optimal sleep duration), was negatively associated with liver stiffness and insulin resistance independent of BMI and energy intake and after adjusting for specific confounding factors.

Evidence exploring associations between a posteriori driven patterns and NAFLD characteristics, namely insulin resistance or liver stiffness, as estimated by transient elastography is sparse. Adriano et al. (2016) showed an inverse association between a healthy pattern, rich in vegetables and legumes, white meat, olive oil, margarine, and bread and toast and NAFLD presence in the elderly. Additionally, a study from a Chinese population (Yang et al. 2015) concluded that adherence to a pattern high in coarse grains, tubers, vegetables, mushrooms, kelp and seaweed, cooked meat, and beans is associated with a lower risk of NAFLD. Other studies using a priori analysis have associated greater adherence

Table 3. Trends associations across tertiles of lifestyle patterns 1 and 3 and NAFLD patient characteristics.

	Lifestyle pattern 1 (full-fat dairy products, refined cereals, potatoes, red meat, TV-hours/day)			*P* value for trend*	Lifestyle pattern 3 (low-fat dairy products, vegetables, fish, optimal sleep duration)			*P* value for trend*
	Low adhrence	Medium adhrence	High adhrence		Low adherence	Medium adherence	High adherence	
Age (y)	49.2±11.2	49.1±11.6	42.8±11.2	**0.01**	45.3±11.7	47.6±10.9	48.1±12.2	0.20
Sex, (males), no. (%)	27 (58.7)	26 (57.8)	38 (84.4)	**0.01**	31 (68.9)	30 (66.7)	30 (65.2)	0.93
BMI (kg/m²)	29.8 (27.7–33.5)	30.0 (26.4–35.0)	30.1 (26.8–32.1)	0.40	29.1 (26.6–33.5)	39.8 (27.0–34.6)	30.2 (27.7–31.9)	0.73
WC (cm)	104.5 (95–109)	102 (96–112)	102 (96–111)	0.99	102 (96–111)	103 (95–116)	103 (96–109)	0.51
Glucose (mg/dL)	88.6±9.6	92.8±11.1	91.7±13.5	0.08	91.2±12.9	90.4±11.7	91.5±10.1	0.28
Insulin (μIU/mL)	11.0 (9–18.5)	12.0 (8–18)	14.0 (11–20)	0.08	16.0 (11–19)	13.0 (9–23)	11.0 (8.1–16.5)	**0.05**
HOMA-IR	2.3 (1.7–4.0)	2.8 (1.7–4.4)	3.2 (2.7–4.8)	0.06	3.3 (2.2–4.8)	3.0 (1.9–5.2)	2.6 (1.7–3.3)	0.11
Total cholesterol (mg/dL)	205±41.8	208±36.5	201±44.5	0.63	201±47.9	212±36.6	201±36.7	0.95
LDL-C(mg/dL)	136±41.5	139±39.7	145±41.6	0.33	137±46.2	146±36.6	138±39.2	0.94
HDL-C (mg/dL)	39.0 (28.7–53.2)	37.0 (27–51)	24.0 (19–31)	**<0.001**	31.0 (23.5–42.5)	36.0 (27.2–47.5)	38.0 (22.0–48.5)	0.33
Triglycerides (mg/dL)	120.0 (76–156)	118 (84–171)	130 (96–178)	0.24	126 (95.5–173)	124 (72.2–194.5)	118 (88.5–150.5)	0.31
ALT (IU/L)	55.0 (42–79)	57.0 (33–75)	71.0 (51–98)	**0.03**	59.0 (48–95)	57 (42–89)	56 (37–83)	0.17
AST (IU/L)	36.0 (26–41)	33.0 (23–41)	39.0 (28–49)	0.21	36.0 (26–47)	34 (26–46)	34 (25–41)	0.29
GGT (IU/L)	82.3 (37–156)	73.0 (36–128)	39.0 (30–85)	**0.02**	47 (34–126)	71 (37–150)	51 (33–107)	0.86
Adiponectin (μg/mL)	5.5 (3.5–9.5)	5.2 (3.8–8.9)	4.2 (2.9–6.0)	**0.05**	4.9 (3.6–8.2)	4.5 (3.0–9.8)	5.0 (3.2–8.1)	0.88
TNF-α (pg/mL)	3.2 (1.8–5.7)	4.1 (2.8–6.0)	4.9 (1.7–6.5)	0.18	4.9 (2.9–6.7)	4.1 (1.7–6.0)	3.9 (1.8–6.0)	0.36
Liver stiffness (kPa)	7.0 (5.6–8.3)	6.4 (5.2–9.1)	6.8 (5.2–8.3)	0.59	7.3 (5.8–10.2)	6.7 (5.7–8.7)	6.6 (5.0–7.4)	**0.04**

Note: Data are presented as mean ± SD or median (interquartile range). NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; BMI, body mass index; WC, waist circumference; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

*P value showing trends of NAFLD patients characteristics across the tertiles of lifestyle patterns 1 and 3 using the Jonckheere–Terpstra trend test. Numbers in bold indicate statistically significant *P* values < = 0.05.

Table 4. Linear regression analysis models, exploring the association between lifestyle patterns 1 and 3 and several characteristics of nonalcoholic fatty liver disease patients.

	Dependent variable HOMA-IR*		Dependent variable LSM*‡	
Lifestyle patterns	Standardized β†	*P*‡	Standardized β†	*P*‡
Model 1 (adjusted for age, sex, BMI)				
Lifestyle pattern 1	1.62	**0.005**	1.23	0.27
Lifestyle pattern 3	−1.17	**0.016**	−1.54	**0.022**
Model 2 (adjusted for age, sex, BMI, energy intake, smoking habits)				
Lifestyle pattern 1	1.66	**0.005**	1.23	0.30
Lifestyle pattern 3	−1.48	**0.02**	−1.48	**0.05**
Model 3 (adjusted for age, sex, BMI, energy intake, smoking habits, adiponectin, tumor necrosis factor-α)				
Lifestyle pattern 1	1.31	0.14	1.28	0.34
Lifestyle pattern 3	−1.66	**0.008**	−1.62	**0.05**

Note: Lifestyle pattern 1: full-fat dairy products, refined cereals, potatoes, red meat, television-hours/day. Lifestyle pattern 3: low-fat dairy products, vegetables, fish, optimal sleep duration. HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; BMI, body mass index.

*Log-transformation of dependent variables was made for achieving normality distribution.

†Standardized beta coefficients after their conversion to natural numbers.

‡*P* value as derived by multiple linear regression analysis showing associations between lifestyle patterns and HOMA-IR or reliable liver stiffness measurements. Numbers in bold indicate statistically significant *P* values < = 0.05.

to the Mediterranean dietary pattern with lower insulin resistance and severity of steatosis (Kontogianni et al. 2014) as well as with lower odds of having metabolic syndrome (Georgoulis et al. 2015). Furthermore, adherence to healthy dietary patterns has been linked to better insulin sensitivity in samples of middle-aged women, young adults, or older individuals (Anderson et al. 2012; Deshmukh-Taskar et al. 2009; Esmaillzadeh et al. 2007).

Moreover, all the foods included in the healthy dietary pattern derived in this study (i.e., low-fat dairy, vegetables, and fish) are generally foods with anti-inflammatory and antioxidant properties (Sears 2015) that have been previously linked to lower insulin resistance (Rideout et al. 2013; Torris et al. 2016) and lower likelihood of NAFLD (Finelli and Tarantino 2012; Zelber-Sagi et al. 2007). Bearing in mind that lifestyle modifications remain the cornerstone therapy for treating NAFLD, healthy dietary patterns like the one that emerged in the current study or the Mediterranean diet could also be integral parts of NAFLD treatment (Abenavoli et al. 2014).

The present study also advocates that a healthy dietary pattern combined with optimal sleep duration (i.e., ≥ 7 and ≤ 9 h/day) (component 3) is associated with favorable characteristics of NAFLD patients, independent of BMI and energy intake. Evidence regarding the association between sleep habits and the development of NAFLD is limited, let alone its synergistic effect with diet. A recent study (Kim et al. 2013) concluded that short sleep duration (≤ 5 h vs. > 7 h) has been associated with increased risk of

NAFLD, but according to authors this association remained only in men after BMI was taken into account. Additionally, in Imaizumi et al. (2015) short sleep duration (≤ 6 h vs. 6 to ≤ 7 h) was linked to increased risk of NAFLD only in Japanese women and this association was lost after BMI adjustment. Daytime sleepiness has also been associated with insulin resistance and histologic features of NAFLD (Bernsmeier et al. 2015). Reduced sleep time can lead to increased food intake through leptin and ghrelin regulation (Copinschi et al. 2014) and through increasing preference for high-energy foods with rich carbohydrate content, including sweets, salty snacks, and starchy foods (Dashti et al. 2015). Sleep deprivation seems to share common metabolic pathways with the stress system by activating hypothalamic–pituitary–adrenal axis (Hirotsu et al. 2015). Finally, excessive daytime sleepiness reduces people's engagement in physical activity and increases engagement in sedentary behaviors (Zimberg et al. 2012).

In this study, lifestyle pattern 1, characterized as unhealthy diet–sedentary behavior lifestyle pattern (i.e., full-fat dairy products, refined cereals, potatoes, red meat consumption, and TV hours/day), was also positively associated with insulin resistance, but this association became marginally insignificant after controlling for adiponectin and TNF-α levels, whereas adiponectin levels were inversely associated with insulin resistance in this model. Therefore, one could speculate that the inverse association initially found between lifestyle pattern 1 and insulin sensitivity reflected a higher inflammatory load, given that participants with high adherence in this lifestyle pattern had significantly lower adiponectin levels and tended to have higher TNF-α levels (Table 3). Indeed, full-fat dairy products, refined cereals, potatoes, and red meats have been constantly linked to higher inflammation indices (Azadbakht and Esmaillzadeh 2009; Buyken et al. 2010; Kontogianni et al. 2006; Ley et al. 2014), whereas it has been shown that high sedentary behavior is associated with a worse inflammatory profile (Henson et al. 2013; León-Latre et al. 2014). Moreover, the inverse association between adiponectin levels and insulin resistance that was revealed in regression model 3 was anticipated given the pathophysiology of NAFLD. According to current knowledge, insulin resistance and adipocyte dysfunction are the initial hits of NAFLD onset (Buzzetti et al. 2016), whereas an imbalance of adipocytokines (e.g., low adiponectin, high TNF-α) may also result in the development of insulin resistance and NAFLD (Polyzos et al. 2010*b*) by playing a crucial role in the regulation of glucose and lipid metabolism and in the control of inflammation in insulin-sensitive tissues (Polyzos et al. 2010*a*).

Smoking habits were not associated with variables related to NAFLD in this study. Data from experimental studies suggested that smoking prompts oxidative stress-mediated hepatocellular apoptosis, implicating liver injury (Azzalini et al. 2010). Nevertheless, the effects of active or passive smoking on NAFLD development and progression are still controversial and more studies are needed to better clarify this association (Liu et al. 2013; Yilmaz et al. 2010; Zein et al. 2011).

The present study has some limitations. Specifically, this is a cross-sectional study and thus it is not suitable for cause–effect relationships. Moreover, the PCA analysis method depends on several subjective decisions that should be made by investigators during the extraction of the components. Furthermore, the population examined in the present study has a specific genetic and cultural profile; thus, results should be confirmed to other populations as well. However, by clustering lifestyle covariables using PCA instead of analyzing independent associations of individual lifestyle items, we identified interpretable lifestyle patterns associated with NAFLD characteristics that could be used for the prevention of the disease.

The present study supports that a higher adherence to a healthy lifestyle pattern, characterized by high consumption of low-fat dairy products, vegetables, and fish, as well as by optimal sleep duration, is associated with lower insulin resistance and liver stiffness in a sample of NAFLD patients, independent of body weight status and energy intake.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare. Christina N. Katsagoni has received a Fellowship of Excellence for Post-graduate Research in Greece—Siemens Program, awarded by the State Scholarships Foundation (I.K.Y.).

References

Abenavoli, L., and Beaugrand, M. 2012. Transient elastography in non-alcoholic fatty liver disease. Ann. Hepatol. **11**(2): 172–178. PMID:22345333.

Abenavoli, L., Milic, N., Peta, V., Alfieri, F., De Lorenzo, A., and Bellentani, S. 2014. Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: Mediterranean diet. World J. Gastroenterol. **20**(45): 16831–16840. doi:10.3748/wjg.v20.i45.16831. PMID:25492997.

Adriano, L.S., Sampaio, H.A., Arruda, S.P., Portela, C.L., Melo, M.L., Carioca, A.A., and Soares, N.T. 2016. Healthy dietary pattern is inversely associated with non-alcoholic fatty liver disease in elderly. Br. J. Nutr. **115**(12): 2189–2195. doi:10.1017/S0007114516001410. PMID:27102566.

Ali, A., Rasheed, A., Siddiqui, A.A., Naseer, M., Wasim, S., and Akhtar, W. 2015. Non-Parametric Test for Ordered Medians: The Jonckheere Terpstra Test. Int. J. Stat. Med. Res. **4**(2): 203–207. doi:10.6000/1929-6029.2015.04.02.6.

Anderson, A.L., Harris, T.B., Tylavsky, F.A., Perry, S.E., Houston, D.K., Lee, J.S., et al. 2012. Dietary patterns, insulin sensitivity and inflammation in older adults. Eur. J. Clin. Nutr. **66**(1): 18–24. doi:10.1038/ejcn.2011.162. PMID:21915138.

Azadbakht, L., and Esmaillzadeh, A. 2009. Red meat intake is associated with metabolic syndrome and the plasma C-reactive protein concentration in women. J. Nutr. **139**(2): 335–339. doi:10.3945/jn.108.096297. PMID:19074209.

Azzalini, L., Ferrer, E., Ramalho, L.N., Moreno, M., Domínguez, M., Colmenero, J., et al. 2010. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. Hepatology, **51**(5): 1567–1576. doi:10.1002/hep.23516. PMID:20432253.

Badran, M., Yassin, B.A., Fox, N., Laher, I., and Ayas, N. 2015. Epidemiology of Sleep Disturbances and Cardiovascular Consequences. Can. J. Cardiol. **31**(7): 873–879. doi:10.1016/j.cjca.2015.03.011. PMID:26037823.

Bernsmeier, C., Weisskopf, D.M., Pflueger, M.O., Mosimann, J., Campana, B., Terracciano, L., et al. 2015. Sleep Disruption and Daytime Sleepiness Correlating with Disease Severity and Insulin Resistance in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comparison with Healthy Controls. PLoS One, **10**(11): e0143293. doi:10.1371/journal.pone.0143293. PMID:26576055.

Bountziouka, V., Bathrellou, E., Giotopoulou, A., Katsagoni, C., Bonou, M., Vallianou, N., et al. 2012. Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: methodological considerations. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. **22**(8): 659–667. doi:10.1016/j.numecd.2010.10.015. PMID:21269818.

Buyken, A.E., Flood, V., Empson, M., Rochtchina, E., Barclay, A.W., Brand-Miller, J., and Mitchell, P. 2010. Carbohydrate nutrition and inflammatory disease mortality in older adults. Am. J. Clin. Nutr. **92**(3): 634–643. doi:10.3945/ajcn.2010.29390. PMID:20573797.

Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E.A. 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism, **65**(8): 1038–1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012. PMID:26823198.

Copinschi, G., Leproult, R., and Spiegel, K. 2014. The important role of sleep in metabolism. Front. Horm. Res. **42**: 59–72. doi:10.1159/000358858. PMID:24732925.

Cureton, E.E., and R.B. D'Agostino. 1983. Factor Analysis: An Applied Approach. NJ: Lawrence Erlbaum Associates.

Dashti, H.S., Scheer, F.A., Jacques, P.F., Lamon-Fava, S., and Ordovás, J.M. 2015. Short sleep duration and dietary intake: epidemiologic evidence, mechanisms, and health implications. Adv. Nutr. **6**(6): 648–659. doi:10.3945/an.115.008623. PMID:26567190.

Deshmukh-Taskar, P.R., O'Neil, C.E., Nicklas, T.A., Yang, S.J., Liu, Y., Gustat, J., and Berenson, G.S. 2009. Dietary patterns associated with metabolic syndrome, sociodemographic and lifestyle factors in young adults: the Bogalusa Heart Study. Public Health Nutr. **12**(12): 2493–2503. doi:10.1017/S1368980009991261. PMID:19744354.

EASL–EASD–EASO. 2016. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepat. **64**(6): 1388–1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004. PMID:27062661.

Esmaillzadeh, A., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Azadbakht, L., Hu, F.B., and Willett, W.C. 2007. Dietary patterns, insulin resistance, and prevalence of the metabolic syndrome in women. Am. J. Clin. Nutr. **85**(3): 910–918. PMID:17344515.

Finelli, C., and Tarantino, G. 2012. Is there any consensus as to what diet or lifestyle approach is the right one for NAFLD patients? J. Gastrointestin. Liver. Dis **21**(3): 293–302. PMID:23012671.

Friedewald, W.T., Levy, R.I., and Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. **18**(6): 499–502. PMID:4337382.

Georgoulis, M., Kontogianni, M.D., Margariti, A., Tiniakos, D., Fragopoulou, E., Zafiropoulou, R., and Papatheodoridis, G. 2015. Associations between dietary intake and the presence of the metabolic syndrome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. J. Hum. Nutr. Diet. **28**(4): 409–415. doi:10.1111/jhn.12323. PMID:25988570.

Supreme Scientific Health Council. 1999. Dietary guidelines for adults in Greece. Ministry of Health and Welfare. Arch. Hellenic Med. **16**(5): 516–524.

Hallsworth, K., Thoma, C., Moore, S., Ploetz, T., Anstee, Q.M., Taylor, R., et al. 2015. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of objectively measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. Frontline Gastroenterol. **6**(1): 44–51. doi:10.1136/flgastro-2014-100432. PMID:25580206.

Helsinki 1997. World medical association declaration of Helsinki: Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. JAMA, **277**(11): 925–926. doi:10.1001/jama.1997.03540350075038. PMID:9062334.

Henson, J., Yates, T., Edwardson, C.L., Khunti, K., Talbot, D., Gray, L.J., et al. 2013. Sedentary time and markers of chronic low-grade inflammation in a high risk population. PLoS One, **8**(10): e78350. doi:10.1371/journal.pone.0078350. PMID:24205208.

Hirotsu, C., Tufik, S., and Andersen, M.L. 2015. Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. Sleep Sci. **8**(3): 143–152. doi:10.1016/j.slsci.2015.09.002. PMID:26779321.

Holand, S.M. 2008. Principal components analysis (PCA). Department of Geology, University of Georgia, Athens, GA.

Imaizumi, H., Takahashi, A., Tanji, N., Abe, K., Sato, Y., Anzai, Y., et al. 2015. The Association between Sleep Duration and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease among Japanese Men and Women. Obesity Facts, **8**(4): 234–242. doi:10.1159/000436997. PMID:26138724.

Jia, Q., Xia, Y., Zhang, Q., Wu, H., Du, H., Liu, L., et al. 2015. Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults. Eur. J. Clin. Nutr. **69**(8): 914–921. doi:10.1038/ejcn.2014.297. PMID:25649235.

Kavouras, S.A., Maraki, M.I., Kollia, M., Gioxari, A., Jansen, L.T., and Sidossis, L.S. 2016. Development, reliability and validity of a physical activity questionnaire for estimating energy expenditure in Greek adults. Sci. Sports, **31**(3): e47–e53. doi:10.1016/j.scispo.2016.01.007.

Kim, C.W., Yun, K.E., Jung, H.S., Chang, Y., Choi, E.S., Kwon, M.J., et al. 2013. Sleep duration and quality in relation to non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged workers and their spouses. J. Hepatol. **59**(2): 351–357. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.035. PMID:23578884.

Kontogianni, M.D., Zampelas, A., and Tsigos, C. 2006. Nutrition and inflammatory load. Ann. N. Y. Acad. Sci. **1083**: 214–238. doi:10.1196/annals.1367.015. PMID:17148742.

Kontogianni, M.D., Tileli, N., Margariti, A., Georgoulis, M., Deutsch, M., Tiniakos, D., et al. 2014. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. Clin. Nutr. **33**(4): 678–683. doi:10.1016/j.clnu.2013.08.014. PMID:24064253.

León-Latre, M., Moreno-Franco, B., Andres-Esteban, E.M., Ledesma, M., Laclaustra, M., Alcalde, V., et al. 2014. Sedentary lifestyle and its relation to cardiovascular risk factors, insulin resistance and inflammatory profile. Rev. Esp. Cardiol. (Engl Ed), **67**(6): 449–455. doi:10.1016/j.rec.2013.10.015. PMID:24863593.

Ley, S.H., Sun, Q., Willett, W.C., Eliassen, A.H., Wu, K., Pan, A., et al. 2014. Associations between red meat intake and biomarkers of inflammation and glucose metabolism in women. Am. J. Clin. Nutr. **99**(2): 352–360. doi:10.3945/ajcn.113.075663. PMID:24284436.

Liu, Y., Dai, M., Bi, Y., Xu, M., Xu, Y., Li, M., et al. 2013. Active Smoking, Passive Smoking, and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Population-Based Study in China. J. Epidemiol. **23**(2): 115–121. doi:10.2188/jea.JE20120067. PMID:23399520.

Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., et al. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes, **50**(8): 1844–1850. doi:10.2337/diabetes.50.8.1844. PMID:11473047.

Marchesini, G., Petta, S., and Dalle Grave, R. 2016. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. Hepatology, **63**: 2032–2043. doi:10.1002/hep.28392. PMID:26663351.

Masarone, M., Federico, A., Abenavoli, L., Loguercio, C., and Persico, M. 2014. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. Rev. Recent Clin. Trials, **9**(3): 126–133. PMID:25514916.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia, **28**(7): 412–419. doi:10.1007/BF00280883. PMID:3899825.

Mesarwi, O., Polak, J., Jun, J., and Polotsky, V.Y. 2013. Sleep disorders and the development of insulin resistance and obesity. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. **42**(3): 617–634. doi:10.1016/j.ecl.2013.05.001. PMID:24011890.

Mukherjee, S., Patel, S.R., Kales, S.N., Ayas, N.T., Strohl, K.P., Gozal, D., and Malhotra, A. 2015. An Official American Thoracic Society Statement: The Importance of Healthy Sleep. Recommendations and Future Priorities. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **191**(12): 1450–1458. doi:10.1164/rccm.201504-0767ST. PMID:26075423.

Nielsen, L.S., Danielsen, K.V., and Sørensen, T.I. 2011. Short sleep duration as a possible cause of obesity: critical analysis of the epidemiological evidence. Obes. Rev. **12**(2): 78–92. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00724.x. PMID:20345429.

Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C., and Stergiopoulos, C. 2010*a*. Adipocytokines in insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease: the two sides of the same coin. Med. Hypotheses, **74**(6): 1089–1090. doi:10.1016/j.mehy.2009.12.028. PMID:20080361.

Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C., and Tsiaousi, E. 2010*b*. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Diab. Obes. Metab. **12**(5): 365–383. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01176.x. PMID:20415685.

Ratziu, V., Bellentani, S., Cortez-Pinto, H., Day, C., and Marchesini, G. 2010. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. J. Hepatol. **53**(2): 372–384. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.008. PMID:20494470.

Rideout, T.C., Marinangeli, C.P., Martin, H., Browne, R.W., and Rempel, C.B. 2013. Consumption of low-fat dairy foods for 6 months improves insulin resistance without adversely affecting lipids or bodyweight in healthy adults: a randomized free-living cross-over study. Nutr. J. **12**: 56. doi:10.1186/1475-2891-12-56. PMID:23638799.

Ryan, M.C., Itsiopoulos, C., Thodis, T., Ward, G., Trost, N., Hofferberth, S., et al. 2013. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. **59**(1): 138–143. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.012. PMID:23485520.

Ryu, S., Chang, Y., Jung, H.S., Yun, K.E., Kwon, M.J., Choi, Y., et al. 2015. Relationship of sitting time and physical activity with non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. **63**(5): 1229–1237. doi:10.1016/j.jhep.2015.07.010. PMID:26385766.

Sears, B. 2015. Anti-inflammatory Diets. J. Am. Col. Nutr. **34**(S1): 14–21. doi:10.1080/07315724.2015.1080105. PMID:26400429.

Tørris, C., Molin, M., and Cvancarova, M.S. 2016. Lean fish consumption is associated with lower risk of metabolic syndrome: a Norwegian cross sectional study. BMC Public Health, **16**: 347. doi:10.1186/s12889-016-3014-0. PMID:27093865.

Yang, C.Q., Shu, L., Wang, S., Wang, J.J., Zhou, Y., Xuan, Y.J., and Wang, S.F. 2015. Dietary Patterns Modulate the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Chinese Adults. Nutrients, **7**(6): 4778–4791. doi:10.3390/nu7064778. PMID:26083112.

Yilmaz, Y., Yonal, O., Kurt, R., and Avsar, E. 2010. Cigarette smoking is not associated with specific histological features or severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, **52**(1): 391–391. doi:10.1002/hep.23718. PMID:20578155.

Zein, C.O., Unalp, A., Colvin, R., Liu, Y.-C., and McCullough, A.J. 2011. Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. J. Hepat. **54**(4): 753–759. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.040. PMID:21126792.

Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Blendis, L., Halpern, Z., et al. 2007. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. J. Hepatol. **47**(5): 711–717. doi:10.1016/j.jhep.2007.06.020. PMID:17850914.

Zimberg, I.Z., Dâmaso, A., Del Re, M., Carneiro, A.M., de Sá Souza, H., de Lira, F.S., et al. 2012. Short sleep duration and obesity: mechanisms and future perspectives. Cell Biochem. Funct. **30**(6): 524–529. doi:10.1002/cbf.2832. PMID:22473743.



Effects of lifestyle interventions on clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis

Christina N Katsagoni, Michael Georgoulis, George V Papatheodoridis, Demosthenes B Panagiotakos, Meropi D Kontogianni

PII: S0026-0495(16)30184-6
DOI: doi: 10.1016/j.metabol.2016.12.006
Reference: YMETA 53504

To appear in: *Metabolism*

Received date: 15 July 2016
Accepted date: 7 December 2016

Please cite this article as: Katsagoni Christina N, Georgoulis Michael, Papatheodoridis George V, Panagiotakos Demosthenes B, Kontogianni Meropi D, Effects of lifestyle in-terventions on clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis, *Metabolism* (2016), doi: 10.1016/j.metabol.2016.12.006

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL 68 (2017) 119–132

Available online at www.sciencedirect.com

Metabolism

www.metabolismjournal.com

Effects of lifestyle interventions on clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis

Christina N Katsagoni[a], Michael Georgoulis[a], George V Papatheodoridis[b], Demosthenes B Panagiotakos[a], Meropi D Kontogianni[a,*]

[a] Department of Nutrition & Dietetics, School of Health Sciences and Education, Harokopio University, 70 El. Venizelou Str., 176 71, Athens, Greece

[b] Department of Gastroenterology, Medical School of National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital of Athens, 17 Agiou Thoma Str., 115 27, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 July 2016
Accepted 7 December 2016

Keywords:
NAFLD
Lifestyle
Diet
Physical activity
Weight loss

ABSTRACT

Background/Objectives. Although lifestyle modifications remain the cornerstone therapy for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the optimal lifestyle intervention is still controversial. The aim of this meta-analysis was to evaluate the effect of exercise and/or dietary interventions, type or intensity of exercise and type of diet, on liver function outcomes (liver enzymes, intrahepatic fat and liver histology), as well as on anthropometric and glucose metabolism parameters in NAFLD patients.

Subjects/Methods. Literature search was performed in Scopus and US National Library of Medicine databases to identify all randomized controlled clinical trials (RCTs) in adult patients with NAFLD, diagnosed through imaging techniques or liver biopsy, published in English between January 2005 and August 2016. Studies' quality was evaluated using the Cochrane Risk of Bias Tool. Heterogeneity was tested using the Cochran's Q test and measured inconsistency by I^2. Effect size was calculated as the standardized mean difference (SMD). The meta-analysis was performed in accordance with PRISMA guidelines.

Results. Twenty RCTs with 1073 NAFLD patients were included. Compared to standard care, exercise improved serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) (all $P < 0.05$). Intrahepatic fat also improved, irrespectively of weight change (SMD = −0.98, 95% CI: −1.30 to −0.66). Regarding the type of exercise, aerobic compared to resistance exercise did not yield any superior improvements on liver parameters, whereas moderate-to-high volume moderate-intensity continuous training was more beneficial compared to continuous low-to-moderate-volume moderate-intensity training or high intensity interval training. Interventions combining exercise and diet showed decreases in ALT ($P < 0.01$) and improvement in NAFLD activity score (SMD = −0.61, 95% CI: −1.09

Abbreviations: NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; RCT, randomized controlled clinical trial; MeSH, Medical Subject Heading; PRISMA, Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses; ^{1}H MRS, proton magnetic resonance spectroscopy; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; IHTG, intrahepatic triglycerides; CT, computed tomography; NAS score, non-alcoholic fatty liver disease score; BMI, body mass index; WC, waist circumference; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; HbA1C, glycated hemoglobin; SMD, standardized mean difference; QS, quality score; MIT, moderate-intensity training; HIT, high-intensity training; HIIT, high-intensity interval training.

* *Corresponding author at:* Department of Nutrition & Dietetics, School of Health Sciences and Education, Harokopio University, El. Venizelou 70, 17671, Kallithea, Greece. Tel.: +30 210 9549359; fax: +30 210 9549141.

E-mail address: mkont@hua.gr (M.D. Kontogianni).

http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2016.12.006
0026-0495/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

to −0.13). Moderate-carbohydrate diets yielded similar changes in liver enzymes compared to low/moderate-fat diets.

Conclusions. Exercise alone or combined with dietary intervention improves serum levels of liver enzymes and liver fat or histology. Exercise exerts beneficial effects on intrahepatic triglycerides even in the absence of weight loss.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) results from fat accumulation in the liver (liver fat >5% of liver weight), which is not due to excess alcohol consumption [1]. NAFLD can present as simple fatty liver or non-alcoholic steatohepatitis [2], including cirrhosis, and represents the most common cause of chronic liver disease in Western countries [3], as well as the second leading cause of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States after hepatitis C virus infection [4]. Similarly, in Europe, about one-fourth of the general population is suffering from NAFLD [5]. The increasing prevalence of the disease worldwide is particularly worrying, since NAFLD patients are at increased risk for cardiovascular diseases [6], type 2 diabetes mellitus [7] and even chronic kidney disease [8], and appear to have higher mortality from both liver-related and non-liver-related causes when compared to the general population [9].

Early diagnosis and intervention, as well as the amelioration and prevention of serious complications, have been proposed as cost-effective strategies for NAFLD treatment. At present, therapeutic approaches focus on the management of disease-related risk factors, namely obesity, insulin resistance and hyperglycemia, dyslipidemias and inflammation/oxidative stress. Given that no medication or surgical procedure has been approved for treating NAFLD, lifestyle modifications (through dietary and exercise interventions) remain the cornerstone approach of treating patients with the disease, aiming mainly at controlling body weight and cardiometabolic disorders related to the metabolic syndrome [10–12].

Given the key role of the lifestyle interventions in the management of NAFLD, there is a need for strong and detailed evidence on the effects of exercise and diet. However, data regarding the optimal type of these interventions remain unclear. For instance, available evidence for the potential effect of diet composition on NAFLD derives mostly from observational studies with low validity, while it is still unclear which type or intensity of exercise is optimal for NAFLD management [12]. There are a few relevant systematic reviews and meta-analyses already published [13–15], however two of those earlier studies [13,14] need to be updated, as they have included a limited number of studies published until the period the meta-analysis was performed, whereas the more recent meta-analysis of Orci et al., [15] was based only on exercise interventions. Moreover, none of the currently published meta-analyses have been based exclusively on NAFLD population.

Therefore, the present meta-analysis of randomized controlled clinical trials (RCTs) in human adults aimed to evaluate the efficacy of lifestyle interventions, i.e., exercise and/or diet, on liver, anthropometric and glucose metabolism parameters in patients with precisely diagnosed NAFLD. Moreover, the effects of the type (aerobic or resistance), volume or intensity of exercise and of the type of diet, i.e. moderate-carbohydrate versus low/moderate-fat diet, were evaluated.

2. Material and Methods

2.1. Data Sources

A systematic review of published RCTs, between 01/01/2005 and 31/08/2016 was performed. The databases searched for eligible studies were Scopus (www.scopus.com) and US National Library of Medicine (PubMed.gov). The literature search was conducted by two independent researchers (CNK & MG) to identify all relevant publications. The Medical Subject Heading (MeSH) keywords used were: non-alcoholic fatty liver, NAFLD, NASH, fatty liver, hepatic steatosis, non-alcoholic steatohepatitis, aerobic exercise, endurance exercise, aerobic training, endurance training, diet, nutrition, weight loss, low-fat diet, low-carbohydrate diet, as well as combinations of the above terms. In some cases, the reference list of the retrieved articles was used to find other relevant studies. Then, a hierarchical approach on the basis of title, abstract and the full manuscript was used. The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses [16] guidelines were followed (Supplementary Table 1).

2.2. Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion criteria: RCTs of intervention with exercise and/or diet in adult (aged >18 years) patients with NAFLD, of any sex or nationality, which were published in English language, were included in the analysis. The definition of NAFLD should have been based on the following criteria: evidence of hepatic steatosis by either imaging [intrahepatic fat content ≥5% as assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (^{1}H MRS) or ultrasound] or biopsy and no presence of other causes for secondary liver fat accumulation [17]. Regarding interventions exploring the effect of diet composition on NAFLD, a moderate-carbohydrate diet was defined as a diet with carbohydrate intake of ≤45% of daily energy intake, while a low/moderate-fat diet was defined as a diet with fat intake of ≤30% of daily energy intake.

Exclusion criteria: Non-human studies, non-RCTs, case-reports and pilot studies, trials with less than 10 individuals or duration of intervention less than 1 month (due to potential lack of statistical power), trials with secondary hepatic steatosis enrollment (i.e. alcohol- or drug-induced steatosis, hepatitis C, Wilson disease, lipodystrophy,

starvation, parenteral nutrition, abetalipoproteinemia, inborn errors of metabolism), as well as review articles, were excluded from the analysis. Studies in which dietary intervention was considered as the control group compared with drug/vitamin supplements intervention group were also excluded, because the whole intervention was focused on the drug/vitamin effects. Moreover, studies in which NAFLD patients did not exclusively comprise their sample were also excluded.

2.3. Data Extraction

Two investigators (CNK & MG) independently extracted the data from the eligible RCTs in duplicate. Disagreement was resolved by a third investigator (MDK). In 7 trials [18–24] for which not all information was provided within the articles, we contacted the authors to obtain the missing details. When the required statistics were not provided, they were calculated using appropriate formulas from the available data. The authors of two trials [22,23] did not respond and these studies were excluded because of statistical discrepancies and obscurities.

2.4. Outcome Measures

Liver function outcomes assessed were changes in serum levels of liver enzymes [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)], intrahepatic triglycerides (IHTG) as assessed by ^{1}H MRS or ultrasound, as well as improvement in liver histology estimated by the NAFLD activity score (NAS), i.e. a score considering steatosis, hepatocellular ballooning and lobular inflammation [25]. Other outcome measures included changes in body weight, body mass index and waist circumference as well as parameters of glucose metabolism, namely the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and glycated hemoglobin (HbA1C).

2.5. Data Synthesis and Statistical Analysis

In total, 311 full-text studies were initially retrieved. Of those, 20 RCTs met the inclusion and exclusion criteria and were included in this meta-analysis (see flowchart in Fig. 1). The agreement between the two reviewers for study selection was 0.92. Full characteristics of the studies are presented in Supplementary Table 2. Results from two or more RCTs using the same methods were pooled together and meta-analyzed. Heterogeneity was tested using the Cochran's Q test and measured inconsistency by I^2. A random-effect model was used to estimate the pooled effect when I^2 values were ≥50%; however, both random and fixed effects models were used in all scenarios. Effect size was calculated as the standardized mean difference (SMD). Estimates of the effect size measures were weighted by the inverse of their variances. Because the clinical relevance of effect size results is difficult to be assessed [26], we used the interpretation thresholds proposed by Cohen et al. [27] to interpret our results. According to Cohen's thresholds, SMDs <0.2, ≥0.2 and <0.5, ≥0.5 and <0.8 or ≥0.8 correspond to insignificant, small, moderate, and large effect sizes, respectively. Source of heterogeneity across study characteristics was explored by subgroup analyses based on the presence of weight loss, percentage of weight loss, presence of diabetes, country of origin, as well as exercise type, intensity, volume and total intervention period time. To further explore heterogeneity, random-effects meta-regression was applied. The validity of the random-effects model was tested by sensitivity analysis, using the influence of each study on the estimated regression coefficients, by removing one study at a time; Cook's distance was used to detect possible outliers (Cook's d > 0.20 was used to identify studies responsible for non-normality of the residuals). Publication bias was evaluated by plotting a funnel plot of SMD on the horizontal axis and standard error on the vertical axis. All statistical analyses were performed in Stata 13 software using relevant commands, i.e., metan, metareg, funnel and metabias (StataCorp, College Station, TX, US).

2.6. Study Quality and Publication Bias Assessment

Study quality was evaluated using the Cochrane Risk of Bias Tool. Quality assessment was based on the following items (+1 point was attributed to each item, maximal score 8): 1) randomization, 2) allocation concealment, 3) blinding of participants, 4) blinding of personnel, 5) blinding of assessors 6) completeness of outcome data, 7) unbiased outcome reporting and 8) lack of other sources of bias. Studies were categorized as high quality if total quality score (QS) was ≥5 or low quality if QS was <5. The overall quality of the eligible studies is shown at Supplementary Table 3. Eleven RCTs were characterized as of high quality and nine as of low quality. The agreement between the two reviewers for the quality assessment was 0.90. Egger's statistical test was implemented to evaluate the evidence of publication bias [28]. For the interpretation of Egger's test, statistical significance was defined as $p < 0.1$.

3. Results

There was only one study [29] which evaluated the effect of dietary intervention alone in comparison to untreated controls and therefore meta-analysis of interventions based exclusively on dietary intervention was not feasible.

3.1. Interventions Based on Exercise Alone

Twelve studies [18–21,24,30–36] with a total of 564 NAFLD patients (341 in the intervention group, 223 in the control group) evaluated the effect of exercise alone on treating NAFLD. Three studies [33,34,36] had more than one intervention group, therefore, each type of intervention was compared with control group and analyzed. Only one RCT [36] aimed at weight loss, although five studies [20,30,31,34,35] and the resistance component of Shamsoddini et al. [33] reported a significant weight loss after intervention compared with controls. Five studies [18,31–34] evaluated the efficacy of aerobic exercise versus standard care, three studies [19,30,33] evaluated the efficacy of resistance exercise versus standard care, three studies [24,35,36] evaluated the efficacy of aerobic plus resistance exercise versus standard care, and two studies

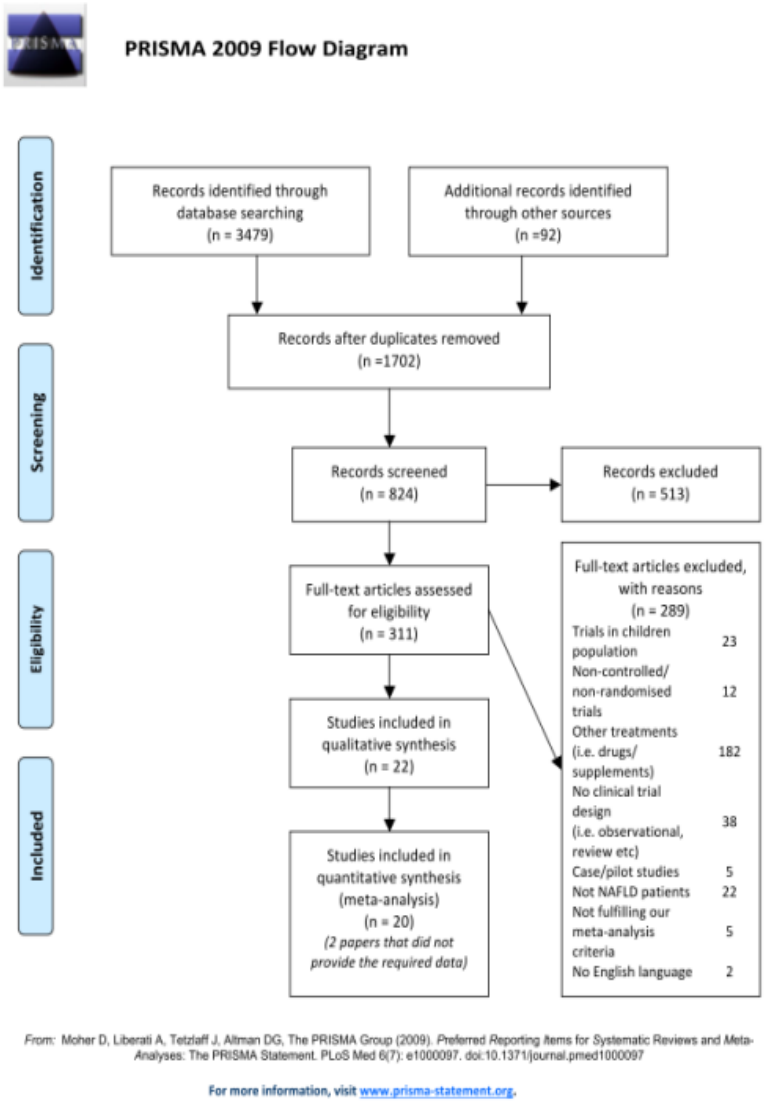


Fig. 1 – Flowchart showing the study selection process.

[21,33] compared the efficacy of aerobic exercise versus resistance exercise.

Regardless of the type of exercise (aerobic, resistance or combination), studies were categorized according to the implemented exercise intensity protocol, to continuous high intensity training (HIT), continuous moderate intensity training (MIT) and high intensity interval training (HIIT). Moreover, when volume was also taken into consideration, studies were categorized as low-to-moderate volume or moderate-to-high volume. Moderate intensity for continuous training was defined as a percentage (%) of maximal heart rate ≤ 60% (calculated as 220 – age) or % heart rate (HR) reserve ≤60% (calculated as maximal HR during cardiorespiratory fitness testing – Resting HR). Training sessions above the aforementioned percentage were classified as HIT. For HIIT, high intensity was defined as 2–3 circuits of ≥50% of one repetition maximum (the maximum amount of force that can be generated in one maximal contraction) or >16–18 rating of perceived exertion (a subjective measure of exercise intensity based on the scale proposed by Borg et al. [37]; range: 6 to 20). Low-to-moderate volume was defined as exercise ≥120 to <180 min/wk and moderate-to-high volume as ≥180 min/wk. Mean time of intervals in HIIT was 2–3 min per interval for a total of 3–5 intervals. Total minutes per week were calculated by multiplying the mean frequency with the mean duration of each exercise program implemented in the studies. According to the aforementioned information, one study [19] implemented moderate-to-high-volume continuous HIT and one [33] low-to-moderate-volume continuous HIT. In addition, four studies [18,31,34,36] implemented low-to-moderate-volume continuous MIT, two [32,35] moderate-to-high-volume continuous MIT and another two [20,24] a high-intensity interval training (HIIT). The study of Bacchi et al., implemented a moderate-to-high-volume HIT, in both aerobic

and resistance groups. One study [30] did not provide any information about the volume or the intensity of exercise. Regarding the mean frequency of exercise programs, seven studies [19–21,24,30,33,35] reported an exercise frequency program of ≤3 times/wk and three [18,34,36] more frequent exercise programs of >3 times/wk, whereas two studies [31,32] applied a 3–5 times/wk exercise protocol. Mean total intervention period time varied across studies; 2 months in two [19,33], 3 months in three [20,24,30], 4 months in five [18,21,31,35,38], 6 months in one [36], and 12 months in one study [34].

3.1.1. *Effects on Liver Parameters*

Exercise alone improved serum ALT and AST levels (Table 1 and Fig. 2). Moreover, a significant improvement based on SMD was observed in IHTG, when they were assessed either only by ^{1}H MRS (SMD = −0.79, 95% CI: −1.05 to −0.53, P < 0.001) or/and by ultrasound (SMD = −0.98, 95% CI: −1.30 to −0.66, P < 0.001). Therefore, in the following analyses results from all studies were included to explore further effects of exercise on IHTG. Not enough data were available regarding NAS score. Heterogeneity in the assessed liver function outcomes, i.e., ALT (Cochran's Q = 26.86 (12), P = 0.008, I^2 = 55.3%), AST (Cochran's Q = 21.58 (10), P = 0.017, I^2 = 53.7%) and IHTG (Cochran's Q = 29.03 (11), P = 0.002, I^2 = 62.1%) was observed. Meta-regression analysis revealed that heterogeneity in ALT, AST as well as IHTG was attributed to the different intensity and volume of exercise protocols (P = 0.042, P = 0.046 and P = 0.003, respectively).

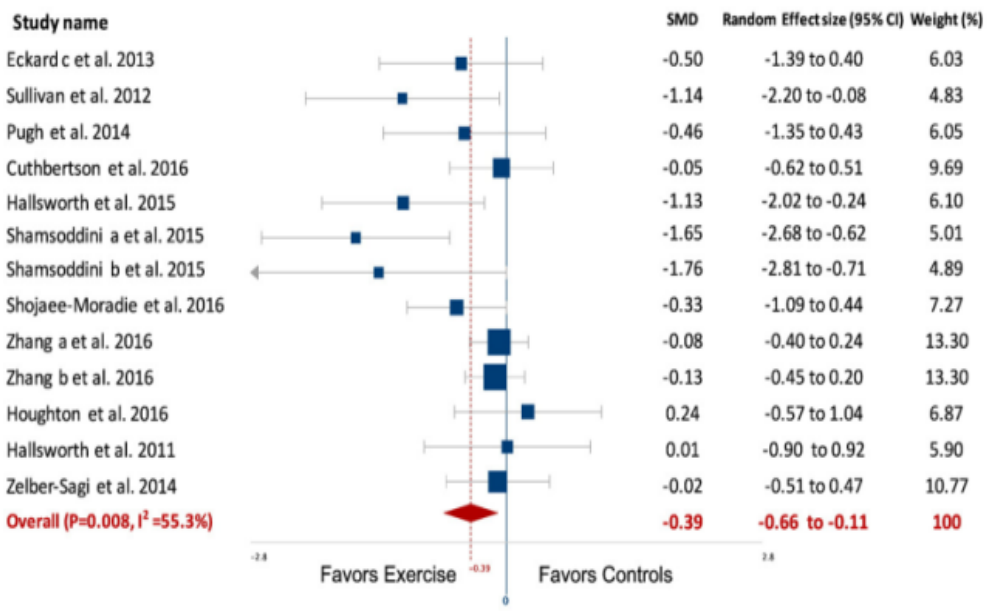
When aerobic exercise was compared to usual care, analysis showed improvements on ALT (SMD = −0.36, 95% CI: −0.73 to −0.001, P = 0.05, I^2 = 58.4%) and IHTG (SMD = −0.84 95% CI: −1.27 to −0.42, P < 0.001, I^2 = 66.6%). A trend for decrease was found on AST levels (SMD = −0.34, 95% CI: −0.71 to 0.03, P = 0.07, I^2 = 61.4%), however aerobic exercise did not improve GGT levels (SMD = −0.03, 95% CI: −0.24 to 0.17, P = 0.73, I^2 = 0.0%). Heterogeneity in ALT and IHTG levels was attributed to the presence of weight loss (P = 0.025 and P = 0.05, respectively). Furthermore, comparing resistance exercise to usual care, improvements were limited only to IHTG levels (SMD = −1.05, 95% CI: −1.87 to −0.24, P = 0.011, I^2 = 65.1%). Similarly, the combination of resistance and aerobic exercise, compared to usual care, showed improvements only on IHTG levels (SMD = −1.54, 95% CI: −2.56 to −0.52, P = 0.003, I^2 = 60.5%). The significant heterogeneity found in IHTG in both resistance and resistance plus aerobic exercise compared to usual care, although further explored, could not be attributed to a certain factor. No significant effects were noticed on ALT (P = 0.31 and P = 0.45, respectively), AST (P = 0.43 and P = 0.42, respectively) or GGT levels (P = 0.17 for resistance plus aerobic only) by both types of exercise (i.e. resistance or resistance plus aerobic). Comparisons between aerobic and resistance exercise, based on the only two existing studies [21,33], did not yield any statistically different improvements on ALT (SMD = 0.41, 95% CI: −0.15 to 0.96, P = 0.15, I^2 = 0.0%), AST (SMD = −0.11, 95% CI: −0.82 to 0.60, P = 0.77, I^2 = 36.6%) and IHTG (SMD = −0.21, 95% CI: −0.77 to 0.35, P = 0.46, I^2 = 0.0%).

Furthermore, when studies were categorized according to the intensity, regardless of the type of exercise, subgroup analysis revealed that continuous HIT provided the most powerful and strongest effect on IHTG (SMD = −1.90, 95% CI: −3.17 to −0.63, P = 0.003, I^2 = 74.3%), whereas continuous MIT and HIIT provided lower, but rather similar reductions (MIT: SMD = −0.86, 95% CI: −1.36 to −0.34, P = 0.001, I^2 = 63.5% vs. HIIT: SMD = −0.93, 95% CI: −1.53 to 0.32, P = 0.003, I^2 = 0.0%). Apart from intensity, when exercise volume was also taken into consideration, continuous moderate-to-high-volume MIT showed greater improvements on IHTG (SMD = −1.69, 95% CI: 2.53 to −0.85, P < 0.001, I^2 = 27.4%) compared to continuous low-to-moderate-volume MIT (SMD = −0.50, 95% CI: −0.77 to −0.23, P < 0.001, I^2 = 0.0%) or HIIT (SMD = −0.93, 95% CI: −1.53 to 0.32, P = 0.003, I^2 = 0.0%). Unfortunately, comparisons between low-to-moderate volume or moderate-to-high volume HIT with MIT or HIIT were not feasible, due to

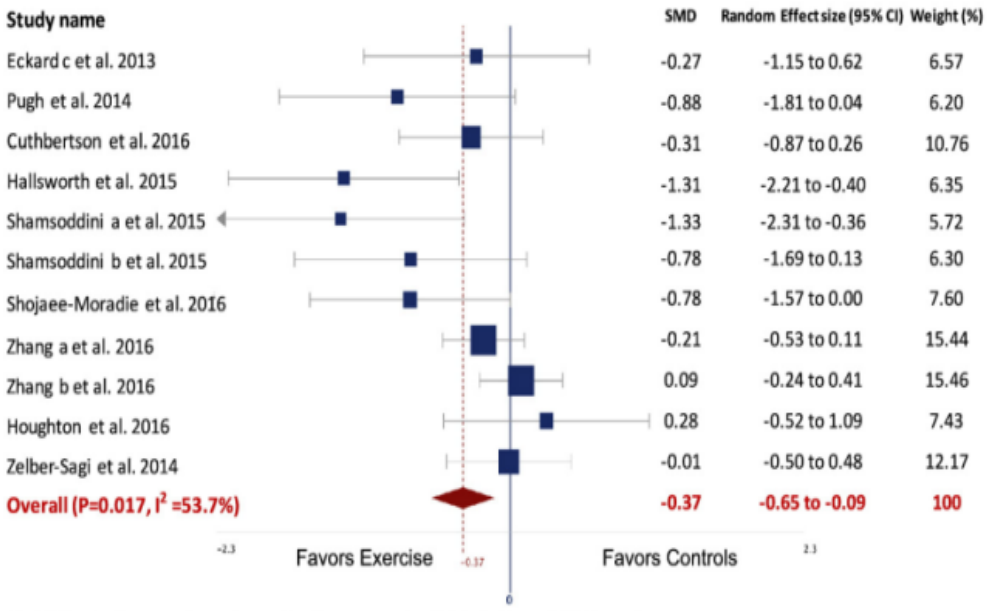
Table 1 – Pooled effect sizes based on exercise only interventions or in combination with diet and moderate-carbohydrate vs. low/moderate-fat diet diets in treating non-alcoholic fatty liver disease.

Outcomes	Exercise only Intervention				Diet + Exercise Intervention				Moderate-carbohydrate vs. low/moderate-fat diet			
	SMD	95% CI	P-value	I^2	SMD	95% CI	P-value	I^2	SMD	95% CI	P-value	I^2
ALT (IU/L)	−0.39	−0.66 to −0.11	0.006	55.3%	−0.58	−0.80 to −0.37	<0.001	48.9%	0.05	−0.27 to 0.36	0.78	0.0%
AST (IU/L)	−0.37	−0.65 to −0.09	0.009	53.7%	−0.35	−0.80 to 0.09	0.12	72.0%	0.28	−0.26 to 0.82	0.31	55.6%
GGT (IU/L)	−0.16	−0.33 to 0.02	0.08	39.6%	−0.32	−1.11 to 0.47	0.43	78.2%	ND	ND	ND	ND
NAS score	ND	ND	ND	ND	−0.61	−1.09 to −0.13	0.01	0.0%	ND	ND	ND	ND
IHTG (%)	−0.98	−1.30 to −0.66	<0.001	62.1%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Weight (kg)	NE	NE	NE	NE	−0.56	−1.45 to 0.32	0.21	85.2%	0.17	−0.16 to 0.49	0.32	3.9%
BMI (kg/m^2)	NE	NE	NE	NE	−0.66	−1.08 to −0.24	0.002	64.4%	0.01	−0.31 to 0.33	0.95	0.0%
WC (cm)	−0.60	−0.78 to −0.42	<0.001	0.0%	−0.46	−0.80 to −0.12	0.008	23.0%	ND	ND	ND	ND
HOMA-IR	−0.76	−1.47 to −0.05	0.037	80.0%	−1.17	−2.41 to 0.07	0.06	90.8%	ND	ND	ND	ND
HbA1c (%)	−0.50	−0.85 to −0.15	0.005	0.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ALT: alanine aminotransferase, **AST**: aspartate aminotransferase, **BMI**: body mass index, **CI**: confidence interval, **GGT**: gamma-glutamyl transpeptidase, **HbA1c**: glycated hemoglobin, **HOMA-IR**: homeostatic model assessment-insulin resistance, **I^2**: I squared (inconsistency index), **IHTG**: intrahepatic triglycerides, **NAS**: non-alcoholic fatty liver disease activity score, **ND**: not enough data for analysis, **NE**: not evaluated, **SMD**: standardized mean difference, **WC**: waist circumference.



a. Effect of exercise alone (left) vs. control (right) on ALT levels

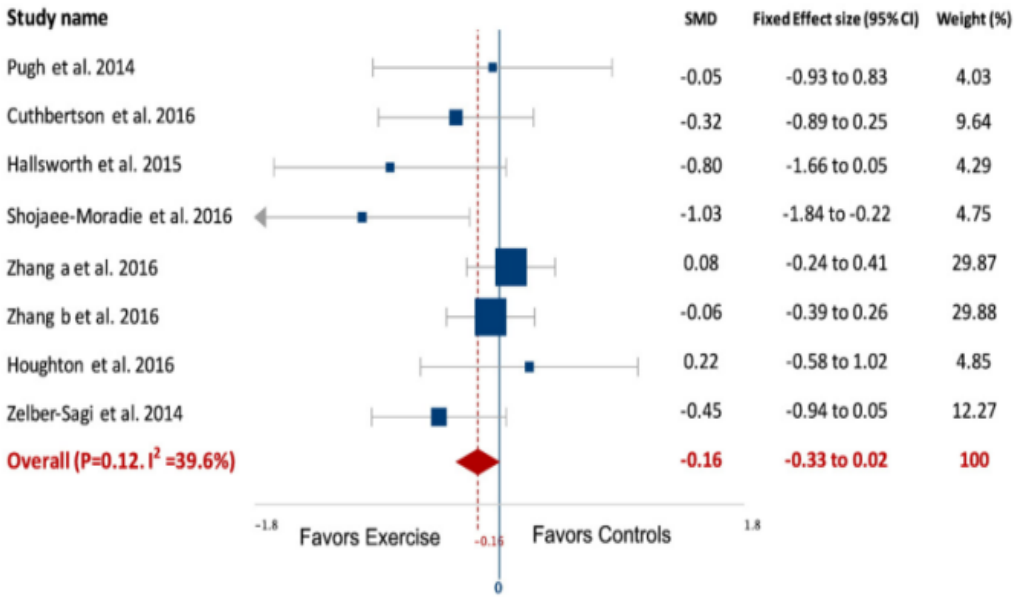


b. Effect of exercise alone (left) vs. control (right) on AST levels

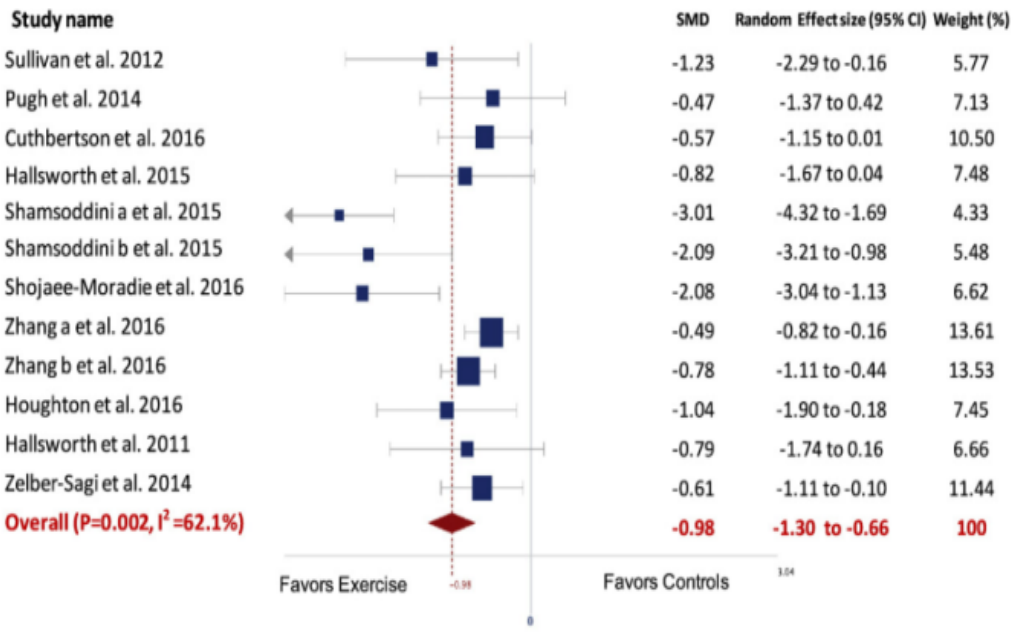
Fig. 2 – Effect of exercise alone vs. control on ALT (a), AST (b), GGT (c) and IHTG (d) in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Interventions based on exercise, compared to control, yielded a significant decrease in ALT (SMD = −0.39, 95% CI: −0.66 to −0.11, P = 0.006), AST (SMD = −0.37, 95% CI: −0.65 to −0.09, P = 0.009) and IHTG levels (SMD = −0.98, 95% CI: −1.30 to −0.66, P < 0.001), but not GGT (SMD = −0.16, 95% CI: −0.33 to 0.02, P = 0.08). Significant heterogeneity among studies was observed in ALT (I^2 = 55.3%, P = 0.008), AST (I^2 = 53.7%, P = 0.017) and IHTG (I^2 = 62.1%, P = 0.002), but not GGT (I^2 = 39.6%, P = 0.12). ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, IHTG: intrahepatic triglycerides, SMD: standardized mean difference.

insufficient data. Further subgroup analysis taking into account the type, volume and intensity of exercise protocols at the same time, was also not possible due to lack of data. Accordingly, results regarding the optimal total intervention period were inconclusive due to the wide range of the intervention periods implemented.

The effect of exercise alone on IHTG levels was unaffected by body weight change. Analyzing only the studies in which



c. Effect of exercise alone (left) vs. control (right) on GGT levels



d. Effect of exercise alone (left) vs. control (right) on IHTG

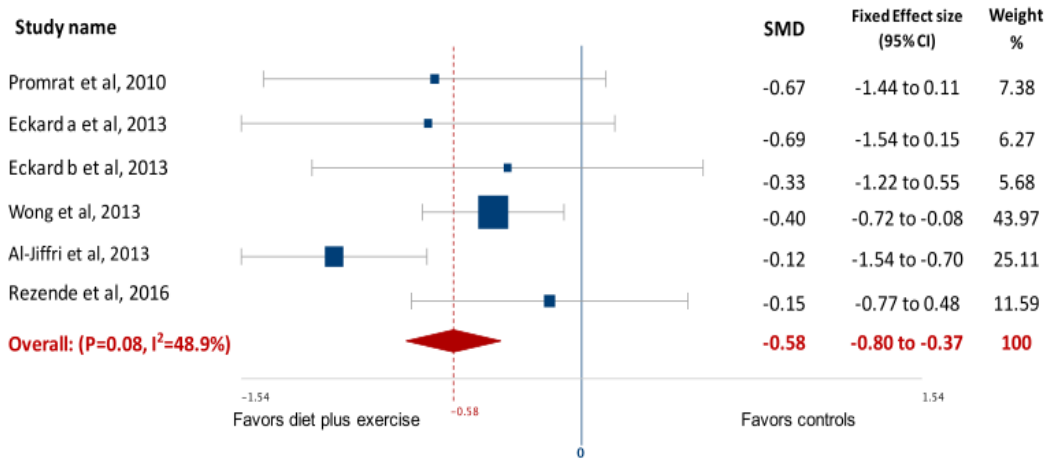
Fig. 2 – (*continued*).

no statistically significant body weight reduction was observed in participants (mean weight change = −0.53 ± 2.32 kg), the effect of exercise on IHTG remained significant (SMD = −0.86, 95% CI: −1.32 to −0.40, P < 0.01, I^2 = 0.0%). Nevertheless, improvements in serum ALT (SMD = −0.31, 95% CI: −0.76 to 0.13, P = 0.17, I^2 = 18.4%), AST (SMD = −0.26, 95% CI: −0.92 to 0.40, P = 0.45, I^2 = 42.8%) and GGT levels (SMD = 0.09, 95% CI: −0.50 to 0.69, P = 0.74, I^2 = 0.0%) were not significant when only studies with no significant weight loss were analyzed.

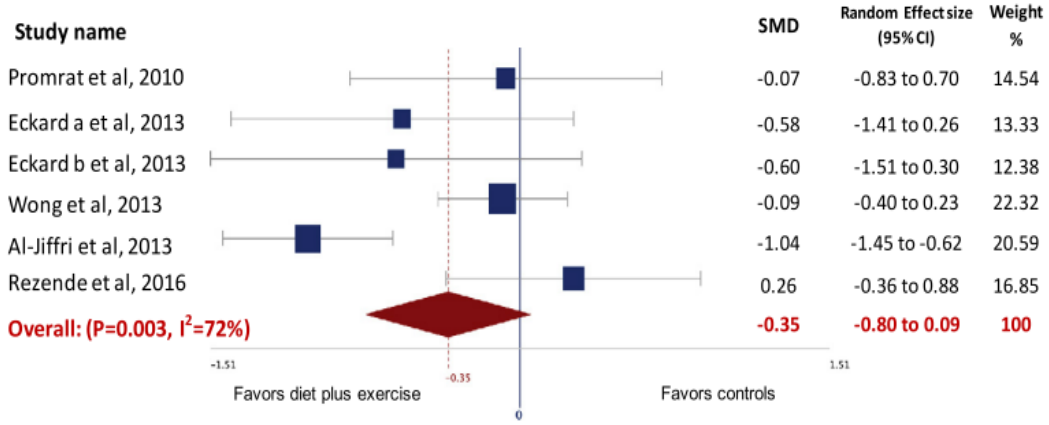
A significant publication bias was observed for the effect of exercise on ALT (P = 0.015), AST (P = 0.016) and IHTG (P = 0.012) as evaluated by Egger's test and funnel plots (data not shown).

3.1.2. *Effects on Anthropometric Parameters*

Exercise alone improved WC significantly (Table 1). Neither heterogeneity (Cochran's Q = 5.47 (8), P = 0.71, I^2 = 0.0%) nor a significant publication bias was observed (data not presented).



a. Effect of diet plus exercise (left) vs. control (right) on ALT levels



b. Effect of diet plus exercise (left) vs. control (right) on AST levels

Fig. 3 – Effect of diet plus exercise vs. control on ALT (a), AST (b), GGT (c) and NAS score (d) in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Interventions based on diet and exercise, compared to control, yielded a significant decrease in ALT (SMD = −0.58, 95% CI: −0.80 to −0.37, P < 0.001) and NAS score (SMD = −0.61, 95% CI: −1.09 to −0.13, P = 0.01), but not AST (SMD = −0.35, 95% CI: −0.80 to 0.09, P = 0.12) and GGT (SMD = −0.32, 95% CI: −1.11 to 0.47, P = 0.43). Significant heterogeneity among studies was observed in AST (I^2 = 72.0%, P = 0.003) and GGT (I^2 = 78.2%, P = 0.032), but not ALT (I^2 = 48.9%, P = 0.08) and NAS score (I^2 = 0.0%, P = 0.98). ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance, NAS score: non-alcoholic fatty liver disease activity score, SMD: standardized mean difference.

3.1.3. *Effects on Glucose Metabolism*

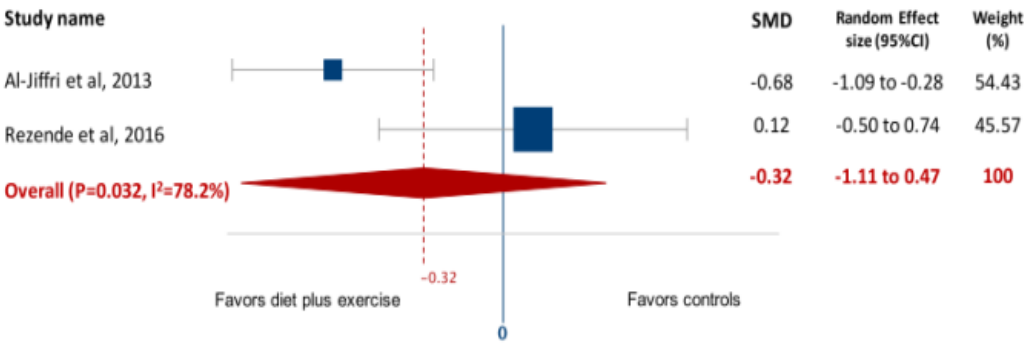
Exercise alone improved HbA1c and HOMA-IR (Table 1). Heterogeneity was low regarding HbA1c (Cochran's Q = 0.58 (3), P = 0.90, I^2 = 0.0%) but high for HOMA-IR (Cochran's Q = 29.93 (6), P < 0.001, I^2 = 80.0%) (Table 1). Meta regression analysis showed that heterogeneity in HOMA-IR was attributed to the different intensity and duration of exercise (P = 0.048). The effect of exercise alone on HbA1c and HOMA-IR was unaffected by weight loss. Analyzing only studies with no statistically significant weight reduction, exercise alone improved both HbA1C (SMD = −0.66, 95% CI: −1.28 to −0.042, P = 0.86, I^2 = 0.0%) and HOMA-IR (SMD = −0.61, 95% CI: −1.14 to −0.09, P = 0.07, I^2 = 61.1%). No significant publication bias was observed for HbA1c or HOMA-IR (data not presented).

3.2. *Interventions Based on Diet Plus Exercise*

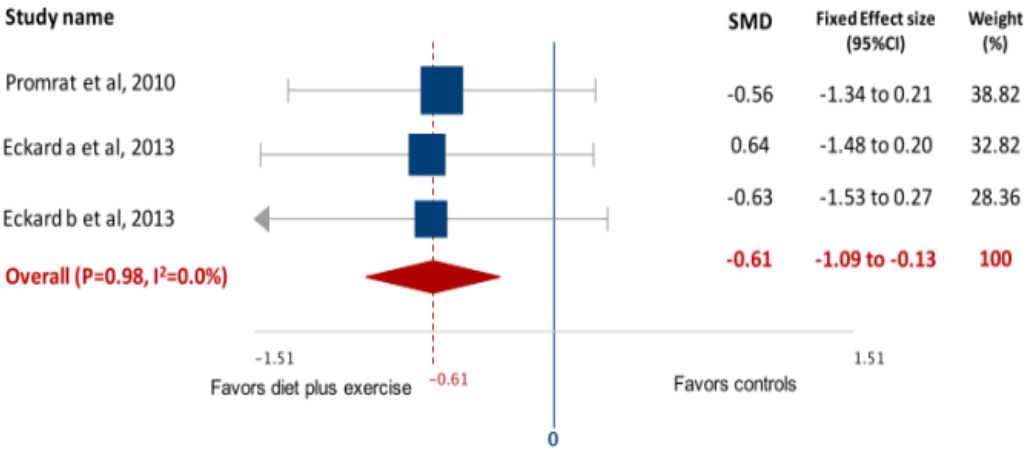
Four studies [39–42] and the two groups of Eckard et al. [36] with a total of 357 NAFLD patients (188 in the intervention group, 169 in the control group) evaluated the efficacy of a diet plus exercise intervention on parameters related to NAFLD. All studies aimed at weight loss, but at the end of intervention only three studies [39–41] achieved statistically significant weight loss compared to controls.

3.2.1. *Effects on Liver Parameters*

Regarding serum liver enzymes, intervention based on diet plus exercise improved only ALT. A significant improvement was also observed in liver histology based on the NAS score (Table 1). Data



c. Effect of diet plus exercise (left) vs. control (right) on GGT levels



d. Effect of diet plus exercise (left) vs. control (right) on NAS score

Fig. 3 – (continued).

regarding interventions' impact on IHTG were not enough to allow further analysis. Heterogeneity was low regarding ALT (Cochran's Q = 9.79 (5), P = 0.08, I^2 = 48.9%) and NAS score (Cochran's Q = 0.02, P = 0.99, I^2 = 0.0%) (Table 1 and Fig. 3).

Furthermore, to assess the effect of weight loss on serum liver enzymes, subgroup analysis was conducted. Results showed improvements in liver enzymes only under weight loss conditions (ALT: SMD = −0.66, 95% CI: −0.90 to −0.42, P < 0.001, I^2 = 71.9% vs. no weight reduction; SMD = −0.34, 95% CI: −0.77 to 0.09, P = 0.13, I^2 = 0.0%), (AST: SMD = −0.40, 95% CI: −0.64 to −0.16, P = 0.001, I^2 = 85.5% vs. no weight reduction; SMD = −0.17, 95% CI: −0.61 to 0.27, P = 0.16, I^2 = 45%). Unfortunately, no subgroup analysis could be done for GGT and NAS, due to insufficient data.

No significant publication bias was found for all of the aforementioned liver function outcomes (data not presented).

3.2.2. *Effects on Anthropometric Parameters*

Diet plus exercise decreased BMI and WC. Heterogeneity regarding BMI (Cochran's Q = 8.44 (3), P < 0.038, I^2 = 64.4%) was observed, but not for WC (Cochran's Q = 2.60 (2), P = 0.27, I^2 = 23.0%) (Table 1). No significant publication bias was found for BMI and WC (data not presented).

3.2.3. *Effects on Glucose Metabolism*

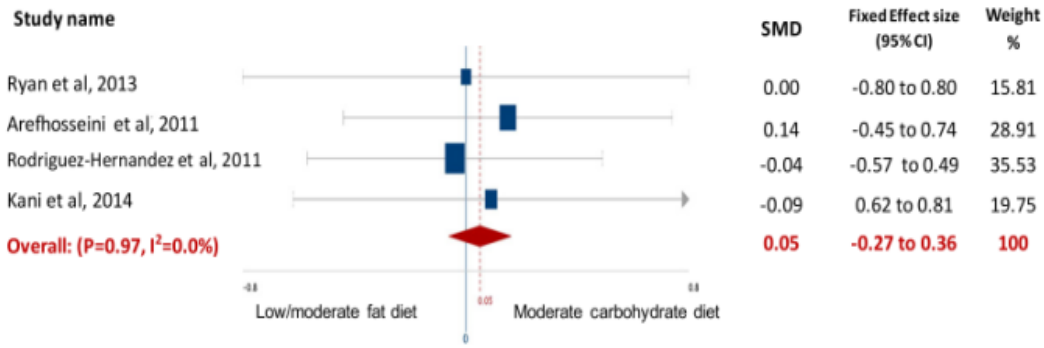
Intervention based on diet plus exercise marginally improved HOMA-IR. No improvements were found for HbA1c. Heterogeneity in HOMA-IR (Cochran's Q = 21.65 (2), P < 0.001), I^2 = 90.8%) was observed. No significant publication bias was found for HOMA-IR.

3.3. *Type of Diet*

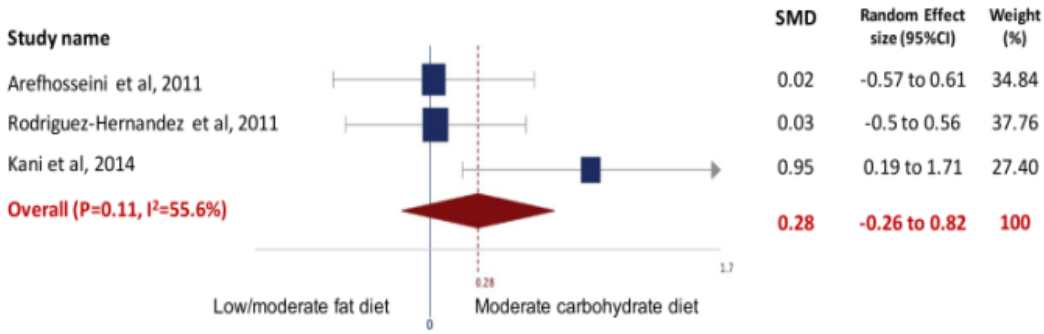
Four studies [43–46] evaluated the efficacy of moderate-carbohydrate diet (77 patients) versus low/moderate-fat diet (75 patients) in patients with NAFLD (Fig. 4). The characteristics of the diets are shown at Supplementary Table 2. Three of these studies [44–46] aimed at weight loss.

3.3.1. *Effects on Liver Parameters*

According to the estimated pooled effect, the efficacy of the two diets in lowering ALT and AST was similar (Table 1). Heterogeneity of the effect measures regarding ALT (Cochran's Q = 0.23, P = 0.97, I^2 = 0.0%) and AST (Cochran's Q = 4.50 (2), P = 0.11, I^2 = 55.6%) was low. Not enough data to explore the effect of the type of diets on IHTG, NAS score and GGT (Table 1) were



a. Effect of moderate carbohydrate (right) vs. low/moderate fat diet (left) on ALT levels



b. Effect of moderate carbohydrate (right) vs. low/moderate fat diet (left) on AST levels

Fig. 4 – Effect of moderate-carbohydrate vs. low/moderate-fat diet on ALT (a) and AST (b) in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Moderate-carbohydrate compared to low/moderate-fat diets had similar effects on ALT (SMD = −0.05, 95% CI: −0.27 to 0.36, P = 0.78) and AST (SMD = 0.28, 95% CI: −0.26 to 0.82, P = 0.31). A significant heterogeneity among studies was observed for AST (I^2 = 55.6%, P = 0.11), but not for ALT (I^2 = 0.0%, P = 0.97). ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, SMD: standardized mean difference.

available. No significant publication bias was observed (data not shown).

3.3.2. *Effects on Anthropometric Parameters*

Interventions based on either moderate-carbohydrate or low/moderate-fat diet brought similar reductions in weight and BMI (Table 1). Heterogeneity was low regarding weight loss (Cochran's Q = 3.12 (3), P = 0.37, I^2 = 3.9%) and BMI (Cochran's Q = 1.11 (3), P = 0.77, I^2 = 0.0%). Not enough data were available to explore the effect of the type of diets on WC. No significant publication bias (data not presented) was observed.

3.3.3. *Effects on Glucose Metabolism*

There were not enough data to explore the effect of the type of diets on HOMA-IR and HbA1c.

4. Discussion

The present meta-analysis of RCTs, in which NAFLD diagnosis was based on either imaging techniques or liver biopsy, supports the beneficial effect of exercise, alone or in combination with diet, on NAFLD management. Regarding the optimal diet composition, both moderate-carbohydrate and low/moderate-fat diets yielded similar results with regard to reductions in serum liver enzymes. Weight loss, along with the intensity and volume of exercise programs, was the main contributor to the heterogeneity observed in the effect of exercise only interventions, whereas only weight loss contributed to the heterogeneity in the exercise plus diet interventions.

Our results suggest that exercise alone has a large effect (SMD = 0.98) on IHTG levels that remains large, even in the absence of weight loss (SMD = 0.86). Aerobic exercise, compared to usual care, improved most liver function outcomes, whereas improvements of resistance or its combination with aerobic exercise, compared to usual care, were limited to IHTG. Nevertheless, when aerobic exercise was compared to resistance exercise, none of the exercise types seemed to be superior to the other. Regarding exercise intensity, continuous HIT was found to be the most beneficial on IHTG, compared to continuous MIT or HIIT. However, when exercise volume was also taken into consideration, moderate-to-high-

volume continuous MIT (i.e., ≥180 min/wk) proved to be more effective in reducing IHTG compared to low-to-moderate-volume continuous MIT (i.e., ≥120 to <180 min/wk) or HIIT. To the best of our knowledge, this is the first meta-analysis evaluating the effect of exercise, including two important components of exercise, i.e., intensity and volume, on liver function outcomes. A beneficial effect of exercise alone was also observed on measured serum liver enzymes (ALT, AST), however, weight reduction seemed to be essential for improving liver enzymes, since when analyzing only the studies with no significant weight loss, no improvements were found. On the contrary, improvements in HOMA-IR and HbA1c after exercise only interventions were independent of weight loss, although weight loss has been repeatedly shown to improve glucose homeostasis indices and should be encouraged in all overweight individuals with or at risk of type 2 diabetes mellitus [47–49]. Unfortunately, no data existed regarding the effect of exercise on liver histology.

The aforementioned results are in line with previous meta-analyses. The meta-analysis of Musso et al. [13] concluded similar results regarding ALT, IHTG, WC and HbA1c, however, no information was provided for other liver enzymes, i.e., AST and GGT, as well as for the type, intensity and volume of exercise. Moreover, authors included RCTs published until November 2011, in some of which NAFLD definition was based only on abnormal liver enzymes. Furthermore, another meta-analysis published in the same year [14] showed a beneficial effect of exercise on liver fat but not on ALT levels. Nevertheless, no information about other liver enzymes was provided, while the population included was not exclusively NAFLD patients. Regarding the type and intensity of exercise, data were limited at that time and authors just reviewed them. Furthermore, in a recent meta-analysis and meta-regression published by Orci et al. [15], exercise intervention was found to be associated with a significant reduction in liver fat content and serum levels of ALT and AST; however, this analysis was also not based exclusively on NAFLD patients. Specifically, most of the included studies incorporated sedentary obese patients, irrespective of a concrete NAFLD diagnosis, a fact that limits the importance of the aforementioned results for NAFLD patients.

Based on the current literature, both exercise volume and intensity, can offer important health benefits; for example, high exercise volume can significantly improve glycemic control in patients with type 2 diabetes [50], whereas high exercise intensity has been associated with greater cardio-protection compared to moderate exercise [51]. However, no clear advantage of MIT or HIIT has been so far reported [52,53] regarding cardio-metabolic function outcomes. Similarly, the current meta-analysis supports that exercise should be encouraged in all NAFLD patients where appropriate and may be promoted in individuals less engaged in dietary recommendations or combined with diet for better outcomes [54]. As no specific recommendations on the amount of exercise exist [12], this meta-analysis suggests that even lower volumes of moderate intensity exercise per week could have a beneficial effect, despite the superiority of higher volumes or higher intensities. Nevertheless, in case of lack of time, HIIT can be implemented instead of moderate intensity exercise as an efficient alternative.

The underlying mechanism for the direct effect of exercise on liver fat and serum liver enzymes is not fully understood. Apart from well-known improvements in general measures of glucose tolerance and insulin sensitivity [55], experiments in rats show that exercise induces several hepatic metabolic adaptations, including (a) decreased delivery of substrates (serum triglycerides and/or free fatty acids), (b) increased mitochondrial oxidation of lipids, (c) decreased lipid anabolic processes and (d) reduction in hepatic lipid stores [56], as well as the attenuation and/or reversion of NAFLD-related endoplasmic reticulum stress that has been associated to hepatic steatosis, insulin resistance, inflammation, oxidative stress and hepatocyte death, all contributing to liver dysfunction [57].

Interventions based on a combination of exercise and diet showed improvements not only in serum levels of liver enzymes, but also in liver histology, as assessed by NAS score. The improvements in ALT levels in the exercise and diet interventions were greater than those observed after exercise only interventions. Moreover, weight loss seemed to be the main contributor for the improvements on serum liver enzymes, as beneficial effects were observed only under weight loss conditions. These results are in line with those of Musso et al. [13], suggesting that weight loss through lifestyle interventions is safe and can improve histological and metabolic parameters in NAFLD. It is worth mentioning that although the results of two recently published interventional studies seem to be very promising [40,58], regarding the exact percentage of weight loss required for NAFLD resolution, the current meta-analysis could not confirm such outcomes due to insufficient data.

Regarding the macronutrient content of the diet, it remains controversial whether dietary carbohydrates or fats have a more detrimental effect on liver function. Both excessive fat [59] and carbohydrate [60] intakes (mainly as sugars, accompanied by excessive energy intake [61]) have been proposed as risk factors for NAFLD development. The present meta-analysis supports that both moderate-carbohydrate (i.e., carbohydrate ≤45% of daily energy intake) and low/moderate-fat (i.e., fat ≤30% of daily energy intake) diets can equally improve liver function, as depicted by reductions in ALT and AST. However, a comparison between low-carbohydrate diets (i.e., carbohydrate <40% of daily energy intake) and low-fat diets (i.e., fat <25% of daily energy intake) was impossible, because there were not enough RCTs for this purpose. Nevertheless, Browning et al. [62] showed that a very low-carbohydrate diet (<20 g/day), compared to a diet with fat intake of 34% of daily energy intake, could actually have favorable effects on IHTG. Several studies have indicated that a high carbohydrate intake, mainly in the form of fructose, can induce NAFLD through up-regulation of hepatic de novo lipogenesis and by bypassing the control point of phosphofructokinase, where glycolytic rate is limited by citrate and ATP [63]. Unfortunately, the dietary composition in the existing studies is very variable and that is why we proceeded into the rather wide categorization of "moderate-carbohydrate" and "low/moderate-fat" diets. However, such a categorization does not allow clear interpretations for the clinical practice and more studies are needed in this field to allow future comparisons between different dietary compositions.

This meta-analysis summarizes the findings of high-quality RCTs in the field of NAFLD management, and provides detailed evidence of the role of lifestyle interventions based on exercise, diet, or their combination, in improving liver function outcomes in NAFLD patients diagnosed by imaging or biopsy. One limitation of the present work was the significant heterogeneity among the available studies, which introduces a warning about the generalization of the present findings. However, using meta-regression analysis, the source of heterogeneity was explored, to allow a better interpretation of our results. Regarding publication bias, although we thoroughly searched literature for published studies, we cannot rule out the possibility of not having included studies reporting null effects that remain often unpublished. Thus, it is difficult to exclude the possibility of analyzing only studies with positive results. Nevertheless, we assessed studies' quality both using Cochrane Risk of Bias Tool and through communications with authors to verify their original study results, and thus we believe that the aforementioned bias has a negligible effect on the present findings. Other limitations include the fact that only studies published in English were included in the present analysis, as it was impossible to assess studies written in other languages, as well as the fact that we were not able to control for some other factors in our analyses, such as body composition, changes of which could undoubtedly mediate the effect of lifestyle interventions on liver function outcomes. Moreover, even though changes in serum levels of liver enzymes are clinically meaningful regarding NAFLD management, the normalization of their levels, especially those of ALT, would definitely be a more robust indicator of NAFLD resolution; however, such data were unavailable in most included RCTs and thus a meta-analysis with such an endpoint could unfortunately not be performed. Last but not least, no conclusion could be drawn about the optimal exercise mode, as analyzing data in regards to type, intensity and volume at the same time, was not feasible, as well as for the optimal composition of diet, due to the large variety of the implemented protocols in the retrieved RCTs. Given that lifestyle interventions remain the cornerstone for NAFLD management, and that there is a need for strong evidence on their effects, this meta-analysis holds great translational potential for NAFLD treatment and contributes to the improvement of patients' care in clinical practice, but also to the design of proper future study protocols.

5. Conclusions

The current meta-analysis, based only on RCTs, provides strong evidence that exercise alone or in combination with a dietary intervention improves serum levels of liver enzymes, intrahepatic fat content or even liver histology in patients with NAFLD. Exercise exerts its beneficial effects on IHTG even in the absence of weight loss, while continuous moderate-to-high-volume MIT seems to be superior to continuous low-to-moderate-volume MIT or HIIT exercise protocols. Moderate-carbohydrate diets and low/moderate-fat diets provide similar effects on liver function outcomes; however, due to lack of sufficient data, the effect of diet composition on NAFLD management deserves further study.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2016.12.006.

Authorship

CNK, DBP and MDK contributed to the study concept and design, CNK and MG contributed to the acquisition, analysis and interpretation of the data, CNK drafted the manuscript, GVP, DBP and MDK critically revised the manuscript, CNK and DBP performed the statistical analyses.

Financial Disclosure

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

CNK has received a Fellowship of Excellence for Post-graduate Research in Greece—Siemens Program, awarded by the State Scholarships Foundation (I.K.Y.). The authors would like to thank Houghton D et al. [24], Sullivan S et al. [18], Hallsworth K et al. [19,20] and Bacchi et al. [21] for providing additional data upon request and Giannis Arnaoutis for his feedback in the interpretation of the study results regarding the exercise only component.

Conflict of Interest

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

[1] Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. Hepatology 2003;37:1202–19.
[2] Hourigan SK, Abrams S, Yates K, Pfeifer K, Torbenson M, Murray K, et al. Relation between vitamin D status and nonalcoholic fatty liver disease in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2015;60:396–404.
[3] Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini GA. Position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. J Hepatol 2010;53:372–84.
[4] Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. Gastroenterology 2015;148:547–55.
[5] Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. Metab Clin Exp 2016;65:1017–25.
[6] Miele L, Targher G. Understanding the association between developing a fatty liver and subsequent cardio-metabolic complications. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2015;9:1243–5.
[7] Kasturiratne A, Weerasinghe S, Dassanayake AS, Rajindrajith S, de Silva AP, Kato N, et al. Influence of non-alcoholic fatty

liver disease on the development of diabetes mellitus. J Gastroenterol Hepatol 2013;28:142–7.
[8] Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med 2014;11:e1001680.
[9] Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. Histopathology 2012;61: 141–52.
[10] Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. BMC Med 2010;8:41.
[11] Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. Clin Sci (Lond) 2008;115:141–50.
[12] Mahady SE, George J. Exercise and diet in the management of nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism 2016;65:1172–82.
[13] Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. Diabetologia 2012;55:885–904.
[14] Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. J Hepatol 2012;57:157–66.
[15] Orci LA, Gariani K, Oldani G, Delaune V, Morel P, Toso C. Exercise-based interventions for nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis and meta-regression. Clin Gastroenterol Hepatol 2016.
[16] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. J Clin Epidemiol 2009;62:1006–12.
[17] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology 2012;55:2005–23.
[18] Sullivan S, Kirk EP, Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2012;55:1738–45.
[19] Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. Gut 2011;60:1278–83.
[20] Hallsworth K, Thoma C, Hollingsworth KG, Cassidy S, Anstee QM, Day CP, et al. Modified high-intensity interval training reduces liver fat and improves cardiac function in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. Clin Sci (Lond) 2015;129:1097–105.
[21] Bacchi E, Negri C, Targher G, Faccioli N, Lanza M, Zoppini G, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 randomized trial). Hepatology 2013;58:1287–95.
[22] Sun WH, Song MQ, Jiang CQ, Xin YN, Ma JL, Liu YX, et al. Lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease in Chengyang District, Qingdao, China. World J Hepatol 2012;4: 224–30.
[23] St George A, Bauman A, Johnston A, Farrell G, Chey T, George J. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2009;50: 68–76.
[24] Houghton D, Thoma C, Hallsworth K, Cassidy S, Hardy T, Burt AD, et al. Exercise reduces liver lipids and visceral adiposity in patients with non-alcoholic steatohepatitis in a randomized controlled trial. Clin Gastroenterol Hepatol 2016.
[25] Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. Hepatology 2007;45:846–54.
[26] Faraone SV. Interpreting estimates of treatment effects: implications for managed care. P T 2008;33:700–11.
[27] Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ: L. Erlbaum Associates; 1988.
[28] Egger M, Zellweger-Zahner T, Schneider M, Junker C, Lengeler C, Antes G. Language bias in randomised controlled trials published in English and German. Lancet 1997;350:326–9.
[29] Yamamoto M, Iwasa M, Iwata K, Kaito M, Sugimoto R, Urawa N, et al. Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol 2007;22:498–503.
[30] Zelber-Sagi S, Buch A, Yeshua H, Vaisman N, Webb M, Harari G, et al. Effect of resistance training on non-alcoholic fatty-liver disease a randomized-clinical trial. World J Gastroenterol 2014;20:4382–92.
[31] Cuthbertson DJ, Shojaee-Moradie F, Sprung VS, Jones H, Pugh CJ, Richardson P, et al. Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homoeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond) 2016;130:93–104.
[32] Pugh CJ, Spring VS, Kemp GJ, Richardson P, Shojaee-Moradie F, Umpleby AM, et al. Exercise training reverses endothelial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014;307:H1298–306.
[33] Shamsoddini A, Sobhani V, Ghamar Chehreh ME, Alavian SM, Zaree A. Effect of aerobic and resistance exercise training on liver enzymes and hepatic fat in Iranian men with nonalcoholic fatty liver disease. Hepat Mon 2015;15:e31434.
[34] Zhang HJ, He J, Pan LL, Ma ZM, Han CK, Chen CS, et al. Effects of moderate and vigorous exercise on nonalcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. JAMA Intern Med 2016; 176:1074–82.
[35] Shojaee-Moradie F, Cuthbertson DJ, Barrett M, Jackson NC, Herring R, Thomas EL, et al. Exercise training reduces liver fat and increases rates of VLDL clearance, but not VLDL production in NAFLD. J Clin Endocrinol Metab 2016;101:4219–28.
[36] Eckard C, Cole R, Lockwood J, Torres DM, Williams CD, Shaw JC, et al. Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial. Ther Adv Gastroenterol 2013;6:249–59.
[37] Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. Med Sci Sports Exerc 1982;14:377–81.
[38] Pugh C, Jones H, Sprung V, Richardson P, Shojaee-Moradie F, Margot Umpleby A, et al. Improvements in liver fat and endothelial function following supervised exercise training are not sustained one-year after the cessation of supervision in non-alcoholic fatty liver disease: 1948 board #100 June 2, 2:00 PM–3:30 PM. Med Sci Sports Exerc 2016;48:539.
[39] Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2010;51:121–9.
[40] Wong VW, Chan RS, Wong GL, Cheung BH, Chu WC, Yeung DK, et al. Community-based lifestyle modification programme for non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. J Hepatol 2013;59:536–42.
[41] Al-Jiffri O, Al-Sharif FM, Abd El-Kader SM, Ashmawy EM. Weight reduction improves markers of hepatic function and insulin resistance in type-2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver. Afr Health Sci 2013;13:667–72.
[42] Rezende RE, Duarte SM, Stefano JT, Roschel H, Gualano B, de Sa Pinto AL, et al. Randomized clinical trial: benefits of aerobic physical activity for 24 weeks in postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. Menopause 2016;23:876–83.

[43] Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol 2013;59:138–43.
[44] Arefhosseini SR, Ebrahimi-Mameghani M, Farsad Naeimi A, Khoshbaten M, Rashid J. Lifestyle modification through dietary intervention: health promotion of patients with non-alcoholic fatty liver disease. Health promotion. Perspectives 2011;1:147–54.
[45] Kani AH, Alavian SM, Esmaillzadeh A, Adibi P, Azadbakht L. Effects of a novel therapeutic diet on liver enzymes and coagulating factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a parallel randomized trial. Nutrition 2014;30: 814–21.
[46] Rodriguez-Hernandez H, Cervantes-Huerta M, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Decrease of aminotransferase levels in obese women is related to body weight reduction, irrespective of type of diet. Ann Hepatol 2011;10:486–92.
[47] Wing RR, Lang W, Wadden TA, Safford M, Knowler WC, Bertoni AG, et al. Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. Diabetes Care 2011;34:1481–6.
[48] Franz MJ, Boucher JL, Rutten-Ramos S, VanWormer JJ. Lifestyle weight-loss intervention outcomes in overweight and obese adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. J Acad Nutr Diet 2015;115:1447–63.
[49] Wilding JP. The importance of weight management in type 2 diabetes mellitus. Int J Clin Pract 2014;68:682–91.
[50] Umpierre D, Ribeiro PA, Schaan BD, Ribeiro JP. Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis. Diabetologia 2013;56:242–51.
[51] Rankin AJ, Rankin AC, MacIntyre P, Hillis WS. Walk or run? Is high-intensity exercise more effective than moderate-intensity exercise at reducing cardiovascular risk? Scott Med J 2012;57:99–102.
[52] Fisher G, Brown AW, Bohan Brown MM, Alcorn A, Noles C, Winwood L, et al. High intensity interval- vs moderate intensity-training for improving cardiometabolic health in overweight or obese males: a randomized controlled trial. PLoS One 2015;10:e0138853.
[53] Sawyer BJ, Tucker WJ, Bhammar DM, Ryder JR, Sweazea KL, Gaesser GA. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on endothelial function and cardiometabolic risk markers in obese adults. J Appl Physiol 2016;121:279–88.
[54] Marchesini G, Petta S, Dalle Grave R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: pathophysiology, evidence, and practice. Hepatology 2016;63:2032–43.
[55] Borghouts LB, Keizer HA. Exercise and insulin sensitivity: a review. Int J Sports Med 2000;21:1–12.
[56] Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Chapter nine—exercise and the regulation of hepatic metabolism. In: Claude B, editor. Progress in molecular biology and translational science: academic press; 2015. p. 203–25.
[57] Passos E, Ascensao A, Martins MJ, Magalhaes J. Endoplasmic reticulum stress response in non-alcoholic steatohepatitis: the possible role of physical exercise. Metabolism 2015;64: 780–92.
[58] Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 2015;149:367 e5–78 e5 [quiz e14–5].
[59] Vilar L, Oliveira CP, Faintuch J, Mello ES, Nogueira MA, Santos TE, et al. High-fat diet: a trigger of non-alcoholic steatohepatitis? Preliminary findings in obese subjects. Nutrition 2008;24:1097–102.
[60] Moore JB, Gunn PJ, Fielding BA. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. Nutrients 2014;6:5679–703.
[61] Chung M, Ma J, Patel K, Berger S, Lau J, Lichtenstein AH. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr 2014; 100:833–49.
[62] Browning JD, Baker JA, Rogers T, Davis J, Satapati S, Burgess SC. Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction. Am J Clin Nutr 2011;93:1048–52.
[63] Chong MF, Fielding BA, Frayn KN. Metabolic interaction of dietary sugars and plasma lipids with a focus on mechanisms and de novo lipogenesis. Proc Nutr Soc 2007;66:52–9.

Πίνακας 1*: Περιγραφικά χαρακτηριστικά των RCTs που χρησιμοποιήθηκαν στη μετα-ανάλυση.

Supplementary Table 2. Characteristics of the included randomized controlled clinical trials.												
Author [ref]	**Journal**	**Country**	**Sample (n)**	**Intervention group**	**Control group**	**Nafld definition**	**Age (y) (mean ± SD)**	**Sex (male)**	**Type of intervention**	**Time**	**Primary outcomes**	**Diabetes**
Exercise only interventions												
Eckard et al, 2013	Therap Adv Gastroenterol	Italy	56 NAFLD (36 NASH)	9 NAFLD	11 NAFLD	Liver biopsy	Intervention group: 52 ± 10. Control group: 51 ± 11.	Intervention group: 67%. Control group: 64%.	Intervention group: moderate aerobic + resistance exercise. EI: Mifflin–St Jeor equation using initial, actual BW + activity factor of 1.5 (light activity) subtracting 500 kcal/d for weight loss of 1 lb/wk. Exercise: 20–60 min, 4–7 d/wk (exercise log + pedometer). Control group: standard care.	6mo	Body weight, ALT, AST, NAS	Control group, 18%, intervention group: 22%

Sullivan et al, 2012	Hepatology	USA	18 NAFLD	12 NAFLD	6 NAFLD	IHTG content >10 % assessed by ^{1}H MRS	Intervention group: 48.6 ± 2.2. Control group: 47.5 ± 3.1.	Intervention group: 6. Control group: 1.	Intervention group: aerobic exercise: progressively increased the duration to 30-60 min, 5 times/wk at 45%-55% of their VO2 peak (i.e., brisk walk); (goal achieved at 4 wks). Control group: maintain their current activities of daily living.	16wks	Body weight, BMI, ALT, IHTG by ^{1}H-MRS	no
Pugh et al, 2014	Am J Physiol Heart Circ Physiol	UK	21 NAFLD	13 NAFLD	8 NAFLD	IHTG >5.5% measured by 1H MRS	Intervention group [mean (95% CI)]: 48 (44, 51). Control group [mean (95% CI)]: 47 (43, 51).	Intervention group: 7. Control group: 4.	Intervention group: Exercise: 30 min moderate-intensity aerobic exercise 3 times/wk at 30% of HRR for 4 wks. Intensity ↑ to 45% HRR the following 4 wks, until wk 8, where duration increased to 45 min. From wk 12, participants were exercising 5 times/wk for 45 min at 60% of their HRR. No dietary modifications. Control group: lifestyle advice provided at clinical consultation. No supervision or guidance beyond the initial advice.	16wks	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, GGT, IHTG by ^{1}H-MRS, HOMA-IR	no

Hallsworth et al, 2011	Gut	UK	21 NAFLD	11 NAFLD	10 NAFLD	>5% IHTG measured by ^{1}H-MRS and a score of < 1.445 on the NAFLD fibrosis scoring system	Intervention group: 52 ± 13.3. Control group: 62 ± 7.4.	NR	Intervention group: Resistance exercise: 3 times/wk for 8 wks; Each session lasted 45-60 min and consisted of a 10 min warm-up at 60% maximum HR on a cycle ergometer followed by resistance exercise done as a circuit, ending with a repeat of the warm-up described. Control group: standard care.	8wks	Body weight, BMI, WC, ALT, IHTG by ^{1}H-MRS,, HOMA-IR, HbA1c	NR
Zelber-Sagi et al, 2014	World J Gastroenterol	Israel	82 NAFLD	44 NAFLD	38 NAFLD	Ultrasound diagnosed fatty liver	Total sample: 46.47 ± 10.76	Total sample: 34 (53%)	Intervention group: Resistance exercise: training (RT) program according to the ACSM 2009 position paper; 3 times/wk; "Resistance Training for Healthy Adults". Exercises with 8-12 repetitions, 3 sets/exercise with 1-2 min rest, for 40 min. Participants excluded if weight loss >3 kg. Control group: home stretching general program.	3mo	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, GGT, HITG by US, HOMA-IR, HbA1c	no

Cuthbertson et al, 2016	Clin Sci	UK	50 NAFLD	30 NAFLD	20 NAFLD	>5.3% IHCL by ^{1}H-MRS	Intervention group [mean (95% CI)]: 50 (46, 58). Control group [mean (95% CI)]: 52 (46, 59).	Intervention group: 23. Control group: 16.	Intervention group: Moderate aerobic exercise: 3 times/wk 30 min moderate (30% HRR) exercise increasing weekly (5 times/wk 45min, 60% HRR by wk 12); No dietary modifications. Control group: Only advice for health benefits of exercise.	16wks	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, GGT, IHTG by ^{1}H-MRS,	no
Hallsworth et al, 2015	Clin Sci	UK	23 NAFLD	12 NAFLD	11 NAFLD	> 5% IHTG measured by ^{1}H-MRS (included patients with fibrosis score of ≤1.455)	Intervention group: 54 ± 10. Control group: 52 ± 12.	NR	Intervention group: Exercise: 3 times/wk high-intensity interval training (cycle ergometry) for 30-40min; 5-min warm up progressing from 'very light' to 'somewhat hard' cycling, followed by 5 intervals of cycling 'very hard', 3-min recovery periods and followed by a 3-min cool down after last interval. Each interval was 2-min long in the first wk with 10 s added per wk, so that intervals were 3 min and 50s long by wk 12. Control group: Standard care (regular monitoring of their conditions).	12wks	Body weight, BMI, ALT, AST, GGT, IHTG by ^{1}H-MRS,, HOMA-IR, HbA1c	NR

Shamsoddini et al, 2015	Hepat Mon	IRAN	30 NAFLD with diabetes type 2	10 NAFLD: aerobic group & 10 NAFLD: resistance exercise group	10 NAFLD	Ultrasound diagnosed fatty liver	Aerobic exercise group: 39.7 ± 6.3. Resistance exercise group: 45.9 ± 7.3. Control group: 45.8 ± 7.3.	30	Aerobic exercise group: 45 min 3times/wk at 75% maximum HR (from wk 2 till the end of intervention): warm up/treadmill training/cool down. Resistance exercise group: 45 min - 7 exercises: triceps press, biceps curl, calf raise, leg press, leg extension, lat pull down and sit-ups. 1-2wks: two circuits at 50% of 1RM; 3-4wks: two circuits at 60% of 1RM; 5-6wks: three circuits at 60% 1RM; 7-8wks: 3 circuits at 70% 1RM. Control group: no exercise program; daily exercise activity allowed.	8wks	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, IHTG by US, HOMA-IR	no
Bacchi et al, 2013	Hepatology	Italy	30 NAFLD with diabetes type 2	17 NAFLD: resistance exercise group	13 NAFLD in the aerobic exercise group	MRI: hepatic fat fraction cutoff of 5.56%	Resistance exercise group: 56.0 ± 1.9. Aerobic exercise group: 55.6 ± 2.0.	Resistance exercise group: 12. Aerobic exercise group: 10.	Aerobic exercise group: 60 min for 60-65% of maximum HR; treadmill, cycle, or elliptical machines. Resistance exercise group: 9 exercises: chest press, shoulder press, vertical traction, leg press, leg extension, leg curl, abdominal crunch) and free weight (biceps,	4mo	BMI, ALT, AST, IHTG by ^{1}H-MRS,	100%

									abdominal); 3 series of 10 repetitions at 70%-80% 1RM, with 1 minute of recovery between series.			
Shojaee-Moradie et al, 2016	The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism	UK	27 NAFLD	15 NAFLD: aerobic plus resistance exercise group	12 NAFLD in the control group	Elevated serum transaminases, indication of hepatic steatosis on ultrasound or by liver biopsy	Intervention group: 52.4 ± 2.2, Control group: 52.8 ± 3	All males (27)	Intervention group: Supervised aerobic + resistance -moderate intensity (40-60% of HRR) for 20 min to 1hour), 4-5 times/wk for 16 weeks. Control group: conventional lifestyle advices.	16wks	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, GGT, IHTG	no

Zhang et al, 2016	JAMA	China	147 NAFLD	73 NAFLD: moderate intensity group & 73 NAFLD: moderate-vigorous group	74 NAFLD	Ultrasonography confirmed also by ^{1}H-MRS > 5% IHTG	Control group: 54 ± 6.8, moderate group: 54.4 ± 7.4, moderate-vigorous group: 53.2 ± 7.1.	control group: 28, moderate group: 30.1%, moderate-vigorous group: 28.8%	Moderate exercise group: briskly walk at approximately 120 steps/minute at 45-55% of maximum predicted heart rate, 30 minutes per session and 5times/wk. Moderate-vigorous exercise group: jogging on a treadmill and gradually increasing exercise intensity to 65-80% of maximum predicted heart rate, 30 minutes, 5times/wk for 6mo and then switched to moderate intensity program. Control group: instructed not to change their physical activity routine	12 mo	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, GGT, IHTG	no
Houghton et al, 2016	Clinical Gastroenterology and Hepatology	UK	24 NASH	12 NASH aerobic plus resistance exercise	12 NAFLD	Liver biopsy	Intervention group: 54 ± 12, control group: 51 ± 16.	NR	Intervention group: supervised aerobic (cycling) at 16-18RPE (very hard) at 3 intervals of 2 minutes with 1 minute rest in between+ resistance exercise with a suitable weight at the same RPE; each session time was 45-60minutes, 3 times/wk for 12 weeks. Control group: continue standard care	12wks	Body weight, BMI, ALT, AST, GGT, IHTG, HOMA-IR, HbA1c	no

Diet plus exercise interventions												
Promrat et al, 2010	Hepatology	USA	31 NASH	21 NASH	10 NASH	Liver biopsy	Intervention group: 48.9 ± 10.9. Control group: 47.6 ± 12.0.	Intervention group: 14. Control group: 8.	Intervention group: Diet: Goal: ↓ 7-10% weight loss Diet: E: 1000-1200 kcal/d (28-33 g F) if baseline BW=200 lb or 1200-1500/d (33-42 g F) if BW=200 lb; Exercise: unsupervised using pedometers: 10.000 steps/d + 200 min/wk of moderate-intensity physical activity. Control group: principles of healthy eating, physical activity & weight control.	48wks	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, NAS, HOMA-IR, HbA1c	48%
Eckard et al, 2013	Therap Adv Gastroenterol	Italy	56 NAFLD (36 NASH)	2 intervention groups: 12 NAFLD in the LFDE group & 9 NAFLD in the MFDE group	11 NAFLD	Liver biopsy	LFDE group: 44 ± 11. MFDE group: 55 ± 5. Control group: 51 ± 11.	LFDE group: 50%. MFDE group: 67%. Control group: 64%.	LFDE group: C:F:P 60:20:20 with moderate exercise & MFDE group: C:F:P 50:30:20 with moderate exercise. EI in both groups: Mifflin–St Jeor equation using initial, actual BW + activity factor of 1.5 (light activity) subtracting 500 kcal/d for weight loss of 1 lb/wk. Exercise in both groups: 20–60 min, 4–7 d/wk (exercise log + pedometer). Control	6mo	Body weight, ALT, AST, NAS	control: 18%, LFDE: 8%, MFDE: 33%

									group: standard care.			
Wong et al, 2013	J Hepatol	Hong Kong	154 NAFLD	77 NAFLD	77 NAFLD	IHTG ≥5% measured by ^{1}H-MRS and plasma ALT >30 IU/L in men &>19 IU/L in women	Total sample: 51 ± 9.	Intervention group: 41. Control group: 31.	Intervention group: Diet: individual education for ↑ energy expenditure & ↓ caloric intake; sessions per wk in the first 4 mo & monthly in the following 8 mo. Exercise: moderate intensity aerobic exercise for 30 min, 3 to 5 d/wk & ↑ daily physical activities. Control group: routine care & instructions to reduce carbohydrate & fat intake plus exercise for 3 times/wk, 30mins/session.	12mo	Body weight, BMI, WC, ALT, AST, IHTG	Intervention group: 5%, control group: 10%

Al Jiffrie et al, 2013	Afr Health Sciences	Saudi Arabia	100 NAFLD	50 NAFLD	50 NAFLD	Elevated liver enzymes, liver biopsy	Total sample (range): 35-55.	NR	Diet: low calorie diet with E: 1200 kcal, P: 15%, F:30-35%, C: 50-55%. Exercise: aerobic treadmill-based training program, 65%- 75% of the maximum heart rate, 3times/wk (i.e. a total of 36 sessions per patient over a 3-month). Control group: only low calorie diet with E: 1200 kcal, P: 15%, F:30-35%, C: 50-55%.	3mo	BMI, ALT, AST, GGT, HOMA-IR	100%
Rezende et al, 2016	Menopause	Brazil	40 NAFLD	19 NAFLD	21 NAFLD	liver biopsy	Control group: 54.5 ± 8.9, Intervetion group: 56.2 ± 7.8	all women	Diet: -500kcal/day; P:35%, F:25%, CHO: 40%. Exercise: supervised aerobic exercise, 2times/wk, 30-50min, at VAT up to 10% below RCP	24wks	BMI, WC, ALT, AST, GGT, HOMA-IR, HbA1c	control group: 72%, intervention group: 84%
Moderate-carbohydrate versus low/moderate-fat diets												
Ryan et al, 2013	J Hepatol	Australia	12 NAFLD	12 NAFLD in the Mediterranean diet group	12 NAFLD in the low fat diet group	Evidence of steatosis both on ultrasonography and histology	Total sample: 55 ± 14.	Total sample: 6	Mediterranean diet group: traditional Cretan Mediterranean diet; The majority of foods (70%) were provided free to subjects: olives, dried fruit, nuts, Greek yoghurt, fish, and extra virgin olive oil; provided with precooked meals; C:F:P 40:40 (MUFA & n3	6 wk	Body weight, BMI, WC, ALT, GGT, IHTG, HOMA-IR	no

									PUFA):20. Low fat diet group: low fat-high carbohydrate diet: C:F:P 50:30:20 - Both diets were prepared and packed into individual servings.			
Arefhosseini et al, 2011	Health Promot Perspect	Iran	44 NAFLD	22 NAFLD in the low carbohydrate diet group	22 NAFLD in the low fat diet group	Ultrasonography & assessment of liver enzymes (ALT & AST)	Low fat diet group: 38.00 ± 8.10. Low carbohydrate diet group: 40.64 ± 8.33.	Low fat diet group: 12. Low carbohydrate diet group: 10.	Low fat diet group: C:F:P 55:25:20. Low carbohydrate diet group: C:F:P: 40:40:20; foods were given as eating plans with some substitutes, physical activity level stable.	6 wk	Body weight, BMI, ALT, AST ,	NR
Kani et al, 2014	Nutrition	Iran	30 NAFLD	15 NAFLD in the low calorie - low carbohydrate diet group	15 NAFLD in the low calorie diet group	Sonography & high levels of ALT- AST (both enzymes > 30 IU/L in men and >20 IU/L in women).	Low calorie - low carbohydrate diet group: 49.3 ± 3.5. Low calorie diet group: 45.6 ± 2.6.	Low calorie - low carbohydrate diet group: 7. Low calorie diet group: 7.	Low calorie - low carbohydrate diet group: - 200 (for overweight) & -500 kcal (for obese) & low carbohydrates: C:F:P 45:35:20. Low calorie diet group: -200 kcal for overweight & -500 kcal for obese. C:F:P 55:30:15.	8 wk	Body weight, BMI, ALT, AST	no

Rodriguez-Hernandez et al, 2011	Ann Hepatology	Mexico	54 NAFLD	28 NAFLD in the low carbohydrate diet group	26 NAFLD in the low fat diet group	Ultrasound and elevated ALT (>29 IU/L)	Low carbohydrate diet group: 46.3 ± 9.1. Low fat diet group: 45 ± 9.1.	0	Low carbohydrate diet group: C:F:P 45:28:27. Low fat diet group: C:F:P 54:21:25.	6 mo	Body weight, BMI, ALT, AST	Low carbohydrate: 21.4%, low fat: 7.6%

ACSM: American College of Sport Medicine, **ALT:** alanine transaminase**, AST:** aspartate aminotransferase, **BW:** Body weight**, C:** Carbohydrates**, E:** Energy**,F:** Fat**,** ^{1}**H MRS**: proton magnetic resonance spectroscopy, **HR:** Heart Rate**, HRR:** heart rate reserve, **IHCL:** intrahepatocellular lipid**, IHTG:** Intrahepatic triglycerides**, kcal:** kilocalories, **LFDE**: low-fat diet + moderate exercise**, LS:** Lifestyle Group**, MFDE**: moderate-fat / low-processed-carbohydrate diet + moderate exercise, **min:** minutes, **mo**: months, **MRI**: magnetic resonance imaging**, MUFA:** monounsaturated fatty acids**, NAFLD:** non-alcoholic fatty liver disease**, NASH:** non-alcoholic steatohepatitis**, NR**: not referred, **P:** Protein**, PA:** physical activity**, (n3) PUFA:** (omega 3) polyunsaturated fatty acids, **RCP:** respiratory compensation point **RM:** repetition maximum**, s:** seconds, **RCTs**: randomized control trial, **SFA:** saturated fatty acids**, VAT:** ventilatory anaerobic, threshold, **VO2:** Volume of O2**, wk(s):** week(s).

**(Όπως έχει γίνει δεκτός από το περιοδικό Metabolism – Clinical and Experimental).*

Πίνακας 2*: Αξιολόγηση ποιότητας των RCTs που συμπεριελήφθησαν στη μετα-ανάλυση.

Author [ref]	Journal	Randomization	Allocation concealment	Blinding of participants	Blinding of personnel	Blinding of assessors	Completeness of outcome data	Unbiased outcome reporting	Lack of other sources of bias	Overall Quality
Exercise alone interventions										
Sullivan et al, 2012	Hepatology	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	5/8
Pugh et al, 2014	Am J Physiol Heart Circ Physiol	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y	6/8
Hallsworth 2011	Gut	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8
Zelber-Sagi et al, 2014	World J Gastroenterol	Y	N	Y	N	N	Y	Y	Y	5/8
Cathbertson et al, 2015	Clin Sci	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	5/8
Hallsworth et al, 2015	Clin Sci	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	5/8
Bacchi et al, 2013	Hepatology	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y	6/8
Shamsoddini et al, 2015	Hepat Mon	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8

Shojaee-Moradie et al, 2016	J of Clin Endocrinology and Metabolism	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8
Zhang et al, 2016	JAMA Internal Medicine	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y	6/8
Houghton et al, 2016	Clinical Gastroenterology and Hepatology	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8
Diet plus exercise interventions										
Promrat et al, 2010	Hepatology	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	5/8
Eckard et al, 2013	Therap Adv Gastroenterol	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	5/8
Wong et al, 2013	J Hepatol	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	7/8
Al Jiffrie et al, 2013	Afr Healt Sciences	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8
Rezende et al, 2016	Menopause: The Journal of The North American Menopause Society	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8
Low carbohydrate versus low/moderate fat diets										
Ryan et al, 2013	J Hepatol	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8

Arefhosseini et al, 2011	Health Promot Perspect	Y	N	N	N	N	Y	N	Y	3/8
Kani et al, 2014	Nutrition	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	7/8
Rodriguez-Hernandez et al, 2011	Ann Hepatology	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	4/8

Y: the item is described, **N:** the item is not described.

**(Όπως έχει γίνει δεκτός από το περιοδικό Metabolism – Clinical and Experimental).*

Παράρτημα Β

I. Έντυπο Συγκατάθεσης

ΚΩΔΙΚΟΣ:

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΕΛ. ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ 70, 176 71 ΑΘΗΝΑ – ΤΗΛ. : 210 9549100, FAX: 210 9577050

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΕΓΩ, Ο/Η ……
ΚΑΤΟΙΚΟΣ …….
ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΩ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΩ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

Δηλώνω τη συγκατάθεσή μου για τη συμμετοχή μου σε ερευνητική μελέτη με τίτλο «**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ»** που διεξάγει το ερευνητικό προσωπικό του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου σε συνεργασία με τη Β' Παθολογική Κλινική, της Ιατρικής Σχολής, ΓΝΑ «Ιπποκράτειο».

Κατανοώ ότι πριν αρχίσει η παρέμβαση θα ενημερωθώ επαρκώς για τη φύση και το σκοπό της μελέτης. Αντιλαμβάνομαι πως όλες οι διαδικασίες θα γίνουν από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό και δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος για την υγεία μου από τη συμμετοχή μου στη μελέτη. Οποιαδήποτε ερωτήματά μου σχετικά με οποιαδήποτε διαδικασία της μελέτης θα απαντηθούν πλήρως από τους ερευνητές. Αν επιθυμώ, μπορώ να λάβω αναλυτικότερη περιγραφή των παραμέτρων που θα αξιολογηθούν και των μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν. Διατηρώ το δικαίωμα να διακόψω ανά πάσα στιγμή τη συμμετοχή μου στη μελέτη. Οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με τα αποτελέσματα των μετρήσεων που θα προκύψουν κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα παραμείνουν απόρρητα και θα χρησιμοποιηθούν από τους ερευνητές ανώνυμα για τους ερευνητικούς σκοπούς.

Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής με ελεύθερη βούληση.

Η σημερινή ημερομηνία είναι ……../……../20…….
Το παρόν υπογράφηκε υπό την παρουσία μου, καθώς και την παρουσία των ακόλουθων:

ΟΝΟΜΑ: ΥΠΟΓΡΑΦΗ

II. Φυλλάδιο NALFD

- ***Αύξηση της πρόσληψης διαιτητικών ινών μέσω αύξησης της κατανάλωσης φρούτων, λαχανικών και ελάχιστα κατεργασμένων αμυλούχων τροφίμων:***

  ⇒ Αντικαταστήστε τα επεξεργασμένα αμυλούχα τρόφιμα (άσπρο ψωμί, φρυγανιές, ζυμαρικά, ρύζι) με τα αντίστοιχα ολικής άλεσης ή ελάχιστα επεξεργασμένα.

  ⇒ Καταναλώστε τουλάχιστον 2 μερίδες οσπρίων/εβδομάδα. **Μία μερίδα όσπρια** ισοδυναμεί με ½ φλιτζάνι βρασμένα όσπρια (φακές, ρεβίθια, φασόλια).

  ⇒ Καταναλώστε 1-2 φρούτα και 2 μερίδες λαχανικών σε κάθε γεύμα (μεσημεριανό ή βραδινό) ανά ημέρα. **1 μερίδα φρούτου** = 1 μικρό πορτοκάλι = 2 μικρά μανταρίνια = 1 μικρή μπανάνα = 3 δαμάσκηνα ξερά, **1 μερίδα λαχανικών** = 1 φλιτζάνι τσαγιού ωμά λαχανικά = 1/2 φλιτζάνι τσαγιού βρασμένα λαχανικά.



•***Αύξηση φυσικής δραστηριότητας***: Αυξήστε την καθημερινή σας σωματική δραστηριότητα. Μειώστε το διάστημα που βρίσκεστε μπροστά σε οθόνη (τηλεόρασης/ υπολογιστή) κατά τον ελεύθερο χρόνο σας, σε λιγότερο από 2 ώρες/ημέρα. Αυξήστε σταδιακά τις καθημερινές σας δραστηριότητες όπως ανέβασμα σκάλας, κηπουρική, παρκάρισμα αυτοκινήτου σε μικρή απόσταση από τη δουλειά. Αν χρησιμοποιείτε μέσα μαζικής μεταφοράς κατεβείτε 1-2 στάσεις πιο μακριά και περπατήστε την υπόλοιπη διαδρομή. Προσθέστε μία μέτριας έντασης αερόβια σωματική άσκηση π.χ. περπάτημα τουλάχιστον 30 λεπτά καθημερινά συνεχόμενά ή διακεκομμένα.



ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΗ-ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ



Εργαστήριο Διατροφής & Κλινικής Διαιτολογίας,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ως μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) ορίζεται η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ (συκώτι), η οποία δεν οφείλεται στην υπέρ ετρη κατανάλωση αλκοόλ. Η νόσος περιλαμβάνει την απλή ηπατική στεάτωση και τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, που συνεπάγεται φλεγμονή του ήπατος (NASH). Η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελούν μεταξύ άλλων, τους κύριους παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Προς το παρόν δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη φαρμακευτική θεραπεία για τη νόσο και η τροποποίηση του τρόπου ζωής παραμένει η κύρια θεραπευτική οδός.

Η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής περιλαμβάνει:

- ***Διατήρηση υγιούς σωματικού βάρους***: Υπολογίστε τον Δείκτη Μάζας Σώματος σας και προσδιορίστε κατά πόσο το βάρος είναι φυσιολογικό ή όχι (***Πίνακας***). Σε περίπτωση που βρίσκεστε στην κατηγορία του υπέρβαρου ή παχύσαρκου προσπαθήστε να χάσετε το 5-10% του αρχικού σας βάρους σε 6 μήνες μειώνοντας τις μερίδες φαγητού που καταναλώνετε και αυξάνοντας τη σωματική άσκηση.

$$\text{Δείκτης Μάζας Σώματος} = \frac{\text{Σωματικό Βάρος (σε κιλά)}}{\text{Ύψος (σε μέτρα) x Ύψος (σε μέτρα)}}$$



Πίνακας: Όρια Δείκτη Μάζας Σώματος (kg/m^2)	
Κάτω από 18,5	Λιποβαρής
18,5-24,9	Φυσιολογικό
25-29,9	Υπέρβαρος
30-35	Α' βαθμός παχυσαρκίας
35-40	Β' βαθμός παχυσαρκίας
Πάνω από 40	Νοσογόνος παχυσαρκία

- ***Μείωση της πρόσληψης «βλαβερού» λίπους***:

  ⇒**Μειώστε την κατανάλωση κόκκινου κρέατος** (π.χ. αρνί, κατσίκι, μοσχάρι, χοιρινό) σε οποιαδήποτε μορφή (π.χ. κιμά, μπριζόλα, παϊδάκια κ.α.) σε λιγότερο από 2 φορές/εβδομάδα και σε μικρή ποσότητα κάθε φορά. Αποφύγετε κρεατοσκευάσματα (π.χ. λουκάνικα, αλλαντικά μπέικον, παστά κρέατα). Στη θέση του κόκκινου κρέατος καταναλώστε ψάρι, πουλερικά και αυγά. Εντάξτε τα λιπαρά ψάρια (σκου πρί, πέστροφα, ρέγγα, φρέσκο τόνο, σαρδέλα, τσιπούρα, φαγκρί, κολιός, χέλι) τουλάχιστον 2 φορές την εβδομάδα στο διαιτολόγιό σας.

  ⇒**Αντικαταστήστε το βούτυρο με ελαιόλαδο** σε όλες τις μαγειρικές σας παρασκευές. Περιορίστε την κατανάλωση έτοιμων φαγητών από fast-food, αρτοσκευασμάτων εμπορίου, όπως κρουασάν, κουλούρια, πίτες, κράκερ, βάφλες, κέικ κ.α.

  ⇒Επιλέξτε γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλά σε λίπος, όπως γάλα και γιαούρτι χαμηλών λιπαρών, τυριά μειωμένα σε λίπος (π.χ. ανθότυρο, κατίκι, μυζήθρα ανάλατη κ.α.).



- ***Μείωση της πρόσληψης γλυκών:*** Μειώστε την κατανάλωση γλυκών σε 2 φορές/εβδομάδα και περιορίστε την ποσότητα κατανάλωσης. Προτιμείστε πιο υγιεινές επιλογές όπως γλυκά του κουταλιού, ρυζόγαλο, λουκούμια, παστέλι, μαντολάτο και περιορίστε τα λιπαρά γλυκά όπως πάστες, σοκολάτες, τούρτες. Επιπλέον, περιορίστε την κατανάλωση αναψυκτικών και χυμών με ζάχαρη.



III. **Σχηματική απεικόνιση συνολικών διατροφικών στόχων ομάδας ΜΔ.**



IV. Σχηματική απεικόνιση συνολικών διατροφικών στόχων ομάδας MTZ.

